

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780071

研究課題名（和文）コメの亜鉛強化への応用を目指したイネの亜鉛輸送の分子機構解明

研究課題名（英文）Characterization of molecular mechanism of Zn transport in rice to fortify Zn of brown rice

研究代表者

上野 大勢 (UENO DAISEI)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授

研究者番号：90581299

研究成果の概要（和文）：本研究ではイネの亜鉛輸送に関わる 2 つの新規なトランスポーターを同定した。根の中心柱で高発現する OsMTP7 は酵母発現系で亜鉛の輸送活性を示した。また、OsMTP8 はその機能の欠損により亜鉛濃度が地上部で減少し、逆に根では上昇した。さらに、OsMTP8 は細胞膜への局在が認められたことから、OsMTP8 は亜鉛の転流に関与することが示唆された。この結果は、コメの亜鉛の強化に繋がる分子基盤となる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we identified two novel transporters for Zn in rice (*Oryza sativa*, L). OsMTP7 expresses around stele showed Zn transport ability in *Saccharomyces cerevisiae*. Knockout of *OsMTP8* resulted in decreased and increased accumulation of Zn in the shoots and roots, respectively. Signal of GFP fused with OsMTP8 was detected in plasma membrane. Further, accumulation of OsMTP8 is suppressed by elevated level of Zn. These results suggest that OsMTP8 is involved in Zn translocation. The findings in this study will be beneficial for Zn fortification in rice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：イネ、亜鉛、トランスポーター、CDF、MTP

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

亜鉛は鉄と並んで人間に最も不足しがちな必須ミネラルであり、全世界の 25% の人々が亜鉛欠乏状態にあると言われている。主要作物であるイネにおいて、種子中の亜鉛濃度を高めることは、亜鉛不足解消への有効な解決策と考えられるが、そのためには亜鉛集積に関わる分子基盤を明らかにする必要がある。しかし、イネの亜鉛輸送機構は未解明な点が多い。

(2) 着想に至った経緯

植物における亜鉛濃度の上昇には同族の有害

害元素であるカドミウムの濃度上昇が付随してしまう。しかし、研究代表者等がこれまでに発見したカドミウムトランスポーターにより、カドミウムの蓄積を抑制しつつ亜鉛の濃度を強化した、理想的な高機能米を生み出すイネの創成に繋がる研究を想起した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、人間に不足しがちな必須元素・亜鉛を、主要穀物であるコメにおいて強化するために、イネの亜鉛輸送の分子機構を解明することである。第一に亜鉛がコメに通じる篩管に輸送されるまでの、(i) 根から地上部へ導管を通じて移行する経路、第二に

(ii)集積部位から転流する経路に関与するトランスポーター遺伝子を同定することである。

3. 研究の方法

(1) 亜鉛輸送に関与する遺伝子のスクリーニング

根から地上部への移行に関わるトランスポーター遺伝子は中心柱付近で発現していると考えられた。そこで、イネの網羅的遺伝子発現データベース「RiceXPro」を利用し候補遺伝子を選抜した。また、候補遺伝子が属するファミリーのイネ変異株を取得し、亜鉛輸送、特に再転流に関与すると考えられる候補遺伝子のスクリーニングを行った。

(2) トランスポーター遺伝子の機能解析

分子生物学的、生理学的、生化学的的手法を用いて、選抜した遺伝子及びコードするタンパク質の発現誘導、局在性、輸送基質の解析を行なった。また、ノックアウトあるいはノックダウン影響、さらには過剰発現による亜鉛集積への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 新規亜鉛輸送体の選抜

本実験では中心柱付近で高発現する遺伝子から *OsMTP7* (metal tolerance protein 7) を亜鉛の地上部への移行に関与する候補遺伝子として選抜した。*OsMTP7* が属する CDF (cation diffusion facilitator) ファミリータンパク質は様々な 2 価重金属イオン(亜鉛、カドミウム、コバルト、マンガン、鉄、ニッケル)を輸送基質とする。CDF ファミリーは 5 個から 6 個の膜貫通領域を有し、ダイマーやオリゴマーの形態でプロトンとの対向輸送により、細胞質から細胞小器官あるいは細胞外への排出を担うことが知られている。また、同ファミリーのイネ変異株を用いたスクリーニングによって、再転流に関与し得る候補遺伝子として *OsMTP8* を選抜した。

(2) *OsMTP7* は亜鉛を輸送基質とする

CDF ファミリーは基質特異性の低いトランスポーターファミリーであるが、主な輸送基質により、Zn-CDF、Fe/Zn-CDF、Mn-CDF の 3 種のサブファミリーに分類される。*OsMTP7* はこの中で Fe/Zn-CDF に属するが、これまで植物においてこのサブファミリーで機能が明らかにされたものはない。そこで、本研究では酵母発現系を用いて亜鉛と鉄の輸送活性を調べた。相補試験において、*OsMTP7* の発現は亜鉛過剰条件下での亜鉛感受性株 ($\Delta zrc1cot1$) の生育を野生株同様に回復させた (図 1)。一方、鉄感受性株 ($\Delta ccc1$) の生育には影響を与えなかった。これらの株では何れも液胞膜局在型のトランスポーターをコー

ドする遺伝子が欠損していることから、*OsMTP7* は亜鉛を輸送基質とし、鉄は輸送基質としないことが示唆された。

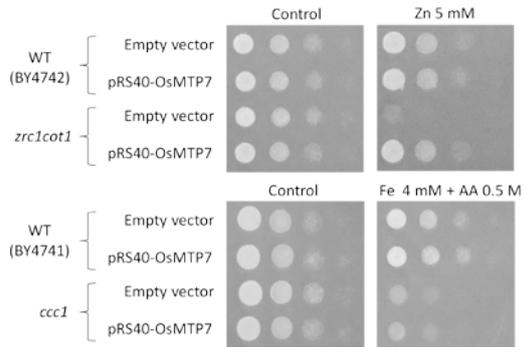


図 1 酵母機能相補試験

次に *OsMTP7* の亜鉛輸送能を検証するために、酵母において亜鉛吸収実験を行った。その結果、野生株においてはベクターコントロールと *OsMTP7* 発現株との間に亜鉛の濃度差は見られなかった。しかし、 $\Delta zrc1cot1$ 株においては、*OsMTP7* 発現株はベクターコントロールに対して 16 倍高い濃度で亜鉛を集積していた (図 2)。このことは、 $\Delta zrc1cot1$ 株で損なわれている亜鉛を液胞に隔離する能力を *OsMTP7* が相補したことを示唆している。

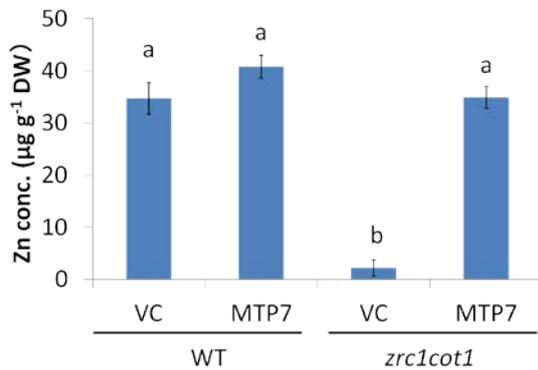


図 2 酵母における *OsMTP7* の亜鉛輸送活性 エラーバーは土標準偏差を示す ($n = 3$)。異なるアルファベットは有意差を示す。

(3) *OsMTP7* の役割

植物における *OsMTP7* の機能と役割を明らかにするために、RNAi ラインを作成し亜鉛集積への発現抑制の影響を調べた。しかし、*OsMTP7* の発現が野生株の 1/10 程度であっても、地上部と根ともに RNAi ラインと野生株の間に差が見られなかった。また、過剰発現株を作成し同様に検討したが、亜鉛のみならず、その他の重金属元素濃度に野生株との違いは見られなかった。これらの結果は、*OsMTP7* が組織レベルの濃度変化には関与しない細胞内輸送に関わる可能性を示唆している。あるいは、機能重複するトランスポー

ターにより欠損の影響が現れにくかった可能性もあるが、中心柱付近で高発現する遺伝子群の中にはホモログは含まれていなかった。

また、亜鉛過剰及び過剰処理による *OsMTP7* 発現への影響をリアルタイム RT-PCR により解析した結果、コントロールとの差は認められなかった。CDF ファミリートランスポーターの発現は概して構成的であるか、翻訳レベルで調節されていることが知られている。ノックダウンや過剰発現で表現型の違いが現れなかったのは、*OsMTP7* タンパク質が一定レベルに保たれている可能性があった。それを検証するためにポリクローナル抗体を作成し、ウエスタン解析により野生株と形質転換株のタンパク質レベルの比較を試みたが、同タンパク質に対応するシグナルを検出することはできなかった。*OsMTP7* の機能解明にはこれらの課題の解決が必要である。

(4) *osmtp8* の表現型

イネには 10 種類の CDF ファミリーホモログが存在する。それらの遺伝子の Tos17 または T-DNA 挿入株を取得し、亜鉛集積性を解析することにより *OsMTP8* の選抜に至った。*OsMTP8* は Mn-CDF サブファミリーに属する。通常濃度 ($0.4 \mu\text{M}$) の亜鉛を処理した場合は野生株と変異株の間に差は見られなかったが、過剰処理 ($10 \mu\text{M}$) の場合、変異株の亜鉛濃度は野生株に対し地上部で 20%低下したが、逆に根では 43%上昇した (図 3)。

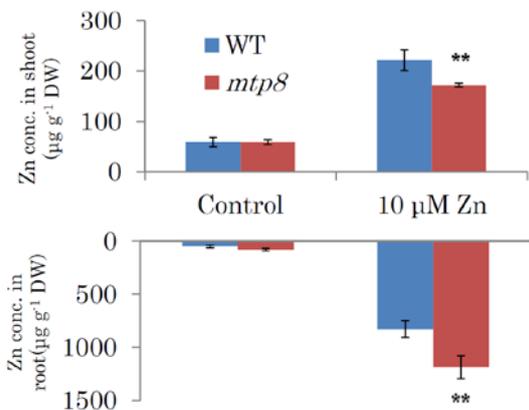


図 3 *OsMTP8* 欠損による地上部と根の亜鉛濃度への影響

エラーバーは土標準偏差を示す ($n = 3$)。

** $P < 0.01$

一方、*OsMTP8* が Mn-CDF に属することから、マンガ集積についても検討した。亜鉛の場合と同様に通常濃度 ($0.5 \mu\text{M}$) のマンガ処理時には変異株と野生株の間で集積性の違いは見られなかった。しかし、 $50 \mu\text{M}$ マンガン過剰処理時には約 2 割、 $200 \mu\text{M}$ マンガン過剰処理時には約 4 割根のマンガ濃度が低下した (図 4)。このように根においては亜

鉛過剰による亜鉛集積への影響とは逆の傾向が見られた。地上部においては何れの処理濃度においても変異株と野生株の間に差は見られなかった。

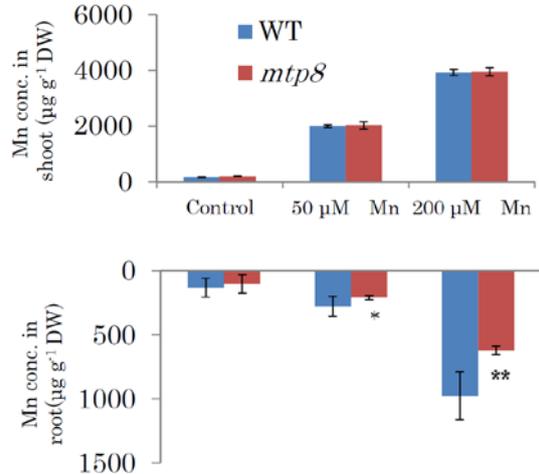


図 4 *OsMTP8* 欠損による地上部と根のマンガ濃度への影響

エラーバーは土標準偏差を示す ($n = 3$)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

なお、その他の必須金属元素には違いがなかった。これらの結果は、*OsMTP8* が亜鉛とマンガをともに輸送基質とすることを示唆している。

(5) *OsMTP8* の細胞内局在

細胞内局在を解析するために、タマネギの表皮細胞における GFP 融合タンパク質の一過発現を観察した。その結果、GFP の蛍光は細胞の外周に観察された (図 5)。この時、液胞膜のマーカータンパク質である SPY51 と連結した RFP は細胞の内側に核をよけるように観察された。この結果は、*OsMTP8* は細胞膜に局在することを示唆している。

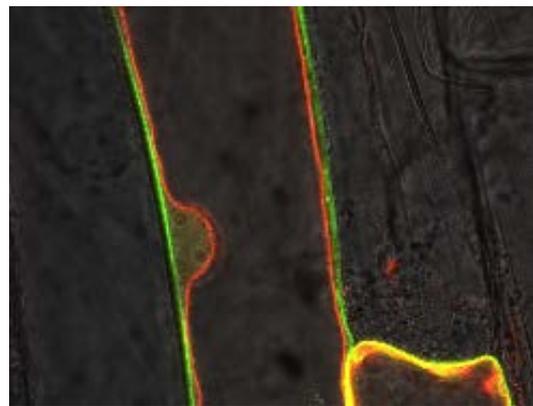


図 5 *OsMTP8*:GFP (緑) 及び SPY51:RFP の一過発現

(6) 酵母発現系による輸送活性の解析

OsMTP8 の亜鉛及びマンガへの輸送活性を酵母発現系を用いて解析した。亜鉛の輸送活

性は $\Delta zrc1cot1$ 株の相補性試験により検討したが、OsMTP8 の導入は同株の亜鉛感受性を相補しなかった。一方、マンガン輸送活性の解析にはマンガン感受性株 ($\Delta smf1$) を用いた。このときマンガン輸送活性が確かめられているホモログ OsMTP8.1 をポジティブコントロールとして用いた。結果として、OsMTP8 は OsMTP8.1 と比較すると程度は弱いものの、ベクターコントロールと比較して顕著に $\Delta smf1$ のマンガン感受性を改善した (図 6)。

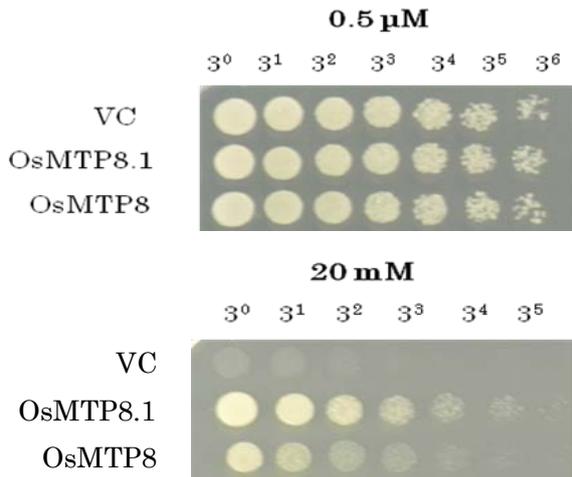


図 6 OsMTP8 における酵母相補性試験
マンガン感受性株 ($\Delta smf1$) を形質転換し、 $0.5 \mu\text{M}$ 及び 20 mM マンガン培地で培養。

(7) OsMTP8 タンパク質蓄積に対する亜鉛過剰とマンガン過剰の影響

マンガン過剰と亜鉛過剰による OsMTP8 タンパク質の発現への影響を解析するために、ウェスタンブロッティングを行なった。野生株と OsMTP8 変異株の OsMTP8 タンパク質の発現を比較したところ、OsMTP8 の予想される分子量 (45.7 kDa) 付近及び 100 kDa 付近に地上部と根共に野生株においてのみバンドが検出された (図 7)。そのため、低分子量のバンドが単量体、高分子量のバンドが多量体と考えられた。

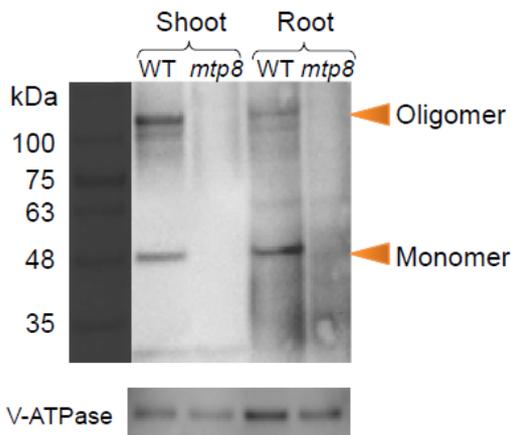


図 7 抗 OsMTP8 抗体の特異性

予想サイズ付近のバンドは何れのマンガン過剰処理、亜鉛過剰処理において濃度の違いは観察されなかったが、 100 kDa 付近に検出されたバンドはマンガン濃度の上昇に伴い濃くなり、亜鉛濃度の上昇に伴い薄くなった (図 8)。

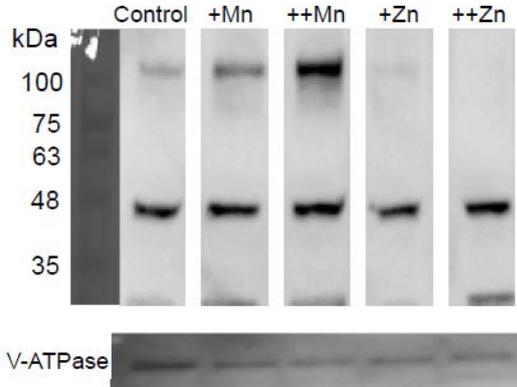


図 8 OsMTP8 蓄積に対するマンガン過剰及び亜鉛過剰の影響

このように、OsMTP8 タンパク質の発現がマンガンと亜鉛の過剰に対して逆の応答を示したことは、*osmtp8* の根において見られた両金属の濃度変化 (野生株に対して亜鉛過剰処理時に濃度が上昇、マンガン過剰処理時に減少) の原因となっていると考えられる。

以上の結果は OsMTP8 が細胞膜に局在し、細胞質から細胞外へと亜鉛とマンガンを排出することによって、これらの金属の転流に関与することを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

① 上野大勢. Functional analysis of OsMTP7, a member of Zn/Fe-CDF in rice. 日本植物生理学会岡山大会. 平成 25 年 3 月 21 日~3 月 23 日. 岡山市

② 上野大勢. 植物のマンガンホメオスタシス. 日本土壌肥料学会鳥取大会. 平成 24 年 9 月 4 日~9 月 8 日. 鳥取市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 大勢 (UENO DAISEI)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授
研究者番号: 90581299