

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248014

研究課題名(和文) イネの有害元素集積を制御する遺伝子の同定と応用

研究課題名(英文) Identification and application of genes involved in accumulation of toxic elements in rice

研究代表者

馬 建鋒 (Ma, Jian Feng)

岡山大学・その他部局等・教授

研究者番号：80260389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：イネのカドミウムやヒ素の集積に関する新規遺伝子の同定を行った。カドミウムの集積に関して、カドミウム吸収の主要輸送体OsNramp5を同定した。OsNramp5は根の外皮と内皮細胞の遠心側に偏在していた。また液胞膜に局在するカドミウム輸送体遺伝子OsHMA3を過剰発現させると、カドミウムの耐性も増加した。さらにカドミウムの種子への分配には節で発現しているOsHMA2が関与していた。一方、ヒ素の集積に関して、OsABCC1が種子へのヒ素の集積を抑制していることを明らかにした。OsABCC1は主に節の篩部伴細胞の液胞膜に局在していた。

研究成果の概要(英文)：We identified novel genes involved in accumulation of cadmium (Cd) and arsenic (As) in rice. We found that OsNramp5 is a major transporter for Cd uptake in rice. OsNramp5 is polarly localized at the distal side of root exodermis and endodermis. Over-expression of OsHMA3, a tonoplast-localized Cd transporter, resulted in enhanced tolerance to Cd toxicity. Furthermore, we found that OsHMA2 localized at the node is involved in distribution of Cd to the grain. On the other hand, we found that OsABCC1 reduces As accumulation to the grain in rice. OsABCC1 is mainly localized to the tonoplast of phloem companion cells of the node.

研究分野：植物栄養学

キーワード：カドミウム ヒ素 イネ トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

土壌中にある有害元素(ヒ素とカドミウム)は食物連鎖を経て我々の健康を害する。カドミウムによるイタイイタイ病やヒ素による慢性中毒は今でも世界で問題になっている。イネは日本を始めアジア各国の主食でもあることから、コメからのカドミウムやヒ素摂取が総摂取量の多くの割合を占めている。従って、コメ中のカドミウムやヒ素を低減させることは健康上非常に重要な課題である。これまでにイネは土壌中の亜ヒ酸をケイ酸輸送体 Lsi1 と Lsi2 を介して吸収することが明らかにされていた。また OsHMA3 がカドミウムの集積に関与していることが報告されていた。しかし、土壌中のカドミウムやヒ素が最終的に種子まで輸送されるには、様々な輸送体の関与が予想されるが、そのほとんどがまだ未同定のままであった。

2. 研究の目的

本研究は主食であるコメ中のヒ素とカドミウムの集積を減らすことを目指して、イネにおけるこれらの有害元素の吸収、輸送、分配などに関与する遺伝子を同定し、様々な手法でこれら遺伝子の機能やその制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

イネをカドミウムやヒ素を含む水耕溶液または土壌で栽培し、各器官をサンプリングした。ミネラルの測定は硝酸分解後、ICP-MSで行った。遺伝子の発現量は定量的RT-PCRで、タンパク質の局在は抗体染色で行った。金属の輸送活性は酵母などに遺伝子を発現させて測定した。

4. 研究成果

(1) イネカドミウムの集積に関する遺伝子の同定

イネの根のカドミウム吸収に関する遺

伝子 OsNramp5 を同定した。OsNramp5 は全生育期間を通して主に根で発現しており、また根の先端部より基部側で高発現していた。各種必須金属欠乏に対する OsNramp5 の発現応答を調べた結果、マンガン、鉄、銅、亜鉛のいずれの欠乏によっても発現が変動せず、恒常的に発現していた。抗体染色で OsNramp5 の組織・細胞局在性を調べた結果、OsNramp5 は根の内皮と外皮細胞に局在し、興味深いことにいずれの細胞でも遠心側に極性局在を示していた(図1)。また GFP との融合遺伝子をタマネギの表皮細胞に発現させて細胞内局在を観察したところ、細胞膜に局在していた。この遺伝子の役割を明らかにするために T-DNA 挿入による遺伝子破壊株を取得し、生理的な解析を行った。吸収 Kinetics を調べた結果、OsNramp5 が破壊されると、根によるカドミウムの吸収がほとんど失われた。さらに土耕栽培すると、破壊株のわら及び玄米中のカドミウムの濃度は破壊株で大幅に低下したが、籾収量も低下してしまった。これは OsNramp5 がマンガンの輸送体でもあるため、OsNramp5 の破壊はマンガンの吸収の大幅な低下を招いてしまった。

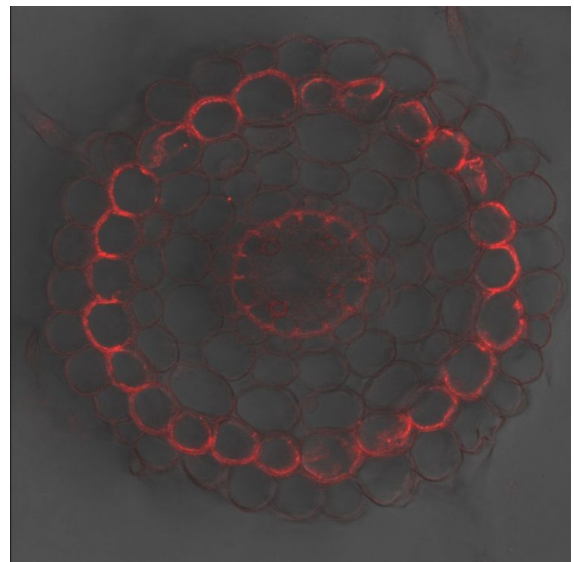


図1 OsNramp5 の局在

抗体染色による OsNramp5 の根での局在を示す。OsNramp5 は根の外皮と内皮細胞の遠心側に偏在している。

また根の液胞膜に局在するカドミウム輸送体 OsHMA3 をさらに解析した結果、OsHMA3 を過剰発現させると、カドミウム耐性も強くなった(図1)。これは吸収されたカドミウムが根の液胞膜に隔離されることによって、地上部への輸送が少なくなるからである。また OsHMA3 はカドミウム以外に、亜鉛も輸送するが、亜鉛の輸送に関わる4種類のトランスポーター遺伝子の発現が常に誘導されているために、カドミウムとは異なり、地上部には一定の亜鉛レベルが維持されていた。



図2 OsHMA3 の過剰発現はカドミウム耐性を付与。異なるカドミウム処理濃度下における野生型(WT)、ベクターコントロール(VC)と過剰発現体 OX)の生育

さらにイネの節で発現する OsHMA2 が種子へのカドミウムの分配に関与することを突き止めた。OsHMA2 は根では内鞘細胞、節では肥大維管束と分散維管束の篩部に発現していた。この遺伝子を破壊すると、種子へのカドミウムの分配が減少した。しかし、コメ収量の低下も引き起こした。これは OsHMA2 が亜鉛の優先的分配にも関与しているからである。

その他に、カドミウム集積の品種間差を利用して、マッピング集団を作成し、いくつかのカドミウム集積に関する QTL を検出した。

(2) イネのヒ素集積に関する遺伝子の同定

イネの節で発現する OsABCC1 輸送体タンパク質がコメ穀粒へのヒ素の蓄積を抑制する働きがあることを突き止めた。OsABCC1 遺伝子はイネのどの組織にも発現していたが、特に節で高発現していた。この遺伝子の発現は低濃度のヒ素には応答しなかった。OsABCC1 は節の分散維管束の篩部に局在していた。OsABCC1 を破壊すると、節のヒ素が減少し、種子のヒ素が増加した。抗体染色や western blot を行った結果、OsABCC1 は液胞膜に局在していた。また酵母に OsABCC1 を発現させると、ヒ素耐性が増加した。さらにシロイヌナズナの atabcc1/atabcc2 変異体に形質転換すると、ヒ素耐性が回復した。チオール化合物の細胞内局在を染色法で調べた結果、野生型イネではほとんど液胞膜に局在していたのに対して、osabcc1 の破壊株では細胞質に局在していた。第 II 節の下から短期間(24 時間)のヒ素を与えて、その分配を調べたところ、野生型イネと比べ、osabcc1 破壊株では、種子へのヒ素の分配が増加した。これらのことから、OsABCC1 は根では、ヒ素-チオール複合体を液胞へ隔離することによって、ヒ素毒性耐性に寄与し、また節では、篩部伴細胞の液胞へヒ素化合物を隔離することによって、種子へのヒ素の輸送を制限していることが明らかとなった(図3)。

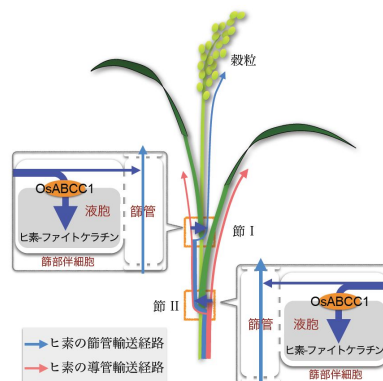


図1 種子へのヒ素集積における OsABCC1 の役割の模式図

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)

[雑誌論文] (計 7 件) 全て査読有

Song, W. Y., Yamaki, T., Yamaji, N., Ko, D., Jung, K. H., Fujii-Kashino, M., An, G., Martinoia, E., Lee, Y. and Ma, J. F. 2014. A rice ABC transporter, OsABCC1, reduces arsenic accumulation in the grain. Proc Natl Acad Sci USA 111: 15699-15704.

Yamaji, N. and Ma, J. F. 2014. The node, a hub for nutrient distribution in gramineous plants. Trends in Plant Sci. 19: 556-563.

Sasaki, A., Yamaji, N. and Ma, J. F. 2014. Overexpression of OsHMA3 enhances Cd tolerance and expression of Zn transporter genes in rice. J. Exp. Bot. 65: 6013-6021.

Milner, M., Mitani-Ueno, N., Yamaji, N., Yokosho, K., Craft, E., Fei, Z., Ebbs, S., Zambrano, M., Ma, J. F.*, Kochian, L*. 2014. Root and shoot transcriptome analysis of two ecotypes of *Noccaea caerulescens* uncovers the role of NcNramp1 in Cd hyperaccumulation. Plant J. 78: 398-410 (*co-corresponding author).

Yamaji, N., Xia, J., Mitani-Ueno, N., Yokosho, K. and Ma, J. F. 2013. Preferential delivery of Zinc to developing tissues in rice is mediated by P-type heavy metal ATPases OsHMA2. Plant Physiol. 162: 927-939. doi:10.1104/pp.113.216564

Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K. and Ma, J. F. 2012. Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. Plant Cell 24: 2155-2167.

Milner, M. J., Craft, E., Yamaji, N., Koyama, E., Ma, J. F. and Kochian, L. V. 2012. Characterization of the high affinity Zn transporter from *Noccaea caerulescens*,

NcZNT1, and dissection of its promoter for its role in Zn uptake and hyperaccumulation. New Phytol. 195: 113-123.

[学会発表] (計 14 件)

Song, W-Y., Yamaki, T., Yamaji, N., Lee, Y. and Ma, J. F.: Further characterization of OsABCC1 involved in As accumulation in rice. 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京, 3月16日 - 18日, 2015. p.127. (3月16日発表)

Ma, J. F. Transporters involved in cadmium accumulation in plants. Development of “Knowledge about Agriculture” through the International Collaboration between the University of Tokyo, Japan and the Southwest University, China. Tokyo, Japan, Sep. 12-13, 2014.

鄧 鋒林・福岡修一・正村純彦・安藤 露・馬 建鋒: Physiological and genetic characterization of two rice cultivars differing in Cd accumulation. 日本土壤肥料学会年会, 東京, 9月9日 ~ 11日, 2014.

馬 建鋒・夏 継星・山地直樹: OsHMA3 輸送体の組織局在の改変による低カドミウム米作出の試み. 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 3月18日 - 20日, 2014.

山木智央・山地直樹・Won Yong Song・Youngsook Lee・馬 建鋒: イネのヒ素耐性と分配に関する輸送体の解析. 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 3月18日 - 20日, 2014.

Ma, J. F. Transporters responsible for cadmium accumulation in rice. 29th IPSR International Symposium and 5th Symposium on Plant Stress Science. Kurashiki, Japan, March 7-8, 2013. (March 7 発表)

Ma, J. F. Transporters involved in Cd accumulation in rice. 4th Annual Conference

on Cost Action FA 0905, Mineral Improved Crop Production for Healthy Food and Feed. Oslo, Norway, June 9-13, 2013. (Keynote speakers, June 11 発表)

Ma, J. E., Yamaji, N., Sasaki, A., Mitani-Ueno, N. and Ueno, D. Mineral transport from soil to seed. XVII International Plant Nutrition Colloquium 2013, Plant Nutrition for Nutrient and Food Security. Istanbul, Turkey, Aug. 19-22, 2013 (Aug. 22 発表)

Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K. and Ma, J. E. OsNramp5 is a major transporter for uptake of Mn and Cd in rice. XVII International Plant Nutrition Colloquium 2013, Plant Nutrition for Nutrient and Food Security. Istanbul, Turkey, Aug. 19-22, 2013 (ポスター発表)

馬 建鋒:植物におけるミネラル輸送機構 - 輸送体の同定で解き明かされる植物栄養の仕組み. 土と肥料の講演会, 東京, 4月4日, 2013. (招待講演)

馬 建鋒:植物の金属輸送システム. 第23回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 東京, 6月21~22日, 2013. (特別講演、6月21日、武蔵野大学)

山本智央・山地直樹・馬 建鋒:イネのヒ素耐性と集積に関与する輸送体 ABC1. 第109回日本土壌肥料学会関西支部講演会, 山口, 11月28日, 2013.

馬 建鋒:イネヒ素とカドミウム吸収の分子機構. 日本薬学会第132年会 札幌, 3月28日 - 31日, 2012.

馬 建鋒:植物の遷移金属の輸送体. Plant transporters for transition metals. 第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6月20日 - 22日, 2012.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/plant.stress/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬 建鋒 (MA, Jian Feng)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号: 80260389

(2) 研究分担者

山地 直樹 (YAMAJI, Naoki)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教授

研究者番号: 00444646

三谷奈見季 (MITANI, Namiki)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号: 40581020

(3)連携研究者

()

研究者番号：