島根大学プロジェクト研究推進機構 『萌芽研究部門』	平成２４年度	**年度報告書**	提出日 平成２５年２月１５日

① プロジェクト名	東北地方の農業復興に役立つ遺伝子群の探索と機能解析		
② プロジェクトリーダー	秋廣　高志	所属	生物資源科学部
		電子メール	akihiro@life.shimane-u.ac.jp

③ プロジェクトの概要（プロジェクトの最終年度における到達目標を簡潔に記入してください。）

東日本大震災の後に起こった大津波や原発事故により、東北地方の農業は壊滅的な被害を受けている。本研究では、早期の農業復興に貢献しうる遺伝子の単離を目指し研究をすすめている。

農業復興において最も必要とされている遺伝子の１つとして、セシウムまたはストロンチウムの輸送体遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子が単離できれば、これらの遺伝子を持たないイネつまりセシウムやストロンチウムを吸収できないイネを作出することが可能となると考えられる。本年度は、これらの遺伝子の探索を行い、候補となる遺伝子群の単離に成功した。一部の遺伝子についてはこれらの遺伝子を欠損したイネの獲得にも成功しており、来年度は、これらのイネのセシウム吸収特性を明らかにすることを目指す。

本研究の目標はもう一つある。それは、我々が開発した輸送体遺伝子のスクリーニングシステム（イネの輸送体遺伝子約 1,500 個を発現するライブラリー：世界に 1 つしかない）を世界的な研究リソースとして国内外の研究グループに利用してもらうことである。本年度は、マグネシウムやニッケルの輸送体について国内の研究者との共同研究を開始した。３月には International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2013)にて発表を行い、海外の研究者との交流も積極に図る予定である。

④ プロジェクトのメンバー及び役割

氏　名	所属（職）	本年度の役割分担
（プロジェクトリーダー） Takashi AKIHIRO 秋廣　高志	生物資源科学部生物科学科・助教	セシウム、ストロンチウム、カドミウム、ヒ素、ニッケル輸送体タンパク質の選抜
Ishikawa TAKAHIRO 石川　孝博	生物資源科学部生命工学科・教授	糖およびビタミンC輸送体の選抜

⑤（1）本年度の研究計画目標の達成状況及び自己評価

（本年度当初の計画書に書かれた内容に沿って，計画と達成目標を箇条書きにしてください。また，その達成目標の項目ごとにその達成状況を記入し，以下の基準に従って自己評価して下さい。

A ： 目標以上に成果をあげた。

B ： ほぼ目標通りの達成度で予定した成果をあげている。

C ： 計画より遅れ気味であるが年度末には目標達成が可能である。

D ： 年度末までに目標達成は不可能である。

自己評価が B 以外の場合には，その原因についても記載して下さい。 2～3月に行う計画のため未執行の場合には評価を空欄にして下さい。）

計画と達成目標	達成状況と自己評価
① セシウム・ストロンチウムに感受性を示すスクリーニングホストの選抜・作製。	「Cs への感受性を 5mM 程度（野生型の 5 倍）、Sr への感受性を 50mM 程度（野生型の 5 倍）に低減させる」、ことを目標とし、6,000 株の変異体ライブラリーから感受性株をスクリーニングした。Cs で 10mM 程度、Sr で 80mM 程度にまで感受性を低減させることに成功できた。予定通り実施した。 **（自己評価）B**
② ①で選抜した酵母をホストにライブラリーを構築する。糖の輸送に変異を持つ酵母をホストとしたライブラリーを作成する。	「①で選抜・作製した酵母に導入しライブラリーにイネのトランスポーター遺伝子を導入し、グリセロールストックを作成する。」ことを目標とし、ストロンチウム感受性株と糖の輸送に変異を持つ酵母を宿主としたライブラリーの構築に成功した。 **（自己評価）B**
③ セシウム、ストロンチウム、カドミウム、ヒ素、ニッケル、糖、ビタミン C を含む培地を作成し、スクリーニング条件を検討する。	「ベクターコントロールを導入した酵母を用いたスクリーニング条件（具体的には基質の濃度と培養時間）を決定する」ことを目標とし、全ての選抜条件を決定した。概ね予定通り実施した。マグネシウムを新たに加えた。 **（自己評価）B**
④ ③で決定した条件でスクリーニングを行う。	「擬陽性クローンを排除する目的で3次スクリーニングまで行う。選抜したクローンは液体培養においても感受性を示すことを調査する」を目標とし実験を行った。どの元素も固形培地での選抜は行ったが、液体培地での選抜まで行かないものもあった。陽性クローンが単離できなかったことが原因となっている。 **（自己評価）B**
⑤ 単離した遺伝子のイネにおける発現部位および細胞局在を解明する	「イネを栽培し各種処理を行った後、RNA を抽出し RT-PCR により発現量と発現部位を特定する。GFP との融合遺伝子を遺伝子銃を用いて長ネギの細胞に導入し、細胞内局在を明らかにする」ことを目的とし、セシウム輸送体と思われる候補タンパク質についてのみ⑤の実験を実施した。遺伝子の発現がある組織は特定できたが、細胞内局在までは明らかに出来なかった。 **（自己評価）B**
⑥ 単離した遺伝子の発現抑制体や過剰発現体の作製単離した遺伝子の発現抑制体や過剰発現体の作製	「コンストラクションの作製（バイナリーベクターの構築）。形質転換および再分化体の作製」を目的としたが、実験は実施しなかった。自ら実験材料を選抜せずに、リソースセンターから入手できることが明らかになったことが原因となっている。 **（自己評価）C**

(2) プロジェクト全体の自己評価 (プロジェクト全体としての達成目標から，今年度の研究成果がこれまでの経過・成果にもとづいてどの段階にあるのかを明示して下さい。また，各グループ間での連携状況についても記入してください。)

●プロジェクト全体評価(自己評価) プロジェクト全体としての達成目標に対する今年度の研究成果の達成状況について
(自己評価)

本研究は東北地方の農業復興に役立つ遺伝子群を単離し、現場に提供することを目的としている。平成24年度は、セシウムの輸送体候補遺伝子を複数個単離し、それらのうち4つの遺伝子についてはこれらを欠損したイネを獲得することができた。来年度は、これらのイネがセシウムを吸収できないことを福島県の汚染土壌を用いて証明したいと考えている。この遺伝子を単離できたことは、JST 復興促進プログラム(マッチング促進)可能性試験の採択に大きく寄与したと考えられる。単離したい17個の遺伝子うち、13個の遺伝子については欠損変異体の発見には至っていないため、今後は新たな研究リソースを用いて探索を実施する予定である。研究成果を積み重ねることで、現在採択されている JST の探索タイプをステップアップさせ、シーズ顕在化タイプ(年間800万円)を目指したいと考えている。

我々が有する研究シーズ(スクリーニングシステム)を世界的な研究リソースとすべく活動については、これまでに、国内の2つのグループと(高知大学、東京大学)との共同研究に発展しており、1件については学会発表を行っている。本プロジェクトのメンバーである石川自身も新奇輸送体の単離に取り組んでおり、これまでに興味深い結果が得られている(未発表)。今後は海外とのグループとの共同研究を目指し論文の執筆、国際学会での発表を積極的に行って行く予定である。その第一弾として、3 月には秋廣と石川で国際シンポジウムで発表を行う。

●各グループ間またはメンバーとの連携状況

進捗状況の確認、関連情報の共有、研究を遂行する補助員や学生の技術指導、などを常に連携を図りながら進めてきた。成果は共同で国際シンポジウムで報告する。

⑥ 公表論文，学会発表など (当該研究に関連した本年度の公表論文，学会発表，特許申請の件数を一覧表に記入して下さい。発明等に関しては，差し支えない範囲で記載して下さい。)

論文掲載 (総件数)	0
学会発表 (総件数)	4
特許出願 (総件数)	0

【内訳】

●論文

なし

●学会発表 (代表的なものを数件記入して下さい。)

- イネのトランスポーター遺伝子を網羅的に発現する酵母タンパク質発現ライブラリーの構築と迅速スクリーニングシステムの構築 南井岳志 小田紘士郎 大谷真広 山木智央 **秋廣高志** 中国四国植物学会 2012年5月12･13日
- イネにおける放射性セシウム輸送体の単離と機能解析 山木智央 **秋廣高志** 中国四国植物学会 2012年5月12･13日
- イネのニッケル吸収過程における鉄との拮抗作用及びニッケル輸送体遺伝子の探索 上岡郁美、上野大勢、**秋廣高志**、岩崎貢三、加藤伸一郎 日本土壌肥料学会 支部会 2012年12月
- Construction of yeast expression library enriched with rice transporter genes. **Takashi Akihiro**, Masahiro Ohtani, Koshiro Oda, Takeshi Minamii, **Takahiro Ishikawa** International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2013) 26-31 March, 2013

●特許出願

なし

⑦ **外部資金獲得状況**（当該プロジェクトに関連した外部資金について一覧の各項目に総件数，金額を記入して下さい。）

■外部資金獲得状況一覧		件数	金額(千円)
(1)科研費 (配分額は間接経費を含む)		0	配分額 0
(2)科研費以外の外部資金	受託研究	2	3,800
	共同研究	0	0
	寄附金・助成金	0	0
	合　計	2	3,800

【一覧内訳】

(1)科研費

現在、秋廣は若手(B)、石川は基盤(B)に採択されているため、新規に申請することはできなかった。

(2)その他外部資金(一覧の項目別に，テーマ，研究者，金額を列挙してください。)

「受託研究」

1．放射性ストロンチウムを吸収しない安全な野菜や作物の開発を目指したストロンチウム輸送体の単離(JST A-STEP)(秋廣高志　代表)　期間総額 1,800 千円（平成 24 年－平成 25 年）

2．セシウムを吸収しない安心・安全なイネの開発

(JST　復興促進プログラム(マッチング促進)可能性試験)(秋廣高志　代表)　期間総額 2,000 千円（平成 24 年－ 平成 25 年）

⑧ **その他特筆すべき成果**（受賞，シンポジウムの開催，産学連携・地域連携に関する各種見本市，展示会への出展等も含む。）

優秀発表賞

「イネにおける放射性セシウム輸送体の単離と機能解析」 山木智央 **秋廣高志** 中国四国植物学会 2012 年 5 月 12-13 日

JST 推薦シーズに採択

JST A-STEP(研究成果最適展開支援プログラム)フィージビリティスタディ探索タイプ 平成 23 年度のグリーンイノベーション分野(生物生産，次世代エネルギー)の採択課題のうち，事後評価が高かった課題 JST 推薦シーズに採択される。平成 25 年 2 月 18 日 JST 東京本部別館ホールにて講演する。(**秋廣高志**)

産学連携

放射性セシウムを吸収しない作物や野菜の研究・開発 （7月13日(金)，(独)科学技術振興機構(JST)の東京別館ホール （「山陰(鳥取・島根)発新技術説明会」にて講演)(**秋廣高志**)

招待講演

第 215 回生存圏シンポジウム 第 2 回東日本大震災以後の福島県の現状及び支援の取り組みについて「セシウムを吸収しない安心・安全なイネの作出を目指したセシウム輸送体の探索」2012(平成 24)年 11 月 30 日 (金)9:30-17:00 場所：京都大学生存圏研究所 木質ホール 3 階にて招待講演を行った。(**秋廣高志**)

新聞報道

2012 年 8 月 2 日 **読売新聞(全国版)**の大地再生コラムにて研究内容が紹介される。
2012 年 7 月 5 日 商経アドバイスに研究内容が紹介される。
2012 年 6 月 18 日 朝日新聞(地方版)に研究内容が紹介される。
2012 年 6 月 16 日 山陰中央新報に研究内容が紹介される。

学内セミナーおよび講演会の開催

「イネにおける放射性物質の吸収機構の解明-セシウムおよびストロンチウムトランスポーターの単離と機能解析-2012 年 1 月 27 日 第 45 回 農業生産学科セミナー および 震災プロジェクト勉強会
島根大学「萌芽研究部門」プロジェクトセミナーの開催
演題 1　福島県農業総合センターにおける放射性物質に関する試験研究の状況
　小野勇治(福島県農業総合センター作物園芸部)
演題 2　イネにおける放射性セシウムの吸収に関する研究-福島県での取り組み状況
　藤村恵人(福島県農業総合センター作物園芸部)

⑨ 本年度の主要な研究成果（図，表，ポンチ絵などを多用して，2ページ以内にわかりやすくまとめてください。）

【研究の目的】

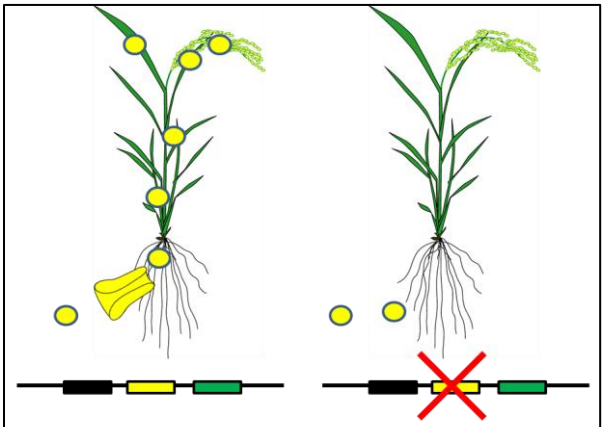
本研究を開始した段階では、東北地方の農業復興のために何が最も必要な研究であるかは不明であった。そこで、8 月と 9 月に福島県、宮城県、岩手県に行き、実際に現地の状況を調べた（右図）。その結果として、放射性物質による土壌汚染の問題を解決することが、農業復興において最も重要な研究であると判断できた。そこで、セシウムおよびストロンチウムを吸収しないイネの作出を目指し、その第一段階として、セシウムおよびストロンチウムの輸送体の単離を目指すこととした。

【結果１】

イネにおいてセシウムおよびストロンチウムは土壌から根を介して吸収されることが報告されている。これらの物質の細胞内への取り込みには輸送体と呼ばれるタンパク質が関与しているが、どの輸送体が関与しているかは不明である。本研究では、これらの輸送体の単離を目指した。方法を以下に記す。イネには約 1,500 種類の輸送体タンパク質があることが推測されているが、その多くを発現する酵母タンパク質発現ライブラリーを独自に構築し、このライブラリーを用いて、セシウムおよびストロンチウムの輸送体の単離を行った。その結果、これまでに 17 個のセシウム輸送体候補遺伝子の単離に成功した。これらの輸送体は細胞外から細胞内にセシウムを取り込む輸送体であると予想される。イネには細胞内に取り込んだセシウムを細胞外に排出（輸送）する働きを持った輸送体もあると考えられている。セシウムを含む培地上で生育が良くなる酵母を選抜することで、セシウムの排出に係る輸送体の探索も行なっており、これまでに約 19 個の輸送体候補遺伝子の単離に成功している。研究内容を紹介する記事（下）

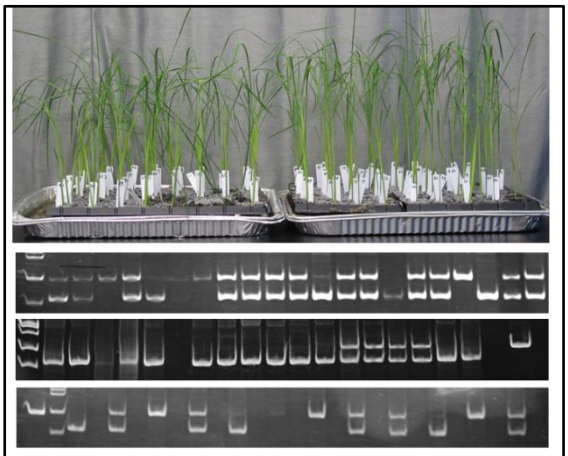
【結果２】

今回単離に成功したセシウム輸送体の遺伝子に変異（異常）があると、この輸送体の機能が失われ、その結果として、このイネはセシウムを吸収することができなくなることが予想される（右図）。単離した 17 個の遺伝子の変異体を探索したところ、10 遺伝子について変異体が存在していた。これらの変異体イネを入手し、変異を持ったイネであることの確認を行った。その結果、4 遺伝子については変異体イネを獲得することができたが、残りの 6 つに関しては確認ができなかった（下左図）。目的の変異体であることが明らかになったイネは栽培を続けて種子の増幅を行なっている（下右図）。

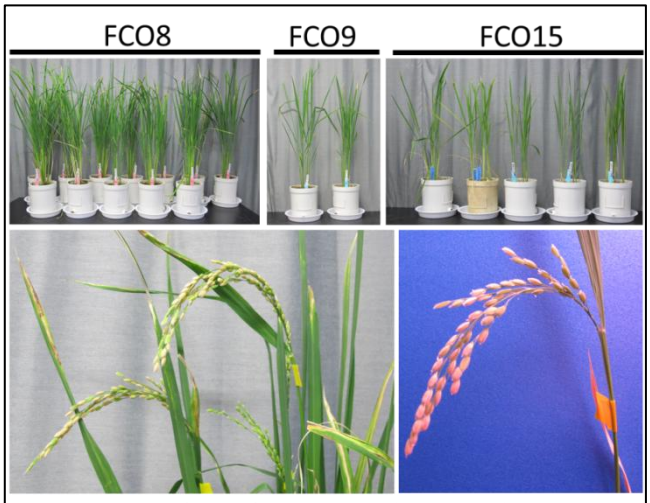


セシウム輸送体遺伝子（黄色）が正常なイネはセシウムを根から吸収し葉・茎・種子に転流する

セシウム輸送体遺伝子（黄色）に変異をもつイネはセシウムを根から吸収できない(予想）。



FCO17遺伝子が欠損した変異体の探索
M2世代84個体を調査し劣勢ホモ個体を選抜することに成功した



FCO8/9/15遺伝子が欠損した変異体の種子の増幅の様子
1月初旬に花が咲き、現在登熟後期。3月初旬には収穫が可能となる予定。春には福島県において現地試験を行う予定。

【今後の予定・展望】

得られた変異体イネは福島県農業総合センターに送り、放射性セシウムを含む土壌を使ってセシウムの吸収試験を行う予定である。これらの変異体の品種は日本晴であり、遺伝子組換え体ではない。したがって、セシウムを吸収しないことが確認出来れば、比較的短時間で実用化することができると期待される。セシウムを吸収しない可能性をもつイネをできるだけ多く選抜することを、来年度の目標として研究を行う予定である。