

島根大学研究機構戦略的研究推進センター 『萌芽研究部門』		平成25年度		年度報告書		提出日 平成26年2月14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@lief.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。)							
<p>本プロジェクトの最終目的は、東北地方の農業復興に役立つ遺伝子群を探索し、獲得した遺伝子群の植物体における機能解明を進めることである。農業復興を考えた場合、放射性物質の輸送に関わる輸送体遺伝子を単離・同定することが喫緊の課題であると考えられることから、セシウムやストロンチウムの輸送体の単離・同定に重点を置き研究を進める。最終的に、植物体内の放射性物質の輸送に重要な働きをする輸送体を特定する。</p>							
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) 秋廣 高志		生物資源科学部生物科学科・助教		セシウム輸送体タンパク質の選抜とイネにおける機能解析			
石川 孝博		生物資源科学部生命工学科・助教		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
セシウム輸送体遺伝子の発現部位の解明	<p>(自己評価)B</p> <p>これまでに単離した 17 個の Cs 輸送体候補遺伝子に加え、新たに 20 個の Cs 輸送体候補遺伝子を単離することに成功した。これらの遺伝子について RT-PCR を用いて発現部位(葉および根)の特定および発現量の特定を行った。また、カリウムの施肥量依存的に発現量が変化する遺伝子の特定を行い、3 つの遺伝子が K 欠乏に依存して発現が誘導されることが明らかとなった。</p>
セシウム輸送体遺伝子の変異体の解析	<p>(自己評価)A</p> <p>Cs 輸送体遺伝子を欠損した変異体イネ(4 系統)を福島県農業総合センター内の汚染土壌にて栽培し、セシウム吸収量を測定した。また、東京大学田野井准教授と共同で放射性セシウムを含む水耕液を用いた吸収栽培試験を行った。その結果、Cs の吸収量が野生型と比較して 10%程度低下していること系統を獲得することに成功した。目的とする変異体を単離できたことから評価を A とした。</p>
新たな変異体の選抜	<p>(自己評価)A</p> <p>本プロジェクトで単離したセシウム輸送体遺伝子のうち、欠損変異体が単離されているのは 4 系統しかない。そこで TILLING 法を用いた変異体の獲得を行った。酵母においてセシウム輸送活性が高かった輸送体やシロイヌナズナにおいて Cs 輸送活性を有していることが明らかになった 4 つの輸送体の変異体の探索を行った。その結果、複数の変異体を獲得することに成功した。</p> <p>TILLING 法を用いて変異体を獲得するためには、大変な労力と費用がかかる。そこで、変異体が比較的入手しやすいシロイヌナズナを用いた機能解析も同時並行で実施した。その結果、Cs 輸送活性を持った輸送体を 4 つ単離することに成功し、この内 2 つの輸送体については、欠損変異体の入手にも成功した。興味深いことに入手した欠損変異体の 1 つは、Cs を含む培地中で栽培すると、根の伸長抑制が野生型よりも緩和された。これは、この輸送体がシロイヌナズナにおける Cs 輸送において重要な働きをしていることを想起させる結果である。植物体において重要な働きを持つ輸送体を単離することが本プロジェクトでの目的であることから、極めて大きな成果であると考えられることから評価を A とした。</p>
ストロンチウム輸送体遺伝子の選抜	<p>(自己評価)D</p> <p>約 1,500 個のイネの輸送体遺伝子を導入したライブラリーを用いてストロンチウム輸送体の選抜を行った。4 次スクリーニングまで実施したが、目的とする輸送体遺伝子は選抜することができなかった。スクリーニングホストの変更やスクリーニング条件の変更も試みたが結果は変わらなかった。この方法では目的とする輸送体は選抜できないことが明らかになった。予想した結果が得られず、今後の発展性も考えられなかったことから、評価を D とした。</p>
その他の遺伝子の選抜および国内外のグループとの共同研究の推進	<p>(自己評価)B</p> <p>国内外の共同研究推進に関しては、海外では、Ca 輸送体遺伝子(韓国 韓国浦項大学 Song 先生)、Cs 輸送体(フランス VAVASSEUR 博士)との共同研究を開始した。国内では、Na 輸送体遺伝子(信州大堀江先生)、Mg 輸送体遺伝子(東京大学田野井先生)、糖輸送体遺伝子(名古屋大学 白武先生)、糖輸送体(東京農工大学 梶田先生)との共同研究を開始した。</p>

(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下さい。)

●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)

予定していた実験は、ほぼすべて遂行することができた。ライブラリースクリーニングにより、Cs 輸送体候補遺伝子を最終的に約 40 個単離できたことは特筆すべき成果であると考えられる。単離した輸送体の植物体(イネ)における機能の解明は、変異体の入手が期待通り行えなかったことから、4つの遺伝子についてしか行うことができなかったが、1 系統において、野生型と比べて 10%程度玄米中の放射線量が減少していることを明らかにできた。この点も本研究の大きな成果といえる。汚染土壌を用いた吸収栽培試験は確立した方法がなく、手探り状態で実施するしかなかったが、結果的には、変異体イネのセシウム吸収能を正しく評価できる方法を確立することができた。今回開発した手法を、他の研究グループにも積極的に技術提供することで、セシウムを吸収しないイネの開発が進展し早期の農業復興に貢献できるものと考えられた。

本プロジェクトで単離した輸送体の生体内機能を解析するためには、欠損変異体の入手が必須であるが、残念ながら希望する欠損変異体は 4 系統しか手に入らなかった。そこで、シロイヌナズナの変異体を用いた機能解析を同時並行で実施することとした。その結果、入手したシロイヌナズナの欠損変異体の中に、Cs 感受性が低下しているものが有ることが明らかとなった。輸送体の遺伝子を欠損させることで、植物体の Cs に対する感受性が低下した例はこれまでに報告例がない。現在は、この輸送体に関する詳細な分析を蓄積を国内外のグループと進めているところである。本プロジェクトは、農業復興に有益な遺伝子を探索し、単離した輸送体の生体内機能を解明することを目的としている。その目的は達成されたと考えられる。今後はレベルの高い論文に投稿するとともに、その成果を背景に外部資金を獲得していく予定である。

●各グループ間またはメンバーとの連携状況

本プロジェクトは秋廣と石川の二名で行っており、すべての研究において常に密に連携を取りながら進めることができた。教員のみならず、研究室の学生間でも積極的に交流が行えたことは教育という観点からも有益だったと考えられる。

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)	0
特許出願 (総件数)	0

【内訳】

●論文

論文投稿準備中である。

●学会発表 (代表的なものを数件記入して下さい。)

なし

●特許出願

取得予定である。

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	3	7400
	共同研究	0	0
	寄附金・助成金	0	0
	合計	3	7400

【一覧内訳】

(1) 科研費

なし

(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

セシウムを吸収しない安心・安全なイネの開発(代表) JST 復興促進プログラムマッチング促進(可能性試験)(秋廣)(4000 千円)

受託研究

探索タイプ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 復興促進プログラム(A-STEP)(秋廣)(1700 千円)

受託研究

放射性セシウムの輸送体が欠損した変異体イネの探索 JST 探索タイプ(A-STEP)(秋廣)(1700 千円)

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。)

招待講演1

第240回 生存圏シンポジウムー(第3回) 東日本大震災以後の福島県の現状および支援の取り組みについて セシウムを吸収しないイネの作出を目指したセシウム輸送体の探索およびこれらの輸送体を持たない変異体イネのセシウム輸送能の評価 平成25年12月20日 場所 京都大学 生存圏

招待講演2

(第2回)生存圏科学の新領域開拓・融合研究に向けた取り組み 福島県との連携研・融合研究に向けたパネルディスカッション -

日時 平成26年3月4日 場所 福島県農業総合センター

出張講義

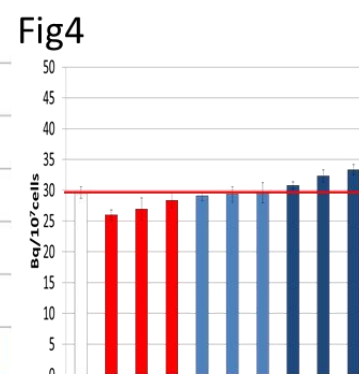
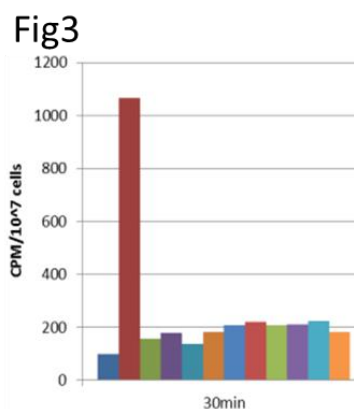
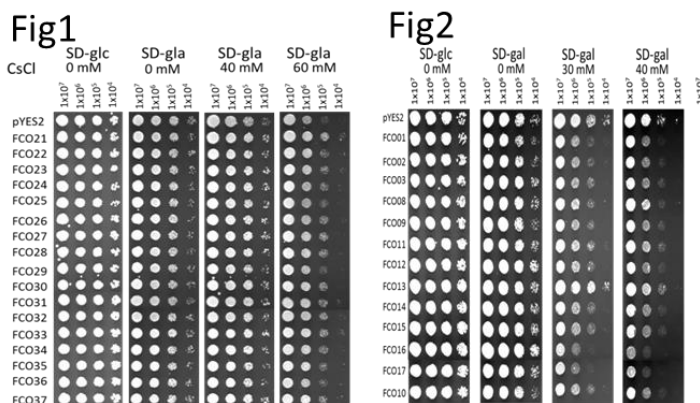
講演タイトル 放射性セシウムを吸収しない安心・安全なイネの開発

平成25年9月17日 場所 島根県立 大社高校

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。)

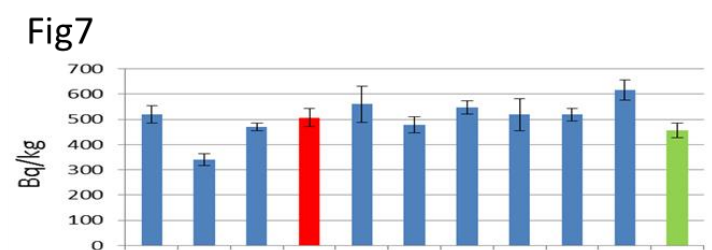
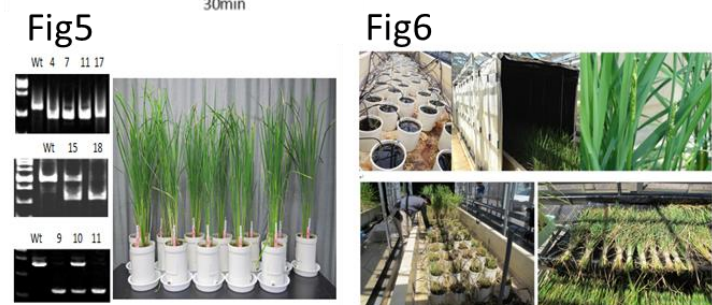
【イネセシウム輸送体の単離】

約 1,500 種類のイネの輸送体を発現する酵母タンパク質発現ライブラリーを用いて、Cs 輸送体候補遺伝子を 37 個単離することに成功した。これらの輸送体の内訳は、細胞外から細胞内にセシウムを輸送する輸送体 (Fig1)、細胞内から細胞外にセシウムを排出する輸送体 (Fig2) および液胞にセシウムを隔離する輸送体 (Fig2) であると考えられた。単離した輸送体の Cs 輸送活性を調査した結果、単離した輸送体のほぼ全てがセシウム輸送活性を有していることが明らかになった (Fig3・4)。Fig3 で臙脂色で示した輸送体は、飛び抜けて高い輸送活性を有することが明らかとなった。



【汚染土壌を用いた変異体イネの栽培吸収試験】

単離したセシウム輸送体が、イネにおけるセシウム輸送の中心的な働きをしているとすると、この輸送体を欠損したイネはセシウムを吸収することができず、玄米中のセシウム含有量が低下するものと考えられる。そこで、単離に成功したセシウム輸送体を欠損するイネの探索を行った。その結果、4 系統の変異体を手に入れることができた。これらの変異体を島根大学内で栽培し、劣性ホモ個体を選抜したのち (Fig5)、種子を増幅させた。こうして得られたイネのセシウム吸収試験を、福島県農業センター内で汚染土壌を用いて行った。その結果、野生型 (赤) に比べて、変異体 (緑) の玄米中の放射線量が 10% 程度減少していることが明らかになった (Fig7)。プロジェクト開始時には、イネのセシウム吸収能を汚染土壌を用いて評価する方法は確立されておらず、手探りで試験を行うしかなかった。本研究では、約 10,000Bq/Kg の汚染土壌を 1/5000 アールワグネルポットに入れ、カリウムを追肥しない条件下で栽培を行った。その結果、グラフに示すような、ばらつきが少ない再現性の高いデータを得ることができた。更に、Perkinermaer 社の NaI 測定器や ICP-MS を用いることで、少ないサンプル量で放射線量を測定することができた。ICP-MS では玄米 5 粒、乾燥させた葉 100mg で測定を行うことができた。NaI では、100 粒程度の種子を用いることで測定が可能であった。



【シロイヌナズナを用いた機能解析】

これまでに単離したイネセシウム輸送体の、イネにおける機能を解明するためには、これらの輸送体を欠損したイネを入手し、それらの変異体のセシウム吸収能を評価する必要がある。しかし、イネ変異体データベースをくまなく探索したが、変異体を4系統しか入手することができなかった。そこで、変異体の充実している、シロイヌナズナを用いた解析を行うこととした。まず、イネのセシウム輸送体遺伝子のシロ

イヌナズナホモログを21個理研バイオリソースセンターから入手し、これらの輸送体がセシウム輸送活性を持つことを調査した。その結果、4個の輸送体がセシウム輸送活性を持つことが明らかになった (Fig8)。そのうち2つの輸送体の変異体を入手することができた (Fig9)。

Fig8

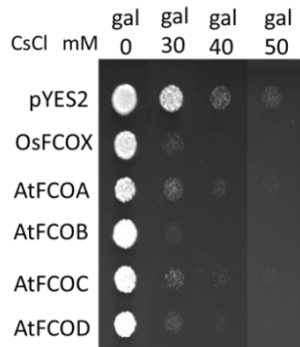


Fig9

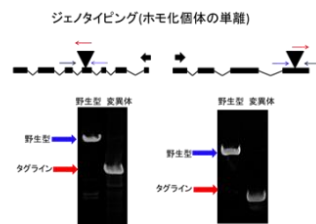


Fig10

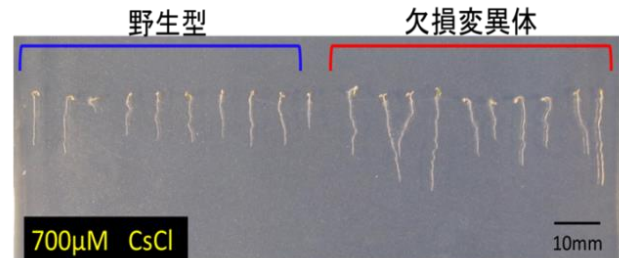
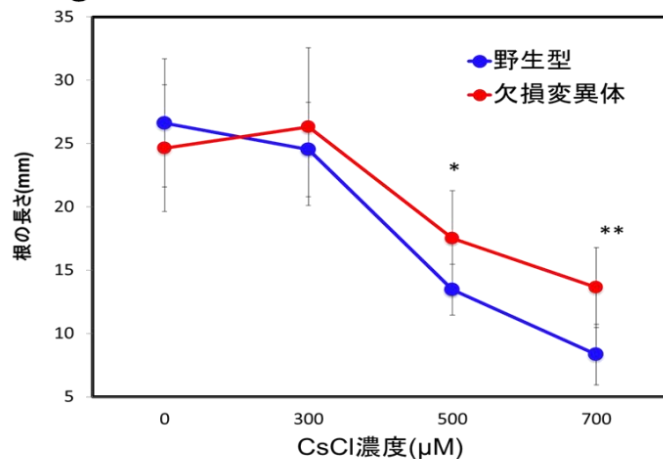
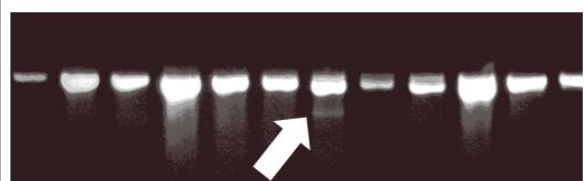


Fig11



続いて、入手した変異体を、セシウムを 0-700 μM 含む培地に播種し、7日間栽培したのち根の長さを測定した (Fig11)。その結果、野生型、変異体どちらも培地中のセシウム濃度が上昇するにつれて、根の伸長が抑制されたが、欠損変異体 (入手した2つのうち1つ) は、野生型ほど根の伸長が抑制されていないことが明らかになった (Fig12)。本試験により、シロイヌナズナにおけるセシウム輸送に、重要な働きを持つ可能性がある輸送体候補が選抜された (Fig11) この輸送体を欠損したイネもセシウム輸送能が低下している可能性が考えられる。そこで、この輸送体の変異体を単離する目的で、最新変異体探索方法である TILLING 法を用いて、変異体の探索を行った。約 4,000 系統の変異体から抽出した DNA を鋳型とした PCR を行い、PCR 産物を CELI 酵素を用いて切断した後電気泳動を行い塩基置換が起こった変異体を選抜した (Fig12)。その結果、複数の変異体を獲得することに成功した。今後はこれらのイネを、本プロジェクトによって確立した栽培評価法を用いて栽培し、変異体イネのセシウム蓄積能が低減していることを確認する予定である。

Fig12



⑩若手研究者育成プランについて

(計画書の内容を踏まえて、今年度取り組んだ内容を記入してください。)

プロジェクト推進者の石川は、大型外部資金の獲得およびプロジェクト運営において十分な経験を有している。科研費やJSTへの申請時に、申請書の書き方等を石川がプロジェクトリーダーの秋廣に指導を行った。JSTについては採択された。

⑪研究終了後の展開（科研費などへの申請等） 図などでわかりやすく示してください。

本プロジェクトにおいて得られた成果は大別して2つ有る。1つ目は、イネおよびシロイヌナズナにおけるセシウムの輸送に重要な働きを持つ可能性を有する輸送体を選抜できたことである。選抜した輸送体の機能解明を加速させ、植物におけるセシウム輸送機構を分子レベルで解き明かしていく予定である。最終的に、セシウムを吸収しない栽培方法や新品種の開発（農業分野）や、セシウムを高蓄積する環境浄化植物の開発（工学分野）、セシウムの吸収メカニズムを一般市民にわかりやすく説明することを通じた風評被害の低減（リテラシー教育）に関連する研究分野での応用を目指したい。これらの研究は今後、科研費やJST A-step等への申請を行い外部資金を獲得する計画としている。

2つ目は、独自に開発した「イネの輸送体に特化した酵母タンパク質発現ライブラリー」が実験系として極めて有効であることが明らかになったことである。すでに、国内外の多くの研究者との共同研究を開始しているが、今後も共同研究を拡大したいと考えている。将来的に、島根大学内にオープンラボを開設し、国内外の研究者が島根大学に来て輸送体を探索できる研究環境を形成していきたいと考えている。こちらも科研費等で外部予算を獲得していく予定である。

セシウム輸送体の機能解明

科研費
KAKENHI



その他輸送体の単離と機能解明

科研費
KAKENHI