

平成21年 3月16日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18780045

研究課題名（和文）植物の亜鉛・カドミウム選別吸収に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the selective Zn/Cd absorption in plant

研究代表者 水野 隆文（MIZUNO Takafumi）

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：50346003

研究成果の概要：タカネグンバイ由来二価金属トランスポーターTjZNT1 と TjZNT2 の配列の比較から、ZNT トランスポーターの亜鉛およびカドミウム認識の違いは予想された可変領域ではなく、N 末端領域の有無に依存することが明らかとなった。特に、ZNT2 の N 末端領域に存在する 36 アミノ酸残基について、その残基数と亜鉛輸送能力に相関が確認されたことから、この領域の存在、もしくはスプライシングによる長さの調整が植物の亜鉛輸送レベルに関与している可能性が示唆された。また、N 末端領域を削除した ZNT2 に新たにニッケル耐性が認められたことにより、ニッケル超集積性植物のニッケル耐性にも ZNT トランスポーターが関与している可能性が示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,500,000	0	2,500,000
2007年度	500,000	0	500,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	210,000	3,910,000

研究分野：植物栄養学

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：植物・亜鉛・カドミウム・トランスポーター・選別吸収

## 1. 研究開始当初の背景

タカネグンバイ由来 TjZNT1 と TjZNT2 の配列には高い相同性が認められるが、両者はいずれもカドミウムを輸送するものの、亜鉛輸送能力は TjZNT1 にしかもたない。これらの特徴を用い、本研究は植物がどのように亜鉛とカドミウムを認識・選別しているのかを明らかにし、植物のカドミウム吸収を抑制する機構を確立することを目指した。

## 2. 研究の目的

植物には必須元素である亜鉛と毒性の高いカドミウムは化学的性質が類似しており、植物へのカドミウム混入は亜鉛取り込みの輸送経路から起こると考えられる。しかし、植物の鉄や亜鉛の獲得において主要な役割を果たすと考えられている ZIP ファミリートランスポーターには、TjZNT1 と TjZNT2 のように、構造がほぼ同一でもカドミウムと亜鉛に対する輸送能力もしくは親和性に対し

異なる性質をもつものが存在する。本研究は、植物根表面で亜鉛獲得に関わるトランスポーターの特性を明らかにすることで、分子生物学的手法により植物の亜鉛取り込みの推進とカドミウム吸収抑制技術を開発し、カドミウム汚染米などの問題解決に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1). TjZNT1の亜鉛認識部位の同定

TjZNT1と2がN末端領域長と中心部の可変領域の部分をのぞきほぼアミノ酸配列が一致することを用い、各トランスポーターをN末端領域、可変領域を含むV領域、およびC末端領域に分割し、それぞれの部位を相互置換したキメラタンパク発現遺伝子を作成した。作成した遺伝子は野生株酵母 BY4741 もしくは亜鉛輸送能力欠損酵母  $\Delta$ ZRT1 株に導入し、カドミウム耐性能については通常の YNB 培地 (pH6.0) で、亜鉛輸送能については Low Zinc medium に亜鉛・カドミウムおよび遺伝子誘導のためのガラクトースを添加して培養した。また、TjZNT1/2 がニッケルに対する高い耐性と集積性を持つタカネグンバイから単離され、発現によって酵母のニッケル耐性が増加することが判明していることから、これらのキメラ遺伝子の発現が酵母のニッケル耐性に与える影響についても検討した。

#### 2). TjZNT2 N 末端領域の亜鉛輸送における役割

N 末端領域の置換により亜鉛輸送性の有無が ZNT1, 2 で逆転したことから、さらに TjZNT2 のみが有する N 末端領域 36 アミノ酸残基の関与について、3カ所のアミノ酸置換および末端からのアミノ酸長を 10、15、25 残基ずつ短くした短縮体とすべてを削除した削減体を作成し、本領域の亜鉛輸送における役割について検討した。削除変異株の亜鉛輸送能力については 1 と同様に低亜鉛培地を用いた生育試験を行ったほか、 $^{65}\text{Zn}$  の取り込みをシンチレーションカウンターを用いて測定した。

#### 3). Mn 超集積性植物コシアブラからの二価金属トランスポーター遺伝子の単離と機能解析

情報が少ない二価金属トランスポーターの構造解析を進めるため、他の金属 (Mn) を超集積するコシアブラより ZIP トランスポーター遺伝子を単離し、その金属輸送能力について検討した。

### 4. 研究成果

#### 1). TjZNT1 の亜鉛認識部位の同定

キメラタンパク質を発現する酵母を亜鉛・カドミウムおよびニッケルを含有する培地にて生育し、その輸送能力を調べた結果、TjZNT1 と 2 の亜鉛輸送能力は N 末端領域の有無によって逆転することが明らかになった。この結果を受け、さらに TjZNT2 のみが有する N 末端領域とそれ以外の領域で検討した結果、TjZNT2 のみが有する 36 アミノ酸残基の有無のみで亜鉛輸送能が逆転することが判明した。これにより、TjZNT1/2 の亜鉛輸送能は、TjZNT2 の N 末端にのみ存在する領域の存在によって規定されていることが明らかとなった。さらに、本領域の欠如によって TjZNT2 発現酵母に新たにニッケル耐性が付与されることから、この領域が ZIP トランスポーターによるニッケル耐性付与に関与することが示唆された。

#### 2). TjZNT2 N 末端領域の亜鉛輸送における役割

TjZNT2 末端の 36 アミノ酸残基がどのように亜鉛輸送能を阻害しているかを明らかにするために、アミノ酸置換法によるリン酸化の影響と、末端からの長さを短くした各種変異体の輸送能検討を行った。リン酸化が予想されるアミノ酸は N 末端領域の 3カ所存在し、その部位のリン酸化により同領域の立体構造が大きく変化することがプログラム解析により予想されたが、これらのアミノ酸を非リン酸化アミノ酸に変換しても、本領域の亜鉛輸送阻害能力に変化は見られなかった。一方、本領域を末端よりアミノ酸長の短縮に伴い酵母への亜鉛取り込みが阻害され、36 アミノ酸すべてを削除した TjZNT2  $\Delta$ 36 の取り込み量を 100%とした場合、 $\Delta$ 10 で約 40%、 $\Delta$ 15 で 80%であり、 $\Delta$ 25 では全 N 末端領域を削除したものと同等であった。

以上のことより、TjZNT2 の N 末端領域による亜鉛輸送阻害はリン酸化による立体構造の変化ではなく、その長さのアミノ酸が細胞外領域に存在することによって、亜鉛の取り込みを阻害していることが予想された。

#### 3). Mn 超集積性植物コシアブラからの二価金属トランスポーター遺伝子の単離と機能解析

コシアブラから得られた Zip ホモログ遺伝子 CsZIP1 は、475 アミノ酸残基のタンパク質をコードしており、他の植物由来 ZIP トランスポーターとの相同性はいずれも 65%以下であった。本遺伝子は Mn 欠乏状態のコシアブラカルスで発現誘導が認められたが、Mn トランスポーター遺伝子 (Smf1) 欠損酵母で

の発現は、酵母の Mn 輸送能力を回復することはできなかった。また、CsZIP1 は Zn および Fe 輸送能力を示さなかったが、野生株酵母での遺伝子発現は、Cd 感受性と Ni 耐性の向上をもたらす結果となった。

#### 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 4 件)

1) Mizuno T, Hirano K, Kato S and Obata H. Cloning of ZIP family metal transporter genes from a Mn hyperaccumulator plant *Chengiopanax sciadophylloides*, and its metal transport and resistance abilities in yeast. *Soil Sci. Plant Nutr.*(査読有り) 54,86-94, 2008

2) Nishida S, Mizuno T, and Obata H. Involvement of histidine-rich domain of ZIP family transporter TjZNT1 in metal ion specificity. *Plant Phys. Biochem.* (査読有り) 46,601-606, 2008

4) 水野隆文「日本の重金属超集積性植物の研究と植物栄養学への応用」三重大学大学院生物資源学研究科紀要(査読有り)35, 15-25 (2008)

3) Mizuno T, Usui K, Nishida S, Unno T, and Obata H. Investigation of the basis for Ni tolerance conferred by the expression of TjZnt1 and TjZnt2 in yeast strains. *Plant Physiol. Biochem.* (査読有り) 45, 371-378, 2007

[学会発表] (計 12 件)

1) Mizuno T, Horie K, Nosaka S, Obata H and Mizuno N. Distribution and differentiation of the serpentine plants in Hokkaido and their chemical characteristics. Sixth International Conference on Serpentine Ecology. College of the Atlantic, Maine, U.S.A. (June 2008)

2) Nishida S, Chisato T, Horie K, Nosaka S, Mizuno N, Obata H, and Mizuno T. Series studies on Japanese Ni-hyperaccumulator *Thlaspi japonicum* and its heavy metal transporters

ZNT1/2 . Sixth International Conference on Serpentine Ecology. College of the Atlantic, Maine, U.S.A. (June 2008)

3) Mizuno T, Usui K, Nishida S, Unno T, and Obata H. Nickel tolerance ability of TjZNTs and the role of histidine-rich domains for TjZNT1 metal transport. 13th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (ISINIP) Montpellier - France, from July 3 to July 7, 2006

4) 西田 翔・水野 隆文「タカネグンバイ由来 ZIP トランスポーターTjZNT2 における N 末端領域の基質特異性への関与」第 50 回植物生理学会(名古屋 2009 年 3 月 21-24 日)

5) 西田 翔・水野隆文・森永康裕・都築知里・小畑 仁「Ni 超集積性植物タカネグンバイ由来 ZIP トランスポーター(TjZNT1/2)の基質選択における N 末端領域の関与」日本土壤肥料学会講演要旨集 第 54 集 P83 名古屋(名古屋市立大学) 2008 年 9 月 9-11 日

6) 水野隆文・長尾賢治・海野孝至・小畑 仁「タカネグンバイ由来 NRAMP トランスポーターの発現がシロイヌナズナのニッケル耐性に及ぼす影響」日本土壤肥料学会講演要旨集 第 54 集 P94 名古屋(名古屋市立大学) 2008 年 9 月 9-11 日

7) 水野隆文・平野賢司・加藤晋太・細野篤子・小畑仁「コシアブラにおけるマンガン超集積の特異性とマンガン獲得機構」第 49 回日本植物生理学会年会 札幌(札幌コンベンションセンター) 2008 年 3 月 20-22 日

8) 西田翔・水野隆文・森永康裕・小畑仁「Ni 超集積性植物タカネグンバイ由来 ZIP トランスポーター(TjZNT1/2)の基質選択および Ni 耐性に関する領域の同定」第 49 回日本植物生理学会年会 札幌(札幌コンベンションセンター) 2008 年 3 月 20-22 日

9) 海野孝至・西田 翔・水野隆文・小畑 仁「*Thlaspi japonicum* 由来 TjZnt1 および 2 の発現がシロイヌナズナのニッケル耐性に及ぼす影響」日本土壤肥料学会講演要旨集 第 53 集 P69 東京(東京農業大学)2007 年 8 月 22-24 日

10) 西田 翔・水野隆文・海野孝至・森永康裕・小畑 仁「キメラ TjZnt1-TjZnt2 発現酵母を用いた Zn<sup>2+</sup>トランスポーターTjZNT1 の亜鉛認識部位の同定」日本土壤肥料学会講演要旨集 第 53 集 P90 東京(東京農業大学)2007 年 8 月 22-24 日

11) 西田 翔・水野隆文・小畑 仁「*Thlaspi japonicum* 由来 TjZNT1 のニッケル排出における高ヒスチジン領域の役割」日本土壤肥料学会講演要旨集 第 52 集 P68 秋田(秋田県立大学)2006 年 9 月 5-7 日

12) 海野孝至・小畑 仁・水野隆文「Thlaspi japonicum 由来 TjZNT1 および 2 の細胞外ニッケル排出機能についての検討」 日本土壤肥料学会講演要旨集 第 52 集 P68 秋田 (秋田県立大学)2006 年 9 月 5-7 日

[図書] (計 1 件)

1 2) 水野直治・水野隆文 産業図書 「フィードの基礎化学」(2007) pp. 1-187

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 隆文(MIZUNO Takafumi)  
三重大学・大学院生物資源学研究科・  
准教授 研究者番号：50346003

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

西田 翔(NISHIDA Sho)  
三重大学・大学院生物資源学研究科  
博士後期課