

シロイヌナズナにおけるニッケル耐性を強化する遺伝子変異の同定

Identification of gene mutations enhancing nickel tolerance in *Arabidopsis thaliana*

応用化学専攻 岡崎 俊樹

OKAZAKI Toshiki

1. 緒言

不良土壌の一種である重金属汚染土壌は世界中に広く分布しており、重金属毒性による作物の収量の減少は、食糧生産における大きな問題の1つである。重金属に分類されるニッケル(Ni)は植物にとって不可欠な微量栄養素であるが、過剰な蓄積は有毒であり、Ni汚染土壌における作物の収量の減少が問題となっている。これまでに、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて、Niの吸収に関わる遺伝子が同定され、過剰なNiの蓄積機構が明らかにされている^{1,2)}。しかし、Niの毒性に関わる遺伝子は未だ不明であり、Ni毒性の発現機構はほとんど明らかにされていない。これらの原因遺伝子を同定することで、長らく明らかにされてこなかった重金属毒性の発現機構の一端を解明することやゲノム育種への応用が期待できる。そこで本研究では、所属研究室が独自に単離したシロイヌナズナのNi超耐性変異体を材料として、シロイヌナズナのNi毒性に関わる原因遺伝子の同定を目的とした。

2. 実験

先行研究から、20系統のNi耐性変異体の中で特に優れたNi耐性を示す *nickel tolerance 3-1* (*nit3-1*) において、Mutation Mapping Plus (MutMap+) 法³⁾によるゲノム解析の結果、*H⁺-ATPase 2 (AHA2)* 及び (*Oxysterol binding protein*)-related protein 2B (*ORP2B*) がNi耐性に関わる候補遺伝子であると推測された。そこで、*nit3-1*由来の *AHA2* をもつ系統 (#14) および *ORP2B* をもつ系統 (#20) を *nit3-1* に野生型 (Col-0) を戻し交配して得られた雑種第三世代 (F3) からそれぞれ単離した。Ni濃度が 0, 17.5, 20, 25, 30, 40 μM となるように NiCl_2 を添加した寒天培地を作成し、Col-0, *nit3-1* 及び #14 を播種

した。14日間の栽培後、Col-0との根の伸長量を比較してNi耐性を評価した。#20についても同様の実験を行った。

次に、*AHA2* 機能欠損型変異体 (*aha2-4*, *aha2-5*) 及び *ORP2B* 機能欠損型変異体 (*orp2b-1*, *orp2b-2*) を ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, USA) より取り寄せた。Ni濃度が 0, 17.5, 20, 25, 30, 40 μM となるように NiCl_2 を添加した寒天培地を作成し、Col-0, *nit3-1*, *aha2-4* 及び *aha2-5* を播種した。14日間の栽培後、Col-0との根の伸長量を比較してNi耐性を評価した。*orp2b-1*, *orp2b-2* についても同様の実験を行った。

3. 結果及び考察

3-1. *nit3-1* 由来の単一遺伝子欠損変異体 (#14, #20) のNi耐性評価

図1及び図2に#14, #20の各Ni処理区における根の伸長量を示した。#14及び#20はNi濃度の上昇による根の伸長阻害は認められたが、Col-0と比較して根が長く伸長する傾向が認められた。しかし、*nit3-1*は#14及び#20と比較して根が長く伸長していたことから、*nit3-1*のNi耐性の向上は *AHA2* 及び *ORP2B* の2遺伝子の変異によるものであることが示唆された。

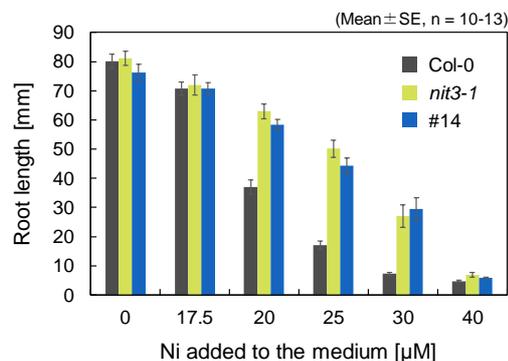


図1 #14のNi耐性評価

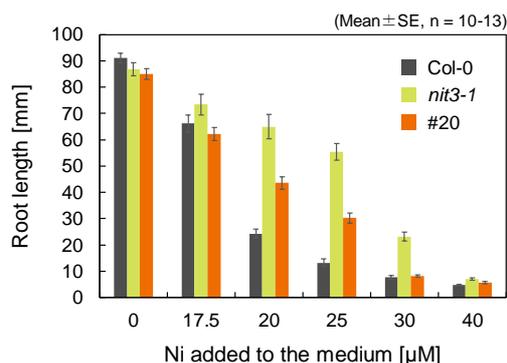


図2 #20のNi耐性評価

3-2. AHA2欠損変異体のNi耐性評価

図3及び図4に *aha2-4*, *aha2-5* の各Ni処理区における根の伸長量の結果を示した。*nit3-1*, *aha2-4* 及び *aha2-5* はNi濃度の上昇による根の伸長阻害は認められたが、Col-0と比較して根が長く伸長する傾向が認められた。20 μM Niの処理区において伸長量の差が最大となり、*aha2-4* の根の長さはCol-0の約2.6倍、*aha2-5* の根の長さはCol-0の約2.5倍であった。この結果から、*AHA2*の変異はNi耐性を向上させることが証明された。

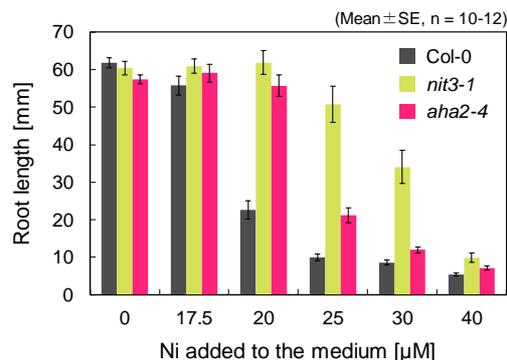


図3 *aha2-4*のNi耐性評価

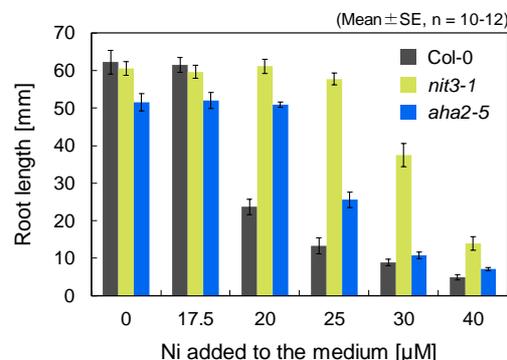


図4 *aha2-5*のNi耐性評価

3-3. ORP2B欠損変異体のNi耐性評価

図5に *orp2b-1*, *orp2b-2* の各Ni処理区における根の伸長量の結果を示した。*nit3-1*, *orp2b-1*

及び *orp2b-2* はNi濃度の上昇による根の伸長阻害は認められたが、Col-0と比較して根が長く伸長する傾向が認められた。25 μM Niの処理区において伸長量の差が最大となり、*orp2b-1* の根の長さはCol-0の約2.2倍、*orp2b-2* の根の長さはCol-0の約1.9倍であった。この結果から、*ORP2B*の変異はNi耐性を向上させることが証明された。

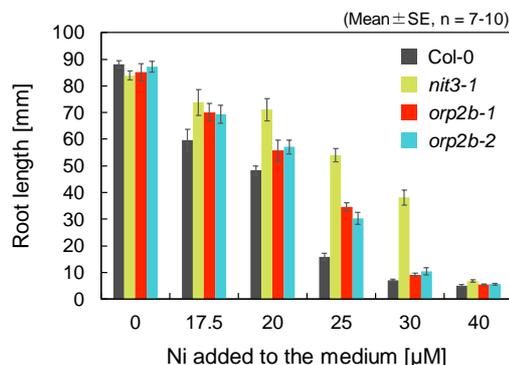


図5 *orp2b-1* 及び *orp2b-2* のNi耐性評価

4. 結論

AHA2 及び *ORP2B* の2遺伝子がシロイヌナズナのNi毒性に関わる原因遺伝子として同定された。*AHA2* 及び *ORP2B* はそれぞれ独立した機能をもつことから、それぞれの遺伝子が関与した異なるNi毒性機構が存在することが示唆された。また、*AHA2* 及び *ORP2B* の2遺伝子における変異により相加的に植物体のNi耐性を強化できると考えられる。将来的にこれらの遺伝子変異を利用した作物のNi耐性強化技術の開発が期待できる。

引用文献

- (1) Nishida, S. et al. *Plant Cell Physiol.* **2011**, 52, 1433–1442.
- (2) Nishida, S. et al. *Plant Signal. Behav.* **2012**, 7, 329–331.
- (3) Fekih, R. et al. *PLoS ONE*, **2013**, 8, 1–10.

対外発表

- 1) 岡崎俊樹, 西田翔, 池田智洋, 古田直紀: プラズマ分光分析研究 2018 筑波セミナー, 2018, 茨城, ポスター発表 (ポスター賞).
- 2) 岡崎俊樹, 西田翔, 池田智洋, 古田直紀: 日本分析化学会第67年会, 2018, 宮城, 口頭発表.
- 3) Toshiki Okazaki, Sho Nishida, Naoki Furuta: 2020 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 2020, Tucson, USA, Poster.