

学位論文

ヘビノネゴザのカドミウム耐性機構に関する研究

2020年9月

生物工学専攻 鵜飼 優子

指導教員 島田 浩章

目次

第一章. 序論.....	2
第二章. ヘビノネゴザのカドミウム蓄積機構の評価	
2.1. 序論.....	4
2.2. 結果.....	4
2.3. 考察.....	12
2.4. 小括.....	14
第三章. ヘビノネゴザのカドミウムストレスへの生理的応答の評価	
3.1. 序論.....	15
3.2. 結果.....	16
3.3. 考察.....	24
3.4. 小括.....	26
第四章. Ca トランスポーターの単離	
4.1. 序論.....	27
4.2. 結果.....	27
4.3. 考察.....	41
4.4. 小括.....	43
第五章. <i>De novo</i> トランスクリプトーム解析	
5.1. 序論.....	44
5.2. 結果.....	44
5.3. 考察.....	66
第六章. ヘビノネゴザが保持するトランスポーターの機能解析	
6.1. 序論.....	68
6.2. 結果.....	68
6.3. 考察.....	76
第七章. 総合考察.....	77
第八章. 材料と方法.....	79
謝辞.....	93
引用文献.....	94

第一章. 序論

様々な産業活動によって排出された有害物質の拡散を防止したり、除去したりすることに役立つ技術として、植物が持つ土壤中の水分や養分を吸収する機能を活用するファイトレメディエーションが注目されている。この技術の利点は、比較的低濃度であれば、広範囲に汚染された土地を長期間にわたり穏やかに汚染物質を処理できること、対象物質の回収・再利用が可能であることなどが挙げられる。この方法を用いるためには対象元素に対する高濃度の吸収能力と、耐性を合わせ持つ植物種が必要である。

カドミウム (Cd) は、多くの植物にとって有毒な元素である (Clemens, 2006)。多くの植物は Cd に耐性を持たない。これらの植物では土壤中の Cd は地上部に蓄積され、この濃度が 5–10 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重量 (DW) に達すると、Cd による毒性の影響を強く受ける (White and Brown, 2010)。タバコ (*Nicotiana tabacum*) は、100 μM の Cd 環境下に曝露されると、植物体の重量および根の伸長が大きく減少することが報告されている (Misra and Gedamu, 1989)。一方、100 $\mu\text{g/g}$ DW 以上の Cd が体内に入っても生育できる耐性植物の存在が知られている (Baker et al., 2000)。乾燥重量あたり 0.1 mg/g 以上の金属量を蓄積できる植物種は、特定元素高濃度蓄積種 (ハイパーアキュムレーター=Hyper Accumulator :HA) と呼ばれている (Baker et al., 2000)。吉原ら (2000) は、200 種以上の被子植物を対象に Cd 耐性と蓄積能に関する選抜試験を行った結果から、植物の一般的な傾向として、「できるだけ Cd を吸収・蓄積しない」という戦略で耐性を獲得している可能性を示した。

Cd 耐性を示す植物のひとつに、ヘビノネゴザ (*Athyrium yokoscense*) がある。ヘビノネゴザは、日本を含む東アジアに生息するシダ植物である (図 1) (Van et al., 2006)。ヘビノネゴザは、1000 μM の Cd 環境下でも正常に生育する。この場合、1.5~3.5 mg/g DW の Cd を体内に蓄積する (Yoshihara et al., 2005)。

1970 年代後半から、Cd を高濃度に蓄積しつつ耐性を維持する HA として、ヘビノネゴザが注目されてきた (本間ら 1977; Nishizono et al., 1987, 1989)。ヘビノネゴザは、Cd 耐性だけでなく、亜鉛 (Zn)、鉛 (Pb)、銅 (Cu) などの重金属に対しても強い耐性を示すことが知られている (Morishita and Boratynski, 1992)。このことからヘビノネゴザは特殊な重金属耐性機構を有するものと考えられる。そこで、この植物の Cd 耐性のメカニズムを明らかにすることで、植物における重金属耐性機構や重金属の蓄積機構の理解に資する重要な知見が得られるのではないかと考えられる。

Cd が吸収されるメカニズムについては、主に、シロイヌナズナやイネを用いた実験によって詳細な生理学的解析が進められている。この結果から、植物にと

って必須元素ではない Cd は、鉄や亜鉛などの必須元素の取り込みに紛れて体内に吸収されると考えられている (Clemens, 2006)。例えば、タバコでは 100 μM の Cd 添加培地で 2 週間培養した際に、鉄 (Fe)、Zn、マグネシウム (Mg)、およびマンガン (Mn) のうち、Fe の含有量が有意に低下する。これに対し、ヘビノネゴザではこれらの必須金属の含有量に有意な変化はみられないことが示されている (程島 2007)。また、Cd の HA であるゲンバイナズナなどでは、高濃度の重金属を蓄えられるメカニズムとして、根から取り込まれた重金属が即座に地上部へと輸送され、液胞などに隔離されることが報告されている (Shen et al., 1997, Lasat et al., 1996)。根における Cd の吸収に関するメカニズムを理解するためには、トランスポーターの分子生物学的レベルでの解析や、生理的な反応、そして根の構成成分や構造などを含む網羅的、多面的な知見が欠かせない。ヘビノネゴザの Cd 耐性には基質特異性の高いトランスポーターや一度細胞内に取り込まれた Cd を細胞質外に排出するトランスポーターの存在が示唆されている (Yoshihara et al., 2005、程島 2007)。

本研究では、まずヘビノネゴザの Cd 吸収に関する全体的な解析を行った (第 2 章)。次に Cd 吸収に伴って生じる生理的な変化を調べた (第 3 章)。この過程で、Cd の吸収が Ca の吸収量に影響を受けることがわかったため、Ca トランスポーターに関する解析を行った (第 4 章)。さらに、より詳細な分子生物学的な解析を実施するために、ヘビノネゴザの遺伝情報の取得と cDNA ライブラリーの構築を行い (第 5 章)、この情報をもとに、Cd ストレスに応答した遺伝子発現に関するトランスクリプトーム解析を行った。最後に、金属の吸収に関わるトランスポーターの機能解析を行った (第 6 章)。これらの知見をもとに、ヘビノネゴザにおける Cd 耐性メカニズムに関する考察を行った。



図 1 ヘビノネゴザの孢子体

第二章. ヘビノネゴザのカドミウム蓄積機構の評価

2-1. 序論

ヘビノネゴザは、地上部よりも根に多くの Cd 蓄積が起こることが報告されている (Yoshihara et al., 2005)。ヘビノネゴザの Cd 吸収と蓄積の機構を詳細に解明するため、植物体を Cd が含まれる培養液で水耕栽培し、この植物体を地上部、根のうちの培養液に浸っていない部分 (根基部)、根の端部の培養液に浸っている部分 (根端部) の 3 部位に分けて、それぞれの部位に含まれる Cd 量を調べた。これをタバコの場合と比較することで、ヘビノネゴザの Cd 吸収機構の特性の解明を試みた。ところで、多くの植物では Cd は、細胞膜に存在する Fe や Zn、Mn などの必須元素のトランスポーターを介して細胞内に誤って取り込まれることが知られている (Clemens, 2006)。しかし、ヘビノネゴザが Cd を吸収する際にどの元素と競合するか不明である。さらに、この必須元素の吸収機構なども未知である。そこで本研究では、ヘビノネゴザの Cd 耐性や蓄積メカニズムの解明に関する知見を得るため、Cd と競合する二価の必須元素の探索を行った。すなわち、Cd と同じ二価の金属元素であるカルシウム (Ca)、Mn、Zn、Fe、Cu、コバルト (Co) および Mg の 7 種の必須元素と Cd 蓄積との関連性について調査した。これらの実験結果を、放射性 Cd 同位元素を用いて行われた細胞内に入った Cd の植物体内の移行実験を交えて、ヘビノネゴザの Cd 蓄積機構についての考察を行った。

2-2. 結果

2-2-1. ヘビノネゴザにおける Cd 蓄積量の解析

ヘビノネゴザの胞子体を、終濃度が $0.1 \mu\text{M}$ になるように Cd を添加した 1/4MS 培養液に移し替えることで Cd への曝露を行った (図 2-1)。この Cd 濃度ではヘビノネゴザ、タバコともに Cd による障害はほとんど生じなかったため、この培養液を標準培養液とした。これにより吸収・移行した植物体の根部および地上部の Cd 量を調べ、同様の実験を行ったタバコのそれぞれの組織での Cd 量と比較した。ヘビノネゴザでは、検出された Cd のほとんどは根端部に存在していた ($4 \mu\text{g/g DW}$)。根基部および地上部では $1 \mu\text{g/g DW}$ 以下であった (図 2-2)。一方、タバコでは根端部と根基部の両方から $4 \mu\text{g/g DW}$ 以上の Cd が検出され、地上部からは $1 \mu\text{g/g DW}$ 以下の Cd が検出された (図 2-2)。この結果から、ヘビノネゴ

ザは Cd 吸収量がタバコよりも少なく、また、吸収した Cd のほとんどは根の端部に留まることがわかった。一方、タバコでは吸収された Cd の多くが根基部へ移行することがわかった。このことからヘビノネゴザとタバコでは、Cd の吸収移行とその蓄積部位が大きく異なることがわかった。



図 2-1 サンプルングの様子

液体培養に使用されるポートと呼ばれる白いプラスチックを 3 段に重ね、根が培養液に浸っている部位と浸っていない部位に分けられるように移植した (A)。根で培養液に浸っている部位を根端部、浸っていない部位を根基部、さらに地上部に分けてサンプルングを行った (B)。タバコについても同様に行った。

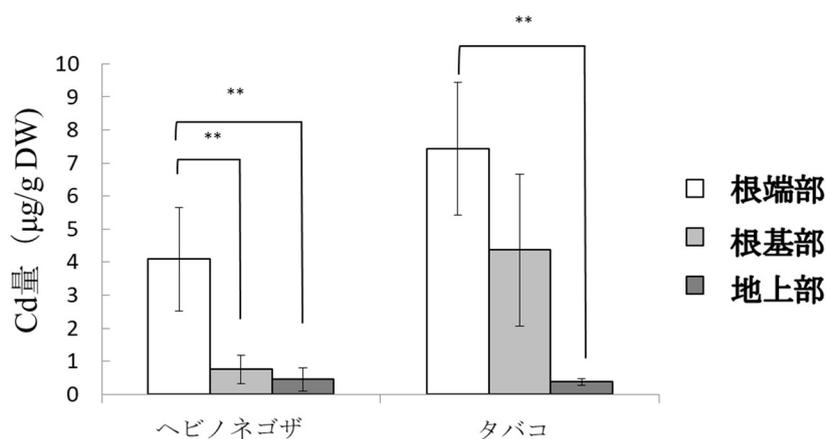


図 2-2 乾燥重量当たりの Cd 量の比較

各植物体を 0.1 μM CdCl_2 環境下へ 24 時間曝露したときの地上部、根基部、根端部の Cd 量を測定した。エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$, t 検定、 $**p < 0.01$)。

2-2-2. Cd 吸収に影響する二価の必須金属元素の特定

植物は様々な金属元素を生育のための必須要素として環境中より取り込む必要がある。これらの金属元素は細胞膜に存在するトランスポーター等により積極的に取り込まれる。Cd は非必須元素であるが、これらの必須金属元素の取り込みと競合し、トランスポーターより流入することが知られている (Clemens, 2006)。

Cd と競合する二価の必須元素の探索をするため、標準培養液から 7 種の二価の必須金属元素を 1 つずつ取り除いた培養液を調製した。標準培養液より Ca、Mn、Zn、Fe、Cu、Co および Mg のそれぞれを除いた培養液を調製し、それぞれを Δ Ca、 Δ Mn、 Δ Zn、 Δ Fe、 Δ Cu、 Δ Co、 Δ Mg 培養液と名付けた。これらの培養液を用いて、ヘビノネゴザとタバコの植物体を 24 時間浸漬して Cd 曝露した。この後、地上部、根基部、根端部に分けてそれぞれ Cd 量を測定した。

その結果、根端部におけるヘビノネゴザの Cd 量は、培養液より Ca を取り除いた Δ Ca で最大値 (47.27 $\mu\text{g/g DW}$) を示した。この培養液では標準培養液 (15.28 $\mu\text{g/g DW}$) を用いた場合に比べ約 3 倍に増加した (図 2-3A)。この他の元素を除いた試験区では標準培養液を用いた場合との間に有意差は認められなかった (図 2-3A)。タバコにおいても Δ Ca 培養液を用いた場合に Cd 量が 41.12 $\mu\text{g/g DW}$ を示し、標準培養液を用いた場合 (13.23 $\mu\text{g/g DW}$) のおよそ 3 倍の値となった (図 2-3B)。

次に、根基部における Cd 量は、ヘビノネゴザでは標準培養液と比較して有意差が認められる試験区はなかった。タバコにおける Cd 量は、 Δ Ca で増加傾向が見られ、 Δ Fe、 Δ Cu および Δ Co を用いた場合では有意な減少が認められた (図 2-3C、D)。一方、地上部の Cd 濃度は、いずれの植物種および試験区においても Cd 量に有意差は見られなかった (図 2-3E、F)。

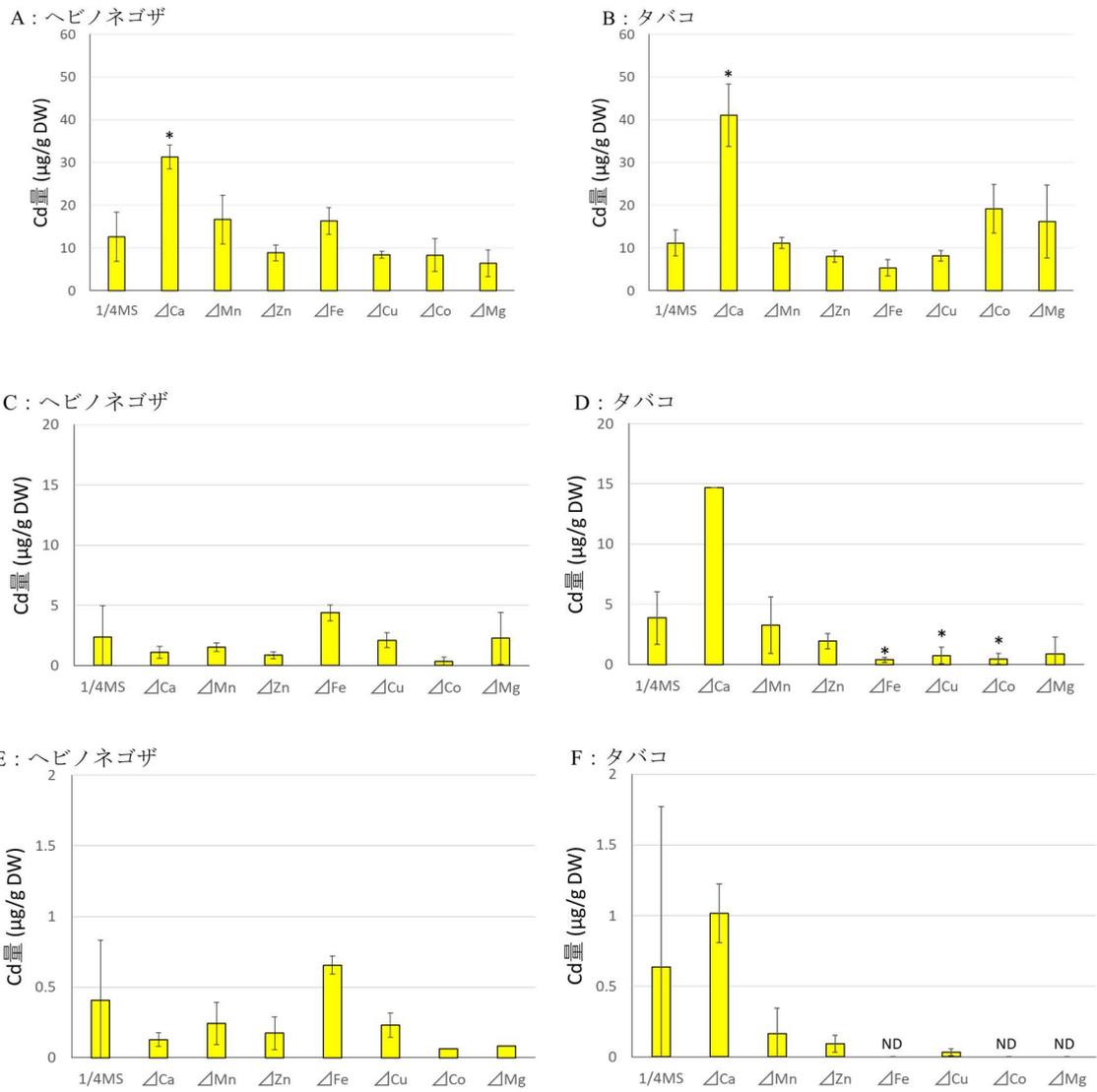


図 2-3 特定元素を除いた培養液に曝露したときの植物体の Cd 量
 標準培養液から各元素をそれぞれ除いた培養液へ各植物体を 24 時間曝露したときの各部位の Cd 量を示す (ND: 検出下限以下、n=4、
 ダネット検定、* $p < 0.05$)。

A、B: 根端部、C、D: 根基部、E、F: 地上部

A、C、E: ヘビノネゴザ、B、D、F: タバコ

2-2-3. Cd 吸収における Ca 濃度の影響

前項の実験では、Ca が欠乏する Cd 含有培養液で栽培した場合に Cd 吸収量が顕著に増加したことから、Cd の流入には Ca の吸収と何らかの関係があると考えられた。Cd の吸収量と培養液中の Ca 濃度の関係を詳細に調べるため、標準培養液に含まれる Ca の終濃度を 0 mM、0.25 mM、0.5 mM、0.75 mM、1.0 mM および 1.25 mM に調製した培養液を作製し、同様の方法で Cd 量を測定した。

その結果、根端部で検出された Cd 量は、ヘビノネゴザとタバコのいずれにおいても、培養液中の Ca 濃度が少ないほど Cd 量が増加することがわかった（図 2-4A、B）根基部および地上部では、ヘビノネゴザとタバコのいずれにおいても Ca 濃度による Cd 量の変化は認められなかった（図 2-4C~F）。

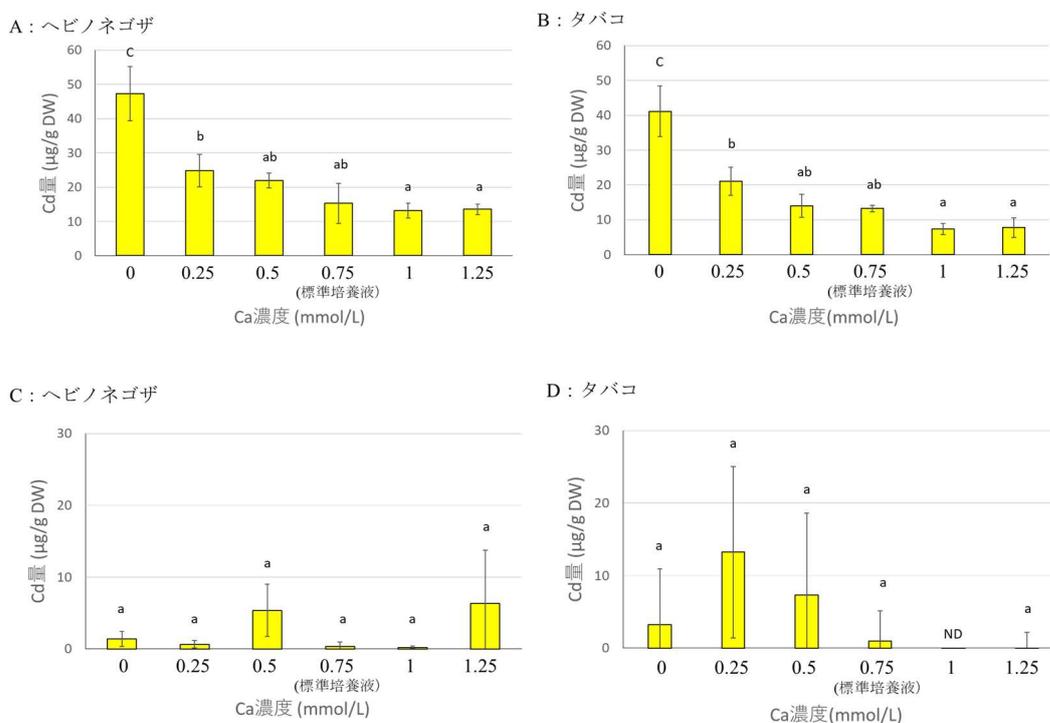
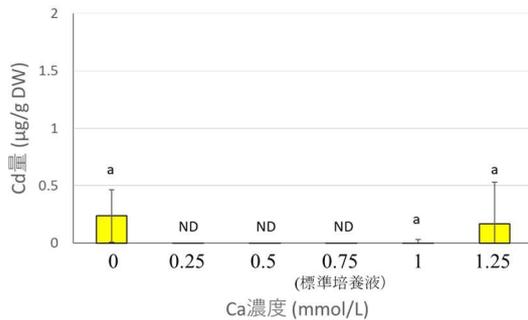


図 2-4 Ca 濃度が異なる培養液に曝露したときの植物体の Cd 量
標準培養液の Ca 濃度を 0 mM、0.25 mM、0.5 mM、0.75 mM（標準培養液）、1.0 mM、1.25 mM とした培養液へ各植物体を 24 時間曝露したときの各部位の Cd 量を示す（ND：検出下限以下、n=4 トウキー、有意水準 5%）。

A、B：根端部、C、D：根基部、E、F：地上部

A、C、E：ヘビノネゴザ、B、D、F：タバコ

E: ヘビノネゴザ



F: タバコ

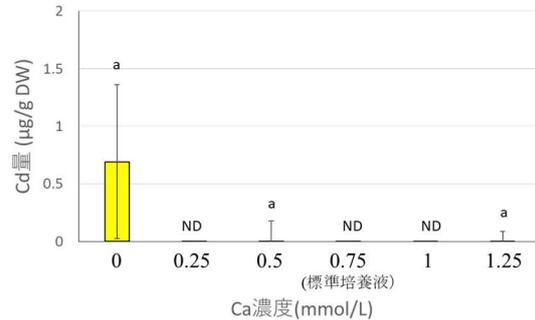


図 2-4 Ca 濃度が異なる培養液に曝露したときの植物体の Cd 量 (続き)

2-2-4. ポジトロンイメージング装置を用いた吸収した Cd 吸収動態

Ca 欠乏時における Cd の吸収機構をより詳細に調査するため、ポジトロンイメージング装置 (PETIS) を用いて、Cd の吸収動態を観察した。PETIS は、植物体全体の元素や物質の移動を動的分析するために特別に開発された放射性同位体を用いたイメージング法である (図 2-5、Fujimaki, 2007; Fujimaki et al., 2010)。この手法を用いることにより、非破壊的かつ定量的に特定の元素に関するリアルタイムの 2 次元画像を得ることができる。また、得られたイメージング動画と根に集まる Cd 量の変化に関する移動速度の解析により、検出された Cd 量の吸収量と吸着量を切り分けることが可能である (Yoshihara et al., 2014)。すなわち、初期の急速な濃度依存的な Cd 量の変化として検出される Cd 移行は、物理的プロセス (吸着) に起因するものと見なすことができ、その後のほぼ一定のゆるやかな勾配を示す Cd 量の変化の速度から求められる値は、生理学的プロセス (吸収) に起因するものと見なすことができる (図 2-6A、Yoshihara et al., 2014)。

植物の根から吸収された金属元素の移行は、大きく細胞内を通過する細胞内輸送 (シンプラスト輸送) と細胞間隙を通過する細胞外輸送 (アポプラスト輸送) によるものに分けられる (Stuedle and Frensch 1996)。シンプラスト輸送では、金属イオンが比較的初期の段階で細胞膜のトランスポーターを介して細胞内へと吸収され、輸送される。細胞内輸送された金属イオンはカスパリー線を超えて内鞘細胞へと移行する。内鞘細胞に到達した金属イオンは、別なトランスポーターを介して維管束内へ輸送され、維管束を伝って上方へ輸送される。一方、維管束に移行しなかった金属イオンは、そのまま内鞘細胞内や内鞘細胞間に留まる (Stuedle and Frensch 1996)。アポプラスト輸送では細胞間隙を通過して内側へ移動する。高等植物の場合、細胞間隙に入り込んだ金属イオンは中心柱の外側にある内皮に存在するカスパリー線によって内鞘への移動が阻まれ、表皮から内皮の

細胞間隙に留まる。すなわち、金属イオンが維管束に到達するためには、シンプラスト輸送を介する必要がある (Steudle and Frensch 1996)。

金属イオンがシンプラスト輸送によって細胞質内へ取り込まれることを「吸収」として取り扱い、アポプラスト輸送によって細胞質外に留まっている状態を「吸着」と表現される。

先行研究において、ヘビノネゴザとタバコについて、標準培養液と CaCl_2 溶液のそれぞれに浸漬して Cd 曝露させた個体の Cd 吸収の動態が観察されている (Yoshihara et al., 2014)。その結果、ヘビノネゴザでは、根より吸収された Cd の地上部への移行はほとんど認められず、地上部において Cd は検出されていない (Yoshihara et al., 2014)。同様の実験を ΔCa を用いた栽培条件で行い、このデータをもとに根における Cd の吸収量と吸着量を解析したところ、ヘビノネゴザでは、標準培養液で栽培した場合の Cd の吸収率が 0.38 であり、 ΔCa では 0.15 であった (図 2-6B、表 1)。一方、タバコでは、標準培養液で栽培した場合の Cd の吸収率が 0.61 であり、 ΔCa では 0.67 であった (図 2-6C、表 1)。これらの吸収率の計算結果と、2-2-2 項で述べた実験により得られた根端部の Cd 量から、推定吸収量と推定吸着量を算出したところ、標準培養液で栽培されたヘビノネゴザにおける Cd の推定吸収量は $4.50 \mu\text{g/g DW}$ 、推定吸着量は $7.33 \mu\text{g/g DW}$ であると算定された。一方、 ΔCa で栽培されたヘビノネゴザにおける Cd の推定吸収量は $4.70 \mu\text{g/g DW}$ 、推定吸着量は $26.60 \mu\text{g/g DW}$ であると算定された (表 1)。この結果から、ヘビノネゴザでは、標準培養液で栽培した場合と Ca 欠乏時の Cd 吸収量はほぼ同じであることがわかった。このことから、Ca 欠乏によって Cd 量が増加したのは、多くが細胞に吸着した Cd であることがわかった。

一方、標準培養液で栽培したタバコにおける推定吸収量は $7.11 \mu\text{g/g DW}$ であり、推定吸着量は $4.54 \mu\text{g/g DW}$ であった。また、 ΔCa における推定吸収量は $24.27 \mu\text{g/g DW}$ であり、推定吸着量は $11.95 \mu\text{g/g DW}$ であった (表 1)。この結果から、タバコでは Ca 欠乏時に Cd 吸収量が大きく増加していることがわかった。これにより、タバコでは、Ca 欠乏によって増加した Cd は吸収と吸着の両方に由来することがわかった。

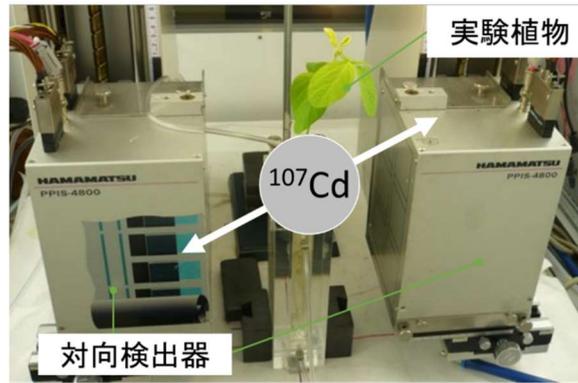
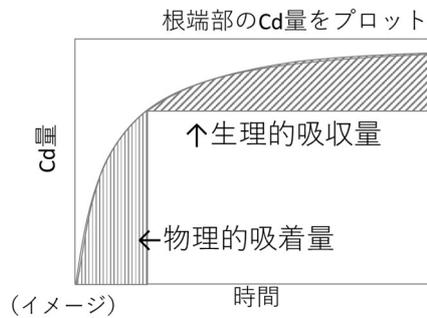
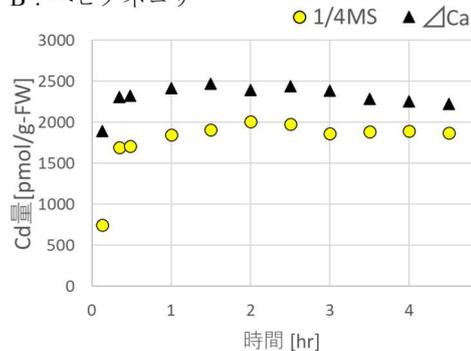


図 2-5 ポジトロンイメージング装置 (PETIS) の概略図

A : 生理的吸収量と物理的吸着量の概略図



B : ヘビノネゴザ



C : タバコ

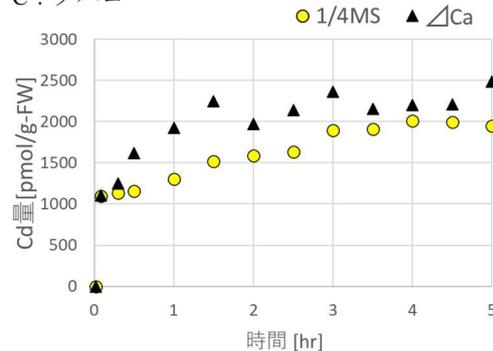


図 2-6 根端部における Cd 量の蓄積挙動の観察結果

A : 生理的吸収量と物理的吸着量の概略図を示す。初期の急速な濃度依存的な Cd 量の変化は物理的プロセス (吸着)、その後のほぼ一定のゆるやかな勾配を示す Cd 量の変化は、生理学的プロセス (吸収) に起因するものと見なすことができる。B : ヘビノネゴザ、C : タバコのポジトロンイメージング装置 (PETIS) を用いた Cd 量の蓄積挙動を観察した結果を示す。物理的吸着量と生理的吸収量の分岐点はそれぞれ 20 分時点、5 分時点とした。

表1 Cdの吸収量と吸着量

植物種	試験区	Cd量 ($\mu\text{g/g DW}$)	吸収率	推定吸収量 ($\mu\text{g/g DW}$)	推定吸着量 ($\mu\text{g/g DW}$)
ヘビノネゴザ	1/4MS	11.83	0.38	4.50	7.33
	$\triangle\text{Ca}$	31.30	0.15	4.70	26.60
タバコ	1/4MS	11.66	0.61	7.11	4.54
	$\triangle\text{Ca}$	36.23	0.67	24.27	11.95

PETISによって算出された吸収率と、ICP-AESによって得られたCd量(図2-3)から、ヘビノネゴザとタバコの推定吸収量と推定吸着量を算出した。

2-3. 考察

地上部、根基部、根端部に分けたCd量を測定した結果、ヘビノネゴザは主に根端部にCdを蓄積し、根基部および地上部にほとんど移行しないことがわかった(図2-2)。一方、タバコでは、根端部と根基部で同程度のCdが検出された(図2-2)ことから、ヘビノネゴザは流入したCdを根端部にとどめる機構が存在することが示唆された。このようにCdを根端部にとどめる機構を有するCd耐性植物は他に知られておらず、このことがヘビノネゴザのCd耐性における大きな特徴であると考えられた。

本研究では、植物体に侵入したCdが上記のいずれの機構かを調べた。培養液に直接接している根(根端部)では、「吸収」と「吸着」の両方が検出されると推定された。ヘビノネゴザの根端部では、Ca欠乏条件で顕著なCd量の増加が認められ(図2-3A)、また、培養液中のCa濃度と植物体の根端部のCd量の間には負の相関関係が認められた(図2-4A)。このことから、環境中のCa量がCdの吸収と移行に大きな影響を及ぼすことが示唆されたが、ヘビノネゴザの根では「吸収」がほとんど起こっておらず、検出されたCdの大部分が「吸着」によるものであることが明らかとなった(表1)。このことから、ヘビノネゴザではCdは根の中心柱へのCdの移行が起こらず、それゆえに地上部へのCdの移行も起こらないことがわかった。一方、タバコでは、ヘビノネゴザと同様に培養液中の

Ca濃度と植物体の根端部のCd量の間を負の相関関係が認められたが(図2-3B、図2-4B)、多くのCdが根の細胞内に「吸収」されていた(表1)。また、根基部においては Δ Fe、 Δ Cu、 Δ CoでCd量の有意な減少が見られたことから、タバコの生体内でCdは、FeやCu、Coと輸送や転流がされている可能性が考えられる(図2-3D)。

これらの結果から、以下の可能性が考えられた。ヘビノネゴザの根では、タバコと異なり、Ca欠乏時に吸着量のみが増加したが、これが生じるためにはヘビノネゴザの表皮細胞あるいは皮層細胞に多くのCdを吸着させる特殊な構造が存在している可能性がある。これらの細胞の細胞壁にCa結合サイトが存在し、これがCd結合にも関与しているならば、培養液中のCa濃度が低い場合にCaに対するCdの相対的な存在比が増すことで、この結合サイトの多くの部分にCdが結合したのではないかと推測される(図2-7A)。

一方、膜に存在する金属トランスポーターの選択性の高さが関与している可能性が考えられる。多くの金属トランスポーターは本来輸送すべき金属イオンとは異なる金属イオンを輸送できるとの報告例がある(Nakanishi et al., 2006; Miyadate et al., 2011; Ueno et al., 2009; Uruguchi et al., 2011)。ヘビノネゴザではこれまでに金属トランスポーターに関する研究例がなく、どのような機能を有するかに関する情報がない。しかし、これまでに得られた実験結果から、ヘビノネゴザのトランスポーターは基質特異性が高く、特定の金属イオンの吸収が選択的に起こるため、Cdの吸収が抑制された可能性が考えられる(図2-7B)。

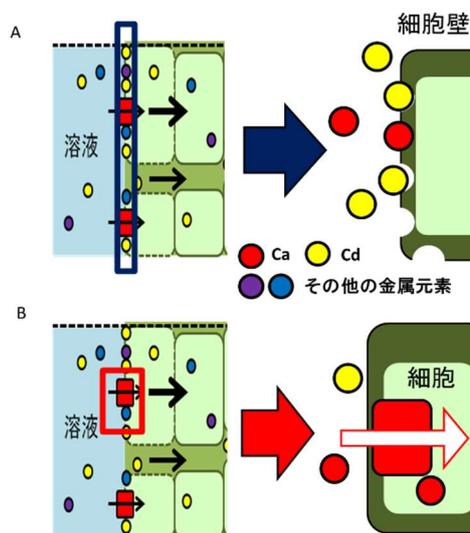


図2-7 根端部におけるCaの影響(仮説)

根端部におけるCaとCdの競合関係の仮説を図に示す。

A: 細胞壁にCa結合サイトが存在している場合

B: 金属トランスポーターにおける基質特異性が高い場合

2-4. 小括

ヘビノネゴザでは根端部に Cd が留まることがわかった。この Cd はほとんどが根の細胞への吸着によるもので、細胞内への吸収はほとんど起こっていなかった。ヘビノネゴザ、タバコともに環境中の Ca 量は Cd の取り込みに大きく影響した。しかし、ヘビノネゴザとタバコでは Ca の影響が大きく異なることが明らかとなった。ヘビノネゴザとタバコの Cd の吸収率と吸着率を算出したところ、タバコでは吸収と吸着の両方が Ca 欠乏によって増加したのに対し、ヘビノネゴザでは吸着量のみが増加していた。これは、ヘビノネゴザでは Cd の維管束内への輸送がタバコよりも厳密に抑制されていることを示唆している。このことから、ヘビノネゴザは、細胞壁表面に特異的な金属との結合サイトのようなものが存在している可能性や、個々の金属イオンに対する特異性の高いトランスポーターが存在し、金属イオンの吸収や生体内での分配を厳密に制御する能力に長けている可能性があるのではないかと推察された。

第三章. ヘビノネゴザのカドミウムストレスへの生理的応答の評価

3-1. 序論

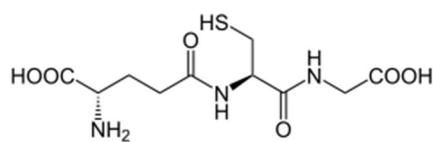
ヘビノネゴザは高濃度の Cd に汚染された土壌でも生育できるが、土壌環境中の Cd がヘビノネゴザの個体に与える影響についてはわからないことが多く、生化学的な事象の知見も少ない。代表的な Cd ストレスのひとつとして、酸化ストレスが知られている。酸化ストレスとは、生体内の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、細胞の DNA・細胞膜上のリン酸脂質・タンパク質・糖質などの傷害を招き、生体にとって好ましくない状態に陥ることをいう (Schutzendubel et al., 2001; Filek et al., 2008)。Cd が土壌中に存在すると、植物が必須元素を吸収する際に混入し、細胞内での必須金属欠乏を引き起こす原因となる (Mendoza et al., 2011)。また、Cd は後述するチオール化合物であるグルタチオンやファイトキレチンとよく結合する (図 3-1)。これらとの結合は細胞内の無毒化機構として働く。しかし、これにより、本来は細胞内に生じた活性酸素種 (ROS) の除去に働くべきチオール化合物を消費してしまい、結果的に Cd ストレスが ROS の増加を招く形となる (Clemens, 2001; Pichorner et al., 1993; Kessler and Brand, 1995; Shaw et al., 1995; Gallego et al., 1996; Chaoui et al., 1997; Cho and Seo, 2005; Pietrini et al., 2003; Pompella et al., 2003)。

抗酸化物質のひとつであるグルタチオンはチオール基を持ち、これが電子供与体として活性酸素に作用することで、ROS を還元して除去することが報告されている (Pompella et al., 2003)。この過程においてグルタチオンは酸化型グルタチオン (GSSG, Glutathione-S-S-Glutathione) に変換されることから、これらの比率は細胞内酸化ストレスの評価指標として用いられている (Pastore et al., 2003)。このほかに、チオール基を持つ物質には、グルタチオンから派生するファイトキレチンがある (Cobbett, 2000; Grill et al., 1989)。ファイトキレチンは、Cd 等の有害重金属をキレートし、液胞や細胞壁に隔離、蓄積することで細胞を保護する機能を持つ (Martinoia et al., 1993; Vogeli-Lange and Wagner, 1990; Tennstedt et al., 2009)。ファイトキレチンは、複数の還元型グルタチオンによって構成されるため、グルタチオン合成の機能喪失型変異体では、Cd に対して感受性となることが報告されている (Howden et al., 1995)。

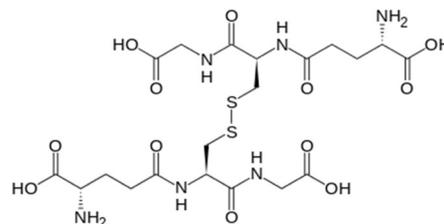
ヘビノネゴザでは、これらの機構の存在は明らかにされていない。この知見を得るために、Cd 曝露した植物体における ROS の発生、チオール化合物の蓄積およびグルタチオン量を調べた。また、これらの事象をより深く理解するため、根の横断面の観察およびカスパー線形成に関する調査を行い、地下組織の構造的な知見を得た。

ところで、多くの植物は、根からさまざまな物質を分泌していることが知られている。これによって、根圏にある元素の動態を変化させ、この吸収のしやすさを変えることが知られている。例えば、ムギネ酸の分泌によって不溶性の鉄を可溶化すること (Takemoto et al., 1979) や、根からクエン酸やシュウ酸、リンゴ酸などを分泌することでアルミニウムをキレート化し、耐性を得ている (Yang et al., 2012; Ma et al., 1997a, b; Zheng et al., 1998; Delhaiza et al. 1993)。Cd に対しても、同様の細胞外への有機酸の分泌例がいくつか報告されている (Xie et al., 2013; Sun et al., 2013) が、ヘビノネゴザでは、このような機構が存在するかどうかは明らかとされていない。そこで、ヘビノネゴザの根の有機酸含量の分析を行い、Cd 添加による増減の有無を調査した。これを、Cd 耐性を持たない植物であるタバコと比較した。

A : 還元型グルタチオン



B : 酸化型グルタチオン



C : ファイトキレチン

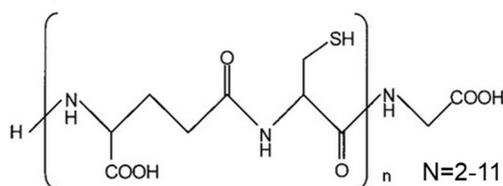


図 3-1 グルタチオンおよびファイトキレチンの構造式

3-2. 結果

3-2-1. Cd ストレスに起因する活性酸素種 (ROS) の検出

有害な重金属イオンなどに植物体が曝露されたときに、ROS の発生が誘発され、これが大きなストレスとなることが報告されている (Andresen and Küpper, 2013)。そこで、Cd を曝露したヘビノネゴザの根での ROS の発生の有無を調べた。その結果、中心柱および内皮において ROS のシグナルが観察された。しかし、その他の部位では ROS は観察されず、Cd の曝露の有無による ROS の量的な増加は認められなかった (図 3-2)。

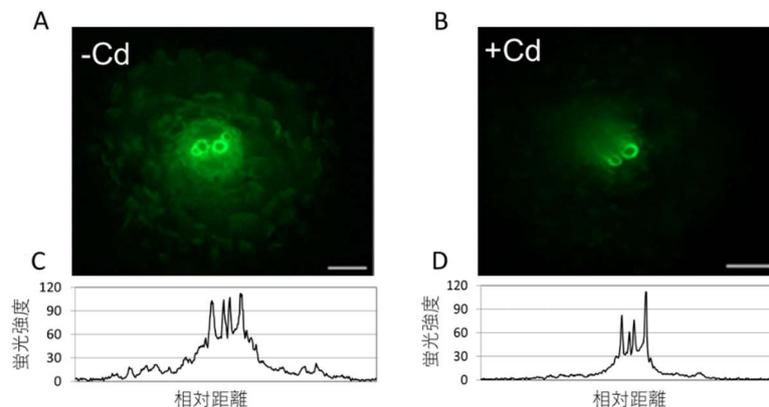


図 3-2 活性酸素種 (ROS) の検出

根の断面を CellROX Green reagent で染色した。Bars=100 μm

A : Cd 非曝露の個体

B : 100 μM Cd 環境下へ 24 時間曝露した個体

C、D : それぞれ (A)、(B) の根の中心を通る任意の線上の蛍光強度のグラフを示す。485 nm / 520 nm (励起波長/蛍光波長)

3-2-2. Cd 曝露した植物体におけるチオール化合物の検出および定量

ヘビノネゴザにおける Cd ストレスへの生理的応答に関する知見を得るため、チオール化合物 (-SH 基を持つ物質) の検出を試みた。検出されるチオール化合物には、ファイトキレチンや還元型グルタチオンが含まれる。チオール化合物は、Cd 曝露条件下で中心柱への蓄積が見られた (図 3-3)。Cd による酸化ストレスの指標および変動したチオール化合物による生体内反応の理解の一助とするため、総グルタチオン量 (還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンの総量) を定量した。その結果、Cd 添加の有無による有意な量的変動は認められなかった (図 3-4)。酸化型グルタチオン濃度を定量したところ、ほとんどの検体で検出下限以下であった (表 2)。総グルタチオン量に変動しなかったこと、および酸化型グルタチオンが検出されなかったことは、Cd 環境に置かれたヘビノネゴザが酸化ストレスを感じていないことを示唆しており、Cd 曝露による ROS の量的差異が生じなかった結果を支持している。また、酸化型グルタチオンが検出されなかったことから、総グルタチオンとして検出された物質の多くは、還元型グルタチオンであることが示唆される。還元型グルタチオン量に変動していなかった一方で、チオール化合物の蓄積が見られたことから、中心柱に蓄積したチオール化合物はファイトキレチンであることが示唆された。

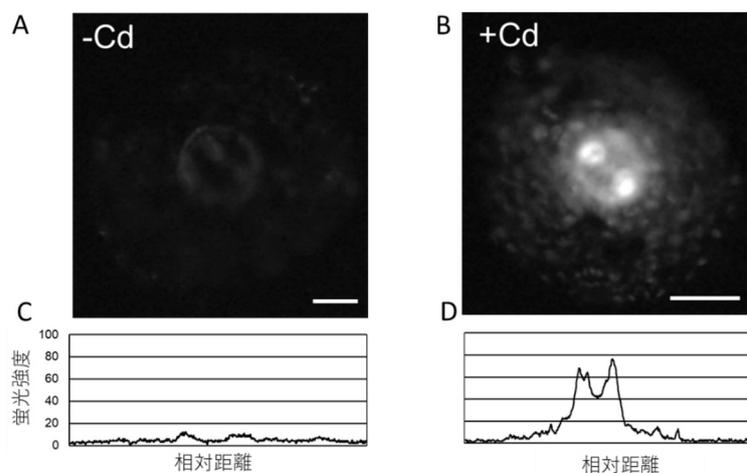


図 3-3 チオール化合物の検出

根の断面を mCBI で染色した。Bars=100 μ m

A : Cd 非曝露の個体

B : 100 μ M Cd 環境下へ 24 時間曝露した個体

C、D : それぞれ (A)、(B) の根の中心を通る任意の線上の蛍光強度のグラフを示す。394 nm / 490 nm (励起波長/蛍光波長)

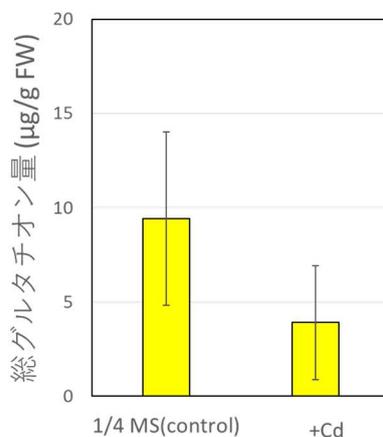


図 3-4 総グルタチオン量の定量の結果

プレートリーダーを用いたサイクリング法による定量の結果を示す (n=6、t 検定、*p<0.05)。検量線を用いてサンプル中の総グルタチオン濃度を算出した。

表2 総グルタチオン量および酸化型グルタチオン量の定量の結果

n 数	総グルタチオン		酸化型グルタチオン (GSSG)	
	1/4 MS	+Cd	1/4 MS	+Cd
1	11.29008	N.D.	N.D.	N.D.
2	N.D.	6.252181	N.D.	N.D.
3	11.31372	6.148278	N.D.	N.D.
4	11.29008	5.514332	N.D.	N.D.
5	11.31372	N.D.	N.D.	N.D.
6	11.3019	5.48604	8.831801	N.D.

サイクリング法による総グルタチオンおよび酸化型グルタチオンの定量結果を示す。N.D.は検出下限以下を示す。単位：μg/g FW

3-2-3. ヘビノネゴザのカスパリー線形成に関する観察

高等植物の根の中心柱周辺にはカスパリー線が存在し、外部からの有害物質の侵入を阻止する役割を担っている (Van, 1961)。これまで、ヘビノネゴザではカスパリー線の存在に関する知見はないが、前項の実験で、ROS とチオール化合物のいずれもが中心柱付近のみで検出されたことから、ヘビノネゴザにもカスパリー線が存在するのではないかと思われた。カスパリー線は維管束植物ではよく発達しているが、シダ植物では発達の度合いが様々である (Lersten, 1997)。ヘビノネゴザの根における構造的な分化とカスパリー線の発達度合いを明らかにするために、根の断面を観察し、カスパリー線の存在の有無を調べた。その結果、ヘビノネゴザの根には内皮や維管束の構造が観察された (図 3-5)。フクシンで染色したところ、中心柱周辺の領域が線状に染色された (図 3-5)。フクシンは、リグニンと結合し赤く染色することが知られている (Barlow, 1969)。発達したカスパリー線には多量のリグニンが含まれることが知られており、フクシン染色法によりカスパリー線が検出できる (Vermeer et al., 2014)。この部分がフクシンにより染色されたことから、ヘビノネゴザの根の内皮にリグニンの集積がある発達したカスパリー線が存在することが示唆された。

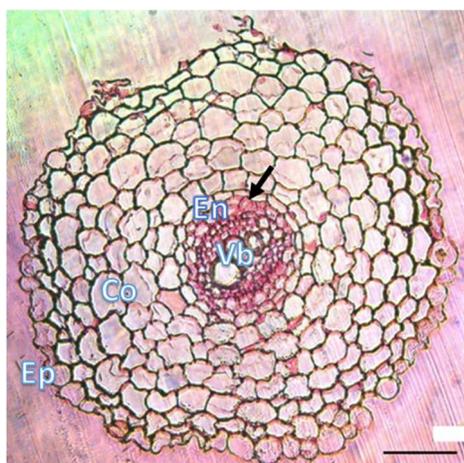


図 3-5 フクシン染色した根の断面

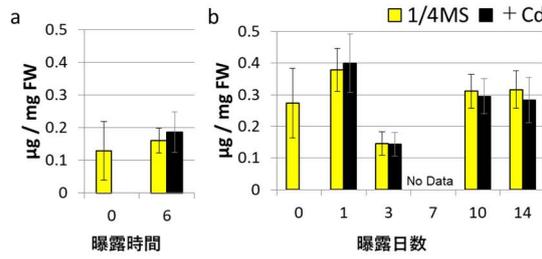
通常環境下で生育した孢子体の根を用いて染色を行った。

Bar=100 μ m、矢印；カスパリー線、Ep；表皮 (epidermal cells)、Co；皮質 (cortex)、Vb；維管束 (vascular bundles)、En；内皮 (endothelium)

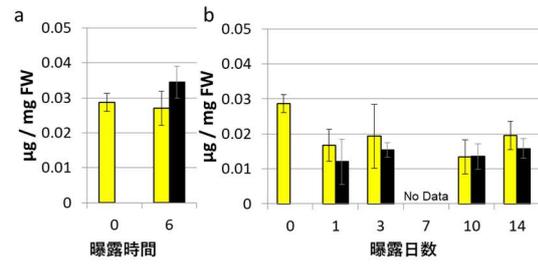
3-2-4. ヘビノネゴザおよびタバコの根における有機酸含量の解析

ヘビノネゴザの根での有機酸産生を検定するため、根に含まれる有機酸の同定およびその定量を行った。また、Cd 曝露の有無によるこの量的変動を調べた。Cd に曝露させた期間を 0 日、1 日、3 日、7 日、10 日、14 日と変えて、その含有量の違いをタバコと比較した。ヘビノネゴザでは 6 時間の短期曝露実験も行った。ヘビノネゴザの根に含まれる有機酸を調べたところ、内部標準との比較により、クエン酸、シキミ酸、L-乳酸、フマル酸、D-リンゴ酸が同定された (図 3-6)。タバコの根では、ヘビノネゴザで同定された有機酸に加えて、ピルビン酸が検出された (図 3-7)。同定された有機酸の構造式を図 3-8 に示す。Cd を含む培養液と含まない培養液で育てた植物体の根の有機酸含有量を比較したところ、いずれの植物種においても両者の間で有機酸含有量の違いは認められなかった (図 3-6、3-7)。それぞれの有機酸含有量をヘビノネゴザとタバコの間で比較したところ、ヘビノネゴザはすべての有機酸の含有量がタバコより多かった (図 3-9)。

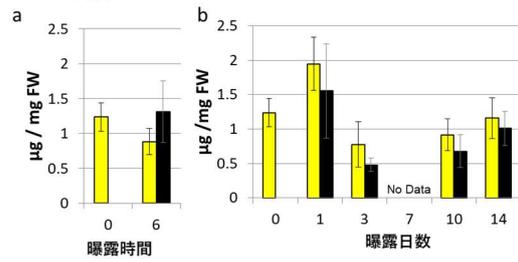
A : クエン酸



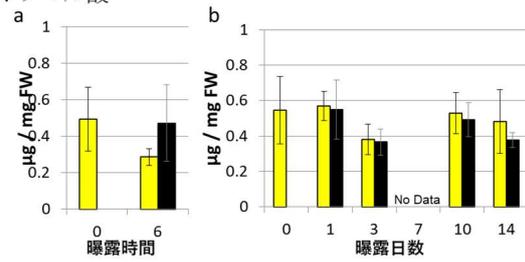
B : シキミ酸



C : L-乳酸



D : フマル酸



E : D-リンゴ酸

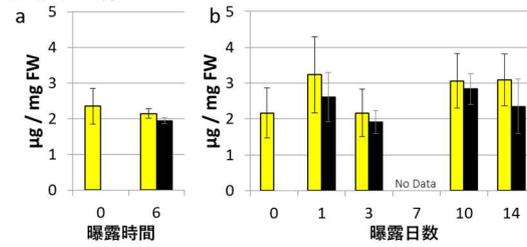


図 3-6 ヘビノネゴザにおける同定された各有機酸の量
 植物体の根から抽出した有機酸含有量を示す(n=6,t 検定,*p<0.05)。
 a : 6 時間曝露した植物体、b : 14 日間にわたり曝露した植物体
 A : クエン酸、B : シキミ酸、C : L-乳酸、D : フマル酸、E : D-リンゴ酸

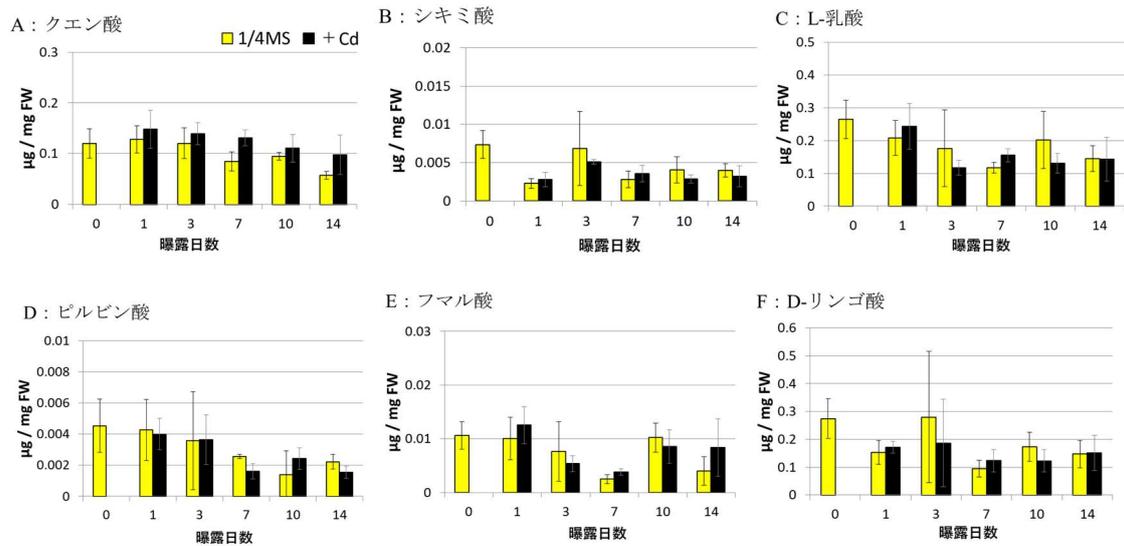
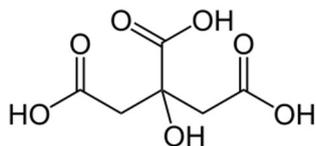


図 3-7 タバコにおける各有機酸の量

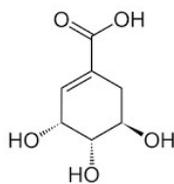
14 日間にわたり曝露した植物体の根から抽出した有機酸含有量を示す (n=6、t 検定、*p < 0.05)。

A : クエン酸、B : シキミ酸、C : L-乳酸、D : ピルビン酸、
E : フマル酸、F : D-リンゴ酸

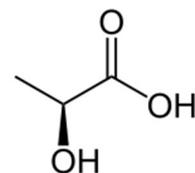
A : クエン酸



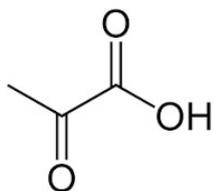
B : シキミ酸



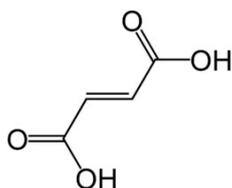
C : L-乳酸



D : ピルビン酸



E : フマル酸



F : D-リンゴ酸

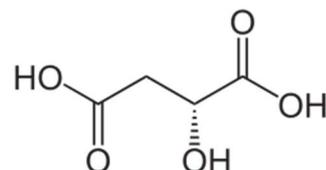
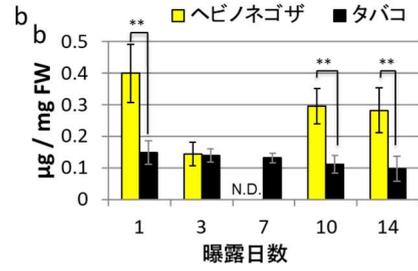
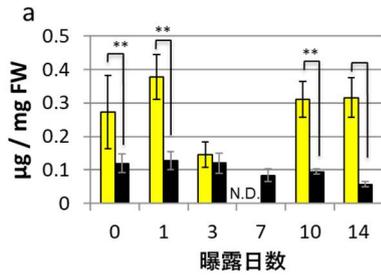
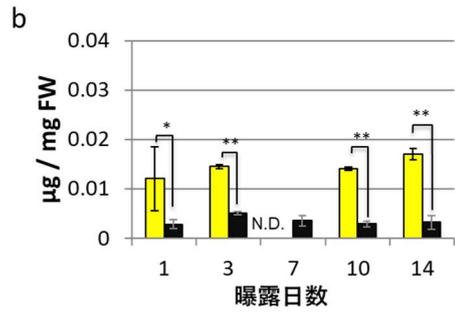
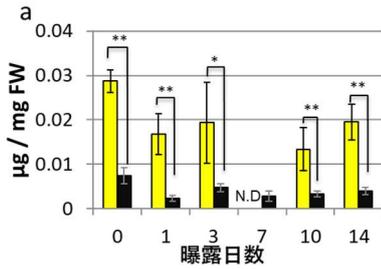


図 3-8 同定された有機酸の構造式

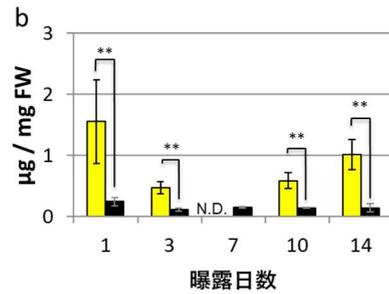
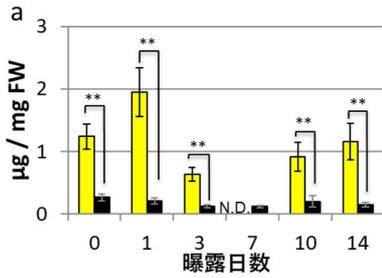
A: クエン酸



B: シキミ酸



C: L-乳酸



D: フマル酸

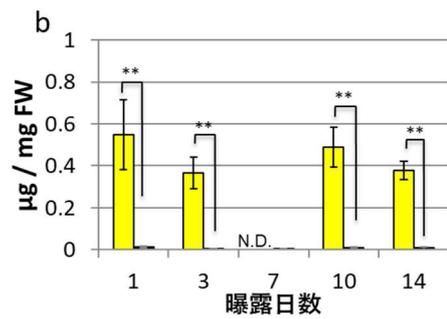
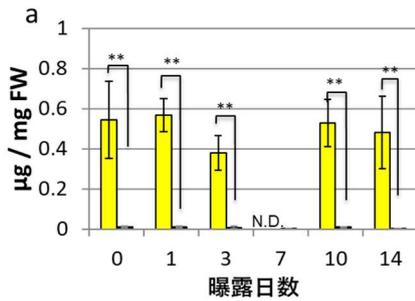


図 3-9 各有機酸量の植物間の比較

ヘビノネゴザとタバコの各有機酸の量を比較した (N.D: No Data, n=6, t 検定、*p < 0.05、**p < 0.01)。

a: 1/4MS 培地へ曝露、b: +Cd 培地へ曝露

A: クエン酸、B: シキミ酸、C: L-乳酸、D: フマル酸、E: D-リンゴ酸

E : D-リンゴ酸

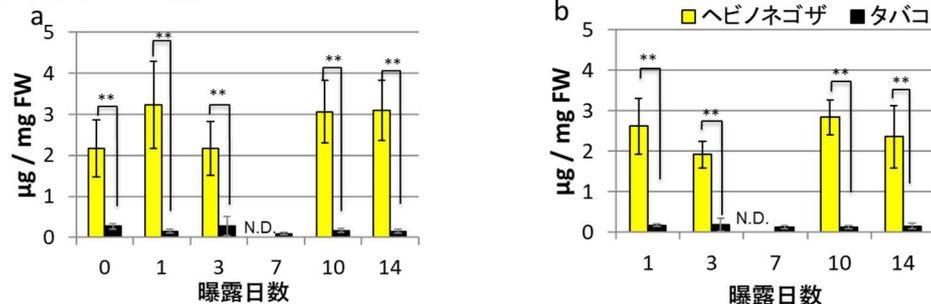


図 3-9 各有機酸量の植物間の比較 (続き)

3-3. 考察

ヘビノネゴザの根端部においても Cd 曝露による活性酸素種 (ROS) の発生誘導が観察されなかったことから、ヘビノネゴザは Cd 曝露による酸化ストレスをほとんど受けていないことが示唆された (図 3-2)。また、グルタチオンの量的変動も観察されなかった (図 3-4、表 2) ことから、この結果が支持されると考えられる。一般的に、細胞内に入った Cd が鉄などの遷移元素の機能を拮抗阻害することで鉄欠乏を引き起こし、また、抗酸化機能をもつグルタチオンを浪費させることにより ROS が発生することが報告されている (Andresen and Küpper, 2013)。すなわち、Cd 曝露によって ROS が発生した場合には、この部位に Cd が存在していると考えられる。ヘビノネゴザの根端部における ROS の発生部位やその量が Cd 曝露を受けない場合とほとんど変わらなかったことから、ヘビノネゴザの中心柱やその周辺の内皮細胞に Cd がほとんど入っていない、もしくは速やかな排除機構が働いていることを示唆している。

ヘビノネゴザの根では、Cd ストレスによる ROS の量的変化が起こらなかったにも関わらず、チオール化合物の蓄積が中心柱で観察された (図 3-2、3-3)。総グルタチオン量に変化が認められなかったことから、増加したチオール化合物は還元型グルタチオンではなく、ファイトキレチンなどであると示唆された。増加したチオール化合物がファイトキレチンであるならば、細胞内に吸収された Cd は速やかにキレートされ、液胞に隔離されることが期待される (Cobbett, 2000; Grill et al., 1989)。このことから、ヘビノネゴザの細胞内においてもチオール化合物を介した防御機構が存在する可能性が考えられた。

ヘビノネゴザでは、チオール化合物の蓄積が中心柱付近のみでみられた (図 3-3) ことから、このような防御機構は中心柱付近でのみ起きていると考えられる。すなわち、ヘビノネゴザの表皮や皮層細胞では、これらの防御機構を保持してい

ない、もしくは Cd が細胞内へ吸収されていないために反応がみられなかったと考えられる。Cd が細胞内へ吸収されていないとすると、Cd 曝露によって ROS の発生誘導が観察されなかったこと (図 3-2) を説明することができる。

ヘビノネゴザの根の構造観察を行ったところ、中心柱付近がフクシンによって染色された (図 3-5)。この結果は、ヘビノネゴザの内皮に木化した細胞壁が存在することを示しているため、ここに発達したカスパリー線が存在することが強く示唆される。カスパリー線の形成は、3つのステージに分けられる (Lersten, 1997)。ステージ 1 では薄いセルロース壁が形成される。ステージ 2 ではセルロース壁が肥厚になり、これがスベリンによって覆われる。ステージ 3 では、さらにリグニンによって二次壁が形成される (Lersten, 1997)。いくつかのシダ植物のカスパリー線の形成について調べられているが、その形態は種によって異なる。多くの種では内皮を形成せずカスパリー線が存在していないか、ステージ 1 に相当する薄いセルロース壁を形成しているだけの未熟なものである (Lersten, 1997)。一方で、ヒ素への耐性を示すことで知られているモエジマシダにはカスパリー線が存在することが報告されている (Balestri et al., 2014)。このことから、ヘビノネゴザやモエジマシダなどの毒性物質に耐性を有する一部のシダ植物ではカスパリー線が発達して不要な物質の流入を抑制する機構を持っているのではないかと考えられる。トウモロコシでは、Cd ストレスによって皮質内細胞の木化が顕著に起こることが報告されており、内皮の木化が Cd 耐性に関与している可能性が示されている (Lux et al., 2011)。ヘビノネゴザには内皮に木化した細胞壁があり、カスパリー線の存在が示唆されることから、この構造が不要な物質の流入を抑制する機構を担っている可能性がある。

細胞外へ有機酸を分泌することと Cd 耐性との関連はいくつかの植物で報告されている。Xie et al. (2013) は、メヒルギが Cd 添加によって低分子の有機酸 (Low-Molecular Weight Organic Acid, LMWOAs) およびアミノ酸を浸出液に排出することを示しており、これが Cd 耐性に重要な役割を担っている可能性を示している。しかし、ヘビノネゴザとタバコでは Cd 添加によって有意に増加する特定の有機酸は見つからなかった (図 3-6、3-7)。

一方で、ヘビノネゴザの根ではタバコよりも多量の有機酸が含まれていた (図 3-9)。キャベツの Cd 耐性品種では、非耐性品種と比較して根に蓄積される Cd の割合が多く、これらの Cd を細胞壁に局在させている。キャベツの Cd 耐性品種の細胞壁には、多くのチオール化合物や有機酸が蓄積されている (Sun et al., 2013)。ヘビノネゴザで観察された Cd の根端部への蓄積や多量の有機酸の蓄積などの特徴は、キャベツの Cd 耐性品種に見られたものと類似している。また、Vogeli-Lange and Wagner は、マルバタバコを用いて Cd 耐性について調査し、「細胞質内でのグルタチオンや液胞内での有機酸との Cd 錯体形成メカニズムは、低

レベルでの曝露下において顕著であるのかもしれない。より高いレベルでの曝露下では、ファイトキレチンや硫化のような追加のメカニズムが必要である」と結論付けている(1996)。キャベツの耐性品種やヘビノネゴザは、低レベルのCd曝露があったときに緊急避難的に利用される有機酸をあらかじめ根に蓄えていることで強い耐性を維持しているのかもしれない。つまり、ヘビノネゴザでは、有機酸含有量が多いことによって、これらが侵入してくるCdをトラップする機構として働き、結果としてCd耐性に大きく関与しているのではないかと考えられる。また、ヘビノネゴザはタバコと比較して、特にL-乳酸、フマル酸、D-リンゴ酸の含有量が多く(図3-9)、これの構造式(図3-8)を考慮すると、環状構造よりも直鎖状の構造がCd耐性には有効なのかもしれない。

3-4. 小括

ヘビノネゴザの細胞は、Cd曝露に伴う酸化ストレスが観察されなかった。一方、チオール化合物はCd曝露に伴う蓄積が中心柱でみられた。ROSとチオール化合物が中心柱近傍のみで検出されたことから、ヘビノネゴザでは表皮や皮層細胞にCdがほとんど入っていないことが示唆された。ヘビノネゴザの根には発達したカスパリー線が存在することや、根に多くの有機酸が含まれることがわかった。これらの結果から、ヘビノネゴザは、根端部に吸着されたCdは細胞間隙を通過してカスパリー線まで輸送され、ここで移送が抑制されていると考えられる。あるいは、皮層のそれぞれの細胞表面にCdが吸着されて動かないのかもしれない。中心柱周辺の細胞に吸収されたCdはファイトキレチンによって無毒化あるいは隔離されるため、酸化ストレスの発生にはつながらないのであろうと考えられる。

第四章. Ca トランスポーターの単離

4-1. 序論

ヘビノネゴザとタバコのいずれにおいても、環境中の Ca 量が Cd 吸収に強く影響することが示された。また、ヘビノネゴザには、個々の金属イオンに対するトランスポーターの特異性が高く、金属イオンの吸収や生体内での分配を厳密に制御する能力を有すると推察された。この仮説を検証するため、ヘビノネゴザが保持する Ca トランスポーター遺伝子の単離を試みた。本章では、Cd 吸収・耐性に関与する Ca トランスポーターの単離を目的とし、塩ストレスおよび Ca 欠乏に応答して発現を変化させることが明らかにされている 9 種類の Ca トランスポーター遺伝子 (Maathuis, 2006) のホモログ遺伝子の単離を試みた。さらに、対照とするためにハウスキーピング遺伝子であるアクチン (*ACT*) の単離を試みた。また単離された部分配列を用いて、この遺伝子の発現器官の特定と、発現量の解析を行った。

4-2. 結果

4-2-1. Ca トランスポーター遺伝子の単離を目指したディジェネレートプライマーの作成とディジェネレート PCR

シロイヌナズナの Ca トランスポーター遺伝子のうち、塩ストレスや Ca 欠乏時に発現量を変化させる遺伝子を選択し、このヘビノネゴザのオルソログを単離する標的遺伝子とした。シダ植物ではヒゲノカズラ植物門のイヌカタヒバのゲノム配列が明らかになっている (Banks et al., 2011)。ヘビノネゴザが含まれるシダ植物門でゲノム配列が明らかになっている植物はない。標的とした遺伝子のディジェネレートプライマーを設計し、遺伝子の単離を試みた。

ヘビノネゴザのカルスから抽出した DNA と、カルス、根、葉から抽出した RNA から合成した cDNA を鋳型として、ディジェネレートプライマーを用いて PCR を行った。その結果、Autoinhibited Ca²⁺ ATPases (*ACA*) のオルソログについては、いずれの鋳型においても目的の遺伝子に由来すると思われる断片の増幅が検出された (図 4-1A)。また、Na⁺/H⁺ Antiporters (*NHX*) と Trans Membrane Segment (*9TMS*) のオルソログについては、カルス由来の cDNA を鋳型にした際に予想される大きさの断片の増幅が認められた (図 4-1B)。Trans Membrane Segment (*6TMS*; At2g18690) と Glutamate Receptor (*GLR2.3*) のオルソログについては、カルス由来の cDNA を鋳型として徐々にアニール温度を高くしていく

ステップアップ PCR を行った場合に予想される大きさの断片の増幅が認められた (図 4-1C)。さらに、*ACT*、*9TMS*、*GLR*、および *6TMS* (*At4g21810*) のオルソログについては、葉由来の cDNA を鋳型にした際に予想される大きさの断片の増幅が認められた (図 4-1D、E)。*Cation/proton Exchangers* (*CAX*)、*6TMS* (*At5g35735*)、および *Trans Membrane Segment* (*8TMS*) のオルソログでは、いずれの鋳型に対しても断片の増幅は認められなかった (図 4-1E)。

予想される大きさの断片の増幅が認められたものについては、反応液量 100 μ l で PCR を行った。得られた増幅産物をクローニングし、それぞれの塩基配列を調べたところ、*ACT*、*ACA*、*6TMS* (*At2g18690*)、および *6TMS* (*At4g21810*) の増幅に用いたディジェネレートプライマーのセンスプライマーとアンチセンスプライマーの配列が該当する増幅断片で確認された。しかし、*NHX4*、*GLR2.3*、*9TMS* では目的の配列は含まれていなかった。これらの結果と各ディジェネレートプライマーの適切なアニール温度を表 3 にまとめた。得られた塩基配列を図 4-2 に示す。ヘビノネゴザから単離した *ACT* 遺伝子は *AyACT*、*ACA* 遺伝子は *AyACA* と名付け、構造的に異なる配列は 1 から 6 までの通し番号をつけた (*AyACA-1~6*)。*6TMS* のうち、*At2g18690* のオルソログは *Ay6TMS* と名付け、*At4g21810* のオルソログは別名で *DER2.1* と呼ばれていることから *AyDER* と命名した。

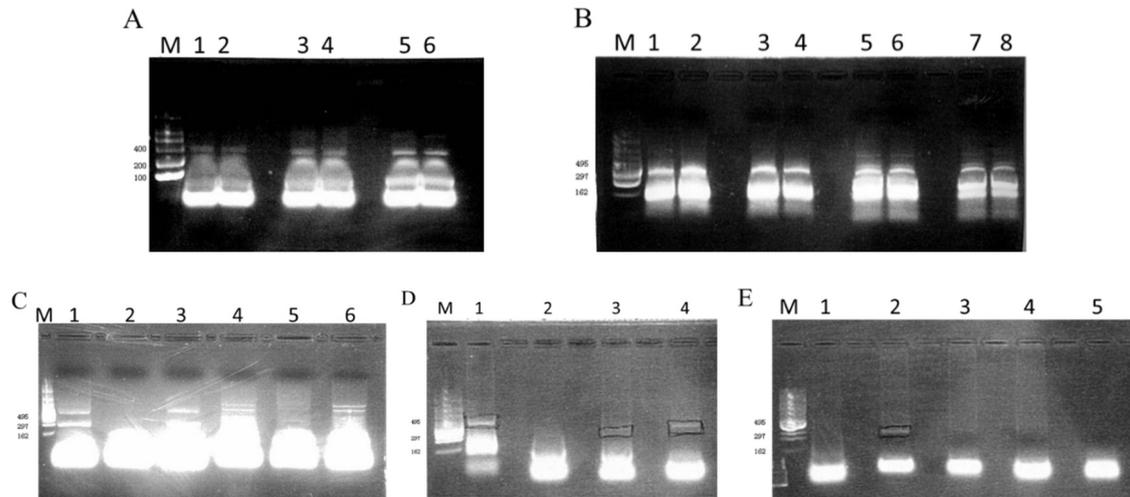


図 4-1 ディジェネレート PCR によって得られた増幅産物の電気泳動像

A : ACA nested プライマーで得られた増幅産物

1、2 ; total DNA、3、4 ; カルス、5、6 ; 根由来の cDNA を鋳型とした。M : 100 bp Ladder

B : 1~4 ; *NHX* および 5~8 ; *9TMS* プライマーで得られた増幅産物

1、2 ; 51.2°C、3、4、7、8 ; 55.2°C、5、6 ; 51.6°C のアニール温度に設定した。カルス由来の cDNA を鋳型とした。M : λ HincII

C : 1~3 ; *6TMS* (*At2g18690*) および 4~6 ; *GLR* プライマーで得られた増幅産物

1、4 ; カルス、2、5 ; 根、3、6 ; 葉由来の cDNA を鋳型とした。

M : λ HincII

D : 1 ; *ACT*、2 ; *NHX*、3 ; *9TMS*、4 ; *GLR* プライマーで得られた増幅産物
葉由来の cDNA を鋳型とした。M : λ HincII

E : 1 ; *6TMS* (*At2g18690*)、2 ; *6TMS* (*At4g21810*)、3 ; *6TMS*

(*At5g35735*)、4 ; *CAX*、5 ; *8TMS* プライマーで得られた増幅産物
葉由来の cDNA を鋳型とした。M : λ HincII

A : *AyACT*

CACACTGGTGTGATGGTTGGKATGGGACAGAAAGATGCATATGTTGGTGACGAGGCT
CAGTCTAAACGAGGAATTTTGACCCTGAAATATACCTATTGAGCATGGTATCGTGACC
AACTGGGATGACATGGAAAAGATATGGCACCATACTTTTATAATGAGCTCCGAGTTG
CCCCGAAGAGCATCCTGTCTTGCTCACTGAAGCGCCTCTCAACCCAAAGGCTAATC
GAGAGAAGATGACACAAATCATGTTTGATACATTCAATGCTCCAGCTATGTATGTTGCC
ATCCAGGCTGTGCTATCCTTGTATGCCAGTGGAAGGACCACCGGTATTGTGCTGGATT
CAGGTGATGGTGTTACACACACTGTACCTATCTATGAAGGGTATGCTTTGCCGCATGCC
ATCCTTCGTCTGGATCTTGCAGGTCGTGACTTGACTGATGCTCTCATGAAGATCCTGA
CGGAACGCGGT

B : *AyACA-1*

CGGTGTGAGACCATGGGAAGTGTGACTACGATCTGTAGTGATAAAACAGGCACCCTT
ACGCTCAACCAAATGACTGTGACCAAGGCATGGGTGGCAGGTGGGATGAGGGATCCT
GTTTCAGATCTAGAAAGCTTGGATAAAGAGTATTGTAATGTACTCATTGAGGGGATTC
CGCAGAATAGCAATGGCAGCGTTTTTGTCCAGCAGGAGGGGAAGAACCGGAAGTG
ACTGGCTCACCCACGGAGAAGGCAGCATTGCTCTGGGCTTAGAGTTGGGAATGGACT
TTACACATGTGAGATCCCCTACTATCTTGAAGTGGAATCCTTCAATTCCATTAAG
AAAGAGCAGGGGTGGCAGTAAGGGTAGCAGATAATGGCAAGGTGCATGTGCATTGG
AAAGGTGCCCGCA

C : *AyACA-2*

CGGTGTGAGACGATGGGCAGTGCTACGACAATTTGCAGTGATAAGACTGGCACCCTT
ACCCTTAATCAGATGAATGTTATAAAAGTATGGGCTGCAGGCAAGTTTAGAGACCCCG
TTTCAGAGCTGCAGAATTTTCAGGACTTTTACAATCTGCTGCTAGAGGGCATTGCTGA
AAATAGCAGTGGCAGTGTATTTCTCCCATGGAAGGAGGAGAGCCTGAAGTTTTCGG
GTCTCCCACAGAAAAGGCTGTCCTACTTTGGGGACTTAAACTTGGTATGGACTTTGAG
TTTGTGACAGACACAATCTACTATTATGCAAGTGGAGACATTCAACTCCGACAAGAAC
GAGCAGGTGTAGCTGTGCAGGTTCTAGCAACTGGAAGAATTAATGCACACTTGAAAAG
GAGCCGCAGA

D : *AyACA-3*

CGGTGTGAGACGATGGGTAGTGCCACCATGATTTGCACTGATAAGACCGGCACTTTAA
CATTGAATCAAATGACTATAGTGCAGACTTGGGTAGCGGGTGAATTTATAGATGTCGA
AGGGAAAGGCCTGTCTTTGGAAGTTCGCAGTTAATTCTTGAGGGTATTGCACAAAA
CAGCACTGCTGATATTAATCTTGAAGAAGACGAAGAGCCAGAAGTGATAGGCTC
TCCTACTGAGAAAGCAGTTCTAATGTGGGATTGAAGCTTGGTCTGGACTTTGACT
GTAAAGTCTCTTTCTGAAGTCATTCAAGAAGAGCCATTCAACTCCATCAAGAAACGG
GCAGGAGTAGCCGTGAGAGTTGCAGAAAGTGGGAGTTTGCATGTCCATTGGCATGTC
CATTTGGAAGGGAGCCCGCA

E : *AyACA-4*

CGGTGTGAGACKATGGGCTCTGCWACSACCATATGTAGTGACAAGACRGGCACACTC
ACTATCAACCAGATGACAGTGGTLAAGTCATGGATTGCTGGGAAAAGCCATCTGTCTG
AGCGCGAAGATTATTCTATGAGCAGCCTGCCTAACCYATTGCGGAGCSTTCTGTTYCA
GGGAATTGCTCAAAACAGTRTGGGAAGTGTCTTTGTGCCAGTTCTTTCAACCKRGA
AGGTTTTAGTGGGAAGATTAACAAACCGAAGTGACSGGGTCTCCTACAGAAAAAGC
TCTCCTCTGGTGGGGCTTGAAGCTGGTATGAGCTTCCAYGATAACCRGGCGGAATCC
ACAATCCTGCAGATGGAACRRTCAATTCCACWARGAAGCGYGCAGGTGTGGCCGTG
GAGACCKRRGAYAAGGAAATACTCATTCACTGGAARGGAGCCGSSGA

図 4-2 得られた増幅産物の塩基配列

下線部は各塩基配列の PCR のプライマー配列を示す。

F : *AyACA-5*

CGGTGCGAGACGATGGGCAGTGCTACCACAATTTGCAGTGATAAGACTGGCACCCCTT
ACCCTTAATCAGATGAATGTTGTA AAAAGTATGGGCTGCAGGTCATGCTGTTTCAGATC
ATGAGCTCCAGAATTTTCCCGACTTTTACAATCTGCTTCTAGAGGCCATTGCTCAAAA
CAGCAGTGGCAGTGTATTTAATCGCCCCATGCAGGCCGAAGGTGCGCGTGCAGGAGA
GCCTGAAGTTTTCGGGTCTCCCACAGAAAAGGCTGTCCTACTTTGGGGACTTAAACT
TGGTATGGACTTTGAGCTTGTGACGACGACAATCTACTATTCTGCAAGTGGAGACATTC
AACTCCGACAAGAAGCGAGCAGGTGTAGCTGTGCAGGTTTTAGCAACTGGGAGAAT
TAATGCACACTGGAAAGGTGCCGGCGA

G : *AyACA-6*

CGGTGGAGACTATGGGCTCTGCAACCACCATATGTAGTGACAAGACGGGCACACTCA
CTATCAACCAGATGACAGTGGTGAAGTCATGGATTGCTGGGAAAATGGAAGATTATTC
TATGAGCAGCCTGCCTAACCCATTGCGGAGCCTTCTGTTTCAGGGAATTGCTCAAAAC
AGTGTGGGAAGTGTCTTTGTGCCAGTCTTTCAACCTAGAAGGTTTTAGTGGGAAG
ATTAACAAACCGAAGTGACCGGGTCTCCTACAGAAAAAGCTCTCCTCTGGTGGGGC
TTGAAAGCTGGTATGAGCTTCCATGATACCAGGGCGGAATCCACAATCCTGCANATGG
AAACGTTCAATTCCACTAGGAAGCGTGCAGGTGTGGCCGTGGAGACCTTTGACAAGG
AAATACTCATTCACTGGAAAGGAGCCGGCGA

H : *Ay6TMS (At2g18690)*

TTGGAGGATATGTGACAGGGAGGACAACCTGGAGGGAGACAAAGAAGAGGACGGC
AAGGAGGGCAAGAGCGGGTGC GAAGGGCCAAGGGGTGGGCGGGGGTTCGATATCC
GCATGCAAGGACATGGCATCCACCTTCTCAGACGATATGCGCATGCCAGTCTGCGCA
GGGAAAGGGCCCCCTTCATAATCAGGCATGCTACACAACCCCTACTTCACCTGCAA
ATC

I : *AyDER (At4g21810)*

GACTTTTTGTTTCACATGTTTTTCTTGGCGCGATATTGCAAATTGCTGGAGGAGACATC
ATTCAGGGGTCGTA CTGCAGACTTTTTCTACATGCTGTTTTTTGGCGGGAGTTTATGA
CAGGACTTGTA CTCTAGGCGGCATGTTCCA ACTGGTGTCTGAATCCTTGGCAAAGAT
ACTTTTTTTGAGCAATTCTCTCACCTTCATGATGGTTTACGTTTGGAGTAAACGCAATC
CTCATGTACACATGAGTTTCTCGGACTGTTACCTTTACGGCACCATACTTACCTTGG
GTCCTCCTCGGCTTT

図 4-2 単離した塩基配列 (続き)

表3 ディジェネレート PCR の条件

プライマー名	鋳型				アニール 温度[°C]	センス プライマー	アンチセンス プライマー
	DNA	カルス	根	葉			
<i>AyACT</i>	—	—	—	○	55.2	○	○
<i>AyGLR2.3</i>	○	○*	×	○	55.2	○	×
<i>AyNHX4</i>	○	○	×	×	55.2	○	×
<i>AyCAX3</i>	×	×	×	×	51.6	-	-
<i>AyACA</i>	○	○	○	○	48.0	○	○
All nested					45.0		
<i>Ay6TMS</i> (<i>At2g18690</i>)	○	○*	×	×	51.6	○	○
<i>Ay6TMS</i> (<i>At4g21810</i>)	○	×	×	○	51.6	○	○
<i>Ay6TMS</i> (<i>At5g35735</i>)	×	×	×	×	51.6	-	-
<i>Ay8TMS</i>	×	×	×	×	48.0	-	-
<i>Ay9TMS</i>	○	○	×	○	55.2	○	×

ディジェネレートプライマーを用いた PCR の各鋳型に対する増幅産物の有無と適切なアニール温度、およびプライマー配列の有無を示す。○：増幅産物有り/プライマー配列有り、×：増幅産物なし/プライマー配列なし。なお、* はステップアップ PCR を行った際に得られた増幅産物を示す。

4-2-2. 単離した遺伝子の配列解析

4-2-2-1. *AyACT* の配列解析

単離された *AyACT* の塩基配列に対応するアミノ酸配列をシロイヌナズナ、タバコ、イヌカタヒバの *ACT* と共にアライメント解析を行った。その結果、供試した全植物間で 97% の相同性が認められた (図 4-3)。相同性検索の結果、*AyACT* は *ACTIN* のドメインが含まれる NBD_sugar-kinase_HSP70_actin superfamily と相同性が高いことがわかった。

```

      *      20      *      40      *      60      *
At : MADGEDIQLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDQAQSKRGILTLKYPiEHG : 76
Nt : MADGEDIQLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDQAQSKRGILTLKYPiEHG : 76
Sm : MSETEDVQPLVCDNGSGMVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDQAQSKRGILTLKYPiEHG : 76
Ay : -----HTGVMVGMGQKDAYVGDQAQSKRGILTLKYPiEHG : 34
      m ed qplvcdng gmvkagfagddapravfppsivgrprHTGVMVGMGQKDAYVGDQAQSKRGILTLKYPiEHG

      80      *      100      *      120      *      140      *
At : IVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNIPAMYVAIQAVLSLYASGRRTG : 152
Nt : IVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNIPAMYVAIQAVLSLYASGRRTG : 152
Sm : IVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNIPAMYVAIQAVLSLYASGRRTG : 152
Ay : IVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNIPAMYVAIQAVLSLYASGRRTG : 110
      IV3NWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNIPAMYVAIQAVLSLYASGRRTG

      160      *      180      *      200      *      220
At : IVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRDLLAGRDLDLMLKILTERGYSFTTSAEREIVRDVKEKLAYIALDYEQE : 228
Nt : IVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRDLLAGRDLDLMLKILTERGYSFTTSAEREIVRDVKEKLAYIVALDYEQE : 228
Sm : IVLDSGDGVTHHTVPIYEGYALPHAILRDLLAGRDLDLMLKILTERGYSFTTSAEREIVRDVKEKLAYIVALDFEQE : 228
Ay : IVLDSGDGVTHHTVPIYEGYALPHAILRDLLAGRDLDLMLKILTERG----- : 157
      IVLDSGDGV3HTVPIYEGYALPHAILRDLLAGRDLDLMLKILTERGysftt aereivrdvkeklay ald eqe

      *      240      *      260      *      280      *      300
At : METAKSSSSVEKSYELPDGQVITIGSERFRFCPEVLFQPSLVGMEAAAGIHETTYSIMKCDVDIRKDLGNIVLSGG : 304
Nt : LETAKSSSSVEKSYELPDGQVITIGSERFRFCPEVLFQPSLVGMEAAAGIHETTYSIMKCDVDIRKDLGNIVLSGG : 304
Sm : LETAKSSSSIEKSYELPDGQVITIGSERFRFCPEVLFQPSLVGMEAAAGIHETTYSIMKCDVDIRKDLGNIVLSGG : 304
Ay : ----- : -
      eta sss eksyelpdgqviti gserfrfcpevlfqpsl gmeaaagihettysimkcdvdirkdlgnivlsgg

      *      320      *      340      *      360      *
At : TTMFPGIADRMSKEITALAPSSMKIKV VAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIAKAEYDESGPSIVHRKCF : 377
Nt : TTMFPGIADRMSKEITALAPSSMKIKV VAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIAKAEYDESGPSIVHRKCF : 377
Sm : STMFPGIADRMSKEITALAPSSMKIKV VAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIAKAEYDESGPSIVHRKCF : 377
Ay : ----- : -
      tmfpgiadrmskeitalapssmkikv vapperkysvwiggsilaslstfqqmwi k eydesgpsivhrkcf

```

図 4-3 単離したヘビノネゴザの *AyACT* と他の植物のオルソログとのアライメント解析の結果

単離した *AyACT* 配列とシロイヌナズナ、タバコ、およびイヌカタヒバの *ACT* 遺伝子とのアライメント解析を行った。Ay : *Athyrium yokoscence* (ヘビノネゴザ)、At : *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ、Accession No. NP_187818.1)、Nt : *Nicotiana tabacum* (タバコ、Accession No. NP_001312615.1)、Sm : *Selaginella moellendorffii* (イヌカタヒバ、Accession No. XP_002977012.1)。

4-2-2-2. *AyACA* の配列解析

単離された *AyACA-1~6* の塩基配列に対応するアミノ酸配列について、相同性を検索した結果、*AyACA-1~6* は *ACA* が属する P-type ATPase P2B タンパク質に共通する E1-E2 ATPase ドメインを持ち、E1-E1 ATPase リン酸化サイト (DKTGTLLT) を保存していた (図 4-4)。*AyACA-1~6* はシロイヌナズナの *ACA* と 42~61% の相同性があり、いずれも *AtACA8* との相同性が最も高かった (表 4)。シロイヌナズナ、イヌカタヒバ、ヒメツリカネゴケの *ACA* 遺伝子のアミノ酸配列と *AyACA1~6* のアミノ酸配列を用いて系統樹を作成したところ、*AyACA-1~6* は大きく 4 つのグループに分けられることがわかった (図 4-5)。すなわち、グループ 1 ; *AyACA-1*、グループ 2 ; *AyACA-2* と *AyACA-5*、グループ 3 ; *AyACA-3*、グループ 4 ; *AyACA-4* と *AyACA-6* である。

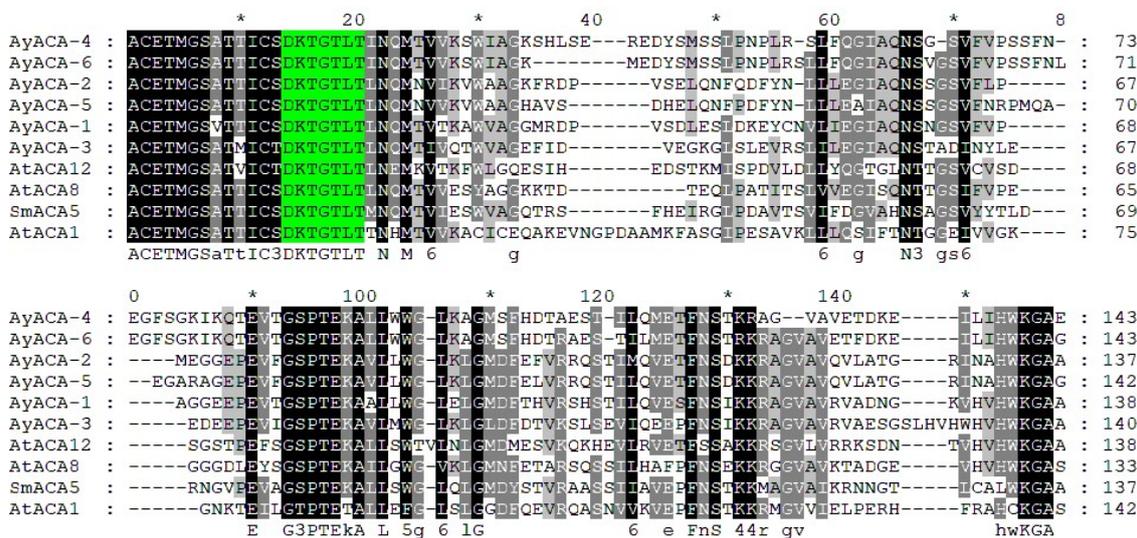


図 4-4 単離したヘビノネゴザの *AyACA* と他の植物のオルソログとのアライメント解析の結果

単離した *AyACA* の 6 遺伝子とシロイヌナズナおよびイヌカタヒバの *ACA* 遺伝子とのアライメント解析を行った。シロイヌナズナの *ACA* は大きく 3 つのグループに分けられることから、それぞれのグループから 1 遺伝子ずつ解析に用いた。すべての *ACA* 遺伝子で E1-E2 ATPase リン酸化サイト (DKTGTLLT ; 緑マーカー箇所) が保存されていた。Ay : *Athyrium yokoscence* (ヘビノネゴザ)、At : *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ, Accession No. Q37145; AtACA1, Q9LF79; AtACA8, Q9LY77; AtACA12)、Sm : *Selaginella moellendorffii* (イヌカタヒバ, Accession No. EFJ08462.1)。

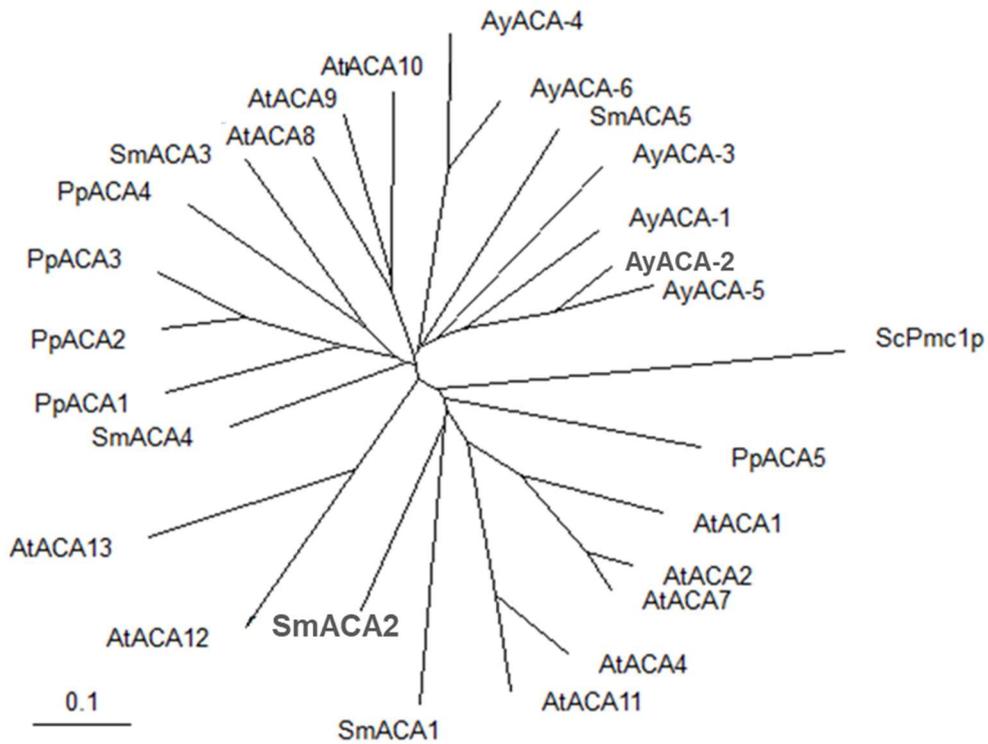


図 4-5 *AyACA* と他の植物のオルソログとのアミノ酸配列による分子系統樹
ACA 遺伝子について、ヘビノネゴザから単離した遺伝子配列に相当する約 400 bp において分子系統樹を作成した。At : *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)、Sm : *Selaginella moellendorffii* (イヌカタヒバ)、Pp : *Physcomitrella patens* (ヒメツリカネゴケ)、Sc : *Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母)。解析に用いた配列を表 5 に示す。

表 4 単離した各 *AyACA* と *AtACA* との相同性の割合

遺伝子名	相同性[%]		
	<i>AtACA1</i>	<i>AtACA8</i>	<i>AtACA12</i>
<i>AyACA-1</i>	44%	61%	51%
<i>AyACA-2</i>	44%	58%	50%
<i>AyACA-3</i>	42%	54%	49%
<i>AyACA-4</i>	45%	52%	45%
<i>AyACA-5</i>	44%	56%	47%
<i>AyACA-6</i>	46%	57%	46%

表 5 分子系統樹の解析に用いた配列

植物種	遺伝子名	Accession No.
<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ)	<i>AtACA1</i>	Q37145
	<i>AtACA2</i>	O81108
	<i>AtACA4</i>	O22218
	<i>AtACA7</i>	O64806
	<i>AtACA8</i>	Q9LF79
	<i>AtACA9</i>	Q9LU41
	<i>AtACA10</i>	Q9SZR1
	<i>AtACA11</i>	Q9M2L4
	<i>AtACA12</i>	Q9LY77
<i>Selaginella moellendorffii</i> (イヌカタヒバ)	<i>SmACA1</i>	XP_002961827.1
	<i>SmACA2</i>	XP_002961828.1
	<i>SmACA3</i>	EFJ09492.1
	<i>SmACA4</i>	EFJ22392.1
	<i>SmACA5</i>	EFJ08462.1
<i>Physcomitrella patens</i> (ヒメツリカネゴケ)	<i>PpACA1</i>	Q70TF0
	<i>PpACA2</i>	Q70TF1
	<i>PpACA3</i>	XP_024360514.1
	<i>PpACA4</i>	XP_024395319.1
	<i>PpACA5</i>	XP_024392308.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母)	Pmc1p	P38929

4-2-2-3. *Ay6TMS* および *AyDER* の配列解析

単離された *Ay6TMS* および *AyDER* の塩基配列に対応するアミノ酸配列について、シロイヌナズナ、イネ、およびイヌカタヒバの *6TMS* とのアライメント解析を行った。その結果、*Ay6TMS* の他の植物種との相同性は低かった。一方、*AyDER* は供試した全植物種のものに対して 82% の相同性が認められた (図 4-6、4-7)。相同性検索を行った結果、*AyDER* は、Rhomboid superfamily に含まれることが示唆された。この遺伝子は標的とした遺伝子を策定するとき用いたシロイヌナズナの *At4g21810* との相同性が最も高かった。

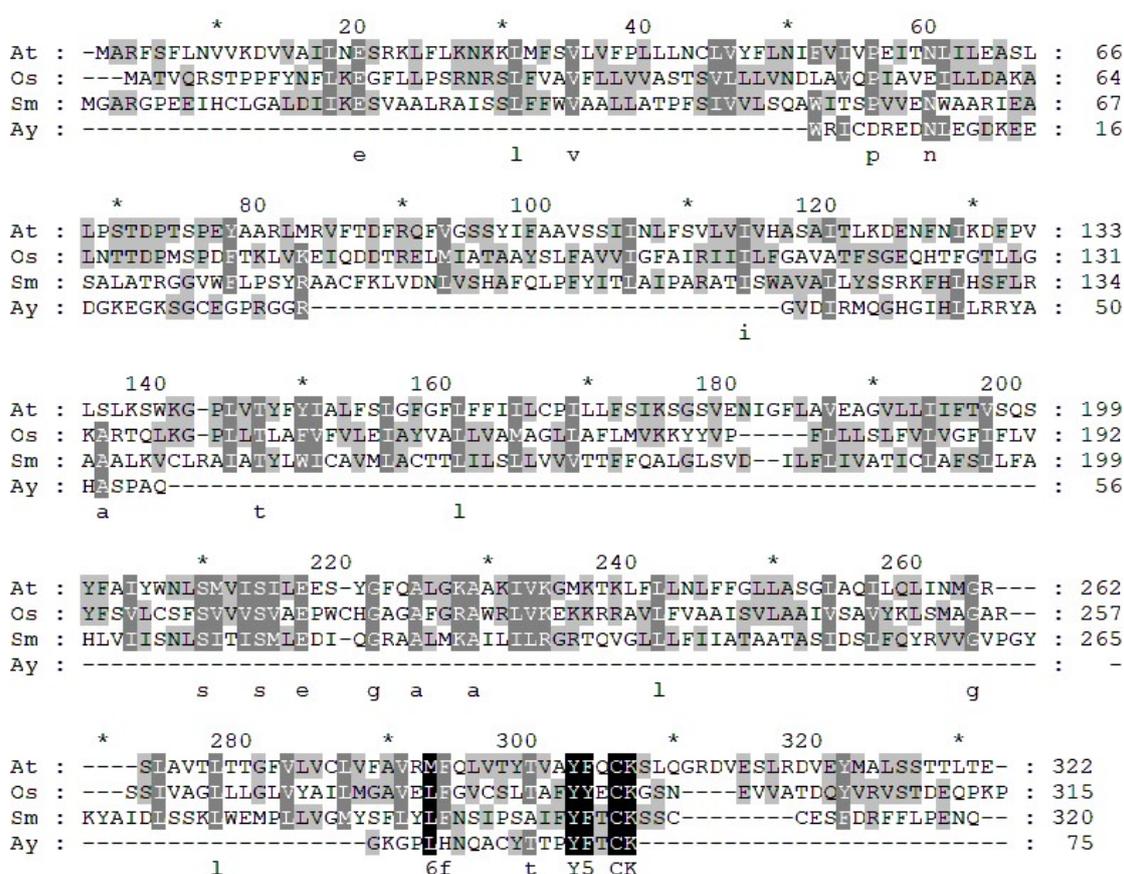


図 4-6 単離したヘビノネゴザの *Ay6TMS* と他の植物のオルソログとのアライメント解析の結果

単離した *Ay6TMS* 配列とシロイヌナズナ、イネ、およびイヌカタヒバの *6TMS* 相同遺伝子とのアライメント解析を行った。Ay : *Athyrium yokoscence* (ヘビノネゴザ)、At : *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ、Accession No. Q9ZV49)、Os : *Oryza sativa* (イネ、Accession No. EAZ08195.1)、Sm : *Selaginella moellendorffii* (イヌカタヒバ、Accession No. XP_002965042.1)。

```

      *           20           *           40           *           60           *
At : MAQAVEEWYKCMPIITRSYLTAAVVTVGCSTLEITSPYNYLNPVTLVVKCYQFWRLVTNFLYERKMDLDFL : 71
Os : MAQAVEEWYRCMPIITRSYLTAAVVTVGCSTLEITSPYHYLNEKLVVQHYEIIWRLVTNFLYERKMDLDFL : 71
Sm : MAQLVEEWYRCIPIITRSYLTLSYLTITAGCALEVISEPLNVYLNPMRVVKHYEVWRLVTNFFYEGRLDLDLDFL : 71
Ay : -----ANSLVIDLDFL : 9
    maq veewy q piitrsylt v tt gc le isp ylnp vv y wrlvtnf yf dldfL

      80           *           100           *           120           *           140
At : FHMFFLARYCKLLEEN SFRGRKTADFLYMLLFGATVLTGIVLIGGMIP-YLSVSESKIIIFLSNSLTFMMVYV : 141
Os : FHMFFLARYCKLLEEN SFRGRKTADFFYMLLFGATVLTGIVLIGGMIP-YISETFARIIFLSNSLTFMMVYV : 141
Sm : FHMFFLARYCKLLEEN SFRGRKTADFFFMLLFGSLLTLVIVLIGGMVVS--FPLPFAEIIIFLSNSLTFMMVYV : 140
Ay : FHMFFLARYCKLLEEN SFRGRKTADFFYMLIFEGSLLTGVILIGGMFFQLVSESLAKIIIFLSNSLTFMMVYV : 80
    FHMFFLARYCKLLEE SFRGRtADffYMLlFG LTgIvI GGM s fa IIFLSNSLTFMMVYV

      *           160           *           180           *           200           *
At : WSKRNFYIHMSFGLGLFTFTAPYLPWVLLGFSILVGSASAGCEFLGMIAGHAYYFLAFVYPRMIDRRFLKTEP : 212
Os : WSKHNFYIHMSFGLGLFTFTAPYLPWVLLGFSILVGSSTAVLLGMIAGHVYYFLEDVYPRMTCRRFLKTEP : 212
Sm : WSRRNPFYVHMSFGLGLESTFTAPYLPWVLLGFSVMVGSSTAVLLGMAAGHVYYFLEDVYPRMTCRRVLLKTEG : 211
Ay : WSKRNFYVHMSFGLGLFTFTAPYLPWVLLGFNR----- : 112
    Wsk NP HMSFGLGLftFTA YLPWVLLGFs vg s w d lgm agh yyfl vyp mt rr lktp

      220           *           240           *           260
At : FIKALFADEPVIAREEDVRFHAHPFDEIHQD----- : 244
Os : FIKALFADDNVVVARPEINAGLGAGARSIHKRATELKYDKQRGLRGAVSH : 261
Sm : LIKALFPEEIVVHREPAVAGAVH----- : 235
Ay : ----- : -
    kalf vv rp

```

図 4-7 単離したヘビノネゴザの *AyDER* と他の植物のオルソログとのアライメント解析の結果

単離した *AyDER* 配列とシロイヌナズナ、イネ、およびイヌカタヒバの *DER* 相同遺伝子とのアライメント解析を行った。Ay : *Athyrium yokoscence* (ヘビノネゴザ)、At : *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ、Accession No. NP_193912.3)、Os : *Oryza sativa* (イネ、Accession No. EEE60319.1)、Sm : *Selaginella moellendorffii* (イヌカタヒバ、Accession No. XP_002968796.1)。

4-2-3. *AyACA* 遺伝子群および *AyDER* の発現部位および発現量の解析

4-2-3-1. 発現器官の特定

1/4MS 培地で 8 日間育成したヘビノネゴザを地上部、根基部および根端部に分割し、それぞれから RNA を抽出した。これより cDNA を調製し、これを鋳型としてリアルタイム RT-PCR を行うことで発現部位の解析を行った。その結果、*AyACA* 遺伝子群はすべての器官において転写産物が検出されたが、*AyACA-3* は根よりも地上部でより多くの転写産物が検出され、*AyACA-5* は地上部よりも根でより多くの転写産物が検出された (図 4-8)。*AyDER* では根で転写産物がわず

かに多く検出された (図 4-8)。

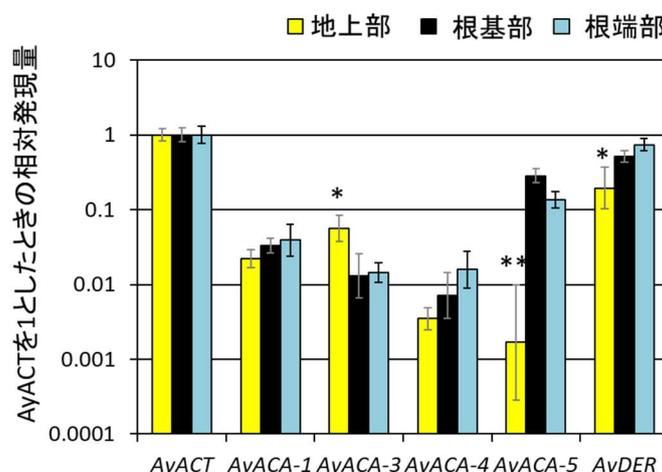


図 4-8 発現器官の特定

リアルタイム PCR を行うことで発現部位の解析を行った。図の値は、アクチン遺伝子との相対値を示す (n=3 (Experimental duplication)、一元配置分散分析、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

4-2-3-2. Ca 欠乏および Cd ストレスへの発現応答の解析

1/4MS 培地、およびこれから Ca を除いた培養液 (-Ca) と、1/4MS 培地に 100 μM Cd を添加した培養液 (+Cd)、Ca を除きかつ 100 μM Cd とした培養液 (-Ca+Cd) を作製した。これらの培養液で育てた植物体から RNA を抽出し、これより合成した cDNA を鋳型としてリアルタイム RT-PCR により Ca 欠乏および Cd ストレスに対する発現応答を調べた。その結果、地上部ではいずれの遺伝子においても、供試したすべての試験区で転写産物量の変化は認められなかった (図 4-9A)。根基部では、*AyACA-4* が -Ca で転写産物の量が増加し、*AyACA-1* が +Cd で、*AyACA-5* が +Cd および -Ca+Cd で転写産物量が減少した (図 4-9B)。根端部では、*AyACA-3* が +Cd で、*AyACA-4* が -Ca および +Cd で、*AyDER* が 1/4MS に比べてその他すべての試験区で転写産物の量が減少した (図 4-9C)。*AyACA-5* では -Ca および -Ca+Cd で転写産物量が増加した (図 4-9C)。しかし、いずれの遺伝子においても、2 倍以上に転写産物量が増加、あるいは減少した試験区はなかった。

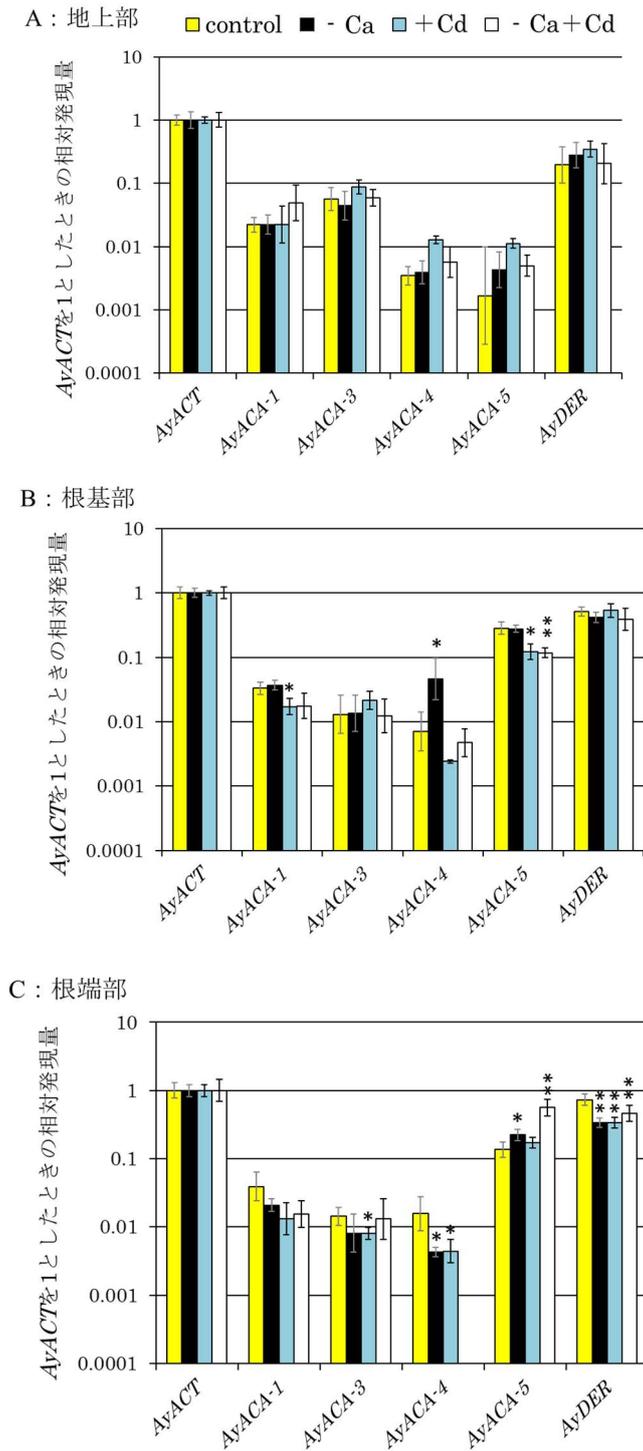


図 4-9 Ca 欠乏および Cd ストレスに対する発現量の変動
リアルタイム RT-PCR を行うことで各遺伝子のストレス応答の解析を行った。図の値は、アクチン遺伝子との相対値を示す (N=3 (Experimental duplication)、t 検定、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

4-3. 考察

ディジェネレートプライマーを用いてヘビノネゴザの遺伝子の単離を試みたところ、*ACT*、*ACA*、および *6TMS* (*At4g21810*) のオルソログ遺伝子の部分塩基配列が得られた (図 4-2)。そこで、ヘビノネゴザから得られたそれぞれの増幅産物は *AyACT*、*AyACA-1~6*、*AyDER* と呼ぶことにした。*AyACT* および *AyDER* はシロイヌナズナ、タバコあるいはイネ、およびイヌカタヒバにおける各遺伝子の標的部領域に対し、それぞれ約 97% と 82% と高い相同性を示したことから (図 4-3、図 4-7)、各相同遺伝子オルソログの部分配列であると考えられた。また、*ACA* については、6 種類のホモログ (*AyACA-1~6*) を単離することができた (図 4-4)。これらの配列は、シロイヌナズナの *ACA* 遺伝子との間に 42%~61% のアミノ酸相同性を示し (表 4)、植物種間で相同性が高い E1-E1 ATPase リン酸化サイト (DKTGTLT) (Baxter et al., 2003) を保持していたことから (図 4-4)、これらはヘビノネゴザの *ACA* 相同遺伝子オルソログの部分配列であると考えられる。

ACA 遺伝子は、シロイヌナズナで 10 種類、イネで 11 種類、イヌカタヒバで 5 種類のホモログが存在することが明らかにされており、シロイヌナズナでは、P-type ATPase の配列を基に作成した系統樹から大きく 3 つのグループに分類されることが知られている (Pedersen et al., 2012; Goel et al., 2011)。シロイヌナズナにおける各 *ACA* 遺伝子間のアミノ酸相同性は、45%~92% である (Axelsen and Palmgren, 2001)。得られた *AyACA* 遺伝子群が *ACA* ファミリー内のいずれの遺伝子と相同性が高いかを調べたが、単離した部分配列がどの遺伝子グループに属するかを識別することは困難であった。そこで、*AyACA-1~6* と、他の植物種の *ACA* 遺伝子の標的部領域を用いて系統樹を作成し、クラスター解析を行った。その結果、シロイヌナズナの *AtACA* 群は 3 つのグループに分類された (図 4-5)。ヒメツリカネゴケの *ACA* (以下、*PpACA*) は、*PpACA1~4* と *PpACA5* の 2 つのグループに、イヌカタヒバの *ACA* (以下、*SmACA*) は、*SmACA1~2* と *SmACA3~5* の 2 つのグループに分類された (図 4-5)。この分類は全長配列を用いて作成した系統樹解析での結果と類似していること (Pedersen et al., 2012) から、*AyACA* の相同遺伝子を調べるためには有効であると考えられた。これに基づいて分類を行った結果、*AyACA-1~6* は 4 つのグループに分けられたが、大別するとすべて *PpACA1~4* グループに属し、*AtACA* の中では *AtACA8~10* のグループに最も近いことが明らかとなった (図 4-5)。*AyACA-1~6* は *AtACA8~10* のいずれかのオルソログであると考えられた。

これまでに、*AtACA4*、*AtACA12*、*AtACA13* は根で強く発現し、塩ストレスおよび Ca 欠乏によって発現量が増加することが明らかにされている (Maathuis, 2006)。ヘビノネゴザの地上部、根基部、および根端部における *AyACA* (*AyACA-*

1,3,4,5)の遺伝子発現とCa欠乏およびCdストレスに対する発現応答を調べた。通常条件で育てた場合、*AyACA*は全身で発現しており、各器官の発現量はほとんど同じであったが、*AyACA-3*は、地上部での発現量が多く、*AyACA-5*は根での発現量が多いことが示唆された(図4-8)。シロイヌナズナでは、*AtACA4*と*AtACAI1*が葉の液胞に局在していることが知られている(Geisler et al., 2000; Baxter et al., 2003; Bolte et al., 2004; Lee et al., 2007)。このことから、*AyACA-3*は、*AtACA4*または*AtACAI1*に近い形質をもっているのではないかと考えられる。

次に、Ca欠乏およびCdストレスへの発現応答について評価した。シロイヌナズナのACAは細胞質内から細胞質外のCa輸送に関わることが知られており(McAinsh and pittman, 2009)、そのうち*AtACA4*は液胞に、*AtACA8~10*は細胞膜に局在していることが知られている(Geisler et al., 2000)。今回単離した*AyACA*が*AtACA8~10*と同様に細胞膜に局在し、細胞質内から細胞質外への輸送に関与していると仮定するならば、これらの遺伝子産物は吸収した物質を生体内で輸送する仕組みに関与していると推測される。植物は、塩ストレスにさらされるとCaの吸収量および木部への輸送量が減少することが知られており(Halperin et al., 1997)、塩ストレス後のACAの発現量は、根圏からの塩の吸収を抑えつつCaを必要とする葉に最大限のCaを輸送するために、*AtACA4*では減少し、*AtACA8~10*では増加することが知られている(Maathuis, 2006)。

今回、*AyACA-1,3,4,5*の発現の挙動を調べたところ、*AyACA-4*は、-Ca条件で根基部での発現量の増加が示唆された(図4-9B)。この*AyACA-4*の挙動は塩ストレスときの*AtACA8~10*の発現挙動と似ている(Maathuis, 2006)。このことから、*AyACA-4*は吸収されたCaの生体内での輸送に関わる可能性が考えられる。一方、*AyACA-1*、*AyACA-3*、*AyACA-5*は、根基部でのCa欠乏に応答した発現量の変動が起こらなかった(図4-9B)ことから、*AyACA-1*、*AyACA-5*は生体内で*AyACA-4*とは異なる働きをしていると考えられる。

*AyACA-4*は、+Cdおよび-Ca+Cd条件で根端部での発現量の減少が示唆された(図4-9C)。*AyACA-4*は、通常生育環境下では土壌から吸収されたCaを地上部へ輸送する役割を担っているとすると、Cd存在下では、根での発現量を減少させることにより、Cdの地上部への輸送を抑制している可能性が考えられる。このことが結果としてCd耐性の付与に寄与しているかもしれない。*AyACA-4*の発現の挙動は、Cd吸収に関与していることが知られているFeトランスポーターをコードする*Nramp*や*IRT*のFe欠乏下およびCd存在下における発現の挙動と一致する(Ishikawa et al., 2012; Connolly et al., 2002)。これに対し、*AyACA-1*と*AyACA-5*は、根端部における+Cd条件での変化は認められなかったが、+Cd条件で根基部での発現量の減少が示唆された(図4-9B、C)。また、*AyACA-5*は根基部における-Ca+Cd条件でも発現量の減少が示唆された一方で、根端部では発現

量の増加が示唆された (図 4-9B、C)。

4-4. 小括

Ca 吸収と Cd 流入との関連を詳細に解析するために、ヘビノネゴザの Ca トランスポーターの分子生物学的解析を試みた。そのために、*ACT*、*ACA*、および *6TMS* (*At4g21810*) の部分配列を単離した。これらの遺伝子の発現部位の特異性、および Ca 欠乏と Cd ストレスへの発現応答を調べた。この結果、ヘビノネゴザには複数の Ca トランスポーターが存在し、それぞれが異なる機能を有すること、細胞膜での Ca 取り込みに関するトランスポーターは Cd を察知し、流入を抑制する機能を有する可能性があること、Ca の組織間輸送に関与するトランスポーターは Cd ストレスにより発現抑制が起こる可能性があることが示唆された。さらに詳細なゲノムワイドな解析を行うためには、ヘビノネゴザの個々の遺伝子の全長配列を単離し、他の植物へ導入するなどの組換え体を用いた検証を行うことが必要であろうと思われる。

第五章. *De novo* トランスクリプトーム解析

5-1. 序論

ヘビノネゴザが高濃度の Cd が存在する土壌環境でも障害なく生存できるのは遺伝的な要素によるものが大きいと予想される。ヘビノネゴザ特有の遺伝子機能により Cd の細胞内への吸収・流入を抑制し、地上組織への移動を阻止しているものと考えられた。これを知るためにはヘビノネゴザの遺伝子の構造およびその発現パターン等を明らかにする必要がある。しかしながら、ヘビノネゴザは、これまでにゲノムサイズや染色体数についての報告がなく、上記の研究を実施するためには、まず、この遺伝子配列を明らかにする必要がある。ゲノムサイズが不明であることや、高品質なゲノム DNA を調製することが困難であったため、また Cd 曝露に応答した遺伝子発現量の変動を知ることが目的であることから、次世代シーケンス解析技術を利用したヘビノネゴザの転写産物の網羅的解析を実施することとした。この遺伝情報をもとに、Cd ストレスに応答する遺伝子を抽出し、この情報をもとにヘビノネゴザの Cd 耐性機構の理解を試みた。

5-2. 結果

5-2-1. ヘビノネゴザの RNA 抽出とその純度の検定

次世代シーケンス解析を行うためには、精製度の高い RNA が必要である。ヘビノネゴザは多糖類などの夾雑物が多く、ISOGEN や TRIZOL を用いた一般的な RNA 抽出方法では、RNA が得られなかった (表 6)。抽出された RNA の精度を検証するため、ヘビノネゴザから total RNA を複数の手法で抽出し、調製した RNA の検定を行った。RNA の抽出には、QIAGEN 社の RNeasy Plant Mini kit、Thermo Fisher Scientific 社の RNA queous Micro Kit、MACGEREYNAGEL 社の NucleoSpin RNA Plant、株式会社リーゾの RNA すいすいの 4 種を用いた。各抽出キットで抽出した RNA を Nanodrop で吸光度と濃度を測定した結果を表 6 に示す。その結果、QIAGEN 社、Thermo Fisher Scientific 社の RNA 抽出キットを用いて抽出した RNA が吸光度比 $A_{260/280}$ がよい値を示したため、これらについて以下の実験を行った。

これまでに単離に成功している *AtACT* 遺伝子を利用して、調製した RNA にゲノム DNA の混入がないことを調べた。まず、*AtACT* の cDNA 配列のうち、イントロンが含まれると予想される領域に該当する約 150 bp の cDNA 配列を増幅

する特異的プライマーを用いて、ヘビノネゴザのゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。その結果、DNA を鋳型としたときに約 450 bp と 150 bp の断片の増幅が認められた (図 5-1)。得られた PCR 増幅産物のそれぞれについてシーケンス解析を行ったところ、DNA を鋳型とした PCR 産物では、約 300 bp のイントロンと考えられる配列の挿入が確認された (図 5-2)。

次に調製した RNA の純度を調べた。このために、*AyACT* 遺伝子のエキソン部分を増幅する特異的プライマーとイントロン部分を増幅する特異的プライマーを作製し、これらのそれぞれをエキソンプライマーとイントロンプライマーと名付けた。これらを用いてヘビノネゴザの RNA から調製した cDNA と、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。抽出した RNA の純度が高い場合には、cDNA 鋳型ではエキソンプライマーからのみ増幅産物が得られるが、純度が低くゲノム DNA の混入があればイントロンプライマーでも断片の増幅が起こる。QIAGEN 社の RNeasy Plant Mini kit および Thermo Fisher Scientific 社の RNAqueous Micro Kit を用いて抽出した RNA について純度の検証を行ったところ、いずれの方法で調製した cDNA を鋳型とした場合でもエキソン領域に相当する約 150 bp の増幅断片が検出されたが、イントロンプライマーを用いた PCR では増幅断片は生じなかった (図 5-3)。一方、ゲノム DNA を鋳型とした PCR では、エキソンプライマーを用いた場合には約 450 bp の増幅断片が検出され、イントロンプライマーを用いた場合にも増幅断片が検出された (図 5-3)。これらのことから、抽出された RNA は DNA の混入がほとんどなく、高い純度をもつ RNA であることが分かった。そこで、RNA 調製には収量の高い QIAGEN 社の RNeasy Plant Mini kit を用いて以後の実験を行うことにした。

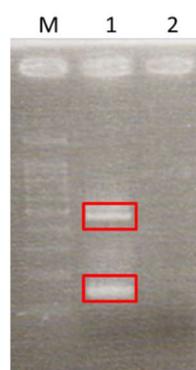


図 5-1 DNA 鋳型としたときの *AyACT* プライマーの増幅産物
1 : DNA 鋳型、2 : NC (RO 水)、M : 100 bp Ladder

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *
actin : CCATCCAGGCTGTGCTATCCTTGTATGCCAGTGAAGGACCACCG----- : 45
short : CCATCCAGGCTGTGCTATCCTTGTATGCCAGTGAAGGACCACCG----- : 45
long : CCATCCAGGCTGTGCTATCCTTGTATGCCAGTGAAGGACCACCGGTGAGAATTTTCACTTACAGCTTGTATCCCTGTGAAATCAATTTTAA : 93
      CCATCCAGGCTGTGCTATCCTTGTATGCCAGTGAAGGACCACCG

      100      *      120      *      140      *      160      *      180
actin : ----- : -
short : ----- : -
long : ACTGTTAGGTGCAGATGATTGGGTTTTCTGATTATAGAAAAGTTATACTAATTTTATGCAGTAGCAATTGGAGGAAGGAATTAACACTAACAAA : 186

      *      200      *      220      *      240      *      260      *      280
actin : ----- : -
short : ----- : -
long : TTTCTTTGACAAAATGTAATAATGATTATAGATGAAGGGGATGTTGATCTTCTTGAATGAGCGTGATGCAAGGCTGTTAAAGTTTGACTATTTA : 279

      0      *      300      *      320      *      340      *      360      *
actin : ----- : 55
short : ----- : 55
long : AGGTTTTTGTGACATGGCTTGAAGTGGGACAATGCTTTTTTCTTACAATTTACAATACATTCATGGAATTTGTTTCTCAGGTATTGCTGCT : 372
      GTATTGTGCT
      GTATTGTGCT

      380      *      400      *      420      *      440      *      460
actin : GGATTCGGGTGATGGTGTACACACATGTACCTATCTATGAAGGGTATGCTTTGCCGCATGCCATCCTTCGCTCGGATCTTGCAGGTCGTG : 147
short : GGATTCGGGTGATGGTGTACACACATGTACCTATCTATGAAGGGTATGCTTTGCCGCATGCCATCCTTCGCTCGGATCTTGCAGGTCGTG : 148
long : GGATTCGGGTGATGGTGTACACACATGTACCTATCTATGAAGGGTATGCTTTGCCGCATGCCATCCTTCGCTCGGATCTTGCAGGTCGTG : 465
      GGATTCaGGTgATGGTgTAcAcAcAcTGTAcCTATcTATgAAGGGTATgCTTTGCCGCATGCCATCCTTCGCTCGGATcTtGCAGGTCGTg

```

図 5-2 DNA 鋳型としたときに得られた増幅産物の塩基配列と
AyACT のアライメント解析の結果

上段：Actin ; 第 4 章で同定した配列
中段：short ; 図 5-1 で得られた短い配列 (150 bp 程度)
下段：long ; 図 5-1 で得られた長い配列 (450 bp 程度)

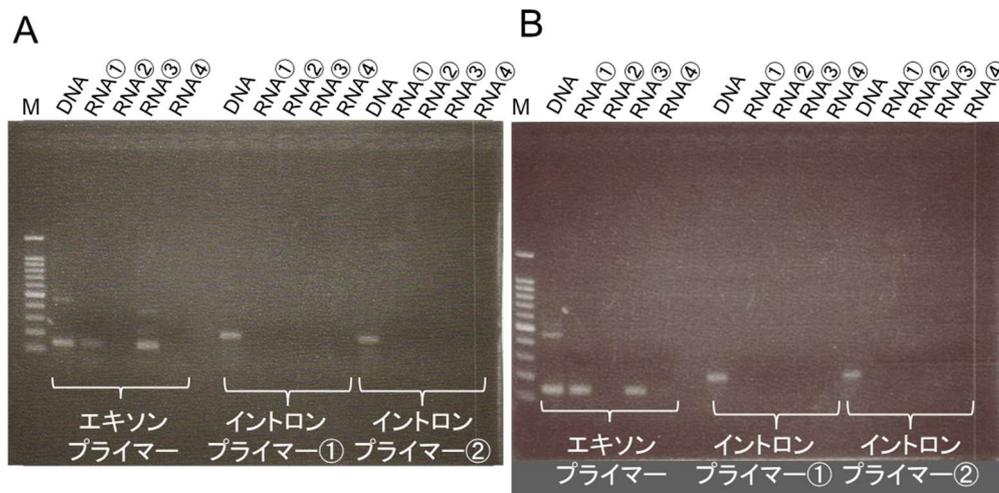


図 5-3 抽出した RNA の純度検証

A : QIAGEN 社の RNeasy Plant Mini kit を用いて抽出した RNA
B : Thermo Fisher Scientific 社の RNA queous Micro Kit を用いて抽出した RNA
RNA① : DNase 処理あり、逆転写酵素添加あり
RNA② : DNase 処理あり、逆転写酵素添加なし
RNA③ : DNase 処理なし、逆転写酵素添加あり
RNA④ : DNase 処理なし、逆転写酵素添加なし
M:100 bp Ladder

表 6 各抽出試薬を用いて抽出した RNA の吸光度と濃度

抽出試薬 (キット) 名	供試器官 (抽出試薬名)	濃度 (ng/μl)	総量 (μg)	A _{260/280}
ISOGEN	根	185.9	—	5.39
	葉	61.1	—	3.92
TRIZOL	根	57.8	—	2.42
	葉	13.4	—	1.54
RNA queous Micro Kit	根	126.1	2.52	2.13
	葉	82.0	1.64	2.12
RNeasy Plant Mini kit	根 (RLC)	100.6	3.02	1.89
	根 (RLT)	10.7	0.3	1.76
	葉 (RLC)	278.8	8.36	1.97
	葉 (RLT)	148.4	4.45	2.00
NucleoSpin RNA Plant	カルス (RAI)	140.0	8.4	1.75
	カルス (RAP)	117.5	7.05	1.96
RNA すいすい	カルス	21	0.63	—

5-2-2. ヘビノネゴザの *De novo* トランスクリプトーム解析

ヘビノネゴザ胞子体植物を終濃度 100 μM の Cd を含む培地に 24 時間置床して Cd ストレスを与えた。この後、根と地上部から RNA を抽出した。また、コントロールとして Cd を含まない培地に置いた植物体からも RNA を調製した。RNA 抽出結果を表 7 に示す。これらの RNA サンプルを逆転写し、Hiseq2000 シーケンサー (Illumina 社) を用いて網羅的な cDNA の配列情報を得た。各サンプルから 4600 万~7200 万の配列断片が得られ (表 8)、これらの合計 6 億 6100 万の配列断片を用いて、転写配列のアセンブリを行った。アセンブリは以下の手順で行った。1. Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014) を用いてクオリティの低い塩基を除去 (トリミング) した。2. トリミングされた配列から、Trinity (v2.4.0) (Grabherr et al., 2013) および PCAP (Huang et al., 2003) を用いてコンティグ (配列断片群) を作成した。アセンブリの結果は、FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) を用いて評価した。得られた配列のうち、類似した配列を集約し、同じ配列が存在する場合には、これらが同一の遺伝子に由来するとみなしてクラスタリング処理を行った。クラスタリングは、CD-HIT-EST (Fu et al., 2012) を用いて行った。その結果、根または葉のいずれかで発現していた転写産物として、35,681 の独立した転写産物の塩

基配列を得た (表 9)。

アセンブル結果の評価指標のひとつである N50 は、このデータセットで 2.6 kb 以上であり、各転写配列の平均長は 2 kb 以上であった (表 9、図 5-4A)。N50 は、contig 配列を長い順に連結していった時、全体の長さの半分に達した時の配列の長さを示す。アセンブルの際には復元したいゲノムに少しでも近づけるよう長い配列がたくさん得られると良いため、アセンブルの結果の良し悪しを判断する指標となっている (Ghangal et al., 2013)。Annadurai らは、ウコンの *De novo* トランスクリプトーム解析を行っており、その N50 は約 1500 bp であった (2013)。彼らは、複数の植物において行われた *De novo* トランスクリプトームの N50 をまとめており、その値は約 500~1500 bp とウコンの N50の方がよりも長かったことから、より良いアセンブリの結果であると述べている (Annadurai et al., 2013)。今回のヘビノネゴザの *De novo* トランスクリプトーム解析で得られた N50 は 2 kb 以上であったことから、アセンブリの結果は良好であると判断した。

次に、TransDecoder v.3.0.1 (<https://transdecoder.github.io/>) を用いて、得られた配列中でタンパク質をコードしている領域を探索した。また、タンパク質の機能検索およびドメイン検索を BLAST search (v2.3.0+) と HMMER package (Johnson et al., 2010) のそれぞれを用いてアノテーションを行った。

アセンブリおよびアノテーション結果の評価指標のひとつとして、BUSCO (Simão et al., 2015) 解析を行った。BUSCO は、アセンブリの定量的評価のため開発された方法である。数百種のゲノムデータから、90%以上の種が保存しているシングルコピーオルソログを core gene set と定義して、これがアセンブルされた配列中にどれだけあるかによって評価を行う。作成したヘビノネゴザのライブラリー中に、陸上植物を指す有胚植物の core gene set がどれだけあるか調べたところ、957 の配列 (66%) が全長一致していることが分かった。また、70 の配列 (5%) とは配列の一部が一致した (図 5-4B)。これは、有胚植物の 90%が保持している配列のうち、約 70%をヘビノネゴザが保持していることを示している。

また、ヘビノネゴザが持つ遺伝子のオルソログを OrthoMCL プログラム (Chen et al., 2006) を用いて調べた。OrthoMCL プログラム (Chen et al., 2006) は、複数生物種における配列の類似性をもとにオーソログのクラスタリングを実行するプログラムである。他の植物と、ヘビノネゴザが持つ遺伝子のオルソログを比較することで、アノテーションの精度を評価した。比較した植物には、被子植物のモデル植物であるシロイヌナズナ (*A.thaliana*)、シダ植物で唯一ゲノム解読がなされているイヌカタヒバ (*S.moellendorffii*)、および原始的な植物であるゼニゴケ (*M. polymorpha*) を用いた。その結果、ヘビノネゴザがもつ遺伝子のうち 78% は少なくともイヌカタヒバ (*S.moellendorffii*)、ゼニゴケ (*M. polymorpha*)、シロ

イヌナズナ (*A.thaliana*) のいずれかがもつオルソログのグループに属していると予測された (図 5-4C)。この結果は、ヘビノネゴザの配列に対して行ったアノテーションが、他の植物と共通のオルソロググループを持つことを示している。進化系統における原始的な生物から高等植物まで、いずれかの植物とも共通するオルソロググループを持つことは、ヘビノネゴザの配列に対して行ったアノテーションが多くのドメインを網羅していることを示している。

これらのデータから、作成したヘビノネゴザの cDNA データライブラリーは、他の有胚植物と共通の配列を約 70% 保持しており、かつ多くのドメインを網羅しているアノテーションが行われていることから、発現解析を行う際にリファレンス配列として用いることが可能な高い品質を有するものであると判断した。そこで、得られたデータライブラリーは DRA008924 として DDBJ に登録した。

得られた cDNA データライブラリーから予想される翻訳産物について BLASTP を用いてその機能の内訳を調べた。その結果、76.8% の遺伝子が既知の遺伝子との相同性が認められた一方で、機能が既知の遺伝子と相同性が認められたのは、全体の 28.2% であった (図 5-4D)。このことからヘビノネゴザでは多くの機能未知の遺伝子が発現していることが示唆された。

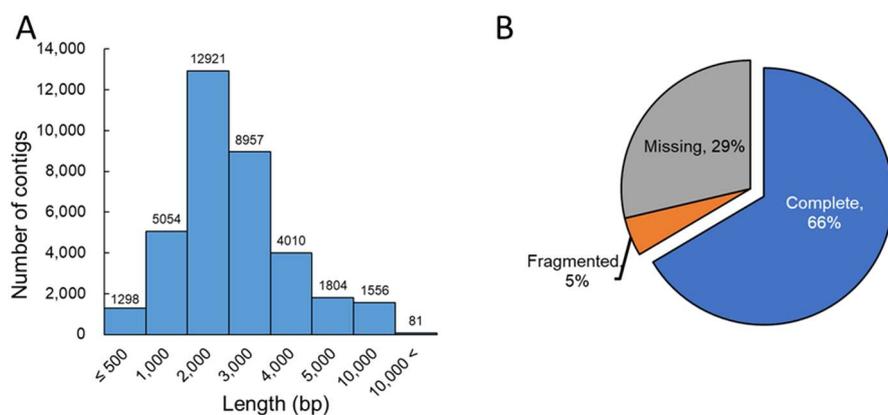


図 5-4 ヘビノネゴザのトランスクリプトーム解析の結果

A : 35,681 の独立した転写配列の長さの分布を示す。

B : 有胚植物の core gene set を用いた BUSCO 解析の結果を示す。

C : ヘビノネゴザの転写産物とイヌカタヒバ (*S.moellendorffii*)、ゼニゴケ (*M. polymorpha*)、シロイヌナズナ (*A.thaliana*) の転写産物との OrthoMCL 解析の結果を示す。上段の数字; 遺伝子クラスターの数、中段の数字; クラスター内の遺伝子の数、下段の数字; 遺伝子の総数を示す。図のセクションの数字は、クラスターの数を示す。

D : NCBI nr データベースに基づく、配列類似性を示した転写産物の割合を示す。

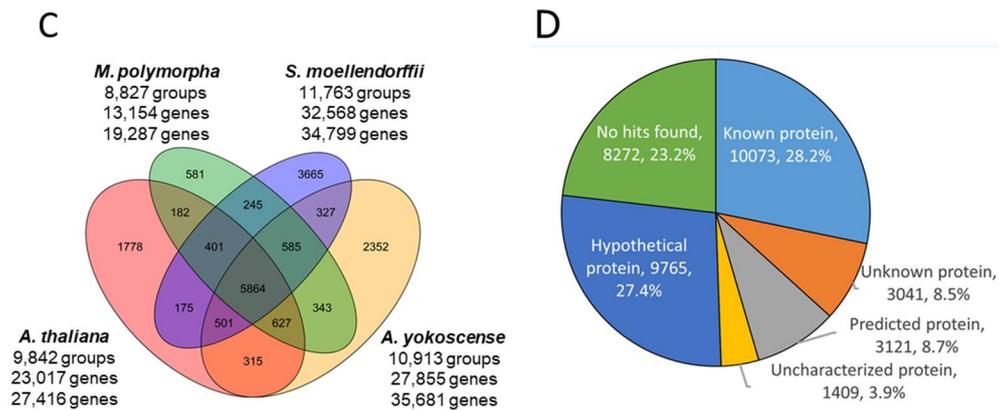


図 5-4 ヘビノネゴザのトランスクリプトーム解析の結果 (続き)

表 7 RNA 抽出結果

組織	曝露培地	実験反復	総量(μg)	A _{260/280}
根	1/4MS	-1	13.30	1.91
		-2	12.52	1.92
		-3	9.66	1.86
	Cd	-1	7.06	1.92
		-2	6.66	1.89
		-3	11.14	1.86
葉	1/4MS	-1	10.74	2.04
		-2	25.26	2.01
		-3	15.22	2.04
	Cd	-1	20.30	2.01
		-2	19.76	2.03
		-3	19.18	2.00

表 8 マッピングに用いたリード数およびその割合

組織	曝露培地	実験反復	総リード数	マッピングされた リード数	マッピングされた リード数の割合 (%)	両端からの解読データ がある割合 (%)
根	1/4MS	1	48,230,866	45,805,297	94.97	90.83
		2	57,181,790	54,423,271	95.18	91.44
		3	50,025,214	47,598,471	95.15	91.76
	Cd	1	55,842,456	52,930,001	94.78	91.33
		2	48,564,620	46,185,852	95.1	91.71
		3	47,405,502	44,597,098	94.08	89.98
葉	1/4MS	1	68,156,644	64,627,722	94.82	91.08
		2	72,690,788	68,962,500	94.87	90.6
		3	55,572,558	52,693,188	94.82	91.37
	Cd	1	56,730,274	53,794,918	94.83	90.33
		2	54,409,480	51,606,502	94.85	91.3
		3	46,753,554	44,035,626	94.19	90.72

表 9 *de novo* トランクリプトームのアセンブリにおける各統計値

項目	
転写配列の数	35,681
転写配列の平均長さ (bp)	2,193
転写配列の N50 の長さ (bp)	2,668
GC 含量 (%)	44.86

5-2-3. Gene Ontology 解析 (GO 解析)

組織間における発現遺伝子の違いを調べるため、根および地上部間で発現量の異なる遺伝子を調べた。そのための方法は、前項の cDNA ライブラリーを作成する際に得られたリード数を Cd 曝露と非曝露のサンプルを比較することで行うやり方を採用した (Love et al., 2014、図 5-5)。すなわち、遺伝子配列を決定するために用いたシーケンスリードの本数をカウントし、これを遺伝子配列の長さで補正した値 (= Reads Per Million mapped reads ; RPM) を遺伝子の発現量として用いる方法である。発現量が多い遺伝子ほど、RPM は高い値を示す。リード数のカウントは、BWA 0.7.17-r1188 program (Li and Durbin, 2010) を用いて行った。算出された RPM について、DESeq2 プログラム (Love et al., 2014) を用いて根と地上部の 2 群間を比較した。その結果、根では 3617 遺伝子、地上部では 3861 遺伝子が、各組織と比較して発現が多いことがわかった (表 10)。それぞれの組織で発現が多い遺伝子群に関して GO 解析を行った。GO は、遺伝子の生物学的プロセス、細胞の構成要素および分子機能に着目して、遺伝子に付けられるアノテーションである。ある遺伝子に付けられた GO を調べることによって、その遺伝子の機能や細胞内局在がある程度推定できる (The Gene Ontology Consortium, 2015)。BLAST2GO によって提供される GO エンリッチメント分析関数を使用し、P-value < 0.05 として選択した転写産物の GO 解析を行った。その結果、根で多く発現していた遺伝子には、生物学的プロセスでは抗酸化プロセスや防御機構、ストレス応答機構などに関与する遺伝子が、分子機能では鉄やカルシウムと結合する機構や抗酸化機構を持つ遺伝子などがあることがわかった (図 5-6A、B)。一方、地上部で多く発現していた遺伝子には、生物学的プロセスでは細胞壁組織やその合成に関与する遺伝子が、分子機能では抗酸化活性を持つ遺伝子などがあることがわかった (図 5-6C、D)。

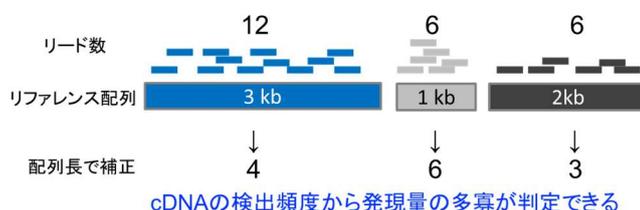


図 5-5 発現解析方法の概略図

リファレンス配列を構成するために供したリード数を比較することで発現量の違いを調べた。比較にはリード数をリファレンス配列長で補正した値 (Reads Per Million mapped reads; RPM) を用いた。

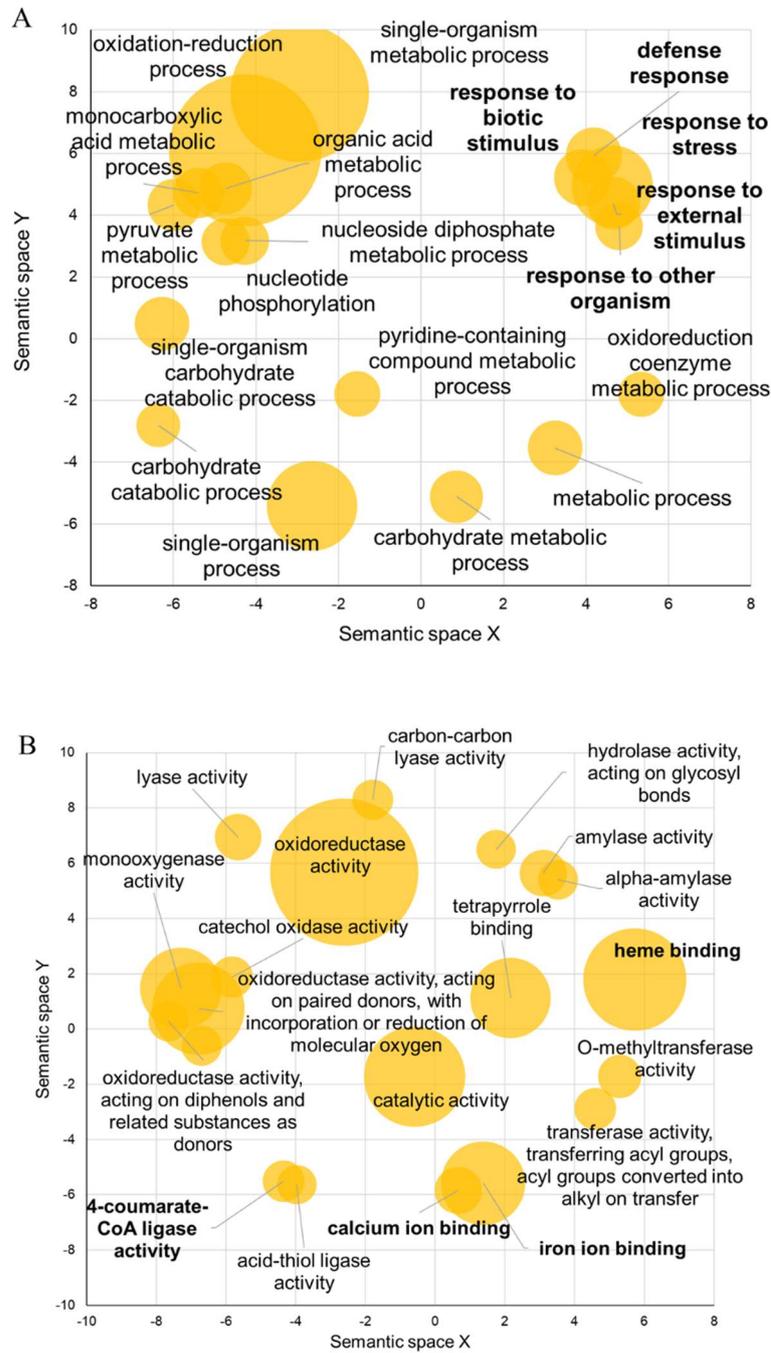


図 5-6 Gene Ontology 解析の結果

- A : 根で発現が多い遺伝子群が関わる生物学的プロセス
- B : 根で発現が多い遺伝子群の分子機能
- C : 地上部で発現が多い遺伝子群が関わる生物学的プロセス
- D : 地上部で発現が多い遺伝子群の分子機能

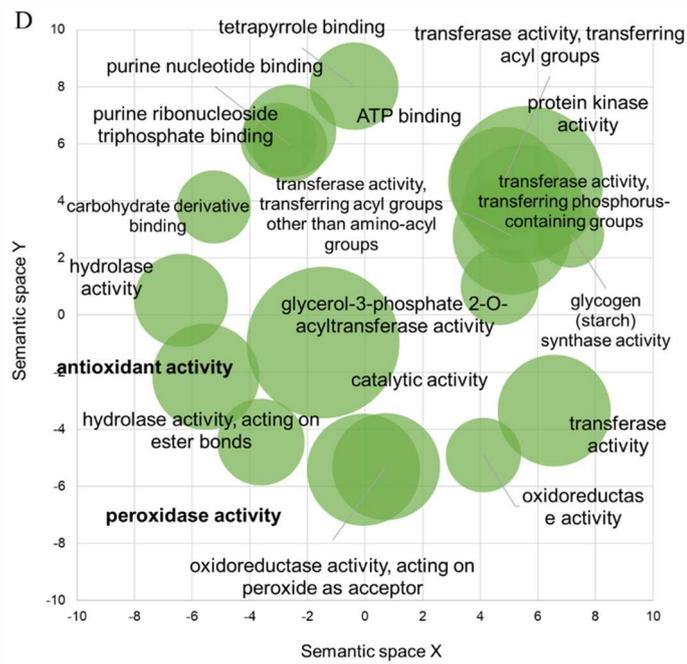
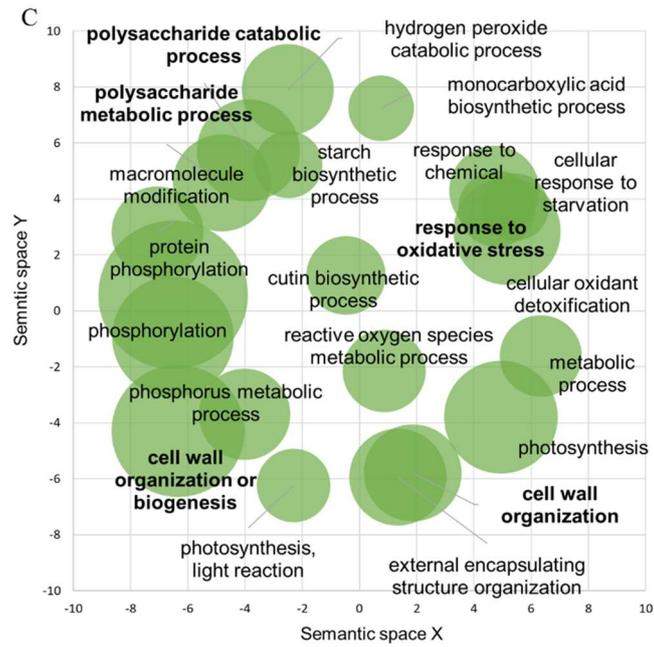


図 5-6 Gene Ontology 解析の結果 (続き)

表 10 根と地上部間で発現量が異なる遺伝子数

	根で発現量が多い遺伝子数	地上部で発現量が多い遺伝子数
遺伝子数	3617	3861

5-2-4. Cd 環境下における遺伝子の発現解析

ヘビノネゴザの Cd 環境下における生体内での応答、および Cd 輸送や耐性に関わる遺伝子を調べるため、Cd 曝露した植物体で発現量を変化させた遺伝子を抽出し、これらの特性を調べた。Cd 曝露と非曝露の 2 群間を比較した結果、発現量が変動した遺伝子 (differentially expressed genes ; DEGs) は非常に少なく、根で 43 遺伝子、地上部で 2 遺伝子であった (図 5-7、表 11、12)。これらの DEGs は、地上部での 1 遺伝子を除き、すべてが Cd 曝露によって発現量が増加していた (図 5-7、表 11、12)。ヘビノネゴザの DEGs の数は、これまでに報告されている他の植物種での Cd 曝露による DEGs の数 (Xu et al., 2012; He et al., 2015) と比較しても少ないことがわかった。(表 13) DESeq2 プログラム (Love et al., 2014) を用いた 2 群間比較を通常の解析で用いられる条件である $q\text{-value} < 0.00001$ で行った場合には、根で 4 遺伝子だけが DEGs として検出された。これらはいずれも機能未知の遺伝子であった。また、この条件では地上部で DEGs として検出された遺伝子はなかった。

$q\text{-value} < 0.01$ としたときに、根で DEGs として検出された 43 遺伝子の中には、窒素トランスポーター (*NPF family*) 遺伝子 (*Athyo41034c000010*) とカタラーゼ遺伝子 (*Athyo6890c000010*, *Athyo71933c000010* and *Athyo38788000010*) が含まれており、根における発現量はそれぞれが 2.7 倍、3.9 倍、3.8 倍、3.7 倍に増加していた (表 11)。地上部で検出された 2 つの DEGs は、いずれも機能未知の遺伝子であり、その変動も 2 倍程度であった。これらの結果は、ヘビノネゴザの地上部では Cd の影響がほとんどないことを示唆している (表 12)。

DEGs として検出されたトランスポーター遺伝子は、窒素化合物の輸送に関わる *NPF family* トランスポーター遺伝子のみであった (表 11)。この遺伝子は遺伝子群を形成しているが、変動が認められた *NPF* 遺伝子は *Athyo41034c000010* のみであった。この配列とシロイヌナズナの *NPF* で系統樹を作成したところ、*Athyo41034c000010* は、*NPF2* のグループと最も近いことがわかった (図 5-8)。

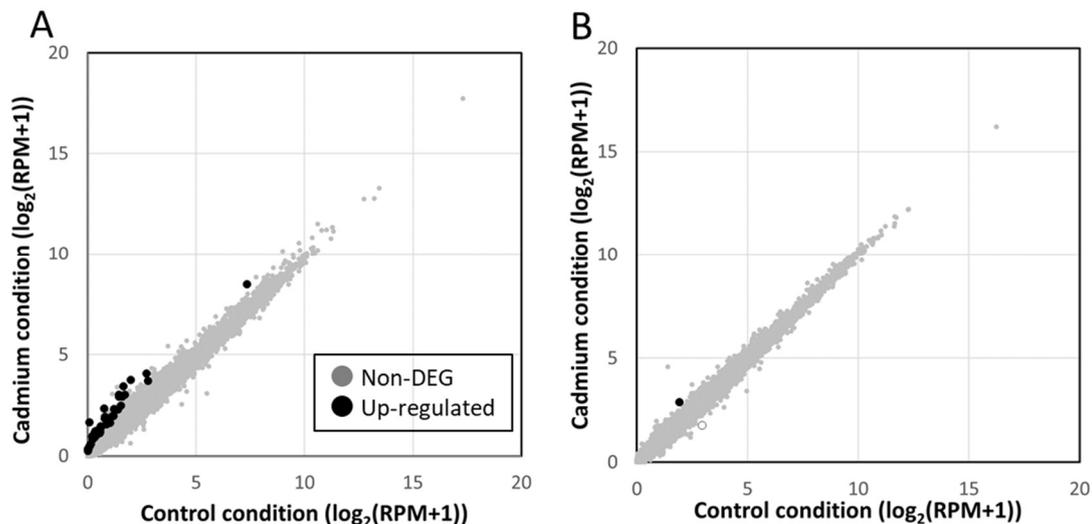


図 5-7 Cd 曝露による発現量変化

全 35681 の遺伝子を解析対象とした。根 (A) と葉 (B) それぞれにおける各遺伝子の発現量を散布図で示した。発現量が増加した遺伝子 (DEGs) を黒丸で示し、減少した遺伝子を白抜きで示した。DEGs は、DESeq2 プログラムを用いて選出した (fold change ≥ 2 、 $q < 0.01$)。

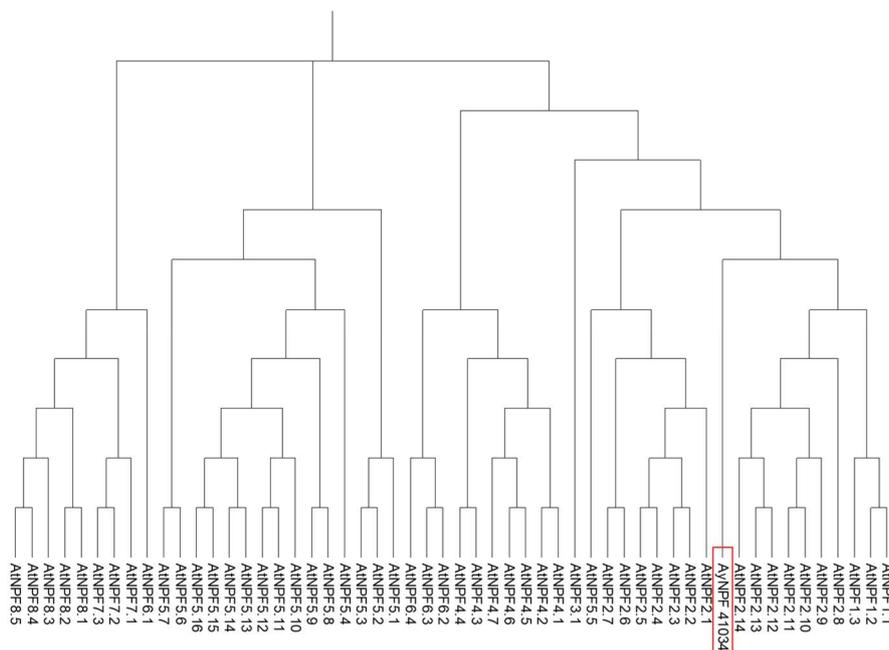


図 5-8 ヘビノネゴザとシロイヌナズナの NPF のアミノ酸分子系統樹
ヘビノネゴザの根において Cd 曝露で発現が上昇した NPF トランスポーター (*Athyo41034c000010*) とシロイヌナズナの NPF ファミリーで分子系統樹を作成した。At: *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)。解析には、Léran et al. (2014) に記載されている配列を用いた。

表 11 根で Cd 曝露によって発現量が変動した遺伝子

	gene	fold change	up/down	q-value	nr
1	Athyo92163c000010	23.16073373	up	1.61E-16	No hits found
2	Athyo21557c000010	9.625562252	up	0.002171728	ref XP_015884040.1 PREDICTED: early nodulin-like protein 1 [Ziziphus jujuba]
3	Athyo42140c000010	7.505023462	up	0.006337214	ref XP_001769046.1 predicted protein [Physcomitrella patens] gb EDQ66124.1 predicted protein [Physcomitrella patens] ref XP_002974525.1 hypothetical protein SELMODRAFT_174236 [Selaginella
4	Athyo26874c000010	5.762488597	up	3.65E-06	moellendorffii] gb EFJ24045.1 hypothetical protein SELMODRAFT_174236 [Selaginella moellendorffii]
5	Athyo32260c000010	5.617188224	up	0.003538873	No hits found
6	Athyo15998c000010	5.282091726	up	0.006422023	gb KZN03281.1 hypothetical protein DCAR_012037 [Daucus carota subsp. sativus]
7	Athyo25361c000010	5.221176419	up	0.000530127	No hits found ref XP_010696405.1 PREDICTED: L-type lectin-domain containing receptor kinase
8	Athyo8415c000010	4.900945519	up	0.000483032	VIII.1 [Beta vulgaris subsp. vulgaris] gb KMS96979.1 hypothetical protein BVRB_7g179860 [Beta vulgaris subsp. vulgaris]
9	Athyo65500c000010	4.826923787	up	4.82E-06	gb OVA00995.1 Protein of unknown function DUF620 [Macleaya cordata] ref XP_017422651.1 PREDICTED: BURP domain protein RD22-like [Vigna
10	Athyo7758c000010	4.776235003	up	0.000645382	angularis] gb KOM40319.1 hypothetical protein LR48_Vigan04g051700 [Vigna angularis] angularis] ref XP_002989121.1 hypothetical protein SELMODRAFT_129215 [Selaginella
11	Athyo28256c000010	4.660627094	up	2.61E-05	moellendorffii] gb EFJ09915.1 hypothetical protein SELMODRAFT_129215 [Selaginella moellendorffii]

表 11 根で Cd 曝露によって発現量が変動した遺伝子 (続き)

	gene	fold change	up/down	q-value	nr
12	Athyo53194c000010	4.605804336	up	0.003538873	No hits found
13	Athyo32077c000010	4.576294755	up	0.003255492	ref XP_002281594.1 PREDICTED: 30-kDa cleavage and polyadenylation specificity factor 30 [Vitis vinifera]
14	Athyo95714c000010	4.292681244	up	0.004959726	gb ABK23514.1 unknown [Picea sitchensis] gb ABK26522.1 unknown [Picea sitchensis]
15	Athyo65056c000010	4.241966888	up	0.004171858	No hits found
16	Athyo6890c000010	3.888842836	up	9.15E-05	gb AGC65520.1 catalase [Eriobotrya japonica] gb AGC65522.1 catalase [Eriobotrya japonica] gb AGC65523.1 catalase [Eriobotrya japonica] gb AGC65524.1 catalase [Eriobotrya japonica] gb AGE15297.2 catalase 2 [Eriobotrya japonica]
17	Athyo733c000010	3.801384764	up	0.006422023	No hits found
18	Athyo71933c000010	3.752645065	up	0.006300123	gb AGC65520.1 catalase [Eriobotrya japonica] gb AGC65522.1 catalase [Eriobotrya japonica] gb AGC65523.1 catalase [Eriobotrya japonica] gb AGC65524.1 catalase [Eriobotrya japonica] gb AGE15297.2 catalase 2 [Eriobotrya japonica] gb AGC65520.1 catalase [Eriobotrya japonica] gb AGC65522.1 catalase [Eriobotrya japonica]
19	Athyo38788c000010	3.700115653	up	0.003010537	gb AGC65523.1 catalase [Eriobotrya japonica] gb AGC65524.1 catalase [Eriobotrya japonica] gb AGE15297.2 catalase 2 [Eriobotrya japonica]
20	Athyo50110c000010	3.597876391	up	0.004442943	ref XP_010916374.2 PREDICTED: protein TOO MANY MOUTHS [Elaeis guineensis]
21	Athyo646c000010	3.541909647	up	0.002545133	ref XP_019638204.1 PREDICTED: uncharacterized protein LOC109480454 [Branchiostoma belcheri]
22	Athyo29829c000010	3.507230605	up	0.004536319	gb ADM76637.1 extensin-like protein [Picea sitchensis] gb ADM76673.1 extensin-like protein [Picea sitchensis]

表 11 根で Cd 曝露によって発現量が変動した遺伝子 (続き)

	gene	fold change	up/down	q-value	nr
23	Athyo45306c000010	3.440215517	up	0.006283918	gb ADE75884.1 unknown [Picea sitchensis]
24	Athyo19712c000010	3.375010235	up	0.004442943	gb ABK23533.1 unknown [Picea sitchensis]
25	Athyo14848c000010	3.374948631	up	1.35E-07	ref XP_010691855.1 PREDICTED: gibberellin-regulated protein 1-like [Beta vulgaris subsp. vulgaris]
26	Athyo50600c000010	3.34605093	up	0.000284835	gb OAE22061.1 hypothetical protein AXG93_3719s1410 [Marchantia polymorpha subsp. ruderalis]
27	Athyo78396c000010	3.316586798	up	2.61E-05	gb EPS62290.1 fasciclin-like arabinogalactan protein 13, partial [Genlisea aurea]
28	Athyo29734c000010	3.298344953	up	0.004442943	gb OAE24973.1 hypothetical protein AXG93_3856s1020 [Marchantia polymorpha subsp. ruderalis]
29	Athyo20012c000010	3.226284058	up	0.000448475	ref XP_012438085.1 PREDICTED: high mobility group B protein 7 [Gossypium raimondii] gb KJB49541.1 hypothetical protein B456_008G147700 [Gossypium raimondii]
30	Athyo1531c000010	3.188540256	up	0.00065894	ref XP_002972662.1 hypothetical protein SELMODRAFT_98542 [Selaginella moellendorffii] gb EFJ25883.1 hypothetical protein SELMODRAFT_98542 [Selaginella moellendorffii]
31	Athyo928c000010	3.135359894	up	9.15E-05	gb OAE25316.1 hypothetical protein AXG93_4620s1300 [Marchantia polymorpha subsp. ruderalis]
32	Athyo92064c000010	3.005911039	up	0.003211277	No hits found
33	Athyo22650c000010	2.99573403	up	0.005686001	ref XP_011046751.1 PREDICTED: uncharacterized protein LOC105141268 [Populus euphratica]
34	Athyo41034c000010	2.721527324	up	0.006422023	gb AQX43138.1 NPF family transporter [Pinus pinaster]
35	Athyo90447c000010	2.681357294	up	0.005686001	ref XP_022035748.1 arabinogalactan peptide 20-like [Helianthus annuus] gb OTG29326.1 putative arabinogalactan protein 20 [Helianthus annuus]

表 11 根で Cd 曝露によって発現量に変動した遺伝子 (続き)

	gene	fold change	up/down	q-value	nr
36	Athyo13177c000010	2.602511543	up	0.005686001	ref[XP_002273978.2] PREDICTED: leucine-rich repeat receptor protein kinase EMS1 [Vitis vinifera]
37	Athyo31112c000010	2.538822662	up	0.009123895	No hits found
38	Athyo91363c000010	2.536730943	up	0.006242106	ref[XP_002962111.1] hypothetical protein SELMODRAFT_403643 [Selaginella moellendorffii] gb[EFJ37371.1] hypothetical protein SELMODRAFT_403643 [Selaginella moellendorffii]
39	Athyo79728c000010	2.45436106	up	0.000386894	gb[ABK24226.1] unknown [Picea sitchensis]
40	Athyo44248c000010	2.44765859	up	0.005686001	ref[XP_002987470.1] hypothetical protein SELMODRAFT_426244 [Selaginella moellendorffii] gb[EFJ11557.1] hypothetical protein SELMODRAFT_426244 [Selaginella moellendorffii]
41	Athyo11730c000010	2.285394201	up	0.00044192	ref[XP_013893708.1] hypothetical protein MNEG_13275 [Monoraphidium neglectum] gb[KIY94688.1] hypothetical protein MNEG_13275 [Monoraphidium neglectum]
42	Athyo2124c000010	2.257585948	up	0.006480232	ref[XP_015775952.1] PREDICTED: uncharacterized protein LOC107354063 [Acropora digitifera]
43	Athyo18057c000010	2.180200308	up	0.008434135	ref[XP_002304146.2] hypothetical protein POPTR_0003s06190g [Populus trichocarpa] gb[EEE79125.2] hypothetical protein POPTR_0003s06190g [Populus trichocarpa]

表 12 地上部で Cd 曝露によって発現量に変動した遺伝子

	gene	fold change	up/down	q-value	nr
1	Athyo33452c000010	2.362995864	up	0.004548	emb[CAN70585.1] hypothetical protein VITISV_013305 [Vitis vinifera]
2	Athyo77495c000010	0.385231995	down	0.000729	gb[ABK26794.1] unknown [Picea sitchensis]

表 13 ヘビノネゴザと他植物との DEGs の数の比較

植物	Cd [μ M]	組織	DEGs 数		参考文献
			発現量 増加	発現量 減少	
ヘビノネゴザ	100	葉	1	1	this work
(<i>Athyrium yokoscense</i>)	100	根	43	0	this work
<i>Solanum nigrum</i>	50	根	233	126	Xu et al., 2012
<i>Solanum torvum</i>	50	根	318	316	Xu et al., 2012
イネ	10	根	214	22	He et al., 2015
(<i>Oryza sativa</i>)	100	根	914	248	He et al., 2015

5-2-5. リアルタイム PCR を用いた再現性確認

Cd ストレスによって根での発現量を 2 倍以上増加させた遺伝子として、*NPF family* 遺伝子とカタラーゼ遺伝子が得られた。そこで、これらの遺伝子に着目し、リアルタイム PCR により根におけるその発現量を調べた。カタラーゼ遺伝子は、最も変動幅の大きい遺伝子ひとつを代表として調査した。リアルタイム PCR を行った結果、*NPF family* では 2.3 倍の発現量の増加が確認された (図 5-9A)。この変動幅は、前項の発現解析で算出された値よりも小さかった。一方で、発現解析で最も増加が認められたカタラーゼは、リアルタイム PCR で発現量の増加は認められなかった (図 5-9B)。

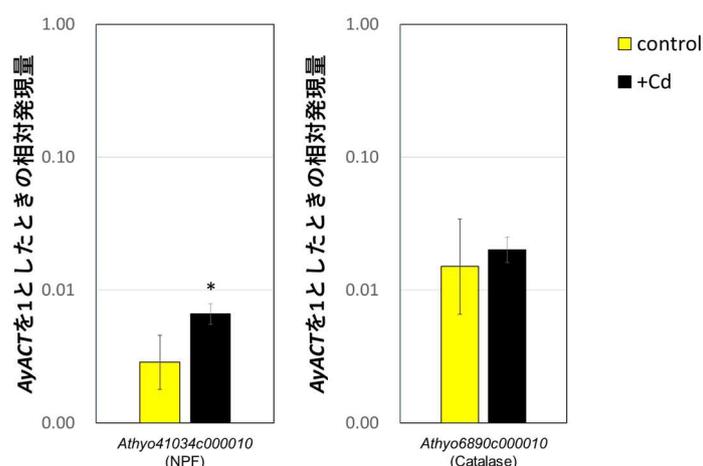


図 5-9 NPF およびカタラーゼのリアルタイム PCR の結果

A : NPF をコードする *Athyo41034c000010* 遺伝子

B : カタラーゼをコードする *Athyo6890c000010* 遺伝子

図の値は、アクチン遺伝子との相対値を示す (n=3、t 検定、*p<0.05)。

5-2-6. 金属トランスポーター遺伝子の探索

Cd 環境下における遺伝子の発現解析では、NPF 以外のトランスポーターが検出されなかったが、ヘビノネゴザには様々な金属トランスポーターが存在すると考えられる。そこで、他の植物で Cd の輸送に関与することが報告されているトランスポーター遺伝子のオルソログが作成したヘビノネゴザのデータセットに含まれているかを調べた。その結果、様々なトランスポーター遺伝子のオルソログと考えられる遺伝子の存在が示唆された。BLASTP 検索により、NPF の他に Cd 輸送に関与する遺伝子として知られている *AtIRT1*、*OsNramp5*、*OsHMA3*、*Hmt1*、*OsACA6*、*AhCAX1* (Ortiz et al., 1992; Connolly et al., 2002; Li et al., 2010; Miyadate et al., 2011; Ishikawa et al., 2012; Shukla et al., 2014; Ahmadi et al., 2018) がヘビノネゴザの遺伝子のデータセットに含まれていることがわかった (表 14)。各トランスポーターのアミノ酸配列と相同性が高いヘビノネゴザの遺伝子を以下に示す; *IRT1* (*Athyo10186c000010*)、*Nramp5* (*Athyo2574c000010*)、*HMA3* (*Athyo6577c000010*)、*Hmt1* (*Athyo90534c000010*)、*ACA6* (*Athyo28924c000010*)、*CAX1* (*Athyo1380c000010*)、*NPF gene* (*Athyo44698c000010*)。これらは、他の植物種の該当するものとの相同性が 30~60%であった (表 14)。ヘビノネゴザで検出された金属トランスポーターの数を他の植物が保持する各トランスポーターの数 (Migeon et al., 2010; Pedersen et al., 2012) と比較した。その結果、ヘビノネゴザでは他植物が持っている *IRT* や *Nramp*、*CAX* それぞれの各トランスポー

ター遺伝子の数とほぼ同数の遺伝子が見つかったが、*HMA*、*Hmt1*、*ACA* は、他の植物よりも多くの遺伝子数の存在が示唆された (表 15)。

これらのトランスポーター遺伝子はいずれも前項の発現解析では Cd 曝露による発現量の変動は検出されていなかった。各トランスポーター配列と最も相溶性が高いヘビノネゴザ遺伝子の発現量を図 5-10 に示す。このことから、ヘビノネゴザは多くの金属トランスポーターを有していたが、100 μ M の Cd 環境での 24 時間の曝露では、発現量の変動に至らないことがわかった。

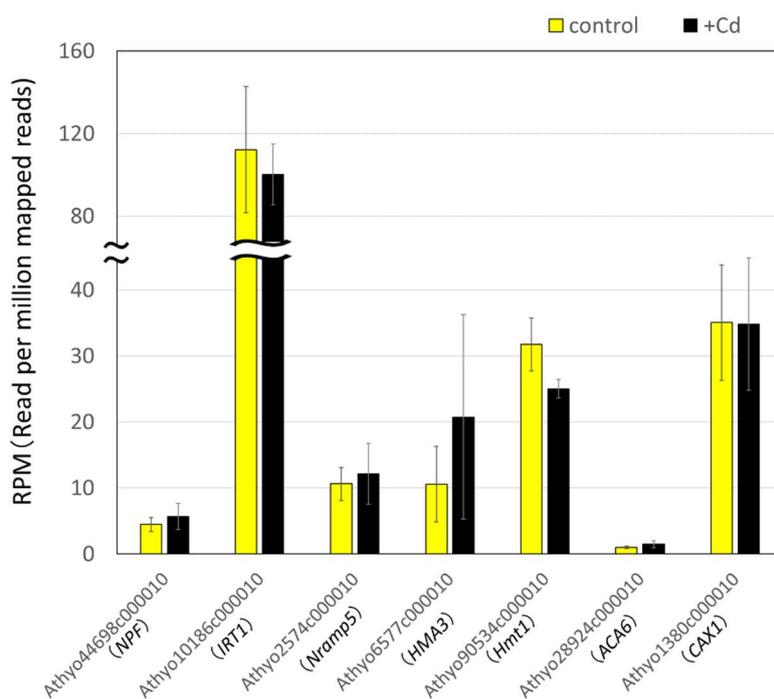


図 5-10 ヘビノネゴザが持つ各トランスポーターのオルソログの発現量

表 14 ヘビノネゴザがもつ金属トランスポーターのオルソログとの相同性の割合と Cd 曝露による発現量の変動幅

遺伝子名	subject ID	BLASTP		DEseq2 in roots		検索対象
		相同性 (%)	E-value	Fold change value	q-value	
<i>NPF</i>	Athyo44698c000010	46.8	1.47E-171	1.3	7.35E-01	Athyo41034c000010
<i>IRT1</i>	Athyo10186c000010	41.3	5.00E-92	1.0	9.98E-01	<i>AtIRT</i> ; NP_567590.3
<i>Nramp5</i>	Athyo2574c000010	59.7	0	1.2	9.07E-01	<i>OsNramp</i> ; Q8H4H5.1
<i>HMA3</i>	Athyo6577c000010	47.7	0	1.9	7.65E-01	<i>OsHMA3</i> ; Q8H384.1
<i>Hmt1</i>	Athyo90534c000010	36.1	1.18E-129	0.9	9.85E-01	<i>Hmt1</i> ; CAA20865.2
<i>ACA6</i>	Athyo28924c000010	58.1	0	1.6	4.97E-01	<i>OsACA6</i> ; AGW24530.1
<i>CAX1</i>	Athyo1380c000010	48.7	2.23E-113	1.1	9.98E-01	<i>AhCAX1</i> ; AKS03561.1

表 15 ヘビノネゴザがもつ金属トランスポーターのオルソログと他植物がもつ金属トランスポーターの数の比較

植物種	トランスポーター名					
	<i>ZIP(IRT)</i>	<i>NRAMP</i>	<i>HMA</i>	<i>Hmt1</i>	<i>ACA</i>	<i>CAX</i>
ヘビノネゴザ (<i>Athyrium yokoscense</i>)	10	8	72*	154	92*	2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	18	7	8	-	10	6
<i>Populus trichocarpa</i>	20	9	10	-	-	7
<i>Vitis vinifera</i>	20	6	9	-	-	4
<i>Oryza sativa</i>	16	7	9	-	-	6
<i>Sorghum bicolor</i>	17	10	9	-	-	6
<i>Selaginella moellendorffii</i>	9	7	12 (10)	-	5	1
<i>Physcomitrella patens</i>	9	6	9 (6)	-	5	5
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	11	3	4 (5)	-	4	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5	3	2	-	-	1

*同一トランスポーターの重複あり。橙セルは Migeon et al., 2010、青セルは Pedersen et al., 2012 より引用した。

5-3. 考察

本研究によって、ヘビノネゴザが持つ遺伝子配列と発現パターンが初めて明らかとなった。ヘビノネゴザの *De novo* トランスクリプトーム解析で得られたデータは、アセンブリの結果や BUSCO 解析、OrthoMCL 解析などの検証結果から、高い品質を有するものであると判断できた。他の植物と、ヘビノネゴザが持つ遺伝子のオルソログを比較し、アノテーションの精度を評価したところ、ヘビノネゴザは、原始的な植物から高等植物まで様々な植物種で共通して保存されているオルソログを持っていることが示唆された。以上のことから、作成したデータセットは、十分な品質のものであるといえる (図 5-4、表 8、9)。シダ植物の遺伝子情報は乏しく、Cd に高い耐性能を示すシダ植物のトランスクリプトーム解析は初めての報告である。

作成したデータセットを用いて、Cd ストレスに対する発現パターンの解析を行った結果、ヘビノネゴザでは Cd 曝露によって根で 43 遺伝子、地上部で 2 遺伝子のみで発現量の変動が認められた (図 5-7、表 11、12)。ナス科の植物である *S. nigrum* と *S. torvum* を用いた研究では、50 μM の Cd 環境下に 24 時間曝すと、それぞれ 359 遺伝子と 634 遺伝子が発現量を変動させることが報告されている (Xu et al., 2012)。類似した報告はイネにおいてもなされており、10 μM と 100 μM の Cd 環境下に 24 時間曝すと、それぞれ 236 遺伝子と 1162 遺伝子が発現量を変動させることが報告されている (He et al., 2015)。このことから、ヘビノネゴザは Cd 曝露によって発現を変動させる遺伝子が高植物と比較して著しく少ないことがわかる (表 13)。すなわち、ヘビノネゴザの遺伝子発現変動は、これらの植物とは大きく異なることが明らかとなった。ヘビノネゴザは Cd ストレスに対する応答が、これらとは違う非常に特殊なものを有している可能性が示唆される。

根で発現量が増加した遺伝子のうち、*NPF family* 遺伝子とカタラーゼ遺伝子に着目し、リアルタイム PCR を用いて発現量の増加について再現性を確認した。その結果、*NPF* では、Cd 曝露によって発現量の増加がみられた。*NPF* は、窒素やペプチドを輸送するトランスポーターで、8 つのグループに大別されることが知られている (Corratgé-Faillie and Lacomb, 2017)。シロイヌナズナを用いた実験で、*AtNPF7.2* (旧名: *AtNPF1.8*) は、細胞膜に局在しており、Cd 曝露によって発現上昇すること (5~13 倍) や、この遺伝子の KO 個体は Cd 感受性株になることが報告されている (Li et al., 2010)。しかし、ヘビノネゴザで発現上昇が見られた *Athyo41034c000010* は変動幅が 2.3 倍と小さく、また、系統樹から *AtNPF2* のグループと近いと推察され、*AtNPF7.2* と類似の機能を保持している可能性は低いと考えられる。尚、*AtNPF2* には、皮層細胞や師部への連結細胞などに発現

している遺伝子が知られているが (Léran et al., 2014)、Cd との関連については未知である。一方、カタラーゼ遺伝子では、発現量の増加がみられず、再現性が確認されなかった。これは、DEG を検出する際の q-value を一般的な条件よりも緩和した 0.01 未満に設定した際に得られた遺伝子であるため、多少のエラーが含まれている可能性が考えられる。カタラーゼは、 H_2O_2 を O_2 にする反応を触媒する酵素であり、酸化ストレスの緩和に関与するとされている (Mittler, 2002)。リアルタイム PCR 結果より、カタラーゼ遺伝子の発現変動が見られなかったことは、ヘビノネゴザが酸化ストレスを受けていないことを示唆する生理学的な実験結果を支持するものである。

多くの植物種では Cd は主に Fe や Ca、Zn などの二価イオントランスポーターやチャンネルを介して細胞内に侵入する (Clemens, 2006)。これまでに ZIP (ZRT/IRT-like proteins) ファミリーに属する IRT トランスポーターや、コムギの LCT1 トランスポーターのオルソログ、カルシウムチャンネル、および Nramp が細胞内への Cd の取り込みに関与していることが報告されている (Clemens et al., 1998; Connolly et al., 2002; White and Broadley, 2003; Ishikawa et al., 2012)。Cd ストレス環境下において、NPF 以外のトランスポーター遺伝子の発現変動が検出されなかったことから、ヘビノネゴザが有する金属トランスポーター遺伝子の挙動に興味を持たれた。本研究において取得したヘビノネゴザの遺伝子情報から、ヘビノネゴザには、LCT1 以外のこれらのトランスポーター遺伝子が保存されていることがわかった (表 14、15)。このことは、ヘビノネゴザが他の植物と類似した細胞膜でのイオン輸送システムを持っていることを示唆している。これにも関わらず、これらの遺伝子の発現量に変動しないことは、Cd に対してこれらのトランスポーターは遺伝子レベルでの応答を行っていないことを示唆している。

第六章. ヘビノネゴザが保持するトランスポーターの機能解析

6-1. 序論

ヘビノネゴザの Cd 耐性機構を明らかにするためには、これまでに提唱されてきたトランスポーターの特異性の高さを評価する必要がある。前項のトランスクリプトーム解析によって遺伝子配列が明らかとなったため、各トランスポーターについての詳細な解析が可能となった。本項では、これを検証するため、ヘビノネゴザの代表的なトランスポーター遺伝子を単離し、これを発現させたイネカルスを作成することで評価を行った。発現させるヘビノネゴザのトランスポーターとして、イネの *OsNramp5* 遺伝子のオルソログに着目した。*OsNramp5* はイネの根で発現しており、細胞膜に局在し、鉄などの輸送に関与している (Ishikawa et al., 2012)。イオンビーム照射によって *OsNramp5* に変異が生じた個体では、Cd の取り込み量が低下することから、これが環境中から細胞内への Cd の取り込みに関与することが示唆されている (Ishikawa et al., 2012)。前項にて得られたヘビノネゴザの遺伝子情報から *OsNramp5* 遺伝子のオルソログを抽出し、この構造および発現量から、最も Cd 輸送に関与している可能性が高い遺伝子を選び出し、これをイネカルスへの導入に用いた。形質転換イネカルスに Cd ストレスを与え、細胞内に取り込まれた Fe、Mn、および Cd 量を測定し、この遺伝子機能を検定した。

6-2. 結果

6-2-1. ヘビノネゴザの *Nramp* を導入したイネカルスの作出

イネの根では、鉄とマンガンのトランスポーターである *OsNramp5* が Cd の取り込みに関わっていることが知られている (Ishimaru et al., 2012)。前項で明らかとなったヘビノネゴザのトランスポーター遺伝子群の塩基配列のうちで *OsNramp5* と相同性を示す遺伝子を抽出した。その結果、*OsNramp5* と相同性を持つ 14 個の遺伝子がみつかった。このうち、E-value が 0.05 以下の遺伝子を *OsNramp5* のオルソログとした (表 16)。これらの遺伝子の発現量を図 6-1 に、翻訳したアミノ酸配列を MOTIF 検索した結果を図 6-2、表 17 に示す。この中で根において発現量が高く、かつ機能未知のドメイン (Domain of unknown function; DUF) を持つ *Athyo15474* 遺伝子に着目し、これを *AyNramp5a* と名付け、以後の実験に用いた。

AyNramp5a にコードされているタンパク質の C-末端に 6×His を付けたレポーター遺伝子を人工合成した (図 6-3)。これを鋳型として、末端に attB1、attB2 配列を付加した PCR プライマーを用いて PCR を行い、末端に att 配列を付加した。得られた断片を植物用バイナリベクターに移し替えた。これにより 35S プロモーターの下流に *AyNramp5a*-6×His が含まれる pGW2-*AyNramp5a*-6×His を得た (図 6-4)。

これを用いてイネカルスを形質転換した。形質転換したカルスでは目的の断片である 648 bp の DNA 断片が検出された (図 6-5)。

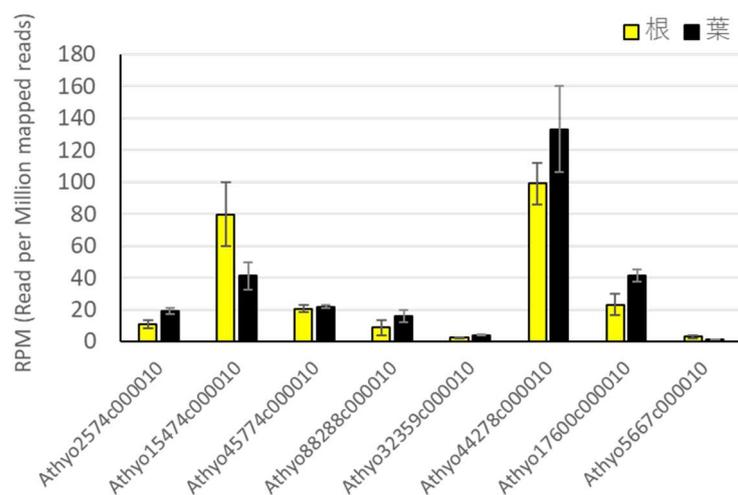


図 6-1 *OsNramp5* 相同遺伝子の発現量

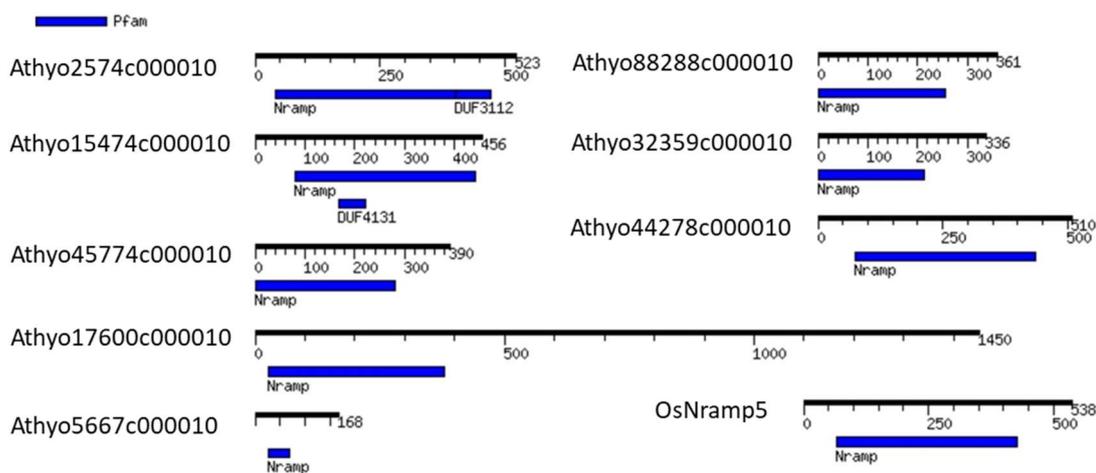


図 6-2 *OsNramp5* 相同遺伝子の MOTIF 検索の結果
OsNramp5 の配列は Accession No.Q8H4H5.1 を用いた。

GGATCC**ATGGGGG**GAGCTGTTACTATATCAACTCAGTTTGCAGGAC
TGGCCACCCCATAGCACTCTTCTTCTGTGGTGTTCGGTGTCTCAA
CCCGCTTAGCCTCAGCCTTACCTGCTTTGCACCATAATGGATGCCG
GCCAGACCAGATTTTCGTCCCCGAAAAACGAGGACTGCGTACACT
CTTAGCTTACCTGGGACCGGGTTTCTTGGTCGCAATAGCGTACATCG
ATCCAGGAAAC**TTTGAGTCTGACCTGAAATCGGGCGCCAAGTACAA**
GTACGAGTTGCTATGGATCATCGTCATCGCCAGTTGTGCAGCGTTGT
TAATTCAGAGTCTCGCCGCAATCTCGGC GTTGTAACAGGCAAGCA
CTTAGCGGAGCATTGCAGAACGGAGTATCCTCGCAAAGTGAAC TTC
CTGCTTTGGATAGCAGCTGAAGTCTCCATTGTGGCCTCTGACATCCC
TGAAGTGCTGGGAACTGCCTTTGCCCTCAACCTTCTCTTCAAG**ATC**
CCGGTTTGGGCAGGAGTGATCCTGACAGGTCTGTCCACGTTGATTC
TCCTTGCCTGCAACAGTACGGCGTACGCAAGCTAGAGTTCTTCAT
AGCCCTACTGGTCTTCACCATGGCTGGCTGCTTCTTTGCAGAGCTA
GCTTATGCTAGGCCACCTGTGGTTGAAGTCTTGAAAGGCATGTTTCAT
TCCTCGGCTTAATGGCGATGGTGC GACTAGGCTGGCTATCTCATTGT
TGGGTGCCATGGTAATGCCTCACAATCTGTTCTTGCATTCTGCCCTG
GTGCTTTCACGCCGTACGCCGAGAACAGTTCGCGGGATAAAGGATG
CGTGCAAATTCTACTTCATGGAGTCGGCTTTTGCCTGTTTGTGCGG
TTTCTCATCAACATCTTTGTGAACAGCGTCAGTGGTGGCGTCTGTTC
CGATCCGACTTTAGCGGCTGGAGACAAGGAGAAATGCGAGAACCT
AGACCTCAATCAAGCGAGCTTCTCCTGAAGAACGTGCTAGGCTCC
TGGTCGAGTAAGCTCTTCGGCATAGCGTTGTTGGCCTCAGGGCAA
GCTCTACGATTACAGGCACCTATGCAGGGCAGTATGTGATGCAAGG
GTTTCTCAATCTCCGGTTCGTTCCCTGGGTTCGGAACCTTCTACCA
GGTCTGTTGCCATTGGACCATCACTCCTCGCAGCGATTTTGGCGG
GTCCTCAGGTGCAGGGAATCTCATCATCATCTCCAGCATTATCCTCT
CTTTCGAACTCCCCTTCGCTTTATTGCCCTGCTCAAGTTCACGTCC
TCGAAGACCAAGATGGGCCCGTACAAGA**ATCCGCTTACCGGGATTC**
GAGCTCATGATTACATGGTCAATCGGATTCACCACCATCATCACCAT
TGAGAATTC

図 6-3 人工合成した *AyNramp5-6*×His の配列

AyNramp5a 発現用ベクターに使用した *AyNramp5-6*×His の配列を示す。太字は開始コドンを示し、下線部分は 6×His の配列を示す。黄色マーカー箇所は Nramp ドメインに、緑マーカー箇所は DUF ドメインに相当する箇所を示す。

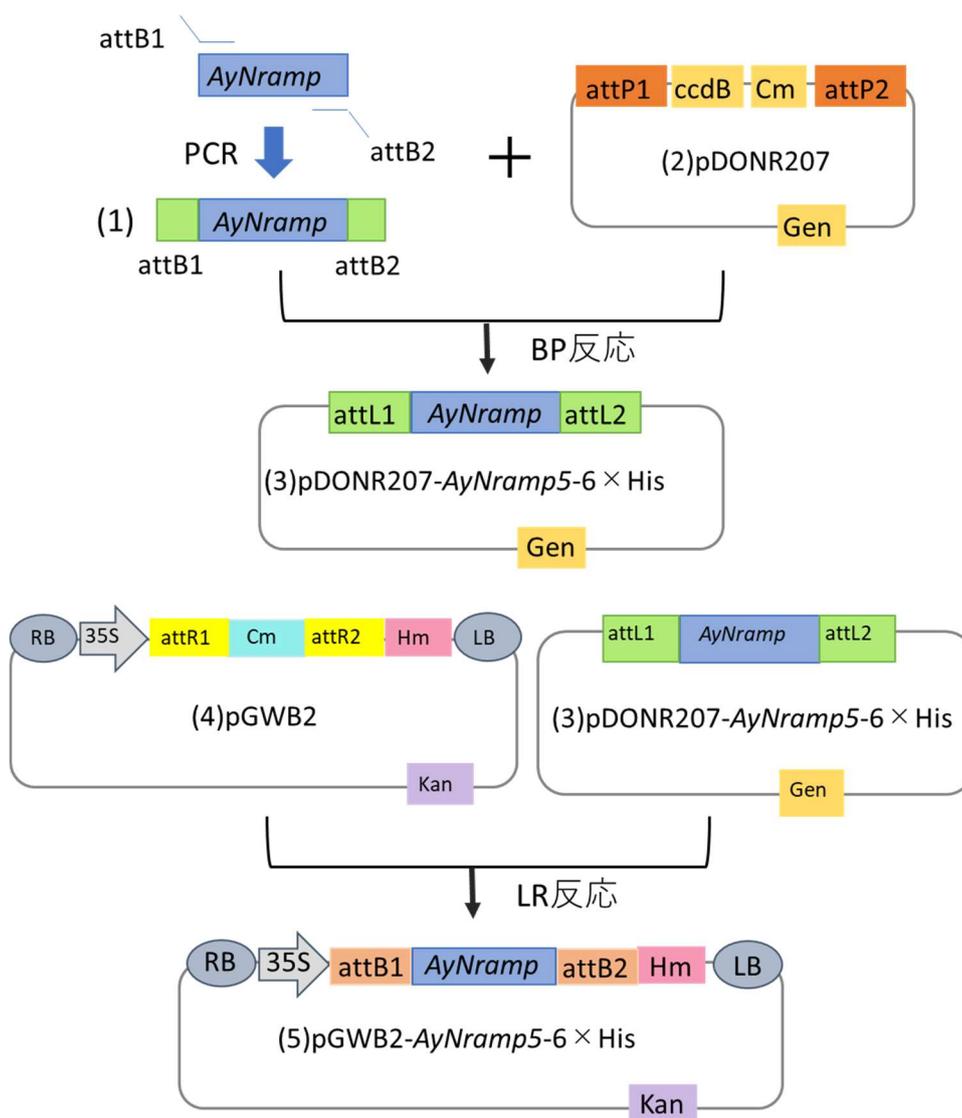


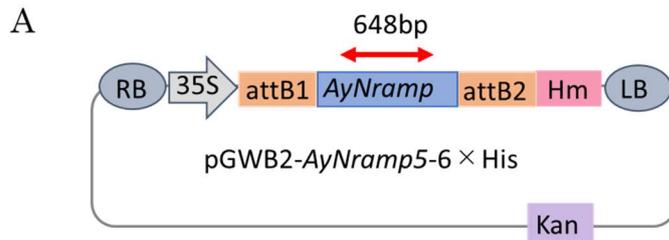
図 6-4 pGWB2-AyNramp5-6xHis 作製の概略

Kan : カナマイシン耐性遺伝子

35S : CaMV 35S プロモーター

attB1,attB2 : BP clonase recombination sites

attR1,attR2 : LR clonase recombination sites



B



図 6-5 *AyNramp5* 発現プラスミドを導入したイネカルスにおける遺伝子の検出

A : pGWB2-*AyNramp5*-6×His の概要図を示す。

矢印で表した *AyNramp5*-6×His (750bp) を PCR で増幅し、導入検定を行った。

B : 導入遺伝子断片の電気泳動結果を示す。

WT : 日本イネカルス

P.C : pGWB2-*AyNramp5*-6×His プラスミド

#1~9 : pGWB2-*AyNramp5*-6×His 導入カルス (日本晴宿主)

表 16 ヘビノネゴザにおける *OsNramp5* 相同遺伝子

subject ID	相同性 (%)	アライメント長 (aa)	E-value
Athyo2574c000010	59.684	506	0
Athyo15474c000010	65.995	397	0
Athyo45774c000010	53.947	380	3.06E-133
Athyo88288c000010	57.273	330	3.10E-132
Athyo32359c000010	56.231	329	9.65E-126
Athyo44278c000010	42.073	492	7.05E-112
Athyo17600c000010	32.143	448	1.33E-45
Athyo5667c000010	60.000	45	1.43E-12

表 17 *OsNramp5* 相同遺伝子の MOTIF 検索の結果

subject ID	Pfam	保有位置 (E-value)	モチーフ名
Athyo2574c000010	Nramp	40..401(8.1e-121)	PF01566, Natural resistance-associated macrophage protein
	DUF3112	403..473(0.26)	PF11309, Protein of unknown function (DUF3112)
Athyo15474c000010	Nramp	80..441(6.6e-119)	PF01566, Natural resistance-associated macrophage protein
	DUF4131	168..221(0.046)	PF13567, Domain of unknown function (DUF4131)
Athyo45774c000010	Nramp	1..280(2e-80)	PF01566, Natural resistance-associated macrophage protein
Athyo88288c000010	Nramp	2..256(1.3e-68)	PF01566, Natural resistance-associated macrophage protein
Athyo32359c000010	Nramp	1..214(1e-60)	PF01566, Natural resistance-associated macrophage protein
Athyo44278c000010	Nramp	75..436(3.8e-121)	PF01566, Natural resistance-associated macrophage protein
Athyo17600c000010	Nramp	26..380(7.2e-90)	PF01566, Natural resistance-associated macrophage protein
Athyo5667c000010	Nramp	27..70(0.0012)	PF01566, Natural resistance-associated macrophage protein
OsNramp5 (sp Q8H4H5.1 NRAM5_ORYSJ)	Nramp	65..426(9.7e-118)	PF01566, Natural resistance-associated macrophage protein

6-2-2. 形質転換カルスを用いたヘビノネゴザの *Nramp5a* の機能解析

得られた形質転換カルスの Cd の取り込みを調べた。得られた形質転換体カルスと非形質転換体カルスのそれぞれ 10 個ずつを、10 μM の Cd を含む培地と、100 μM の Cd を含む培地、および Cd を含まない培地の上に 24 時間置床した。これらのカルスを錠剤に成型し、蛍光 X 線解析装置を用いて金属元素類の含有量を測定した。標準の白米粉末と Fe、Mn、Cd も含む白米粉末を用いて作成した検量線 (図 6-6) から、形質転換体と非形質転換体カルスにおける各元素の取り込み量を算出した。その結果、形質転換体では非形質転換体よりも鉄とマンガンの取り込み量が増加していた (図 6-7A、B)。このことから導入した *AyNramp5a* が鉄とマンガントランスポーターとして機能することが分かった。さらに、形質転換体の Cd の取り込み量を測定したところ、形質転換体では非形質転換体よりも Cd の取り込み量が大きく増加していることが分かった (図 6-7C)。このことから、*AyNramp5a* はイネの *Nramp* と同様に Fe、Mn のトランスポーターとして機能するだけでなく、Cd 取り込み量にも関与することが分かった。

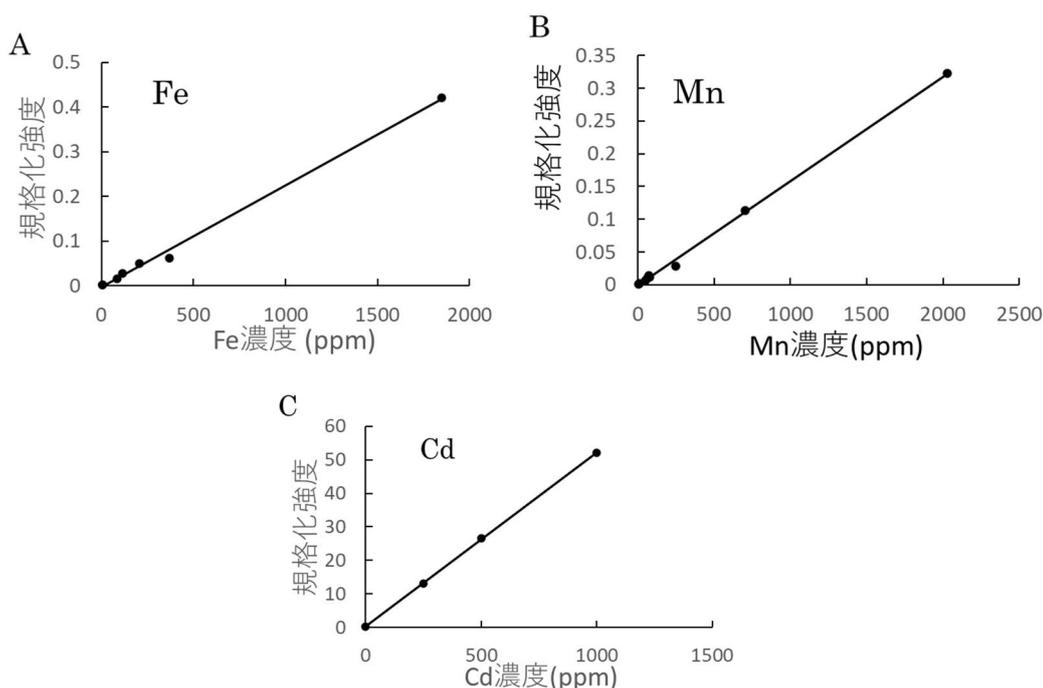
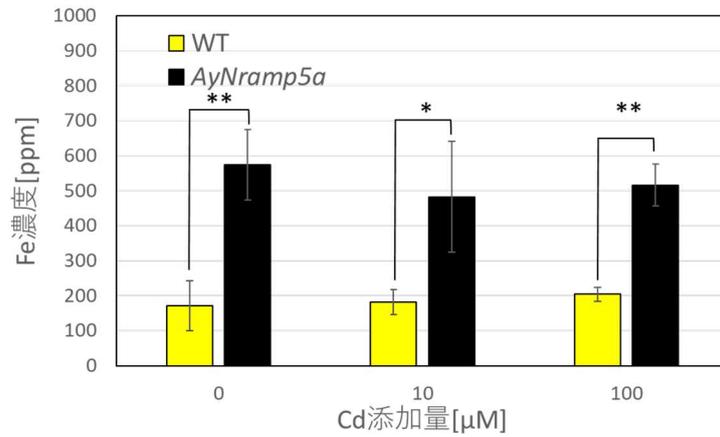


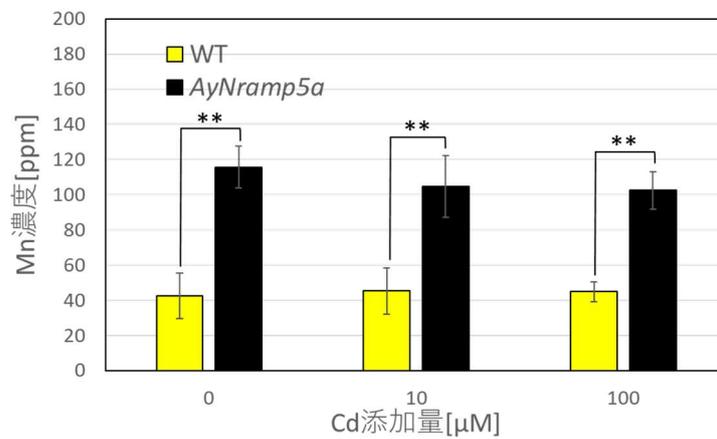
図 6-6 Fe、Mn、Cd の標準曲線

蛍光 X 線解析における Fe (A)、Mn (B)、Cd (C) の標準曲線を示す。

A



B



C

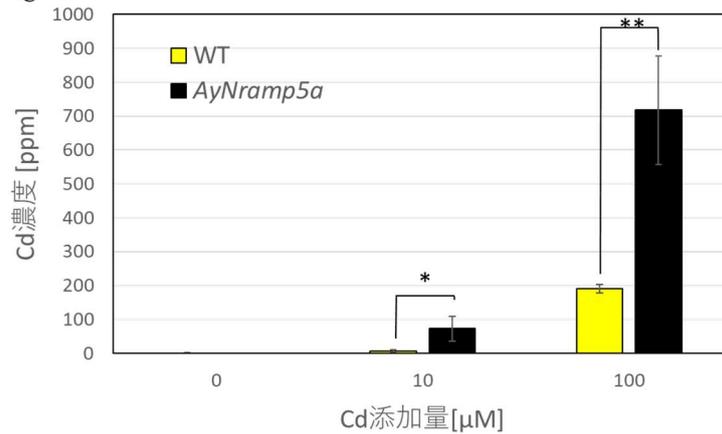


図 6-7 蛍光 X 線解析によるイネカルスへの Fe、Mn、Cd 取り込み量
 A : Fe の取り込み量、B : Mn の取り込み量、C : Cd の取り込み量を示す (N=3、t 検定、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

6-3. 考察

トランスクリプトーム解析によって、ヘビノネゴザには、多くの植物が有する金属トランスポーター遺伝子と相同性を持つ遺伝子が存在することが分かった。これらのトランスポーター遺伝子の発現量は Cd 投与によっても変動が起らなかったことから、ヘビノネゴザの金属トランスポーターは Cd ストレスに対して遺伝子の発現レベルでの応答が起らないことが示唆された。このことから、ヘビノネゴザのそれぞれのトランスポーターは標的とする金属に対する特異性が高く、異物である Cd の取り込みが抑制されているのではないかと考えられた。そこで代表的なトランスポーター遺伝子をイネカルスで発現させ、Cd の取り込み量の変化を調べることで、ヘビノネゴザのトランスポーターの特異性についての評価を行った。

Nramp は細胞膜に局在する鉄とマンガンのトランスポーターである。イネの Nramp5 (*OsNramp5*) は Cd の吸収にも関与することが知られている (Ishimaru et al., 2012)。ヘビノネゴザの Nramp5 オルソログである *AyNramp5a* 遺伝子の構造が明らかになったため、この遺伝子を導入したイネカルスを作製した。

AyNramp5a を発現する形質転換体カルスを、Cd を含む培地で培養し、蛍光 X 線解析装置を用いて各カルスに含まれる元素の含有量を測定したところ、*AyNramp5a* を発現させたイネカルスでは、鉄とマンガンの吸収量が増加していることが分かった (図 6-7A, B)。このことから、ヘビノネゴザの *AyNramp5a* は鉄、マンガントランスポーターとして機能することがわかった。また、Cd ストレス下での Cd の取り込み量を測定した結果、形質転換体では、より Cd の吸収量が増大していた (図 6-7C)。この結果から、*AyNramp5a* は *OsNramp5* と同じように、鉄、マンガントランスポーターとして機能するだけでなく、他の植物の Nramp5 と同じように Fe、Mn と競合して Cd を吸収することが分かった。このことから、*AyNramp5a* は Cd を通過させる金属トランスポーターであり、特定の金属イオンに対する特異性は高くないことが示唆された。この結果は、ヘビノネゴザの膜に到達した Cd は Nramp5 などのトランスポーターを介して細胞内へ流入することを意味する。

7. 総合考察

Cd 蓄積を調べた結果、ヘビノネゴザでは根端部に Cd が留まっており、細胞内への吸収はほとんど起こっておらず、Cd の維管束内への輸送が厳密に抑制されていることが示唆された。生理的応答の評価より、ヘビノネゴザの細胞は、Cd 曝露に伴う酸化ストレスが観察されなかったことや、ROS とチオール化合物が中心柱近傍のみで検出されたことから、表皮や皮層細胞にも Cd がほとんど入っていないことが示唆された。このような Cd 流入を阻止する防御機構として、ヘビノネゴザの根に見つかった発達したカスパリー線や、根に多くの有機酸が含まれることが関与している可能性が考えられた。ヘビノネゴザの根では、根端部に吸着された Cd は細胞間隙を通過してカスパリー線まで輸送され、ここで移送が抑制されていると考えられる。あるいは、皮層のそれぞれの細胞表面に Cd が吸着されて動かない可能性も考えられる。

細胞内へ Cd が流入しない機構として、ヘビノネゴザが保持するトランスポーターの特異性の高さが理由として考えられてきた。この検証を行うためには、分子生物学的研究が必要であり、そのためにヘビノネゴザの遺伝子情報が必要であった。しかしながらヘビノネゴザのゲノム情報などは全くなかったことから、新たに *De novo* トランスクリプトーム解析を行うことで遺伝子情報を明らかにした。得られた遺伝子情報から、Cd ストレスによって発現量を変動させる遺伝子を調べたところ、ヘビノネゴザは発現量を変動させる遺伝子はほとんどなく、またその変動幅も小さいことがわかった。これは、蓄積機構の評価および生理学的応答の評価で示唆された Cd が細胞内へほとんど入っていない現象を支持するものであった。

ヘビノネゴザはさまざまな金属トランスポーターを保持しており、他の植物と類似した細胞膜でのイオン輸送システムを持っていることが示唆された。そこで細胞外から細胞内への Cd 輸送を担う *OsNramp5* のオルソログである *AyNramp5a* をイネカルスに導入してその機能を評価したところ、トランスポーターとしての機能が認められた。さらに、*OsNramp5* と同様に、Fe や Mn の他に Cd も取り込むことが明らかとなった。

以上のことから、ヘビノネゴザは細胞膜の金属トランスポーターは他の植物種のトランスポーターと同様に Cd を取り込むものであるにもかかわらず、細胞内へ Cd を流入させない特殊な機能が存在することがわかった。すなわち、ヘビノネゴザの Cd 耐性機構には、根に多く含まれる有機酸や発達したカスパリー線などの構造体が大きく関与していることが強く示唆された。もしくは、一度細胞内へ吸収された Cd を排出する機能を有しているのかもしれない。このような機能があるとする、Yoshihara et al. (2014) による PETIS を用いた

実験において、ヘビノネゴザを曝露した培養液中の Cd は、時間とともに徐々に増加しているように見える現象を説明することができる。

これらの解析により、ヘビノネゴザが有する Cd 耐性に関する全体像が明らかになった。ヘビノネゴザでは他の植物と類似した細胞膜でのイオン輸送システムを持っている一方で、根に多く含まれる有機酸や発達したカスパリー線などの構造体によって Cd を細胞内への吸収を抑制している。細胞内に吸収された Cd に対してもファイトケラチンによる隔離機能によって、生体内の反応を阻害しないと考えられた。これらの個々の能力の総和により他の植物が成し遂げることができなかった高い Cd ストレス耐性を有するに至ったと考えられる (図 7)。これらの結果は、今後の重金属汚染地域における作物の育成に役立つものと考えており、重金属耐性を保持する植物に関する基盤的な知見となると期待される。

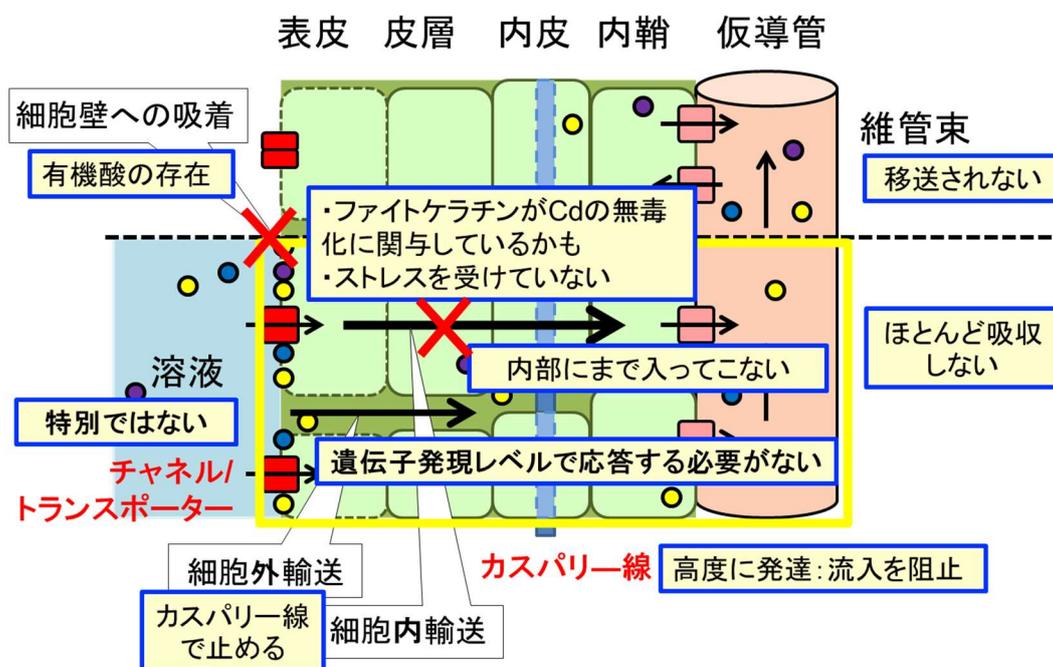


図 7 ヘビノネゴザの Cd 耐性機構の概略

8. 材料と方法

8-1. 供試材料と培養条件

ヘビノネゴザ (*Athyrium yokoscense*) は、群馬県足尾町の足尾鉾山跡において 2001 年に採集した植物体からカルス誘導し、2001 年 9 月以来液体振とうにより 1/2MS で継代を続け、胞子体に再分化させたものを用いた (Yoshihara et al. 2005)。培地は、1/2x ムラシゲ・スクーグ (MS) 培地 (Murashige and Skoog, 1962) に 30g/L スクロース、0.3% ゲランガム、ビタミン溶液 (グリシン 2.0 mg/mL, ミオイノシト-ル 100.0 mg/mL, ニコチン酸 0.50 mg/mL, ピリドキシン塩酸塩 0.50 mg/mL, チアミン塩酸塩 0.10 mg/mL) を添加したものを用いた。25°C、14 h/10 h (明条件/暗条件) 環境下において培養した。

タバコはシャーレ上の 1/2MS 固体培地に播種し、発芽後 3~4 日程度の個体をヘビノネゴザと同条件で 1 週間程度育成し、その後 1/2MS 液体培地に移植して 1 週間程度育成した幼植物体を使用した。

8-2. 培養液の調製

終濃度が 0.1 μ M になるように Cd を添加した 1/4MS 培地を標準培養液とした。特定元素を除いた試験では、標準培養液から二価の必須金属元素である Ca、Mn、Zn、Fe、Cu、Co および Mg、の 7 つの元素をそれぞれ 1 つずつ除いた培養液を調製した。それぞれを Δ Ca、 Δ Mn、 Δ Zn、 Δ Fe、 Δ Cu、 Δ Co、 Δ Mg 培養液と名付けた (表 18)。Ca 濃度を変化させた試験では、標準培養液の Ca の終濃度のみを 0 mM、0.25 mM、0.5 mM、0.75 mM、1.0 mM および 1.25 mM に変更した培養液を調製した (表 19)。第三章以降の試験では、1/4MS に終濃度が 100 μ M となるように Cd を添加した培養液を用いた (+Cd)。Ca 欠乏に応答する遺伝子の発現応答を調べた試験では、1/4MS 培地から Ca を除いた試験区を作製した。1/4MS 培地から Ca のみを除いた培養液を -Ca、これに終濃度 100 μ M となるように Cd を添加した培養液を -Ca+Cd とした (表 20)。

表 18 特定金属を除いた培養液の組成

培養液名	濃度 (μM)							
	Ca	Mn	Co	Fe	Mg	Zn	Cu	Cd
Control	750	25	0.025	25	375	7.5	0.025	0.1
△Ca	0	25	0.025	25	375	7.5	0.025	0.1
△Mn	750	0	0.025	25	375	7.5	0.025	0.1
△Co	750	25	0	25	375	7.5	0.025	0.1
△Fe	750	25	0.025	0	375	7.5	0.025	0.1
△Mg	750	25	0.025	25	0	7.5	0.025	0.1
△Zn	750	25	0.025	25	375	0	0.025	0.1
△Cu	750	25	0.025	25	375	7.5	0	0.1

表 19 Ca 濃度を変化させた培養液の組成

培養液名	濃度 (μM)							
	Ca	Mn	Co	Fe	Mg	Zn	Cu	Cd
Control (Ca0.75mM)	750	25	0.025	25	375	7.5	0.025	0.1
Ca0mM	0	25	0.025	25	375	7.5	0.025	0.1
Ca0.25mM	250	25	0.025	25	375	7.5	0.025	0.1
Ca0.5mM	500	25	0.025	25	375	7.5	0.025	0.1
Ca1.0mM	1000	25	0.025	25	375	7.5	0.025	0.1
Ca1.25mM	1250	25	0.025	25	375	7.5	0.025	0.1

表 20 培養液の組成

培養液名	濃度 (μM)	
	Ca	Cd
1/4MS	750	0
-Ca	0	0
+Cd	750	100
-Ca+Cd	0	100

8-3. カドミウム量の測定

数か月培養したヘビノネゴザ胞子体と、ヘビノネゴザと同程度の大きさまで成長したタバコ (*N. tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) の Cd 蓄積量を測定した。タバコは、対照植物として用いた。標準培養液、特定金属を除いた培養液 (表 19)、Ca 濃度を変化させた培養液 (表 19) に 24 時間曝露した植物体を 3 つの部位 (地上部、根基部、根端部) に分け、各部位の Cd 量を誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES; S Optima 5300 DV, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) を用いて測定した。供試材は、65°C 下に 2 日間起き乾燥させ、重量測定の後には 1.5 ml の HNO₃ および H₂O₂ 溶液を添加することで灰化を行った。溶液の添加は各 2 回行った。灰化した試料を 1N の HCl 溶液 10 ml で溶解し、測定試料とした。

8-4. ポジトロンイメージング装置を用いた Cd の動態観察

観察に用いる ¹⁰⁷Cd は、Fujimaki et al. (2010) の方法に従って作製し、標準培養液および Δ Ca を調製した (表 18)。試験および解析は、Yoshihara et al. (2014) と同様の方法で実施した。

8-5. 活性酸素種およびチオール化合物の検出

CellROX Green Reagent (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) および mCBI (monochlorobimane ; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて、根の切断面における活性酸素種 (ROS) の発生部位とチオール化合物の蓄積部位を観察した。CellROX 染色は、添付のプロトコールに従い、mCBI 染色は、Kováčik et al. (2014) と同様の方法に従った。1/4MS および終濃度が 100 μM になるように Cd を添加した 1/4MS (+Cd) (表 20) に 24 時間曝露した植物

体の根を各染色試薬で処理を行い、卓上ハンドミクロトーム TH (Kenis, Osaka, Japan) を用いて 100 μm の厚さに切断し、正立顕微鏡 (ECLIPSE 80i; NIKON, Tokyo, Japan) で観察した。蛍光は超高圧水銀ランプ (NIKON, Tokyo, Japan) を用いて、CellROX による染色では励起波長 495 nm / 蛍光波長 590 nm、mCBI による染色では励起波長 394 nm / 蛍光波長 490 nm とした。各蛍光プローブを用いて染色した根の蛍光強度の測定をフリーフェアとしてウェブで公開されている画像解析ソフトの Image J 1.48 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて行った。

8-6. グルタチオンの定量

1/4MS および+Cd (表 20) に 24 時間曝露したサンプルを液体窒素中ですり潰し、100 mg あたり 1 ml の 0.2 N HCl を用いて抽出した (酸抽出液)。総グルタチオン濃度は、抽出に用いた HCl の 1/10 倍量の 0.2 M NaH_2PO_4 pH 5.6 を酸抽出液に加えてよく混ぜ、さらに同じく HCl の 4/5 倍量の 0.2 N NaOH を加えて中和したものを総グルタチオン濃度定量用測定液とした。さらに、総グルタチオン濃度定量用測定液 200 μL に 1 μL の VPD (2-vinylpyridine) を添加して還元型グルタチオンを除去し、12000 rpm で 5 分間の遠心分離操作を行って得られた上清を酸化型グルタチオン用濃度定量用測定液とした。グルタチオンおよび酸化型グルタチオンはプレートリーダーを用いたサイクリング法によって定量した (Queval and Noctor, 2007)。すなわち各物質の定量は、10 μL の抽出液あたり 180 μL のグルタチオン測定反応液を添加し、5 分後に 412 nm の吸光度の経時変化 (10 秒おきに 80 回測定) をプレートリーダー (Thermo Scientific™, Multiskan™ GO マイクロプレートスペクトロフォトメータ; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) で測定した。測定に用いたグルタチオン測定反応液は、終濃度が 100 mM の NaH_2PO_4 (pH 7.5)、5 mM の EDTA、0.5 mM の NADPH と DTNB、および 0.2 unit の Glutathione Reductase となるよう調整した。また、定量を行うため、還元型グルタチオンおよび還元型グルタチオン (WAKO, Osaka, Japan) を 100 μM になるよう溶解し、標品標準液として用いた。それぞれの標準液の希釈系列を 3 点作成し、検量線を作成した。各標準溶液の測定結果から作製した検量線を用いてサンプル中の総グルタチオンおよび酸化型グルタチオン濃度を算出した。

8-7. カスパリー線の検出

1/2MS 培地で培養したヘビノネゴザ胞子体の根を供試した。供試材は、FAA (3.7% formaldehyde, 5% acetic acid, 50% ethanol) に 24 時間以上浸漬した後、エ

タノールシリーズ（50、70、80、90、95、100%）にて置換を行った。置換した根はテクノビット 7100（Kulzer, Hanau, Germany）で包埋し、ミクロトーム PR-50（Yamato Kohki Industrial, Saitama, Japan）を用いて暑さ 20 μm の切片を作成した。得られた切片を 0.1%（w/v）New Fuchsin（Sigma Aldrich, St. Louis, USA）を用いて染色し、倒立顕微鏡（PHASE CONTRAST-2 ELWD 0.3, Nikon, Tokyo, Japan）観察を行った。

8-8. 有機酸の同定および定量

1/4MS および+Cd（表 20）にヘビネゴザとタバコを 14 日間に渡って曝露した。曝露開始から 0 時間、1 日、3 日、7 日、10 日、14 日後に植物体からすべての根を切断し、サンプルとした。ヘビネゴザでは、曝露開始から 6 時間後にもサンプルを得た。有機酸の抽出は、Johnson et al.（1996）の方法に従った。

有機酸の同定および検出は、ACQUITY UPLC システム（Waters, Massachusetts, USA）を用いて行った。分離用カラムは、ACQUITY UPLC® HSS T3（粒子径 1.8 μm 、内径 2.1 mm×長さ 150 mm; Waters, Massachusetts, USA）を用い、カラム温度は 30°C、圧力は 1 秒あたり約 12000 psi とした。また、検出器には PDA e λ （Waters, Massachusetts, USA）を用い、検出波長は 210 nm とした。溶離液には、5 mM NaH₂PO₄（pH 2.8）を用いた。各チューブに接続した溶液は、以下の通りである。すなわち、A1、A2 に 80%アセトニトリルを、B1 に超純水を、B2 に 5 mM NaH₂PO₄（pH 2.8）を、SW、WNW に 10%アセトニトリルを、SNW に 100%アセトニトリルを接続した。各溶液は、それぞれを調製後に減圧濾過を行い、不純物の除去を行った。有機酸の同定および定量を行うため、各有機酸試薬（クエン酸、酢酸ナトリウム、マレイン酸（WAKO, Osaka, Japan）および有機酸キット（Sigma-Aldrich, St. Louis, USA）内容である DL-イソクエン酸、コハク酸、シキミ酸、シュウ酸、L-乳酸、フィチン酸、フマル酸、D-リンゴ酸）を 10 mg/ml になるよう溶解し、標品標準液として用いた。なお、ピルビン酸（WAKO, Osaka, Japan）は、10 倍希釈液（約 125 mg/ml）を標品標準液として用いた。それぞれの標品標準液の希釈系列を 3 点作成し、検量線を作成した。各有機酸抽出液は、5 mM NaH₂PO₄（pH 2.8）で 10 倍希釈した後に UPLC 分析に用いた。なお、これらのサンプルは分析直前に 0.20 μm メンブレンフィルター（SLLGH13NK、Millex）でろ過し、Amber Screw top vial（12×32 mm; Waters, Massachusetts, USA）に充填したものを使用した。

8-9. ディジェネレートプライマーの設計

シロイヌナズナで塩ストレス、および Ca 欠乏時に発現量を変化させる遺伝子をヘビノネゴザから単離する標的遺伝子とした。標的遺伝子のアミノ酸配列と相同性が高いアミノ酸配列上位 50 種とシダ植物であるイヌカタヒバの相同性が高いアミノ酸上位 5 種を元にアライメントを作成した。アライメントは、**clustalw** (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) で作成した。アライメントの描画と編集は、**Gene Doc** (<https://genedoc.software.informer.com/2.7/>) を用いて行った。アミノ酸の保存性が高く、かつ 3' 末端 3 塩基が特異的配列となり、プライマーの通りが少なくなる配列を基にイノシンを用いてディジェネレートプライマーを設計した。なお、*ACA* 遺伝子は、*ACA* ファミリー全体でアミノ酸配列の相同性が高い部分を標的としたため、2 種類のプライマーを用いた。すなわち、約 1000 bp を増幅する *ACAall* プライマーで増幅が確認され、かつ、その増幅産物を鋳型としてさらに内側の約 400 bp を増幅する *ACAnested* プライマーでの増幅産物を塩基配列決定の材料とした。その他の遺伝子については、1 種類のプライマーでの増幅産物を塩基配列決定の材料とした。標的遺伝子の一覧、および設計したディジェネレートプライマーの配列を表 21 に示す。

表 21 ターゲット遺伝子と設計したディジェネレートプライマーの配列

遺伝子名	Gene Code	プライマー名	プライマー配列 (5'→3')	Tm 値	予測される増幅塩基数[bp]
<i>AyACT</i>	<i>At3g12110</i>	ACT-F	CACACTGGTGTGATGGTTGGNATGGG	61-63	460
		ACT-R	TAACCGCGTTCCGTCAGGATCTTCAT	60	
<i>AyGLR2.3</i>	<i>At2g24710</i>	GLR2.3-F	GAKGCNGYIGNTNGGIGAKA	52-66	300
		GLR2.3-R	AMCATIGTNGARAADATRAACCA	54-64	
<i>AyNHX4</i>	<i>At5g55470</i>	NHX-F	GGNGARGGIGTNGTIAAYGA	52-60	420
		NHX-R	CATRTANGAIARRTANGCCAT	50-60	
<i>AyCAX3</i>	<i>At3g51860</i>	CAX-F	GTITCNTTYTYTIACNGARCA	46-56	300
		CAX-R	TGNGWCSAIARYTGRTT	42-50	
<i>AyACA</i>	<i>At2g41560</i>	ACAall-F	GTNGGIATNAAYACIGARTGG	52-60	1020
	<i>BQ619447</i>	ACAall-R	CKRCAIGGRTCYTDDATNCC	52-64	
	<i>At3g63380</i>	ACAnested-F	GCNTGYGARACNATGGG	50-58	
	<i>At3g22910</i>	ACAnested-R	TCNSCIGCNCCYTTCCA	50-56	
<i>Ay6TMS</i>	<i>At2g18690</i>	6TMS-F	YTIGARGAYATDTGMCARGG	50-62	180
		6TMS-R	GAYTTRCANGTRAARTA	40-50	
<i>Ay6TMS</i>	<i>At4g21810</i>	6TMS-F	GAYTTYTNTTYCAYATGTT	48-58	180
		6TMS-R	RAAICCNARNARIACCCA	46-58	
<i>Ay6TMS</i>	<i>At5g35735</i>	6TMS-F	TIAAYGCNRTITSNTGGGG	48-56	300
		6TMS-R	YKRTGRTADAYITTCCARTA	44-60	
<i>Ay8TMS</i>	<i>At3g06170</i>	8RMS-F	GAYYTIACNCAYAAYTGGAA	46-58	300
		8TMS-R	TARCGIABRTAIGYRCGRTA	42-52	
<i>Ay9TMS</i>	<i>At4g21250</i>	9TMS-F	TIGGNATHGGNGGIGGNTGG	56-64	360
		9TMS-R	CAIGGIVBRYKRAAICCCAT	46-58	

8-10. RNA 抽出および cDNA 合成

ヘビノネゴザの RNA 抽出は、ヘビノネゴザのカルス、根、および葉から各抽出試薬およびキットを用いて添付のプロトコールに従って行った。抽出試薬を用いた手法では、ISOGEN (Life technologies, Massachusetts, USA)、TRIZOL (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を用いた。キットを用いた手法では、RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands)、RNA queous Micro Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)、NucleoSpin RNA Plant (MACGEREYNAGEL, Dueren, Germany)、RNA すいすい (株式会社リーゾ, Tsukuba, Japan) を用いた。DNase 処理は、1 μg 相当量の RNA を Deoxyribonuclease (RT Grade) for Heat Stop (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) もしくは Recombinant DNase (Takara, Kusatsu, Japan) を用いて反応温度 37°C もしくは 42°C で、反応時間 20 分の条件で行った。反応産物は、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, Osaka, Japan) による cDNA 合成に供した。反応には RNA 溶液を 500 ng 相当量用い、Rever Tra Ace (TOYOBO, Osaka, Japan) 1.0 μL 、RNase Inhibitor (TOYOBO, Osaka, Japan) 0.5 μL 、Oligo dT20 (TOYOBO, Osaka, Japan) 0.5 μL 、dNTP Mixture (TOYOBO, Osaka, Japan) 2.0 μL 、5 \times Rever Tra Ace Buffer (TOYOBO, Osaka, Japan) 4 μL を混合し、最終液量を 20 μL とし、42°C で 60 分の反応を行った。その後、99°C で 5 分、4°C で 5 分の処理を行った。また、Rever Tra Ace を添加せずに cDNA 合成反応を行った反応液をネガティブコントロールとして用いた。

8-11. ヘビノネゴザのゲノム DNA の抽出

ヘビノネゴザの羽片 1 枚を刻んでエッペンドルフチューブに入れ、これにオート SK ミル (Tokken Inc., Kashiwa, Japan) 用のクラッシャーを投入し、液体窒素で冷却した後にオート SK ミルで 1600 rpm、30 秒間振盪を 5 回繰り返して粉碎した。これに 700 μL の植物用細胞溶解試薬 (1 M Tris-HCl (pH 8.0)、5 M NaCl、0.5 M EDTA、10% SDS) を加えて混合し、65°C で 1 時間静置した。その後クロロホルムを 600 μL 加えて 20 分振盪し、12000 rpm、室温、5 分で遠心分離した。水層を 500 μL 吸い取り、これに 500 μL のイソプロパノールを加えて混合した。10000 rpm、室温、5 分間で遠心分離し、得られた沈殿に 900 μL の冷 70% エタノールを加え、これを 12000 rpm、室温、2 分間で遠心分離した。上清を捨て沈殿を減圧乾燥し、沈殿物を超純水 50 μL に溶解したものを DNA 溶液とした。

8-12. ディジェネレート PCR

ディジェネレートプライマーを用いた PCR は、ヘビノネゴザから抽出した DNA あるいは RNA から調製した cDNA を鋳型として Go taq (Promega, Madison, USA) を用いて行った。反応液は、Go taq を 4.5 μl 、鋳型を 1.0 μl 、100 μM の各プライマーを 0.5 μl ずつを混合し、最終液量が 10 μl となるように調製した。PCR 用サーマルサイクラーのプログラムは、1 サイクルを 94°C で 5

分、その後 94°Cを 30 秒、アニール温度を 30 秒、72°Cを 30 秒、として 30 サイクル行い、さらに最後に 3'末端保護のために 72°Cで 5 分間保持した。なお、アニール温度は、45.0°C、48.0°C、51.6°C、55.2°Cと変化させ、適切な温度を選択した。増幅がみられたものでは、最終液量が 100 µl となるよう反応液を再調製し、増幅産物の精製を行った。本条件での PCR の増幅産物が微量であった際に、サーマルサイクラーの条件として、以下に示すステップアッププログラムを行った。1 サイクルを 94°Cで 5 分、その後 94°Cを 30 秒、45°Cを 30 秒、72°Cを 30 秒、として 5 サイクル行い、さらに 94°Cを 30 秒、53°Cを 30 秒、72°Cを 30 秒、として 30 サイクル行い、最後に 3'末端保護のために 72°Cを 5 分間保持した。

8-13. サブクローニング

ディジェネレート PCR によって得られた産物を UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO BIO, California, USA) を用いて精製した。精製した PCR 産物をエタノール沈殿により濃縮し、pGEM-T Easy Vector SystemI (Promega, Madison, USA) を用いて、添付のプロトコールに従い大腸菌に遺伝子導入を行った。遺伝子導入を行った大腸菌は、アンピシリン/X-Gal/IPTG を含む LB 培地を用いて 37°C、一晩増殖させて、コロニー形成を行った。LB 培地の組成は、Bacto pepton を 10.0 mg/L、Yeast Extract を 5.0 mg/L、NaCl を 10.0 mg/L、Agarose を 15.0 mg/L、Ampicillin を 25.0 mg/L、X-Gal を 40.0 mg/L、IPTG を 0.1 mM とした。コロニーを形成した大腸菌のうち、白色を呈したものを選抜した。選抜したコロニーは、直接 PCR 法により導入した遺伝子の確認を行った。反応は Go taq (Promega, Madison, USA) を用いて行い、その組成は Go taq を 5.0 µl、100 µM の各プライマーを 0.05 µl ずつとし、最終液量を 10 µl とした。用いたプライマー配列を表 22 に示す。また、この PCR 産物をシークエンスに用いた場合の組成は、Go taq を 5.0 µl、100 µM の各プライマーを 0.01 µl ずつとし、最終液量を 10 µl とした。導入確認された大腸菌のプラスミド抽出には、QIAprep Miniprep spin column (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いて、添付のプロトコールに従い行った。

表 22 M13 の配列

プライマー配列 (5'→3')	
M13-Fw :	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13-Rv :	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

8-14. 塩基配列の決定

BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて、添付のプロトコールに従い導入確認された大腸菌のプラスミドの塩基配列の決定を行った。大腸菌の遺伝子導入確認時に行ったコロニー PCR 産物から塩基配列を決定する場合には、ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いてプライマーを除去した後に塩基配列の

決定を行った。塩基配列の決定に用いたプライマーは、導入確認を行った際のプライマーと同じものを用いた (表 22)。

8-15. 決定した塩基配列の解析

PCR 産物から得られた塩基配列は、DNA シーケンスアセンブルソフトウェア SEQUENCHER V5.0 (日立ソリューションズ, Tokyo, Japan) を用いて塩基配列の相同性解析を行った。得られた塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、そのアミノ酸配列とシロイヌナズナ、タバコもしくはイネ、およびイヌカタヒバの各遺伝子と対応するアミノ酸配列でアライメントを作成した。

PCR 産物から得られた塩基配列の相同遺伝子検索は、Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて行い、シロイヌナズナの相同遺伝子検索は、TAIR BLAST 2.2.8 (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/Blast/TAIRblast.pl>) を用いて行った。Blast のプログラムは、Blastx とし、データベースは Standard (1)、Non-redundant protein sequences (nr) で行った。TAIR BLAST 2.2.8 のプログラムは BLASTP とし、データセットは TAIR10 Transcripts (-introns,+UTRs) (DNA) で行った。

AyACA のアミノ酸分子系統樹の作成は、PCR 産物から得られた塩基配列と、シロイヌナズナ、イヌカタヒバ、およびヒメツリカネゴケの対応する部分配列 (Pedersen et al., 2012) を元に clustalw (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) を用いて近隣結合法 (NJ 法) により行った。NPF トランスポーターのアミノ酸分子系統樹の作成は、RNA-seq によって得られた配列と、シロイヌナズナの配列 (Léran et al., 2014) を元に同様の方法で作成した。アミノ酸分子系統樹の描画は、tree view (<https://treeview.software.informer.com/>) を用いた。

8-16. リアルタイム PCR

調製した RNA を用いて cDNA を合成した。*AyACA* および *AyDER* では、これを鋳型として、SYBR Premix Ex TaqII (Takara, Kusatsu, Japan) を、NPF およびカタラーゼでは Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて発現量の測定を行った。用いたプライマーを表 23 に示す。反応は、QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いた。反応条件は、ポリメラーゼ反応として 94°C を 10 分保持した後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、77°C 30 秒を 40 サイクル行った。発現量は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を用いて相対的に評価した。アクチンは、NPF とカタラーゼの発現量標準化のために用いた。

表 23 リアルタイム PCR に用いたプライマー配列

遺伝子名	プライマー名	プライマー配列 (5'→3')
<i>AyACT</i>	AyACT-qF :	CCATCCAGGCTGTGCTATCC
	AyACT-qR :	CACGACCTGCAAGATCCAGA
<i>AyACA-1</i>	AyACA-1-qF :	CTGGGCTTAGAGTTGGGAAT
	AyACA-1-qR :	ATGCACCTTGCCATTATCTGCTAC
<i>AyACA-3</i>	AyACA-3-qF :	GACGAAGAGCCAGAAGTGATAG
	AyACA-3-qR :	ACTCCTGCCCGTTTCTTGATG
<i>AyACA-4</i>	AyACA-4-qF :	GGGAAAAGCCATCTGTCTGA
	AyACA-4-qR :	CTGGGCACAAAGACACTTCC
<i>AyACA-5</i>	AyACA-5-qF :	GAGCTCCAGAATTTTCCCGA
	AyACA-5-qR :	AAACTTCAGGCTCTCCTGCAC
<i>AyDER</i>	AyDER-qF :	ATTGCAAATTGCTGGAGGAG
	AyDER-qR :	GCCAAGGATTCAGACACCAG
<i>NPF</i> (<i>Athyo41034c000010</i>)	AyNPF-F :	CGAGGCGACACTCTACATGA
	AyNPF-R :	AGAACCTCGTGCTTCCAAGA
カタラーゼ (<i>Athyo6890c000010</i>)	AyCAT-F :	GAGATGTGGAGGGTTCTGGA
	AyCAT-R :	AACGGCCTCTTCAACAGAGA

8-17. PCR による cDNA に含まれるゲノム DNA 由来の不純物の検出

DNase 処理および逆転写反応の有無が異なる 4 種の cDNA を供試した。コントロールはゲノム DNA を用いた。プライマーは、アクチンのエキソンおよびイントロン配列に対応するプライマーを用いた (表 24)。PCR の反応溶液は、0.5 μL の DNA 溶液または cDNA 溶液に 0.5 μL、10×Blend-Taq Buffer

(TOYOBO, Osaka, Japan) 1.0 μL、dNTP Mixture (TOYOBO, Osaka, Japan) 1.0 μL、Blend-Taq DNA polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan) 0.1 μL、10 μM のプライマーを 0.5 μL ずつを加えて混合し、最終液量が 10 μL となるように調製した。PCR は、2720 Thermal cycler (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて、1 サイクルを 94°C で 5 分、その後 94°C を 30 秒、55°C を 30 秒、72°C を 30 秒として 30 サイクル行い、最後に 3' 末端保護のために 72°C を 7 分間保持した。

表 24 アクチンのエキソンおよびイントロン配列に対応するプライマー配列

遺伝子名	プライマー名	プライマー配列 (5'→3')
<i>AyACT</i>	エキソンプライマー-Fw	CCATCCAGGCTGTGCTATCC
	エキソンプライマー-Rv	CACGACCTGCAAGATCCAGA
	イントロンプライマー①-Fw	CAGTAGCAATTGGAGGAAGGA
	イントロンプライマー①-Rv	CATTGTCCCCTTCAAGCCA
	イントロンプライマー②-Fw	GGTGCAGATGATTGGGTTTCT
	イントロンプライマー②-Rv	CCCACTTCAAGCCATGTCATC

8-18. RNA シーケンス

1/4MS および+Cd (表 20) に 24 時間曝露したヘビノネゴザの根と地上部から RNeasy plant mini kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いてトータル RNA を抽出した。抽出した RNA は、NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) と Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, California, USA) を用いて精製度を確認した。RNA ライブラリーは、Truseq RNA library Preparation Kit (Illumina, California, USA) を用いて作成し、Hiseq2000 sequencer (Illumina, California, USA) により 100 bp のペアエンドを得た。生データは、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) にアクセッションナンバーDRA008924 にて登録された。

8-19. *De novo* アセンブリと ORF の妥当性確認

得られたシーケンス生データは、FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) と Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014) を用いて解析を行った。Trimmomatic v0.36 は、パラメータを LEADING, 20; TRAILING, 20; SLIDINGWINDOW, 4:15; MINLEN, 36 に設定して行った。トリミングされた配列のアセンブルは、Trinity (v2.4.0) (Grabherr et al., 2013) のパラメータを--seqType fq --SS_lib_type RF に設定して得られた配列を元に PCAP (Huang et al., 2003) を-y 10、-t 80 の設定にて行った。得られたデータセットを相同性 80% で同一とみなし、CD-HIT-EST (Fu et al., 2012) でグループ分けを行った。クラスター内で最も長い配列を用いて、タンパク質をコードしている領域を TransDecoder v3.0.1 (<https://transdecoder.github.io/>) によって決定した。配列比較は BLAST search (v2.3.0+) から得られた UniProt データベースと HMMER package (Johnson et al., 2010) 中の hmmscan プログラムから得られた Pfam-A データベースを用いた。タンパク質をコードしている転写配列は、以降のリファレンス配列データセットとして用いた。リファレンス配列の妥当性については、embryophyta_odb9 データベースを用いて、パラメータ-e 1e-05 -m tran として BUSCO v3.0.2 (Simão et al., 2015) を行った。転写産物のオルソログについては、BLASTP (-e 1e-5 -F F -m 8) に基づいて OrthoMCL1.4 (--mode 4) 解析を行い、シロイヌナズナ (phytozome)、ゼニゴケ (<http://marchantia.info/download/>)、イヌカタヒバ (ensemble plants) と共通して保持しているオルソログを調べた。

8-20. トランスクリプトーム結果に基づく発現量の解析

トリミングされた RNA のリードは、BWA 0.7.17-r1188 program (Li and Durbin, 2010) をパラメータ mem -M としてリファレンス配列へマッピングした。発現量は、reads per million mapped reads (RPM) に基づいて featureCounts program (Liao et al., 2014) を用いて計算した。3 反復のサンプルすべてで RPM ≥ 1 を示した転写物は有意に発現しているとした。発現量が異なる転写物につ

いては、R 中の DESeq2 program (Love et al., 2014) を用いて、fold change ≥ 2 、 $q < 0.01$ を満たす転写物として決定した。

8-21. Gene Ontology 解析 (GO 解析)

GO アノテーションに基づいて、根と地上部のサンプル間で発現が異なる転写産物の解析を行った。フィッシャーの正確確率検定を使用して、ベンジャミニニホッホベルグ法に基づく偽発見率 < 0.05 で解析を行った (The Gene Ontology Consortium, 2014)。

8-22. *AyNramp5a* 発現用プラスミドの構築

AyNramp5a 遺伝子配列の情報を元に、3'末端に 6×His タグを付加した遺伝子を人工合成した (図 6-3)。合成した遺伝子 (*AyNramp5a*-6×His) を鋳型として、3'末端に attB1、attB2 配列を付加した PCR プライマーを用いてこの領域を増幅した (表 25)。増幅した DNA 断片は、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) を用いて精製した。

増幅した断片は BP 反応により pDONR-207 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) へ挿入した。BP 反応は、PCR 産物 5.0 μL に、pDONR207DNA 溶液を 1.0 μL 、BP clonase (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) 2.0 μL 、MilliQ 水 2.0 μL を加えて混合し、25°C で 60 分間保持することで行った。次に LR 反応を行って pDONR-207 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) へ挿入した *AyNramp5* を pGWB2 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) へ乗せ換えた。LR 反応は、*AyNramp5a* が導入された pDoner207 プラスミド溶液 3.0 μL (150 ng 相当量) に、pGWB2DNA 溶液 1.0 μL と LR clonase (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) 2 μL および MilliQ 水 4 μL を加えて混合し、25°C で 60 分間保持することで行った (図 6-4)。

表 25 *AyNramp5* の増幅に用いたプライマー

プライマー名	プライマー配列 (5'→3')
attB1 – <i>AyNramp5</i> – Fw	GGGGACCACTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCAT GGGGGAGCTGTTACTATATCAACTCAG
attB2 – <i>AyNramp5</i> – Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTC AATGGTGATGATGGTGGTGAATCCGATTGA

8-23. イネカサの形質転換

イネカサの形質転換は、アグロバクテリウム法を用いた (Hiei et al., 1994)。日本晴 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) の玄米を滅菌し、N6D 固体培地に胚の部分を上にして置床し、28°C の明所で培養してカサを誘導した。N6D 固体培地は、Sucrose を 30 g、CHU (N6) Basal Salt Mixture (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) を 3.98 g、Bacto Casamino Acids を 900 mg、L-proline を 2878 mg、2,4-dichlorophenoxyacetic acid を 2 mg、N6-vitamin (200×) を 5.0 ml、ゲルライト (WAKO,

Osaka, Japan) を 4.0 mg を混合、1000 ml ヘメスアップして調製した。N6-vitamin (200×) は、グリシン: 40 mg/l; ニコチン酸: 10 mg/l; ピリドキシン HCl: 10 mg/l; 非アミン HCl: 20 mg/l; ミオイノシトール: 2.0 g/l の混合液を用いた。使用直前に、必要に応じてクラフォラン (Sanofi S.A., Paris, France; 250 mg/mL) を 2.0 ml、Hygromycin B (WAKO, Osaka, Japan; 50 mg/mL) を 1.0 ml 添加した。アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* EHA105) の形質転換はエレクトロポレーションにより行った。形質転換したアグロバクテリウムは AAM+アセトシリンゴン溶液 30 mL に懸濁し、イネカルスと混和した後に 2N6-AS 固体培地 (Hiei et al., 1994) の濾紙上に置床し、25°C, 暗所で 3 日間共存培養した。AAM+アセトシリンゴン溶液は、AAM 培地用ストック溶液 (Hiei et al., 1994) にアセトシリンゴン (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) を 30 mg/L となるように加えることで調整した。形質転換カルスを選抜は、クラフォランとハイグロマイシンを含む N6D 固体培地に置床し、28°C、明所で培養することで行った。

形質転換カルスの遺伝子導入検定として、RNA を抽出し、調製した cDNA を鋳型として PCR を行った。PCR に用いたプライマーを表 26 に示す。

表 26 カルスの導入検定に用いたプライマー

プライマー名	プライマー配列 (5'→3')
Seq-Nramp5-Fw	TTAATGGCGATGGTGCGACT
Seq-Nramp5-Rv	CCCGGTAAGCGGATTCTTGT

8-24. 植物体の Cd 投与と Cd 取り込み量の分析

金属イオンの含量の分析は東京電機大学北千住キャンパスの保倉研究室にて行った。R2 液体培地 (Ohira et al., 1973) に、CdCl₂ を終濃度 10 μM または 100 μM となるように加えた培養液を調製し、Cd の取り込み量を測定するための試験区とした。WT と形質転換カルスのそれぞれ 10 個体を各試験区で 24 時間振盪培養した。各試験区で振盪培養したイネカルスを洗浄し、凍結乾燥機 (FDU-12AS; EYELA, Tokyo, Japan) を用いて 24 時間かけて凍結乾燥を行った。この試料をミキサーミル (Verder Scientific, Tokyo, Japan) で破碎し、破碎したサンプル 30 mg を Atlas 15T manual hydraulic press (SPECAC, Kent, England) を用いて圧縮して、10 mm 径の錠剤に成型した。この錠剤を用いて試料中に含まれる元素の量を蛍光 X 線解析装置によって測定した。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただきました東京理科大学 基礎工学部 生物工学科の島田浩章教授をはじめ、寺村浩助教、柳澤俊輔氏、北崎真由氏、涌井裕子氏、植物体の管理と実験を行ってくれた鎌田まなか氏、島田研究室の皆さまに感謝申し上げます。一般財団法人 電力中央研究所の吉原利一上席研究員、バイオインフォマティクス分野にて解析とご助言いただきました理化学研究所 バイオ生産情報研究チームの持田恵一博士、井上小槇氏（現：タカラバイオ）、分析分野にてご協力いただきました東京電機大学 工学部 環境科学科の保倉明子教授、山本悠暉氏にも重ねて感謝申し上げます。何度も暖かい激励をくださった佐賀大学 農学部の後藤文之教授、一般財団法人 電力中央研究所の庄子和博上席研究員、北海道大学 農学部の北崎一義助教にも深く感謝申し上げます。また、社会人ドクターとしての挑戦をご快諾してくださった株式会社住化分析センターの皆様にも感謝いたします。書ききれないほどの多くの方に支えられました。応援の気持ちをくださったすべての方へ、感謝申し上げます。

引用文献

- Ahmadi, H., Corso, M., Weber, M., Verbruggen, N., and Clemens, S. (2018) CAX1 suppressed Cd-induced generation of reactive oxygen species in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ.* **41**, 2435–2448.
- Andresen, E., and Küpper, H. (2013) Cadmium toxicity in plants. *In* Cadmium: from Toxicity to Essentiality (eds.: Sigel, A., Sigel, H., and Sigel, R. K. O.), pp. 395–413. Springer, Dordrecht.
- Annadurai, R. S., Neethiraj, R., Jayakumar, V., Damodaran, A. C., Rao, S. N., Katta, M. A. V. S. K., Gopinathan, S., Sarma, S. P., Senthilkumar, V., Niranjana, V., Gopinath, A., Mugasimangalam, R. C. (2013) *De novo* transcriptome assembly (NGS) of *Curcuma Longa* L. rhizome reveals novel transcripts related to anticancer and antimalarial terpenoids. *PLOS ONE* **8** (2), 1-11.
- Axelsen, K. B., and Palmgren, M. G. (2001) Inventory of the Superfamily of P-Type Ion Pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 696-706.
- Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Reeves, R. D., and Smith, J. A. C. (2000) Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils. *In* Phytoremediation of Contaminated Soil and Water (eds.: Terry, N., and Bañuelos, G.), pp. 85–107. Lewis, Boca Raton, FL.
- Balestri, M., Ceccarini, A., Forino, L. M. C., Zelko, I., Martinka, M., Lux, A., and Castiglione, M. R. (2014) Cadmium uptake, localization and stress-induced morphogenic response in the fern *Pteris vittata*. *Planta* **239**, 1055–1064.
- Banks, J. A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J. L., Gribskov, M., dePamphilis, C., Albert, V. A., Aono, N., Aoyama, T., Ambrose, B. A., et al. (2011) The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* **332**, 960–963.
- Barlow, P. W. (1969) Differences in response to colchicine by differentiating xylem cells in roots of *Pisum*. *Protoplasma* **68**, 79–83.
- Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M. R., Boutry, M., Palmgren, M. G., Gribskov, M., Harper, J. F., and Axelsen, K. B. (2003) Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* **132**, 618-628.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120.
- Bolte S., Brown S., Satiat-Jeunemaitre B. (2004) The N-myristoylated Rab-GTPase m-Rab_{mc} is involved in post-Golgi trafficking events to the lytic vacuole in plant cells. *J. Cell Science* **117**, 943-954.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H., and Ferjini, E. E. (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* **127**, 139-147.
- Chen, F., Mackey, A. J., Stoeckert, C. J., Jr., and Roos, D. S. (2006) OrthoMCL-DB: querying a comprehensive multi-species collection of ortholog groups. *Nucl. Acids Res.* **34**, D363–D368.
- Cho, U. H. and Seo, N. H. (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* **168**(1), 113-120.
- Clemens, S., Antosiewicz, D. M., Ward, J. M., Schachtman, D. P., and Schroeder, J. I. (1998) The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12043–12048.

- Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**, 475-486.
- Clemens, S. (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**, 1707–1719.
- Cobbett Christopher S. (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* **123(3)**, 825-832.
- Connolly, E. L., Fett, J. P., and Guerinot, M. L. (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14**, 1347–1357.
- Corratgé-Faillie, C., and Lacombe, B. (2017) Substrate (un)specificity of Arabidopsis NRT1/PTR FAMILY (NPF) protein. *J. Exp. Bot.*, **68 (12)**, 3107–3113.
- Delhaiza, E., Ryan, P. R., and Randall, P. J. (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root pices). *Plant Physiol.* **103 (3)**, 695-702.
- Filek, M., Keskinen, R., Hartikainen, H., Szarejko, I., Janiak, A., Miszalski, Z., Golda, A. (2008) The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. *J. Plant Physiol.* **165 (8)**, 833-844.
- Fu, L., Niu, B., Zhuy, Z., Wu, S., and Li, W. (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **28**, 3150–3152.
- Fujimaki S. (2007) The positron-emitting tracer imaging system (PETIS), a most-advanced imaging tool for plant physiology. *ITE Letters on Batteries, New Technol. Med.* **8**, 58–67.
- Fujimaki S., Suzui N., Ishioka N.S., Kawachi N., Ito S., Chino M. & Nakamura S. (2010) Tracing cadmium from culture to spikelet, non-invasive imaging and quantitative characterization of absorption, transport, and accumulation of cadmium in an intact rice plant. *Plant Physiol.* **152**, 1796–1806.
- Gallego, S. M., Benavides, M. P., and Tomaro, M. L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* **121**, 151-159
- Geisler, M., Axelsen, K. B., Harper, J. F., and Palmgren, M. G. (2000) Molecular aspects of higher plant P-type Ca²⁺-ATPases. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes* **1465**, 52-78
- Goel, A., Taj, G., Pandey, D., Gupta, S., and Kumar, A. (2011) Genome-wide comparative in silico analysis of Calcium transporters of rice and Sorghum. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **9(4-5)**, 138-150.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., et al. (2013) Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-seq data. *Nat. Biotechnol.* **29**, 644–652.
- Ghangal, R., Chaudhary, S., Jain, M., Purty, R. S., and Sharma, P. C. (2013) Optimization of de novo short read assembly of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) transcriptome. *PLOS ONE* **8 (8)**, 1-7.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E. L., and Zenk, M. H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteinyl dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6838-6842.
- Halperin, S. J., Kochian, L. V., and Lynch, J. P. (1997) Salinity stress inhibits calcium loading into the xylem of excised berley (*Hordeum vulgare*) roots. *New Phytologist*

135, 419-427.

- He, F., Liu, Q., Zheng, L., Cui, Y., Shen, Z., and Zheng, L. (2015) RNA-seq analysis of rice roots reveals the involvement of post-transcriptional regulation in response to cadmium stress. *Front. Plant Sci.* **6**, 1136.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **6** (2), 271-282.
- 程島裕貴 (2007) 植物におけるカドミウム耐性メカニズムの解析 東京理科大学
本間慎、積田孝一、白田和人 (1977) 重金属汚染地における植生と植物による重金属の吸収蓄積について *Environment and Human Survival* 103-110
- Howden, R., Andersen, C. R., Goldsbrough, P. B., and Cobbett, C. S. (1995) A Cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107** (4), 1067-1073.
- Huang, X., Wang, J., Aluru, S., Yang, S.-P., and Hillier, L. (2003) PCAP: a whole-genome assembly program. *Genome Res.* **13**, 2164–2170.
- Ishikawa, L. S., Ishimaru, Y., Igura, M., Kuramata, M., Abe, T., Senoura, T., Hase, Y., Arao, T., Nishizawa, N. K., and Nakanishi, H. (2012) Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 19166–19171.
- Ishimaru, Y., Takahashi, R., Bashir, K., Shimo, H., Senoura, T., Sugimoto, K., Ono, K., Yano, M., Ishikawa, S., Arao, T., Nakanishi, H., and Nishizawa, N. K. (2012) Characterizing the role of rice NRAMP5 in Manganese, Iron and Cadmium transport. *Sci Rep* **2** :286
- Johnson, J. F., Allan, D. L., Vance, C. P., and Weiblen, G. (1996) Root carbon dioxide fixation by phosphorus-deficient *Lupinus albus*. *Plant Physiol.* **112**, 19-30
- Johnson, S., Eddy, S. R., and Portugaly, E. (2010) Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure. *BMC Bioinformatics* **11**, 431.
- Kessler, A. and Brand, M. D. (1995) The mechanism of the stimulation of state 4 respiration by cadmium in potato tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* **33**, 519-528
- Kováčik, J., Babula, P., Hedbavny, J., and Švec, P. (2014) Manganese-induced oxidative stress in two ontogenetic stages of chamomile and amelioration by nitric oxide. *Plant Sci.* **215–216**, 1-10.
- Lasat, M. M., Barker, A. J. M., Kochian L.V. (1996) Physiological characterization of root Zn^{2+} absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and non-accumulator species of *Thalasspi*. *Plant Physiol.* **112**, 1715-1722
- Lee, S. M., Kim, H. S., Han, H. J., Moon, B. C., Kim, C. Y., Harper, J. F., Chung, W. S. (2007) Identification of a calmodulin-regulated autoinhibited Ca^{2+} -ATPase (ACA11) that is localized to vacuole membranes in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **581**, 3943-3949.
- Léran, S., Varala, K., Boyer, J. C. et al. (2014) A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci.* **19**, 5–9.
- Lersten, N. R. (1997) Occurrence of endodermis with a casparian strip in stem and leaf. *Bot. Rev.* **63**, 265–272.
- Li, H., and Durbin, R. (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589–595.
- Li, J.-Y., Fu, Y.-L., Pike, S. M., Bao, J., Tian, W., Zhang, Y., Chen, C.-Z., Zhang, Y., Li, H.-M., Huang, J., et al. (2010) The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.8 functions

- in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell* **22**, 1633–1646.
- Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014) FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930.
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550.
- Lux, A., Martinka, M., Vaculík, M., and White, P. J. (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J. Exp. Bot.* **62**, 21–37.
- Ma, J. F., Zheng, S. J., and Matsumoto, H. (1997a) Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.* **38** (9), 1019-1025.
- Ma, J. F., Zheng, S. J., Matsumoto, H. and Hiradate, S. (1997b) Detoxifying Aluminium with buckwheat. *Nature* **390**, 569–570.
- Maathuis, F. J. M. (2006) The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *Exp. Bot.* **57**, 1137-1147.
- Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K., and Amrhein, N. (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate ‘export’ pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* **364**, 247-249.
- McAinsh, M. R., and Pittman, J. K. (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytologist* **181**, 275-294.
- Mendoza-Cozatl, D. G., Jobe, T. O., Hauser, F., and Schroeder, J. I. (2011) Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Curr. Opinion Plant Biol.* **14** (5), 554-562
- Migeon, A., Blaudez, D., Wilkins, O., Montanini, B., Campbell, M. M., Richaud, P., Thomine, S., Chalot, M. (2010) Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3763–3784.
- Misra, S., and Gedamu, L. (1989) Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. *Theor. Appl. Genet.* **78**, 161–168.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**, 405–410.
- Miyadate, H., Adachi, S., Hiraizumi, A., Tezuka, K., Nakazawa, N., Kawamoto, T., Katou, K., Kodama, I., Sakurai, K., Takahashi, H., et al. (2011) OsHMA3, a P_{1B}-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. *New Phytol.* **189**, 190–199.
- Morishita, T., and Boratynski, J. K. (1992) Accumulation of cadmium and other metals in organs of plants growing around metal smelters in Japan. *Soil Sci. Plant Nutri.* **38**, 781–785.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.
- Nakanishi, H., Ogawa, I., Ishimaru, Y., Mori, S., and Nishizawa, N. K. (2006) Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺ transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice. *Soil Sci. Plant Nutri.* **52**, 464–46.
- Nishizono, H., Ichikawa, H., Suzuki, S., and Ishii, F. (1987) The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*. *Plant Soil* **101**, 15–20.
- Nishizono Hiromi, Watanabe Takemasa, Orii Tokiko, Suzuki Shizuo (1989) Suppression of Inhibitory Effects of Copper on Enzymatic Activities by Copper-Binding Substances from *Athyrium yokoscense* Assayed in vitro. *Plant Cell Physiol.* **30** (4): 565-569

- Ohira, K., Ojima, K., and Fujiwara A. (1973) Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant and Cell Physiol.* **14**, 1113-1121.
- Ortiz, D. F., Kreppel, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G., and Ow, D. W. (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J.* **11**, 3491–3499.
- Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Lo Russo, A., Gaeta, L. M., Tozzi, G., and Federici, G. (2003) Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin. Chem.* **47** (8), 1467–1469.
- Pedersen, C. N. S., Axelsen, K. B., Harper, J. F., and Palmgren, M. G. (2012) Evolution of plant P-type ATPases. *Plant Sci.* **2012** (3), 1-19
- Pichorner, H., Korori, S. A. A., Thur, A., and Ebermann, R. (1993) The two and the four electron transfer to molecular oxygen-mediated by plant peroxidase in the presence of thiol. *Biochem. Physiol.* 131-136.
- Pietrini, F., Iannelli, M. A., Pasqualini, S., and Massacci, A. (2003) Interaction of Cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiol.* **133** (2), 829-837.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., and Casini, A. F. (2003) The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* **66**(8), 1499-1503.
- Queval, G., Noctor, G. (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal. Biochem.* **363** (1), 58-69.
- Schutzendubel, A., Schwanz, P., Teichman T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L., and Polle, A. (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiol.* **127** (3), 887-898.
- Shaw, B. P. (1995) Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biologia Plantarum* **37**, 587-596.
- Shen, Z. G., Zhao, F. J., and McGrath, S. P. (1997) Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *thlaspiochroleucum*. *Plant cell Environ.* **20**, 898-906.
- Shukla, D., Huda, K. M. K., Banu, M. S. A., Gill, S. S., Tuteja, R., and Tuteja, N. (2014) OsACA6, a P-type 2B Ca²⁺ ATPase functions in cadmium stress tolerance in tobacco by reducing the oxidative stress load. *Planta* **240**, 809–824.
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., and Zdobnov, E. M. (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* **31**, 3210–3212.
- Steudle, E., and Frensch, J. (1996) Water transport in plants: role of the apoplast. *Plant Soil* **187**, 67–79.
- Sun, J., Cui, J., Luo, C., Gao, L., Chen, Y., and Shen, Z. (2013) Contribution of Cell Walls, Nonprotein Thiols, and organic acids to Cadmium resistance in two cabbage varieties. *Arch. Environ. Contamination Toxicol.* **64**, 243-252.
- Takemoto, T., Nomoto. K., Fushiya, S., Ouchi, R., Kusano, G., Hikino, H., Takagi, S., Matsuura, Y., and Kakudo, M. (1979) Structure of Mugineic acid, a new amino acid possessing an Iron-chelating activity from roots washings of water-cultured *Hordeum vulgare* L. *Proceedings of the Japan Academy* **54**, ser. B 469-473.
- Tennstedt, P., Peisker, D., Bottcher, C., Trampczynska, A., and Clemens, S. (2009)

- Phytochelatins synthesis is essential for the detoxification of excess Zinc and contributes significantly to the accumulation of Zinc. *Plant Physiol.* **149** (2), 938-948.
- The Gene Ontology Consortium (2015) Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucl. Acid Res.* **43**, D1049–D1056.
- Ueno, D., Kono, I., Yokosho, K., Ando, T., Yano, M., and Ma, J. F. (2009) A major quantitative trait locus controlling cadmium translocation in rice (*Oryza sativa*) *New Phytologist* **182**, 644–653.
- Uraguchi, S., Kamiya, T., Sakamoto, T., Kasai, K., Sato, Y., Nagamura, Y., Yoshida, A., Kyojuka, J., Ishikawa, S., and Fujiwara, T. (2011) Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 20959-20964.
- Van Fleet, D. S. (1961) Histochemistry and function of the endodermis. *Bot. Rev.* **27**, 165–220.
- Van, T. K., Kang, Y., Fukui, T., Sakurai, K., Iwasaki, K., Aikawa, Y., and Phuong, M. N. (2006) Arsenic and heavy metal accumulation by *Athyrium yokoscense* from contaminated soil. *Soil Sci. Plant Nutri.* **52**, 701–710.
- Vermeer, J. E. M., von Wangenheim, D., Barberon, M., Lee, Y., Stelzer, E. H. K., Maizel, A., and Geldner, N. (2014) A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in *Arabidopsis*. *Science* **343**, 178–183.
- Vogeli-Lange, R., and Wagner, G. J. (1990) Subcellular Localization of Cadmium and Cadmium-Binding Peptides in Tobacco Leaves. *Plant Physiology* **92** (4), 1086-1093.
- Vogeli-Lange, R., and Wagner, G. J. (1996) Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Sci.* **114**, 11-18.
- White, P. J., and Broadley, M. R. (2003) Calcium in plants. *Ann. Bot.* **92**, 487–511.
- White, P. J., and Brown, P. H. (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann. Bot.* **105**, 1073–1080.
- Xie, X., Weiss, D. J., Weng, B., Liu, J., Lu, H., and Yan, C. (2013) The short-term effect of cadmium on low molecular weight organic acid and amino acid exudation from mangrove (*Kandelia obovata* (S., L.) Yong) roots. *Environ. Sci. Pollution Res.* **20**, 997-1008
- Xu, J., Sun, J., Du, L., and Liu, X. (2012) Comparative transcriptome analysis of cadmium responses in *Solanum nigrum* and *Solanum torvum*. *New Phytol.* **196**, 110–124.
- Yang, L. T., Qi, Y. P., Jiang, H. X., and Chen, L. S. (2012) Review Article, Roles of organic acid anion secretion in Aluminum tolerance of higher plants. *Biomed Res. International* **2013**, 1-16
- Yoshihara, T., Tsunokawa, K., Miyano, Y., Arashima, Y., Hodoshima, H., Shoji, K., Shimada, H., and Goto, F. (2005) Induction of callus from a metal hypertolerant fern, *Athyrium yokoscense*, and evaluation of its Cd tolerance and accumulation capacity. *Plant Cell Rep.* **23**, 579–585.
- Yoshihara, T., Suzui, N., Ishii, S., Kitazaki, M., Yamazaki, H., Kitazaki, K., Kawachi, N., Yin, Y.-G., Ito-Tanabata, S., Hashida, S., et al. (2014) A kinetic analysis of cadmium accumulation in a Cd hyper-accumulator fern, *Athyrium yokoscense* and tobacco plants. *Plant Cell Environ.* **37**, 1086–1096.
- 吉原利一、後藤文之、庄子和博 (2000)植物による環境修復(1)-現状と遺伝子工学の適用に関する調査- 電力中央研究所報告 U00022
- Zheng, S. J., Ma, J. F., and Matsumoto, H. (1998) High Aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiol.* **117** (3), 745-751