

令和 3 年 3 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18666

研究課題名(和文) 金属輸送体ZIP13が関わる花粉管伸長・破裂制御機構の解析

研究課題名(英文) Analyses of regulatory mechanisms of zinc transporter ZIP13-mediated pollen tube growth and rupture.

研究代表者

河内 美樹 (Kawachi, Miki)

名古屋大学・高等研究院・准教授

研究者番号：40625125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの亜鉛マンガンを輸送体ZIP13が成熟花粉及び花粉管のゴルジ体に局在し正常な花粉管伸長に重要であることが明らかとなった。ZIP13欠損株は、高温ストレス下において種子形成数の減少がみられたため、花粉管伸長を調べた結果、高温ストレス下のZIP13欠損株の花粉管の多くは、伸長途中で花粉管の先端が破裂してしまうことが明らかになった。花粉管先端の破裂が、確かにZIP13欠損によるものであることが相補実験からも示され、そして亜鉛キレーター等を用いた解析からその原因が花粉管内の亜鉛濃度低下に因るものである可能性が高いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、成熟花粉と花粉管のゴルジ体局在する金属輸送体ZIP13による亜鉛輸送が正常な花粉管伸長に重要であることが明らかとなった。これまでショ糖、ホウ素、カルシウムが花粉管伸長に必要であることは分かっていたが、亜鉛が花粉管伸長に重要な因子であることは知られておらず、本研究成果により亜鉛が植物の受精に重要であることが初めて示された。

研究成果の概要(英文)：We found that the zinc and manganese transporter ZIP13 is localized in the cis-Golgi apparatus of mature pollen where it plays an important role for normal pollen tube growth under heat stress. A ZIP13 knockout mutant (*zip13*) sets fewer seeds than wild type plants under heat stress. In vitro and in vivo pollen tube growth analysis revealed that *zip13* pollen tube growth was impaired under heat stress, as pollen tube tips ruptured prematurely. Expression of a ZIP13-mGFP fusion protein under the control of the ZIP13 promoter complemented the *zip13* phenotype. Also, analyses using metal chelating agents suggested that this pollen tube rupture was caused by zinc depletion in pollen tubes.

研究分野：植物生理

キーワード：亜鉛輸送体 マンガン輸送体 受精 花粉管伸長

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

微量必須元素である亜鉛は、タンパク質の構造維持や、酵素の活性中心に位置し触媒反応を担っており、亜鉛欠乏は成長障害やストレス耐性の低下など重篤な欠乏症をもたらす。一方、過剰量の亜鉛は植物にとって毒となるため、植物の細胞内亜鉛濃度は亜鉛輸送体によって厳密に調節されている。これまでの研究で、モデル植物である *Arabidopsis thaliana* の亜鉛輸送体ファミリーの一つ zinc-regulated transporter (Zrt)/ iron-regulated transporter (Irt)-related protein (ZIP) 13 が成熟花粉および受精前の花粉管のゴルジ体で発現し、正常な受精に重要であることを見出した。ZIP13 欠損株は、高温ストレス下で種子形成数の減少が見られたため、*in vitro* 実験で花粉管伸長を調べた結果、高温ストレス下の ZIP13 欠損株の花粉管の大多数は、伸長途中で花粉管の先端が破裂してしまうことが明らかになった。さらに、酵母異種発現系解析より、ZIP13 は亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ )とマンガニオン( $Mn^{2+}$ )をサイトゾル側へ輸送する可能性が高いことが示されたが、植物内で実際にどちらのイオンが正常な花粉管伸長に重要なのか、どのような機構で花粉管伸長に寄与しているのかは不明であった。

## 2. 研究の目的

植物の受精において花粉管伸長と破裂の制御は非常に重要である。異種間では花粉管伸長と破裂が起こらないことが交雑育種の障壁となっていることから、その制御機構解明は重要であるが不明な点が多い。申請者はこれまでの研究から、花粉管内の  $Zn^{2+}$  と  $Mn^{2+}$  のどちらか(もしくは両方)の濃度低下により花粉管が破裂すること、正常な花粉管伸長・破裂の制御にゴルジ体に局在する  $Zn^{2+}$ ・ $Mn^{2+}$  輸送体 ZIP13 が必要であることを見出した。花粉管伸長・破裂において  $Zn^{2+}$  や  $Mn^{2+}$  が重要な因子であることは知られておらず、新規性の高い発見である。ZIP13 がどのように花粉管内  $Zn^{2+}$  または  $Mn^{2+}$  濃度を調節し、花粉管伸長と破裂の制御に関与するのかを明らかにすることを目的に研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ZIP13 欠損株の表現型相補試験。

異常な花粉管破裂が、ZIP13 欠損に起因するものであることを確かめるため、そして mGFP を融合した ZIP13 が機能的であるかを調べるため、ZIP13 欠損株にオウンプロモーター制御下で mGFP 融合 ZIP13 を発現させ相補試験を行った。

### (2) *in vivo* での花粉管伸長観察。

これまでに *in vitro* での花粉管伸長実験で ZIP13 欠損花粉は野生型の花より花粉管の破裂が起こりやすいことが示された。*in vivo* でも花粉管が伸長途中で破裂し稔性稔性低下の原因となっているかを調べるため、アニリンブルー染色によりめしべの中を通る花粉の観察を行った。さらに花粉管伸長と受精の様子を可視化するために、GUS と ZIP13 を花粉特異的プロモーター *pLAT52* で ZIP13 欠損株にヘテロで発現させ、ZIP13 発現花粉管を GUS 染色によって青色に可視化できる株を作成し観察を行った。

### (3) 正常な花粉管伸長に寄与する ZIP13 の輸送基質の特定。

酵母異種発現系を用いた解析では ZIP13 は亜鉛イオンとマンガニオンを輸送することが示された。花粉管の破裂が、亜鉛イオンとマンガニオンのどちらか、もしくは両方の濃度低下によるものであるか否かを、ZIP13 欠損花粉の花より花粉管破裂が亜鉛やマンガンの添加により抑制されるか否かや、膜透過性の亜鉛蛍光プローブを用いた *in vitro* 花粉管伸長実験により調べた。

### (4) ZIP13 欠損株の細胞壁染色。

ZIP13 欠損株の花粉管が破裂しやすいことから、花粉管壁の強度が低下してのではないかと推測して野生株と ZIP13 欠損株の細胞壁成分の染色を行なった。花粉管のペクチンをルテニウムレッドによって、セルロースをカルコフロールホワイトによって染色し観察した。ZIP13 は根毛でも発現していることから、根毛においても同様に細胞壁成分の染色を行った。

### (5) 花粉管の亜鉛・マンガニ濃度調節の全体像の理解に向けて。

花粉管内の亜鉛やマンガンの濃度調節がどのように受精に関与するのか理解するには、ZIP13 以外にも花粉に発現する亜鉛やマンガニ輸送体の種類や局在を明らかにし、ZIP13 との関連を明らかにする必要がある。これまでの研究で花粉に発現する可能性が示された亜鉛輸送体とマンガニ輸送体について RFP 等の蛍光タグを用いて、ZIP13-GFP との共局在解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ZIP13 欠損株の表現型相補実験。

ZIP13-mGFP は花粉管のゴルジ体で発現することがゴルジ体マーカータンパク質との共局在解析から確かめられた。また ZIP13-mGFP の発現により ZIP13 欠損株で見られた高温ストレス下での花粉管破裂はが顕著に抑制され、野生型植物の花と同程度の花粉管伸長を示すことが確認された。本実験より、ZIP13 欠損株で見られた異常な花粉管先端の破裂が、確かに ZIP13

欠損によるものであることが相補実験から示された。

### (2) *in vivo*での花粉管伸長観察。

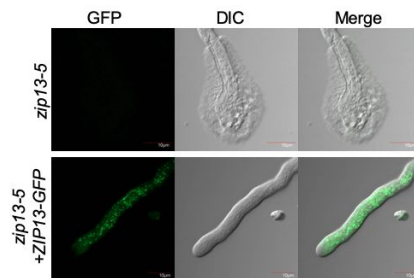
これまでに、*in vitro*での花粉管伸長実験から ZIP13 欠損花粉は高温ストレス下において花粉管が伸長途中で破裂しやすいことが示された。伸長途中で異常な花粉管破裂が ZIP13 欠損株の稔性低下の原因と考えられるが、めしべの中を伸長する ZIP13 欠損花粉管も破裂が起こりやすいのかどうかは分かっていない。そこで野生型のめしべに野生型もしくは ZIP13 欠損花粉を受粉させて、めしべの中を伸長する花粉をアニリンブルー染色により観察したところ、高温ストレス (30°C) 下でも 8 時間で野生型の花粉管はめしべ基部の胚珠まで到達するが、ZIP13 欠損株の花粉管は基部まで到達していない様子が観察された。また、GUS 染色の有無により ZIP13 の有無が可視化できる花粉を作成し、青色に染色される ZIP13(+)花粉と無色の ZIP13(-)花粉がめしべの中で競合する様子の観察を試みた。高温ストレス下では ZIP13(+)花粉の伸長と受精が有利となり GUS 染色される胚珠の数が無色の胚珠の数を上回り、特にめしべ基部の胚珠でその傾向が顕著となることを予測していたが、実際には ZIP13(+)により受精され青色に染まった胚珠の数は、無色の胚珠の数と同程度であった。無色の胚珠が ZIP13(-)により受精されたどうかは分からないため、ZIP13(+)花粉が ZIP13(-)花粉よりも受精に有利であることを *in vivo*で可視化して示すには至らなかった。今後は野生型のめしべに ZIP13 へテロ欠損株の花粉を受粉させてできた種子を、めしべの柱頭から基部の順に採取してジェノタイプピングすることで、ZIP13(+)花粉と ZIP13(-)花粉のどちらによって受精したのかを調べるなど別の実験方法を検討したい。

### (3) 正常な花粉管伸長に寄与する ZIP13 の輸送基質の特定。

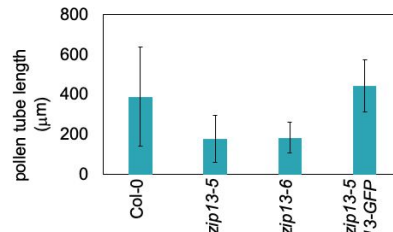
ZIP13 欠損株で見られた異常な花粉管先端の破裂が、花粉管内のマンガン濃度の低下、亜鉛濃度の低下、どちらに起因するものかを明らかにするために、ZIP13 欠損花粉の花粉管破裂が亜鉛イオンやマンガニオン処理により抑制されるかどうか実験したところ、いずれの処理によっても花粉管破裂は抑制されないことが分かった。ZIP13 は *cis*-Golgi に局在しており、亜鉛イオンまたはマンガニオンをゴルジ体からサイトゾルへ輸送すると考えられることから、ZIP13 が欠損すると、ゴルジ体内の亜鉛イオンまたはマンガニオン濃度の上昇、サイトゾルの亜鉛イオンまたはマンガニオン濃度の低下が予測される。そこでまずは花粉管のオルガネラ内外の亜鉛濃度変化を調べるため膜透過性の亜鉛蛍光プローブ Zinpyr-1 を用いた解析を試みた。しかし、野生株の花粉でも Zinpyr-1 で処理すると花粉管の先端の破裂が起こり、花粉管内の亜鉛濃度をモニターすることはできなかった。Zinpyr-1 は亜鉛選択性が高いことから、花粉管内の亜鉛が Zinpyr-1 と結合して、亜鉛欠乏状態になったために花粉管先端の破裂が起こったと推測される。Zinpyr-1 はマンガニオンとも弱く結合するが、亜鉛イオン存在下では Zinpyr-1 に結合したマンガニオンが亜鉛イオンに置換されることが分かっている。この性質を用いて、予め Zinpyr-1 にマンガニオンを配位させたから ZIP13 欠損花粉に与えることで亜鉛イオンのみと結合する条件を作り出し実験を行ったところ、花粉管の破裂が観察された。これらの結果から、亜鉛が欠乏すると花粉管が破裂することが明らかとなった。ZIP13 は花粉管の *cis*-Golgi から亜鉛を輸送することで正常な花粉管伸長に重要な役割を果たしていると考えられる。

### (4) ZIP13 欠損株の細胞壁染色。

ZIP13 欠損株の花粉管破裂がどのようなメカニズムで起こっているのか分かっていない。花粉管壁はペクチンやセルロースなどから構成されており、その構成によって花粉管の強度と柔軟性が保たれており花粉管伸長に影響を与える。ZIP13 は花粉管の先端付近で花粉管の破裂が観察されたことから、先端付近の一次壁成分の構成に変化があり強度が低下しているのではないかと推測し、ZIP13 欠損株の花粉管をルテニウムレッド染色によってペクチンを、カルコフロールホワイト染色によってセルロースの染色を行った。花粉管の染色は報告があるので可能なはずだが技術的に未熟でデータを取るまでに至らなかった。そこでまず取り扱いやすい根毛での染色を行った。ZIP13 は根毛でも発現していること、根毛の伸長にもペクチンやセルロースが重要であるためである。染色の結果、ZIP13 欠損株の根毛は野生株の根毛と同定のルテニウムレッド染色とカルコフロール染色の様子が観察され違いは見られなかった。今後は花粉管での染色を進めること、またより詳細な一次細胞壁成分の構成割合について抗体を用いて調べる



30°Cで伸長させたzip13-5花粉およびZIP13プロモーターによりZIP13-GFPを発現させた花粉のin vitro花粉管伸長の様子。



30°Cで4.5時間伸長させた花粉管の長さ (n=33).

図1 ZIP13 欠損株の表現型相補

などして ZIP13 欠損花粉が破裂しやすい原因を明らかにしていきたい。

(5) 花粉管の亜鉛・マンガン濃度調節の全体像の理解に向けて。

発表前のデータのため分子名や局在は伏せるが、ZIP13 と共に花粉管内の亜鉛イオンとマンガンイオン濃度調節に関わる輸送体の局在が複数明らかとなった。それらが ZIP13 とどのような位置関係にあるのか画像データを得ることができ、花粉管内の亜鉛やマンガンの濃度調節機構の理解を一步前進させることができた。

本研究より、ZIP13 は花粉管の *cis*-Golgi に局在して亜鉛を輸送することで正常な花粉管伸長に寄与しており特に高温ストレス下での正常な受精に重要な役割を果たすことが明らかとなった。これまでに植物の受精に亜鉛輸送体に関わることは報告がなく学術的意義は大きい。今後は亜鉛輸送体がどのように花粉管伸長に寄与するのかそのメカニズムを明らかにしていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計10件)

Miki Kawachi, Saki Fujita, Nahoko Nagasaki-Takeuchi, Youichiro Fukao, Masayoshi Maeshima, Arabidopsis thaliana zinc transporter ZIP13 contributes to healthy pollen tube growth under heat stress, 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction, Jun 11, 2018-Jun 16, 2018, Nagarakawa Convention Center, Japan.

溝口未恭、前島正義、河内美樹、シロイヌナズナの花粉に発現する Mn 輸送体の同定と解析、第3回植物の栄養研究会、2017年9月1日-2017年9月2日、東京工業大学

河内美樹、藤田早紀、武内(長崎)菜穂子、深尾陽一朗、前島正義、シロイヌナズナの亜鉛輸送体 ZIP13 は花粉管伸長に関与する、第12回トランスポーター研究会、2017年7月8日-2017年7月9日、東北大学

服部桃子、佐藤亜沙子、ロイシャシュテファン、森仁志、白武勝博、前島正義、河内美樹、Analysis of Seasonal Foliar Boron Retranslocation in Peach Trees、第58回日本植物生理学会年会、2017年03月16日~2017年03月18日、鹿児島大学

小林克至、瀬上紹嗣、前島正義、河内美樹、Functional analysis of an Arabidopsis thaliana ZIP transporter involved in IAA-Ala resistance、第58回日本植物生理学会年会、2017年03月16日~2017年03月18日、鹿児島大学

河内美樹、藤田早紀、武内(長崎)菜穂子、深尾陽一朗、前島正義、Arabidopsis thaliana Zinc Transporter ZIP13 Contributes to the Normal Pollen Tube Growth Under Heat Stress、第58回日本植物生理学会年会、2017年03月16日~2017年03月18日、鹿児島大学

小林克至、前島正義、河内美樹、植物ホルモン IAA 濃度調節に関わる金属輸送体 IAR1 に関する研究、第2回植物の栄養研究会、2016年09月02日~2016年09月03日、名古屋大学

溝口未恭、前島正義、河内美樹、シロイヌナズナの花粉に発現する Mn 輸送体の同定と解析、第11回トランスポーター研究会(招待講演)、2016年07月02日~2016年07月03日、京都大学

小林克至、瀬上紹嗣、前島正義、河内美樹、植物ホルモン IAA 濃度調節に関わる金属輸送体 IAR1 に関する研究、第11回トランスポーター研究会、2016年07月02日~2016年07月03日、京都大学

河内美樹、植物における CDF と ZIP の役割とその調節機構、第11回トランスポーター研究会(招待講演)、2016年07月02日~2016年07月03日、京都大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：溝口未恭

ローマ字氏名：MIZOGUCHI, Miku

研究協力者氏名：小林克至

ローマ字氏名：KOBAYASHI, Katsushi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。