

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05377

研究課題名(和文) 根端メリステムを有害元素から防御する分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of toxic metal detoxification in the root apical meristem

研究代表者

浦口 晋平 (Uraguchi, Shimpei)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：20638837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、根の発達を制御する根端メリステムに着目し、モデル植物シロイヌナズナを用いて有害元素の根端に対する毒性を解析した。まず、有害元素毒性の表現型解析のための培地条件の最適化を行った。続いて、有機水銀化合物の一種であるフェニル水銀が無機水銀と同様の機序、すなわちファイトケラチン(重金属リガンド)の生合成を誘導・結合によって無毒化されることを明らかにした。ファイトケラチン合成遺伝子AtPCS1は主に根の表皮細胞に発現した。一方、毒性の機序は化学形態によって異なり、根端メリステムの細胞周期・細胞分裂の攪乱、さらに上流のイベントとしてオーキシン恒常性の異常が毒性のターゲットとして示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌中の有害元素は、植物の生育や農業生産を阻害する要因である。有害元素に対する植物の耐性メカニズムの理解はある程度進んだ一方で、根の発達と伸長を制御する根端分裂組織における高い解像度での有害元素の毒性と耐性に関する研究はほとんど見られない。本研究は、モデル植物であるシロイヌナズナの根端メリステム(分裂組織)に着目し、有害元素の無毒化に関わる細胞型を同定し、さらに毒性のターゲットの解明を分子レベルで進めた。本研究をさらに発展させていくことで、世界の不良土壌での農業生産の改善や、植物を用いた環境保全技術への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The study examined the effects of different toxic metals on root apical meristems using Arabidopsis as the model plant. We first optimized the agar plate conditions for the metal toxicity phenotyping. We then demonstrated that phenyl-mercury is detoxified through AtPCS1-mediated pathway as like inorganic-mercury. AtPCS1 is predominantly expressed in epidermal cells of the root, suggesting that the cell type plays a major role in detoxification of various toxic metals. In contrast, possible molecular targets of metal toxicity are likely to differ among metal species and chemical forms: among cell cycle and cell division disturbance was suggested and auxin distribution defect was suggested as its upstream target.

研究分野：植物栄養学

キーワード：有害金属 根端メリステム ファイトケラチン cad1-3 細胞周期 オーキシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界ではヒ素、カドミウム、水銀といった有害元素の土壌汚染が報告されている。これら有害元素は毒性が高く、食物連鎖を介して摂取した場合は人の健康リスクとなる。植物の生長もこれら有害元素によって阻害されるため、農業生産も悪影響を受ける。植物の根は、土壌と直接コンタクトするために土壌の有害元素の影響を受けやすい。根の中でも静止中心と幹細胞群を含む根端分裂組織は根の発達に重要である。根端分裂組織における有害元素に対する耐性機構や毒性の理解は重要である。しかしながら、根端における有害元素の毒性や耐性の研究はアルミニウムに関して偏重しており、その他の有害金属に関する知見が不足していた。また、シロイヌナズナやイネなどモデル植物の変異株を用いた個体レベルでの解析が多く、根の細胞型や植物ホルモンや細胞周期などに関する分子レベルの知見も不足していた。

2. 研究の目的

本研究は、モデル植物であるシロイヌナズナの根の成長の中心である根端分裂組織に着目し、有害元素の無毒化のメカニズムおよび毒性のメカニズムについて、根端の細胞型レベルや分子レベルでの理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナの有害金属応答の解析条件の最適化

まず、シロイヌナズナの有害金属応答の解析に用いる固形培地の条件の最適化を行った。具体的には6種類の寒天試薬を用いて、1/10 改変 Hoagland 培地に添加した時のカドミウム、亜ヒ酸、無機水銀、過剰亜鉛に対するシロイヌナズナの野生型 (Col-0)、重金属感受性の異なる3つの変異株 (*cad1-3*, *cad1-6*, *abcc1/abcc2*) の表現型を解析した。寒天試薬中に含まれる元素含有量を ICP-AES で解析した。

(2) シロイヌナズナのフェニル水銀耐性における AtPCS1 の役割

AtPCS1 の機能欠損変異株である *cad1-3* の根に対する亜ヒ酸、カドミウム、無機水銀、有機水銀 (メチル水銀およびフェニル水銀) の影響を解析した。そのうち、水銀化合物において興味深い表現型が観察されたので、*cad1-3*, *cad1-6*, *abcc1/abcc2* を用いて詳細な解析を行った。さらに、水銀化合物によるファイトケラチン合成誘導、ファイトケラチンと水銀化合物との結合性を検証した。

(3) 根端分裂組織における有害金属の毒性

AtPCS1 が根端分裂組織のどの細胞型で機能しているのか検証するため、機能欠損株 *cad1-3* に *pAtPCS1::AtPCS1-GFP* を導入した相補系統を樹立した。共焦点顕微鏡により AtPCS1-GFP の根端における発現部位を解析した。さらに、無機水銀とフェニル水銀による根端分裂組織のオーキシン恒常性と細胞周期に対する影響を解析した。定量 PCR により根端の遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの有害金属応答の解析条件の最適化

我々はこれまでに、1/10 改変 Hoagland 培地といくつかの寒天試薬を用いてシロイヌナズナの有害元素応答を解析してきた。その過程で、寒天試薬あるいは同一試薬でもロットによって変異株の表現型が変動する問題に直面してきた。まずそこで、シロイヌナズナの有害金属ストレス下での表現型を安定的に観察するために、いくつかのメーカーの寒天試薬およびロット間差を解析し、培地条件の最適化を試みた。寒天に含まれる元素のイオノーム解析を行ったところ、寒天試薬の種類 (メーカー) やロットによって元素プロファイルが大きく異なった。根長を指標として有害金属感受性変異株の表現型を解析したところ、寒天試薬の種類やロットによって結果は異なった。とくに、亜ヒ酸に対する変異株の感受性は、寒天の試薬あるいはロットによって大きく変動し、条件によっては変異株と野生型株の生育差がほとんど消失した。カドミウム、無機水銀、過剰の亜鉛においても同様の検討を行ったところ、それぞれの解析に最適な寒天試薬が選定された。ついで、寒天試薬による影響が大きかった亜ヒ酸について、植物の元素蓄積に対する寒天試薬の影響を解析した。その結果、ヒ素の蓄積レベルのみならず、栄養元素のプロファイルに対しても寒天試薬の選択が大きく影響することがわかった。以上の結果より、有害元素に対する感受性を固形培地で解析する際には、対象とする元素によって寒天試薬を使い分け、かつ複数の試薬あるいはロットで検証する重要性が示唆された。これらの結果は *Frontiers in Plant Science* 誌に発表した。

(2) シロイヌナズナでのフェニル水銀耐性における AtPCS1 の役割

シロイヌナズナの有害金属耐性の中心を担うファイトケラチン合成酵素 AtPCS1 の欠損変異株 *cad1-3* の根に対する亜ヒ酸、カドミウム、無機水銀、有機水銀(メチル水銀およびフェニル水銀)の影響を解析したところ、いずれも根の伸長が重度に阻害されるものの、根の形態などの表現型は有害金属種や化学形態により異なった。とくに、いもち病対策の農薬として過去に用いられたフェニル水銀は、根端の異常な肥大化を引き起こし、*cad1-3* において野生型よりも顕著に観察された。すなわち、有機水銀の一種であるフェニル水銀の無毒化に AtPCS1 が関わっている可能性が示された。フェニル水銀が AtPCS1 活性を誘導するのかを *in planta*、分裂酵母を用いた異種発現系、大腸菌組換え AtPCS1 を用いた *in vitro* アッセイで検証した。分裂酵母の系では毒性が強く実験が困難であったが、フェニル水銀は *in planta*、*in vitro* で無機水銀と同様の PCS 活性を誘導した。さらに、ファイトケラチン担持ビーズを用いた金属-リガンド結合アッセイを開発し、ファイトケラチンが無機水銀あるいはフェニル水銀と結合するのかを検証したところ、グルタチオンと水銀は 2:1、ファイトケラチン(PC2)と水銀は 1:1 で結合することが示唆された。続いて、ファイトケラチンと金属の抱合体を液胞内へと輸送する AtABCC1、AtABCC2 の二重欠損変異株の水銀化合物に対する感受性を解析したところ、野生型に比べてフェニル水銀に対しても高感受性を示したことから、フェニル水銀は無機水銀と同様のファイトケラチンを介した作用機序で無毒化されることが示された(図1)。

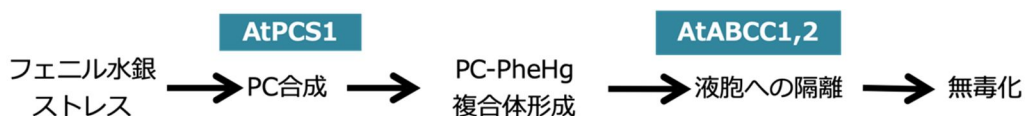


図1 本研究で明らかとなったファイトケラチン経路を介したフェニル水銀解毒機構

(3) 根端分裂組織における有害金属の毒性

まず、AtPCS1 の機能欠損株 *cad1-3* に *pAtPCS1::AtPCS1-GFP* を導入した相補系統を樹立した。共焦点顕微鏡により AtPCS1-GFP の根端における発現部位を解析したところ、AtPCS1-GFP の蛍光は、根端の最外層にあたる側部根冠および表皮細胞に認められた。すなわち、有害金属耐性で中心的な役割を果たす AtPCS1 は、土壌と接するこれら外側の細胞層で優先的に発現しており、これらの細胞層がファイトケラチン合成の誘導と無毒化を担う細胞型として重要であることが示唆された。

本研究に用いた有害金属種のうち、無機水銀とフェニル水銀では化学形態によって根端の表現型が異なったことから、この二種類の金属種に注目し細胞周期・オーキシン恒常性に対する影響を解析した。まず、フェニル水銀処理が根端の細胞分裂活性を亢進して肥大化を誘発している可能性を G2/M 期のマーカー系統の蛍光観察ならびに EdU を用いた S 期の細胞の蛍光染色によって検討した。フェニル水銀処理によって細胞分裂活性は低下する傾向が見られ、逆に分裂領域と伸長領域の境界領域において主に表皮細胞の肥大化・異形化が観察された。また多くの細胞で核の肥大化が観察された。また、根端の肥大に伴って根冠のアミロプラストが消失することを見出した。アミロプラストは根端におけるオーキシンの適切な分配に重要であることから、水銀化合物によるオーキシン輸送と分布を蛍光観察により解析した。オーキシンの極性輸送に関わる PIN1、PIN2、PIN3 の根端における発現を GFP レポーター系統によって解析し、さらにオーキシン分布 DR5rev::GFP 系統を用いて解析した。フェニル水銀処理では根端の PIN1、PIN2、PIN3 の

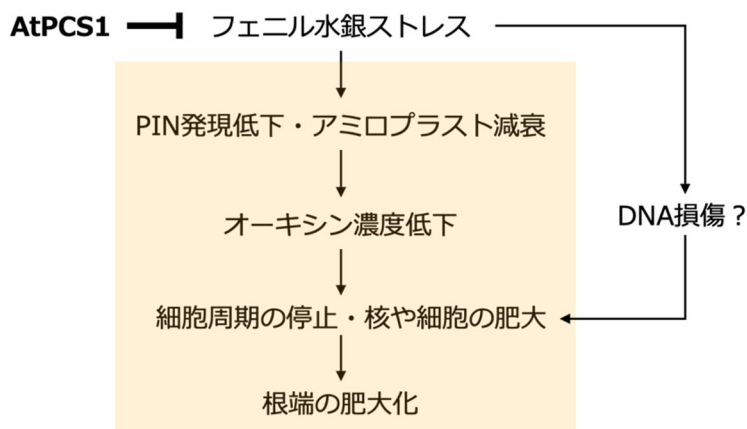


図2 本研究で明らかとなったフェニル水銀毒性の模式図

発現低下が観察され、連動してオーキシンレベルが低下した。無機水銀処理では PIN3 の発現低

下が観察されたものの、根端のオーキシンレベルは上昇傾向を示した。培地に天然オーキシンである IAA や人工オーキシンである NAA をフェニル水銀と共処理すると根端肥大は抑制されたことから、フェニル水銀の毒性として根端へのオーキシンの適切な分布の阻害が考えられた。また、定量 PCR によって、*BRCA1* や *RAD51* など DNA 損傷の修復に関わる遺伝子群の発現誘導が観察され、フェニル水銀が誘発する根端の異常な肥大の一因として DNA 損傷を起因とする細胞周期の停止も関与する可能性が考えられた (図 2)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uraguchi Shimpei, Ohshiro Yuka, Otsuka Yuto, Tsukioka Hikari, Yoneyama Nene, Sato Haruka, Hirakawa Momoko, Nakamura Ryosuke, Takanezawa Yasukazu, Kiyono Masako	4. 巻 11
2. 論文標題 Selection of Agar Reagents for Medium Solidification Is a Critical Factor for Metal(loid) Sensitivity and Ionic Profiles of <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.00503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浦口晋平, 田丸夏帆, 鈴木真帆, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 リアルタイム PCR を用いたシロイヌナズナの DNA 損傷定量法の開発
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦口晋平, 長井賢一郎, 成瀬史惟, 曾根有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 ファイトケラチン担持ピーズを用いたファイトケラチンの金属結合性の定量解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦口晋平, 大城有香, 佐藤遼, 平川桃子, 羽貝知洸, 田丸夏帆, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 根端分裂組織の細胞周期に及ぼす有害元素ストレスの影響
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦口晋平, 曾根有香, 大塚 裕登, 大森彩加, Arunee Wongkaew, 大津(大鎌)直子, 中村亮介, 高根沢康一, Stephan Clemens, 清野正子
2. 発表標題 根端分裂組織の重金属耐性におけるAtPCS1の役割
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦口 晋平, 曾根 有香, 大塚 裕登, 中村 亮介, 高根沢 康一, 清野 正子
2. 発表標題 シロイヌナズナの有害元素応答の解析に適した寒天試葉の検討
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2018年度神奈川大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚 裕登, 浦口 晋平, 曾根 有香, 中村 亮介, 高根沢 康一, 大津 直子, Stephan Clemens, 清 野 正子
2. 発表標題 AtPCS1はシロイヌナズナにおいてフェニル水銀ストレスの緩和に必須である
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2018年度神奈川大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	パイロイト大学			