

令和 6 年 9 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K15949

研究課題名（和文）根の環境応答による液胞動態変化に伴う物質輸送の解明

研究課題名（英文）Investigation of transport mechanisms with changes in vacuolar dynamics of Arabidopsis root tips under environmental stress

研究代表者

中山 真由美（Nakayama, Mayumi）

東北大学・生命科学研究科・博士研究員

研究者番号：70814317

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）：シロイヌナズナの根のコルメラ細胞において、水分環境によって顕著に動態が異なる液胞に着目し、根冠のプロテオーム解析により液胞動態に関与するタンパク質を網羅的に解析し候補分子を絞り込み、それらの分子の機能解析を行い輸送される物質を推定することにより、環境ストレス応答時における液胞の役割と、それらの環境応答を統御する機構解明のための糸口となる知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物細胞内で大きな体積を占める液胞が、環境変化への応答に果たす役割については未だ解明されていないことが多い。本研究では、水分勾配や浸透圧変化といった環境ストレス下でのタンパク質の変動を網羅的に解析することで、根の環境応答機構における液胞の役割を見出すことに貢献することができる。本研究を含めた関連研究の推進により、植物の環境応答・環境適応の機能を応用する技術として確立することが可能となり、極限環境に

研究成果の概要（英文）：The dynamics of vacuoles in Arabidopsis root tips change dramatically depending on the water condition. In this research, the proteomic analysis of Arabidopsis root tips provided some candidates for target proteins that are presumed to be involved in dynamics after stress avoidance and might be a clue to identify stress response and recovery mechanism.

研究分野：植物生理学

キーワード：環境応答

## 1. 研究開始当初の背景

植物は環境の変化に应答する高い能力をもつ。シロイヌナズナの根では、水分勾配に应答し水分の多い空間へと伸長する水分屈性を発現する。これまでの研究から、水分勾配刺激によって水分屈性を発現し水分を獲得する過程において、根のコルメラ細胞内ではオートファジー様の液胞発達およびストレス回避後の液胞収縮が見られた。一方で、浸透圧刺激時にはオートファジー様の液胞の発達のみ確認でき、収縮は確認されなかった。これらのことから、水分勾配刺激により発達した液胞の収縮は、水分屈性による屈曲で根端がストレスを回避し水分を獲得することによる水分環境の変化における特異な現象であると考えられた。

## 2. 研究の目的

植物の根の環境応答現象のひとつとして、水分勾配や浸透圧変化による環境ストレス下でオートファジー現象が関与することが明らかとなり、液胞の役割が新たに見出されたが、環境応答における多様な現象との相互関係は不明である。そこで、本研究課題では、水分環境によって顕著に動態が異なる液胞に着目し、①根端のプロテオーム解析により液胞動態に関与するタンパク質を網羅的に解析し、②液胞と細胞質間の物質を輸送する分子の探索と機能解析を行うことで機能する分子を特定し、環境ストレス応答における液胞の役割と、それらの環境応答を統御する機構解明のための糸口を掴むことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ①根端プロテオーム解析による液胞動態変化に関与する分子の同定

経時的に水分勾配刺激を与えたシロイヌナズナ根端については、予備実験として iTRAQ によるプロテオーム解析データが得られている。本研究では、新たに、浸透圧刺激処理・解除後のシロイヌナズナ根端からタンパク質を抽出、酵素消化後にペプチドを iTRAQ ラベリング、飛行時間型質量分析装置による分析、変動するタンパク質を比較した (Fig. 1)。

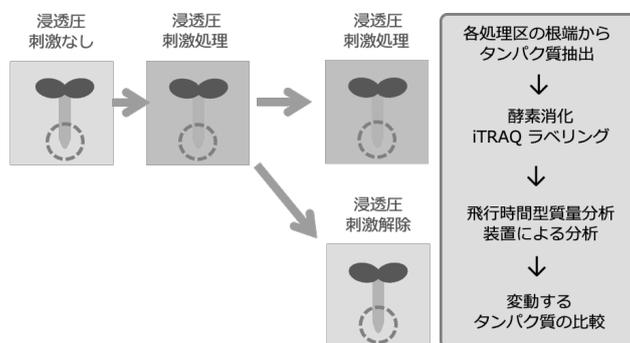


Fig.1 iTRAQ によるシロイヌナズナ根端のプロテオーム解析

さらに、これらのプロテオーム解析結果に既知のマイクロアレイ解析データを加えて検証し、トランスポーター関連の分子については②の候補分子として活用した。

### ②液胞への取り込みおよび排出に関わる分子の探索と輸送基質の同定

①の解析によって絞り込んだ分子について、大腸菌および出芽酵母での発現系の構築し、培養液中に排出または菌体内に蓄積する物質を質量分析(メタボローム解析)により同定した。

#### 4. 研究成果

①シロイヌナズナの根端プロテオーム解析として、予備検討で取得していた水分勾配刺激処理時のプロテオーム解析データに既知のマイクロアレイ解析データを加えて検証し、根端が環境ストレスを回避し液胞が収縮する際に特異に機能する可能性のある候補タンパク質リストを作成、トランスポーターまたは膜局在と予測される8タンパク質について、それらをコードする遺伝子を②の候補遺伝子として活用した。

加えて、浸透圧刺激処理・解除後の根端プロテオーム解析を複数回行い、同様に候補タンパク質リストを作成、それらをコードする遺伝子を②の候補遺伝子として活用した。

浸透圧刺激処理時、解除後にはそれぞれ300強のタンパク質において増減の変動が認められた (Fig. 2)。

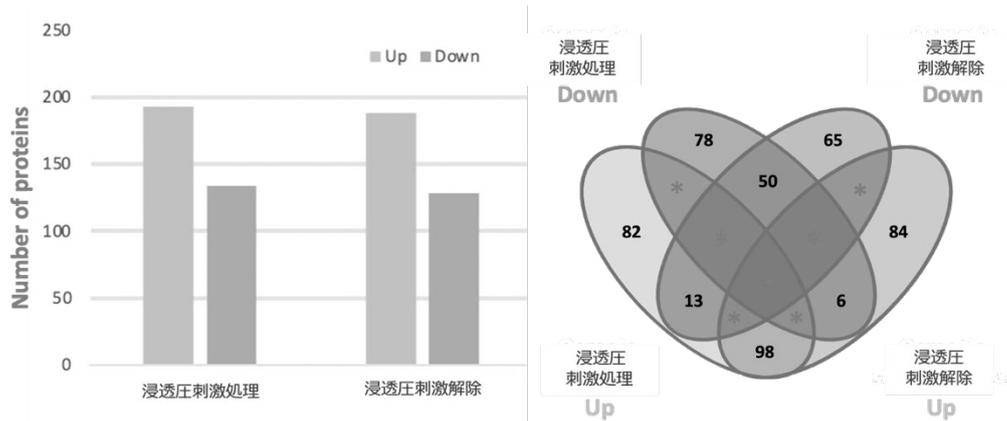


Fig.2 浸透圧刺激処理・解除によるタンパク質の変動

浸透圧刺激の解除によって変動するタンパク質については、浸透圧解除/刺激の値が1.2以上または0.8以下であるものを特異的なものとした場合、167タンパク質において増加、136タンパク質において減少が確認された (Fig. 3(A))。これらの変動タンパク質は液胞に関連するものが多く、 $Ca^{2+}$ シグナル伝達やアブシジン酸、オーキシンといった植物ホルモンに関連するタンパク質にも変動が認められた (Fig. 3(B))。これらの成果については学会発表を行った。

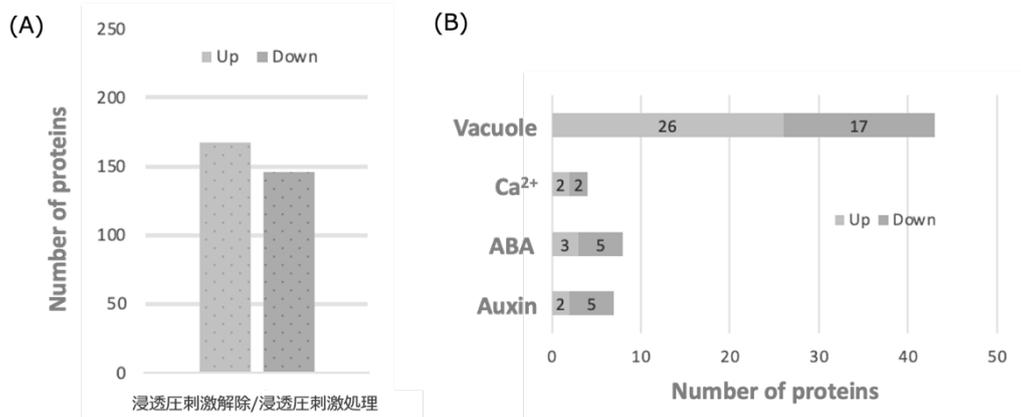


Fig.3 浸透圧刺激解除時に特異的なタンパク質の変動(A)と特徴的な機能におけるタンパク質の変動(B)

②液胞収縮に関わるタンパク質の機能解析として、公共データベース等を活用し、シロイヌナズナにおいて液胞膜局在、あるいはトランスポーターとしての機能が予測される10遺伝子を探索モデルとし、①のプロテオーム解析から絞り込まれた候補遺伝子と共に、大腸菌および出芽酵母での過剰発現系を用いた解析を行った。大腸菌において発現を確認できた過剰発現体については、それらの培養液を質量分析することで輸送物質を推定することができた。

①、②の結果から、シロイヌナズナ根端においては、浸透圧刺激を解除することで、液胞に関連するタンパク質の増減が認められ、 $Ca^{2+}$ シグナル伝達やGタンパク質関連シグナル伝達、植物ホルモン関連をはじめ、多くの分子の変動が確認された。これらの同定されたタンパク質の中には水分勾配刺激時に変動するタンパク質と一致するものもあり、水分環境に応答した液胞の動態変化の解明の糸口となる可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mayumi Nakayama, Nahoko Higashitani, Shinich Sato
2. 発表標題 Proteomic analysis of Arabidopsis root tips after osmotic pressure release
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024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
---------	---------