

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究 B

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23780059

研究課題名（和文）生殖生長・種子成熟における新規金属タンパクの探索と金属制御機構の解明

研究課題名（英文）Study of novel metalloproteins and metal regulation mechanism at reproductive stage and during seed development

研究代表者 高橋 美智子 (MICHIKO TAKAHASHI)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：90345182

研究成果の概要（和文）：蛍光 X 線による未受精卵、受精前後の子房における金属タンパクの解析の結果、受精および初期胚発生において重要と思われる亜鉛タンパクの存在が明らかになった。また、受精後 1 日の初期胚では亜鉛と銅の濃度が高いことが明らかになり、正常な胚発生には亜鉛が重要なことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Fluorescent X-ray analysis of rice egg and ovaries before and after fertilization cleared important zinc binding protein during fertilization and early embryogenesis. Concentration of zinc and copper was high in an embryo 1 day after fertilization and importance of zinc for normal embryogenesis was cleared.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学

キーワード：植物、発生・分化、発現制御、金属栄養、ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

鉄、亜鉛、銅、マンガンなどの必須金属元素の欠乏は栄養成長期の生育を阻害するだけでなく、生殖成長にも影響を与え不稔や収量の低下を招く。金属キレート物質であるニコチアナミン(NA)は全ての高等植物に存在し、その欠如は生殖器官の金属濃度の低下、花器官の形態や数の異常、花粉形成の異常、不稔を惹起し、さらには胚発達にも異常を起こすことを明らかにした。この表現型は鉄・硫黄クラスターを持つ核タンパク質である DNA グリコシラーゼ DEMETER、zinc finger 型転写因子の SERRATE や FIL の欠損変異体に類似している。これらのタンパク質が機能するためには補因子として金属元素を必要とすることから、タンパク質は存在していても金属元素が十分に供給されない、あるいは細胞内での金属輸送の制御が異常になったことがこれらの現象の原因として

考えられた。in vitro 系において FIL の亜鉛、およびシス因子との結合は、金属キレーターである EDTA によって制御され、ミトコンドリア局在の鉄・硫黄クラスタータンパク質 aconitase の鉄との結合、およびその活性は Frataxin タンパク質によって制御されることが報告されている。このように金属タンパク質の機能発現には金属元素の結合と解離による制御が不可欠であるが、生殖成長期における金属元素の役割や、その細胞内輸送制御の詳細はほとんど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

鉄、亜鉛、銅、マンガンなど必須金属元素の欠乏により花粉形成の異常、不稔、収量低下が起こる。また、必須であっても金属元素が過剰に存在すると生育阻害が起きる。これらの過程に共通して不可欠なのは細胞内の金属制御である。細胞内では多くの金属結合

タンパクや金属結合化合物により金属元素の受け渡しが起こり、これによりタンパクの機能発現および細胞内金属の恒常性の維持が行われると考えられる。本研究では新規および既知の金属タンパク質および金属結合化合物に着目し、未だ未解明な生殖成長、胚発生、種子成熟過程における金属元素の細胞内制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 金属分布解析とプロテオーム解析の融合による、花粉管伸長、胚発生、種子成熟における新規および既知の金属タンパクの同定と機能解析

(2) 金属検出蛍光試薬を用いた胚発生過程および花粉管伸長過程の金属元素動態の解析。

(3) イネ *in vitro* 胚発生系を用いた胚発生時の金属元素欠乏の影響と金属の供給形態の解明。

### 4. 研究成果

SPring-8 における蛍光 X 線解析により、花粉管の伸長前後、未受精卵、受精前後の子房および種子成熟過程における金属タンパクの検出を行った。未受精卵に多くの亜鉛タンパクが存在することが明らかになった。また、受精後 1 日の子房における初期胚では亜鉛と銅の濃度が高いことが明らかになった。

胚発生における亜鉛の動態を明らかにするため、亜鉛検出蛍光試薬を用いた顕微鏡観察および亜鉛欠乏条件におけるイネ受精卵の *in vitro* 培養を行った。その結果、亜鉛欠乏条件下では細胞分裂が途中で停止し正常な初期胚発生が行えないことが明らかになった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Iwai T., Takahashi M., Oda K., Terada Y., Yoshida K.T. Dynamic changes in the distribution of minerals in relation to phytic-acid accumulation during rice seed development. *Plant Physiol.* (2012) 160 : 2007-2014 (査読有)
2. Suzuki M., Bashir K., Inoue H., Takahashi M., Nakanishi H., Nishizawa NK. Accumulation of starch in Zn-deficient rice. *Rice* 5 : 1-9. (2012) (査読有)

3. Masuda H., Ishimaru Y., Aung M. S., Kobayashi T., Kakei Y., Takahashi M., Higuchi K., Nakanishi H., Nishizawa N. K. Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Scientific Reports* 2 : 1-7. (2012) (査読有)

4. Nozoye T., Nagasaka S., Kobayashi T., Takahashi M., Sato Y., Sato Y., Uozumi N., Nakanishi H., Nishizawa NK. Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *J. Biol. Chem.* 286 : 5446-5454. (2011) (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. AtCLCa is involved in  $\Gamma$  transport into vacuoles, Misaki Kuribayashi, Shota Kato, Tetsuya Shimoyama, Aiko Watanabe, Satoshi Yoshida, Hitoshi Sekimoto, Sébastien Thomine, Sophie Filleur, Michiko Takahashi, International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2013)、2013 年 3 月 26 - 31 日、倉敷芸文館、岡山

2. The importance of metals during fertilization in plants, Aiko Watanabe, Tetsuya Shimoyama, Misaki Kuribayashi, Takashi Okamoto, Michiko Takahashi, International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, 2012 年 11 月 12-16 日、名古屋ガーデンパレス、愛知

3. 高橋美智子、生殖生長と種子成熟の植物栄養学からめざす作物の収量増加と機能性向上、日本土壌肥料学会 2012 年大会 (シンポジウム)、2012 年 9 月 6 日、鳥取大学

4. 渡辺藍子、Mark. GM. Aarts、関本均、高橋美智子、シロイヌナズナ亜鉛欠乏応答性転写因子 AtbZIP19 のイネにおける機能解析、日本土壌肥料学会 2012 年大会、2012 年 9 月 6 日、鳥取大学

5. ヨウ素過剰耐性イネ変異体の選抜、吉平恵依、加藤翔太、石川明史、吉田聡、伊藤純一、長戸康郎、高橋美智子、関本均、日本土壌肥料学会 2011 年大会、2011 年 8 月、つくば

6. イネ根ヨウ素酸還元活性のヨウ素応答と作物間比較、石川明史、高木大地、手塚彩、加藤翔太、吉田聡、関本均、高橋美智子、日本土壌肥料学会 2011 年大会、

2011年8月、つくば

7. イネ根によるヨウ素酸還元とそのヨウ素応答、加藤翔太、和知孝典、吉平恵依、吉田聡、関本均、高橋美智子、日本土壤肥料学会 2011年大会、2011年8月、つくば

〔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

<http://shigen.mine.utsunomiya-u.ac.jp/pnp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 美智子 (TAKAHASHI MICHIKO)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：90345182

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし