

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780054

研究課題名(和文)ミヤコグサにおけるマルチミネラル集積機構の解明

研究課題名(英文)Multi-mineral accumulation in Lotus japonicus

研究代表者

古川 純 (FURUKAWA, Jun)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40451687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミヤコグサ主要実験系統B-129とMG-20の間で認められる複数金属の集積特性の差異について、亜鉛ならびにセシウムを主な対象として元素動態解析と遺伝子発現解析を中心とした検討を行った。複数金属の集積を統合的に制御するような機構についてはその有無を含め未だ明らかではないものの、いずれの金属元素においても欠乏などの外部栄養環境の変化に対してB-129系統がより積極的に輸送系の活性を制御する傾向を有していることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Multi-mineral accumulation observed in Lotus japonicus B-129 line, compared to MG-20 line, was investigated based on mineral behavior within the plant and gene expressions in the root tissue. In this research, zinc and cesium were focused on as one of the essential and non-essential element for plant, respectively. Although the integrated mechanism regulating the accumulation of multi-mineral was not clear, the highly controlled mineral transport system in B-129 involved in the adaptation to the nutrition deficiency for essential element was observed. And that suggests the multi-mineral accumulation in B-129 is the results of the difference of the regulation pattern of mineral acquisition and transport.

研究分野：植物栄養・生理学

キーワード：QTL解析 ミヤコグサ 亜鉛 セシウム 環境応答

1. 研究開始当初の背景

陸上植物における金属集積には根圏からの吸収、導管への積み込み、地上部への輸送、地上部における器官から細胞レベルにおける分配、局在、隔離など様々な機構が関与している。また生体内で保たれる様々な金属の恒常性は、特定の金属に対してただ一つの機構が働くのではなく、多くの機構が協調して機能することによって保たれていると考えられる。また金属輸送体の多くは複数の金属に対する輸送活性を持つことなどから、ある遺伝子が決まった金属だけでなく、複数の金属の恒常性維持に関与する可能性も示されている。これまでに個々の金属輸送体やメタロチオネインなどに対する研究は国内外で実施されているが、それら遺伝子機能の解析と、生体内に含まれる様々な金属元素の動態を網羅的に解析するメタロミクス手法を組み合わせて進められた研究は少数であった。

研究代表者はミヤコグサの主要実験系統である Gifu B-129 (以下 B-129) と Miyakojima MG-20 (同 MG-20) を用いた水耕栽培でのメタロミクス解析から、B-129 が MG-20 に比べ Na、Mn、Ni、Cu そして Zn を、地上部・根組織それぞれで 2~3 倍まで集積していることを明らかにしてきた。また、根における遺伝子の網羅的発現解析から、B-129 における金属蓄積への関与が期待される候補遺伝子を複数獲得し、また、これらの系統間で作成された交配後代を用いた Zn 集積に関する QTL 解析 (着目した機能に関与することが期待される遺伝子がゲノム上のどこに存在するのか位置を特定する解析) から、計 16 箇所の Zn 集積関連 QTL 領域を得ていた。個々の金属集積関連遺伝子の機能を明らかにすることは、植物の養分吸収機構を解明する上で重要な過程であるが、メタロミクス解析により植物中における複数の金属元素の挙動に共通性が認められたことから、それらの活性を統合的に制御している情報伝達機構について解析を進める上で、ミヤコグサは極めて優れた特徴を有する材料であると考えられた。ミヤコグサ B-129 で認められたような複数元素を同時に集積する現象の一例として、これまでにシロイヌナズナの *FRD3* 欠損株における Mn、Cu、Zn および Mg 集積の増加が報告されていた。*FRD3* はクエン酸を導管内に分泌することにより、Fe の地上部への導管内輸送を促進しており、欠損株での複数金属の集積は、地上部の Fe 含量が低下することによって誘導される Fe 獲得機構の副次的な影響であるとされている。ミヤコグサ B-129 においても MG-20 に比べて Fe 含量が根で多く、地上部で少なくなっていることなどから、*FRD3* 欠損シロイヌナズナと同様な Fe の輸送機能の低下が原因となっていると予測されたが、集積される元素が異なるなど別個の金属集積機能に作用している可能性も考えられた。以上からミヤコグサ B-129 に

おけるマルチミネラル集積が、地上部組織における Fe 欠乏によって誘導される現象であるかを明らかにし、誘導される機構を構成する具体的な遺伝子の同定と、その制御機構について解明することが重要であると考えられた。特に複数の金属元素を同時に集積するような制御機構を明らかにすることで、これまで明らかになっている個々の金属を対象とした集積機構との比較により、複数の金属の集積に関与する機構と、特定の金属の集積に関与する機構を個別に理解するための知見が得られ、植物の金属集積機構の協調性と独立性が示されることが期待された。

2. 研究の目的

ミヤコグサ B-129 と MG-20 間では複数の金属元素の集積量ならびに輸送活性が異なっており、また B-129 では地上部・根組織間の Fe 含量の比率が大きく根に偏っていること、そしてシロイヌナズナで報告されている地上部 Fe 欠乏により誘導されるマルチミネラル集積の知見から、前述の QTL に地上部の Fe 欠乏を介して Zn 集積の原因となる遺伝子が含まれていることが予測される。特に、根における Fe の導管内への輸送に関与すると報告されている輸送体 *IREG* をコードする相同遺伝子を、5 個含む QTL 領域がこれまでの解析結果から得られており、重点的に関与の有無を検証する必要があると考えられた。本研究では Zn 集積関連 QTL に座乗する遺伝子について、候補遺伝子の同定などを行うが、Zn 集積のみならず他の金属元素集積の観点からもこれらの解析を行うことで、B-129 の有するマルチミネラル集積能が Fe の吸収・輸送機構を介したものであるか、また Fe や他の金属元素の集積機構がどのような情報伝達経路により活性化されるのかを明らかにすることを目的とした。さらにミヤコグサ B-129 と MG-20 について必須元素以外の金属含量についても解析を行い、B-129 で活性化されているミネラル集積能によって影響を受ける元素についての知見を得ることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミヤコグサ B-129 および MG-20 における Fe 欠乏応答遺伝子の発現解析: シロイヌナズナにおいて Fe 欠乏時に発現が誘導されることが知られている既知遺伝子 *IRT1* について、ミヤコグサの相同遺伝子をクローニングした。B-129 と MG-20 間で発現量が異なる条件を確認した後、B-129 で Fe 欠乏応答が誘導されていることを示すマーカーとして使用した。

(2) B-129 および MG-20 における Zn 欠乏応答解析: 先行研究で明らかにした Zn 集積に関連する 16 箇所の QTL 領域には、合計で 12 個の既知金属輸送関連遺伝子の相同遺伝子が含まれていることから、B-129、MG-20 そ

れぞれにおけるこれらの遺伝子の発現誘導を Zn 欠乏・過剰条件下で検証し、Zn 含量に対応した発現誘導・抑制を示す遺伝子が存在するかを明らかにした。また植物体に Zn の放射性同位元素である Zn-65 を 2 日間吸収させ、ガンマカウンタ、オートラジオグラフィならびに PETIS(Positron Emitting Tracer Imaging System)法により Zn 集積・輸送の特性を比較した。

(3) Zn 集積関連 QTL に座乗する Fe 集積関連遺伝子の機能解析: これまでの知見から、複数金属元素の同時集積には Fe 欠乏応答の関与が示唆されていることから、Zn 集積に関連する QTL として得られた QTL についても、直接的には B-129 における地上部組織での Fe 欠乏の原因となっている遺伝子が座乗している可能性がある。特に第 3 染色体に推定された QTL の領域内には、シロイヌナズナの根において導管内へ Fe を輸送しているとの報告がある *IREG* の相同遺伝子が 5 個近傍に存在していることがミヤコグサのゲノム情報から判明している。これらの遺伝子の発現量や全長アミノ酸配列を B-129、MG-20 間で比較することにより、系統間で Fe 含量を変化させている候補遺伝子の探索を行った。

(4) B-129 の非必須元素に対する集積能力の検証: B-129 と MG-20 を非必須元素としてセシウムの添加条件下でも生育して解析を行った。これにより B-129 のマルチミネラル集積能について非必須元素への応用についての知見を得た。

4. 研究成果

(1) ミヤコグサ B-129 と MG-20 における複数元素の集積・輸送活性の差異、ならびに B-129 の Zn 集積を制御すると予測される 16ヶ所の QTL について、QTL 領域に存在している金属輸送に関わる可能性のある候補遺伝子の発現解析を播種後 4 週の植物を用いて行った。B-129 が示すマルチミネラル集積能への Fe 欠乏の関与を明らかにするため、植物体が Fe 欠乏に対する応答反応が活性化された状態にあるかを判定するマーカー遺伝子を選抜したところ、根圏から二価 Fe イオンを吸収する輸送体である *IRT1* をコードする遺伝子が栄養成長期の B-129 で高発現していることが明らかとなり、以降はこの発現を鉄欠乏の指標として解析を行った。

(2) Zn 集積関連 QTL 上に座乗している Zn 輸送関連遺伝子の発現について、水耕液中の亜鉛濃度を通常(0.4 μ M)、欠乏(無添加)、過剰条件(40 μ M)に設定し、4 週間生育させて比較したところ、細胞膜局在型の Zn 取込み輸送体である ZIP2 をコードする遺伝子の発現パターンが B-129 と MG-20 で異なっており、B-129 のみで亜鉛欠乏時に増加、過剰時に減少していることが明らかとなった(図 1)。ミヤコグサ

の ZIP2 と最も相関性が高かった同じくマメ科植物のタルウマゴヤシにおける ZIP2(MtZIP2)を対象とした報告から、根圏の Zn 濃度が高い際に発現量が増加し、導管からの再吸収を根で行うことで地上部への過剰な Zn 輸送を防ぐ機能を果たしている可能性が示唆されていたが、B-129 での ZIP2 発現パターンは逆の傾向を示していた。ZIP2 のミヤコグサにおける機能については、根組織内での発現部位などを明らかにすることで、導管からの再吸収を介したイオン輸送の制御について新たな知見が得られるものと考えられる。

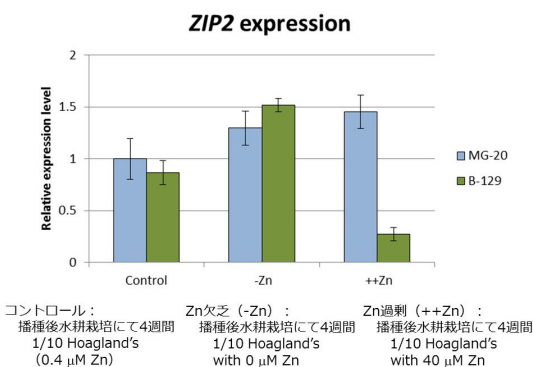


図 1 ミヤコグサ ZIP2 の亜鉛欠乏/過剰条件下での発現解析

(3) *IRT1* が高発現している条件下で、QTL 上に座乗している Fe 輸送関連候補遺伝子の発現を比較したところ、地上部への Fe 輸送に関与するとされる遺伝子 *IREG* の相同遺伝子の発現量に系統間差は認められなかった。このため特に *IREG* が連続しているとされた QTL 領域の B-129 と MG-20 の配列比較を行ったところ、領域内に存在する *IREG* は 2 つのみであり、タンパク質をコードする領域の塩基配列にも系統間差が認められなかった。そこで研究期間中に改めて実施されたゲノム情報の再解析によって更新されたゲノムと情報を基に QTL 解析を改めて行ったところ、これまで対象としてきた領域に一致するような QTL を得ることができなかった。

(4) ゲノム情報等の更新を受け、生理的な元素動態に主眼を置いた解析を優先することとし、Zn 欠乏に対する ZIP2 の発現誘導がミヤコグサ B-129 系統の植物体において既報の研究と異なっていたことに着目した解析を行った。鉄欠乏条件下で、水耕液中の亜鉛濃度を通常、欠乏、過剰条件に設定して 4 週間生育させ、その後亜鉛の吸収、輸送、蓄積について解析を行った。亜鉛動態についてはその詳細を日本原子力研究機構高崎量子応用研究所に設置されている PETIS を用いて陽電子放出核種である Zn-65 による非侵襲でのリアルタイム解析を行った。欠乏区では亜鉛のきわめて速やかな地上部組織への輸送が認められたものの、過剰区では投与した亜鉛の多くが根部にとどまっておき、通常の亜鉛濃度で栽培した B-129 で認められる地上部へ

の亜鉛集積は亜鉛環境の変化によってさらに誘導あるいは抑制が強まることが明らかとなった(図2)。また、この誘導と抑制自体はMG-20でも同様であったこと、水耕液中の鉄濃度を増やし、鉄欠乏を緩和した植物体を用いても亜鉛の吸収量に顕著な変化が認められなかったことから、B-129の示す地上部への優先的な亜鉛輸送活性制御には鉄欠乏応答機構の寄与は小さいという可能性が示された。

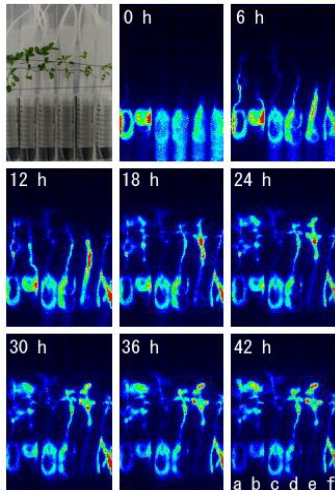


図2 亜鉛欠乏/過剰条件下における亜鉛の挙動

a, b, c: MG-20
d, e, f: B-129

a, d: 通常
b, e: Zn 欠乏
c, f: Zn 過剰

(5) B-129とMG-20間で発現ならびに亜鉛環境への応答で差異が認められているZIP2に着目し、推定されている機能を基にコンパートメントモデルによる亜鉛動態の数理的な解析を実施した。PETIS法によって取得された亜鉛動態を地上部、根、水耕液に分けて定量化した(図3)。ZIP2の機能を既に報告のあ

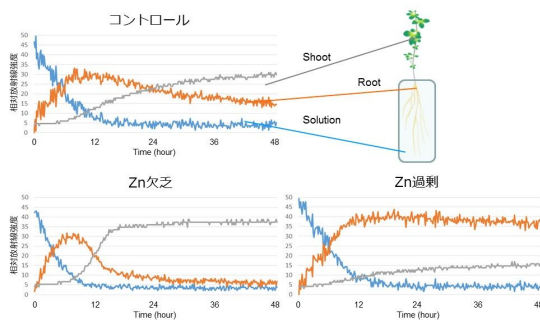


図3 PETIS法によって取得されたB-129系統の亜鉛欠乏/過剰条件下における亜鉛挙動

る根における導管からの亜鉛再吸収と仮定して、地上部、根、導管内、水耕液における亜鉛プールを設定し、亜鉛環境に応答した導管への亜鉛積み込みの活性の算出を試みた(図4)。図1に示されるZIP2の発現量を導管から根への亜鉛回収活性とし、PETIS法による定量値の変化に合致するように積み込み活性を変動させると、コントロール条件下における亜鉛積み込み活性をそれぞれ基準とした場合、B-129では亜鉛欠乏時が4.00倍、

過剰時が0.05倍に、MG-20では欠乏時が1.05倍、過剰時が0.38倍となり、MG-20に比べB-129で4-7倍大きく変動していると算定された。このような系統間での亜鉛環境に対する恒常性維持機構の違いがミヤコグサの亜鉛集積活性の違いに強く関与していると示唆された。

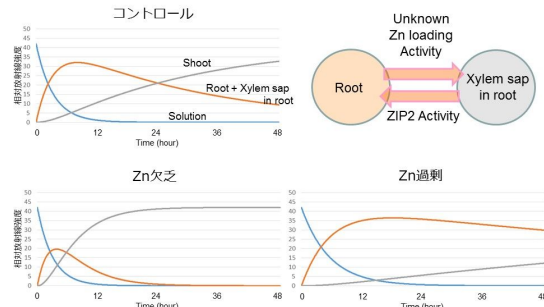


図4 導管への亜鉛輸送活性を変化させたモデルシミュレーションによる各プールの亜鉛含量推定値の経時変化

(6) 必須元素以外の金属としてセシウムについて集積能を検証した結果、カリウム欠乏時に根におけるセシウム濃度が両系統で異なり、B-129で約3倍となることが明らかとなった。カリウム欠乏時の既知応答機構の知見から欠乏シグナルを伝える転写因子であるRAP2.11に着目して発現解析を行ったところ、B-129の根で同程度の発現誘導が生じていることが明らかとなった。亜鉛同様に栄養環境への適応反応の強さが異なることで蓄積量が変動していると考えられ、亜鉛ならびにカリウムに対する吸収・輸送機構の反応性の高さがミヤコグサB-129におけるミネラル集積機構に関わっており、かつその制御系は独立しているか、あるいは既知の遺伝子発現に対する制御よりもさらに上流で支配されているという可能性が示唆された。

本研究によりミヤコグサにおける亜鉛やセシウムの動態ならびに輸送制御機構の一端が明らかとなった。今後複数の金属元素の挙動を統合的に制御するような機構の有無、あるいはそれを構成する具体的な遺伝子を持つために、B-129系統の有する特徴的な性質が活用されることが期待される。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

古川 純、鈴井 伸郎、尹 永根、石井 里美、野田 浩希、野田 祐作、河地 有木、

藤巻 秀、佐藤 忍、ミヤコグサにおける亜鉛吸収動態と輸送関連遺伝子の発現解析、第51回アイソトープ・放射線研究発表会、2014年7月7日、東京大学農学部（東京都・文京区）

野田 浩希、古川 純、佐藤 忍、QTL解析を用いたミヤコグサにおける放射性セシウム吸収関連遺伝子の探索、第51回アイソトープ・放射線研究発表会、2014年7月7日、東京大学農学部（東京都・文京区）

古川 純、岩田 佳晃、高野 葵、佐藤 忍、Identification of the candidate genes regulating shoot zinc accumulation in *Lotus japonicus*, 17th International Plant Nutrition Colloquium, 2013年8月19日-22日、イスタンブール(トルコ)

〔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〕

(1)アウトリーチ活動

佐藤 忍、古川 純、植物の根と導管液、つくばサイエンスコラボ 2014、2014年11月8-9日、つくばカピオ(茨城県つくば市)

佐藤 忍、古川 純、植物の根と導管液、国際植物の日、2014年5月18日、筑波大学(茨城県・つくば市)

佐藤 忍、古川 純、植物の根と導管液、つくばサイエンスコラボ 2013、2013年11月9-10日、つくばカピオ(茨城県つくば市)

佐藤 忍、古川 純、植物の根と導管液、国際植物の日、2013年5月18日、筑波大学(茨城県・つくば市)

佐藤 忍、古川 純、植物の根と導管液、つくば科学フェスティバル 2012、2012年11月17-18日、つくばカピオ(茨城県つくば市)

(2)ホームページ等

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~plphys/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 純 (FURUKAWA, Jun)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40451687