

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05754

研究課題名（和文）オーキシン作用における亜鉛輸送体の役割

研究課題名（英文）The role of zinc transporters in auxin signaling

研究代表者

河内 美樹（Kawachi, Miki）

名古屋大学・生命農学研究科・学振特別研究員(RPD)

研究者番号：40625125

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：植物の小胞体に局在する亜鉛輸送体IAR1が、オーキシン作用に寄与するメカニズムとその生理的役割の解明のため、IAR1欠損株を用いた表現型解析、ホルモン解析、トランスクリプトーム解析を行った。IAR1は浸透圧ストレスに対する初期の一時的な側根形成促進に必要であり、IAR1による小胞体からの亜鉛輸送が、活性型ホルモンレベルの調節を通じてIAAアミノ酸縮合体介在性のオーキシンシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、小胞体からの亜鉛輸送が浸透圧ストレス下での植物の側根形成に影響を与えることが示された。亜鉛輸送体が環境ストレスに応答した植物の成長制御に関与することを示す本成果は、将来的には環境ストレス耐性の高い農作物の作出に役立つ可能性がある。また、亜鉛輸送体が活性型の植物ホルモンの量の調節に寄与することやそれに関与する遺伝子群を明らかにするなど学術的にも意義のある新たな知見をもたらすことができた。

研究成果の概要（英文）：Our research focused on Arabidopsis IAR1, a zinc transporter found in the endoplasmic reticulum (ER) of plant cells. Utilizing IAR1-knockout plant for phenotypic, hormone, and transcriptome analyses, we revealed the physiological role and mechanism of IAR1 in auxin regulation. We observed that IAR1 is vital for the preliminary transient encouragement of lateral root formation in response to osmotic stress. The findings indicated that zinc transport from the ER by IAR1 could be crucial for auxin signal delivery via IAA amino acid conjugates, through the regulation of active hormone levels.

研究分野：植物生理

キーワード：亜鉛輸送体 オーキシン

1. 研究開始当初の背景

インドール-3-酢酸 (IAA) は、植物の成長を制御する主要な天然オーキシンであり、その濃度に応じて成長を促進または抑制する作用を持つ。IAA は遊離状態で活性化し、環境に対応した成長制御に重要な役割を果たす。植物は IAA のレベルを、IAA を不活性化するアミノ酸縮合体の形成と、それらの縮合体を再活性化させる加水分解によって調整する。

先行研究で IAA-Ala 耐性を持つシロイヌナズナ変異体のスクリーニング から *iar1* (IAA-Ala resistant 1) が単離され、その原因遺伝子 *IAR1* が金属輸送体である ZIP ファミリーに属することが報告された。*iar1* は IAA 処理した際に根の伸長が抑制される。また、IAA-Ala は小胞体 (ER) 内の加水分解酵素 IAR3 により活性型の IAA へと加水分解されることが知られている。これらのことから、*iar1* は ER 内の金属イオン濃度が高くなり、それにより IAR3 の活性が阻害され、IAA の生成が抑制され、根の伸長抑制は起こらないと考えられている。しかし、*IAR1* の輸送基質や局在については不明なままであった (Lasswell et al., 2000)。一方、我々はこれまで、植物の亜鉛恒常性を解明することを目的とし、複数の亜鉛輸送体について研究を進めてきた。その中で *IAR1* が ER に局在する亜鉛輸送体であることが明らかになった。*IAR1*-mGFP の解析から、*IAR1* が根の ER で発現し、特に根の先端と側根原基で発現が高いことも確認した。しかし、*IAR1* 欠損株では、亜鉛欠乏状態でも亜鉛過剰状態でも表現型は見られず、亜鉛含量も野生品種と有意差はなかった。依然、*IAR1* による亜鉛輸送がどのように IAA-Ala 耐性機構に寄与するのか、そして *IAR1* の生理的役割についての理解は不十分で、これらの未解明な点を解決することで、亜鉛とオーキシン作用の関係を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

これまでの研究結果から、*IAR1* が ER 局在型の亜鉛輸送体であることが示され、それにより亜鉛とオーキシンの関連性が明らかになった。しかし、*IAR1* による亜鉛輸送がオーキシン作用にどのように関与し、どのような生理的役割を果たしているのかはまだ解明されていない。我々は、*IAR1* が Zinc finger モチーフを持つ転写因子やキナーゼなどの亜鉛結合タンパク質に亜鉛を供給することで、ER で発生した IAA のシグナル伝達を遂行させる役割を持っているのではないかと推測している。特定のストレス状態下で、環境に適応した成長制御のために ER で IAA が生成され、*IAR1* がそのシグナル伝達に関与する分子に亜鉛を供給し活性化する役割を果たす可能性も考えられる。これらの仮説を検証するための実験を進行させることで、亜鉛輸送体 *IAR1* が関与するオーキシン作用機構とその生理的役割を明らかにすることを目的とする。オーキシン研究の歴史は長く、オーキシンの生理作用については多くの知見が得られているが、その作用機構についてはまだ未明な部分が多い。「亜鉛」という新規視点からオーキシン作用機構を理解し、環境適応能力の向上した作物の開発のために有用な知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) ホルモン解析

1/2 MS 寒天培地で育成した 2 週齢の *IAR1* 欠損株および野生株 (Col-0) の根を、40 μ M の IAA-Ala、IAA-Leu、または IAA-Phe 水溶液に 24 時間漬けた。処理後、根を超純水で洗浄し、40

個体の根をサンプルチューブに計量し、液体窒素で急速凍結した。根に含まれるホルモン (tZ, tZR, tZRPs, cZ, cZR, cZRPs, DZ, DZR, DZRPs, iP, iPR, iPRPs, tZ7G, tZ9G, tZOG, cZOG, tZROG, cZROG, tZRPsOG, cZRPsOG, DZ9G, iP7G, iP9G, GA1, GA4, ABA, SA, JA, IAA, IAA-Asp, IAA-Ala, IAA-Ile, IAA-Leu, IAA-Phe, IAA-Trp, JA-I) の一斉解析を、理化学研究所 環境資源科学研究センターの植物ホルモン解析支援により実施した。解析は3連で行い、統計解析ソフトウェア JMP を用いて有意差検定を行った。

(2) DR5::GFP レポーター解析

オーキシン誘導性 DR5::GFP レポーター形質転換体 Col-0 と *IAR1* 欠損株のかけ合わせにより、DR5::GFP レポーターが導入された *IAR1* ホモ欠損株を作成した。*IAR1* 欠損は PCR 法により、DR5::GFP は花粉の蛍光顕微鏡観察によりホモの個体を選抜した。得られた種子を 1/2 MS 培地で栽培した 1 週齢の植物を、コントロールとして超純水、過剰亜鉛水溶液、EDTA 水溶液、NaCl 水溶液、マンニトール水溶液で数時間から一日処理し、GFP 蛍光の観察を蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

(3) トランスクリプトーム解析

2 週齢の野生株 Col-0 と *IAR1* 欠損株を使用した。これらの植物に 40 μ M の IAA-Ala を処理し、コントロールグループには水溶液を処理した。各サンプルは 5 個の植物体から作成され、実験は 3 連で行った。IAA-Ala の処理後 24 時間経過したところで、各植物の地上部と根を切り分けた。そして、根の部分だけをジルコニアビーズを入れたサンプルチューブに収集し、すぐに液体窒素で凍結した。レチミルを用いて試料を粉碎し、その後、RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を株式会社マクロジェンジャパンに送り、NovaSeq6000 を用いた次世代シーケンス解析サービスを利用して、トランスクリプトーム解析を行った。

(4) *IAR1* 欠損株の表現型解析

1/2 MS 寒天で 1 週間栽培した *IAR1* 欠損株と野生株を、1/2 MS 寒天培地またはマンニトールが加えられた 1/2MS 寒天培地に植え替えた。その後、3 日後、4 日後、5 日後という時間帯で側根の数を計測した。実験は、24 個体を 1 セットとして行った。

4. 研究成果

論文投稿準備中の未発表データを含むため、後日結果も含む報告書と差し替えをする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Miki Kawachi, Arnaud de Ruffray, Bianka Wehr, Wiebke Moebius, Kerstin Schmitt, Oliver Valerius, Hitoshi Sakakibara, Stefan Scholten
2. 発表標題 Isolation and characterization of small RNA-containing vesicles from maize pollen
3. 学会等名 The 26th International Conference on Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河内美樹, 小嶋美紀子, 竹林裕美子, 榊原均
2. 発表標題 シロイヌナズナ垂鉛輸送体 IAR1 変異体のトランスクリプトームおよびホルモン解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miki Kawachi, Arnaud de Ruffray, Kerstin Schmitt, Oliver Valerius, Hitoshi Sakakibara, Stefan Scholten
2. 発表標題 Characterization of small RNA-containing maize pollen vesicles by LC/MS analysis
3. 学会等名 4th European maize meeting (国際学会)
4. 発表年 2021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	Georg August University of Goettingen	Max Planck Institute	