

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06318

研究課題名（和文）イメージングによる植物細胞間のリン動態解析

研究課題名（英文）Phosphate dynamics analysis between plant cells by imaging

研究代表者

菅野 里美（Kanno, Satomi）

名古屋大学・高等研究院・准教授

研究者番号：20586010

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）：イメージセンサーを使った新たな実験系についてテスト検出を重ね、既存の機器では実現できなかった空間分解能（15-20マイクロメートル）を持つことを確認した。さらに予想外の結果として感度を大幅に向上することを確認し、これまでに検出限界以下であった現象を検出できる可能性を見出すことができた。根の細胞ごとにリンの集積が異なることを見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は生育のために17種類の元素をバランスよく吸収する必要がある。そのため農業生産において施肥は欠かせない。作物が必須元素の過不足をどのように感知し、それらの吸収を制御し、一生のうちにどれほど元素を吸収するのか基礎的な理解が深まれば、効率的な施肥法への応用の可能性を持つ。本研究では、イメージセンサーを使った元素の挙動解析システムを立ち上げ、根が外界から取り組んだ元素の挙動を細胞ごとに捉え、植物へ与えた元素の吸収メカニズムを明らかにするものである。

研究成果の概要（英文）：I established an imaging experiment system with a new idea using a image sensor and confirmed that it has a spatial resolution (15-20 micrometers) that could not be achieved with existing equipment. Furthermore, as an unexpected result, we confirmed a significant increase in sensitivity (about 100 times) and found the possibility of detecting phenomena that were previously below the detection limit. In Plant roots, the system is able to capture as an image the different accumulation of phosphoric acid in each cell.

研究分野：植物生理学

キーワード：リン トランスポーター イメージング 肥料

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は水、光、栄養元素や病原菌など生育環境を認識しその環境に適した生育応答を示す。これらさまざまな生育応答を促す環境からのシグナルと植物細胞の遺伝子発現の ON/OFF についてモデル植物の変異体解析から分子機構が明らかにされてきている。栄養元素量についても例えば、窒素に関しては細胞膜上の硝酸トランスポーターは外界の窒素レベルの感知に関わる可能性 (Ho *et al.*, 2009)、転写因子 NLP による分子制御機構が明らかにされている。本研究で注目しているリンの場合は主要なトランスポーターに感知機構が無いと考えられており (Ayadi *et al.*, 2015)、細胞質のイノシトールリン酸を介した SPX タンパク質と PHR 転写因子の結合の有無が下流のリン応答遺伝子群の制御に働くと考えられている。しかしながら、植物が吸収したリン酸がどのように細胞質でイノシトールリン酸に代謝されているのか、その反応経路の全貌を含め、感知機構についてはいまだ説明を要するところである。また、植物体個体では、リン欠乏時に葉から根へ microRNA がシグナル分子として送られること (Chiou *et al.*, 2011) など全身を統一するような制御機構が報告されている。応募者は、これまでの自身の研究の中でリン酸の輸送は植物の器官ごとの不均一さから、植物体個体として考えた際にリン感知は器官ごとのリン要求量と供給量に応じて局所的に生じているのではないかと考えた。そこで植物の栄養環境感知において「植物体全体として体内外の栄養環境の認識を統一して応答するのか、それとも個々の器官ごとに局所的に反応しているのか」という疑問が生じた。

2. 研究の目的

本研究では栄養元素のうちリンに注目し、植物組織に局所的に与えたリン酸情報の時空間的広がりを明らかにし、リン応答マーカー遺伝子応答が植物体の器官ごとに異なるかどうか明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、(1)リントレーサ挙動解析、(2)リンの化学形態解析、(3)リン応答マーカー遺伝子発現解析の3点において解析を進めていく。

(1)リントレーサ挙動解析

・個体レベルでの詳細な解析

モデル植物のシロイヌナズナを用いて根の一部に施与した P-33 リン酸トレーサの時空間的広がりを使用して定量的に測定する。これまでの先行研究の結果から、リン施与後 30 分間には遺伝子発現変動は生じていることが明らかであることから施与から 120 分間の間での測定を行う。

・組織レベルでの詳細な解析

応募者はこれまでの研究の中で顕微鏡下での放射性トレーサ解析システムを開発した (Kanno *et al.*, 2012)。しかしながら、蛍光タンパク質での遺伝子発現解析に比較して画像空間分解能が低いこと、レンズによる収差がリンの定量解析に影響するのが問題であった。そこでイメージセンサでの検出系への改良し、検出を試みる。

(2)リンの化学形態解析

投与したリン酸は ATP や脂質や核酸などあらゆるものに代謝されるが、本研究において注目するのは無機リン酸とイノシトールリン酸の存在量である。現在、リン応答分子機構において SPX タンパク質は最上流にあり、SPX ドメインはイノシトールリン酸と結合することが報告されている (Wild *et al.*, 2016)。本研究では、何処にどれだけのリン酸およびイノシトールリン酸 (InsP_6 、 InsP_7 、 InsP_8) が存在することが遺伝子発現応答を促すのかを理解する。器官レベルの視点から(1)のサンプルを器官ごとにサンプリングし、LC-MS による分析を予定している。一般的な LC ではリン化合物の分析はその金属キレート性を持つ性質から分析が難しいが、新たに開発された専用カラムでの測定の可能性を探る。

(3)リン応答マーカー遺伝子発現解析

先行実験において絞り込んだリン酸投与後、植物体内のリン酸量上昇と遺伝子発現量に相関のある遺伝子群をマーカーとして使用する。これらのプロモータ領域を利用したレポーターライオンを用いて、リンの局在と遺伝子発現組織の関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 個体レベルでの時空間広がりについて、地上部もしくは根の一部に投与した P-32 の植物体内での分配をイメージングにより測定した。その結果、10 日栽培したシロイヌナズナを用いて我々の実験条件下では、10 分以内に個体全体から P-32 シグナルが検出された。このことから、一部から投与したリン酸シグナルはその集積に器官や組織間の差が生じるものの、個体全体への分配は分単位で生じるイベントであることが示された。集積の違いの経時変化について器官ごとの詳細な解析を引き続き進めている。

(2) 組織からのイノシトールリン酸の抽出について、動物細胞でのプロトコルを基本にチタン

ビーズを使う検出系についてプロトコル作成を進めた。今後、(1)と(3)の結果に合わせて(3)の検出を進めていきたい。

(3)先行研究で絞り込んだリン酸応答マーカー遺伝子のうち、遺伝子 A のプロモーター-GUS のラインは、根の皮層細胞の一部にシグナルが見られる現象があった。そこで、(1)で新たに構築したイメージセンサ検出系によって、シロイヌナズナの根での P-32 の集積をイメージングしたところ、細胞ごとに集積が異なることが確認できた(図 1)。 (1)の P-32 の分布とこれらのマーカー遺伝子の発現局在について引き続き解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuko Kurita;Satomi Kanno;Ryohei Sugita;Atsushi Hirose;Miwa Ohnishi;Ayumi Tezuka;Ayumi Deguchi;Kimitsune Ishizaki;Hidehiro Fukaki;Kei'ichi Baba;Atsushi J Nagano;Keitaro Tanoi;Tomoko M Nakanishi;Tetsuro Mimura	4. 巻 45
2. 論文標題 Visualization of phosphorus re-translocation and phosphate transporter expression profiles in a shortened annual cycle system of poplar.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant, cell & environment	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Laure Genies;Ludovic Martin;Satomi Kanno;Serge Chiarenza;LoicCarasco;Virginie Camilleri;Alain Vavasseur;Pascale Henner;Nathalie Leonhardt	4. 巻 173
2. 論文標題 Disruption of AtHAK/KT/KUP9 enhances plant cesium accumulation under low potassium supply.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiologia plantarum	6. 最初と最後の頁 1230-1243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pp1.13518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Alaa Allaham, Satomi Kanno, Liu Zhang, Akiko Maruyama-Nakashita	4. 巻 21
2. 論文標題 Sulfur Deficiency Increases Phosphate Accumulation, Uptake, and Transport in Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21082971	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 該当する

〔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 ALLAHHAM Alaa, 菅野里美, 張柳, 丸山明子
2. 発表標題 硫黄不足によるリン酸の吸収と地上部への輸送の促進
3. 学会等名 トランスポーター研究会
4. 発表年 2020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			
フランス	CEA			