

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658065

研究課題名(和文)植物体の地上部に高濃度の亜鉛を蓄積させる篩管内を長距離移行するシグナルの解明

研究課題名(英文) Detection of signals that are transported via sieve tubes and induce activation of zinc movements in oilseed rape plants

研究代表者

中村 進一 (Nakamura, Shin-ichi)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00322339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究でグルタチオンを植物(アブラナ)の葉に部位特異的に与えると植物体の地上部に移行・蓄積する亜鉛(Zn)の量が有意に増加する現象を見出している。この現象は葉に与えたグルタチオンによって誘導されたシグナルが篩管内を長距離移行して、根において機能して起こると考えられた。この篩管を長距離移行するシグナルの候補として、グルタチオンやタンパク質に着目した。葉におけるグルタチオン処理に应答した篩管液グルタチオンや篩管液タンパク質の変化を観察することができた。ポジトロンイメージング実験ではグルタチオンによって亜鉛の吸収や移行が活性化されている様子を可視化することができた。

研究成果の概要(英文)：Application of glutathione to leaves activated Zn absorption in roots, Zn transport and Zn accumulation in shoots in oilseed rape plants. These activations are induced by some signals that are transported via sieve tubes. The ratio of glutathione, reduced form, to glutathione, oxidized form, has changed by application of glutathione to leaves site-specifically. Abundance of several proteins in sieve tubes also has changed by glutathione treatment. These substances in sieve tubes were expected to be signals. Positron imaging experiments enabled us to visualize Zn movements in oilseed rape plants treated with glutathione.

研究分野：植物栄養学

キーワード：グルタチオン 亜鉛 篩管

## 1. 研究開始当初の背景

我々の食を取り巻く問題のひとつにヒトにとっての必須元素である亜鉛(Zn)の摂取不足の問題がある。Znの推奨摂取量は男性で1日あたり約12mg、女性で約9mgである(日本人の食事摂取基準(2010年版 厚生労働省))。しかし、近年の食生活の変化が我々にZn摂取量の低下をもたらし、実際のZn摂取量は男性で1日あたり約9mg、女性で約7mgにとどまっている。その結果、我々は恒常的なZn摂取不足の状態になっている。Zn摂取不足の問題は味覚異常、免疫力の低下など我々に深刻な健康障害をもたらす要因となる可能性を秘めている。このようなZn摂取不足の問題を解決するためには、Znを高濃度を含む食材を恒常的に摂取することが効果的である。しかし、レバーや貝類などのZnを高濃度を含む食材を恒常的に摂取し続けることは現実的ではない。そこで日々の食卓にのぼる野菜に含まれるZn含量を高めることができれば、このZn摂取不足の問題を解決するための有効な手段になりうると考えた。我々の研究グループは野菜類のなかでも特に葉物野菜に注目している。これまでも農作物の亜鉛含量を高める試みとして、植物体内における亜鉛動態に関与するトランスporter遺伝子を同定し、それらの遺伝子の植物体内における発現レベルを調節することや、植物に与える亜鉛量を増やすことなどが検討されてきた。しかし、これらの方法はいずれも広範囲に利用される栽培技術には結びついていない。

我々の研究グループでは、植物体内の重金属元素動態を解明し、それらを制御することによって農作物に付加価値をもたらすことを目指して研究を行ってきた。これまでの研究において、生理活性ペプチドの一種であるグルタチオンを植物(アブラナ)の葉に部位特異的に与えた時に、植物体の地上部に移行・蓄積するZn量が有意に増加する現象を見出すことに成功した。葉に与えたグルタチオンによって、根におけるZn吸収やZnの地上部への移行が活性化したことは、葉に与えたグルタチオンによって誘導されたシグナルが篩管内を長距離移行して、根において機能したためであると考えられた。この篩管内を長距離移行するシグナルを同定し、この現象の分子メカニズムを解明し、それらを応用展開していくことが、遺伝子組み換え技術を利用せず、しかも栽培環境に負担もかけない新たな亜鉛高蓄積作物の栽培技術を確立することに繋がる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はこれまでの研究で明らかにすることができたアブラナの葉に部位特異的にグルタチオンを与えることが、植物体の地上部に蓄積するZn量を有意に増加させる現象の分子メカニズムを解明することである。メカニズム解明のための端緒として、維管束組織である篩管に特に着目した。葉に与えたグルタチオンが根において機能するためには、篩管の中を長距離移行し、根において機能するシグナルの存在が必須である。本研究ではこのような篩管内を長距離移行するシグナルを同定し、それらを利用することで植物体内のZn動態を制御可能にすることを目指している。本研究を通じて得られる研究成果を応用展開することによって、植物体の地上部(可食部分)に蓄積するZn量を増加させる新たな栽培技術を創出することができればと考えている。本研究を通じて、このような新規栽培技術を創出するための、研究基盤を構築することを目指している。

具体的に検討を行う項目としては、グルタチオン処理が植物のZn含量に及ぼす影響の評価、篩管液中に存在するシグナル伝達物質になりうる物質のグルタチオン処理に対する影響の評価、ポジトロンイメージング技術を用いた植物体内におけるZn動態の定量化、の3つを考えている。

## 3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するために掲げた3つの研究課題に対応して、以下に示すような実験を行った。

### (1) グルタチオン処理が植物のZn動態に及ぼす影響の評価

水耕栽培したアブラナに様々なグルタチオン処理を行い、グルタチオン処理に応答したアブラナにおけるZnの蓄積を調べた。処理後の植物を地上部と地下部に分け、乾燥後に乾物重を測定して生育量を調べた。乾燥したサンプルの有機物を分解後、ICP-発光分光装置を用いて、抽出液中のZn濃度を測定した。乾物重の測定結果及び機器分析の測定結果から、それぞれのサンプル中のZn含量を算出した。測定結果を比較することで、グルタチオン処理がアブラナのZn動態に及ぼす影響を評価した。

### (2) 篩管液中に存在するシグナル伝達物

## 質になりうる物質のグルタチオン処理に対する影響の評価

水耕栽培したアブラナにグルタチオン処理を行い、これまでに我々の研究グループで確立した切断法を用いて篩管液を採取した。篩管内を長距離で移行する物質の中でも、シグナル伝達物質として機能することが推測されるグルタチオンやタンパク質などに着目した。グルタチオンには還元型、酸化型と異なる2つの化学形態が存在する。そして、その存在比も細胞内では重要な意味を持つ。そこで今回の篩管液グルタチオンの分析に当たっては、篩管液の採取時に、グルタチオンが空気中の酸素で酸化することを抑えるため、窒素雰囲気下で篩管液を採取する方法を確立した。この方法を用いることによって実験結果の再現性が格段に向上した。採取した篩管液中のグルタチオン濃度は HPLC 法を用いて測定した。今回、行った HPLC 分析ではグルタチオンの還元型と酸化型を 20 分間で同時に測定することができる。篩管液タンパク質の濃度はブラッドフォード法を用いて測定した。篩管液中のタンパク質組成は篩管液タンパク質を二次元電気泳動によって分離後、蛍光色素によって検出することで調べた。対照区とグルタチオン処理区の篩管液タンパク質の組成を比較し、篩管液タンパク質に対するグルタチオン処理の影響を評価した。

- (3) ポジトロンイメージング技術を用いたグルタチオンに反応した Zn 動態の定量的な解析

ポジトロンイメージング装置で撮像した画像の解析を行い、根へのグルタチオン処理が Zn 動態に及ぼす影響を調べた。イメージング実験では、Zn のポジトロン放出核種である  $^{65}\text{Zn}$  を用いた。カドミウム(Cd)の経根吸収の可視化で確立した実験系を Zn のイメージングにも応用して Zn 動態の可視化を行い、画像解析を行った。

## 4. 研究成果

- (1) グルタチオン処理が植物の Zn 動態に及ぼす影響の評価

これまでに行ってきた研究によって植物(アブラナ)の葉に部位特異的に与えたグルタチオンが植物体の地上部への Zn の移行と蓄積を活性化することが明らかになっている。グルタチオンを与える部位を変えたところ、この現象を引

き起こすのは葉に部位特異的に与えたグルタチオンのみで、根に与えたグルタチオンにはこのような植物体の地上部への Zn の移行と蓄積を活性化する効果がみられないことが明らかになった(図1)。Zn と Cd は植物体内では同じような挙動を示すことが報告されている。しかし、今回得られた実験結果は植物に部位特異的に与えたグルタチオンが体内動態に及ぼす影響は Zn と Cd では全く異なることを示していた。

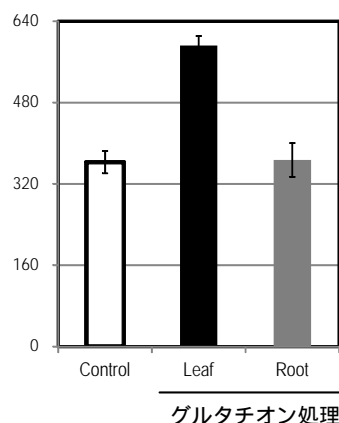


図1 植物に部位特異的に与えたグルタチオンがアブラナの地上部における亜鉛含量に及ぼす影響 縦軸は乾物重 1g 当たりの植物体の地上部の Zn 含量(nmol) 横軸は処理区 グルタチオン処理期間は 10 日間、(n>8)

- (2) 篩管液中に存在するシグナル伝達物質になりうる物質のグルタチオン処理に対する影響の評価

グルタチオン処理を行った植物から篩管液を採取したところ、葉へのグルタチオン処理は篩管液の転流速度には影響を及ぼしていないことが明らかになった。窒素雰囲気下で篩管液を採取することによって、採取したアブラナ篩管液の酸化還元状態の再現性を高めることができた。採取した篩管液のグルタチオン濃度(還元型及び酸化型)を HPLC によって測定した。グルタチオン処理を行わないコントロールの植物から採取した還元型グルタチオン濃度は約 1mM であった。10 日間の還元型グルタチオン処理を行った植物から採取した篩管液の還元型グルタチオン濃度はコントロールの植物から採取した篩管液の還元型グルタチオン濃度と比べて、増加傾向を示していた。一方、葉に酸化型グルタチオン処理を行った植物から採取した篩管液の還元型グルタチオン濃度はコントロールの植物から採取した篩管液の還元型グルタチオン濃度と比べて、減少傾向を示していた。これらの実験結果から、葉に与えるグルタチオンの化学形態によって、篩管液中の還元型グルタチオ

ンが示す応答が異なることが明らかになった。また、篩管液中に存在する還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンの存在比も葉へのグルタチオン処理に応答し、変化することが明らかになった。このような実験結果は、グルタチオン自体が篩管内を長距離移行するシグナルである可能性を示している。

また、篩管液中に存在するタンパク質濃度は葉へのグルタチオン処理に応答して、変化はしていなかった。一方、二次元電気泳動法によって、篩管液タンパク質を分離し、蛍光色素を用いて分離したタンパク質の検出を行ったところ、いくつかの篩管液タンパク質の存在量が葉へのグルタチオン処理に応答して、変化していることが明らかになった。グルタチオン処理に応答して、存在量が増加したタンパク質の中には分子量約14kDa、等電点約5のタンパク質があった。現在、このタンパク質をはじめとするグルタチオン処理に応答した篩管液タンパク質に関して、篩管内及びシンク組織での機能について考察を行っているところである。

(3) ポジトロンイメージング技術を用いたグルタチオンに応答した Zn 動態の定量的な解析

Zn のポジトロン放出核種である  $^{65}\text{Zn}$  を用いて、ポジトロンイメージング実験を行った結果、葉へのグルタチオン処理に応答して、植物の Zn の吸収・移行、蓄積が活性化している様子を可視化することができた。イメージング実験によって得られた実験結果は、これまでのアブラナ栽培試験で得られた実験結果を支持するものであった。

現在はこの3年間の研究期間に得られた研究成果を取りまとめ、学術論文を投稿するための準備を進めているところである。以上のようにして得られた研究成果から、新規栽培技術を創出するための研究基盤を構築することができたと確信している。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

中村進一、鈴木伸郎、加賀光哉、石井里美、尹永根、河地直木、頼泰樹、服部浩之、藤巻秀：グルタチオンの施用がアブラナの亜鉛動態に及ぼす影響、2012年度 日本土壌肥料学会 東北支部会(青森大会) 平成24年7月4日から5日、青森県観光物産館アスパム(青森県青森市)

中村進一、鈴木伸郎、菊池優香、佐々木彩、石井里美、尹永根、河地直木、頼泰樹、服部浩之、藤巻秀：葉へのグルタチオンの施用が体内での亜鉛動態に及ぼす影響、2013年度 日本土壌肥料学会 東北支部会(福島大会) 平成25年7月8日から9日、福島県農業総合センター(福島県郡山市)

中村進一：グルタチオンを用いて農作物に蓄積する亜鉛の量を増やす、イノベーションジャパン 2013、平成25年8月29日から30日、東京ビックサイト(東京都江東区)

中村進一：葉物野菜の亜鉛含量を増やす栽培方法の確立、コラボ産官学第10回研究成果発表会、平成26年3月7日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

中村進一：高濃度に亜鉛を含む農作物の新しい栽培技術の開発、新技術説明会、平成26年11月20日、科学技術振興機構(東京都千代田区)

中村進一、柴田成子、菊池優香、鈴木伸郎、石井里美、尹永根、河地直木、頼泰樹、服部浩之、藤巻秀：葉に与えたグルタチオンに応答して篩管内を長距離移行するシグナルの検索、2015年度 日本土壌肥料学会 東北支部会(秋田大会) 平成27年7月6日から7日、カレッジプラザ(秋田県秋田市)

〔その他〕  
ホームページ等

秋田県立大学研究者総覧、

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=41>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 進一 (NAKAMURA, Shin-ichi)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号：00322339

(2) 研究分担者

鈴木 伸郎 (SUZUI, Nobuo)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子  
ビーム応用研究部門・研究副主幹  
研究者番号：20391287