

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 15 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450080

研究課題名(和文) イネ初期胚発生および種子成熟過程における亜鉛の機能と制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on function and regulation of zinc for embryo development and seed maturation of rice plant

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：受精前後のイネ卵細胞のマイクロアレイ解析により受精後に遺伝子発現が1.3倍増加するトランスポーターが見いだされた。そのトランスポーターのTos変異体は単為結果の表現型を示した。子房のIAA濃度を測定したところTos変異体では野生型のイネよりもIAA濃度が低いことがわかった。また植物体の金属濃度を測定したところTos変異体の子房の亜鉛濃度が野生型イネより有意に高いことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：One transporter gene which expression increased 1.3 times after fertilization was determined by microarray analysis using rice eggs before and after fertilization. The tos mutant of this transporter presented the phenotype of parthenocarpy. Measurement of IAA concentration in ovaries revealed that IAA concentration in Tos mutant was lower than wild type rice plant. Analysis of metal concentrations in plant body revealed that zinc concentration in ovaries of Tos mutant was significantly higher than that of wild type rice plant.

研究分野：植物栄養学

キーワード：イネ 亜鉛 卵細胞 胚発生

1. 研究開始当初の背景

世界の約 50%の土壌は作物に亜鉛欠乏を引き起こす不良土壌である。この不良土壌は作物の収量を低下させるのみでなく、ヒトの亜鉛欠乏を生じる地域と密接に関連している。ヒトの亜鉛欠乏は世界 3 大栄養疾患につぐ深刻な問題であり、小児の発達障害や皮膚病、味覚障害、生殖機能の低下を引き起こすと考えられ、近年ではガンやアルツハイマー病との関連も報告されている。

亜鉛は生物にとって必須元素であり、生命活動を司る細胞内の様々なタンパクが機能するのに必要とされる。例えば遺伝子の発現に必要な転写因子には多くの Zinc finger タンパク群が存在し、このタンパク群が機能するためには亜鉛が必要である。特に細胞分裂が盛んな新しい組織においてより多くの亜鉛が必要とされると考えられる。このため植物が亜鉛欠乏にさらされると生育が抑制され、稔性が低下する。生殖生長や種子成熟において、亜鉛のみならず、鉄、銅、マンガンなどの元素の重要性は明らかであるが、植物の生殖生長、受精、胚発生におけるこれらの金属元素の役割および制御機構はほとんど未解明のままである。

我々はこれまでに鉄、亜鉛、マンガン、銅などの金属元素を十分与えて生育させた場合でも植物体内の金属のキレーターであるニコチアナミン (NA) が欠如すると、花器官の鉄、亜鉛、銅などの金属濃度が減少し、花器官の形態異常や数の異常、不稔がおきることを明らかにしている (Takahashi et al. 2003)。NA は植物に広く存在する三価鉄、二価鉄、亜鉛、銅、マンガン、ニッケルなどの金属のキレーターであり、植物体内の金属輸送や金属の恒常性の維持に関係すると考えられている。

受精前後と種子成熟過程の 1 2 段階の子房のメタボローム解析ではイネの胚発生および種子成熟期に、NA のみならず、金属結合能をもつ有機酸 (クエン酸、リンゴ酸) が高い濃度で存在することが明らかになった。イネの受精前後や種子成熟期の子房では、特に胚発生期に亜鉛の取り込みが高く、胚および胚乳で亜鉛濃度が高い。胚では NA の濃度が高く、胚乳ではデオキシムギネ酸 (DMA) の濃度が高い。DMA はイネ科植物が鉄欠乏および亜鉛欠乏時に根から分泌する 3 価の鉄や亜鉛のキレーターであるが、植物体内においても鉄の輸送を行うと考えられている。また、受精と胚発生初期にあたる 5 段階目までの子房のトランスクリプトーム解析結果は種子成熟に伴う NA および DMA 合成系遺伝子、NA および DMA 金属錯体のトランスポーター、鉄や亜鉛イオンのトランスポーターの発現の増加を明らかにした。これらの結果は、受精および胚発生を伴う種子成熟過程における亜鉛および金属結合化合物の重要性を示すと考えられる。

近年、シロイヌナズナにおいて亜鉛欠乏応

答性転写因子 *AtbZIP19* とその結合配列 ZDRE が同定された (Ana G. L. Assunção, et al. 2010)。*AtbZIP19* は亜鉛欠乏応答性遺伝子群の上流領域の配列 ZDRE に結合し、遺伝子発現を制御すると考えられている。イネにも *AtbZIP19* の相同遺伝子が存在し、結合配列 ZDRE も存在する。機能解析を目的として *AtbZIP19* 遺伝子を導入したイネでは、NA および DMA 合成系遺伝子、NA および DMA 金属錯体のトランスポーター、鉄や亜鉛イオンのトランスポーターの発現が顕著に増加した。受精と胚発生初期にあたる 5 段階目までの子房のトランスクリプトーム解析では *AtbZIP19* の相同遺伝子の発現が種子成熟に伴って増加することが分かった。このことはイネの *AtbZIP19* 相同遺伝子がイネの種子成熟過程において発現する亜鉛関連遺伝子の発現制御に関わる可能性を示唆した。

2. 研究の目的

本研究ではイネの初期胚発生における亜鉛元素の機能とその制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 初期胚発生への亜鉛欠乏の影響および亜鉛供給形態の解明

イネは柱頭に花粉が付き、花粉管が伸長して受精し、受精卵が胚になる。受精卵および未受精卵の単離方法は首都大学の岡本准教授の研究室ですでに確立しており宇都宮大学においても実験系を確立している。

首都大学東京の岡本博士との共同研究により、*in vitro* 胚発生系を用いて胚発生と亜鉛および亜鉛結合物質の関わりを明らかにする。これまでの我々の研究から胚発生には亜鉛が重要であると推測している。これをさらに詳細に明らかにするため、受精卵培養液中の亜鉛をキレート物質によって取り除き、胚の形態形成への影響を顕微鏡下で調べる。

(2) 初期胚発生に関わる亜鉛関連遺伝子の探索

亜鉛欠乏条件と通常条件で培養した初期胚を材料にマイクロアレイ解析を行い、発現に変化のある亜鉛関連遺伝子を探索する。

4. 研究成果

(1) 受精前後のイネ卵細胞のマイクロアレイ解析により受精後に遺伝子発現が 1.3 倍増加するトランスポーターが見いだされた。そのトランスポーターの Tos 変異体は単為結果の表現型を示した。子房の IAA 濃度を測定したところ Tos 変異体では野生型のイネよりも IAA 濃度が低いことがわかった。また植物体の金属濃度を測定したところ Tos 変異体の子房の亜鉛濃度が野生型イネより有意に高いことが明らかになった。

(2) イネ卵細胞を材料に亜鉛欠乏処理条件下および亜鉛十分条件下でマイクロアレイ解析により遺伝子発現の変化を調査した。亜鉛欠乏で処理したイネ卵細胞では複数の金属結合タンパクの遺伝子の発現が上昇した。また、金属元素を輸送するトランスポーター遺伝子の発現も上昇した。一方で、PDR トランスポーターや MFS トランスポーターの遺伝子発現が減少した。

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 5 件)

Bashir K, Ishimaru Y, Itai RN, Senoura T, Takahashi M, An G, Oikawa T, Ueda M, Sato A, Uozumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK. Iron deficiency regulated OsOPT7 is essential for iron homeostasis in rice. *Plant Molecular Biology* 査読有 88 (2015) 165-176

Tomoko Nozoye, Suyoen Kim, Yusuke Kakei, Michiko Takahashi, Hiromi Nakanishi & Naoko K. Nishizawa Enhanced levels of nicotianamine promote iron accumulation and tolerance to calcareous soil in soybean. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 査読有 78 (2014) 1677-1684

Nozoye T, Tsunoda K, Nagasaka S, Bashir K, Takahashi M, Kobayashi T, Nakanishi H, Nishizawa NK. Rice nicotianamine synthase localizes to particular vesicles for proper function. *Plant Signal Behavior* 査読有 (2014) doi : 10.4161/psb.28660

Nozoye T, Nagasaka S, Bashir K, Takahashi M, Kobayashi T, Nakanishi H, Nishizawa NK. Nicotianamine synthase 2 localizes to the vesicles of iron-deficient rice roots, and its mutation in the YXXφ or LL motif causes the disruption of vesicle formation or movement in rice. *The Plant Journal* 査読有 77 (2014) 246-260

Kato S., Wachi T., Yoshihira K., Nakagawa T., Ishikawa A., Takagi D., Tezuka A., Yoshida H., Yoshida S., Sekimoto H., Takahashi M. Rice (*Oryza sativa* L.) roots have iodate reduction activity in response to iodine. *Frontiers in plant physiology* 査読有 (2013) doi: 10.3389/fpls.2013.00227

[学会発表](計 7 件)

Aiko Watanabe, Hirokuni Ikezawa, Te

tsuya Shimoyama, Vanessa Stein, Mark GM Aarts, Michiko Takahashi Analysis of functions of *AtbZIP19* in rice plant the 17th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (ISINIP) 2014 年 7 月 7 日 ドイツ (Gatersleben/Quedlinburg)

Kuribayashi M, Kato S, Shimoyama T, Watanabe A, Yoshida S, Sekimoto H, Thomine S, Filleur S, Takahashi M. AtCLCa is involved in I⁻ transport into vacuoles International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2013) 2013 年 3 月 29 日 倉敷芸文館

Shota Kato, Takanori Wachi, Masataka Kato, Kei Yoshihira, Akifumi Ishikawa, Daichi Takagi, Aya Tedsuka, Takuya Nakagawa, Hideharu Yoshida, Futoshi Miyazawa, Satoshi Yoshida, Michiko Takahashi, Hitoshi Sekimoto Rice plants have an ability to reduce IO₃⁻ to I⁻ in the rhizosphere, and transport iodine in the form of both I⁻ and IO₃⁻ in xylem. XVII International Plant Nutrition Colloquium 2013 年 8 月 19 日 Istanbul Convention and Exhibition Center

栗林美早、加藤翔太、下山哲也、中川拓也、吉田聡、関本均、Sébastien Thomine, Sophie Filleur, 高橋美智子 シロイヌナズナのトランスポーターAtCLCaのヨウ素輸送とヨウ素応答 日本土壌肥料学会年会 2013 年 9 月 11 日 名古屋大学

中川拓也、吉平恵依、加藤翔太、伊藤純一、長戸康郎、吉田聡、関本均、高橋美智子 ヨウ素過剰耐性イネ変異体のヨウ素吸収・移行の解析 日本土壌肥料学会年会 2013 年 9 月 11 日 名古屋大学

中川拓也、渡辺健太、猪狩浩明、加藤翔太、石川明史、高木大地、手塚彩、吉田聡、関本均、高橋美智子 作物間におけるヨウ素過剰耐性と植物体ヨウ素濃度の比較解析日本土壌肥料学会年会 2013 年 9 月 11 日 名古屋大学

加藤 翔太、加藤 雅隆、宮澤 太志、中川 拓也、吉田 聡、高橋 美智子、関本 均 イネ導管液中ヨウ素の化学形態分析 日本土壌肥料学会年会 2013 年 9 月 11 日 名古屋大学

[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/mp/>

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