

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450080

研究課題名(和文)植物の根において亜鉛欠乏を感知するセンサータンパク質の探索とその機能解析

研究課題名(英文) Exploration and functional analysis of sensor protein for zinc deficiency in higher plants root

研究代表者

深尾 陽一郎 (Yoichiro, Fukao)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：80432590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シロイヌナズナにおいて亜鉛恒常性維持に重要な機能を持つ転写因子 bZIP19とbZIP23に着目した。亜鉛欠乏時にこれら転写因子が制御する下流因子を調べるために、定量プロテオーム解析手法としてiTRAQ解析やSRM解析などを行ったところ、いくつかの亜鉛輸送体や分泌ペプチドなどがbZIP19とbZIP23により制御されていることが示された。bZIP19とbZIP23は同じ機能をもつと信じられていたが、本研究により異なる遺伝子の発現を制御することが示された。さらに、分泌ペプチドが亜鉛恒常性維持に重要な役割をもつことが示唆されている。

研究成果の概要(英文)：To avoid lethal depletion of cellular Zn, plants modulate the molecular mechanism of Zn homeostasis. To explore the genes that participate in Zn homeostasis under Zn-deficient condition, we have performed iTRAQ-based quantitative proteomics using microsomal proteins from the roots of *A. thaliana* wild-type and bzip19 mutant. Through this analysis, it has revealed that expressions of several Zn transporters and defensin-like proteins were regulated by bZIP19 and bZIP23. This result has supported by selected reaction monitoring analysis. Also, it had showed that bZIP19 and bZIP23 independently regulate their own target genes to adapt to Zn-deficient condition, although it has reported that they have redundant functions on the regulation of Zn transporters in a previous report. Furthermore, it has suggested that the defensin-like proteins contribute to Zn homeostasis.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：亜鉛 亜鉛欠乏センサー bZIP19 転写因子 分泌ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

亜鉛は多くの酵素の構造や機能を維持するために不可欠であり、植物の生育に必須の微量栄養元素である。本研究で用いる野生型シロイヌナズナは、亜鉛十分培地 (Zn+) で生育した場合と比較して、亜鉛欠乏培地 (Zn-) では根の成長が 70% 程度に阻害される。亜鉛欠乏時の根では、亜鉛輸送体の発現量が上昇することも明らかにしている。研究代表者は、亜鉛欠乏による根の成長阻害が 10% 程度と著しい *bzip19* 変異体を単離している。また定量的なプロテオーム解析を行った結果、*bzip19* 変異体ではいくつかの亜鉛輸送体の発現量が上昇しなかった。これらの結果と過去の報告から (Assunção et al., *PNAS*, 107, p10296, 2010)、bZIP19 は亜鉛欠乏時に亜鉛輸送体のプロモータ領域に存在する ZDRE モチーフに結合し、その発現量を上昇させる転写因子として機能すると考えられる。さらに Assunção らは、bZIP19 と bZIP23 は相同性が高く、機能的に重複していると報告している。申請者が行った解析では、確かに *bzip23* 変異体も亜鉛欠乏感受性を示したが、弱い表現型であったことから、bZIP19 が亜鉛輸送体の発現量を調節する主な転写因子と考えている。

bZIP19 と機能的に相同な因子として、酵母では ZAP1 の研究が進んでいる。本研究課題を立案する上で重要なポイントは、ZAP1 が亜鉛結合領域 (Zinc finger motif) を持ち、転写因子自身が亜鉛欠乏センサーとして働くことである (Bird et al., *EMBO J.*, 22, p5137, 2003)。それに対して、bZIP19 の分子量は ZAP1 の半分程度であり、少なくとも Zinc finger motif はない。そこで本研究は、(仮説 1) bZIP19 自身が亜鉛欠乏センサーとして働くのか、(仮説 2) 異なる亜鉛欠乏センサーや発現調節に関わる調節因子と複合体を形成し、下流に位置する亜鉛輸送体の発現制御を行っているのかを明らかにする。さらに (仮説 3) 亜鉛欠乏センサーが bZIP19 とは直接相互作用しない可能性も考慮し、その探索を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物において未だに発見されていない亜鉛欠乏を感知するセンサータンパク質の同定とその機能解析に取り組む。申請者は、変異体解析や定量プロテオーム解析の結果から、転写因子 bZIP19 が亜鉛欠乏時の亜鉛恒常性維持に重要な役割を持つことを明らかにしている。そこで、bZIP19 自身またはその相互作用タンパク質が亜鉛欠乏センサーとして働く可能性を考えている。さらに直接相互作用しない因子がセンサーである可能性も考慮して研究を計画する。

## 3. 研究の方法

### (1) bZIP19 の亜鉛結合領域の有無の決定

bZIP19 には亜鉛が結合する可能性のある、

システインとヒスチジンリッチな配列がある。そこでこの配列に亜鉛が結合するかどうかを、*bzip19* 変異体を用いた機能相補解析、大腸菌で発現した精製 bZIP19 タンパク質への亜鉛結合量をドットプロット解析または元素濃度測定装置 ICP-OES による測定、亜鉛固定化カラムへの結合解析により明らかにする。

(2) bZIP19 との相互作用タンパク質の同定  
bZIP19 と直接相互作用するタンパク質には、亜鉛欠乏センサーまたは機能調節因子が含まれると考えている。このため、免疫沈降実験を行う。

(3) bZIP19 と相互作用する因子の解析  
bZIP19 が亜鉛欠乏センサーとして機能する場合は、相互作用する因子は bZIP19 の機能調節因子の可能性がある。このため変異体解析と、蛍光タンパク質を用いた細胞内局在解析を行う。bZIP19 以外のタンパク質が亜鉛欠乏センサーとして機能する場合は、これらの解析に加え「bZIP19 の亜鉛結合領域の有無の決定」に記した実験も行う。

(4) bZIP19 が発現制御する遺伝子の機能解析

以上の解析は転写因子 bZIP19 自身またはその上流で機能する因子の探索および機能解析であるが、bZIP19 が発現を制御する下流の因子についても機能解析を行う。野生型シロイヌナズナ Col-0 および *bzip19* 変異体を用いて定量的なプロテオーム解析を行い、そこから発現を制御する因子を同定し、その機能について解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) bZIP19 の亜鉛結合領域の有無の決定

bZIP19 には亜鉛が結合する可能性のある、システインとヒスチジンリッチな配列がある。*bzip19* 変異体は亜鉛欠乏条件下において著しい生育阻害を示すことを指標に、システインとヒスチジンリッチな配列を欠損した変異型 *bZIP19* 配列を *bzip19-1* 変異体に導入し、その表現型が回復するかどうかを調べた。しかし変異型 *bZIP19* の mRNA は検出されず、分解されていると推察された。このため *bzip19-1* 変異体の表現型が亜鉛欠乏条件下で回復する事も無かった。また、同じ配列を大腸菌に導入し、精製 bZIP19 タンパク質への亜鉛結合量をドットプロット解析または元素濃度測定装置 ICP-OES により測定することを計画したが、同様に bZIP19 タンパク質が発現することは無かった。以上のことから、変異型の *bZIP19* mRNA またはタンパク質は、転写後制御あるいは翻訳後制御により分解されていることが推察され、本実験を遂行することが困難である事が明らかとなった。

(2) bZIP19 との相互作用タンパク質の同定  
bZIP19 と直接相互作用するタンパク質には、亜鉛欠乏センサーまたは機能調節因子が含まれると考え、免疫沈降実験を行った。この実験では、bZIP19 に 2 種類のタグ (GFP と

FLAG) を付加した融合タンパク質を *bzip19* 変異体において発現するシロイヌナズナ形質転換体を作製し、変異体の表現型が回復することを確認した。なお、プロモータは bZIP19 の自己プロモータおよび 35S プロモータを用いた。自己プロモータを用いた場合、発現量の低さから、bZIP19 自身が同定される事は無かった。一方、35S プロモータを用いた場合は bZIP19 が同定され、相互作用因子の候補を複数得ることが出来た。このうち、亜鉛結合領域を含む C2H2-like zinc finger protein に着目し、この T-DNA 挿入変異体を SALK 研究所より取り寄せて解析を進めた。ホモラインを得た後、表現型観察を行ったが、亜鉛欠乏培地において野生型とまったく同様の生育を示したことから、亜鉛欠乏のセンサータンパク質としては機能していないことが明らかとなった。bZIP19 と相互作用するセンサータンパク質が存在する場合、その結合力が弱い、あるいは瞬間的な結合である可能性を考え、架橋剤 DSP を使って bZIP19 とセンサータンパク質を架橋した状態で同定することを試みたが、亜鉛結合領域を含む有力な候補を得ることはできなかった。

### (3) bZIP19 と相互作用する因子の解析

以上、(1) と (2) の結果から、(3) の実験を遂行するには至らなかった。

### (4) bZIP19 が発現制御する遺伝子の機能解析

当初の目的であった bZIP19 の相互作用因子は同定するに至らなかったが、bZIP19 およびそのホモログである bZIP23 の機能解析を実施し、論文を報告することができた (Inaba et al., *Plant J.*, 2015)。研究代表者はシロイヌナズナ野生型 Col-0 および *bzip19-1* 変異体を用いて定量的なプロテオーム解析 (iTRAQ 解析) を行ったところ、亜鉛十分条件に比べて亜鉛欠乏した根では最大で 30 倍以上も上昇する 3 種類の分泌ペプチドが同定された。また *bzip19-1* 変異体では、亜鉛欠乏状態であってもこれらのペプチドの発現量は十分上昇しなかった。iTRAQ 解析は発現が変動するタンパク質を探索する上で有効な手段であるが、定量性は高くない。そこで、より定量性の高い SRM 法を用い、これらの分泌ペプチドが亜鉛欠乏に応答するか、また *bzip19-1* 変異体では発現が抑制されているかを調べた。SRM 法では、タンパク質をトリプシン消化した時に生じるペプチド断片のうち、質量分析計により検出される配列を選択する。このペプチドを化学合成し、このとき安定同位体ラベルしておくことで、内生の分泌ペプチド由来のペプチドとはアミノ酸配列が同一であるが質量は異なるために、質量分析計内において別々に検出することが可能となる。すなわち、内部標準として用いることが出来ることから、対象となるタンパク質の絶対量をより高い定量性で測定することが可能な手法である。この解析の結果、iTRAQ 解析の結果と SRM 法の結果は一致した。

bZIP19 は、プロモータ配列上に存在する ZDRE モチーフと呼ばれるシス配列に結合し、遺伝子発現を制御することが知られている。これまで ZDRE モチーフは主に亜鉛輸送体をコードする遺伝子のプロモータ配列上に存在することが知られていたが、新たに同定された分泌ペプチドのプロモータ領域にも ZDRE モチーフが存在していた。以上のことから、これら 3 種類の分泌ペプチドは bZIP19 に発現制御され、亜鉛欠乏時に機能する新規タンパク質であることが示された。また我々は、分泌ペプチドの N 末端側にシグナルペプチドが存在しており、N 末端がプロセッシングにより切断されること、また C 末端側は成熟型の分泌ペプチドにおいても切断されないことを質量分析により明らかにした。このため、GFP、FLAG を分泌ペプチドの C 末端側に付加し、35S プロモータまたは自己プロモータにより発現制御させたシロイヌナズナ形質転換体を作成した。これらは *bzip19* 変異体に導入した。この結果、3 種類の分泌ペプチドは細胞膜上に局在する可能性が示唆され、また亜鉛濃度が低いほど GFP 蛍光が強くなることが判明した。

また先行研究の報告では、bZIP19 と bZIP23 は協調的に機能すると信じられていた。しかし研究代表者が iTRAQ 解析と同様の条件でマイクロアレイ解析を実施したところ、bZIP19 が制御する遺伝子群、bZIP23 が制御する遺伝子群が存在し、それぞれ機能分担していることが示された。また、bZIP19 に発現制御される遺伝子は、亜鉛輸送体だけが実験的に証明されているが、マイクロアレイ解析の結果から分泌ペプチドなど亜鉛輸送には関わらない遺伝子についても発現制御されていることが示された。そこでこのことを実験的に証明するために、自己プロモータ制御下で GUS タンパク質を Col-0、*bzip19* 変異体、*bzip23* 変異体に発現させる形質転換体を作成した。GUS 染色を行ったところ、野生型と *bzip23* 変異体では亜鉛欠乏時に GUS タンパク質の発現が上昇したが、*bzip19* 変異体では発現が上昇しなかったことから、マイクロアレイ解析の結果を支持する結果となった。

さらに、3 種類の分泌ペプチドのうち最も亜鉛欠乏に応答してタンパク質発現量が上昇する分泌ペプチドに関して T-DNA 挿入を得ることができたため、この表現型観察を行ったところ、亜鉛欠乏に対してやや感受性を示した。しかし細胞内の亜鉛濃度を測定したところ、有意差は得られなかった。分泌ペプチドには相同性の高いペプチドが多数存在しているため、相同性の高い複数のペプチドを一度に欠損した変異体を作成し、より詳細な解析を行う。

## 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 2 件)

①Fukao Y., Kobayashi M., Zargar SM., Kurata R., Fukui R. Mori CI. and Ogata Y. “Quantitative proteomic analysis of the response to zinc, magnesium, and calcium deficiency in specific cell types of *Arabidopsis* roots.” *Proteomes*, 4 (1), 1-13, 2016. 査読有り

DOI: 10.3390/proteomes4010001.

②Inaba S., Kurata R., Kobayashi M., Yamagishi Y., Mori CI., Ogata Y. and Fukao Y. “Identification of putative target genes of bZIP19, a transcription factor essential for *Arabidopsis* adaptation to Zn deficiency in roots.” *Plant J.*, 84 (2), 2015, 323-334, 2015. 査読有り

DOI: 10.1111/tpj.12996.

[学会発表] (計 3 件)

①深尾陽一郎、大下智也、小林麻美「シロイヌナズナにおいて亜鉛欠乏に応答する defensin-like protein の機能解析 (口頭発表)」、第 58 回日本植物生理学会、2017 年 3 月 17 日、鹿児島県鹿児島市 鹿児島大学群元キャンパス

②山口雄司、花田耕介、森泉、深尾陽一郎「シロイヌナズナにおいて亜鉛恒常性維持に関わるペプチドの機能解析 (口頭発表)」、第 58 回日本植物生理学会、2017 年 3 月 17 日、鹿児島県鹿児島市 鹿児島大学群元キャンパス

③稲葉尚子、深尾陽一郎「亜鉛輸送体の発現を制御するシロイヌナズナ転写因子 bZIP19 のオルソログの機能解析 (ポスター発表)」、第 56 回日本植物生理学会、2015 年 3 月 18 日、東京都世田谷区 東京農業大学世田谷キャンパス

[その他]

ホームページ等

<http://www.ritsumei.ac.jp/lifescience/bioinfo/fukaolab/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

深尾 陽一郎 (FUKAO, Yoichiro)  
立命館大学・生命科学部・准教授  
研究者番号：80432590

### (2) 研究協力者

稲葉尚子 (INABA, Shoko)