

亜鉛欠乏したシロイヌナズナの根端細胞で蓄積する 未知構造体の生理的意義の解明

Elucidation of physiological significance of unknown structure in root tip cells of Arabidopsis under Zinc deficiency

代表研究者 立命館大学 深尾 陽一朗 Ritsumeikan University Yoichiro FUKAO
協同研究者 名古屋大学 佐藤 良勝 Nagoya University Yoshikatsu SATO

Zinc is an essential micronutrient for plants, and it plays an important role in the structure and function of a wide range of proteins, including metabolic enzymes and transcription factors. Plants have developed regulatory mechanisms for intracellular zinc homeostasis in the process of adaptation to a zinc-deficient growth condition. Zinc transporters are upregulated in zinc-deficient plants and that their expressions are regulated by transcription factors (bZIP19 and bZIP23). However, little is known about other phenomena. Therefore, this study elucidates the physiological significance of starch accumulation in plastids in zinc-deficient roots. Our results indicate that no or little starch accumulation was observed under conditions of deficiency of essential elements other than zinc. As no starch accumulation was observed under the condition of high zinc concentration, it was shown to be a phenomenon that is specific to zinc deficiency. Gravity-sensing amyloplasts containing starch are present in columella cells at root tips of plants. Plants can recognize the direction of gravity based on the sedimentation of amyloplasts in the direction of gravity. Starch accumulation in columella cells was unaffected by changes in zinc concentration, suggesting that the starch accumulation observed during zinc deficiency is a novel phenomenon.

研究目的

研究代表者は、亜鉛欠乏したシロイヌナズナの根を用いたプロテオーム解析やトランスクリプトーム解析から、複数の Defensin-like (DEFL) family protein の発現量が増加することを見出した (Inaba et al., 2015; Nakayama et al., 2020)。このうち、DEFL203 の細胞内局在を解析する過程において、DEFL203 が細胞壁および細胞膜に局在すると共に (Kimura et al., accepted)、亜鉛欠乏した根において、直径 5 μm 以下のオルガネラと考えられる構造にも局在することが示唆された。各種オルガネラの GFP 蛍光マーカーを用いた顕微鏡観察を行ったところ、プラスチドマーカーとして用いられる CT-GFP 株では、明視野でも確認できる構造体を GFP 蛍光が囲っているように観察された (Fig. 1)。この構造体は亜鉛欠乏したシロイヌナズナの根端細胞で多く観察され、亜鉛濃度が十分に存在するとまったく観察される事はない。本研究では、亜鉛欠乏特異的に根端に存在するプラ

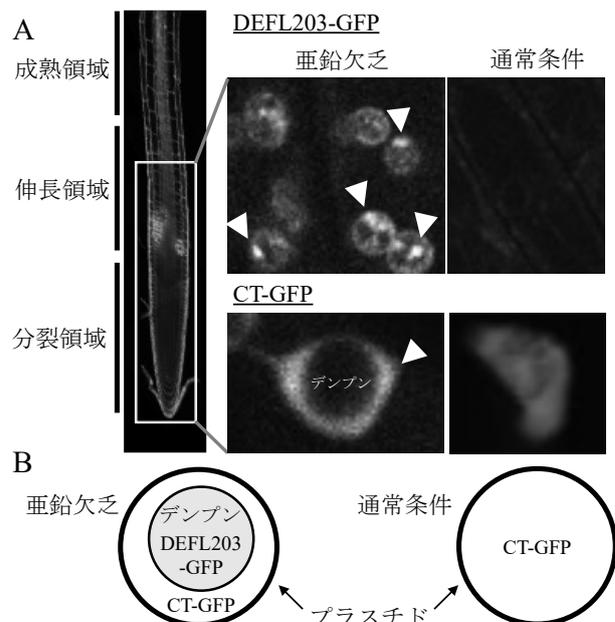


Fig. 1 : Characteristics of plastids observed in zinc-deficient roots. (A) DEFL203-GFP fluorescence (arrowhead) was observed inside plastids, and CT-GFP fluorescence (arrowhead) was observed surrounding starch under zinc-deficient condition. (B) shows the relationship between plastids, starch, DEFL203-GFP, and CT-GFP in zinc-deficient and basal conditions.

スタド内部に観察される構造体がどのように形成されるのか、またこの構造体あるいは構造体をもつプラスチドの生化学的特徴や形成機構を調べることで、未知の構造体が亜鉛欠乏特異的に形成される生理的意義を明らかにすることを目的とする。

研究経過

・プラスチド内部に蓄積する構造体の特定

既知のプラスチド機能としては、デンプンや脂肪酸の蓄積、あるいは窒素同化に関与する事が知られている。亜鉛欠乏時に観察される構造体を特定するために、野生型シロイヌナズナ (エコタイプ: Col-0) を亜鉛欠乏培地で生育し、デンプンを可視化できるヨウ素染色液で処理したところ、プラスチド内部の構造が染色された。さらにデンプンを可視化できる蛍光プローブ VISTA を用いたところ、プラスチド内にデンプンが蓄積していた。一方、脂肪酸の染色液ナイルレッドを用いて亜鉛欠乏培地で生育した Col-0 の観察したところ、内部構造は染色されなかった。また電子顕微鏡観察では、通常培地で生育した Col-0 の根においてもデンプンの蓄積が見られたものの、亜鉛欠乏時により多く蓄積していた。以上のことから、亜鉛欠乏時にプラスチド内部に観察される構造体はデンプンであることが判明した。なお、デンプンを蓄積するプラスチドは、一般的にアミロプラストと呼称するが、ここではプラスチドとする。

・デンプン蓄積条件の検討

野生型シロイヌナズナを、亜鉛以外の必須元素欠乏条件下で生育し、デンプン蓄積の有無を明視野顕微鏡により観察した。必須微量元素として、マンガン、鉄、銅、コバルトを、必須多量元素としてマグネシウムを調べた。この結果、マンガンおよびマグネシウム欠乏した Col-0 の根において少数のデンプンを蓄積するプラスチドが観察された。定量的データは得られていないものの、亜鉛欠乏時に観察される数と比較すると、ごく少数であったことから、根端におけるプラスチドへのデンプン蓄積は亜鉛欠乏特異的な現象であることが示された。

デンプンが蓄積する環境要因として光環境変化に着目した。シロイヌナズナの生育は1日を16時間明条件で、8時間暗条件の長日条件下で生育している。デンプンを観察する過程で、暗条件から明条件に切り替わった直後においてはデンプンの蓄積量が少ないかほとんど見られないのに対して、その後の時間

経過と共にデンプン蓄積量が増加することを発見した。例えば葉におけるプラスチド (葉緑体) は、日中に光合成によりスクロースを合成し、そのスクロースをデンプンとして蓄積する。一方、夜間では光合成を行えないため、日中に蓄積したデンプンをスクロースに分解し、エネルギー源として植物の生長に用いている。この現象と根におけるデンプン蓄積量の変化が同様であるかを調べるために、亜鉛欠乏培地に播種した Col-0 を6日間長日条件下で生育した後、連続光 (24時間明条件)、暗所 (24時間暗条件)、長日条件下さらに1日生育した。この結果、連続光や長日条件下ではデンプン蓄積が観察されたものの、暗所に1日置いた植物の根では観察されなかった。また亜鉛を含む通常培地へ移植した後、連続光や長日条件下で1日生育した場合は、デンプン蓄積が観察されなかった。そこで根に蓄積するデンプン量を定量したところ、デンプン蓄積量は長日条件下で最も多く、次に連続光、暗所の順になった。以上のことから、根端におけるデンプン蓄積は、日長にตอบสนองしていることと、亜鉛が存在するとデンプン蓄積は観察されないことが確認された。

・スクロース供給源の検討

デンプンは、光合成反応によって合成され、葉緑体内に蓄積する。またスクロースの形で貯蔵器官へと輸送され、デンプンへ変換された後に蓄積する。そこで亜鉛欠乏時に蓄積するデンプン合成が培地に含まれるスクロースから由来するのか、光合成によって合成されたスクロースに由来するのかを確かめるためにスクロース濃度を0%、1% (基本となる濃度)、3%、5%にした亜鉛欠乏培地を用いて Col-0 を生育した。この結果、0%ではデンプン蓄積がほぼ見られなかった。一方、1%、3%、5%では観察されたが、スクロース濃度に応じてデンプン蓄積量が変化することはなかった。一方、地上部からのスクロース供給を絶つために、胚軸を切断した後1日後に観察したところ、亜鉛欠乏培地においてもデンプン蓄積は観察されなかった。このため、スクロース供給源は現時点で特定することはできていない。今回観察した播種後7日目の幼苗体は、種子に貯蔵されたエネルギー源を利用して生長している従属栄養成長の時期から独立栄養成長へ移行する時期である。今後は長期生育を行い、地上部の葉が光合成能力を完全に獲得する時期において詳細な観察が必要である。

・プラスチドの生化学的特徴の解析

プラスチドを単離してプロテオーム解析を行うために、葉緑体単離キットとして販売されているキット (invent 社) を用いたが、現在のところプロテオーム解析を行うために十分な純度および収量のプラスチドは得られていない。今後は、密度勾配遠心による単離や、亜鉛欠乏および亜鉛を含む通常条件下で生育した Col-0 の根全体を用いたプロテオーム解析も検討する。

・デンブンプ蓄積に関わる遺伝子の探索

通常培地で生育した Col-0 を亜鉛欠乏培地に移植し、デンブンプ蓄積の経時変化を観察したところ、6 時間後にはデンブンプ蓄積が見られた。そこで今後は亜鉛欠乏への移植後 0、1、2、4、6 時間後に RNA 抽出を行い、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を実施する予定である。

・他の植物における観察

亜鉛欠乏によって観察されるデンブンプ蓄積がシロイヌナズナ特異的な現象かを調べたところ、現時点では少なくともタバコの根では亜鉛欠乏時にデンブンプ蓄積するアミロプラスチドが観察された。今後は他の植物の観察を引き続き実施すると共に、より組織の大きいタバコの根を用いたプラスチド単離とプロテオーム解析も試みる予定である。

考察

プラスチドは、2 枚の包膜で包まれており、水溶性のストロマがあるという共通点をもつ。一方、プラスチドの種類によってチラコイドの発達度合いは異なる。葉緑体の場合、チラコイドが平面的な内膜構造を発達しているのに対し、デンブンプを蓄積するプラスチドではチラコイドの発達がほぼ見られずデンブンプ顆粒で埋め尽くされている。事実、我々が実施した電子顕微鏡観察では、亜鉛欠乏した根におけるプラスチドの内膜構造は発達しておらず、デンブンプ顆粒が蓄積していた。

植物の根の先端には根冠があり、中央にあるコルメラ細胞には重力を感知するアミロプラスチド (デンブンプを蓄積するプラスチド) がある。このアミロプラスチドは重力方向に沈降することで植物に重力方向を知らせる役割をもっており、根の重力屈性に関与している。本研究においてシロイヌナズナを通常条件下および亜鉛欠乏条件下で生育した場合、共にコルメラ細胞ではアミロプラスチドが存在するのに対して、その他の細胞では亜鉛欠乏した場合のみデンブンプを

蓄積するプラスチドが存在した。コルメラ細胞におけるアミロプラスチド内のデンブンプは、葉で合成されたスクロースが根に転流され、デンブンプとして長期的に保存される。本研究で観察された亜鉛欠乏にตอบสนองしたデンブンプ蓄積は日長にตอบสนองしていたが、コルメラ細胞のアミロプラスチドでは観察時間や日照条件の変更により蓄積量や形態等に明確な差が見られなかった。さらに、亜鉛欠乏した根の重力屈性が変化することはなかったことを考え合わせると、亜鉛欠乏によってデンブンプを蓄積するプラスチドは、コルメラ細胞におけるアミロプラスチドとは全く異なる機能を有すると言える。

光の明暗応答によるデンブンプ量の変化は、地上部の葉緑体に一時的に蓄積されるデンブンプにおいて見られる。植物は日中に葉において光合成で得たエネルギーを一時的にデンブンプとして蓄積する。夜間は光合成が行えず、呼吸のみ行っているが、この間に日中に蓄積したデンブンプを分解してエネルギーを得て生長している。このことから、亜鉛欠乏でプラスチド内に蓄積するデンブンプは、地上部の葉緑体のデンブンプと同様に、光の明暗によって調節されている可能性が示唆された。

デンブンプは、植物細胞内のプラスチドのストロマで合成され、短期的および長期的なエネルギー貯蔵としての役割をもつ。亜鉛欠乏時に見られるプラスチドは重力屈性に関与しないことから、単にデンブンプとしてエネルギーを蓄積している可能性がある。植物が意図してデンブンプを蓄積しているのか、亜鉛欠乏による障害を受けた結果としてデンブンプが蓄積しているのかにより、この現象の生理的意義の解釈が大きく異なる。前者のようにこの現象が能動的に起こると仮定すると、根の伸長障害が起こる亜鉛欠乏の環境下において、植物がエネルギー源としてデンブンプを蓄積していると考えられる。植物は亜鉛欠乏条件下において根の伸長が阻害されるが、これは生育環境に十分な栄養がないために意図的に根の伸長を抑制してバイオマスを増やさないことでエネルギー消費を抑えているとの解釈もできる。また亜鉛欠乏が解消された後には、生長を再開するためのエネルギー源として蓄積したデンブンプを分解する可能性が考えられる。一方、後者の場合は通常状態の生育条件下においてはデンブンプの合成速度と分解速度が平衡状態にあるのに対して、亜鉛欠乏条件下ではデンブンプ分解に負の影響があり、平衡状態が崩れた結果と

してデンプン合成速度が分解速度を上回ったことでデンプンの蓄積が観察された可能性が考えられる。

分裂組織にはプロプラスチドが存在し、様々なプラスチドへと分化する。根は根端側において細胞分裂し、細胞が縦方向に伸長することで、根全体が伸長する。このことから、根は根端側から地上部側に向けて分裂領域、伸長領域、成熟領域に分類することができる (Fig. 1)。本研究で観察されるプラスチドは、主に分裂領域と伸長領域において観察され、これを考えると、分裂領域に存在するプロプラスチドが亜鉛欠乏を何らかの形で感受することでデンプンを蓄積するプラスチドに分化する可能性がある。一方で、亜鉛欠乏条件から通常培地に移行した場合や暗所に移行した場合はデンプンが分解され、逆に通常培地から亜鉛欠乏条件に移行した場合や明所に移行した場合はデンプン蓄積が見られることから、プラスチドにデンプン合成や分解に関わる酵素およびスクロースを輸送するための輸送体が存在していると考えられる。このような亜鉛欠乏時にデンプンを蓄積するプラスチドの生化学的特徴や形成機構を明らかにするためには、亜鉛欠乏と通常培地で生育したシロイヌナズナやタバコの根から単離したプラスチドのプロテオーム解析や、デンプン蓄積が始まるタイミングでのRNA-seq解析などを行うことが、今後必要になると考えている。

参考文献

Inaba S., Kurata R., Kobayashi M., Yamagishi Y., Mori I., 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), 323-334, 2015.

Nakayama S., Sugano S.S., Hirokawa H., Mori I.C., Daimon H., Kimura S. and Fukao Y. "Manganese Treatment Alleviates Zinc Deficiency Symptoms in *Arabidopsis* Seedlings." *Plant Cell Physiol.*, 61(10), 1711-1723, 2020.

研究の発表

口頭発表

1. 深尾陽一郎「シロイヌナズナにおいて亜鉛欠乏応答する Defensin-like family proteins の解析 (招待講演)」植物の栄養研究会第6回交流会、2021年11月13日、オンライン開催 (大阪府立大学)

誌上発表

1. Kimura S., Vaattovaara A., Ohshita T., Yokoyama K., Yoshida K., Hui A., Kaya H., Ozawa A., Kobayashi M., Mori I.C., Ogata Y., Ishino Y., Sugano S.S., Nagano M. and Fukao Y. "Zinc deficiency-induced defensin-like proteins are involved in the regulation of root growth in *Arabidopsis*." *Plant J.*, accepted.