

## ミヤコグサにおける亜鉛集積と関連遺伝子の解析

高野 葵 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古川 純 (筑波大学 生命環境系)

## 背景

植物は動物と異なり移動する事ができない。このような環境下で生育するため、植物は師管を通して光合成で得た有機物を植物体内に循環させ、また導管を発達させる事で土壤中に存在している水やミネラルを全身に輸送している。この導管の能力を利用して、可食部のミネラル含量を適正に保つため、ダイズなどを用いた金属集積の研究が進められている。ダイズと同じくマメ科のミヤコグサはモデル植物として知られており、ゲノムサイズが小さく生活環が短いという特徴がある。そこで、当研究室ではミヤコグサを用いた金属集積についての研究が進められている。当研究室の先行研究において、2系統のミヤコグサ MG-20 と B-129 を用いて  $^{65}\text{Zn}$  の取り込み実験を行ったところ、B-129 が地上部により亜鉛を集積している事が分かった。また、Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS) によって、植物体中の亜鉛動態を解析したところ、根から地上部への亜鉛の輸送活性が高い事が示唆された。これらの結果から MG-20 と B-129 の組換え自殖系統 125 系統を用いた QTL 解析を行い、トランスポーターなどの原因となる遺伝子の特定が試みられた。その結果、地上部での亜鉛の集積に関与すると考えられる 16 の遺伝子座が特定された。以上のような先行研究から、本研究では亜鉛集積に対する栄養条件の影響、QTL 解析で得られた遺伝子座に座乗している亜鉛集積に関与すると考えられる候補遺伝子の発現量の解析を目的とした。

## 方法

亜鉛集積に関わる遺伝子の機能を調査するため、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の主要実験系統である Miyakojima MG-20 と Gifu B-129 の 2 系統を実験に供した。種子を吸水・発芽させた後、およそ 1 ヶ月間 Hoagland 水耕液にて水耕栽培させた。その後、Hoagland 水耕液から亜鉛を取り除いた水耕液を用いて 4 日間または 11 日間処理したものと通常の水耕液で処理したものを対照区として用意した。通常の水耕液は亜鉛濃度が  $0.4 \mu\text{M}$ 、欠乏用の水耕液は  $0 \mu\text{M}$  となっている。

それぞれのサンプルに放射性同位体  $^{65}\text{Zn}$  を取り込ませた後、BAS イメージングによって亜鉛局在を、ガンマカウンタによって相対放射能を地上部と根において計測した。また、リアルタイムイメージング (PETIS) により亜鉛の挙動を非侵襲で連続的に観察した。さらに、QTL 解析により得られた 16 の遺伝子座に座乗する遺伝子の中から、機能予測により亜鉛の輸送に関わる可能性の示された 13 種類の遺伝子について両系統での発現量を比較するため、これらのサンプルの RNA を抽出し RT-PCR により発現解析を行った。

## 結果

## 亜鉛欠乏条件の検討

MG-20 と B-129 をおよそ 1 ヶ月間水耕栽培し、一定期間の欠乏処理期間を設け、その後亜鉛を取り込ませたところ、欠乏 4

日目において亜鉛の吸収量が多い事が示された。系統別の特徴として MG-20 よりも B-129 も方が欠乏に対する応答が顕著である傾向が示された。また BAS イメージングにおいても同様に 4 日間の欠乏処理をかけた植物の方がより亜鉛を集積しており、対照区に比べて亜鉛欠乏処理区の植物では、根から地上部にかけて全体的に亜鉛が分布しており、対照区では根に亜鉛を集積し、地上部への移行量が少ない事が示唆された。以上より、欠乏処理により誘導される遺伝子の発現解析には 4 日程度の亜鉛欠乏条件が好ましいと考えられた。

同様に亜鉛欠乏 4 日を欠乏処理区の条件として、リアルタイムイメージングによる亜鉛動態の解析を行った。根全体、地上部全体、茎頂部分、胚軸部分を対象として放射能の経時変化をグラフ化したところ、地上部での亜鉛蓄積量については対照区と亜鉛欠乏区どちらにおいてもリアルタイムイメージング開始約 12 時間後から増加した。しかしながら蓄積の傾向については系統間で差が認められ、MG-20 では初期の輸送量が多いのに対し B-129 では時間経過と共に輸送量が増加していた。また、MG-20 においては亜鉛欠乏処理 4 日による吸収・輸送量の増加は明瞭ではなかった。

## 亜鉛欠乏により誘導される地上部への亜鉛輸送を司る遺伝子の探索

QTL 解析によって得られた 13 の候補遺伝子について、それぞれ MG-20 と B-129 を用いて発現解析を行っている。現在上記の解析から得られた欠乏により誘導される亜鉛輸送活性の上昇と発現量の変化が相関する遺伝子の有無について解析中である。

## 今後の展望

先行研究において、亜鉛以外の金属含量を調べた結果、B-129 において鉄の地上部への輸送活性が低い事が示されており、地上部への鉄輸送の滞りが植物の鉄欠乏症状を引き起こし、他の金属の集積を誘導している可能性もある。このように、欠乏している金属とは異なる金属が集積されるような現象は、モデル植物のシロイヌナズナでも報告例があることから、今後は地上部への鉄輸送活性との関連性も踏まえて、亜鉛の集積メカニズムを解明する必要がある。