

令和 5 年 4 月 13 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H00934

研究課題名(和文)植物栄養輸送体の細胞膜における偏在の分子基盤

研究課題名(英文)A molecular framework for polar localization of nutrient transport proteins in the plasma membrane of plant cells

研究代表者

高野 順平 (Takano, Junpei)

大阪公立大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70532472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物の輸送体が根の細胞において土壌/中心方向の細胞膜へ偏在するメカニズムの解明と応用を目指した。研究代表者らは本研究開始前に、ホウ酸チャネルNIP5;1とホウ酸トランスポーターBOR1の偏在性は連続的な小胞輸送(エンドサイトーシスとエキソサイトーシス)により形成・維持されることを見出し、本研究ではこれを確定するとともに、複数の制御因子を同定した。主たる成果としては、ホウ酸トランスポーターBOR1のC末端領域のリン酸化と脱リン酸化が偏在性に重要であることを示し、BOR1の相互作用タンパク質である脱リン酸化酵素がBOR1の極性輸送に寄与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではホウ酸チャネルNIP5;1とトランスポーターBOR1をモデルとし植物の膜タンパク質の土壌/中心側細胞膜への偏在メカニズムの一端を明らかにした。これは植物細胞における栄養輸送と膜交通の理解を進めるだけでなく細胞極性の形成という発生学の根本に迫るものである。本研究ではまた、多様な輸送体の偏在性を人為的に制御する技術の開発を目指した。いまだ開発途上であるが、輸送体の局在改変技術は、植物のみならず微生物等様々な生物由来の輸送体を植物の生産性、機能性向上のために活用する基盤技術となるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of study was understanding of the mechanisms underlying the polar localization of nutrient transporters in plant cells. We have previously shown that continuous endocytosis and exocytosis are required for the maintenance of the polar localization of a boric acid channel NIP5;1 and a borate exporter BOR1 toward the soil- and stele-side plasma membrane domains, respectively, in root cells. In this study, we further investigated the mechanisms utilizing genetics and proteomics approaches. As a major finding, we identified the importance of both phosphorylation and dephosphorylation of BOR1 C-terminal region in the regulation of the polar trafficking.

研究分野：植物栄養学

キーワード：輸送体 細胞内局在 小胞輸送 極性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は根で栄養素を吸収し体内の必要部位に送って利用している。これら吸収・移行を司るタンパク質が輸送体であり、各細胞における輸送体の細胞内局在が輸送の方向性を決定する。シロイヌナズナにおいて細胞へのホウ酸吸収を促進するホウ酸チャネル NIP5;1 とホウ酸排出を促進するトランスポーター BOR1 は、根の表皮細胞や内皮細胞において土壌側と中心側の細胞膜にそれぞれ偏って局在する。このような偏在性はホウ素をはじめとし鉄、マンガン、硝酸、ケイ素など様々な栄養輸送体について報告され、植物において栄養の輸送方向を決定する普遍的な性質と理解された。

2. 研究の目的

本研究では、輸送体が根の細胞において土壌/中心方向の細胞膜へ偏在するメカニズムの解明を目的とした。ほとんどの植物細胞の細胞膜には仕切りがないにもかかわらず、輸送体の偏った局在が形成されて維持される。研究代表者らは研究開始前までに連続的な細胞内小胞輸送（エンドサイトーシスとエキソサイトーシス）が植物の栄養輸送体の偏在性を形成・維持することを見出していたが、これを確定するとともに、小胞輸送の方向を決定するメカニズムの解明を目指した。また、輸送体へ偏在性を人為的に付与する方法の確立を目指した。

3. 研究の方法

1. ホウ酸トランスポーター BOR1 の偏在の順遺伝学的解析

BOR1 が根の各細胞において中心側細胞膜へ偏在するメカニズムを解明するため、BOR1-GFP の細胞内局在を指標とした順遺伝学的解析を行った。

2. BOR1 と NIP5;1 における偏在性に重要なアミノ酸配列の同定

NIP5;1 の N 末端領域および BOR1 の C 末端領域のうち偏在性に必要なアミノ酸配列をアラニンスキャンニング法により解析した。

3. ホウ酸輸送体のリン酸化に依存した相互作用タンパク質の同定と解析

GST プルダウンと LC-MS/MS 質量分析（北海道大学 高須賀博士らによる）により結合タンパク質を探索し、候補タンパク質の機能を逆遺伝学的に解析した。

4. 小胞輸送の制御因子の極性輸送における役割の解析

偏在性を規定しうる因子として、輸送小胞への積荷タンパク質（輸送体など）の選別に重要なクラスリン（コートタンパク質）アダプタータンパク質複合体（AP）1-4 が挙げられる。研究代表者らは AP2 複合体が NIP5;1 のエンドサイトーシスと偏在性維持に重要であることを報告していたが（Wang ら 2017 Plant Cell）、本研究では BOR1 の偏在性への寄与について解析した。また、トランスゴルジネットワーク（TGN）において積荷タンパク質の選別に働くことが示唆されている AP1 と AP4 や、リサイクリング系の制御因子 GNOM（ARF-GEF）に着目し、BOR1 の細胞内輸送における役割を解析した。

5. 他の輸送体への偏在性付与

NIP5;1 の配列を付加することにより、異種の膜タンパク質へ土壌側偏在性を付与する試験を進めた。改変タンパク質は、形質転換によりシロイヌナズナの根の表皮細胞に発現させた。

4. 研究成果

1. ホウ酸トランスポーター BOR1 の偏在の順遺伝学的解析

EMS 変異株のスクリーニングにより BOR1-GFP の偏在性が弱い変異株を得たが、種子を取得できず、その後の解析を断念した。変異株の矮性な形態から偏在性への植物ホルモンの寄与を想定し、検証したが、寄与を支持する結果は得られなかった。

2. BOR1 と NIP5;1 における偏在性に重要なアミノ酸配列の同定

NIP5;1 の N 末端領域および BOR1 の C 末端領域のうち偏在性に必要なアミノ酸配列をアラニンスキャンニング法により同定した。BOR1 については、リン酸化される複数のセリンおよびスレオニン残基が重要であった。アラニン（非リン酸化型）置換/アスパラギン酸（リン酸化ミミック型）置換の両方で偏在性が低下したため、リン酸化と脱リン酸化の両方が偏在性に重要であると考えられた。

3. ホウ酸輸送体のリン酸化に依存した相互作用タンパク質の同定と解析

NIP5;1 の N 末端領域と BOR1 の C 末端領域の野生型およびアラニン/アスパラギン酸置換型を大腸菌で合成し、GST プルダウンと LC-MS/MS 質量分析により相互作用タンパク質を探索した。特にホウ酸輸送体 BOR1 の結合タンパク質候補して得られた脱リン酸化酵素について解析を進め、特定の二重変異株がホウ素欠乏感受性であることを見出した。上記 2 の結果と合わせ、リン酸化と脱リン酸化による BOR1 の極性輸送の制御機構が推定された。

4. 小胞輸送の制御因子の極性輸送における役割の解析

輸送小胞への積荷タンパク質の選別に重要なクラスリンアダプタータンパク質（AP）複合体のうち AP2 複合体について解析を進めた。その結果、BOR1 と結合し恒常的なエンドサイトーシ

スを促進することで、偏在性の維持において重要な役割を果たすことを明らかにして論文発表した (Yoshinari et al. *Plant Physiology* 2019)。AP4 複合体については、BOR1 の偏在性ではなく液胞輸送系に重要であることを明らかにした。高ホウ素処理時に BOR1 は TGN の一部で AP4 と共同在することを超解像顕微鏡により確認した (お茶の水女子大学 植村博士との共同研究)。また、小胞輸送の制御因子である ARF-GEF の一つ GNOM の機能について、BrefeldinA 耐性 GNOM を発現させ BrefeldinA を処理する実験によって解析した。その結果、GNOM に依存したエンドサイトーシスがホウ酸トランスポーターBOR1 の偏在性に寄与することを明らかにし、論文発表した (Yoshinari et al. *Biology of the Cell* 2021)。

その他、BOR1 のホウ素に応答した分解がホウ酸輸送に伴う構造変化に依存することを示した研究において、構造変化が偏在性にも影響することを示した (Yoshinari et al. *Plant Cell* 2021)。

5. 他の輸送体への偏在性付与

NIP5;1 の配列により異種の膜タンパク質へ土壌側偏在性を付与する試験を進めた。上記 2 の解析で重要性を見出した NIP5;1 のリン酸化領域を含む 41 アミノ酸を NIP1;2 および水チャネル PIP2;1 の N 末端領域に付加/挿入したキメラタンパク質を発現させたが、偏在性を付与することはできなかった。続いて、NIP5;1 の N 末端領域全体を酵母やモエジマシダの亜ヒ酸輸送体の N 末端領域に付加/挿入したキメラタンパク質を発現させ、細胞内局在を解析した。本来液胞膜に局在する亜ヒ酸輸送体の局在を細胞膜に変化させたが、偏在性については明らかでなくさらなる解析が必要である。本形質転換シロイヌナズナにおいては、表皮細胞からの亜ヒ酸排出が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 高野 順平	4. 巻 92
2. 論文標題 植物のミネラル輸送研究最前線 8. ホウ素の輸送機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本土壌肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 129-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20710/dojo.92.2_129	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 高野 順平	4. 巻 56
2. 論文標題 ホウ酸を輸送しつつ感知するトランスセプター	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 117-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18978/jsr.p.56.2_117	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 A. Yoshinari, Y. Toda Y, J. Takano	4. 巻 0
2. 論文標題 GNOM dependent endocytosis maintains polar localization of the borate exporter BOR1 in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/boc.202000106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 A. Yoshinari, T. Hosokawa, M. P. Beier, K. Oshima, Y. Ogino, C. Hori, T. E. Takasuka, Y. Fukao, T. Fujiwara and J. Takano	4. 巻 0
2. 論文標題 Transport-coupled ubiquitination of the borate transporter BOR1 for its boron-dependent degradation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koaa020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Q. Wang, W. Zhang W, H. Xiao, N. Sotta, M. P. Beier, J. Takano, K. Miwa, L. Gao, T. Fujiwara	4. 巻 171
2. 論文標題 Involvement of boron transporter BOR1 in growth under low boron and high nitrate conditions in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pysiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 703-713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pp1.13249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshinari, A., Hosokawa, T., Amano, T., Beier, M.P., Kunieda, T., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Naito, S., and Takano, J.	4. 巻 179
2. 論文標題 Polar Localization of the Borate Exporter BOR1 Requires AP2-Dependent Endocytosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1569-1580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.01017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muthuvel Jothi, Junpei Takano	4. 巻 -
2. 論文標題 Understanding the regulatory mechanisms of B transport to develop crop plants with B efficiency and excess B tolerance.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant and Soil	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11104-023-05975-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計28件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Junpei TAKANO
2. 発表標題 Molecular Mechanisms of Boron Transport in Plants
3. 学会等名 42nd ANNUAL MEETING OF PLANT TISSUE CULTURE ASSOCIATION (INDIA) & INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADVANCES IN PLANT BIOTECHNOLOGY AND GENOME EDITING-2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野順平、室啓太、松本真季、田中佑樹、小椋康光、山崎有紗、吉成晃
2. 発表標題 ホウ酸トランスポーターBOR1はタベート細胞から薬室へホウ素を輸送する
3. 学会等名 日本土壌肥科学会 北海道大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 6.張哲, 山崎有紗, 中村俊介, 竹村駿介, 石黒澄衛, 高野順平
2. 発表標題 シロイヌナズナホウ酸輸送チャネルの小胞体からの輸送にはカーゴレセプター候補タンパク質KNS3とそのホモログが重要である
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野 順平
2. 発表標題 植物のホウ酸トランスセプター
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 大会シンポジウム 「農芸化学における分子から細胞・個体レベルまでの生命金属科学研究」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野 順平
2. 発表標題 ホウ酸トランスセプターBOR1
3. 学会等名 第62回植物生理学会年会シンポジウム「生命金属科学の新展開」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野 順平
2. 発表標題 植物におけるホウ酸トランスポーターの偏在・分解と選択的小胞輸送
3. 学会等名 第15回トランスポーター研究会年会 シンポジウム2（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 順平
2. 発表標題 生命金属動態の維持～植物のホウ酸トランスセプター～
3. 学会等名 コラボレーション企画 CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 順平
2. 発表標題 細胞質ホウ酸バイオセンサーの開発と利用
3. 学会等名 日本土壤肥料学会岡山大会 シンポジウム「植物の元素イメージング」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大島啓嗣、細川卓也、高野順平
2. 発表標題 シロイヌナズナのホウ酸輸送体BOR1のC末端細胞質側領域の酸性配列とユビキチン化の関係
3. 学会等名 日本土壤肥料学会岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠原千波、高野順平
2. 発表標題 ホウ酸チャネル NIP5;1が細胞膜において偏って局在するメカニズムの解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張哲、山崎有紗、中村俊介、高野順平
2. 発表標題 シロイヌナズナホウ酸チャネルの小胞体からの輸送に関わるKNS3の機能解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 室啓太、清水優大、荻野由香、堀千明、高須賀太一、笠井光治、藤原徹、高野順平
2. 発表標題 ホウ酸トランスポーター BOR1 の偏在制御におけるリン酸化の役割の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会島根大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴野文彦、Marcel Beier, 永田大地、高野順平
2. 発表標題 高親和性K ⁺ トランスポーターHAK5のカリウム濃度に応じた分解メカニズムの解明
3. 学会等名 日本植物生理学会島根大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野順平
2. 発表標題 ホウ酸トランスポーターの偏在・分解を制御するエンドメンブレンシステム
3. 学会等名 日本植物生理学会 大阪大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akira Yoshinari, Takuya Hosokawa, Taro Amano, Marcel Pascal Beier, Tadashi Kunieda, Tomoo Shimada, Ikuko Hara-Nishimura, Satoshi Naito, Junpei Takano
2. 発表標題 AP2-dependent and independent endocytic pathways: differential regulation of polar localization and vacuolar sorting of the borate transporter BOR1
3. 学会等名 International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野順平
2. 発表標題 ホウ酸トランスポーターの極性輸送と液胞輸送におけるエンドサイトーシスのルート
3. 学会等名 日本植物学会 第83回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室 啓太
2. 発表標題 シロイヌナズナホウ酸輸送体の極性制御機構の解析
3. 学会等名 JANPER・細胞骨格研究会 合同大会 島根大学
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野順平
2. 発表標題 Boron transport and sensing in Arabidopsis
3. 学会等名 ISM-8, The 8th International Symposium on Metallomics, Kanazawa (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Junpei Takano, Keita Muro, Akira Yoshinari, Maki Matsumoto, Arisa Yamasaki, Yu-ki Tanaka, Yasumitsu Ogra
2. 発表標題 AtBOR1 in tapetum cells transports boron to support pollen development
3. 学会等名 IPNC2022, Brazil
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Junpei Takano
2. 発表標題 AtBOR1 is a borate transceptor controlling degradation of itself
3. 学会等名 IPNC2022, Boron Satellite meeting, Brazil (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田麟太郎、室啓太、清水優大、大橋慧介、荻野由香、笠井光治、堀千明、高須賀太一、藤原徹、高野順平
2. 発表標題 シロイヌナズナのホウ酸輸送体の偏在機構の解明
3. 学会等名 植物の栄養研究会, 東京
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 室啓太, 吉田 麟太郎 ² , 清水 優大, 大橋 慧介, 荻野 由佳, 笠井 光治, 堀 千明, 高須賀 太一, 藤原 徹, 高野 順平
2. 発表標題 ホウ酸トランスポーター BOR1 のリン酸化/脱リン酸化を介した偏在制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会 仙台大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Junpei Takano
2. 発表標題 Mechanisms controlling polar localization and boron-dependent degradation of boric acid/borate transport proteins
3. 学会等名 19th International Workshop on Plant Membrane Biology. IWPMB2023, Taipei (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Junpei Takano
2. 発表標題 Boron transport and sensing by a borate transceptor in Arabidopsis
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Kobe (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daspute Abhijit Arun, Daichi Wasa, Keita Muro, Junpei Takano
2. 発表標題 Switching Localization of an Arsenite Transporter PcACR3;1 using N-terminal Region of a Boric Acid Channel AtNIP5;1
3. 学会等名 植物バイオテクノロジー学会 堺大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張哲, 山崎有紗, 中村俊介, 竹村駿介, 石黒澄衛, 高野順平
2. 発表標題 KNS3 and its two homologs form a probable cargo-receptor complex, important for ER exit of boric acid channels in Arabidopsis.
3. 学会等名 ISM-8, The 8th International Symposium on Metallomics, Kanazawa
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野順平
2. 発表標題 植物におけるホウ素の利用とホウ酸トランスセプター
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会、名古屋
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野順平
2. 発表標題 ホウ酸トランスセプターBOR1によるホウ酸感知と自己制御
3. 学会等名 植物の栄養研究会, 東京
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 室啓太、高野順平 (第2章第2節担当)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 7
3. 書名 生命金属ダイナミクス: 生体内における金属の挙動と制御	

1. 著者名 A. Yoshinari, J. Takano (Chapter1 担当)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 13
3. 書名 Plant Endosomes	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪立大学プレスリリース 持続的な作物生産に向けて https://www.osakafu-u.ac.jp/press-release/pr20201216/ 植物栄養学研究グループ https://www.omu.ac.jp/agri/plantnutrition/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高須賀 太一 (Takasuka Taichi) (70748409)	北海道大学・農学研究院・准教授 (10101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	植村 知博 (Uemura Tomohiro)		
研究協力者	吉成 晃 (Yoshinari Akira)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------