

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02880

研究課題名(和文)細胞内調節因子が主導する植物イオン輸送体の階層的機能統御の解明

研究課題名(英文)Elucidation of hierarchical functional control of plant ion transporters driven by intracellular regulatory factors

研究代表者

魚住 信之(Uozumi, Nobuyuki)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：40223515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物は様々な環境の変化に適応することが必要であり、乾燥・脱水・塩害などに応じた恒常性維持をする仕組みを備えている。植物イオン輸送体はその応答機構分子として機能しており、養分吸収、浸透圧調節、膜電位形成、細胞内酵素の活性化と不活化を行う。生体膜で機能するイオン輸送体は、直接および間接的に環境変化に反応して恒常性の維持、増殖と分化において重要な役割を担っている。本研究では、未解明となっているイオン輸送体の機能と役割とその統御の機構の解明をはかることをめざして検討を行った。環境変化に適応するためのイオン輸送体の同定を行うとともに、イオン輸送体の制御機構に関する知見を獲得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球環境は短期的にも長期的にも変化が激しく、地球上の生物はその変化に適応している。砂漠化などの環境変化は地球規模の課題となっている。生物は環境変化の中で細胞内恒常性を維持するために、生体膜で機能するイオン輸送体は重要な役割を果たしている。本研究では、これまで知られていなかった植物のイオン輸送体やその先祖型の輸送体の機能や調節機構を分子レベルから調べた。これにより、新たなイオン輸送体の分子機構の一端が明らかとなり、生物の環境適応性に関する知見のいくつかが明らかとなった。環境変化に耐性力を持つ植物の知的基盤を確立にあたり、本研究の成果は寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I

Living cells need to adapt to various changes in the environment, and have a mechanism to maintain homeostasis in response to drought, dehydration, salt damage, etc. The plant ion transporter functions as a molecular mechanism, and performs nutrient absorption, osmoregulation, membrane potential formation, and activation and inactivation of intracellular enzymes. Ion transport system located in biological membrane play important roles in maintaining homeostasis, proliferation and differentiation in response to environmental changes. In this study, we have elucidated the functions and roles of ion transport system, which have not been well characterized, and their control mechanism. We have identified ion transport system to adapt to environmental changes and obtained knowledge on the control mechanism of membrane ion transport.

研究分野：生物化学

キーワード：膜輸送体 脂質修飾 浸透圧 恒常性 イオン輸送

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物が必要とする炭素化合物を生産する光合成生物は、様々な環境の変化に適応することが必要であり、乾燥・脱水・塩害などに応じた恒常性維持をする仕組みを備えている。植物や葉緑体の先祖と考えられている藍藻のイオン輸送体はその応答機構分子として機能している。養分吸収、浸透圧調節、膜電位形成、細胞内酵素の活性化と不活化を行うことにより、直接および間接的に関与して恒常性の維持、増殖と分化において重要な役割を担っている。生体膜は環境変化の影響を最も影響を受ける。生体膜や埋め込まれているイオン輸送体は様々な環境変化に対応するための分子によって調整されている。地球の耕作地の砂漠化は、塩の集積により環境の浸透圧が上昇して植物細胞の水が奪われたことが一つの原因である。このように、乾燥、脱水、塩の集積は浸透圧ストレスであり、植物の生産性を抑制する。Naの細胞内への過剰な侵入を防ぐために、陽イオンのKと陰イオンのClが細胞内主要イオンとして存在し、細胞の浸透圧を保っている。両イオンは、浸透圧調節にとどまらず、細胞の膨張や収縮、膜電位の維持、植物の成長や気孔開閉の制御に必須である。この現象にK、Cl、Na輸送体が関わっている。このイオンを維持には、イオン輸送体とそれを調節機構が機能している。

### 2. 研究の目的

植物の細胞内イオン恒常性や膜電位の維持を担うイオン輸送体は、浸透圧変化(乾燥・脱水・塩害)への適応においても重要な働きを担う。本研究では、環境変化の一つである浸透圧変化の適応に関与する植物と光合成生物の藍藻の生体膜、イオン輸送体を調節する細胞内分子の同定と作用機構の解明をめざす。浸透圧変化による細胞反応にも着目して、環境変化に適応した細胞表面の適応反応について検討を行う。これにより、イオン輸送体の機能発現に至る階層的な統御機構を解明し、関連するイオン輸送体を協奏的に作動させる分子機構の理解をすすめることを目的とする。

### 3. 研究の方法

シロイヌナズナの遺伝子変異株候補種子についてPCRで目的遺伝子の変異を確認して、ホモ化をすすめた。また、相補試験や機能試験を行うためにバイナリベクターを用いた遺伝子の再導入を行った。機能未知のパルミトイル基転移酵素について酵母遺伝子変異株を用いて機能評価を行った。次に、CBLを導入した酵母のPAT遺伝子変異株に放射性標識したパルミチン酸をあたえタンパク質の修飾の有無を検出した。

イオン輸送活性に関しては大腸菌発現系を用いて検討した。イオン輸送体の機能測定やCBLとペアを組むCIPKの同定を卵母細胞に細胞内因子とイオン輸送体を単独発現もしくは共発現させて膜電位固定測定による電気生理測定を行った。CBLとCIPKの相互作用をtwo-hybrid法を遂行した。

CBL-CIPK複合体の中で、複数のイオン輸送体の輸送活性調節に関わる組み合わせを検討する。複数のイオン輸送体とCBL-CIPK複合体の共発現による2種類以上のイオン輸送体の機能活性を、卵母細胞の電気生理測定、酵母変異株を用いた相補テストと原子吸光法による輸送活性測定で調べる。CBL-CIPK複合体の機能発現に必須となるCaの結合の有無とPATによる脂質修飾残基の決定を行う。CBL-CIPK複合体が認識する配列を輸送体間の配列比較で絞り込み、アミノ酸を置換したチャネルを用いてCa結合とPATが脂質を付与する残基を調べた。植物内Caシグナリングの検出は、放射性同位体を用いてゲル内に閉じ込めた蛋白質との結合の有無を調べた。

### 4. 研究成果

シロイヌナズナで機能するKチャネルのTPK2とKC03がK輸送体として機能するか否かを調べた。TPK2はK輸送体として機能することを大腸菌発現系で明らかにした。KC03は輸送機能を持たなかった。TPK2がCaイオンによって調節を受けることを明らかにした。

機能未知のシロイヌナズナのパルミトイル基転移酵素を酵母変異株に導入して、24種類のパルミトイル基転移酵素の機能活性について酵母変異株を用いるスクリーニングにより検出した。また、パルミトイル基転移酵素遺伝子変異株のホモ化をすすめた。

生体膜に埋め込まれたイオン輸送体が浸透圧や塩濃度の変化で影響を受けることが分かっており、光合成微生物の藍藻と大腸菌の単細胞系で植物分子と膜輸送体の機能活性を検出するための基礎的検討を行った。外部の浸透圧や塩濃度が上昇した際にイオン輸送体の調節を行う藍藻のセカンドメッセンジャーとなるc-di-GMP合成酵素を調べた。4種類の本酵素候補遺伝子をクローン化したところ、DgcAが顕著な活性を示した。さらにDgcAを過剰発現した株では細胞外多糖生産によるバイオフィーム形成が促進された。この現象は、大腸菌においても確認された。細胞壁合成酵素と二成分系蛋白質が機能不全になることで、細胞壁などの細胞表面が影響を受けることが明らかになった。藍藻の二成分系でも細胞膜変化に関与することを見いだした。さらに、浸透圧の変化は細胞膜の機械受容性チャネルを活性化する。最も基本的な機械受容性チャネルを研究対象に検討を行ったところ、細胞内調節因子が高浸透圧に反応して輸送体の活性を調節することが明らかになった。高い塩濃度の添加によって、細胞表面の健全性が影響を受けるこ

とが示された。また、外環境変化による生体膜の伸縮に反応する機械刺激受容性チャネルの機能解析とその細胞内調節系を検討し、多重な調節をイオン輸送体が受けている実例を示した。

シロイヌナズナで機能するイオン輸送体の KEA1-KEA6 の細胞内局在性を調べた。細胞膜とチラコイド膜に存在していることが分かった。KEA1-KEA6 の輸送活性も大腸菌反転膜によりアンチポーター輸送活性を測定した K を透過する活性を検出した。さらに、チラコイド膜で機能する KEA3 とその置換体について詳細に解析を行い、H<sup>+</sup>輸送による NPQ の調節に参与することを確認した。

CBL5 の孔辺細胞における発現を検討したところ、既存の発現組織別発現結果と一致した。また、維管束系において顕著な発現が見いだされたが変異株の表現型は観察されなかった。孔辺細胞で発現して気孔閉鎖に参与する陰イオンチャネル SLAC1 を活性化するリン酸化酵素の CIPK11 と CBL5 が機能することを検討した。質量分析から既知以外のアミノ酸残基にリン酸化が生じることが見つかった。気孔閉鎖は細胞の浸透圧や細胞壁の調節と相関して膜タンパク質を調節することによって細胞内浸透圧の調整についての知見を得た。生体膜に係留する CPK6 は N 末領域の Cys5 がパルミトイル化修飾されている。他の Cys がパルミトイル化を受ける可能性について検討したところ、Cys5 のみが選択的にパルミトイル化を受けることが分かった。シロイヌナズナの 24 種類のパルミトイル基転移酵素の中で多くのパルミトイル基転移酵素が CPK6 を対象にパルミトイル化修飾に関与することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugawara Keita, Toyoda Hayato, Kimura Mami, Hayasaka Shunsuke, Saito Hiromi, Kobayashi Hiroshi, Ihara Kunio, Ida Tomoaki, Akaike Takaaki, Ando Eiji, Hyodo Mamoru, Hayakawa Yoshihiro, Hamamoto Shin, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 478
2. 論文標題 Loss of cell wall integrity genes <i>cpxA</i> and <i>mrcB</i> causes flocculation in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 41 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20200723	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 該当する

1. 著者名 Saito Shunya, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Calcium-Regulated Phosphorylation Systems Controlling Uptake and Balance of Plant Nutrients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00044	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 Ishikawa Ko, Chubachi Chihiro, Tochigi Saeko, Hoshi Naomi, Kojima Seiji, Hyodo Mamoru, Hayakawa Yoshihiro, Furuta Tadaomi, Kera Kota, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 166
2. 論文標題 Functional characterization of multiple PAS domain-containing diguanylate cyclases in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 659 ~ 668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mic.0.000929	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 Tsujii Masaru, Tanudjaja Ellen, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Diverse Physiological Functions of Cation Proton Antiporters across Bacteria and Plant Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4566 ~ 4566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124566	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 Uehara Chihiro, Takeda Kota, Ibuki Tatsuki, Furuta Tadaomi, Hoshi Naomi, Tanudjaja Ellen, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Analysis of Arabidopsis TPK2 and KC03 reveals structural properties required for K <sup>+</sup> channel function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Channels	6. 最初と最後の頁 336 ~ 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19336950.2020.1825894	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 Kera Kota, Yoshizawa Yuichiro, Shigehara Takehiro, Nagayama Tatsuya, Tsujii Masaru, Tochigi Saeko, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Hik36/Hik43 and Rre6 act as a two-component regulatory system to control cell aggregation in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76264-2	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 Amemiya Shun, Toyoda Hayato, Kimura Mami, Saito Hiromi, Kobayashi Hiroshi, Ihara Kunio, Kamagata Kiyoto, Kawabata Ryuji, Kato Setsu, Nakashimada Yutaka, Furuta Tadaomi, Hamamoto Shin, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 294
2. 論文標題 The mechanosensitive channel YbdG from <i>Escherichia coli</i> has a role in adaptation to osmotic up-shock	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12281 ~ 12292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.007340	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 Tsujii Masaru, Kera Kota, Hamamoto Shin, Kuromori Takashi, Shikanai Toshiharu, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Evidence for potassium transport activity of Arabidopsis KEA1-KEA6	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46463-7	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kanane Sato, Shunya Saito, Megumi Kato, Shin Hamamoto, Taishin Kakei, Masaru Kono, Matteo Grenzi, Alex Costa, Yasuhiro Ishimaru, Nobuyuki Uozumi
2. 発表標題 Isolation of natural ion channel inhibitors in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunya Saito, Misaki Sato, Shin Hamamoto, Philipp Koster, Jeorg Kudla and Nobuyuki Uozumi
2. 発表標題 Multiple CBL-CIPK pairs regulate Arabidopsis guard cell ion channels
3. 学会等名 18th International Workshop on Plant Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ジフェニル尿素化合物誘導体	発明者 魚住信之, 有澤美枝子, 鈴木喬太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019- 14 5 811	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 植物のカリウムイオン輸送体の機能制御剤及び植物の育成方法	発明者 魚住信之 遠藤晃輔 浜本晋 池ノ上芳章	権利者 国立大学法人東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-042163	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

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	石丸 泰寛  (Ishimaru Yasuhiro)  (80590207)	東北大学・工学研究科・准教授    (11301)	

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			
イタリア	University of Milan			