

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06565

研究課題名（和文）究極の酵母タンパク質発現ライブラリーを用いたイネ膜輸送体の網羅的機能解析法の開発

研究課題名（英文）Development of a comprehensive functional analysis method for rice membrane transporters using the yeast protein expression library.

研究代表者

秋廣 高志（Takashi, Akihiro）

島根大学・学術研究院農生命科学系・助教

研究者番号：40508941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：イネの膜輸送体を約1500種類発現する酵母タンパク質発現ライブラリーを構築し、このライブラリーを用いて、殺虫剤の輸送体のスクリーニングを行った。本ライブラリーはこれまでの研究ではできなかったネガティブスクリーニングが可能であるため、選抜培地上で感受性を示す酵母を短期間で効率的にスクリーニングすることが可能である。本研究では、殺虫剤への感受性を示す酵母を選抜し、その輸送体を欠損したイネまたは過剰発現するイネを作出し、欠損すると殺虫剤の吸収量が減少し、過剰発現させると吸収量が増加することが明らかとなった。構築したライブラリーが有効なスクリーニング方法であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネには約1500種類の膜輸送体があると考えられている。そのうち、機能が明らかになっている輸送体は30%程度であり、機能が不明な膜輸送体が数多く存在する。膜輸送体の欠損変異体を用いた研究は膜輸送体研究を行ううえで最も強力な研究材料となるが、1つの膜輸送体を欠損しても表現型が現れない場合もある。本研究で構築した実験手法は逆遺伝学的な手法を用いた手法であり、本ライブラリーを構築できたことで、これまで機能が明らかになっていなかった膜輸送体の機能を次々に明らかにできるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The yeast protein expression library that expresses about 1500 rice membrane transporters was developed and used this library to screen for transporters of insecticides. This library enables negative screening, which has not been possible in previous studies. It is possible to efficiently screen yeast for susceptibility on selection media in a short period of time. In this study, we selected yeasts susceptible to insecticides and generated rice plants lacking or overexpressing the transporter, and found that the amount of insecticide absorption was reduced when the transporter was deficient and increased when it was overexpressed. The constructed library proved to be an effective screening method.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：膜輸送体 チャンネル トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イネには約 1500 種類の膜輸送体が存在していると考えられている。そのうち機能が明らかになっているのは 30%であり、多くの膜輸送体の機能が明らかではない。膜輸送体を欠損した変異体を使った研究は、膜輸送体の機能を明らかにする上で、とても有力な実験材料である。しかし、1つの膜輸送体を欠損しただけでは、表現型が現れないものも多く存在しており、膜輸送体研究の進展を送らせていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、逆遺伝学的な研究方法を用いて膜輸送体の機能解明を行うための実験プラットフォームの構築を目指した。イネ完全長 cDNA を約 1500 種類入手し、これを酵母タンパク質発現ベクターにサブクローニングし、イネの膜輸送体をすべて発現する酵母タンパク質発現ライブラリーを構築し、このライブラリーを用いて新奇の膜輸送体を選抜できないかを検証する。

3. 研究の方法

相同組み換えを使ったクローニング方法である GAP-repair クローニング法を用いて、1500 種類のイネ完全長 cDNA を酵母タンパク質発現ベクターにサブクローニングする。こうして構築したベクターを酵母に形質転換し、ライブラリーを構築する。このライブラリーをさまざまな物質を含む培地で培養し、酵母の生育を調査することで、導入された膜輸送体の機能を特定する。

4. 研究成果

殺虫剤である thiamethoxam を含む培地でライブラリーを生育し、感受性を示

す酵母を選抜した。OsALT15 は酵母の thiamethoxam 吸収量を増加させた。OsALT15 を欠損したまたは過剰発現するイネを作出し、thiamethoxam の吸収量を調査したところ、欠損した場合、thiamethoxam の吸収量は減じ、過剰発現させた場合、thiamethoxam の吸収量が増加した。過剰発現体では少ない殺虫剤でウンカが死んだことから、OsALT15 を高発現するイネは少ない量の殺菌剤の使用で防虫効果を示すことが明らかとなった。本研究により、イネの膜輸送体をすべて発現するライブラリーは、新奇の膜輸送体をスクリーニングする手法として使えることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mohammad Arif Ashraf, Takashi Akihiro, Keita Ito, Sayaka Kumagai, Ryohei Sugita, Keitaro Tanoi, Abidur Rahman	4. 巻 14
2. 論文標題 ATP binding cassette proteins ABCG37 and ABCG33 function as potassium-independent cesium uptake carriers in Arabidopsis roots	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Plant	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molp.2021.02.002	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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		
中国	South China Agricultural University		