

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580076

研究課題名（和文） オオムギ 2 成分高親和性硝酸イオン輸送系の機能解析

研究課題名（英文） Functional characterization of two-component high-affinity nitrate transport system

研究代表者

末吉 邦 (SUEYOSHI KUNI)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：10216278

研究成果の概要（和文）：オオムギ根は、高親和性硝酸輸送系 (HATS) を介して低濃度の硝酸を吸収する。本研究では、HATS を構成する 2 つのタンパク質、HvNRT2 および HvNAR2 の機能解明につながる知見を得た。まず、2 つのタンパク質が細胞膜上で複合体を形成し得ることを *in vitro* で明らかにした。続いて、根の根毛域において、皮層の最も外側の細胞層に共に局在することを明らかにした。また、分割蛍光タンパク質を利用して、HvNRT2 と HvNAR2 が植物細胞の細胞膜上で相互作用して存在することを *in vivo* で明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In barley, low level of external nitrate is absorbed by high affinity transport system (HATS) which is composed of two proteins, HvNRT2 and HvNAR2. In this study, it was suggested that two proteins make complex in the isolated plasma membrane and co-localized at out most layer of the cells in root cortex. In addition, Bimolecular fluorescence complementation analysis showed that HvNRT2 and HvNAR2 interacts in the plasma membrane of the native plant cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：オオムギ、硝酸イオン、膜輸送、トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

(1)はじめに

陸生植物は、窒素源として主に土壌中の硝酸イオンを根から吸収し、これを有機態窒素に同化している。作物の生産性向上のためには窒素施肥が必須であるが、今後減肥料栽培が不可欠となる中で、作物の窒素(硝酸イオン)利用効率をいかに向上させるかが求めら

れる。そのために、根の細胞膜上において低濃度硝酸イオンの吸収に関わる高親和性輸送系 (HATS) の機能制御機構を明らかにすることが重要となる。これまで、HATSを直接担うタンパク質として、高親和性硝酸イオントランスポーター (NRT2) が考えられてきたが、近年 NRT2の制御因子としてNAR2タンパク質が新たに発見された。すなわち、HATSは、NRT2とNAR2

が担う2成分輸送系であることが提案された。応募者は、HATSの機能発現におけるNAR2の役割を明確にすることが重要と考えた。

(2) 研究の学術的背景

国内外における古くからの生理学的研究により、硝酸イオンは基質親和性の異なる2つの輸送系に機能的に分類されてきた。一つは、低濃度域(0.5mM以下)での硝酸イオン吸収に関係するHATSであり、もう一つは高濃度域(0.5mM以上)での吸収に働く低親和性輸送系(LATS)である。これら2つの輸送系は、いずれもプロトンの電気化学的ポテンシャル勾配を利用して硝酸イオンを細胞内に輸送する2次能動輸送系であり、それらの実体としてのタンパク質は硝酸イオントランスポーター(NRT)と総称されている。90年代に入って、米英仏などのグループを中心に、NRTをコードする遺伝子がさまざまな植物種で同定され、NRTの分子生物学的研究が加速した。NRT遺伝子にT-DNAが挿入されたシロイヌナズナ変異株やNRTmRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞の解析から、一部のNRTについては硝酸イオン輸送体であることが明確にされた。現在では、HATSをコードする遺伝子はNRT2、LATSをコードする遺伝子はNRT1と呼ばれている。NRT2およびNRT1はいずれも遺伝子ファミリーを形成しており、例えばシロイヌナズナではNRT2は7個(AtNRT2.1~AtNRT2.7)、NRT1は9個(AtNRT1.1~AtNRT1.9)のメンバーがゲノム上に同定されている(AtNRT1についてはさらに44個の類縁メンバーを含める場合もある)。オオムギにおいては、4つのNRT2(HvNRT2.1~HvNRT2.4)遺伝子が単離され、応募者を含めた国内外の研究者により解析されている。多くのNRT2メンバーの中で最も機能解析が進んでいるのは、シロイヌナズナのAtNRT2.1とAtNRT2.2の2つで、それらは、シロイヌナズナHATSの主要な構成因子であることが示された。最近、NRT2の機能発現には新たなNAR2タンパク質が必要であることが示唆され、HATSにおけるNAR2の役割が国内外で注目されている。しかし、NAR2が細胞膜に存在するのか、NAR2はNRT2と相互作用することができるのか、など不明な点が多い。HATSの機能発現におけるNAR2の位置づけを明確にするためには、これらの不明な点を解明することが必要である。

2. 研究の目的

応募者は、最近、オオムギのHvNRT2とHvNAR2の両タンパク質に対する抗体を作成することに他の研究者に先駆けて成功し、免疫化学的手法によるNRT2/NAR2のタンパク質レベルでの解析が可能になった[6]。オオム

ギは、硝酸イオン吸収に関する生理学的研究に古くからよく用いられており、最も多くのデータが蓄積されている植物種である。しかし、それらの生理的データを分子レベルで裏付けることのできるデータは少ない。モデル植物であるシロイヌナズナは、硝酸イオン輸送に関する遺伝子およびタンパク質の機能解析には強力な材料であるが、硝酸イオン吸収の生理は、オオムギとシロイヌナズナとは大きく異なり、植物種ごとに詳細な分子レベルの解析が求められている。

そこで、本研究では、「オオムギHATSの機能発現におけるHvNAR2の役割を明確にすること」を目標とし、前述した不明な点を明らかにすべく、以下の項目を行った。

- ①HvNRT2/HvNAR2の複合体形成をin vitroで明らかにする。
- ②HvNRT2およびHvNAR2の根組織内局在性を免疫組織化学的手法で明らかにする。
- ③インタクトな植物細胞内におけるHvNRT2とHvNAR2の相互作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) オオムギの生育

オオムギ(*Hordeum vulgare* L. cv. Minorimugi)種子を水で湿らせたろ紙で包み、グロースキャビネット内(25°C)で発芽させた。3日目に無窒素培養液の入ったバットに種子を移植し、連続光下で栽培した。無窒素培養液は毎日交換した。7日目に無窒素培養液に窒素源を加え、一定時間後に根を採取した。なお、無窒素培養液の組成は以下のとおりである。

0.1mM	CaCl ₂
1.0mM	MgSO ₄
0.2mM	KH ₂ PO ₄
2.5×10 ⁻² mM	Fe-EDTA・Na ₂
1.0×10 ⁻² mM	H ₃ BO ₃
5.0×10 ⁻⁴ mM	MnSO ₄
2.0×10 ⁻⁴ mM	CuSO ₄
5.0×10 ⁻⁴ mM	ZnSO ₄
1.0×10 ⁻⁵ mM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄

(2) ブルーネイティブ電気泳動(BNE)法

オオムギ幼植物根から水性2層分配法により細胞膜画分を調製し、界面活性剤で膜画分から可溶化したタンパク質をBNEに供したのち、HvNRT2およびHvNAR2を各々の抗体を用いた免疫プロットング法で検出した。

(3) 免疫組織染色法

無窒素で7日間育てたオオムギ幼植物に0.4mM硝酸と0.4mMアンモニア塩をそれぞれ与え、12時間後に根を採取した。根の先端部から20mmの部位から横断切片を作成し、HvNRT2およびHvNAR2に対する抗体を用いて蛍光抗体染色を行なった。

(4) HvNRT2およびHvNAR2の細胞内における相互作用解析

インタクトな植物細胞内におけるHvNRT2およびHvNAR2の相互作用を解析するために、Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法を行なった。HvNRT2.1およびHvNAR2.3をYellow fluorescence protein (YFP)の分割N末端側(nYFP)あるいは分割C末端側(cYFP)と融合タンパク質を形成するようコンストラクトを作成した。島根大学総合科学研究支援センターより分与された4種のBiFCベクター(nYFP/pUGWB0、cYFP/pUGWB0、nYFP/pUGW2、cYFP/pUGW2)を用いた。クローニングサイトへのHvNRT2.1とHvNAR2.3のopen reading frameの組み込みは、Gatewayシステムを利用した。

作成したコンストラクトは、パーティクルガンを用いてタマネギ表皮細胞に導入し、融合タンパク質を一過的に発現させ、YFPの発する蛍光を観察した。なお、蛍光はGreen fluorescence protein (GFP)の波長で観察した。

4. 研究成果

(1) HvNRT2およびHvNAR2の複合体形成

硝酸塩を24時間供与したオオムギ幼植物根から調製した細胞膜画分をBNEに供し、HvNRT2とHvNAR2の抗体を用いて免疫ブロット解析を行なった。HvNRT2抗体を用いた結果HvNRT2モノマーと思われるバンドが検出されなかった(図1:黒矢頭)。

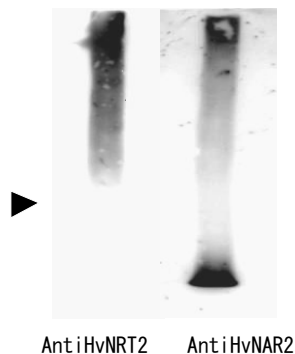


図1. BNEによるタンパク質複合体解析

一方、HvNAR2抗体を用いた結果では、20kDa付近にHvNAR2のモノマーと思われるバンドが検出された(図1:赤矢頭)。また、モノマーより高分子側にも両抗体によりバンドが検出され、HvNRT2とHvNAR2が複合体を形成していることが示唆された。HvNAR2のモノマーのバンドが検出されたことは、HvNAR2がHvNRT2より過剰に存在していると考えられる。

(2) HvNRT2およびHvNAR2の根組織内局在性

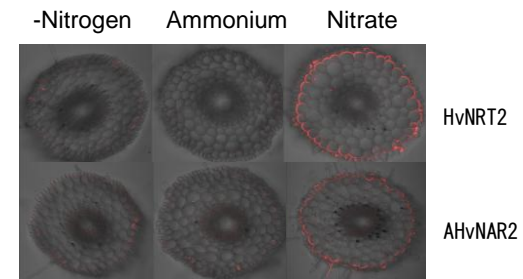


図2. HvNRT2とHvNAR2の組織内局在性

(3) BiFC法によるHvNRT2およびHvNAR2の相互作用解析

いくつか作成したコンストラクトのうち、HvNRT2.1-nYFPとHvNAR2.3-cYFPの組み合わせをタマネギ表皮で発現させ、蛍光を観察した結果、細胞膜上で蛍光が観測された(図3右)。蛍光が観測されるということは、HvNRT2とHvNAR2が細胞膜上で相互作用し、分割YFPの構造が最構成されたことを示している(図4)。

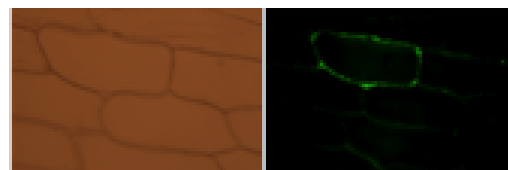


図3. BiFC法における蛍光観察

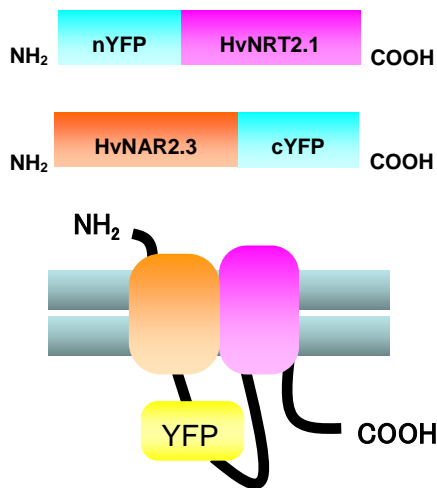


図 4. BiFC 法による YFP の再構成モデル

この実験では、HvNRT2 の N 末端に nYFP を、HvNAR2 の C 末端に cYFP を付加しており(図 4 上)、融合タンパク質が植物細胞内で発現した場合、YFP は細胞質側に露出し、そのため再構成が可能となったと考えられる(図 4 下)。

(4) 今後の課題

以上のことより、HATS の機能発現において、細胞膜における HvNRT2 と HvNAR2 の相互作用が重要であることが示唆された。今後は、この相互作用が硝酸イオンの輸送活性の発現に直接必要であるのか、タンパク質の細胞膜への局在に関係するのかを明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Ishikawa, Y., Ito, Y., Sato, Y., Fukaya, M., Takahashi, H., Morikawa, N., Ohtake, T., Ohyam and K. Sueyoshi,
Two-component high-affinity nitrate transport system in barley: membrane localization, protein expression in roots and a direct protein-protein interaction, *Plant Biotechnol*, vol. 26, p. 197-205, 2009. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- ① 末吉邦, 植物トランスポーター研究の新しい展開, 第 4 回ストレス科学シンポジウム, 2012 年 3 月 8 日, 倉敷, 岡山
② 石川伸二・園部和幸・三谷奈見季・馬建鋒・原田久富美・大山卓爾・末吉邦, オオムギ低親和性硝酸トランスポーターの機能解析, 日本土壌肥料学会 2011 年つくば大会, 2011 年 8 月 9 日, つくば, 茨城

- ③ Sueyoshi K. Nitrate transporters in barley. 3rd Japan-China Joint Workshop on Plant Nutrition, 2011 年 3 月 27 日, 倉敷, 岡山
④ Ishikawa, S., Ohishi M., Yamaji N., Ma JF., Ohtake N., Ohyama T., Sueyoshi K. Two-component high-affinity nitrate transport system in barley: Localization in roots and protein-protein interaction in plant cells. 1st International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, 2010 年 7 月 27 日, 犬山, 愛知
⑤ Sueyoshi K., Ohyama T. Nitrate uptake, transport and accumulation in higher plants. 2nd International Meeting of IPM, 2009 年 12 月 9 日, ハノイ, ベトナム

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.niigata-u.ac.jp/~sueyoshi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末吉 邦 (SUEYOSHI KUNI)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号：10216278

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし