

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14805

研究課題名（和文）イネアンモニウム輸送体の偏在と小胞体蓄積の生理的意義の解明

研究課題名（英文）Mechanisms underlying the polar localization and ER accumulation of rice ammonium transporter1

研究代表者

小西 範幸 (Konishi, Noriyuki)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：20866959

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：窒素は、植物がもっとも多量に必要とする必須元素である。イネの3種類のアンモニウム輸送体1 (AMT1) は、水田における主要な窒素源であるアンモニウムの吸収を担っている。イネのAMT1は偏在と小胞体蓄積というイネに特有の翻訳後制御を受けるが、その制御機構は不明であった。本研究では、AMT1のC末端細胞質領域に変異を加えた変異型AMT1の解析から、1) AMT1;2のC末端のリン酸化は局在の制御に関与しない、2) AMT1;1のC末端の13アミノ酸領域がその膜交通に必須であること、を明らかにした。さらに、共免疫沈降によって、これらの制御に関与しうる複数の相互作用因子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、AMT1のイネに特徴的な翻訳後制御機構の解明に向けての端緒をつかむことができた。今後、イネの窒素利用効率の向上に資する発見につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Ammonium is a major nitrogen source for paddy-growing rice, and three ammonium transporter1 (AMT1) members are responsible for its uptake. In rice, AMT1 members polarly localize at the distal side of the plasma membrane, and they accumulate in ER after ammonium supply. However, the physiological significance and mechanisms underlying these posttranslational regulations are poorly understood.

Here, we analyzed the localization of various AMT1;1 deletion variants and point-mutated AMT1;2 variants to investigate the region involved in their polar localization and ER accumulation. Overall, this analysis indicates that 1) phosphorylations at the C-terminal cytosolic region of AMT1;2 was not required for its polar localization, 2) the 13 amino acid region of AMT1;1 C-terminus was involved in its membrane trafficking. Furthermore, by co-immunoprecipitation, we identify several interacting proteins of AMT1;1 and AMT1;2 as potential regulators of their posttranslational regulations.

研究分野：植物栄養学

キーワード：アンモニウム イネ アンモニウム輸送体 極性局在 小胞体蓄積 リン酸化 翻訳後制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

窒素は植物が最も多量に必要とする土壌由来の必須栄養素である。嫌気的な水田ではアンモニウムが優勢な窒素形態であり、イネはアンモニウムを主な窒素源することが知られている。申請者らの過去の研究から、イネのアンモニウム吸収は、根で発現する3種類のアンモニウム輸送体 (AMT1) 分子種 (AMT1;1, AMT1;2, AMT1;3) によることが分かっていた [1]。すなわち、AMT1 分子種の制御がイネの効率的なアンモニウム利用の鍵を握ると考えられる。AMT1 タンパク質の局在を詳細に解析すると、いずれの AMT1 分子種も外皮細胞の遠心側の細胞膜に偏った局在 (偏在) を示した。さらに、AMT1;1 と AMT1;2 は、アンモニウムの供与に応じた発現増大に伴って、小胞体にも蓄積した。AMT1 分子種の偏在性や小胞体蓄積性は、他の植物種では報告されておらず、イネ特有の翻訳後制御であると考えられる。しかし、その生理的な意義や制御メカニズムは全くわかっていない。

2. 研究の目的

本申請では、イネ AMT1 分子種の翻訳後制御、特に偏在性と小胞体蓄積性の生理的意義の解明を第一の目的とした。さらに、これらの翻訳後制御メカニズムの解明に向けた制御因子の探索を第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 偏在性と小胞体蓄積性に関わる領域の探索

AMT1 分子種はその C 末端に大きな細胞質領域を有している [2]。この領域がなんらかの制御を受けて偏在性と小胞体蓄積性が制御されると仮定し、C 末端に変異を加えた AMT1;1 と AMT1;2 の偏在性と小胞体蓄積性を検討した。

① AMT1;2 の C 末端細胞質領域におけるリン酸化が局在に及ぼす影響の検討

アブラナ科のモデル植物シロイヌナズナのホウ素輸送体 AtNIP5;1 の偏在性には、その N 末端細胞質領域のリン酸化が必要だと知られている [3]。AMT1;2 の偏在にもリン酸化が関与すると仮定し、その C 末端にある計 8 か所のリン酸化されうるアミノ酸 (セリン、スレオニン、チロシン) 残基を、脱リン酸化を模倣するアラニン、あるいは、リン酸化を模倣するアスパラギン酸に置換した。Flag-tag を付加したこれらの変異型 AMT1;2 遺伝子を AMT1;2 自身のプロモーターで *amt1* 三重変異体に発現させ、抗 Flag 抗体を用いた免疫染色でその局在を評価した。さらに、アンモニウムの吸収についても評価した。

② AMT1;1 の C 末端細胞質領域の欠失が局在に及ぼす影響の検討

AMT1;1 に関しては、その C 末端の異なる領域を欠失させた変異型 AMT1;1 を作成し、Flag-tag を付加したこれらの変異型 AMT1;1 遺伝子を AMT1;1 自身のプロモーターで *amt1* 三重変異体に発現させ、抗 Flag 抗体を用いた免疫染色でその局在を評価した。

(2) 共免疫沈降による相互作用タンパク質の探索

(1) で作成した AMT1;1-Flag あるいは AMT1;2-Flag を発現させた機能相補イネを 3 日間の窒素欠乏処理、または、充足アンモニウム処理し、その根からタンパク質を抽出した。膜タンパク質画分を精製したのち、Flag タグを用いた共免疫沈降を実施した。沈降タンパク質を LC-MS/MS 解析に供し、含まれるタンパク質を網羅的に同定した。

4. 研究成果

(1) 偏在性と小胞体蓄積性に関わる領域の探索

① AMT1;2 の C 末端細胞質領域におけるリン酸化が局在に及ぼす影響の検討

8 か所のリン酸化されうる残基それぞれを脱リン酸化/リン酸化模倣した合計 16 種類の変異型 AMT1;2 を *amt1* 三重変異体に導入し、これらの局在を解析した。しかし、いずれも遠心側の偏在性と小胞体蓄積性を示した。この結果は、シロイヌナズナの AtNIP5;1 と異なりイネの AMT1;2 の偏在制御にリン酸化が関与しないことを示した。

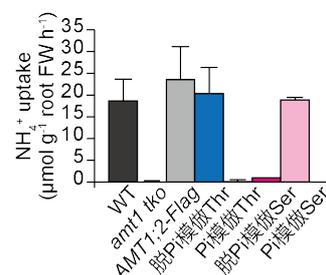
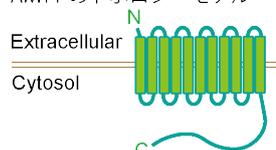
AMT1 の C 末端のリン酸化は AMT1 の活性制御に関わる [4]。特に、幅広い種間の AMT1 で保存されているスレオニン残基のリン酸化は、AMT1 のアンモニウム輸送を不活化し、過剰なアンモニウムによる毒性を回避する機構として知られている [4]。しかし、この保存されたスレオニン残基以外で AMT1;2 の活性制御に関わるリン酸化残基は見出されていない。AMT1;2 の C 末端にある 8 か所のアミノ酸残基の中に新規な活性制御残基があるかを知るために、上記で作出した変異型 AMT1;2 を導入したイネの根におけるアンモニウム吸収活性を比較した。既知の保存されたスレオニン残基のリン酸化模

図 1: AMT1;2 の C 末端配列とリン酸化/脱リン酸化模倣変異型 AMT1;2 のアンモニウム吸収

AMT1;2 の C 末端細胞質領域のアミノ酸配列 (リン酸化されうる残基)

LGLLLRISAEDEMAGMDQTRHGGFYAYHDD
DASGKPDRSVGGFMLKSAHGTTQVAAEMGGHV

AMT1 のトポロジーモデル



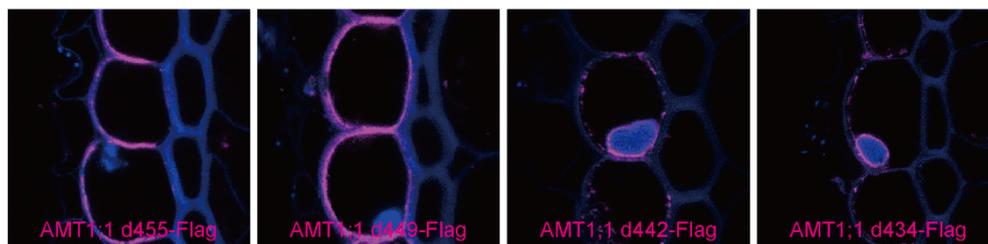
倣によるアンモニウム輸送活性の喪失に加え、保存されていないセリン残基の一つを脱リン酸化模倣した場合にも輸送活性が完全に失われることが分かった (図1)。AMT1;2 の免疫沈降において、このセリン残基は窒素欠乏条件とアンモニウム充足条件の両方でリン酸化されていたが、保存されたスレオニン残基はアンモニウム充足条件でのみリン酸化されていた。これら結果から、AMT1;2 は低窒素条件でセリン残基のリン酸化によって活性化されるが、根圏のアンモニウム濃度の上昇に伴いスレオニン残基のリン酸化によって不活性化されるという 2 段階の翻訳後制御を受けることが示唆された。当初の目的とは異なるものの、本解析からイネの AMT1 の活性制御に関わる新規なリン酸化サイトを見出すことに成功した。AMT1 の活性制御を通したイネのアンモニウム利用効率の向上に向けて、さらに研究を進めていく。

② AMT1;1 の C 末端細胞質領域の欠失が局在に及ぼす影響の検討

AMT1;1 の C 末端細胞質領域 (435 番目のロイシン残基から 498 番目のバリン残基の領域) を末端側から徐々にデリレーションしたところ、449 番目のメチオニン残基から最後の 498 番目のバリン残基までの 50 アミノ酸を欠失させてもその偏在に影響しなかったが、442 番目のアスパラギン酸残基以降の 55 アミノ酸を欠失させると AMT1;1 は小胞体に蓄積し、細胞膜への膜輸送が阻害された (図2)。このことは、膜ドメインに近い 435 番目のロイシン残基から 449 番目のメチオニン残基までの領域に AMT1;1 の膜輸送に必要な領域があることを示唆している。膜輸送に必要な領域をさらに絞り込むため、449 番目のメチオニン残基から 498 番目のバリン残基までを欠失させた AMT1;1 の 446 番目-448 番目、443 番目-445 番目、439 番目-441 番目、435 番目-438 番目の領域をアラニンに部分置換した変異型 AMT1;1 の局在を解析した。446 番目-448 番目と 443 番目-445 番目を部分置換しても細胞膜での偏在は維持されたが、439 番目-441 番目と 435 番目-438 番目の部分置換によって AMT1;1 は小胞体に蓄積した。これらの結果は、AMT1;1 の C 末端の膜ドメインに近い 7 アミノ酸の領域がその小胞体蓄積と偏在の制御に関わる可能性を示している。

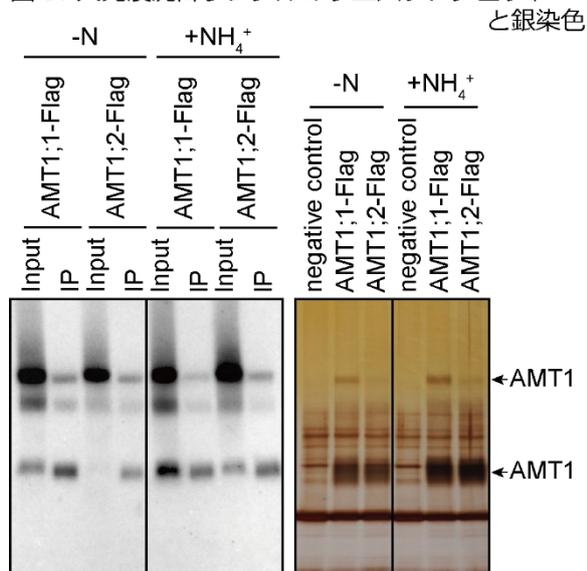
図2: AMT1;1 の C 末端細胞質領域の欠失による細胞内局在の変化

	435	445	455	465	475	485	498
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
AMT1;1	LGLLR	LSAEDETSGMDL	TRHGGFAYVYHDEDEHDKSGVGGFMLRSAQTRVEPAAAAASNSNNQV				
AMT1;1d460-	LGLLR	LSAEDETSGMDL	TRHGGFAYVYHDEDEHDKSGVGGFMLRSAQTRVEPAAAAASNSNNQV				
AMT1;1d455-	LGLLR	LSAEDETSGMDL	TRHGGFAYVYHDEDEHDKSGVGGFMLRSAQTRVEPAAAAASNSNNQV				
AMT1;1d449-	LGLLR	LSAEDETSGMDL	TRHGGFAYVYHDEDEHDKSGVGGFMLRSAQTRVEPAAAAASNSNNQV				
AMT1;1d442-	LGLLR	LSAEDETSGMDL	TRHGGFAYVYHDEDEHDKSGVGGFMLRSAQTRVEPAAAAASNSNNQV				
AMT1;1d434-	LGLLR	LSAEDETSGMDL	TRHGGFAYVYHDEDEHDKSGVGGFMLRSAQTRVEPAAAAASNSNNQV				



(2) 共免疫沈降による相互作用タンパク質の探索

AMT1;1-Flag と AMT1;2-Flag の共免疫沈降を実施し、沈降タンパク質中に AMT1;1-Flag および AMT1;2-Flag が含まれることをウエスタンブロットと銀染色で確かめた (図3)。このサンプルを LC-MS/MS 解析 (外部依頼) に供し、相互作用タンパク質の探索を実施した。ネガティブコントロールと比較して、AMT1;1 と AMT1;2 の両方のサンプルでよく検出されるいくつかの機能未知のタンパク質を見出すことができた。今後、イネプロトプラスト過発現系を用いた共免疫沈降やスプリットルシフェラーゼ再構成法などでこれらの相互作用を確認したのち、相互作用因子の機能解析を実施する予定である。



参考文献: [1] Konishi et al., 2021. *New Phytol.* 232: 1778-1792. [2] Loqué et al., 2007. *Nature* 446: 195-198. [3] Bi Wang et al., 2017. *Plant Cell*, 31: 2636-2648. [4] Beier et al., 2018. *Plant J.* 93: 992-1006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小西範幸、馬建鋒
2. 発表標題 イネマンガン輸送体OsNramp5の偏在と膜輸送に関わる領域の同定
3. 学会等名 第65回植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Konishi, N. and Ma, J. F.
2. 発表標題 Posttranslational regulation of ART1 in rice.
3. 学会等名 The 11th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小西範幸、馬建鋒
2. 発表標題 アルミニウム処理によるART1のリン酸化と核蓄積
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2023年度愛媛大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小西範幸、馬建鋒
2. 発表標題 イネケイ酸輸送体Lsi1の偏在制御に対するホスファチジン酸関与の検討
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山地直樹、三谷奈見季、小西範幸、馬建鋒
2. 発表標題 イネのケイ素吸収を制御する長距離シグナルタンパク質の同定
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Noriyuki Konishi and Jian Feng Ma
2. 発表標題 Clathrin-mediated endocytosis is not required for maintaining the polar localization of mineral transporters in rice
3. 学会等名 19th International workshop on plant membrane biology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------