

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23248017

研究課題名(和文)プロトンポンプと金属イオン輸送系の機能構造、機能共役、細胞ダイナミクスの解明

研究課題名(英文)Molecular structures, functional coordination, and cell dynamics of vacuolar proton pump and metal transporters

研究代表者

前島 正義 (Maeshima, Masayoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：80181577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,100,000円、(間接経費) 11,130,000円

研究成果の概要(和文)：液胞膜プロトンポンプH⁺-PPaseと液胞膜亜鉛輸送体MTP1に注目し、MTP1の特徴的アミノ酸30残基の生化学的機能(FEBS J. 2012)、MTP1のHis領域の分子構造と亜鉛結合性の特性(FEBS Open Bio 2013)、植物における亜鉛過剰での膜輸送系タンパク質の変動特性(Plant Physiol. 2011)、H⁺-PPaseのPPi加水分解機能の形態形成での重要性(Plant Cell 2011; Plant Signal. Behav. 2012)、H⁺-PPaseとホスファチジルイノシトールリン酸との相互作用(Plant Cell 2013)等の成果を得た。

研究成果の概要(英文)：We focussed our attention to the vacuolar proton H⁺-PPase and zinc transporter MTP1 and obtained the following information. (1) Individual biochemical role of 30 residues of MTP1 (FEBS J., 2012), (2) structural and ligand binding property of the His-rich loop of MTP1 (FEBS Open Bio, 2013), (3) biochemical dynamics of membrane transporters under Zn stress (Plant Physiol., 2011), functional role of H⁺-PPase for early development of seedlings (Plant Cell 2011, Plant Signal. Behav. 2012), and biochemical significance of interaction of H⁺-PPase and phosphatidylinositol phosphates (Plant Cell 2013).

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：金属イオン プロトンポンプ イオン輸送体 液胞 分子構造 機能調節

1. 研究開始当初の背景

本研究を開始した当初は下記の研究背景があった。

細胞内の金属イオン環境は、膜輸送系、金属キレーター等によって調節されている。たとえばZnは微量必須元素であるが、高濃度では細胞に障害を及ぼす。必須元素として細胞内に貯留し、過剰障害を防ぐために細胞外に放出あるいは液胞に隔離するシステムを備えている。これを支えるのが膜輸送系である。その解明のためには、各輸送体の濃度センシング、活性調節、発現調節の機構解明、各膜輸送体欠失の元素含量への影響、金属イオン集積オルガネラの動態を解き明かす必要がある。

申請者はH⁺-PPaseの研究を推進し、各国グループの参入の契機を作り、発表した構造モデルは世界標準として認知されていた。H⁺-PPaseはエネルギー変換酵素として特異な位置を占めシンプルな構造をもつ。東大の豊島教授・三村助教(当研究室出身)は高い解像度を与える結晶を得て、可能な項目で共同研究を進めることとした。米国Docampoなど多数のグループが様々な生物のH⁺-PPaseに注目しているが、精緻な分子構造と機能調節での成果は少ない。困難とされていたH⁺-PPaseの可視化に挑戦しH⁺-PPase機能を保持した自プロモータ::酵素-GFPの発現に成功した。液胞イメージングが可能となった。

Zn輸送体については独Kraemerら多数のグループがあり競争が激しい。液胞のMTPによる毒性回避機能と濃度応答性を明らかにした申請者らの成果は広く認められている。CAXについては米国Hirschiらが各分子種の詳細を解析しており、申請者は液胞膜CAX分子種の特定、イオン選択性決定部位の特定を世界に先駆けて明らかにしてきた。PCaPも当研究室で発見し、注目されている。

2. 研究の目的

下記の目的を設定して研究を遂行した。

(1) H⁺-PPaseの構造と機能調節機構：

H⁺-PPaseのX線構造解析の結果をもとに、アミノ酸変異導入法により原子レベルでの構造とイオン移動経路、作動機構を解明する。高機能型H⁺-PPaseの作出に成功したので、植物への導入と金属イオン集積機能への影響を解明する。

(2) H⁺-PPaseからみた液胞形態のダイナミズム：

酵素の自プロモータ制御下で発現するGFP-H⁺-PPase導入植物の作出に成功したので、液胞の形態的ダイナミズム、H⁺-PPaseの細胞特異的な蓄積、さらに金属ストレス化での液胞の形態的、機能的なダイナミズムを解明する。

(3) Zn輸送体MTP1：Znは必須微量元素であるが過剰濃度では細胞毒性を示す。通常、過剰Znは液胞に隔離・蓄積されるか、細胞外に排出される。液胞膜のZn輸送体を中心して、反応機構、構造-機能協働、Zn選択決定機構、Zn濃度検出機構、細胞特性、環境応答性、変異型MTP1導入株でのイオンバランスの定量により、生理的特性を明らかにする。

申請者らが発見したPCaPはCaとCuを結合し、情報伝達因子とも相互作用し、N末端が脂質修飾され細胞膜に結合している。遺伝子欠失株はCuなどの高濃度金属に感受性となる。そこで金属結合に関わる構造、イオン選択性、金属イオン輸送システムとの関連(情報伝達と機能調節)を解析し、金属ホメオスタシスにおける役割を解明する。

(4) 新規金属結合タンパク質(PCaP)：

申請者らが発見したPCaPはCaとCuを結合し、情報伝達因子とも相互作用し、N末端が脂質修飾され細胞膜に結合している。遺伝子欠失株はCuなどの高濃度金属に感受性となる。そこで金属結合に関わる構造、イオン選択性、金属イオン輸送システムとの関連(情報伝達と機能調節)を解析し、金属ホメオスタシスにおける役割を解明する。

(5) 金属イオン輸送系とプロトンポンプの機能的協調：

H⁺-PPase、亜鉛輸送体MTP1、PCaPの機能欠失株、過剰発現株の作出に成功し、液胞型H⁺-ATPaseの機能欠失株も入手した。各変異体における金属イオ

ン耐性・要求性、植物での元素含有量、関連遺伝子の変動を解明する。

3. 研究の方法

(1) H⁺-PPaseの構造と機能調節機構：

H⁺-PPaseは約80 kDaの単一タンパク質で構成される。結晶構造から予測される機能部位（基質結合、H⁺受容・移動・放出、二量体形成）のアミノ酸を部位特異的に変異させた酵素を作成して機能を判定する。結晶構造と部位特異的あるいはランダムな変異導入による個別残基の機能評価を考慮してまとめる。これらを総合して基質結合・触媒部位、H⁺透過経路、エネルギー共役部位、二量体形成面を含めた分子モデルを提案する。

(2) H⁺-PPaseの可視化と細胞特異性、金属応答性の解明：

内在性のH⁺-PPase遺伝子を欠失した株に、自プロモータ::H⁺-PPase-GFPを発現させた分子可視化植物株を作出し、植物の発芽から開花までの各段階での全ての組織・細胞でのH⁺-PPaseの発現強弱、液胞形態を共焦点レーザー顕微鏡により解析する。さらに金属（Zn, Cu, Ca, Mn）の過不足条件でのH⁺-PPase蓄積量と液胞形状の変化を解析する。亜鉛ストレス下での液胞の形態変化を注意深く解析する。

(3) Zn輸送体の亜鉛濃度センサー機能の解明：

液胞膜のZn輸送体であるMTP1は、細胞質側に多数のHis残基が配列した領域がある。His残基はZn²⁺との親和性が高く、細胞質Zn²⁺はこの領域に集積してから、H⁺との対向輸送によって液胞内に輸送されるものと考えられる。MTP1が作動するのは細胞質Zn²⁺がHis領域を飽和させる濃度に上昇した時にのみであると考えられる。His領域は細胞質Zn²⁺濃度のセンサーと推定される。His領域（32残基）を欠失した分子を酵母に発現させたところ亜鉛輸送速度が増大した。そこで、このHis領域の

タンパク質化学的特性、とくに亜鉛結合の定量と結合による構造変化を解析する。さらに、His領域の生理学的な役割を明らかにするために、変異型（His領域を欠失した）酵素を植物に導入し、その生理学的特徴、たとえば亜鉛過剰・亜鉛欠乏に対する耐性を解析し、同時に亜鉛含量も定量する。

(4) 新規金属結合タンパク質PCaP1の金属ストレス応答機構の解明：

PCaP1はCaとCuを結合し、ミリスチル化により細胞膜に結合し、カルモジュリン、ホスファチジルイノシトールリン酸（PtdInsP）と相互作用する。PCaP1は細胞膜で金属感知も含めた情報伝達に関わっている可能性が高い。PCaP1遺伝子破壊株の表現型を観察したところ、銅過剰条件において顕著な生育阻害と根の形態異常が見られた。自プロモータ::PCaP1-GFP発現植物体を作製したので、Cuを始めとして金属の種類、濃度（不足と過剰）を変えつつ、PCaP1遺伝子の発現と翻訳産物のレベル、細胞内局在がどのように変動し応答するかを解析する。加えて、PCaP1のタンパク質化学的特性を構造面で解析する。

(5) 液胞プロトンポンプと金属輸送体変異株での金属応答性の解明：

H⁺-PPaseと液胞膜H⁺-ATPase（V-ATPase）の機能欠失株を整え終えたので、初年度は、これら変異株が金属（Zn, Cu, Ca, Mn）の過不足条件でどのような表現型を示すかを解析する。金属ホメオスタシスにおいてH⁺-PPaseとV-ATPaseのいずれが大きく寄与するかを判定する。

4. 研究成果

液胞膜プロトンポンプ H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase)と液胞膜亜鉛輸送体 MTP1 (metal tolerant protein 1) に注目し、(1) MTP1 の特徴的アミノ酸 30 残基の生化学的機能(*FEBS J.*

2012)、(2) MTP1 の His 領域の分子構造と亜鉛結合性の特徴(*FEBS Open Bio* 2013)、(3) 植物における亜鉛過剰での膜タンパク質の変動特性 (*Plant Physiol.* 2011)、(4) H^+ -PPase の PPi 加水分解機能の形態形成での重要性 (*Plant Cell* 2011; *Plant Signal. Behav.* 2012)、(5) H^+ -PPase とホスファチジルイノシトールリン酸との相互作用 (*Plant Cell* 2013) 等の成果を得た。以下、各項目を説明する。

(1) シロイヌナズナの液胞膜に局在する亜鉛輸送体 AtMTP1 は、過剰な亜鉛を液胞内に能動輸送 (Zn^{2+}/H^+ 交換輸送) することで、植物の過剰亜鉛耐性を支える分子である。この膜タンパク質中の機能に重要と想定される 30 アミノ酸残基 (例えば膜貫通領域の荷電アミノ酸残基) を選定し、個々の残基をアラニン等に置換し、これを酵母細胞に発現させて亜鉛あるいは他の二価カチオンの輸送能を検定することで、各アミノ酸残基の機能を評価した。その結果、亜鉛の輸送そのものに寄与する残基、亜鉛イオンの選択性に関わる残基を特定することができた。成果は、*FEBS Journal* (2012)に発表した。なお、分子モデルは掲載号の表紙を飾った。

(2) 亜鉛輸送体 MTP1 は細胞質側に His に富んだループが存在する。当研究室では、この His ループの欠落は亜鉛輸送活性そのものの機能停止には至らないが、逆に亜鉛輸送活性を、野生型酵素の 11 倍に高めることを明らかにしていた。そこで、この His ループが分子構造上どのような特徴があるのかを解明するために、ポリペプチドを合成しタンパク質化学的に解析した。CD スペクトルからはヘリックスあるいは β 構造の少ない、天然変性状態に近い配列であること、亜鉛の結合によって構造が変化することを明らかにし、ITC 法により、His ループが 4 個の亜鉛イオンを結合することなど、定性的定量的な知見を得、*FEBS Open Bio* (2013)

に発表した。

(3) 奈良先端大の深尾准教授との共同研究により、亜鉛過剰条件下で生育した植物を試料として、膜タンパク質組成がどのように変化するかを解析した。亜鉛過剰は植物にとっては亜鉛のみでなく鉄欠乏をももたらすことを明らかにした。これは、亜鉛過剰状態では、鉄輸送体が鉄ではなく亜鉛を優先的に輸送するためであることを明確に証明し、金属イオンのクロストークの実体の一部を明らかにした。成果は、*Plant Physiology* (2011) に発表した。

(4) H^+ -PPase の機能欠失株の特性を解析することで、 H^+ -PPase の欠失は細胞質のピロリン酸 (PPi) の除去ができないことにより、細胞分裂機能等が低下し、子葉の細胞数が減少すること (子葉の形状変化) を明らかにした。成果は、*Plant Cell* (2011)および *Plant Signaling and Behavior* (2012)に発表した。

その他、 H^+ -PPase とホスファチジルイノシトールリン酸との相互作用 (*Plant Cell*, 2013) を実証し、これが孔辺細胞での H^+ -PPase の機能調節につながっている可能性を示唆した。この他、 H^+ -PPase の機能を維持したままの可視化による液胞の形状変化、 H^+ -PPase の蓄積量の特徴を解明し、改変型 MTP1 分子を発現した植物株の特徴を解析し、また、 H^+ -PPase の機能アミノ酸の解析などを進めた。いずれも論文投稿準備中であるため詳述することは差し控える。

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 18 件) 下記全て査読有り

1. Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E.B., Nishida, I., and Lee, Y. (2013) The ABCA9 transporter facilitates seeds storage

- lipid synthesis at the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110: 773-778.
2. Wang, B., Bailly, A., Zwiewka, M., Henrichs, S., Azzarello, E., Mancuso, S., Maeshima, M., Friml, J., Schulz, A., and Geisler, M. (2013) *Arabidopsis* TWISTED DWARF1 functionally interacts with auxin exporter ABCB1 on the root plasma membrane. *Plant Cell*, 25: 202-214.
 3. Kato, M., Aoyama, T., and Maeshima, M. (2013) A Ca²⁺-binding protein PCaP2 located on the plasma membrane is involved in root hair development as a possible signal transducer. *Plant J.*, 74: 690-700.
 4. Tanaka, N., Kawachi, M., Fujiwara, T., and Maeshima, M. (2013) Zinc-binding and structural properties of the histidine-rich loop of *Arabidopsis thaliana* vacuolar membrane zinc transporter MTP1. *FEBS Open Bio*, 3: 218-224.
 5. Bak, G., Lee, E.J., Lee, Y., Kato, M., Segami, S., Heven, S., Maeshima, M., Hwang, J.U., and Lee, Y. (2013) A role of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate in vacuolar structure change in guard cells of closing stomata. *Plant Cell*, 25: 2202-2216.
 6. Yoshida, K., Ohnishi, M., Fukao, Y., Okazaki, Y., Song, C., Hayashi, F., Fujiwara, M., Nakanishi, Y., Saito, K., Shimmen, T., Suzaki, T., Fukaki, H., Maeshima, M., and Mimura, T. (2013) Local distribution of membrane proteins on vacuoles isolated from *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *Plant Cell Physiol.*, 54: 1571-1584.
 7. Chen, Z., Fujii, Y., Yamaji, N., Masuda, S., Takemoto, Y., Kamiya, T., Yusuyin, Y., Iwasaki, K., Kato, S., Maeshima, M., Ma, J.F., and Ueno, D. (2013) Mn tolerance in rice is mediated by MTP8.1, a member of the cation diffusion facilitator family. *J. Exp. Botany*, 64: 4375-4387.
 8. Ferjani, A., Ishikawa, K., Asaoka, M., Ishida, M., Horiguchi, G., Maeshima, M., and Tsukaya, H. (2013) Enhanced cell expansion in *KRP2* overexpressor is mediated through increased V-ATPase activity. *Plant Cell Physiol.* 54: 1989-1998.
 9. Ferjani, A., Ishikawa, K., Asaoka, M., Ishida, M., Horiguchi, G., Maeshima, M., and Tsukaya, H. (2013) Class III compensation, represented by *KRP2* overexpression, depends on V-ATPase activity in proliferative cells. *Plant Signaling and Behavior*, 8, e27204
 10. Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Sakata, A., Maeshima, M., and Tsukaya, H. (2012) Regulation of pyrophosphate levels by the H⁺-PPase is central for proper resumption of early plant development. *Plant Signaling & Behavior*, 7: 38-42.
 11. Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N., and Miller, W.A. (2012) Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathogens*, 8: e1002639.
 12. Kawachi, M., Kobae, Y., Kogawa, S., Mimura, T., Krämer, U., and Maeshima, M. (2012) Amino acid screening based on structural modeling identifies critical residues for the function, ion selectivity and structure of *Arabidopsis* MTP1. *FEBS J.*, 279: 2339-2356.
 13. Tomioka, R., Takenaka, C., Maeshima, M., and Tezuka, T., Kojima, M., Sakakibara, H. (2012) Stimulation of root growth induced by aluminum in *Quercus serrata* Thunb. is related to activity of nitrate reductase and maintenance of IAA concentration in roots. *American J. Plant Sciences*, 3: 1619-1624.

14. Muto, Y., Segami, S., Hayashi, H., Sakurai, J., Murai, M., Hattori, Y., Ashikari, M., and Maeshima, M. (2011) Vacuolar proton pumps and aquaporins involved in rapid internode elongation of deepwater rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75: 114–122.
15. Fukao, Y., Ferjani, A., Tomioka, R., Nagasaki, N., Kurata, R., Nishimori, Y., Fujiwara, M., and Maeshima, M. (2011) The iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 155: 1893-1907.
16. Oliveira, L.M.N., Sobreira, A.C., Sobreira, A.C.M., Costa, J.H., Otoch, M.L.O., Maeshima, M., and Fernandes de Melo, D. (2011) Chilling-induced changes of vacuolar proton pumps of hypocotyls from *Vigna unguiculata*. *Plant Growth Regulation*, 64: 211-219.
17. Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Muto, Y., Maeshima, M., and Tsukaya, H. (2011) Keep an eye on PPi: The vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase regulates postgerminative development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23: 2895–2908.
18. Fukuda, M., Satoh-Cruz, M., Wen, L., Crofts, A.J., Sugino, A., Washida, H., Okita, T.W., Ogawa, M., Y. Kawagoe, Y., Maeshima, M., and Kumamaru, T. (2011) The small GTPase Rab5a is essential for intracellular transport of proglutelin from Golgi apparatus to the protein storage vacuole and endosomal membrane organization in developing rice endosperm. *Plant Physiol.*, 157: 632-644.

[学会発表] (計 3 0 件)

Segami, S. et al. : Dimerization of GFPs fused to H⁺-pyrophosphatase influences the morphology and dynamics of vacuoles. International Workshop on Plant Membrane

Biology, Okayama, March 26-31, 2013 等

[図書] (計 3 件)

1. Ferjani, A., Segami, S., Asaoka, M. and Maeshima, M. (2013) Regulation of PPi levels through vacuolar membrane H⁺-pyrophosphatase. *In Progress in Botany*, Vol. 75, ed. Lüttge, Beyschlag and Cushman, pp. 145-166, Springer-Verlag, Heidelberg.
2. Kawachi, M., Kobae, Y., Tomioka, R., and Maeshima, M. (2011) The role of membrane transport in the detoxification and accumulation of zinc in plants. *In A Soil Biology Series: Detoxification of Heavy Metals*. Springer-Verlag. pp. 129-142.
3. Kawachi, M., Nagasaki-Takeuchi, N., Kato, M., and Maeshima, M. (2011) Application of radioisotope in biochemical analysis: Metal binding proteins and metal transporters. *In Radioisotopes - Applications in Bio-Medical Science*, Ed by Singh, N., pp. 115-126, InTech.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 :

<http://celld.agr.nagoya-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 : 前島 正義

(Masayoshi, Maeshima)

名古屋大学大学院生命農学研究科・教授

研究者番号 : 80181577

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者