

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780056

研究課題名(和文)放射性同位体を用いた植物体内のマグネシウム移行動態と輸送体の解析

研究課題名(英文)Study of Mg distribution and Mg transporter using radioisotope as a tracer

研究代表者

田野井 慶太郎(Keitaro, Tanoi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90361576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、短半減期核種であるマグネシウム28(28Mg：半減期20.9時間)を放射性同位体トレーサーとして用い、イネのマグネシウム(Mg)動態解析を実施した。その結果、Mg欠乏処理をしたイネでは2番目に新しい葉へのMg移行が抑えられる現象が見られた。解析の結果、Mg欠乏処理でまず蒸散が影響を受けることが判明した。また、根での吸収解析により、低pHではMg吸収活性が低下することや、根の吸収部位によりその後のMg輸送先が異なることなどが示された。

Mg輸送体の候補遺伝子であるOsMRS2-6において、Mg輸送能をMg吸収欠損酵母で解析した結果、28Mgを輸送することが示された。

研究成果の概要(英文)：We observed magnesium (Mg) movement in rice plant with a short-life nuclide, magnesium 28 (28Mg: half-life is 20.9 hour) as a radioactive tracer. 28Mg transport drastically decreased in the 2nd newest leaf on day 6 of Mg-free nutrient culture. As a result from the further analysis of the leaf, it was indicated that the defect in transpiration flow was found earlier than the other symptoms of Mg deficiency, such as photosynthesis reduction and necrosis. When we analyzed the Mg uptake manner in root, we found that Mg uptake activity was decreased by low pH. In addition, 28Mg experiment showed the different magnesium uptake and transport activity along the rice root axis.

We also performed a complementation assay of rice MRS2 family in the yeast CM66 strain, which lacks Mg uptake ability. As a result, OsMRS2-6 was shown to have an ability of Mg transport.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：マグネシウム28

1. 研究開始当初の背景

マグネシウム (Mg) は生命活動に深く関わる元素である。植物では葉緑素の構成成分であること、ほぼ全ての代謝経路に Mg^{2+} 依存性の酵素が関与すること、ATP 消費に Mg^{2+} が不可欠であることなどに必須性が認められる。細胞内の Mg^{2+} 濃度を厳密に調整することは、細胞が恒常性を保つ上で大変重要であり、その役割を担う CorA (MRS2) 輸送体が報告されている。CorA は特にサルモネラ菌で研究が先行しており、 Mg^{2+} の吸収および排出を行っていることが報告されている (Smith and Maguire 1998)。また、酵母には MRS2 遺伝子 (CorA 遺伝子とスーパーファミリーを形成する) がコードされ、MRS2 は Mg^{2+} 輸送を担っていることが報告されている。これらの輸送体の特徴は、 Mg^{2+} の吸収と排出の両方を担っていることであり、細胞内の Mg^{2+} 濃度を一定に保つことに役割を果たすと推察される。植物では、同じスーパーファミリーに属する 9 遺伝子がシロイヌナズナにおいて MRS2/MGT ファミリー (Schock et al., 2000; Li et al., 2001) として単離され、Mg 輸送能は Pro. Knoop のグループによって機能相補実験を用いて証明された (Gebert et al., 2009)。これらのことから、MRS2/MGT ファミリーが、植物において Mg 輸送に関与していると考えられている。ただし、同輸送体が植物体内で Mg の吸収や長距離輸送を実際に担うかは確認されていない。シロイヌナズナにおいて、ほぼすべての MRS2 遺伝子のノックアウト株、さらにはそれを 2 重、3 重にノックアウトした変異体が Prof. Knoop のグループによって解析されているが、いずれの変異体も、Mg 環境への応答に変化はなく、体内 Mg の動態については解析すらされていないのが現状である (personal communication)。また、MRS2/MGT とは別の Mg 輸送体として、液胞に局在する AtMHX が報告されている (Shaul et al., 1999)。その発現場所が導管周辺細胞であることから、Mg の長距離輸送に何らかの役割を果たしているものと推察されるが、直接的な証拠は存在しない。

MRS2/MGT や MHX などの Mg 輸送体の、植物中での Mg 吸収・輸送に果たす役割が未だに解明されていない原因の一つは、Mg 動態の詳細が不明であることが挙げられる。一般に元素動態の解析にはトレーサーが汎用されており、例えば Ca-45 の葉面吸収実験は、Ca が転流されにくいことを示した重要な実験である。これに対し、Mg については有用なトレーサーがなく、植物体内における Mg 輸送の方向性や転流時期など、基本的な情報は今に至るまで得られていない。

また、一般に植物体において無機養分が欠乏すると、その無機養分の輸送に関わる分子の発現量が mRNA レベルで調節される例が多いが、Mg については、欠乏条件下でも MRS2/MGT および MHX の発現は増加しな

いことを Dr. Hermans らがマイクロアレイ解析から示した (Hermans et al., 2010)。一方、申請者は Mg-28 を世界で唯一製造しトレーサー利用を開始し、Mg 欠乏処理によってイネの Mg 吸収能が高まる結果を得た (Tanoi et al., 2011)。Mg-28 の活用により、Mg 動態の一端が明らかになる可能性が示された。

2. 研究の目的

本申請者の研究の最終的な目的は、植物が Mg を認識し、必要な組織へ分配するメカニズムを解くことである。そこで、Mg 輸送・分配を担うことが期待される MRS2/MGT の、イネにおける 9 つのホモログに注目し、発現解析や機能解析を進める中で、Mg 輸送能について酵母を用いた解析を適用する。また、植物体内における Mg 動態を解析するために、Mg-28 を世界で唯一活用できる環境を整え、様々な解析へ供することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Mg28 の製造

放射線医学総合研究所のサイクロトロンを利用して製造した。アルミニウムにビームを照射し、得られた ^{28}Mg を分離した。

(2) Mg 欠乏処理をしたイネにおける Mg 移行解析

播種後 2 週間のイネにおいて、Mg を除いた水耕液で 6-8 日間欠乏処理を行った。このイネに対し ^{28}Mg を 1 時間投与した後、各葉を葉身 (B) および葉鞘 (S) に分けてサンプリングした。サンプルはガンマカウンターで測定した。

(3) 酵母を用いた OsMRS2-6 における Mg 輸送能評価

マグネシウム吸収欠損酵母 CM66 において、OsMRS2-6 を過剰発現させ、 ^{28}Mg 吸収実験を行った。

(4) 根の ^{28}Mg 吸収および移行解析

播種後 1-2 週間のイネを用いた。まず、様々な pH での Mg 吸収活性を ^{28}Mg を用いて求めた。次に、根を先端からおよそ 1cm ごとに区切って特定の位置にのみ ^{28}Mg を吸収させ、その後の ^{28}Mg 輸送先を解析した。

4. 研究成果

(1) Mg28 はおよそ 2 ヶ月に 1 度の頻度で製造を行った。1 度の製造で得られる ^{28}Mg は 3-5MBq 程度であった。

(2) Mg 欠乏処理を施した 3 週齢イネにおいて ^{28}Mg を経根投与したところ、第 5 葉には ^{28}Mg が移行せず、代わりに第 4, 6 葉への ^{28}Mg 輸送が促進されていることが判明した。そこで第 5 葉を詳しく調べたところ、Mg 欠乏処理 6

日目において、光合成能は保っているものの、蒸散速度は無処理区と比較して半分程度に減少していた。その他 Mg 欠乏により顕れる症状を経時的に調べた結果、Mg 欠乏の最初の症状は蒸散速度の低下であることが示された。

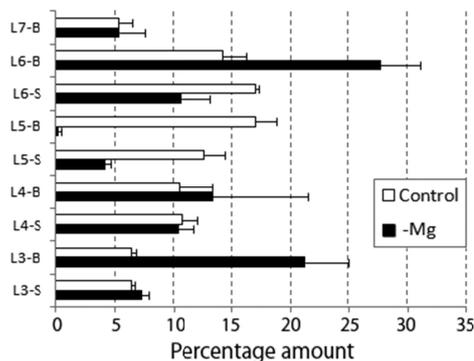


図1 イネの各葉への Mg²⁸ 移行割合
B:葉身 S:葉鞘 L6 は古い葉から数えて 6 番目の葉であることを示す。

(3) イネの MRS2 ファミリーの 1 つである OsMRS2-6 について、Mg 吸収能欠損酵母を用いた機能相補実験を実施した。²⁸Mg を用いて吸収能を調べた結果、OsMRS2-6 は Mg 吸収能を持つことが示された。さらに解析を進めた結果、OsMRS2-6 は葉緑体で Mg 輸送を担っていることが示唆された。

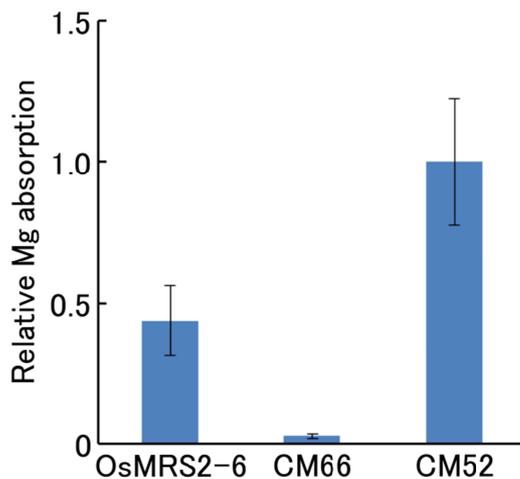


図2 酵母を用いた OsMRS2-6 の Mg 輸送能の解析。OsMRS2-6:CM66 に OsMRS2-6 を過剰発現させたもの。CM66 : Mg 吸収能欠損酵母に空ベクターを形質転換したもの。CM52 : Mg 吸収能を欠損していない酵母に空ベクターを形質転換したもの

(4) 根の Mg 吸収様式および吸収後の輸送様式を ²⁸Mg を用いて調べたところ、低 pH では Mg 吸収能が低下することや、根の部位によって、吸収後の Mg 輸送先が異なることが示された。

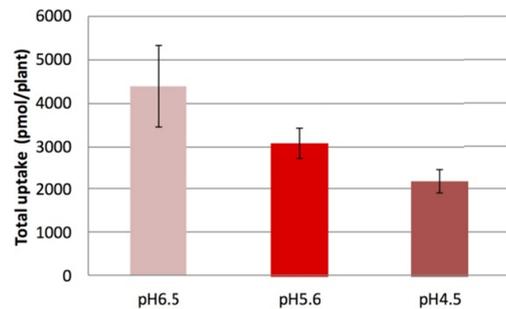


図3 各 pH におけるイネ幼植物の Mg 吸収量の比較。²⁸Mg 吸収時間は 15 分。

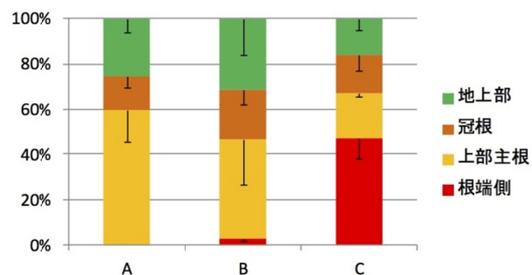


図4 根の各部位に ²⁸Mg を投与後 1 時間での分布。A:根端 0-1cm、B 根端から 1.3-2.3cm、C 根端から、2.6-3.6cm

本研究では ²⁸Mg を用いることで、植物中に存在する Mg と ²⁸Mg を明確にわけて解析できた。その結果、Mg がどのように吸収され、どのように輸送されるかについて、上記の知見を得ることに成功した。

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5件)

Kobayashi, N.I.; Iwata, N.; Saito, T.; Suzuki, H.; Iwata, R.; Tanoi, K. and Nakanishi, T.M., "Application of ²⁸Mg for Characterization of Mg Uptake in Rice Seedling under Different pH Conditions", Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 296 531-534 (2013). DOI:10.1007/s10967-012-2010-9, 査読有

Tanoi, K.; Kobayashi, N.I.; Saito, T.; Iwata, N.; Hirose, A.; Ohmae, Y.; Iwata, R.; Suzuki, H. and Nakanishi, T.M., "Application of ²⁸Mg to the Kinetic Study of Mg Uptake by Rice Plants", Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 296 749-751 (2013). DOI:10.1007/s10967-012-2219-7, 査読有

Kobayashi, N.I.; Iwata, N.; Saito, T.;

Suzuki, H.; Iwata, R.; Tanoi, K. and Nakanishi, T.M., "Different Magnesium Uptake and Transport Activity Along the Rice Root Axis Revealed by ²⁸Mg Tracer Experiments", *Soil Science and Plant Nutrition* 59 149-155 (2013). DOI:10.1080/00380768.2012.751554, 査読有

Kobayashi, N.I.; Saito, T.; Iwata, N.; Ohmae, Y.; Iwata, R.; Tanoi, K. and Nakanishi, T.M., "Leaf Senescence in Rice due to Magnesium Deficiency Mediated Defect in Transpiration Rate Before Sugar Accumulation and Chlorosis", *Physiologia Plantarum* 148 490-501 (2013). DOI: 10.1111/pp1.12003., 査読有

Saito, T.; Kobayashi, N.I.; Tanoi, K.; Iwata, N.; Suzuki, H.; Iwata, R. and Nakanishi, T.M., "Expression and Functional Analysis of the CorA-MRS2-ALR-Type Magnesium Transporter Family in Rice", *Plant and Cell Physiology* 54 1673-1683 (2013). DOI: 10.1093/pcp/pct112. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

田野井 慶太郎; 小林 奈通子; 斉藤 貴之; 鎌田 梨沙; 岩田 錬; 鈴木 寿; 中西 友子, "マグネシウム欠乏処理が植物根のマグネシウム吸収速度に与える影響—放射性トレーサーを利用した解析—", 第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山大学) PL140 (2013, Mar 21-23).

小林 奈通子; 斉藤 貴之; 大前 芳美; 岩田 錬; 田野井 慶太郎; 中西 友子, "蒸散量の低下を介して葉の枯死に至るマグネシウム欠乏応答機構の解析", 第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山大学) PL194 (2013, Mar 21-23).

Kobayashi, N.I.; Saito, T.; Suzuki, H.; Iwata, R.; Tanoi, K. and Nakanishi, T.M., "Studies of the MRS/MGT Magnesium Transporter Family in a Rice Plant", the 6th International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2013) (Kurashiki, Okayama Japan) S3-P23 (2013, Mar 26-31).

鎌田 梨沙; 斉藤 貴之; 小林 奈通子; 田野井 慶太郎; 中西 友子, "²⁸Mg を用いたイネにおけるマグネシウム吸収能の品種間比較", 第 50 回 アイソトープ・放射線研究発表会 (東京大学) 2p-III-04 (2013, Jul 3-5).

Tanoi, K.; Kobayashi, N.I.; Saito, T.; Hirose, A.; Ohmae, Y.; Suzuki, H.; Iwata, R. and Nakanishi, T.M., "Application of magnesium-28 and

potassium-42 to study uptake manner in a rice plant", IPNC 2013 (XVII. International Plant Nutrition Colloquium) Istanbul (Turkey) (2013, Aug 19-22).

Kobayashi, N.I.; Saito, T.; Ohmae, Y.; Iwata, R.; Tanoi, K. and Nakanishi, T.M., "Physiological and Transcriptional Responses to Magnesium Deficiency in Rice Leaves", IPNC 2013 (XVII. International Plant Nutrition Colloquium) Istanbul (Turkey) (2013, Aug 19-22).

小林 奈通子; 斉藤 貴之; 田野井 慶太郎; 中西 友子, "イネにおける多様なマグネシウム欠乏応答の解析", 日本土壌肥料学会 2013 年度名古屋大会 名古屋大学 (2013, Sep 11-13).

小林 奈通子; 田野井 慶太郎; 斉藤 貴之; 岩田 直子; 岩田 錬; 鈴木 寿; 中西 友子, "イネ幼植物による Mg の吸収と排出の ²⁸Mg を用いた解析", 第 49 回 アイソトープ・放射線研究発表会 (東京大学) (2012, Jul 9).

Tanoi, K.; Kobayashi, N.; Saito, T.; Iwata, N.; Hirose, A.; Ohmae, Y.; Iwata, R.; Suzuki, H. and Nakanishi, T., "Kinetics of Mg-28 Uptake by Rice Roots", *Plant Biology Congress 2012* (Freiburg Germany) (2012, Jul 31 / Aug 2).

Kobayashi, N.I.; Iwata, N.; Saito, T.; Suzuki, H.; Iwata, R.; Tanoi, K. and Nakanishi, T.M., "Quantitative Determination of Magnesium Uptake and Transport in Rice", *Plant Biology Congress 2012* (Freiburg Germany) (2012, Jul 31 / Aug 2).

斉藤 貴之; 小林 奈通子; 岩田 直子; 中西 友子; 田野井 慶太郎, "イネにおける葉緑体局在型 MRS2 の解析", 日本土壌肥料学会 2012 年大会 (鳥取大学) P9-7 (2012, Sep 4).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田野井 慶太郎 (TANOI Keitaro)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90361576

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし