

平成30年 6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450076

研究課題名(和文) オオムギ高親和性硝酸イオン輸送系の機能発現機構解明にむけた組織細胞学的アプローチ

研究課題名(英文) Histochemical and cytochemical approaches toward elucidating the mechanisms of functional expression of barley high-affinity nitrate transport system

研究代表者

末吉 邦 (Sueyoshi, Kuni)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10216278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オオムギ根の高親和性硝酸輸送系を構成する2つのタンパク質(HvNRT2.1およびHvNAR2.3)の相互作用について、組織細胞生物学的に明らかにした。まず、2つのタンパク質は根の皮層における最も外側の細胞層の細胞膜に存在していることを明らかにした。続いて、HvNRT2.1とHvNAR2.3が細胞膜上で相互作用することをBiFC法で明らかにした。さらに、2つのタンパク質をタマネギ表皮細胞で個別に発現させたところ、それぞれのタンパク質単独では細胞膜に局在できないことを明らかにした。以上の結果より、両タンパク質が細胞膜に局在するためにはお互いの存在が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, an interaction between two proteins (HvNRT2.1 and HvNAR2.3), both of which configure the high-affinity nitrate transport system in barley roots, was investigated histochemically and cytochemically. These two proteins localize on the plasma membrane of the outermost cell layer in the barley root cortex. In addition, these proteins interact on the plasma membrane as revealed by BiFC analysis. When HvNRT2.1 and HvNAR2.3 were expressed individually in epidermal cells of onion, each protein failed to localize the plasma membrane. These results indicate that these two proteins may need each other for localizing on the plasma membrane.

研究分野：植物栄養学

キーワード：硝酸イオン トランスポーター オオムギ

1. 研究開始当初の背景

植物は、窒素源として主に硝酸イオンを根から吸収し、これを植物体内の各部位に分配し、タンパク質や核酸などの有機態窒素に同化している。土壤中からの低濃度の硝酸イオン吸収能力を強化することは、作物の窒素利用効率の向上を目指す上で重要な戦略であり、将来的に、減肥料栽培でも作物の収量を維持できる技術開発に寄与することが期待される。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を行う高親和性輸送系(HATS)の機能制御機構を明らかにすることが極めて重要となる。これまで、HATSを担うタンパク質の実体として、高親和性硝酸イオントランスポーター(NRT2)のみが考えられてきたが、新たにNRT2の制御因子としてNAR2タンパク質が発見された^{1, 2)}。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。

シロイヌナズナのNAR2欠損変異体株は、野生株と比較してHATS活性が10%まで減少しており³⁾、このとき、NRT2の細胞膜局在性も失われることが示唆された⁴⁾。オオムギでは、NRT2とNAR2のタンパク質間相互作用に、NRT2のC末端とNAR2の中央領域が関わることを示唆されたが⁵⁾、これが*in vivo*、すなわち細胞内においても支持されるかは不明である。このため、NRT2とNAR2は根において同じ組織の細胞に存在し、相互作用する可能性があるのか、NRT2とNAR2は細胞内で複合体を形成して存在するのか、その場合、NRT2とNAR2のタンパク質間相互作用に特定のアミノ酸残基が関与するか、NRT2とNAR2は単独で細胞膜に局在できるのか、など、不明な点が多く残されている。研究代表者は、これらの不明な点を解明するためには、NRT2とNAR2の組織細胞学的研究が不可欠であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、オオムギ根においてHATSを構成する2種のタンパク質(HvNRT2およびHvNAR2)の機能発現機構を組織細胞学的な側面から明らかにし、低窒素な土壌条件下における作物の窒素利用効率の向上技術に寄与できる分子基盤を提示することを目的とし、以下の項目を行った。

- (1) HvNRT2 および HvNAR2 の根組織内局在性解明
- (2) アフィニティカラム法による HvNRT2 と HvNAR2 の相互作用解析
- (3) HvNRT2 および HvNAR2 の細胞内における相互作用解析
- (4) 個々の HvNRT2 および HvNAR2 の細胞内局在性解析

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(摂氏 25 度)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。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) 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硝酸を与え、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に対する抗体を一次抗体に用いて蛍光抗体染色を行なった。

(3) アフィニティカラム法による HvNRT2 と HvNAR2 の相互作用解析

HvNRT2とHvNAR2の部分配列を大腸菌内で発現させ、それらの間の相互作用を解析した。まず、HvNRT2のC末端領域77残基(HvNRT2C)とHvNAR2の中央部分63残基(HvNAR2Cent)の組換えタンパク質断片を得、HvNAR2Centをカラムに固定化した。そのHvNAR2Cent固定化カラムにNRT2.1Cをアプライした後、カラムに結合したタンパク質を酸性溶液で溶出し、溶出液中のタンパク質にHvNRT2Cが含まれるか解析した。また、アミノ酸置換した変異NRT2.1Cを用いて同様の実験を行った。

(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。

作成したコンストラクトは、パーティクルガン法でタマネギ表皮細胞に、またポリエチレングリコール法でオオムギ葉肉プロトプラストに導入し、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。

(5) HvNRT2 および HvNAR2 の単独での細胞内局在性

HvNRT2.1 と GFP との融合タンパク質 (HvNRT2.1:GFP) および HvNAR2.3 と DsRed との融合タンパク質 (HvNAR2.3:DsRed) を一過的発現系として用いられるタマネギ表皮細胞に個別に発現させ、2 種の融合タンパク質が細胞内のどこで発現しているのかを調べた(図 1 a, b)。また、HvNRT2.1:GFP および HvNAR2.3:DsRed をタマネギ表皮細胞で同時に発現させ、緑色蛍光、赤色蛍光および両蛍光をマージさせた結果を観察した(図 1c)。

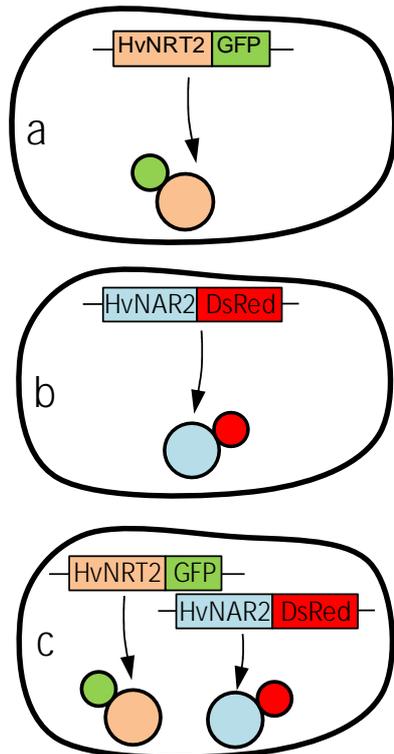


図 1. 一過的発現解析の 3 つのパターン

4. 研究成果

(1) HvNRT2 および HvNAR2 の組織局在

蛍光観察の結果、HvNRT2 および HvNAR2 はともにオオムギ根の皮層域の最も外側にある細胞層において、遠心

側の細胞膜にのみ局在することが示された。また、これらのタンパク質は硝酸塩の供給によって発現誘導されることが明らかになった。今回の結果により、HvNRT2 および HvNAR2 が同一の細胞層に同時に発現していることが明らかになり、2 つのタンパク質が相互作用する可能性を組織細胞学的側面から示すことができた。また、根における低濃度の硝酸イオンの吸収が、これまで考えられていた皮層域全体ではなく、皮層域の最も外側にある細胞層においてのみ行われていることが強く示唆された。硝酸イオンは、これらの細胞に一旦吸収されたのち、原形質連絡を通じて、すなわちシンプラスト經由で維管束組織にある導管まで送られると考えられた(図 2)。さらに本研究によって、HvNRT2 および HvNAR2 が細胞膜の遠心側にのみ配置されることが明らかになったが、それがどのような機構で行われているのか、解明すべき新たな課題が生じた。

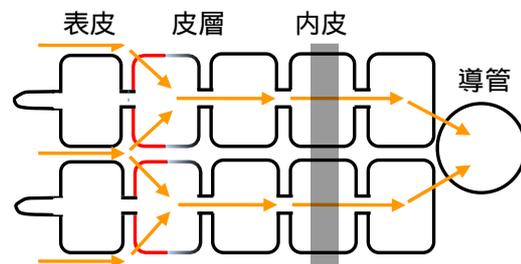


図 2. 硝酸イオンの根内移行モデル

矢印は硝酸イオンの動きを示す。HvNRT2 および HvNAR2 の局在する場所は赤の線で示した。

(2) HvNRT2 と HvNAR2 の相互作用解析

HvNAR2.3 の中央断片を固定化したカラムに HvNRT2.1 の C 末端断片アプライしたところ、両タンパク質断片がカラム内で結合することが明らかになった。これにより、両タンパク質の結合部位が初めて示唆された。いくつかのアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置換した変異 NRT2.1C タンパク質断片をカラムに通して、同様の実験を行ったところ、463 番目のセリン残基がアラニン残基に置換された断片において、顕著な結合能の低下が見られた。このことから、このセリン残基が NAR2.3 との結合に関与することが示唆された。これまでの研究で、NRT2.1C タンパク質断片がオオムギ根の粗抽出液中でリン酸化されることが明らかになっており、NRT2.1 の 463 番目のセリン残基がリン酸化修飾を受けることにより、NAR2.3 との結合能が変

化することが考えられる。

(3) HvNRT2 および HvNAR2 の細胞内における相互作用解析

HvNRT2.1 の N 末端と分割黄色蛍光タンパク質(YFP)の N 末端側との融合タンパク質(nYFP:HvNRT2.1)と HvNAR2.3 の C 末端と分割 YFP の C 末端側との融合タンパク質 (HvNAR2.3:cYFP) をタマネギ表皮細胞とオオムギ葉プロトプラストにおいて発現させた。タマネギ表皮細胞およびプロトプラストの両方において再構成された YFP による蛍光が細胞膜上に観察され、HvNRT2.1 と HvNAR2.3 が相互作用して細胞膜上で機能することが示唆された。なお、タマネギ表皮細胞での観察結果は以前にも得られていたが、蛍光強度が弱かったため、本研究ではプロトプラストも用いた。今後、プロトプラストで得られた結果を論文投稿に用いることとする。

(4) HvNRT2 および HvNAR2 の単独での細胞内局在性

蛍光観察の結果、図 1 の a および b の細胞では、コントロールの細胞と同じく細胞質全体に広がった蛍光が確認された。このことは、HvNRT2 および HvNAR2 は単独では細胞膜に局在化することはできないことを意味している。一方、c の細胞では、緑色および赤色の蛍光が細胞膜で見られ、両蛍光を重ねると黄色を呈した。これは、二つのタンパク質が細胞膜に配置されるためにはお互いの存在が必要であることを意味し、NRT2 の細胞膜への配置に NAR2 が関与するという仮説を提示することができた。

(5) 今後の課題

HvNRT2 および HvNAR2 が細胞膜上で相互作用することが BiFC 法により、示され、また、HvNRT2.1 と HvNAR2.3 のタンパク質間相互作用には、HvNRT2.1 の C 末端と HvNAR2.3 の中央領域が関与することが示された。今後、部位特異的変異法によりこれらの領域に存在する特定のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換し、変異タンパク質どうしをタマネギ表皮細胞などで同時に発現させ、変異タンパク質の細胞内局在性を調べる。これにより、特定のアミノ酸残基の変異の有無が細胞内における局在性にも影響を及ぼすのかが明らかになる。

また、HvNRT2 および HvNAR2 がどのような機構で皮層の最も外側の細胞層にのみ局在するのかを明らかにするた

めに次の実験を行う。すなわち、HvNRT2.1 および HvNAR2.3 のプロモーター領域の下流に、GFP を連結しミナトカモジグサに形質転換したのち、根における GFP の発現部位を観察する。GFP の発現部位がオオムギ根における HvNRT2 および HvNAR2 発現部位と同じであれば、両タンパク質の組織特異的発現が遺伝子のプロモーターにより支配されていることが明らかになる。さらに、プロモーター領域の削り込み実験を行うことで、HvNRT2 および HvNAR2 の組織特異的発現に關与している詳細なプロモーター領域が明らかとなる。

<引用文献>

- 1) Tong et al., Plant J., 41: 442-450, 2005
- 2) Yong et al., Plant J., 63: 739-748, 2010
- 3) Okamoto et al., Plant Physiol., 140: 1036-1046, 2006
- 4) Wirth et al., J. Biol., 282: 23541-23552, 2007
- 5) Ishikawa et al., Plant Biotechnol., 26, 197-205, 2009

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 6 件)

Ishikawa S., Ono y., Ohtake N., Sueyoshi K., Tanabata S., Ohya T. Transcriptome and metabolome analyses reveal that nitrate strongly promotes nitrogen and carbon metabolism in soybean roots, but tends to repress it in nodules. Plants 7, no. 2, 2018. <https://doi.org/10.3390/plants7020032>

[学会発表](計 5 件)

Suzuki E., Sueyoshi K. Two-component nitrate transport system in barley –Tissue and cellular localization-. Student joint symposium between Niigata University, Japan and the Vietnam National University of Agriculture, Hanoi, Vietnam, 2017.
篠原雅人・大竹憲邦・大山卓爾・末吉邦，オオムギ高親和性硝酸輸送系の制御機構 日本土壤肥料学会 2015 年京都大会，京都，2015 年
中村涼花・野澤大樹・佐々木聡子・大竹憲邦・大山卓爾・末吉邦，オオムギ NRT1/PTR FAMILY(NPF)の硝酸輸送活性の測定，日本土壤肥料学会関東支部大会，栃木，2015 年
Nozawa D., Takada M., Shinohara M., Ohtake N., Ohya T., Sueyoshi K.

Functional analysis of Low-affinity nitrate transporter in barley. KAAB international symposium, Niigata, Japan, 2014

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.agr.niigata-u.ac.jp/teachers/222>

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・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

(4)研究協力者

野澤大樹，高田雅大