

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26252011

研究課題名(和文) 膜輸送システムと金属結合分子からみた植物細胞の自律的イオン濃度調節機構の解明

研究課題名(英文) Autonomous regulatory mechanism of metal ion levels by membrane transport system and metal-binding protein

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) 31,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞は金属イオンの濃度を調節しつつ生命活動を維持している。その調節に関わるイオン膜輸送系、濃度感知装置に焦点を当て、以下の成果を得た。1) 液胞膜Zn輸送体MTP1の細胞質側のHisに富んだ領域が、細胞質イオン濃度を感知し、低濃度では細胞質Zn濃度を維持するため活性を抑制する役割をもつことを証明した。2) 新規亜鉛輸送体MTP12がMTP5とヘテロ多量体を形成し、ゴルジ装置に局在することを解明した。3) 細胞膜のCa結合タンパク質PCaP1について、金属結合による構造変化、培地銅イオン過剰による発現増大、遺伝子欠失株での銅感受性増大、気孔の閉口機能への寄与等の生理機能を解明した。

研究成果の概要(英文)：Plants regulate concentrations of metal ions in order to maintain their activities. We focused on the ion transport systems and ion-sensing machineries and revealed the followings. 1) The cytosolic histidine-rich loop changes its configuration and functions acts as a sensor of cytosolic zinc to maintain an essential level in the cytosol. This was evidence by in vivo examination using loss-of-function mutant plants. 2) New-type zinc transporter MTP12 forms a hetero-oligomer with MTP5 and functions as zinc transporter in the membrane of Golgi apparatus. 3) A newly identified calcium-binding protein PCaP1, which is stably associated with the plasma membrane, changes its conformation by binding with metal ions. The expression of PCaP1 gene is enhanced by increased copper levels and its loss-of-function mutant plants become sensitive to high copper levels. Also, PCaP1 is involved in the closing mechanism of stomata in leaves.

研究分野：Biochemistry, Plant Molecular Biology

キーワード：Membrane Metals Membrane transporter Ion concentration

### 1. 研究開始当初の背景

植物細胞は、亜鉛、マグネシウム、カルシウム等の必須金属イオンを過不足なく濃度調節しつつ、生命活動に利用している。この点は、分子機構の解明が十分とは言えない状況であった。そこで、液胞が担う金属イオンの集積機能とそれを支えるプロトンポンプに焦点を当て、分子素子自身とシステム全体としてのイオン調節機構の両面を解明することを目的とした。さらに、新規な亜鉛輸送体候補分子 AtMTP12 にも注目し分子生物学的特性を解明することとした。

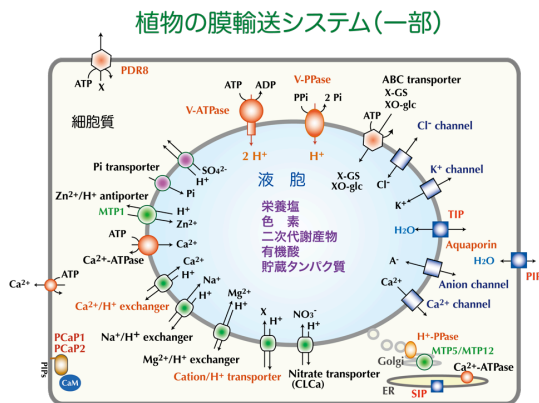


図1 植物の膜輸送システム. 液胞膜輸送分子等を中心にした模式図

### 2. 研究の目的

植物は必要な金属の余剰分を液胞に蓄え、必要に応じて細胞質に供給する。本研究では、液胞への金属集積を担う  $Zn^{2+}/H^{+}$  対向輸送体 (MTP1)、 $Ca^{2+}/H^{+}$  対向輸送体 (CAX) とその機能を支える  $H^{+}$ -ピロホスファターゼ ( $H^{+}$ -PPase) に焦点を当てる。二次能動輸送体は V-ATPase と  $H^{+}$ -PPase が形成する pH 勾配を駆動力とする。各分子の詳細な作動機構、イオン濃度センサーを含む機能ドメイン、膜局在のダイナミズム、生理機能の特性、そして他の膜輸送系の協調機構の解明を目的とする。亜鉛輸送体群は多様な分子種で構成される。その中で、分子サイズが極めて大きな分子種 MTP12 に注目し、この未知分子種の高次構造、細胞内局在、機能の解明も進めることとした。さらに、金属イオンホメオスタシスに関わると推定される新規金属結合タンパ

ク質 (PCaP: Plasma-membrane associated Ca-binding protein) について、その遺伝子の特性、金属イオン応答との関連に焦点を当てる。これにより金属イオン濃度の調節と備蓄の機構、主要な膜輸送素子の機能構造の詳細を解明する。以上を、研究開始当初の目的とした。

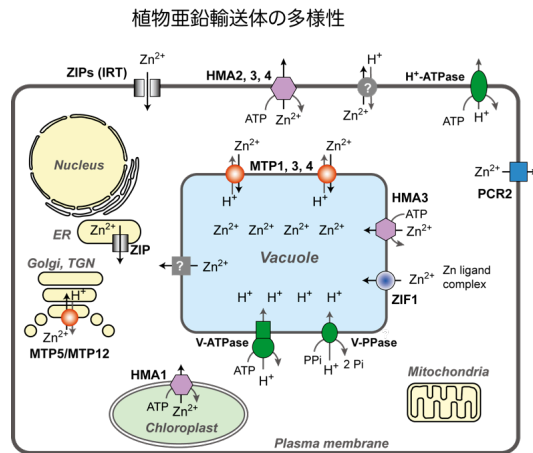


図2 植物の細胞がもつ亜鉛輸送体. 亜鉛輸送体には能動輸送体、受動輸送体、イオンチャネル等、多様な分子種があり、その主な分子を中心にした模式図. 本研究では、MTP1、MTP5、MTP12 を解析対象とした。

### 3. 研究の方法

植物細胞は金属イオンの濃度を調節しつつ生命活動を維持している。その調節に関わるイオン膜輸送系、濃度感知装置に焦点を当て、生化学的、分子生物学的な手法で分子装置と昨日解明を進めることとした。実験対象として、モデル植物シロイヌナズナを用い、液胞膜 Zn 輸送体 MTP1、新規亜鉛輸送体 MTP12、細胞膜の Ca 結合タンパク質、液胞膜プロトンポンプ  $H^{+}$ -PPase を対象分子として設定し、イオンの定量も含めた解析を進めた。また、植物全体における特定分子の役割を明らかにするため、遺伝子改変植物の生育等の定量的、定性的な評価も実施した。

### 4. 研究成果

植物細胞は金属イオンの濃度を調節しつつ生命活動を維持している。その調節に関わるイオ

ン膜輸送系、濃度感知装置に焦点を当て、以下の成果を得た。1) 液胞膜 Zn 輸送体 MTP1 の細胞質側の His に富んだ領域が、細胞質イオン濃度を感知し、低濃度では細胞質 Zn 濃度を維持するため活性を抑制する役割をもつことを証明した。2) 新規亜鉛輸送体 MTP12 が MTP5 とヘテロ多量体を形成し、ゴルジ装置に局在することを解明した。3) 細胞膜の Ca 結合タンパク質 PCaP1 について、金属結合による構造変化、培地銅イオン過剰による発現増大、遺伝子欠失株での銅感受性増大、気孔の閉口機能への寄与等の生理機能を解明した。さらに、4) 液胞膜における金属イオン輸送体をエネルギー面で支えるプロトンポンプ  $H^+$ -PPase についても、機能を支える分子構造、生理機能について新たな知見を得た。

以下、それぞれの研究項目について概説する。

(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。この分子の亜鉛輸送機能に重要と想定される細胞質ヒスチジンループ (His ループ) に注目した。His ループは亜鉛輸送のブレーキ役を担うことを酵母異種発現系により明らかにしている。また、この His ループは、亜鉛の結合によって構造が変化することをすでに明らかにしている。そこで、このループを欠落した変異 AtMTP1 を、導入した株を作出して生理的な特性を解析した。特徴的な形質として、亜鉛不足条件 (培地添加亜鉛 0  $\mu$ M) では、変異 AtMTP1 導入株は野生株に比べて著しく生育が抑制された。その原因は、亜鉛不足環境でありながら、変異 AtMTP1 が根の液胞に必要以上に亜鉛を輸送してしまい、地上部への亜鉛供給を抑制してしまうためであった。 *Plant & Cell Physiology* 誌 (2015) に発表し、極めて重要な知見としてよく読まれ、引用もされている。

また、根のどの部位が金属イオン集積に重要

であるかを解明するため、根毛を形成しない変異株 NR23 を作出し、その生理特性を解析した。その結果、根毛は、リン、鉄、カルシウム、亜鉛、銅、カリウムの吸収に極めて大きな役割を果たしていること、さらにリン酸等吸収に必要なリンゴ酸、クエン酸の分泌の 70% ほどを担っていることを明らかにした。 *Journal of Experimental Botany* 誌 (2014) に発表したところ、根毛機能を定量的に示す極めて重要な論文としてよく引用されている。

(2) 植物の亜鉛輸送体群は、多様な分子種を含んでいる。その中に、CDF ファミリーの MTP がある。MTP1 は上述のように液胞膜で  $Zn^{2+}/H^+$  交換輸送体として、液胞への亜鉛輸送に貢献している。類似分子として 10 種以上あるが、なかでも MTP12 は分子サイズが、MTP1 の 2 倍ほどもあり、推定膜貫通領域は 14 個と推定されていた。しかし、その分子特性は未解明であった。そこで、MTP12 を対象として、とくに酵母発現系、およびシロイヌナズナ培養細胞系を用いて特性を解明した。とくに、MTP12 は MTP5 とのヘテロ多量体 (おそらくヘテロ二量体) を形成し、細胞内のゴルジ装置に局在し、亜鉛輸送能をもつという、大きな発見につながった。ゴルジ装置での亜鉛輸送の生理的な意義はこれからの課題であるが、成果を *FEBS Journal* 誌 (2015) に発表した。新規発見としてよく読まれている。

(3) 当研究室が発見した膜局在型カルシウム結合タンパク質 PCaP1 については、その遺伝子欠失株の表現型が明確に生じないことから、生理機能が解明されないままであった。本研究では、タンパク質特性、遺伝子応答、細胞内局在、遺伝子欠失株の表現型を解析した。その結果、次の結果を得た。(a) PCaP1 はカルシウムのみでなく、マグネシウムとの結合特性を示し、結合により分子構造を変化させる。(b) PCaP1 タンパク質は植物のほとんどの細胞の細胞膜に安定的に局在している。さらに、(c) 遺伝子欠失株では、過

剰銅イオン濃度条件では感受性が高くなり、PCaP1 が銅イオンホメオスタシスに寄与している。(d) 遺伝子欠失株では、暗条件下での気孔を閉じる機能に障害が生ずる。これらの知見の一部を、*Journal of Plant Research*(2016)に発表した。世界の他の研究グループも本知見に関心を寄せ、新たな共同研究もスタートした。

(4)液胞膜は金属イオンの集積にとって不可欠のオルガネラであり、細胞質金属イオンをエネルギー依存的に液胞内に能動輸送する。エネルギー供給源の一つとして、液胞膜内外の pH 勾配がある。上述の  $Zn^{2+}/H^{+}$  交換輸送体 (AtMTP1)も pH 勾配を利用する能動輸送体である。液胞膜に pH 勾配を形成するのは、液胞膜  $H^{+}$ -ATPase および  $H^{+}$ -PPase の2つのプロトンポンプである。そこで、 $H^{+}$ -PPase の分子構造の特徴とその遺伝子の機能欠失株の特性を解析した。分子構造については、基質ピロリン酸 (Mg-PPi 複合体) 結合領域、 $H^{+}$ 透過経路、液胞側での  $H^{+}$ 遊離サイト等を中心に、部位特異的変異酵素を作出して、基質加水分解機構およびプロトン輸送活性を測定することにより、個々のアミノ酸残基を評価した。20 個を越す個別残基の評価を達成したのみにかかわらず、基質加水分解能をもつがプロトンポンプ機能をもたない「脱共役型」変異酵素を得た。これは、同一酵素がもつ2つの機能を切り分けることができることを示す、極めて重要な発見であった。成果を *Journal of Biochemistry*(2014)に公表した。注目度と引用頻度が高い。

さらに、この「脱共役型」変異  $H^{+}$ -PPase を、 $H^{+}$ -PPase 遺伝子欠失株に導入したところ、欠失株がもつ表現型(子葉の形状変化等)が回復した。すなわち、正常な生育には、 $H^{+}$ -PPase の基質加水分解機能のみが重要であるという知見を得た。その一方で、 $H^{+}$ -PPase を過剰発現した株は栄養成長後期において、統計的に優位な成長促進効果を示した。その成果は、*Frontiers of Plant Science*(2016a)に発表した。これらの成果

から、金属ストレス等に対する貢献も想定され、今後、PPi 加水分解のみでなく、プロトンポンプ機能が顕著に表出する生理現象を継続的に研究する意義が高いと考えている。

また、 $H^{+}$ -PPase の遺伝子欠失株が、培地の窒素栄養源によっては、組織壊死など顕著な表現型を示したので、その結果も *Frontiers of Plant Science*(2016b)に発表した。

## 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]

(原著論文計 16 件、解説論文 3 件)

### 原著論文

- 1.Ferjani, A., Segami, S., Asaoka, M., and Maeshima, M. (2014) Regulation of PPi levels through vacuolar membrane  $H^{+}$ -pyrophosphatase. *In Progress in Botany*, Vol. 75, edited by Lüttge, U., Beyschlag, W., and Cushman, J., pp. 145-166, Springer-Verlag, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-38797-5\_5
- 2.Tanaka, N., Kato, M., Tomioka, R., Kurata, R., Fukao, Y., Aoyama, T., and Maeshima, M. (2014) Characteristics of a root hair-less line of *Arabidopsis thaliana* under physiological stresses. *Journal of Experimental Botany*, 65 (6), 1497-1512. doi: 10.1093/jxb/eru014
- 3.Uenishi, Y., Nakabayashi, Y., Tsuchihira, A., Takusagawa, M., Hashimoto, K., Maeshima, M., and Sato-Nara, K. (2014) Accumulation of TIP2;2 aquaporin during dark adaptation is partially PhyA dependent in roots of *Arabidopsis* seedlings. *Plants*, 3, 177-195. doi:10.3390/plants3010177
- 4.Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Muto, Y., Maeshima, M., and Tsukaya, H. (2014) Roles of the vacuolar  $H^{+}$ -PPase in seed storage oil mobilization and plant

- development. *Plant Morphology*, 26, 45-51. (review article)
5. Segami, S., Makino, S., Miyake, A., Asaoka, M., and Maeshima, M. (2014) Dynamics of vacuoles and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase visualized by monomeric green fluorescent protein in *Arabidopsis*: Artifacts of bulbs and native intravacuolar spherical structures. *Plant Cell*, 26, 3416-3434. doi:10.1105/tpc.114.127571
6. Asaoka, M., Segami, S., and Maeshima, M. (2014) Identification of the critical residues for the function of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase by amino acid screening based on the 3D structure. *Journal of Biochemistry*, 156, 333-344. doi: 10.1093/jb/mvu046
7. Song, W.Y., Park J., Eisenach, C., Maeshima, M., Lee, Y., and Martinoia, E. (2014) ABC transporters and heavy metals. In "Signaling and Communication in Plants". Volume 22, Plant ABC Transporters (ed. Markus Geisler), pp.1-17, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (June 18, 2014) (total 331 pages)
8. Tanaka, N., Fujiwara, T., Tomioka, R., Krämer, U., Kawachi, M., and Maeshima, M. (2015) The histidine-rich loop of *Arabidopsis* vacuolar membrane zinc transporter AtMTP1 is involved in sensing cytosolic level of zinc. *Plant & Cell Physiology*, 56: 510-519. doi:10.1093/pcp/pcu194
9. Fujiwara, T., Kawachi, M., Sato, Y., Mori, H., Kutsuna, N., Hasezawa, S., and Maeshima, M. (2015) A high molecular mass zinc transporter MTP12 forms a functional heteromeric complex with MTP5 in the Golgi in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, 282: 1965-1979 doi:10.1111/febs.13252
10. Kobae, Y., Kawachi, M., Saito, K., Kikuchi, Y., Ezawa, T., Maeshima, M., Hata, S., and Fujiwara, T. (2015) Up-regulation of genes involved in *N*-acetylglucosamine uptake and metabolism implicates recycling mode of chitin in intraradical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 25: 411-417. doi: 10.1007/s00572-014-0623-2
11. Nagata, C., Miwa, C., Tanaka, N., Kato, M., Suito, M., Tsuchihira, A., Sato, Y., Segami, S. and Maeshima, M. (2016) A novel-type phosphatidylinositol phosphate-interactive, Ca-binding protein PCaP1 in *Arabidopsis thaliana*: stable association with plasma membrane and partial involvement in stomata closure. *Journal of Plant Research*, 129: 539-550. doi:10.1007/s10265-016-0787-2
12. Asaoka, M., Segami, S., Ferjani, A., and Maeshima, M. (2016) Contribution of PPi-hydrolyzing function of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in vegetative growth of *Arabidopsis*: Evidenced by expression of uncoupling mutated enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 7, Article 415. doi:10.3389/fpls.2016.00415
13. Fukuda, M., Segami, S., Tomoyama, T., Nakanishi, Y., Gunji, S., Ferjani, A., and Maeshima, M. (2016) Lack of H<sup>+</sup>-pyrophosphatase causes developmental damage in *Arabidopsis* leaves in ammonia-free culture medium. *Frontiers in Plant Science*, 7, Article 819. doi:10.3389/fpls.2016.00819
14. Ferjani, A., and Maeshima, M. (2016) Multiple facets of H<sup>+</sup>-pyrophosphatase and related enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 7, Article no. 1265. doi: 10.3389/fpls.2016.01265
15. Takahashi, K., Morimoto, R., Ishida, M.,

Asaoka, M., Maeshima, M., Tsukaya, H., and Ferjani, A. (2017) Compensated cell enlargement in *fugu5* is specifically triggered by lowered sucrose production from seed storage lipids. *Plant & Cell Physiology*, 58, 668-678.

doi:10.1093/pcp/pcx021

16. Tanaka, N., Uno, H., Okuda, S., Gunji, S., Ferjani, A., Aoyama, T., and Maeshima, M. (2017) SRPP, a cell-wall protein involved in development and protection of seeds and root hairs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 58, 760-769.

doi:10.1093/pcp/pcx021

#### その他の解説論文 (和文)

河内美樹、藤原崇志、田中奈月、前島正義:植物の亜鉛膜輸送体からみた亜鉛ホメオスタシスと亜鉛シグナリング(ミニレビュー). 生化学、2014年、86巻(3号)、pp 407-410

瀬上紹嗣、前島正義:GFPの二量体化を原因とする細胞内オルガネラの異常構造の形成とその予防策. 化学と生物、2015年、53巻、10号、pp. 703-708

河内美樹、藤原崇志、田中奈月、前島正義:亜鉛輸送体Cation Diffusion Facilitatorの機能を支える構造. 微量元素学会誌、「セミナー」、2015年 Biomedical Research on Trace Elements 26 (3): 124-129, 2015年.

[学会発表] (計 54 件)

Maeshima M, Segami S, Fukuda M, Asaoka M, Ferjani A: Dual functions of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase: vacuolar acidification and PPi homeostasis. 17<sup>th</sup> International Workshop on Plant Membrane Biology, Annapolis, Maryland, USA, June 5-10, 2016

Masayoshi MAESHIMA (2017) Multiple facets of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase and vacuolar functions: visible and invisible parts. Annual Meeting of Japanese Society of Plant

Physiologists. Symposium on Plant Vacuoles 2017. Kagoshima University, March 16 – 18, 2017 等

[図書] (計 1 件)

前島正義:植物細胞-液胞. 植物学の百科事典. (編集委員:三村・飯野・長谷部)、丸善出版、2015年

[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 (MAESHIMA, Masayoshi)  
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

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

河内 美樹 (KAWACHI, Miki)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科(現 高等研究員)・准教授  
研究者番号: 40625125

##### (4) 研究協力者

( )