

平成 30 年 8 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07334

研究課題名(和文)膜輸送体の極性局在の制御と利用

研究課題名(英文)Regulation of polar localization of membrane transporter

研究代表者

笠井 光治 (Kasai, Koji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：80517938

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)：シロイヌナズナのホウ酸トランスポーターBOR1は根の細胞の細胞膜において内向きの極性をもって局在しており、その極性は植物の必須栄養素であるホウ素を土壌から植物地上部へ効率的に送るのに有効である。本研究ではBOR1の内向き極性を決める遺伝子配列領域をホウ素輸送体以外の栄養輸送体に導入し利用することを目的とした。重金属輸送体であるPCR2遺伝子に内向き極性を決める遺伝子配列領域として同定したBOR1のC末端細胞内領域の配列を融合したところ、PCR2は内向きの極性を示すようになった。この結果はBOR1のC末端領域配列が、様々な膜輸送体に極性を付与するシグナル配列として利用できる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Arabidopsis borate transporter BOR1 is localize to the inner plasma membrane in the root cell, and the polar localization is effective to transport boron which is the micronutrient of plant from soil to the plant above ground part effectively. We introduced the sequence domain that decided inward polar localization of BOR1 into the nutrient transporter except the BOR borate transporter. After fusing with the sequence of the BOR1-C-terminal domain in the PCR2 gene which was a heavy metal transporter, PCR2 showed inward polarity. This result shows possibility that the C-terminal domain sequence of BOR1 can be used as signal sequence for inward polar localization to various plasma membrane proteins.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：膜輸送体 極性局在 ホウ酸トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

植物の根で発現する栄養輸送体は、土壌中の栄養素の吸収、地上部への輸送に重要な役割を果たす。栄養輸送体の中には極性を持って局在するものが知られており、極性は栄養素の輸送の方向を決める重要なファクターであると考えられる。シロイヌナズナホウ酸トランスポーターBOR1はホウ素の効率的な吸収に重要な役割を果たす(引用文献1)。BOR1は内向きの極性を持って根の様々な細胞の細胞膜に局在しており、土壌から地上部への向きを持った輸送に重要であると考えられた(引用文献2)。さらに極性局在性を消失した変異体の作成とその変異体のホウ素吸収特性の解析から、この局在が効率的なホウ酸輸送に寄与している事が示されていた(未発表データ、図1)。

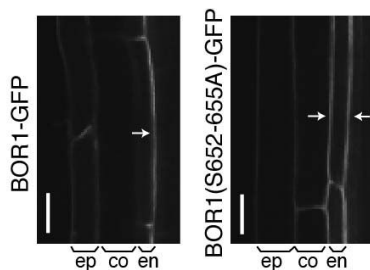


図1. 根における野生型 BOR1-GFP と変異型 BOR1(S652-655A)-GFP の局在。矢印で示すように野生型 BOR1-GFP は導管側に極性を持って局在するが、S652-655A 変異体は極性を示さない。

en: 内皮 (endodermis), co: 皮層 (cortex), ep: 表皮 (epidermis)

また、遺伝子配列の解析から BOR1 の C 末端領域の配列が極性局在に関与すると考えられ(引用文献3) BOR1 のパラログで内向き極性を示さない BOR4 に BOR1C 末端領域を融合すると細胞膜局在性を保持したまま根の成熟領域の endodermis おいて内向きの極性を付与出来ることが明らかになっていた(未発表データ、図2)。

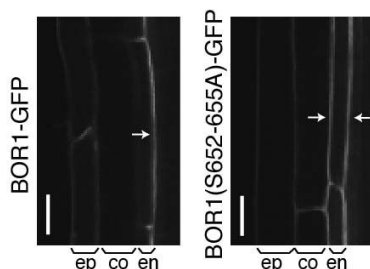


図2. 根における野生型 BOR1-GFP と変異型 BOR1(S652-655A)-GFP の局在。矢印で示すように野生型 BOR1-GFP は導管側に極性を持って局在するが、S652-655A 変異体は極性を示さない。

en: 内皮 (endodermis), co: 皮層 (cortex), ep: 表皮 (epidermis)

2. 研究の目的

BOR1 の極性局在シグナル配列 (C 末端細胞内領域の配列) を用いて、他の排出型栄養輸送体に内向きの極性を付与する技術を開発し、膜輸送体極性の制御およびそれを利

用した有用植物 (重金属に耐性を持つものや栄養欠乏における生育が改善したもの) の作出を目指した。さらに、極性の付与の効果の評価するための元素分布の変化を検出するためのシステムの構築を目指した。

3. 研究の方法

BOR1 の極性局在シグナル配列を含むと考えられる C 末端細胞内領域配列を、その他の排出型栄養輸送体である HMA2, PCR2 (必須栄養素 Zn を輸送する。Cd などの有害重金属も輸送する) の C 末端領域に導入し、それらを発現するシロイヌナズナ形質転換体を作成した。同時に導入した GFP 蛍光を指標として作成した栄養輸送体が内向きの極性を持つかどうかを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、内向きの極性の付与が認められた PCR2-BOR1C 末端領域-GFP タンパク質を発現植物に関しては Cd を含む培地および Zn が欠乏した培地において、それぞれ Cd に対する耐性、Zn 欠乏に対する耐性を試験した。さらに、極性能が付与された輸送体を発現した植物体における元素輸送能の変化を調べるために、laser-ablation-ICP-MS を用いてシロイヌナズナの根における元素の分布の変化を検出する系を構築した。

4. 研究成果

(1) 排出型重金属輸送体 PCR2 への内向き極性の付与

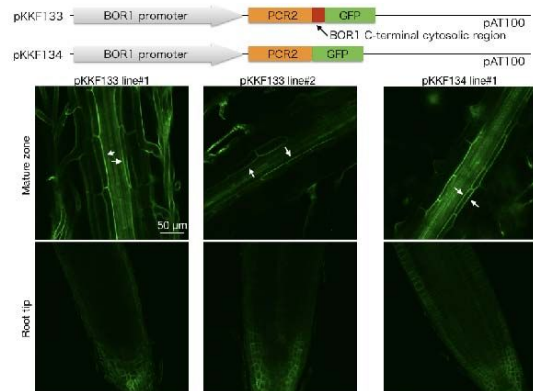


図3. PCR2 への内向き極性能力の付与

BOR1 の C 末端領域を導入すると内向きの極性を示すようになった (pKKF133)。図1. PCR2 への内向き極性能力の付与 BOR1 の C 末端領域をもたないコントロール (pKKF134) ではしていないコントロール (pKKF134) では内向きの極性は観察されなかった。

排出型重金属輸送体 PCR2 と HMA2 の C 末端領域に BOR1 の C 末端領域配列と GFP 配列を融合しシロイヌナズナに形質転換、発現させた結果、HMA2 では有意な内向き極性は確認出来なかったが、PCR2 では細胞膜局在性を保ったまま根の成熟領域の endodermis において内向きの極性を持つようになる事が明らかに

なった(図3)。コントロールのGFPのみ融合したタンパク質は極性を示さないことからBOR1のC末端配列はBORホモログでは無い他の輸送体においても内向きの極性を与えるシグナル配列として利用できることが明らかになった。

(2)laser-ablation-ICP-MS を用いたシロイヌナズナの根における元素の分布の検出する系の構築

内向きの極性を獲得した PCR2 を発現する植物体の重金属に対する耐性や亜鉛欠乏に対する耐性を調査したが、有意な変化が認められなかったため、より詳細に元素分布の微細な変化を検出する必要があった。そこで、laser-ablation-ICP-MS (LA-ICP-MS) を用いた根における元素分布を検出する系の構築を行った。LA-ICP-MSでは多元素分析(B, Na, Mg, K, P, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn)を行った。植物体は特別な処理は行わず、スライドガラス上の粘着面を上にして固定したセロファンテープにセットし、主根の根端から約 50 μm の点を開始点として 30 μm 間隔で上部に向かって 10 箇所 ablation を 4 回繰り返した。4 回の ablation により根を貫通出来ることを確認した。B, Na, Mg, P, K に関しては安定してシグナルを検出することができた(図4)。その他の元素についてはシグナルが低い、ノイズが高い等の問題がある。コントロール株の野生型 Col-0 株に関しては、元素ごとの分布パターンは大きく分けて以下の 3 パターンに分類された。(1) B は根端領域で量が多く、根の上部に行くほど少なくなる傾向を示した。(2) Na は根端領域で量が多く、根上部に向かっていったん低くなるが、さらに上部に行くと再び高くなる傾向を示した。(3) Mg, P, K は根端から根上部にかけて比較的量が一定だった。これらの結果から

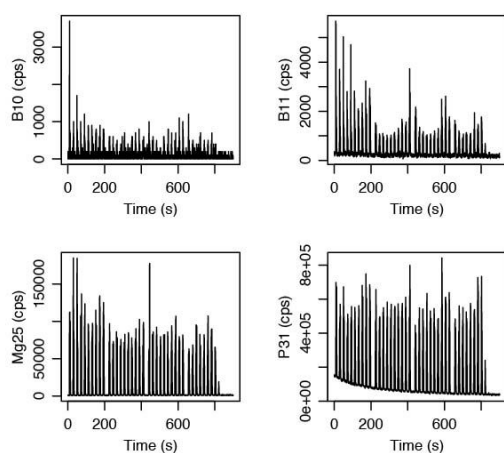


図4. LA-ICP-MSによるホウ素(10B, 11B), マグネシウム(25Mg), リン(31P)の検出例

主根の根端から約 50 μm の点を開始点として 30 μm 間隔で上部に向かって 10 箇所 ablation を 4 回繰り返した。

LA-ICP-MS による根の元素分布の元素間での違いが明確に検出されていることが確認された。しかしながら、PCR2 発現株を解析する上で重金属の安定した検出が今後の課題である。

< 引用文献 >

1. Takano J, Noguchi K, Yasumori M, Kobayashi M, Gajdos Z, Miwa K, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T., Arabidopsis boron transporter for xylem loading., Nature. 420(6913):337-40, 2002
2. Takano J, Tanaka M, Toyoda A, Miwa K, Kasai K, Fuji K, Onouchi H, Naito S, Fujiwara T., Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways., Proc Natl Acad Sci U S A.107(11): 5220-5, 2010
3. Kasai K, Takano J, Miwa K, Toyoda A, Fujiwara T., High boron-induced ubiquitination regulates vacuolar sorting of the BOR1 borate transporter in Arabidopsis thaliana., J Biol Chem. 286(8):6175-83, 2011

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 1 件)

1. Aibara I, Hirai T, Kasai K, Takano J, Onouchi H, Naito S, Fujiwara T, Miwa K., Boron-dependent translational suppression of the borate exporter BOR1 contributes to the avoidance of boron toxicity. Plant Physiol. 2018 May 4. doi: 10.1104/pp.18.00119., [Epub ahead of print], 2018

[学会発表](計 0 件)

[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

笠井 光治 (Kasai, Koji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号: 80517938