

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18660

研究課題名(和文)植物のマンガン恒常性を司る分子機構の包括的理解

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of molecular basis for Mn homeostasis in plants

研究代表者

上野 大勢 (Ueno, Daisei)

高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・准教授

研究者番号：90581299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネの優れたマンガン恒常性の維持に関わる重要な分子機構を明らかにした。Mn-CDFファミリーに属する細胞膜型トランスポーターMTP9は根の内皮と外皮において、向心側の細胞膜に局在し、マンガンを中心柱へと移行する高効率な吸収システムの一部を担っていた。また、液胞膜型のMTP8.2は地上部と根の両方で、マンガンが液胞に隔離することにより、優れたマンガン耐性に寄与することがわかった。さらにMTP11は幼植物期から生殖生長期に渡り、様々な組織でマンガンのトランスゴルジへの輸送に関わり、高濃度でマンガンが存在する水田における正常な登熟に貢献することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the molecular basis for Mn homeostasis in rice, which is Mn accumulating and tolerant crop. The plasma membrane-localized MTP9 was localized to the proximal side of endodermal and exodermal cells of roots. This exporter was involved in efficient root Mn uptake in co-operation with NRAMP5, an influx transporter localized at the distal side of the same cell layers. On the other hand, MTP8.2 was tonoplast-localized transporter expressed in both shoots and roots, and involved in the high Mn tolerance. MTP11 was expressed in old leaf blades, which accumulated more Mn than other tissues, at vegetative growth stage. MTP11 was localized to trans-Golgi and mediates Mn tolerance to a lesser extent than tonoplast-localized transporters. At reproductive stage, MTP11 was expressed in reproductive organs and might contribute to high fertility in submerged paddy with high Mn availability.

研究分野：植物栄養学

キーワード：マンガン ホメオスタシス イネ 耐性 集積性 吸収 トランスポーター 輸送体

1. 研究開始当初の背景

マンガンは植物の光合成における酸素生成等に関わる微量必須元素である。土壌中の可給態マンガン濃度は、pH や水分状態等により大きく変化する。例えば、石灰質土壌では植物はマンガン欠乏になり易く、酸性土壌や排水不良等の条件が重なれば過剰害が問題となる。植物は土壌環境に応じてドラステックにトランスポーターの発現を変化させ、その発現の強弱と個々のトランスポーターの基質特異性の違いにより、生育に適した金属イオン濃度を維持している。

未同定のトランスポーターを探索する手段の一つとして、マイクロアレイ等を用いた網羅的な遺伝子発現解析がある。これまで網羅的発現解析により、鉄、亜鉛および銅の過不足に回答して発現が変化するトランスポーター遺伝子が数多く同定されてきた。これに対し、マンガンの輸送に関わる遺伝子が同手法により同定された例はない。これはマンガンが転写レベルでの制御を受けない特異なシステムにより輸送されることを示唆しており、マンガン恒常性維持に関わる分子機構への理解が他の必須重金属と比べ遅れる一因となっている。

2. 研究の目的

本研究は、マンガン環境の変化に適応したイネが有する、優れたマンガン恒常性に関わる分子機構を包括的に解析することを目的とした。研究代表者のこれまで研究から、いくつかのマンガン輸送体がタンパク質レベルで増減することがわかっていた。このことから、当初はポリソーム解析を介した未知遺伝子の同定に期待したが至らなかった。一方で、並行して解析した Mn-CDF (cation diffusion facilitator) ファミリー輸送体が、全生育期間を通じて植物全体でマンガン恒常性の維持に大きな役割を果たすことを突き止めた。

3. 研究の方法

Mn-CDF に属する輸送体の機能を解明するため、分子生物学的および生化学的手により、組織・細胞内局在性、重金属輸送活性、輸送基質特異性、植物の各部位における発現を解析した。また、機能欠損株を用いて、水耕試験によりマンガン過剰・欠乏への影響を調べた。さらに、土耕試験で長期間の生育や収量に対する機能欠損の影響を調べた。これらを通じてイネにおける各トランスポーターの役割を推察した。

4. 研究成果

(1) MTP9 による高効率なマンガン吸収

イネの根の外皮および内皮では、カスパーラインにより溶質の拡散が遮断される。また、外皮と内皮の間には通気組織が形成されているため、吸収したミネラルを中心柱へ輸送するには、この二つの細胞層で吸収と排出を

協調的に行う必要がある。土壌溶液からのマンガンの吸収を担う Nramp5 (natural resistance-associated macrophage protein 5) は、根の外皮と内皮で発現し、カスパーラインを境として遠心側の細胞膜に極性局在することが報告されていた。我々は同細胞層からの排出を担う輸送体 MTP9 (metal tolerance protein 9) を同定した (図 1; Ueno et al., 2015, *Nature Plants*)。MTP9 はカスパーラインよりも中心柱側の細胞膜に極性局在していた。MTP9 を発現させた大腸菌の再構成リポソームを用いた解析により、マンガンに対する特異的な輸送活性が認められた。短時間の吸収実験の結果、*mtp9* 変異株ではマンガンの吸収と、続く地上部への移行が妨げられた。土耕栽培における収量を比較したところ、*mtp9* 変異株では野生株の半分以上に低下した。さらに、クロロフィル蛍光の解析により、この収量低下の原因が光化学系へのマンガン供給量の不足に因ることが示唆された。

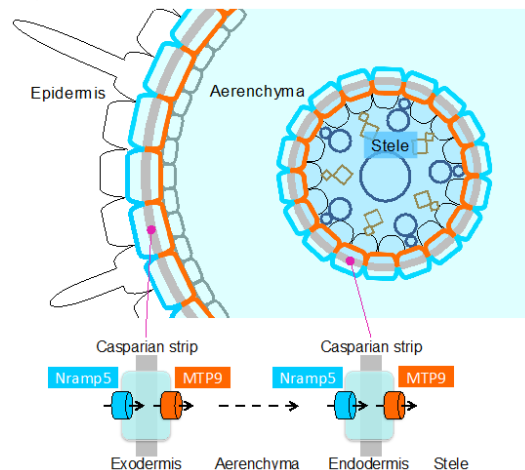


図 1 イネのマンガン吸収システム

マンガンの内向きの輸送活性を持つ Nramp5 (水色) は外皮と内皮の遠心側、外向きの輸送活性を持つ MTP9 (橙色) は向心側にそれぞれ極性局在する。Nramp5 と MTP9 によりカスパーライン (灰色) が発達する細胞層を効率よく通過することが可能になり、その結果イネは吸収したマンガンの多くを地上部に蓄積する。

(2) 根におけるマンガン耐性分子機構

MTP9 の働きによりマンガンが効率的に根から地上部へ移行するため、イネの根のマンガン濃度は他の植物よりも低く保たれる。しかし、水田においてイネの根は土壌還元による高濃度のマンガンに絶え間なく曝される。我々は液胞膜型の MTP8.2 が MTP8.1 (Chen et al, 2013) と共に根の Mn 耐性を担う主要な輸送体であることを明らかにした。両遺伝子の変異株と野生株間でマンガン過剰条件における 24 時間の根の伸長を比較したところ、障害率が野生株で約 20% だったのに対し、変異株では 90% 以上だった (図 2; Takemoto et al., 2017, *Plant and Cell Physiology*)。

一方、その他の重金属に対しては感受性を示さなかったことから、これらの輸送体はマンガンに特異的であると結論付けられた。

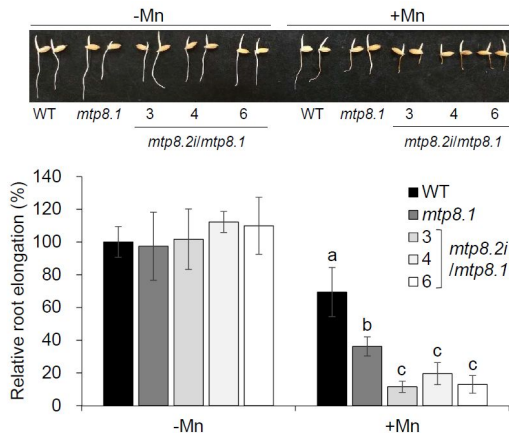


図 2 根のマンガン耐性に対する *MTP8.1* と *MTP8.2* 欠損の影響
異なる英小文字間には有意差があることを示す (P<0.05, Tukey 法)

さらに、変異株ではマンガン濃度の増加に伴い、外液からのマンガン吸収が抑制された (図 3; Tsunemitsu et al., 2018, *Plant Signaling & Behavior*)。以上より、高マンガン環境におけるイネの根のマンガン濃度は、液胞への隔離に加え、外液からの吸収の抑制により適切に維持されていると考えられた。

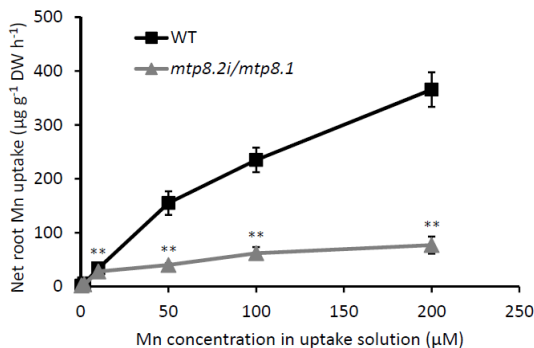


図 3 短時間(3時間)の濃度依存的マンガン吸収速度
**は 1%の水準で相関係数が有意であることを示す (t 検定)

(3)地上部におけるマンガン耐性分子機構

地上部へ移行し、展開葉へ分配された過剰なマンガンも *MTP8.1* と *MTP8.2* によって液胞へ隔離され無毒化されることがわかった。地上部において *MTP8.1* と *MTP8.2* は共に、マンガン濃度が高い古い葉身で高発現していた。これらの遺伝子の二重変異株がそれぞれの単独変異株と比べ著しいマンガン毒性を示したことから (図 4; Takemoto et al., 2017, *Plant and Cell Physiology*)、両輸送体ともマンガン耐性に重要であることがわかった。



図 4 *MTP8.1/8.2* 二重破壊によるマンガン耐性への影響

(4)トランスゴルジ局在型 *MTP11* の役割

イネの全 5 つの Mn-CDF の中で、*MTP11* は地上部と根どちらにおいても比較的高いレベルで発現している。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の At*MTP11* は同種のマンガン耐性に関わる主要なマンガントランスポーターであると報告されていることから、イネの *MTP11* もマンガン耐性に関わる可能性が示唆された。*MTP11* は幼植物期において、マンガン耐性の主幹をなす *MTP8.1* と同様に古い葉身で高発現していた。また、全生育期間を通して花柄や穂軸を含むあらゆる組織で構成的に発現していた。イネプロトプラストにおいて *MTP11::GFP* 融合遺伝子を一過的に発現させたところ、GFP のシグナルはトランスゴルジマーカーである KAM1 C:mRFP と ST:mRFP のシグナルと概ね一致したが、シスゴルジマーカー (mRFP:SYP31) や液胞前区画 (PVC) マーカー (mRFP:VSR2)、TGN マーカー (mRFP:SYP61) のものとは一致しなかった (図 4; Tsunemitsu et al., 2018, *Planta*)。このことから、*MTP11* はトランスゴルジに局在することが明らかになった。

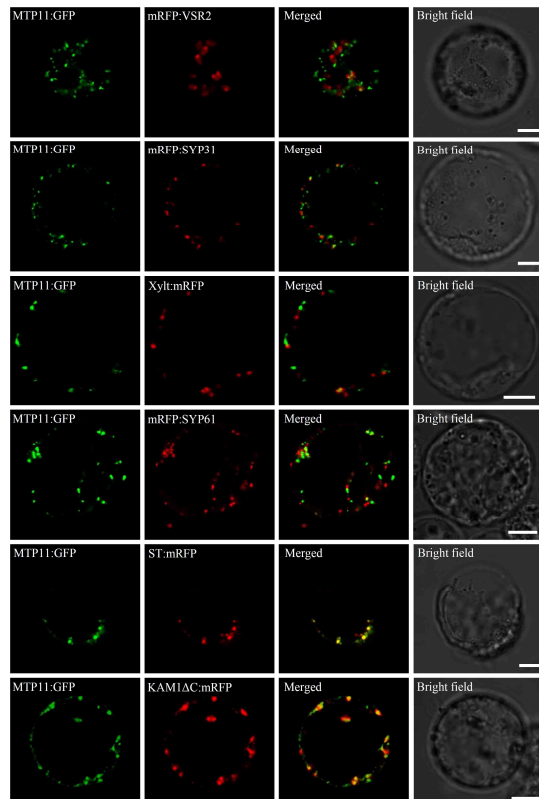


図 4 *MTP11* の細胞内局在

独立した2つのMTP11欠損株(Nipponbare由来; *mtp11n*, Dongjin由来; *mtp11d*)を用いてマンガン耐性・集積性への影響を調べた。水耕栽培でマンガン過剰処理を施したところ、MTP11欠損株の生育は野生株と同程度阻害され、欠損による影響は見られなかった。これに対し、二重破壊株(*mtp8.1mtp11n*, *mtp8.1mtp11d*)では葉身には著しいマンガンの毒性が現われ、それぞれの親株に対し生育が大きく低下した。これはMTP11がマンガン耐性に限定的に関与することを示している。一方、MTP11単独欠損による収量への影響を長期土耕試験により調べた結果、野生株と*mtp11n*間で地上部の乾燥重量には差がなかったが、子実収量と登熟歩合は*mtp11n*でそれぞれ約30%低下した(図5; Tsunemitsu et al., 2018, *Planta*)。これは、生殖組織におけるMTP11によるトランスゴルジへのマンガンの輸送が、米の収量確保に必要であることを示唆している。

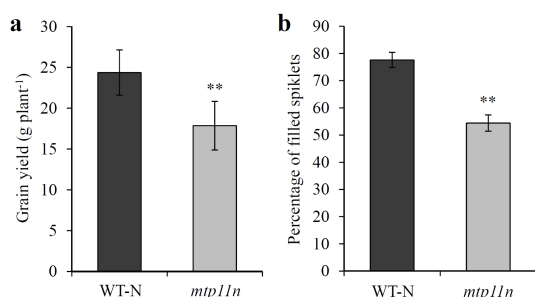


図5 MTP11欠損による収量への影響
(a)子実収量、(b)登熟歩合。**は1%の水準で相関係数が有意であることを示す(*t*検定)

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4件)

Tsunemitsu Y, Genga M, Okada T, Yamaji N, Ma JF, Miyazaki A, Kato SI, Iwasaki K, Ueno D (2018) A member of cation diffusion facilitator family, MTP11, is required for manganese tolerance and high fertility in rice. *Planta*, in press. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2890-1> (査読有)

Tsunemitsu Y, Yamaji N, Ma JF, Kato S, Iwasaki K, Ueno D (2018) Rice reduces Mn uptake in response to Mn stress. *Plant Signal. Behav.*, 13:e1422466. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1422466> (査読有)

Takemoto Y, Tsunemitsu Y, Fuji-Kashino M, Mitani-Ueno N, Yamaji N, Ma JF, Kato S, Iwasaki K, Ueno D (2017) The tonoplast-localized transporter MTP8.2 contributes to manganese detoxification in the shoots and roots of *Oryza sativa* L. *Plant Cell Physiol.*, 58:1573-1582.

<https://doi.org/10.1093/pcp/pcx082> (査読有)

Ueno D, Sasaki A, Yamaji N, Miyaji T, Fujii Y, Takemoto Y, Moriyama S, Che J, Moriyama Y, Iwasaki K, Ma JF (2015) A polarly localized transporter for efficient manganese uptake in rice. *Nat. Plants*, 1:15170. <http://dx.doi.org/10.1038/nplants.2015.170> (査読有)

[学会発表](計7件)

上野大勢(代表): イネの高マンガ集積に関わる分子機構. 第129回日本森林学会. 2018年3月26日~29日.

常光優太, 宮崎彰, 山地直樹, 馬建鋒, 加藤伸一郎, 岩崎貢三, 上野大勢(代表): トランスゴルジ局在型MTP11はイネのマンガ耐性に関与する. 第113回日本土壤肥料学会関西支部会. 2017年12月7日.

上野大勢(代表): 植物の重金属輸送に関する研究. 日本土壤肥料学会2017年度仙台大会. 9月5日~7日

常光優太, 竹本侑馬, 山地直樹, 馬建鋒, 加藤伸一郎, 岩崎貢三, 上野大勢(代表): 液胞膜型輸送体MTP8.1とMTP8.2はイネの根におけるマンガ耐性に寄与する. 植物化学調節学会第51回大会. 2016年10月28日~30日

上野大勢(代表): 植物のマンガ恒常性を司る輸送システム. 第11回トランスポーター研究会年会. 2016年7月2日, 3日

常光優太, 竹本侑馬, 山地直樹, 馬建鋒, Mayila Yusuyin, 加藤伸一郎, 岩崎貢三, 上野大勢(代表): MTP8およびMTP8.1はイネの根におけるマンガ耐性に寄与する. 日本土壤肥料学会2015年度京都大会. 9月9日~11日

D. Ueno(代表), Y. Takemoto, S. Kotake, N. Yamaji, J.F. Ma, S. Kato, K. Iwasaki: Vacuolar sequestration of Mn in leaf epidermis by OsMTP8 is required for Mn tolerance in rice. 13th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements. July 12-16, 2015.

[その他]

ホームページ等

本研究が関連する「植物の重金属輸送に関する研究」の業績に対し、2017年度第35回日本土壤肥料学会奨励賞を受賞したことを高知大学のホームページに掲載した。 <http://www.kochi-u.ac.jp/information/2017090800012/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

上野 大勢 (UENO, daisei)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授
研究者番号: 90581299