

令和元年6月2日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14786

研究課題名(和文) 生体膜共役輸送系の進化と生理-海産藻類はNa+を必須とするか

研究課題名(英文) Evolution of membrane co-transport system- Is Na+ essential for co-transporter of marine algae ?

研究代表者

三村 徹郎 (Mimura, Tetsuro)

神戸大学・理学研究科・教授

研究者番号：20174120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜共役輸送系はH⁺共役型とNa⁺共役型が知られていて、陸上植物の祖先種シャジクモのリン酸輸送系はNa⁺型である。この共役輸送系の進化を明らかにするために、汽水産緑藻類ヒラアオノリを用いて、生体膜共役輸送系の分子基盤と進化を明らかにすることを目指した。ヒラアオノリは、Na⁺欠乏条件下でも成長速度は落ちるが生育できること、必須栄養塩のリン酸の輸送が、H⁺型とNa⁺型であることを明らかにした。発現RNAの解析から、細胞膜に存在する二つのリン酸輸送体遺伝子の存在を見いだした。さらに、シャジクモのリン酸輸送体遺伝子のNa⁺依存性を、アフリカツメガエル未受精卵を用いた実験系で確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜共役輸送系は、栄養の取り込みや老廃物の排出に働き、細胞存続の基盤となる輸送系である。H⁺共役型とNa⁺共役型が知られていて、植物と動物を区別する大きな要素である。陸上植物は、H⁺共役型を持つことが知られている。本研究から陸上植物の祖先種であるシャジクモやアオサ類は、H⁺型やNa⁺型を持つことが明らかとなった。これら共役輸送系は、古くはH⁺共役型から進化したと考えられているが、陸上植物の祖先種の植物群がNa⁺型も持つことから、これらの共役輸送系がどのように進化してきたのかを、もう一度検討し直すことが必要となる。

研究成果の概要(英文)：The co-transport system is known to be H⁺-coupling or Na⁺-coupling. The phosphate transport system of *Chara braunii* which is supposed to be the ancestor of land-plants, is Na⁺ co-transport type. In order to clarify the evolution of this co-transport system, we aimed to analyze the molecular basis and evolution of the co-transport system by using the brackish green algae; *Ulva compressa*. We found that it can be grown even under Na⁺-deficient conditions, and the phosphate transport is both H⁺ type and Na⁺ type. Transcriptome analysis revealed the presence of two phosphate transporter genes supposed to be in the cell membrane. In further experiment, the Na⁺ dependency of the phosphate transporter gene of *Chara braunii* was confirmed using *Xenopus* unfertilized egg's system.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：共役輸送 ナトリウムイオン リン酸 アオサ シャジクモ 膨圧調節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全ての細胞において、栄養物質の取り込みや老廃物の排出の大半が生体膜の共役輸送系によって行われる。共役輸送系は、細菌や菌類の多くと植物では H^+ の電気化学ポテンシャル勾配で、細菌の一部と動物では Na^+ の電気化学ポテンシャル勾配で駆動される (図 1)。

申請者の三村は、陸上植物の祖先種の一つとされるシャジクモでは、必須栄養塩のリン酸の輸送が Na^+ 依存であることを生理学的に初めて証明し、さらに坂山等が確立したシャジクモ類の EST とゲ

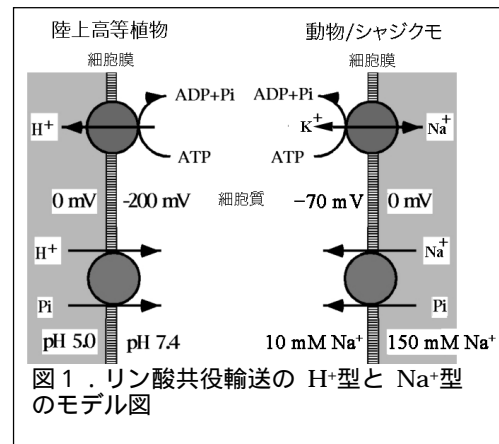


図 1. リン酸共役輸送の H^+ 型と Na^+ 型のモデル図

ノムデータから、ただ一つの遺伝子を見出しその全長を決定することで、それが陸上植物の細胞膜リン酸輸送体と相同かつ祖先型であることを明らかにした。また、同じシャジクモ類に属するアオミドロと、基部陸上植物であるゼニゴケでは、生理実験からリン酸輸送は H^+ 共役輸送系として機能する可能性を見出している。一方、シャジクモ類の祖先種の一つである海産緑藻の栄養塩輸送機構については、全く研究が進んでいない。そこで、海水から汽水までの多様な環境で生育できる緑藻類の一つアオサ類に着目し、陸上植物の祖先種と考えられる藻類が、 H^+ 共役輸送系と Na^+ 共役輸送系のどちらを利用しているのか、またその輸送系が、シャジクモや陸上植物の栄養塩輸送系にどのように進化してきたのかを検討することとした。

2. 研究の目的

生体膜共役輸送系は、栄養の取り込みや老廃物の排出に働き、細胞存続の基盤となる輸送系である。 H^+ 共役型と Na^+ 共役型が知られていて、植物と動物を区別する大きな要素である。我々は陸上植物の祖先種とされるシャジクモのリン酸輸送系は Na^+ 共役型であることを報告し、シャジクモからただ一つの細胞膜型リン酸輸送体遺伝子を単離し、それが高等植物の細胞膜リン酸輸送体全ての祖先型であることを見出した。本研究では、この共役輸送系の進化を明らかにするために、シャジクモ類のさらなる祖先種として、海水から汽水までの多様な環境で生育できる緑藻類の一つアオサ類の栄養塩輸送機構に着目し、遺伝子解析と膜輸送生理解析を組み合わせることで、海藻の生体膜共役輸送系の分子基盤と進化を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

実験材料として海水から汽水までの多様な塩分環境で生育できるアオサ類を用いる。また、生理解析、ゲノム解析に用いられてきたシャジクモを基準材料とするとともに、シャジクモの遺伝子解析も進める。

- 1) 多様な塩分環境で生育させたアオサ類の生育が、 Na^+ とどのように関連しているかを明らかにする。
- 2) 多様な塩分環境下での、アオサ類のリン酸輸送活性を生理解析する。
- 3) 遺伝子発現解析を行うことで、リン酸輸送体遺伝子を同定するとともに、可能ならその単離と輸送測定を行う。
- 4) アオサ類のような海産緑藻の Na^+ 利用能がどのように規定されているのかを決定する。
- 5) 以上の過程を、淡水産藻類でありながら Na^+ 共役系を持つシャジクモや、陸上植物の祖先系として知られるゼニゴケなどの共役輸送系と比較解析することで、それらのイオン輸送系がどのように進化してきたのかを明らかにする。

4. 研究成果

4-1. アオサ類 (*Ulva compressa* (和名; ヒラアオノリ)) の Na⁺依存性:

汽水産緑藻のヒラアオノリ (*Ulva compressa*) のナトリウム要求性を検討した結果、海産藻類でありながら全く Na⁺を除いた培地でも、速度は落ちるが成長を続け

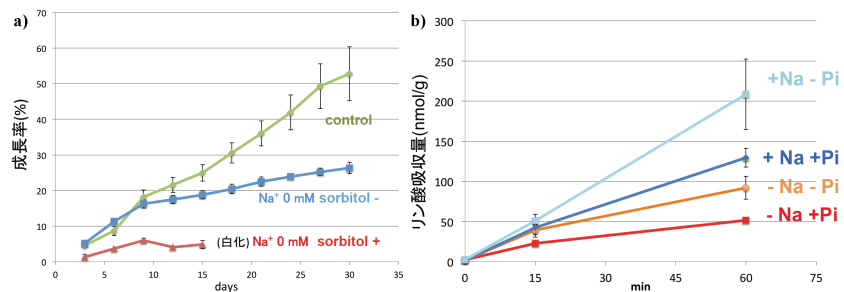


図1 : a) アオサの成長の Na⁺依存性。 b) アオサリン輸送機構の Na⁺依存性。

られること、また、そのリン酸輸送過程を、放射性同位体を用いて測定した結果、その機構には、Na⁺依存性と H⁺依存性の二つが共存していることが明らかとなった (図1)。

さらに、Na⁺を除いた培地では、細胞内のイオン濃度が膨圧に依存せず調節されることが明らかとなった。これは、浸透圧調節機構として、膨圧に依存しない新しい生理過程の可能性が示唆された (図2)

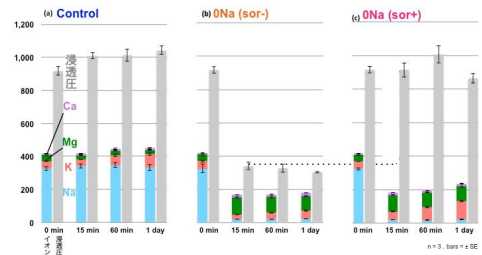


図2 : それぞれの培養条件下における Cation 濃度と浸透圧。

4-2. シャジク藻類、アオサ藻類におけるリン酸輸送体分子機構の解析とリン酸共役輸送系の進化: 陸上植物の祖先の一つと考えられるシャジクモとアオサ類を対象に、栄養塩としてのリン酸の共役輸送系の分子機構と、その進化について検討した (図3)。

シャジクモ (*Chara braunii*) は、Na⁺/リン酸共輸送を行っているということ、リン酸の取り込み実験により確認した。さらに、ゲノム解析データから、細胞膜に存在する高親和性リン酸輸送体ファミリー Pht1 に属する *CbPht1* 遺伝子を一たび見出し、それがシャジクモの節間細胞に発現していることを明らかにした。

この *CbPht1* 遺伝子がリン酸輸送を行うことを酵母に導入した実験から明らかにした。一方、酵母を用いた実験では、Na⁺依存性の確認が出来なかったことから、クローニングしたリン酸輸送体遺伝子をアフリカツメガエル未受精卵に顕微注射し、この遺伝子産物が Na⁺依存性リン酸輸送の実体であることを証明した (図4)。

Phylogenetic tree of PHT1

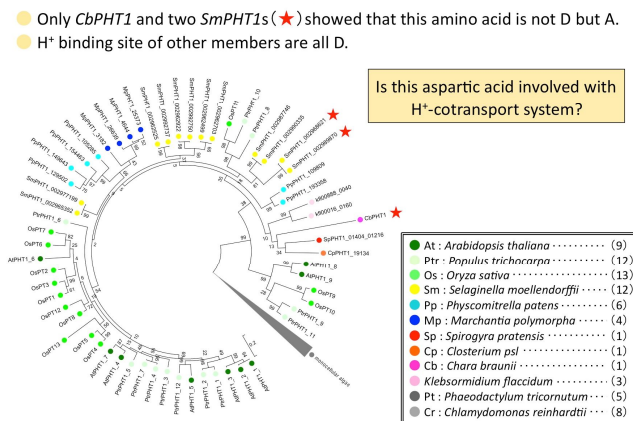


図3 : リン酸輸送体 (PHT) の系統関係

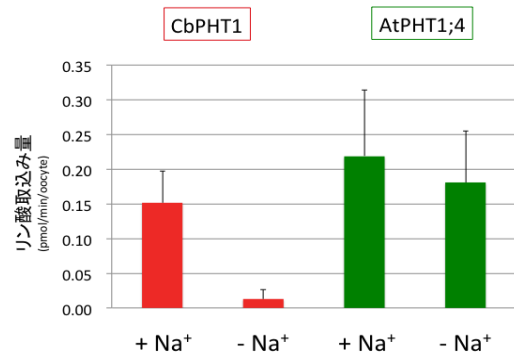


図4 : シャジクモリン酸輸送体 (*CbPHT1*) とシロイヌナズナリン酸輸送体 (*AtPHT1;4*) のアフリカツメガエル未受精卵におけるリン酸輸送活性の Na⁺依存性

さらにアオミドロとゼニゴケでリン酸吸収実験を行い、Na⁺非依存性を明らかにした。

最後に、汽水産緑藻のヒラアオノリ (*Ulva compressa*) のトランスクリプトーム解析を行い、発現 RNA から、二つのリン酸輸送体遺伝子のホモログを見出した。ヒラアオノリには、シャジクモや陸上植物で知られる、Pht1 ファミリーの遺伝子は見出さず、代わりに PTB ファミリーと Pht2 ファミリーに近い二つのリン酸輸送体ホモログを見出した。これらはそれぞれ H⁺共役系と Na⁺共役系に近縁であったことから、これらの遺伝子が発現した輸送体がヒラアオノリのリン酸輸送活性を担っている可能性が示された。これらの遺伝子の共役イオンの証明が今後の課題である。

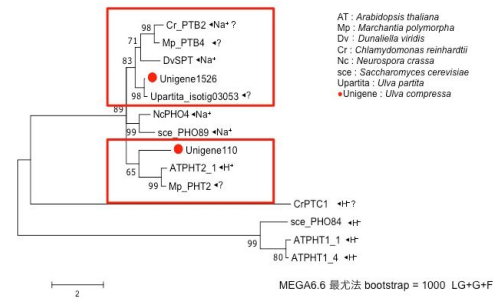


図5: 既知のリン酸輸送体遺伝子とヒラアオノリのリン酸輸送体候補遺伝子のアミノ酸配列を用いた系統樹

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

- 1) Baba Kei'ichi *, Kurita Yuko, Mimura Tetsuro (2018) Wood structure of *Populus alba* formed in a shortened annual cycle system. *J. Wood Science* 64 (1) : 1-5. DOI 10.1007/s10086-017-1664-x
- 2) Mochizuki Akihito, Murata Takahiro, Hosoda Ko, Katano Toshiya, Tanaka Yuji, Mimura Tetsuro, Mitamura Osamu, Nakano Shin-ichi, Okazaki Yusuke, Sugiyama Yuko, Satoh Yasuhiro, Watanabe Yasunori, Dulmaa Ayuriin, Ayushsuren Chananbaatar, Ganchimeg Darmaa, Drucker Valentin V., Fialkov Vladimir A., Sugiyama Masahito (2018) Distributions and geochemical behaviors of oxyanion-forming trace elements and uranium in the Hövsgöl–Baikal–Yenisei water system of Mongolia and Russia. *Journal of Geochemical Exploration* 188: 123–136.
<https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2018.01.009>
- 3) * Ohnishi Miwa, * Aneqawa Aya, Sugiyama Yuko, Harada Kazuo, Oikawa Akira, Nakayama Yasumune, Matsuda Fumio, Nakamura Yukiko, Sasaki Ryosuke, Shichijo Chizuko, Hatcher Patrick G., Fukaki Hidehiro, Kanaya Shigehiko, Aoki Koh, Yamazaki Mami, Fukusaki Eiichiro, Saito Kazuki, Mimura Tetsuro (2018) Molecular components of *Arabidopsis* intact vacuoles clarified with metabolomic and proteomic analyses. *Plant and Cell Physiology* 59 (7) : 1353–1362. doi: 10.1093/pcp/pcy069.
- 4) Martinoia Enrico, Mimura Tetsuro, Hara-Nishimura Ikuko, Shiratake Katsuhiko (2018) The multifaceted roles of plant vacuoles. *Plant and Cell Physiology* 59 (7) : 1285–1287.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy113>.
- 5) Takami Tsuneaki, Ohnishi Norikazu, Kurita Yuko, Iwamura Shoko, Ohnishi Miwa, Kusaba Makoto, Mimura Tetsuro, Sakamoto Wataru (2018) Organelle DNA degradation contributes to the efficient use of phosphate in seed plants. *Nature Plants* 4(12):1044-1055. doi: 10.1038/s41477-018-0291-x.
- 6) Sharma Shanti S., Yamamoto Kotaro, Hamaji Kohei, Ohnishi Miwa, Aneqawa Aya, Sharma Shashi, Thakur Sveta, Kumar Vijay, Uemura Tomohiro, Nakano Akihiko, Mimura Tetsuro (2017) Cadmium-induced changes in vacuolar aspects of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 114: 29-37. doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.02.017.
- 7) Kurita Yuko, Baba Kei'ichi, Ohnishi Miwa, Matsubara Ryosuke, Kosuge Keiko, Aneqawa Aya, Shichijo Chizuko, Ishizaki Kimitsune, Kaneko Yasuko, Hayashi Masahiko, Suzaki Toshinobu, Fukaki Hidehiro, Mimura Tetsuro* (2017) Inositol hexakis phosphate is the seasonal phosphorus reservoir in the deciduous woody plant (*Populus alba* L.). *Plant and Cell Physiology* 58(9), 1477-1485.

doi:10.1093/pcp/pcx106

- 8) Baba Kei' ichi *, Kurita Yuko, Mimura Tetsuro (2017) Architectural morphogenesis of poplar grown in a shortened annual cycle system. *Bulletin of Research Institute for Sustainable Humanosphere Kyoto University*, 13: 1-4.
- 9) Mitamura Osamu, Satoh Yasuhiro, Watanabe Yasunori, Nakano Shin-ichi, Katano Toshiya, Tanaka Yuji, Mimura Tetsuro, Drucker Valentin V., Sugiyama Masahito (2016) Contribution of picophytoplankton to urea decomposition in the euphotic zone of Lake Baikal. *Limnological Study* 3: 35-52.
- 10) Chiang Chih-Pin, Yim Won Cheol, Sun Ying-Hsuan, Ohnishi Miwa, Mimura Tetsuro, Cushman John Chandler, Yen Hungchen Emilie (2016) Identification of ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) microRNAs using RNA-Seq and their putative roles in high salinity responses in seedlings. *Frontiers in Plant Science* 7:1143, doi: 10.3389/fpls.2016.01143.
- 11) Sharma Shanti S, Dietz Karl-Josef, Mimura Tetsuro (2016) Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant Cell & Environment* 39 (5) : 1112-1126. doi: 10.1111/pce.12706

〔学会発表〕(計 39 件)

- 1) 三村 徹郎, 大西 美輪, 村西 直樹, 藤原 ひとみ, 石崎 公庸, 深城 英弘, 西山 智明, 坂山 英俊, Rob J. Reid, 且原 真木, 「シヤジクモ細胞膜リン酸輸送体の分子機能解析」, 日本植物学会第82回大会, 広島国際会議場, 2018.9, 国内, 口頭発表 (一般)
 - 2) 井阪 若菜, 寺内 真, 大西 美輪, 羽生田 岳明, 市原 健介, 山崎 誠和, 石崎 公庸, 深城 英弘, 河野 重行, 川井 浩史, 新免 輝男, 三村 徹郎, 「汽水産緑藻 *Ulva compressa* のNa⁺に依存した成長とリン酸の取り込みについて」, 日本植物学会第81回大会, 東京理科大学 野田キャンパス, 2017.9, 国内, ポスター発表
 - 2) 井阪若菜, 大西美輪, 羽生田岳昭, 市原健介, 山崎誠和, 石崎公庸, 深城英弘, 河野重行, 川井浩史, 新免輝男, 三村徹郎, 「汽水産緑藻*Ulva compressa*のNa⁺ に依存した成長とリン酸の取り込みについて」, 日本藻類学会第41回大会, 高知, 2017.3, 国内, 口頭発表 (一般)
- 他 36 件

〔図書〕(計 3 件)

- 1) Ohnishi Miwa, Yoshida Katsuhisa, Mimura Tetsuro (2017) Analyzing the vacuolar membrane (tonoplast) proteome. *In Plant Membrane Proteomics*, In: Mock HP., Matros A., Witzel K. (eds) *Plant Membrane Proteomics. Methods in Molecular Biology*, vol 1696. Humana Press, New York, NY, DOI https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7411-5_7
- 2) 三村徹郎 (2016) 「基礎生物科学」(鷲谷いづみ 監修/高橋純夫 編) 培風館 総ページ数: 238 ページ、14 章: 植物における生体制御のしくみ、15 章: 植物が必要とする水と栄養、16 章: 植物と他の生物との関わりあい
- 3) 三村徹郎 (2016) 「植物学の百科事典」(植物学会編、編集長三村徹郎) 丸善 総ページ数: 800 ページ、「リン代謝」、「水孔」、「運動」

〔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

6. 研究組織

(1)研究分担者 ナシ

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大西 美輪

ローマ字氏名：Ohnishi Miwa

研究協力者氏名：川井 浩史

ローマ字氏名：Kawai Hiroshi

研究協力者氏名：井阪 若菜

ローマ字氏名：Isaka Wakana

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。