

令和元年6月14日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15082

研究課題名(和文)植物ホウ酸チャネルのER exitを制御するカーゴレセプターの同定

研究課題名(英文) Identification of an ER-Golgi cargo receptor for boric acid channels in plant cells

研究代表者

高野 順平 (Junpei, Takano)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70532472

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)：本研究では、シロイヌナズナにおいてSPOT1/KNS3と呼ばれる機能未知タンパク質が、ホウ酸チャネルNIP5;1を合成の場である小胞体から機能する場である細胞膜へ運ぶカーゴレセプターであることを示唆する結果を得た。KNS3とその相同タンパク質は小胞体においてホウ酸チャネルと結合し、共に輸送小胞に積み込まれてゴルジ体へ運ぶ可能性が高い。本研究の過程では、ホウ酸チャネルの一種であるNIP7;1が葯のタペート細胞におけるKNS3のカーゴ(積荷)であるかどうかを検討し、NIP7;1はKNS3には依存せず細胞膜に局在しホウ酸輸送に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は小胞体で合成され、ゴルジ体を経由して機能する膜へ輸送される。最初の輸送ステップは小胞体における輸送小胞への積み込みであるが、その仕組みは単純ではないことが様々な生物で明らかになりつつある。本研究は植物のホウ酸チャネルという特定の膜タンパク質を選択的に輸送小胞に積み込む新たな仕組みを見出したものである。これは細胞膜で働くホウ酸チャネルの量を正確に調整する植物にユニークな仕組みと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we suggested that SPOT1/KNS3 functions as a cargo receptor for boric acid channels from the endoplasmic reticulum (ER) to the plasma membrane in plant cells. KNS3 and homologs probably bind with boric acid channels on the ER membrane to selectively transport into transport vesicles toward the Golgi. In the course of this study, we also revealed the localization of a boric acid channel NIP7;1 in the plasma membrane of anther tapetum cells although the localization was not dependent on KNS3.

研究分野：植物栄養学

キーワード：カーゴレセプター ホウ酸チャネル シロイヌナズナ 小胞体 分泌系 ゴルジ体 花粉

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

1. 研究開始当初の背景

ホウ素は植物の必須栄養素でありかつ蓄積しすぎると毒となる元素である。シロイヌナズナ NIP5;1 は細胞へのホウ酸吸収を促進するホウ酸チャネル、BOR1 はホウ酸の細胞外への排出を促進するホウ酸トランスポーターであり、両者が共同してホウ素を土壌から吸収し導管へ送る (Takano et al. Nature 2002; Plant Cell 2006; PNAS 2010)。これら輸送体が、細胞膜に適量配置されることがホウ素の適切な輸送、ひいては植物の生長にとって重要である。

私たちは、ホウ酸チャネル NIP5;1 の細胞内局在メカニズムを理解するため、GFP-NIP5;1 の局在に異常を持つ変異株のスクリーニングを一つ一つの株の蛍光イメージングによって行った (Uehara et al. PCP 2014)。その結果、GFP-NIP5;1 の大部分が ER に留まる変異株が得られた (図 1)。本変異株では、PIN2 や PDR8 といった細胞膜局在型輸送体や NIP5;1 に近縁の PIP2;1 の局在には異常がなかった。つまり NIP5;1 あるいはそのごく近縁のタンパク質群に特異的な ER exit 機構に異常がある変異株と考えられた。続いて原因遺伝子をマッピングと次世代シーケンサーを用いた Positional cloning 法で探索したところ、*At5g58100* に絞られた。*At5g58100* のコードするタンパク質の機能は未知であったが、その T-DNA insertion 変異株には花粉外壁エキシン構造に異常を持つために *spot1/kns3* という名が付けられていた。私たちの ER 型変異株においてもエキシン構造に異常が見られ、*spot1/kns3* T-DNA insertion 変異株においても GFP-NIP5;1 の ER 局在が見られたため、これらは同一遺伝子の変異株であることが確定した。したがって *SPOT1/KNS3* は NIP5;1 の ER exit と花粉外壁の構造維持の両方に重要なタンパク質をコードすると考えられた。以降は、研究開始後に協力を得た石黒澄衛博士 (名古屋大学) の呼び名に従い、*KNS3* と呼ぶ。

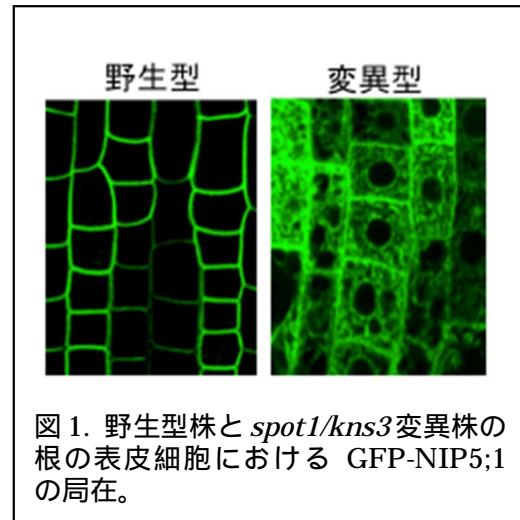


図 1. 野生型株と *spot1/kns3* 変異株の根の表皮細胞における GFP-NIP5;1 の局在。

2. 研究の目的

KNS3 が NIP5;1 およびそのホモログのカーゴレセプターとして ER exit を促進するという仮説 (図 2) を検証することを目的とした。また、*KNS3* は薬のいずれかの細胞においてホウ酸チャネル NIP7;1 の ER exit を促進し、それにより花粉外壁構造の形成に寄与する可能性を検証した。

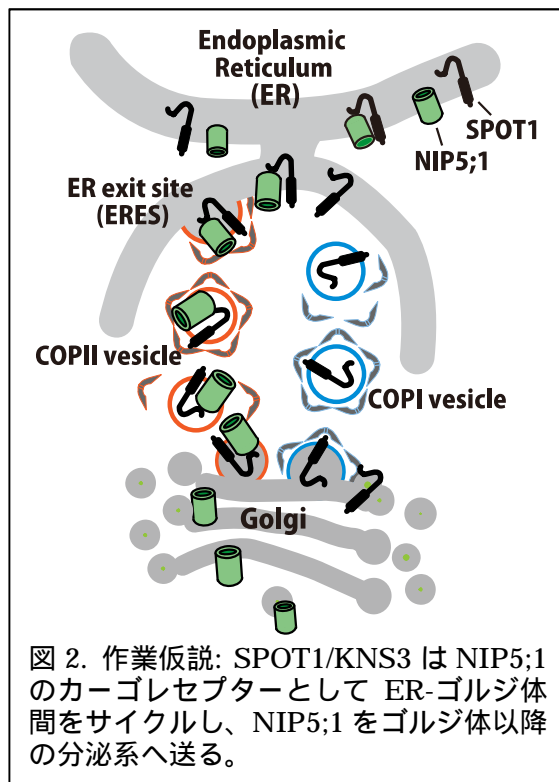


図 2. 作業仮説: *SPOT1/KNS3* は NIP5;1 のカーゴレセプターとして ER-ゴルジ体間をサイクルし、NIP5;1 をゴルジ体以降の分泌系へ送る。

3. 研究の方法

A. *KNS3* が輸送するタンパク質の同定

研究開始前に、*kns3* 変異株では GFP-NIP5;1 の一部が ER に留まるが、H⁺-ATPase やオーキシン輸送体 PIN2、PDR8、さらには同じアクアポリンの family に属する PIP2;1 の局在には異常がない結果を免疫染色法にて得ていた。本研究では、NIP5;1 に近縁のタンパク質が *SPOT1* による品質管理を受けるかどうか検証するため、NIP subfamily の各メンバーに蛍光タンパク質を融合して *spot1* 変異株の根の表皮細胞における局在を解析した。同様に薬において発現するホウ酸チャネル NIP7;1 の細胞内局在を解析した。

B. *KNS3* の細胞内局在

研究開始までに *KNS3* の配列に mCherry を挿入したコンストラクト (mCherry-*KNS3*) を作成しベンザミアタバコの葉に一過的に発現させた結果、ER シートとゴルジ体の両方と思われる局在パターンを観察していた。本研究では、各種マーカータンパク質と共同在を観察し、局在を確定した。本実験は形質転換シロイヌナズナも作成して試みた。また、*KNS3* のポリクローナル抗体を作成し、免疫染色法により局在を解析した。*KNS3* の蓄積がホウ酸濃度に応じて変化するかどうかも解析した。

C. *KNS3* の生理学的機能

KNS3 はホウ酸チャネル NIP5;1 の ER exit に寄与するため、植物のホウ酸吸収において

重要と考えられた。そこで、*kns3* 変異株を様々なホウ酸濃度で栽培し、表現型を解析した。また、*kns3* 変異株では花粉外壁構造に異常が現れることが知られているが、この表現型をホウ酸供給によって回復させられるかどうか解析した。

D, KNS3 と NIP5;1 の相互作用

SPOT1 が ER 中で NIP5;1 を認識する可能性を検証するため、相互作用解析を行った。植物細胞における BiFC、酵母の ER 膜上での split-ubiquitin two-hybrid や共免疫沈降法により解析した。

E, KNS3 ホモログの解析

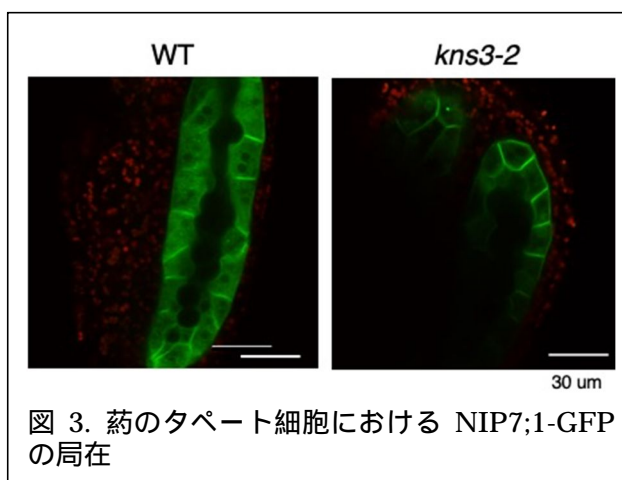
KNS3 にはシロイヌナズナに 2 つホモログと考えうるタンパク質がある。これらが KNS3 と共同して働く可能性を検証するため、各ホモログの変異株、二重および三重変異株に GFP-NIP5;1 を導入し、局在を解析した。また、これらのホウ素に依存した生育を解析した。

4. 研究成果

A, KNS3 が輸送するタンパク質の同定

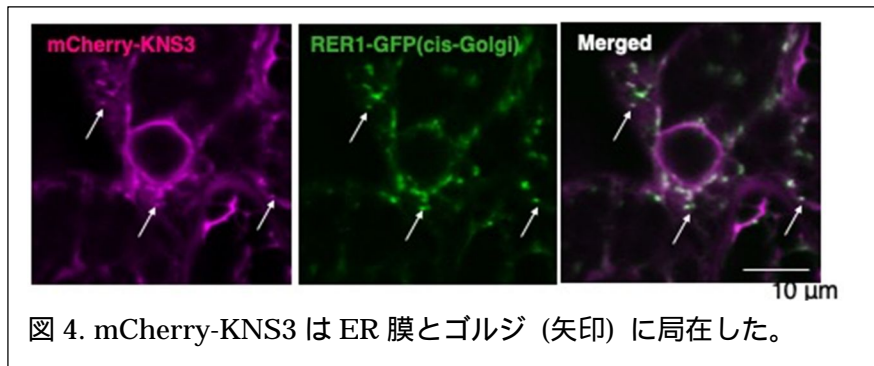
kns3 変異株に proNIP5;1: GFP-NIP1;2, GFP-NIP6;1, GFP-PIP2;1 を形質転換により導入し、根の表皮細胞における局在を解析したところ、NIP1;2 と PIP2;1 は正常に細胞膜に、NIP6;1 は細胞膜と ER 膜に局在した。したがって、本来は花茎の節などで働くホウ酸チャネルである NIP6;1 も、NIP5;1 と同様に KNS3 によって運ばれるカーゴ (積荷) であることが明らかになった。

薬において発現することが知られていたホウ酸チャネル NIP7;1 については、proNIP7;1: NIP7;1-GFP のコンストラクトを作成し形質転換植物の薬における局在を解析したところ、当初示唆されていた小孢子ではなく、タペート細胞に発現することが明らかになった。タペート細胞においては主に細胞膜に局在した。本成果は、NIP7;1 のホウ酸チャネルとしての機能解析の論文において発表した (Routray et al. 2018 Plant Physiology)。続いて本コンストラクトを *kns3* 変異株に導入し細胞内局在を解析したところ、変わらず細胞膜に局在した。したがって、NIP7;1 は KNS3 のカーゴではないと考えられた (図 3)。



B, KNS3 の細胞内局在

KNS3 の配列に mCherry を挿入したコンストラクト (mCherry-KNS3) と ER およびゴルジマーカをベンザミアタバコの葉に一過的に発現させた結果、ER シートとゴルジ体での共局在が見られた (図 4)。したがって KNS3 は ER とゴルジを行き来するタンパク質である可能性が高まった。また、KNS3 のポリクローナル抗体を作成し、免疫染色法により局在を解析した。抗体は western blotting においては明確なシグナルを与えたが、免疫染色法では明確な結果は得られなかった。KNS3 の蓄積がホウ酸濃度に応じて変化するかどうかも western blotting により解析したところ、変化は見られなかった。



シロイヌナズナ植物体においても局在解析を行うため、各種タグを融合した KNS3 を KNS3 プロモーター制御下で発現させるコンストラクトを *kns3* 変異株に形質転換により導入した。しかしながら、*kns3* 変異株における GFP-NIP5;1 の局在異常を明確に相補するコンストラクトは得られなかった。プロモーター配列の長さやタグの挿入位置を変えて現在も実験を続けている。

C, KNS3 の生理学的機能

kns3 変異株を様々なホウ酸濃度で栽培し表現型を解析したが、低ホウ素でやや根が短い傾向が得られたが、明確ではなかった。また、*kns3* 変異株の花粉外壁構造の異常は、ホウ酸供給によって回復しなかった。上記 A の NIP7;1 の局在が KNS3 に依存しなかったことと合わせて、花粉外壁構造の異常についてはホウ素は直接的には関係しないと考えられた。花粉形成においては別の KNS3 カーゴがあるものと考えられる。

D, KNS3 と NIP5;1 の相互作用

KNS3 と NIP5;1 の相互作用解析をベンザミアタバコの葉における一過的発現系で BiFC により解析した。その結果、相互作用を示唆する BiFC 蛍光がゴルジと見られる構造で観察された。しかしながら同様の相互作用が KNS3 カーゴではない NIP1;2 を用いた場合でも見られたことより、相互作用の特異性に疑問が残った。酵母の ER 膜上での split-ubiquitin two-hybrid や植物サンプルによる共免疫沈降法については実験材料を確立し、予備的な実験まで進めた。

E, KNS3 ホモログの解析

KNS3 と 2 つのホモログそれぞれの変異株、および三重変異株に GFP-NIP5;1 を導入し、局在を解析した。その結果、いずれの株においても同程度に ER 膜と細胞膜に局在が見られた (図 5)。したがって、これら 3 つのタンパク質は協同して働く可能性が高いと考えられた。また、これらの変異株のホウ素に依存した生育を解析したところ、いくつかの株でホウ素欠乏条件下でやや根の成長が悪い傾向が見られたが、明確ではなかった。

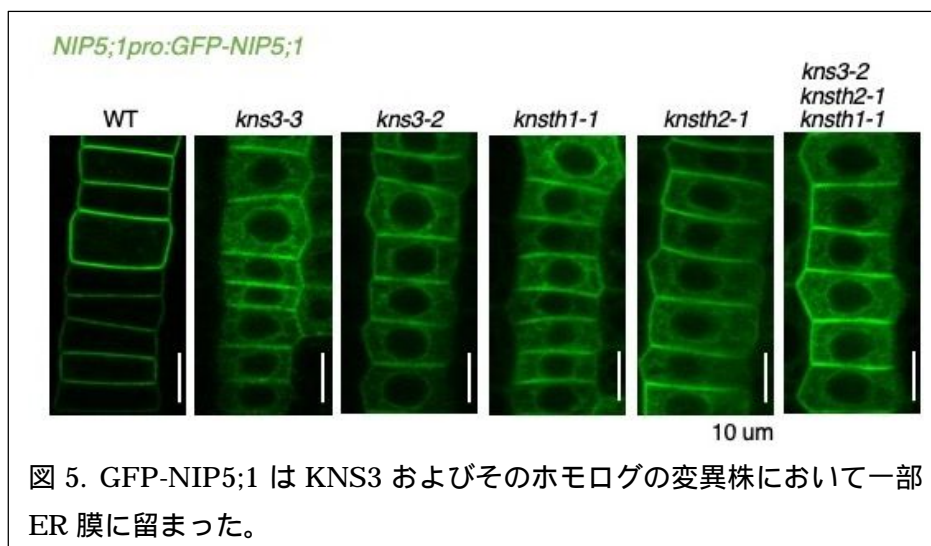


図 5. GFP-NIP5;1 は KNS3 およびそのホモログの変異株において一部 ER 膜に留まった。

以上から、KNS3 がホウ酸チャネル NIP5;1 およびそのホモログのカーゴレセプターとして ER exit を促進するという仮説をサポートするデータと今後の証明を可能にする実験材料を得ることができた。さらに、KNS3 が単独ではなく 2 つのホモログと協同して働く可能性を示した。また、ホウ酸チャネル NIP7;1 がタペート細胞の細胞膜に局在し、花粉形成に寄与することを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1, Routray P, Li T, Yamasaki A, Yoshinari A, Takano J, Choi WG, Sams CE, and Roberts DM. Nodulin Intrinsic Protein 7;1 is a tapetal boric acid channel involved in pollen cell wall formation. *Plant Physiology* 2018 178(3):1269-1283. DOI:10.1104/pp.18.00604 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

1, 山崎 有紗・中村 俊介・石黒 澄衛・高野 順平
シロイヌナズナにおけるホウ酸チャネル特異的な ER-ゴルジカーゴレセプター候補タンパク質 SPOT1/KNS3 の解析
日本土壌肥料学会 神奈川大会 2018 年 8 月 29 日 口頭発表

2, 中村 俊介, ・竹村 駿介・石黒 澄衛・内藤 哲・高野 順平
SPOT1/KNS3 はホウ酸チャネルの ER exit に重要である
日本植物生理学会 鹿児島大会 2017 年 3 月 16-18 日 ポスター発表

〔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〕

ホームページ等

植物栽培生理学研究室ホームページ

<https://saibaiseirigaku.wixsite.com/crop-ecophysiology>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中村 俊介 (北海道大学大学院修士)

ローマ字氏名：Shunske Nakamura

研究協力者氏名：山崎 有紗 (大阪府立大学大学院修士)

ローマ字氏名：Arisa Yamasaki

研究協力者氏名：張 哲 (大阪府立大学大学院博士前期課程)

ローマ字氏名：Zhe Zhang

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。