

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005 年度～2008 年度

課題番号：17380047

研究課題名（和文）植物のモリブデン輸送の分子生理学的解析と応用

研究課題名（英文）Molecular physiological analysis and application of plant molybdate transport

研究代表者

氏名（アルファベット） 藤原 徹（FUJIWARA Toru）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・生物生産工学研究センター・准教授

研究者番号 80242163

研究成果の概要：

研究開始当時、植物の必須元素の一つ、モリブデンはトランスポーターの知られていない唯一の元素であった。本研究はシロイヌナズナの系統間の差を利用して、真核生物で初めてのモリブデントランスポーターを同定し、その活性、発現、生理学的役割について明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	3,300,000	0	3,300,000
平成 18 年度	3,700,000	0	3,700,000
平成 19 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
平成 20 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
総計	14,400,000	2,220,000	16,620,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 植物栄養学・土壌学

キーワード：トランスポーター、分子遺伝学、モリブデン

1. 研究開始当初の背景

モリブデンは植物の必須元素の一つであり、植物の要求量は極めて少ない。しかし、窒素代謝に重要な硝酸還元酵素等の補酵素であるモリブデンコファクターを構成しており、植物の窒素代謝やホルモンの合成などに必須な元素である。モリブデンは硫黄の同族元素であり、硫酸と同様、モリブデン酸として吸収される。生理学的にはリン酸や硫酸との競合を示唆する報告はあるものの、モリブデンを輸送する分子の報告は細菌ではなされていたものの、植物を含む真核生物では国内外を問わずなされていなかった。モリブデン欠乏は農業上の問題となることがあり、カリフラワー等では whiptail と呼ばれる葉

の奇形がモリブデン欠乏によって発生することが知られている。これらの問題を解決するためにも、モリブデンの吸収機構の解明が待たれていた。

本研究開始時点までに、私たちの研究グループは、ホウ素の輸送機構の研究を進めてきていたが、その研究の中から、実験によく用いられる植物であるシロイヌナズナの異なる系統(Col-0 と Ler と呼ばれる 2 種類の系統)間で、同じ条件で栽培しても葉のモリブデン濃度が数倍違っていることを見いだしていた。このような違いは遺伝的な違いであることが多く、研究環境が世界的に整備されているシロイヌナズナの系統間での違いが見つかったことは、この違いをもたらす原因遺伝子を同定することができる可能性が高

いことを意味している。

そこで、原因遺伝子がいくつどこに存在するかを明らかにする目的で、Col-0 と Ler を掛け合わせ、その後代の F₂ 世代の葉のモリブデン濃度を測定したところ、モリブデン濃度が高いグループと低いグループに 3 : 1 程度の比率で分離していることが明らかになった。Col-0 と Ler の中間的なモリブデン濃度を示す株は見られなかった。このことは、葉のモリブデン濃度が一つの遺伝子によって支配されていること、Ler 型（モリブデン濃度が低い型）が劣性であることを示している。原因遺伝子がどの染色体にあるかを明らかにするために、分子マーカーを調べたところ、原因遺伝子はシロイヌナズナの 5 本ある染色体のうち第 2 染色体上にあることを明らかにしていた。

シロイヌナズナの異なる系統間でのモリブデン濃度の違いは、世界的には米国のグループも見だしており、2003 年に発表された Nature Biotechnology の論文中に、Col-0 と Ler と呼ばれる 2 種類の系統間でのモリブデン含量が違っていることを示すデータが含まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、シロイヌナズナのモリブデントランスポーターの機能と制御、生理的な役割についての解析を進めることによって、植物におけるモリブデン輸送の分子機構を明らかにしようとするものである。また、シロイヌナズナや他の植物の相同遺伝子の機能や役割に関する研究を行うことによって、モリブデンの輸送の役割分担等を明らかにすることを目的としている。これらの研究は、モリブデンの輸送制御機構の解明につながり、より効率的にモリブデンを植物の必要とする部分へと供給したり、モリブデンを植物に蓄積させたりする技術につながるものと考えている。

3. 研究の方法

シロイヌナズナの系統間の違いを利用した葉のモリブデン濃度を制御する遺伝子の同定には、多数の F₂ 植物について、葉のモリブデン濃度を測定すると共に、Simple Sequence Length Polymorphism などの分子マーカーを用いて、遺伝子の染色体上の座乗位置を確定した。モリブデン濃度の測定は植物（または酵母）のサンプルを硝酸分解し、ICP-MS 装置を用いて定量した。

座乗位置が確定したら、その領域の配列情報を基に、原因遺伝子である可能性の高い遺伝子を選び出した。

その特定の遺伝子をコードする cDNA を

酵母で発現させ、酵母のモリブデン濃度を測定した。

また、その遺伝子と緑色蛍光タンパク質（GFP）の融合遺伝子を作成し、細胞内での同定された遺伝子産物の局在を GFP 蛍光を元にして推定した。

遺伝子発現の組織特異性を調べるために、遺伝子のプロモーター領域を大腸菌のグルクロニダーゼ（GUS）または GFP に連結し、シロイヌナズナに導入した。得られた形質転換植物での組織、細胞特異的な発現パターンを GUS 活性または GFP 蛍光を指標にして推定した。

相同遺伝子の解析についても、cDNA の酵母での発現、変異体の解析等、同様に進めていった。

4. 研究成果

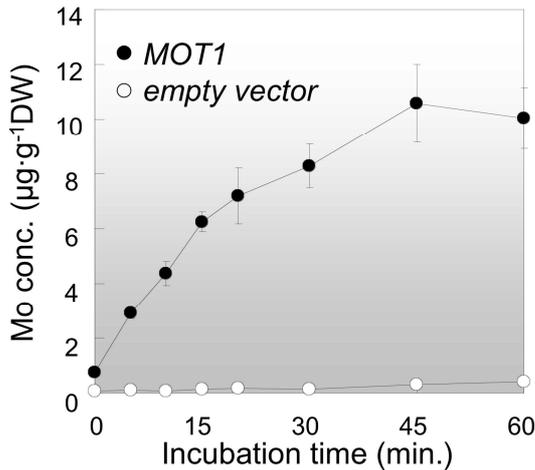
(1) シロイヌナズナのモリブデントランスポーターの同定と輸送活性

Col-0 と Ler の系統間での葉のモリブデン濃度を司る遺伝子の存在する領域を F₂ 植物の解析により、170kb 程度に限定することができた。この領域の配列を調べてみたところ、多くの遺伝子が存在していたが、その中に、当時硫酸トランスポーターの相同遺伝子であるとして *Sultr5;2* と名付けられた遺伝子が存在していた。この遺伝子は疎水性が高い領域が繰り返し現れる構造を持っており、膜タンパク質であることが想定されるものであったが、当時（現在も）この遺伝子産物が硫酸トランスポーターとして、硫酸を輸送する活性を持っているとの報告はされていなかった。

先に述べたようにモリブデンは硫黄の同族元素であり、硫黄が硫酸として主に吸収され、モリブデンがモリブデンとして吸収されることを考えると、モリブデン酸の輸送体が硫酸の輸送体に似ている可能性が大いに考えられたので、この遺伝子産物がモリブデン輸送活性を持っているかどうかを確かめることにした。Open Reading Frame を Polymerase Chain Reaction 法を用いてクローニングし、酵母用の発現ベクターに連結して、酵母に導入して発現させた。この酵母とベクターだけを導入した対照の酵母をモリブデンを加えない培地で培養し、モリブデンを与えてからの酵母細胞内のモリブデン濃度の変化を経時的に測定した。その結果を図 1 に示す。原因遺伝子を発現する酵母はしない酵母に比べて細胞内のモリブデン濃度が急速にかつ大幅に上昇することが確認された。これは、原因遺伝子の産物が、細胞外にあるモリブデンを細胞内に吸収する活性を持っていることを示唆している。

このことから、この原因遺伝子を *Molybdate transporter 1 (MOT1)* と命名した。MOT1 は真核生物で初めて同定されたモリブデントランスポーターであり、それまで知られていた細菌のモリブデントランスポーターとは異なるグループに属するトランスポーターである。

図1 原因遺伝子 MOT1 を発現する酵母のモリブデン



濃度を、モリブデンに暴露後、経時的に測定したものの、黒丸が MOT1 を発現する株、白丸が MOT1 を発現しない株。

この酵母での実験手法を用いて、培地のモリブデン濃度が吸収速度にどのような影響を与えるかを検討したところ、MOT1 はモリブデン酸に対する親和性が極めて高いことが明らかになった。MOT1 のモリブデン酸に対する Km 値は 20nM 程度であった。これまでに知られている無機栄養素のトランスポーターの中では最も基質親和性が高いトランスポーターである。この性質は、土壌にわずかしかが存在しないモリブデンを効率良く吸収するために役立っているものと考えられる。

(2) MOT1 の細胞内局在と発現

MOT1 の発現の組織特異性を明らかにするために、プロモーター領域を GUS および GFP に連結し、シロイヌナズナに導入して、発現の組織特異性を観察したところ、根にも葉にも発現が観察された。維管束やその周辺に特に強い発現が観察された。発現は培地のモリブデン濃度によっては大きな影響を受けなかった。

MOT1 mRNA の蓄積が培地のモリブデン濃度に影響を受けるかどうかを調べた。植物の無機栄養素のトランスポーターは環境中の基

質の濃度に応じて発現制御を受けていることが多い。MOT1 mRNA の蓄積は培地のモリブデン濃度によって大きく変化せず、硝酸トランスポーターやリン酸トランスポーター遺伝子で知られている強い誘導とは違い、MOT1 mRNA の蓄積は培地のモリブデンの濃度によって制御されていないことが明らかになった。

また MOT1 タンパク質が細胞内のどの部分に存在するのかを明らかにするために、MOT1 を GFP に連結し、タバコ培養細胞 BY 2 で発現させたところ、GFP 蛍光は細胞膜だけでなく細胞内にもドット状に観察された。(図 2) 細胞内局在については現時点では断定的なことは言えないが、最近、MOT1 がミトコンドリアに局在することを主張するグループもある。

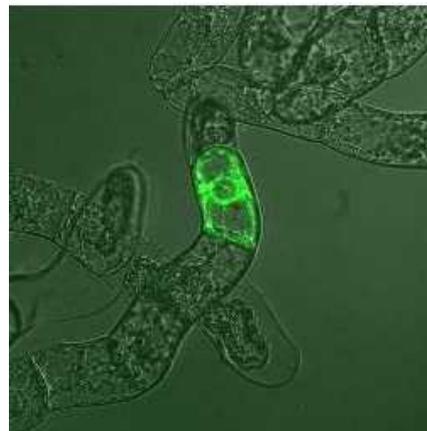


図2 MOT1 と GFP の融合タンパク質を発現するタバコ培養細胞 BY-2 蛍光像と明視野像を重ねた写真である。

(3) MOT1 の生理的な役割

MOT1 遺伝子に変異を持つシロイヌナズナ変異株は野生型植物に比べて根においても葉においてもモリブデン濃度が低かった。MOT1 は植物個体全体としてのモリブデンの取込み(つまり根へのモリブデンの取込み)に重要な役割を担っていることが推測された。

実験条件によっては、MOT1 遺伝子に変異を持つシロイヌナズナの葉のモリブデン濃度は野生型植物の 10%程度しかなかったことから、MOT1 はシロイヌナズナのモリブデン吸収の大部分を担っていることが示唆された。

また、MOT1 遺伝子に変異を持つシロイヌナズナ変異株をモリブデンを加えない培地で栽培したところ、野生型植物は通常条件と同様の生育を示したが、変異株は生育が極端に悪くなった(図 3)ことから、MOT1 はモリブデン濃度が低い条件では、シロイヌナズナの正常な生育に必須なタンパク質であることが分かった。



図3 野生型(左)と *MOT1* 遺伝子に変異を持つシロイヌナズナ変異株(右)をモリブデンを加えない培地で栽培した。

(4) *MOT1* の相同遺伝子の解析

シロイヌナズナには *MOT1* に似た遺伝子が一つ存在している。この遺伝子は以前 *Sultr5;1* と呼ばれていた遺伝子で、配列の類似性からモリブデン輸送への関与が考えられたので、この遺伝子 (*MOT2* と呼ぶ) についての解析を行った。

MOT2 を酵母で発現させると、酵母のモリブデン濃度を高める傾向が認められたが、*MOT1* を発現させた酵母に比べてモリブデン濃度の上昇はわずかであった。*MOT2* もモリブデン輸送活性を持っていると思われるが、酵母においては、細胞内局在が異常になったりすることで活性が弱くしか見られないのかもしれない。

MOT2 に変異を持つ変異株は野生型株に比べて根のモリブデン濃度が高い傾向が認められた。また、*MOT2* を GFP と融合して発現させると、液胞膜に局在していることを示唆する結果が得られた。*MOT2* は植物個体レベルで見ると根から地上部へのモリブデン輸送に関与しているように見えるものの、液胞に局在していること、酵母で発現させると *MOT1* ほど強くは無いものの、細胞内の濃度を高めることから、モリブデンを集積させる能力があることになる。

これらの結果は、一見矛盾しているようにも見える。すなわち、仮に *MOT2* が液胞膜に存在しており液胞内にモリブデンを蓄積する役割があるのだとすれば、*MOT2* に変異を持つ変異株は野生型株に比べて根のモリブデン濃度が低くなるはずであるが、実際には高くなっている。

おそらく、*MOT2* の役割を矛盾無く示すためには、活性についてのより詳しい解析や *MOT1* との相互関係についての解析などを行う必要があるのではないかと考えている。

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)

Tomatsu, H., Takano, J., Takahashi, H., Watanabe-Takahashi A., Shibagaki, N., Fujiwara, T. An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 18807–18812 (2007) 査読あり

[学会発表](計9件)

戸松 創、藤原 徹 「シロイヌナズナのモリブデン輸送体 (*MOT1*) の機能解析」日本土壤肥料学会 2006 年度年次大会 2006/9/5 (秋田)

戸松 創、藤原 徹 「シロイヌナズナ モリブドントランスポーター *MOT2* の機能解析」第 48 回 日本植物生理学会年会 2007/3/28 (松山)

戸松 創、藤原 徹 「シロイヌナズナ モリブドントランスポーター *MOT2* の機能解析」第 2 回トランスポーター研究会 2007/6/9 (東京)

三輪大樹、戸松 創、佐藤修正、田畑 哲、藤原 徹 「ミヤコグサ モリブドントランスポーターの機能解析」第 2 回トランスポーター研究会 2007/6/9 (東京)

Ide Y, Kusano M, Fukushima A, Tomatsu H, Saito K, Hirai MY, Fujiwara T. “Transcriptome and metabolome analysis of molybdenum deficiency in *Arabidopsis thaliana*” Nitrogen 2007 2007/7/27 (Lancaster, UK)

戸松 創、高野順平、高橋秀樹、高橋(渡部)晶子、柴垣奈佳子、藤原 徹 「植物におけるトランスポーターを介したモリブデン酸の輸送」トランスポーター研究会：第 1 回関東部会 2007/12/10 (東京)

戸松 創、藤原 徹 「シロイヌナズナのモリブデン輸送における *MOT2* の役割 - *MOT1* との比較」日本土壤肥料学会 2008/9/9 (名古屋)

笠井光治、戸松 創、藤原 徹 「プロテオリポソームを用いたシロイヌナズナのモリブデン酸トランスポーターの機能解析」BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第

81 回日本生化学会大会 合同大会)
2008/12/11 (神戸)

井出曜子、及川彰、草野都、福島敦史、遠藤亮、南原英司、斉藤和季、平井優美、藤原 徹
「シロイヌナズナのもリブデン欠乏応答のメタボローム、トランスクリプトーム解析」
第50回日本植物生理学会年会 2009/3/21
(名古屋)

〔図書〕(計 2件)

Tomatsu T, Fujiwara T. Molybdenum transport and its involvement in nitrogen assimilation
In NITROGEN ASSIMILATION IN PLANTS. Ohyama T and Sueyoshi K. eds. In press. 査読あり

Tomatsu H, Takano J, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T. QTL analysis on leaf Mo concentration in *Arabidopsis thaliana*.
in Plant nutrition for food security, human health and environmental protection. C.J. Li et al. (Eds) Kluwer Academic pp164 -165 (2005) 査読あり

〔産業財産権〕
出願状況(計 2件)

名称:「モリブデントランスポーター及びその遺伝子」
発明者:藤原 徹、高野順平、戸松 創
出願人:独立行政法人科学技術振興機構
種類:特許
番号:特願 2005-071991
出願年月日:H17.3.14 出願
国内外の別:国内

名称:「モリブデントランスポーター及びその遺伝子」
発明者:藤原 徹、高野順平、戸松創
出願人:独立行政法人科学技術振興機構
種類:特許
番号:PCT/JP2006/305061
出願年月日:H18.3.14 出願
国内外の別:国際出願

〔その他〕

モリブデントランスポーターの発見は記者会見で発表し、科学新聞等に掲載された。また、東京大学農学部ホームページにトピックとして掲載された。

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 徹 (FUJIWARA TORU)

東京大学・生物生産工学研究センター・准教授

研究者番号:80242163

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし