

平成23年 5月20日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19370018  
 研究課題名 (和文) 葉組織における無機栄養分配・転流機構の解析  
 研究課題名 (英文) Studies on the mechanism of ion distribution and re-translocation in plant tissues.

研究代表者  
 三村 徹郎 (MIMURA TETSURO)  
 神戸大学・大学院理学研究科・教授  
 研究者番号：20174120

研究成果の概要(和文):植物が細胞や組織において示す低分子量物質の環境維持機構について、特にリン酸イオンに焦点を置き、外部リン酸環境と根の根系構築の關係にリンと鉄が協調的に機能すること、植物体内でのリン酸転流を支える細胞膜リン酸輸送体の組織分布、木本植物における落葉時のリン酸転流現象、種子に蓄積されるイノシトールリン酸の生合成過程に働く酵素類の細胞内、細胞間分布について明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Molecular mechanisms of homeostasis of low molecular weight substances were studied in plant cells and tissues. We have focused on the phosphate homeostasis using Arabidopsis plants and cells, or Poplar tree. First we clarified a relationship between root architecture and environmental phosphate status. We found cooperative roles of phosphate and iron are quite important. Second, we analyzed the re-translocation system of phosphate from older leaves to younger leaves of Arabidopsis based on the gene expression. Further, we observed phosphate recovery of poplar leaves during late summer and autumn. Last, we analyzed cell and tissue metabolism of inositol phosphates during seed development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,300,000円	1,590,000円	6,890,000円
2008年度	4,200,000円	1,260,000円	5,460,000円
2009年度	4,200,000円	1,260,000円	5,460,000円
総計	13,700,000円	4,110,000円	17,810,000円

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：葉、維管束、生体膜輸送系、無機栄養塩、イオンホメオスタシス、リン酸、シロイヌナズナ、転流

## 1. 研究開始当初の背景

植物の生育において、無機イオンや代謝物質など低分子量物質の濃度・分布は、植物体内で生じるあらゆる生理反応の基盤的要素である。植物は、この細胞内低分子環境を安定的に維持するために様々な機能を持っている。土壌から必要な栄養塩を吸収し、維管束（主に道管）を通じて各組織へ分配してい

く。また、生体内に取り込まれた栄養塩の一部は、老化組織から若年組織へとやはり維管束（主に篩管）を通じて転流していく。各細胞における細胞膜やオルガネラの膜輸送系が、これらの機能に重要な働きをすることが知られていた。一方、その分子・生理機構に比べて実際に維管束に栄養塩がどのように取り込まれていき、維管束を通じて流れてき

た栄養塩が、各細胞にどのように分配されていくかの分子レベルの機構はほとんど理解されていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、植物体地下部から地上部、及び地上部における栄養塩（特にリン酸イオンを中心とした）利用能としての維管束分配と転流、さらには代謝過程との関わり合いについて、分配・転流に関与する分子機構を栄養塩の環境解析、膜輸送能、細胞間輸送機構に基づいて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、主にモデル植物として知られるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の植物体と培養細胞、また木本植物のモデル系として知られるポプラ (*Populus alba*) を用いた。

シロイヌナズナは、ゲノム構造が明らかになっており、通常の分子生物学的解析に使用した。植物体から維管束系細胞を生きのまま単離する技術を確認し、物質輸送や集積機構の解析を進めた。イオン輸送系に関与する遺伝子の発現解析を行うとともに、タンパク質の組織、細胞内分布をGFP融合タンパク質や蛍光抗体を用いた顕微鏡観察を行った。

低分子化合物の分析には、イオンクロマトグラム、蛍光標識物質などを使用した。

## 4. 研究成果

本研究は、細胞内で営まれる生理機能の基盤的要素である細胞内低分子環境の維持に重要な過程のうち、リン酸吸収に働く根系構築の調節過程、根からシュートへのリン酸分配に働く維管束系の機能分化、木本植物におけるリン酸転流過程、次世代に持ち越されるリン酸化合物としてのイノシトールリン酸代謝を明らかにすることで、植物の低分子環境制御の分子機構の全体像を、リン酸を中心に描き出すことを目的とし、以下の成果を得た。

### 1. 外部リン酸環境に応じた根系構築の応答機構と地上部への転流能

シロイヌナズナのリン酸欠乏に対する根系構造の変化を検討し、リンと鉄の沈殿、鉄の酸化状態が根系構築の重要な要因であることを見出した。低リン酸条件下において、鉄濃度の低下に伴って主根伸長抑制、側根数増加といったリン酸欠乏様の根系変化がより顕著に観察された（図1）。根系のリン酸取り込み能は、鉄濃度の変化により大きな影響はみられなかった。放射性同位体を用いたリン酸吸収の空間的解析では、根系構造変化に伴ってリン酸吸収パターンが変化した。これらの結果から、植物はリン酸と鉄を同時に

感知し、リン酸吸収を一定に保つために、根系構造や生理活性を制御している可能性が示唆された。またオーキシンによる側根形成が異常になった変異体を用いた実験から、リン酸/鉄による根系変化にはオーキシンシグナルが関わっている可能性が示唆された。

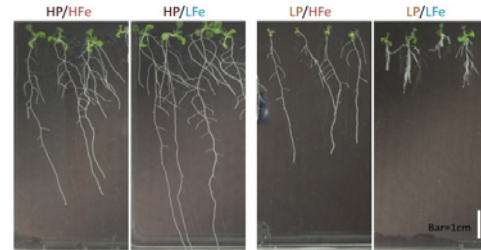


図1: リン酸環境変化 (HP, LP) に伴う根系構築の変化に対する鉄 (HFe, LFe) の影響。

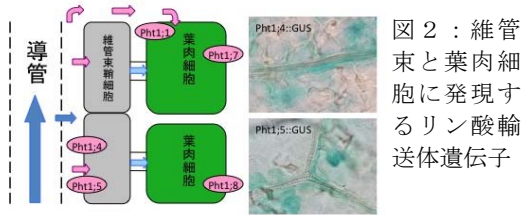
### 2. シュート維管束系を通じたリン酸輸送と、リン酸分配機構

植物が生命を維持するためには、根から取り込んだ栄養塩の、道管を通じた植物体全体への分配が必須である。本研究では葉組織における、道管から葉肉細胞への物質輸送メカニズムの詳細を明らかにするために、まず、生体膜不透過性の蛍光色素である BCECF が、ある実験条件下では細胞内に取り込まれることを利用して、維管束組織および葉肉細胞が異なる物質輸送活性をもつことを明らかにした。次に、維管束組織と葉肉細胞のもつ個々の機能を解析するために、維管束組織および葉肉細胞を生きのまま単離する方法を確認し、単離葉肉細胞および単離維管束組織のマイクロアレイ解析を行い、それぞれの組織で異なる輸送系遺伝子が働いていることを明らかにした。

道管から葉肉細胞へ分配される栄養塩のうち、単離した葉肉細胞におけるリン酸吸収活性の測定により、リン酸欠乏条件下におかれた個体の若い葉のみが葉肉細胞に弱いリン酸吸収活性を持つが、その他の条件では葉肉細胞は、ほとんどリン酸を吸収しなかった。また、細胞膜型リン酸輸送体である *Ph1* の遺伝子発現解析を行った結果、生育条件のリン酸濃度にかかわらず、維管束組織ではリン酸輸送体の遺伝子発現が高く、リン酸欠乏条件下では葉肉細胞でいくつかの輸送体の遺伝子発現上昇がみられた。

これらの実験結果から、道管が運んで来たリン酸イオンが葉肉細胞に分配される過程において、植物体に十分なリン酸が与えられている時には、道管で運ばれてきたリン酸イオンの大半は道管近傍の維管束組織で吸収され、葉肉細胞へは、原形質連絡を介したシンプラストを通じて運ばれるが、リン酸が欠乏すると、葉肉細胞もリン酸吸収活性を上

昇させ、シンプラスト輸送に加え、細胞膜周囲のアポプラストを経由した取り込みを行うことが示唆された (図2)。



### 3. 木本植物の落葉時におけるリン酸回収機構

これまでの研究で、シロイヌナズナのような草本植物葉組織において生じるリン酸転流の過程で発現する遺伝子群を明らかにしてきた。また、それらの遺伝子のいくつかに変異を起こすと転流過程に影響が生じることも明らかにしている。一方、木本植物でも同じような転流が生じるかどうかについては、その詳細は明らかにはなっていない。

本研究では草本植物としてシロイヌナズナに加えて、木本植物としてゲノムの解明されている落葉樹のポプラを実験材料として、草本植物と木本植物のリン酸の分配・転流機構の比較、解析を進めた。

シロイヌナズナを、+P、1/50P の異なるリン酸濃度条件下で生育させると、1/50P 培地で生育した個体では葉年齢の古い葉でリン酸含有量が減少するとともに新しい葉で増加する成長に伴う転流現象が確認できた。

これまで木本植物では落葉の際に、葉に含まれていた窒素やリンを回収することが知られている。そこで、ポプラの一年間の葉の生重量とリン酸濃度、リン酸含有量を測定したところ、8月から9月と葉が黄色に変色する10月から11月にかけて一枚の葉あたりの無機リン酸の大幅な減少が見られ、11月には無機リン酸・有機リン酸ともに測定開始時の5月に比べ、リン酸含有量が約50%以上減少することが明らかになった (図3)。

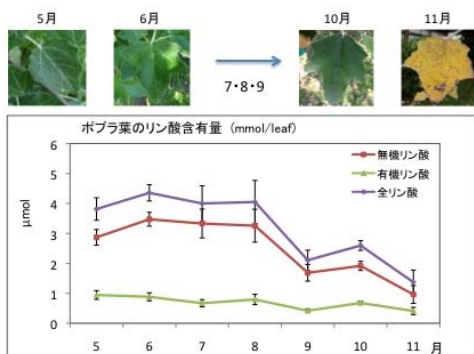


図3：ポプラ葉のリン酸含有量の通年変化

### 4. イノシトールリン酸代謝とイノシトールリン酸化合物の液胞への蓄積機構

植物体内を転流したリン酸は、最終的に種子にイノシトール-6-リン酸 (IP6) として蓄えられ、次世代に受け継がれる。我々は、これまで種子形成時しか出来なかった IPn の生合成の研究について、培養細胞に IP6 を蓄積させる実験系を確立し、同時に、細胞内の多様な IPn をイオンクロマトグラムを用いて網羅的に測定する非 RI 測定系を、初めて確立することに成功してきた。そこで、既に知られている IPn 合成系酵素に網羅的に GFP を結合し、細胞内での発現部位の確認をすすめ、IPn の合成は細胞質基質で行われ、液胞に運び込まれることを推定した (図4)。

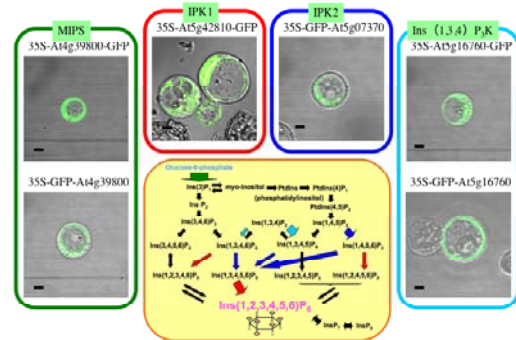


図4：IP6合成系と主要酵素の細胞内分布

また、シロイヌナズナの種子形成時の IP6 貯蔵過程において、IP6 合成代謝系の調節酵素として知られる MIPS

(*myo*-inositol-1-phosphate synthase) は主に胚乳で発現し、IP6 が貯蔵される胚とは異なる組織分布をすることを見出した。IP6 の生合成には、細胞間相互作用が重要な役割を果たしている可能性が示唆された (図5)。

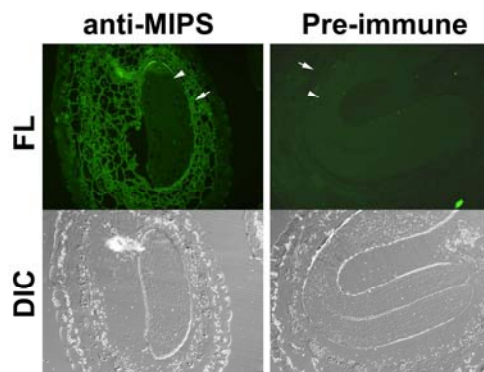


図5：蛍光抗体で測定したシロイヌナズナ種子の MIPS 分布

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕  
原著論文 (総論文数 10 編)

1. Kuwano, M., Mimura, T., Takaiwa, F., Yoshida, K.T. (2009) Generation of stable "low phytic acid" transgenic rice through antisense repression of the 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase gene using 18-kDa oleosin promoter. *Plant Biotechnology J.* 7(1): 96-105. 査読有
2. Mano, S., Miwa, T., Nishikawa, S., Mimura, T. and Nishimura, M. (2009) Seeing Is Believing: On the Use of Image Databases for Visually Exploring Plant Organelle Dynamics. *Plant Cell Physiol.* 50: 2000-2014. 査読有
3. Hamaji, K., Nagira, M., Yoshida, K., Ohnishi, M., Oda, Y., Uemura, T., Goh, T., Sato, M.-H., Terao-Morita, M., Tasaka, M., Hasezawa, S., Nakano, A., Hara-Nishimura, I., Maeshima, M., Fukaki, H. and Mimura, T. (2009) Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50: 2023-2033. 査読有
4. Mitsuhashi, N., Kondo, M., Nakaune, S., Ohnishi, M., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I., Richardson, A., Fukaki, H., Nishimura, M. and Mimura, T. (2008) Localization of *myo-inositol-1-phosphate synthase* to the endosperm in developing seeds of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 59: 3069-3076. 査読有
5. Uehara, T., Okushima, Y., Mimura, T., Tasaka, M. and Fukaki, H. (2008) Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 49: 1025-1083. 査読有
6. Kawachi, M., Kobae, Y., Mimura, T. and Maeshima, M. (2008) Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar  $Zn^{2+}/H^{+}$  antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *J. Biol. Chem.* 283: 8374-8383. 査読有
7. Yoshida, K., Ohtani, A., Mimura, T., Shimmen, T. (2008) Osmoregulation coupled with change of growth mode in *Spirogyra*. *Functional Plant Biology* 35: 580-584. 査読有
8. Ohnishi, M., Mimura, T., Tsujimura, T., Mitsuhashi, M., Washitani-Nemoto, S., Maeshima, M. and Martinoia, E. (2007) Inorganic phosphate uptake in intact vacuoles isolated from suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don under varying Pi status. *Planta* 225: 711-718. 査読有

#### 英文総説

1. Mimura, T., Ohnishi, M., Shimaoka, T., Tomizawa, K. (2008) Proteome analysis of vacuolar membrane. In "Plant Genetic Engineering vol 9: Plant membrane and vacuolar transporters", Ed. by Jaiwal PK. 査読有、pp. 301-343, CABInternational

#### 和文総説

1. 三村徹郎、大西美輪、深城英弘 (2007) リン環境と植物 「植物における環境と生物ストレスに対する応答」、蛋白質核酸酵素-別冊 52:625-632、共立出版

#### 〔学会発表〕

国際会議 (招待講演 2 件、一般発表 16 件)

1. Mimura T.: Metabolome researches in plant metabolic regulation. 21st International Conference on Arabidopsis Research (June 6 - 10, 2010, Yokohama Japan)
2. Mimura T.: Post genome analysis of vacuolar function and control of plant metabolism. 5th International Conference on Plant Metabolomics, Yokohama, July 15-18, 2008.

国内会議 (招待講演 2 件、一般発表 66 件)

1. 大西美輪、吉田勝久、三村徹郎: プロテオミクスによる液胞機能の解析、「植物科学におけるプロテオミクス」、第 51 回日本植物生理学会年会 (熊本 2010 年 3 月 18 日-21 日)
2. 三村徹郎: 植物体内におけるリンの取り込み、分配、蓄積の生理学、「植物はどうやってリンを見つけて、運んで、利用するか」、第 51 回日本植物生理学会年会 (熊本 2010 年 3 月 18 日-21 日)
3. 三村徹郎、姉川彩、大西美輪: ポストゲノム解析から見えてきた植物細胞代謝における新しい液胞像、植物化学シンポジウム (神戸 2009 年 12 月 17 日)
4. 三村徹郎: 植物液胞のポストゲノム解析、第 4 回メタボロームシンポジウム、横浜、2009 年 11 月 18-19 日
5. 三村徹郎: 液胞膜エンジニアリングによる植物代謝システム制御、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第 2 回公開シンポジウム (東京 (日本科学未来館) 2009 年 10 月 16 日)

#### 〔図書〕 (計 3 件)

1. 西村幹夫・三村徹郎・西村いくこ・真野昌二 監修、永野惇・桧垣匠 文 (2010)

「Photobook 植物細胞の知られざる世界」  
化学同人

2. 三村徹郎 (2009) 「基礎生物学シリーズ7  
植物生理学」、(三村徹郎、鶴見誠二編)、化  
学同人
3. 三村徹郎 村上明男 (2009) 「水環境の今  
と未来 藻類と植物のできること」(川井浩  
史、三村徹郎 編) 生物研究社 「3.  
水生植物の生理 35-50 ページ」

[その他]

ホームページ等

研究代表者 三村徹郎

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-mimura/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三村 徹郎 (MIMURA TETSURO)

神戸大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20174120