

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究(研究課題)

研究期間：2008～2010

課題番号：20200031

研究課題名（和文）

膜輸送体候補遺伝子の総当たり過剰発現解析による新しい元素膜輸送の発見

研究課題名（英文）

Whole genome screening of plant membrane transporter for inorganic elements.

研究代表者

中西 洋一 (Nakanishi Yoichi)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：60362290

研究成果の概要（和文）：

植物細胞には宇宙を構成するほぼ全ての元素が含まれるが、それらを外界と細胞内で出し入れする膜輸送体の実体は不明なものが多い。一方、モデル植物シロイヌナズナのゲノムには膜輸送体をコードすると予想される遺伝子が約 1,400 存在するが、それらの多くは機能不明である。

我々は新たな膜輸送体を発見する手段として、候補遺伝子の総当たり発現解析が有効と考え、候補遺伝子のクローニングと発現解析系の確立を進めた。結果的に、全ゲノムの 98% にあたる 1,380 種類の候補遺伝子のクローン化ライブラリを完成させた。また、候補遺伝子を絞った発現機能スクリーニングが膜輸送体発見の強力な手段になりうることも検証した。中間段階で試験的に作出した酵母発現ライブラリ、植物発現ライブラリを重金属耐性より重金属元素 (Mn, Ni, Zn, Cd) 耐性に関わる新規の候補分子 5 種を見出している。また、生物を生かしたまま、特定の元素 (Mo) や、広範な元素 (遷移元素) の量の変化を見積もるための技術開発を進めた。

研究成果の概要（英文）：

Plant cells contain all elements of the universe. Transporters that import/export inorganic elements have been poorly identified yet. In Arabidopsis genome, about 1,400 transporter-related genes were found in silico, of which function is almost unknown.

To overcome whole genome screening from possible candidates, we constructed an expression library consisted of the transporter gene(s). We cloned 1,380 genes (98% of candidates). Expression screening by use of the library has been shown to be powerful tool for identification of novel transporters. We screened five candidate genes that posed tolerance of heavy metal elements (Mn, Ni, Zn, Cd) to host organisms. We also developed research tools that can analyze level(s) of element(s) in living organisms.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2008 年度 | 8,400,000 | 2,520,000 | 10,920,000 |
| 2009 年度 | 7,900,000 | 2,370,000 | 10,270,000 |
| 2010 年度 | 7,900,000 | 2,370,000 | 10,270,000 |
| 総計 | 24,200,000 | 7,260,000 | 31,460,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・ゲノム科学、機能生物科学・応用ゲノム科学

キーワード：膜輸送と輸送タンパク質、機能ゲノミクス、微量元素

1. 研究開始当初の背景

最新の元素分析技術の成果として、原口紘きが提唱した「拡張元素普存説」によると、生物には宇宙を構成する100以上の元素がすべて含まれるという(原口2000, 現代化学)。事実、生物の生命維持に欠くことのできない必須元素約20種にくわえて、必須ではないが有益な元素、用途・効果が分からない元素、有害な元素までもが生体内に含まれている(図1上)。

では、生物はどのようにして元素を外界から吸収し、生体内で利用しているのだろうか。細胞レベルのマイクロ世界では、細胞の内・外環境ともに水環境であり、多くの元素は電荷や極性を持った化合物、分子種として水に溶けて存在する。ところが、細胞を取り囲む生体膜は疎水性であり、荷電性・極性物質は基本的に通さない。このため、生物は溶質の吸収・排出に特別なタンパク質である膜輸送体を通して、生体膜を経由した物質輸送(生体膜輸送)を行っている。したがって、細胞内に全ての元素が存在するならば、これに対応する何らかの膜輸送体が存在すると考えられる(図1下)。

植物は無機栄養だけで生育できるため、元素の生体膜輸送の研究モデルとして優れている。実際、元素輸送体の研究に、我が国の植物研究者は大きく貢献しており、ホウ素(B)の膜輸送体(Takano 2002, Nature)、ケイ素(Si)の膜輸送体(Ma 2006, Nature, 2007, Nature)、モリブデン(Mo)の膜輸送体(Tomatsu 2007, PNAS USA)は、植物の研究で発見された。しかし、元素一つ一つに対する輸送体の研究を個別に進める従来の方法では、全般的な元素輸送の解明は遠い。また、遺伝子の重複により、遺伝学的解析が困難な例も予想される。

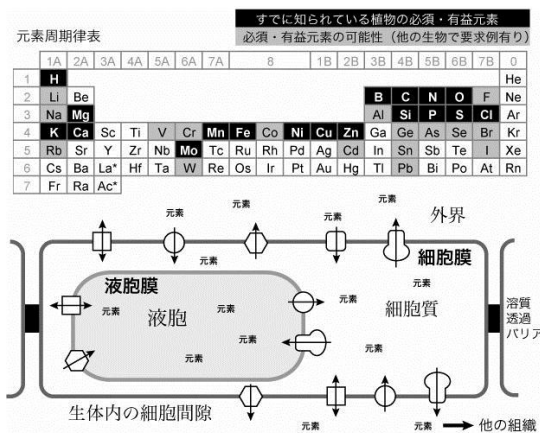


図1 植物細胞における元素の膜輸送

2. 研究の目的

そこで発想を転換し、膜輸送機能ゲノミクスによる問題解決、すなわち全ての膜輸送体候補遺伝子について、元素種にこだわらず何でも良いので、膜輸送との関連性を調べ上げることを大目標にすえ、そのために必要な実験材料の開発と方法論の確立を目指した。

本研究では、タンパク質一次構造中に疎水性領域を6個以上もつ分子を全て膜輸送体(候補分子)と仮定した。膜輸送機能ゲノミクスでは、先行事例にとらわれず全く新規の分子も解析対象とする点が重要であるためである。

モデル植物シロイヌナズナのゲノムには、こうした特徴を持つタンパク質をコードする膜輸送体候補遺伝子が約1,400種存在する(図2)。その一部は既に分子機能が確定しているが、多くは輸送基質が不明である。これらを総当たり式もしくは飽和試験によりもれなく調べることで、新たな元素膜輸送体を発見することを目的とした。

そこで、上記の約1400種のシロイヌナズナ遺伝子を全て含む膜輸送体候補限定遺伝子ライブラリの整備を第一の目標とした。

次いで、限定ライブラリをモデル宿主で発現させて、総当たり発現試験や飽和スクリーニング試験を実際に行い、本研究が提案する方法論が新規膜輸送体の探索に有効であるか検証した。

さらに、研究を展開するには、生きた生物・細胞で元素量を評価する必要があることから、バイオプローブ分子の開発やイメージ解析法も検討した。

シロイヌナズナには膜輸送体の候補遺伝子が1,400個ある

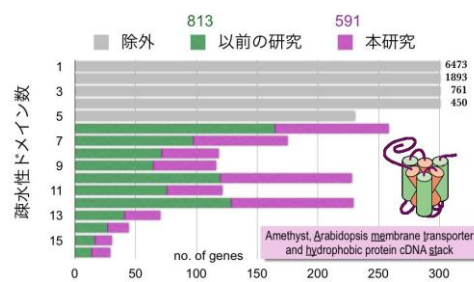


図2 シロイヌナズナの膜輸送体候補遺伝子

3. 研究の方法

研究開始時点で、約1,400種類の候補遺伝子のうち約800種類はクローン化されていた。本研究では残りの600種類の遺伝子について個別クローニングを行った。各種組織RNA

より逆転写 polymerase chain reaction (PCR) 法で目的遺伝子を増幅し、ベクターに挿入、配列を確認した。

試作段階の遺伝子ライブラリをもとに、ベクターを組み換え、各種モデル宿主での過剰発現ベクター群を作製した。すなわち、パン酵母、植物、動物細胞の発現ベクターを部分的に作出した。これらを用いて、形質転換酵母、形質転換シロイヌナズナ、形質転換動物細胞を作出した。

総当たり試験の例として、動物細胞で候補分子を並列的に発現させ、モリブデン(Mo)バイオプローブの蛍光を指標にして、Mo 輸送体の選抜を行った。飽和スクリーニング試験の例として、形質転換酵母ライブラリの高濃度亜鉛 (Zn) 培地での生育試験、形質転換シロイヌナズナライブラリの混合重金属 (Mn, Ni, Zn, Cd) 培地での生育試験を行った。

モリブデン(Mo)バイオプローブの CFP 部分をウミシイタケルシフェラーゼに改変し、発光型モリブデンセンサーを開発した。また、生きた植物でアントシアニンの発色を他の色素と分けて分光イメージ化する装置を開発した。

4. 研究成果

膜輸送体遺伝子ライブラリの作製

研究基盤となる膜輸送体候補遺伝子の収集を進め、最終的にシロイヌナズナゲノムにある 1,404 遺伝子のうち 1,380 遺伝子(98%)をクローニングした。

イオンチャネルなど、特定の膜輸送体は生化学的な代謝回転数が高い一方、細胞内での発現量が少ない傾向がある。また、特異な器官でのみ発現する遺伝子も少なくない。本研究でクローニングを試みた 591 種のシロイヌナズナ遺伝子も、理化学研究所が保有する約 50 万の cDNA クローン群の中に存在せず、微量遺伝子にあたると思った。そこで各種組織、器官の混合全 RNA より逆転写 PCR 法で目的 cDNA を増幅した。結果、ごく一部を除き、ほぼ全ての目的遺伝子の DNA 断片が増幅された。

次に、大腸菌を一次宿主として DNA 断片をクローニングした。約 60% の遺伝子は通常の方法で問題なくできたが、残りの遺伝子でエラークローンとしてしかクローニングできないという問題が生じた。すなわち、フレームシフト変異や終止コドン変異、よく保存されたアミノ酸コドンへのミスセンス変異などである。

一般に、膜タンパク質遺伝子のクローニングは困難で、エラークローンが生じやすいとされる。膜タンパク質の全長産物もしくは部分長産物が、大腸菌内で合成されると有害性を示す場合があり、結果的にエラークローン

が選択されるためである。

本研究では、通常の方法でクローニングが困難な 250 遺伝子について、複数の方法を組み合わせ対処した。すなわち、(1) 発現ベクターへの直接クローニングや、(2) 低コピー数ベクターの採用、(3) アミノ酸配列に影響しないサイレント変異クローンの採用などである。また真核生物での過剰発現解析を目指したクローン化であるため、(4) cDNA の代わりにイントロンを含むゲノム DNA、(5) cDNA とゲノム DNA のハイブリッドも許容した。

技術的に困難な面が多く、予想をはるかに上回る時間とマンパワーを費やし、全体の進捗の制限要因となったが、本研究で作出したライブラリは今後の植物膜輸送研究を進める上で貴重な資産として、活用・公開してゆきたい。

総当たりによるモリブデン輸送体の探索

試験的に作出した動物細胞発現ライブラリ(約 900 遺伝子)を用いて、モリブデン(Mo)輸送体を探索した。

モリブデン(Mo)は生物共通の必須元素であるにも関わらず、膜輸送体の解明があまり進んでいない元素である。本研究では、過剰発現により宿主動物細胞の Mo 濃度を変化させる輸送体遺伝子を総当たり式に探索した。

具体的には、動物細胞 HEK293T に、研究グループが独自に開発した蛍光バイオプローブ(MolyProbe)と植物膜輸送体全ての組み合わせで co-transfection した。蛍光プローブで細胞内 Mo 濃度をモニターして、タイムコースを変化させるエフェクター遺伝子を探索した(図3)。

Use of sensor protein to test molybdate transport activity of Amethyst

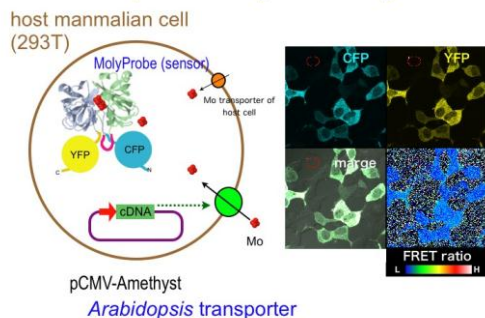


図3 モリブデン輸送体の探索

その結果、(1) 細胞外からモリブデンを吸収し、細胞質の Mo 濃度を上昇させる膜輸送体、(2) 逆に細胞内から Mo を排出して結果的に細胞質 Mo 濃度を下げる機能をもつ輸送体、(3) 細胞内オルガネラに Mo を運び、容量が一杯になるまでの間、細胞質 Mo 濃度を下げる輸送体の候補が見出された。

飽和スクリーニングによる重金属輸送体の探索

1,400種の膜輸送体遺伝子をほぼ均一に含む発現ライブラリの別の使い道として膜輸送体の飽和スクリーニングも有力である。

すなわち、通常の遺伝子スクリーニングでは、個別の遺伝子の構成比がバラバラで、場合によっては存在しない場合もあるため、理論上、飽和スクリーニングには無限の試行を要する。一方、1,400は多いとはいえ有限数であるため、X%飽和スクリーニングに必要な試行数Yをポワソン分布より推定できるからである。

前述の理由で、完全なライブラリの整備が間に合わなかったため、本研究では試験的に作出した酵母発現株ライブラリ(約900種)、シロイヌナズナ発現株ライブラリ(200種)の飽和スクリーニングを行い、重金属遷移元素であるマンガン(Mn)、ニッケル(Ni)、亜鉛(Zn)、カドミウム(Cd)の毒性を緩和する膜輸送体を検索した。

その結果、発現酵母株の亜鉛耐性を強化する遺伝子として、従来の知見では予想されていなかったアミノ酸輸送体ホモログの探索に成功した(図4)。

完全均一化ライブラリを用いた 重金属ストレス関連膜輸送体の探索

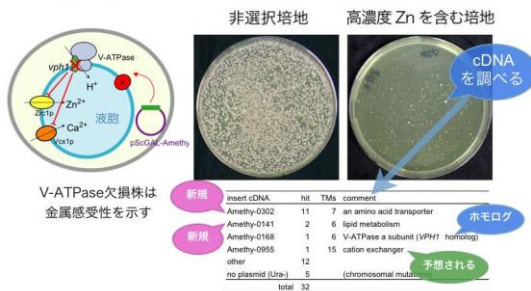


図4 亜鉛耐性を強化する酵母発現株の選抜

また、シロイヌナズナ過剰発現株ライブラリを重金属耐性試験で評価することにより、わずか200株の母集団からマンガン耐性の強化された膜輸送体発現株1株を単離した。同様に、ニッケル、カドミウム耐性の強化された膜輸送体発現株3株を単離することに成功した(図5)。ニッケル、カドミウム耐性株のうち1種はCAX型輸送体過剰発現株であり、従来の知見から機能を予測しうるのであったが、他は新規の分子群である(図6)。

以上の結果から、限定ライブラリの飽和スクリーニングが新規輸送体発見において強力な手段であることが確認できた。また植物の、重金属耐性システムの多様さを明らかにすることが出来た。

Screening of metal-tolerant lines

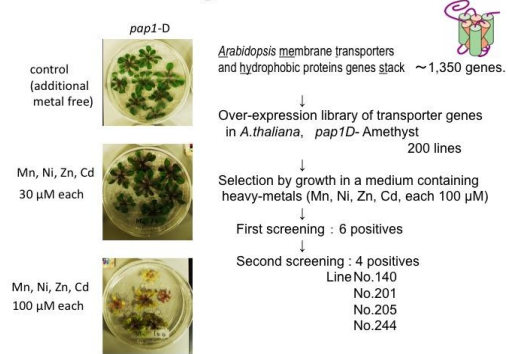


図5 植物過剰発現株ライブラリの作出と重金属耐性株の選抜

Summary and Proposal

- We obtained four transporter over-expressed lines of which metal tolerance are improved.
No.140 is resistant to Mn.
No.201, 205, 244 are resistant to Ni and Cd.
- Some transporter genes are induced by metal stress.
Mn induce M140, whereas Cd induce M140 & M244.

Functions of the transporters are ...

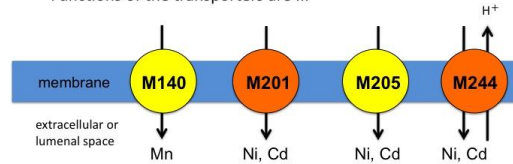


図6 植物過剰発現解析から示唆された重金属輸送体

生きた細胞の元素量を計測する新規バイオプローブの開発

本研究で作製した遺伝子発現ライブラリを新たな元素膜輸送の発見に結びつけるためには、目的の元素の細胞内の量を可視化するツールが必須である。

本研究では、自家蛍光が極めて強い酵母などの宿主でも細胞内モリブデン(Mo)濃度を測定するため、新たに自己発光型バイオプローブ MolyProbe/B を作出した。

植物色素のアントシアニンは広範な遷移金属元素(前述のMn, Ni, Zn, Cd以外の元素)と結合して色調を変える性質があり、バイオプローブとして有力である。しかし、植物に大量に含まれるクロロフィル系、カロチノイド系色素が色観察の障害となる問題点がある。そこで、植物を8波長の透過光で撮影したのち、ソフトウェア上の数値処理でアントシアニン系色素の色だけをイメージ抽出するシステムを開発した。同システムは、シロイヌナズナ過剰発現株で遷移金属元素量を評価する手段として活用中である。

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)

Segami S, Nakanishi Y, Sato MH, Maeshima M. Quantification, organ-specific accumulation and intracellular localization of type II H(+)-pyrophosphatase in Arabidopsis thaliana. Plant & Cell Physiology (2010) 51: 1350-1360. 査読有り

[学会発表] (計12件)

1. 中西洋一、佐古建志、佐藤世理、前島正義、シロイヌナズナの金属耐性に関する新規の膜タンパク質、第53回植物生理学会年会、2012年3月18日、京都産業大学、京都市
2. 前田道子、中西洋一、2色発光モリブデンセンサー蛋白質による酵母細胞内のモリブデン濃度測定、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、パシフィコ横浜、横浜市
3. 中西洋一、飯田俊太郎、川嶋輝美、藤原徹、生きた植物細胞のモリブデン濃度イメージング、第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、国立京都国際会館、京都市
4. 中西洋一、佐古建志、前島正義、シロイヌナズナの重金属耐性に関する新規の膜輸送体、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月11日、要旨集(震災対応のため)
5. 佐藤世理、中西洋一、動物細胞を宿主とする植物膜輸送体候補遺伝子総当たり過剰発現系の構築と、それを利用したモリブデン輸送体遺伝子の探索、第74回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2010年5月29日、名古屋大学医学部、名古屋市
6. 中西洋一、佐藤世理、動物細胞で発現する植物膜輸送体遺伝子ライブラリとその総当たりスクリーニング、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学、熊本市
7. 中西洋一、佐藤世理、植物膜輸送体遺伝子ライブラリからの細胞内モリブデン濃度調節因子の探索、第32回日本分子

生物学会年会、2009年12月9日、パシフィコ横浜、横浜市

8. Yoichi Nakanishi, Takeshi Sako, Eriko Hataya, Yu Imai, Yori Sato, and Masayoshi Maeshima, Comprehensive screening of inorganic ions and membrane transporter genes that correlated with color development of anthocyanins. 5th International Workshop on Anthocyanins, 2009年9月16日、Nagoya
9. 佐古建志、今井悠、中西洋一、シロイヌナズナのアントシアニン色素の発色特性とそれを利用した膜輸送体遺伝子の探索、第73回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2009年5月23日、名古屋市立大学、名古屋市
10. 中西洋一、佐古建志、幡谷恵莉子、今井悠、前島正義、アントシアニンの発色に関する膜輸送体遺伝子群の探索、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月21日、名古屋大学、名古屋市
11. 飯田俊太郎、藤原徹、中西洋一、生きた植物細胞のモリブデン濃度イメージング、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月5日、要旨集(震災対応のため)学会トピックス賞受賞
12. 中西洋一、三上俊之、新美友章、中西華代、モリブデン酸を検出するバイオプローブ、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年12月11日、神戸ポートアイランド、神戸市

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 核酸合成用酵素組成物及び核酸合成法
発明者: 中西洋一
権利者: 名古屋大学
種類: 特許
番号: 特願2010-152448
出願年月日: 平成22年7月2日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 洋一 (NAKANISHI YOICHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号: 60362290

(3)連携研究者

前島正義 (Maeshima Masayoshi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：80181577

藤原徹 (Fujiwara Toru)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：80242163

新美友章 (Niimi Tomoaki)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：30377791

(4)研究協力者

中西華代 (Nakanishi Hanayo)
名古屋大学・学術振興会 R P D

瀬上紹嗣、三上俊之、佐古建志、前田道子
以上4名、名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生

幡谷恵莉子、今井悠、飯田俊太郎、川嶋輝
美

以上4名、名古屋大学・農学部・学部学生

佐藤世理
名古屋大学・技術補佐員