

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380060

研究課題名(和文)

金属イオンの膜輸送と濃度調節に関する分子システムの解明

研究課題名(英文)

Molecular system of membrane transport and level regulation of metal ions

研究代表者：

前島 正義 (MAESHIMA MASAYOSHI)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：80181577

研究成果の概要(和文)：

(1) 液胞膜亜鉛輸送体 AtMTP1 の亜鉛輸送能および金属イオン選択性を規定するアミノ酸残基を特定した。

(2) 植物の新規情報変換タンパク質 PCaP1 と PCaP2 がミリスチル化されて細胞膜に局在し、PCaP1 が銅応答性、気孔開閉に関わること、PCaP2 が根毛の発達形成に関わることを発見した。

(3) H⁺-ピロホスファターゼの II 型ではなく、I 型が液胞膜で金属集積能力を支えていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I investigated *Arabidopsis* vacuolar membrane zinc transporter AtMTP1, novel cation-binding proteins PCaP1 and PCaP2, and H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase), which are involved in metal homeostasis in plant cells.

(1) AtMTP1 works as a Zn²⁺/H⁺ exchanger and has high affinity for zinc and zinc selectivity. We determined functional residues related to ion transport and selection of zinc.

(2) PCaP1 and PCaP2 N-myristoylated are stably associated with plasma membrane. I found that PCaP1 is involved in copper sensitivity and stomatal closure and PCaP2 in development of root hairs.

(3) I clarified that *Arabidopsis* type I H⁺-PPase is localized to the vacuolar membrane and mainly contributes to metal homeostasis through activation of metal active transporters. The type II H⁺-PPase is a minor isoform and localized to the Golgi membranes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：亜鉛、亜鉛輸送体、カルシウム、カチオン結合タンパク質、液胞膜、膜輸送体、プロトンポンプ

1. 研究開始当初の背景

どの生物も、多様な金属を酵素あるいはタンパク質の構造や機能を支える要素として分子の構成要素として組み込んでいる。たとえば、亜鉛は 300 種を超す多くの酵素あるいはタンパク質の必須要素となっている。いずれの必須金属も不足すればそれぞれの典型的な欠乏症を示し、逆に過剰であれば細胞や個体に障害をもたらす。植物細胞では、細胞質の過剰な金属イオンの多くは液胞に集積される。どの濃度以上が過剰で、どの濃度までが許容範囲か認識しつつ液胞に隔離することが求められる。その分子機構の詳細は未知の領域である。そこで、とくに亜鉛ホメオスタシスを具体的な実験対象として、液胞膜 Zn^{2+}/H^{+} exchanger を中心に個別輸送分子の特性と、その遺伝子欠失株での生理的な変化を解析することを大きな柱とした。また、液胞への亜鉛集積は、液胞膜内外の H^{+} の濃度勾配を利用する。すなわち、プロトンポンプの機能で液胞内が酸性化されており、その pH 勾配を利用して、 Zn^{2+}/H^{+} の交換輸送機構により、亜鉛が液胞内に取り込まれる。したがって、亜鉛輸送体とその機能を支えるプロトンポンプの両面での研究を進める必要があった。

2. 研究の目的

植物細胞において、液胞が担う金属イオンの集積機能に焦点を当てる。生育に必須な Ca, Mn, Mg, Zn などは過剰分を液胞に蓄積し、必要な時に細胞質に供給する機構を備えている。本研究では、液胞へのイオン集積機能を支える分子として Zn^{2+}/H^{+} 対向輸送体 (Zn 輸送体、MTP1) とその機能をエネルギー的に支えるプロトンポンプに焦点

を当てる。二次能動輸送体は V-ATPase と H^{+} -ピロホスファターゼ (V-PPase) の 2 つの H^{+} ポンプが形成する pH 勾配を利用し作動する。とくに Zn^{2+}/H^{+} 対向輸送体の構造を基盤とする作動機構、イオン濃度センサー機能、生理機能の特性、そして一次・二次能動輸送系の協調機構の解明を目的とする。さらに、金属イオンホメオスタシスに関わると推定される新規金属結合タンパク質 (PCaP) を見出しているため、金属イオン輸送系との関連に焦点を当てる。これにより金属イオンと H^{+} サーキットの全容、細胞質金属イオン濃度の調節機構を解き明かす。

3. 研究の方法

(1) Zn 輸送体の亜鉛濃度センサー機能の解明: 液胞膜の Zn 輸送体である MTP1 は、細胞質側に His 残基が多数配列した領域 (His 領域) をもつ。His 残基は Zn^{2+} との親和性が高く、細胞質 Zn^{2+} は His 領域に集積してから、 H^{+} との対向輸送によって液胞内に輸送されるものと推測している。MTP1 が作動するのは細胞質 Zn^{2+} が His 領域を飽和させる濃度に上昇した時のみであると考えている。すなわち、His 領域が細胞質 Zn^{2+} 濃度のセンサーとしてはたらき、細胞質に必要な Zn^{2+} 濃度を維持する機構となっているとの仮説である。His 領域のどの His 残基が亜鉛濃度感知とイオン選択性に関わっているのかを酵母発現系で解析した。さらに、His 領域を欠失した MTP1 分子、あるいは種々のアミノ酸を置換した変異 MTP1 分子を遺伝子導入した植物を作出し、植物体レベルでの機能を明らかにする実験を進めた。とくに、亜鉛過剰条件での生

育と、その環境での亜鉛集積量について、生理的かつ化学的に定量解析し、我々の仮説を検証した。

(2) 新規金属結合タンパク質の金属・塩ストレス応答機構の解明：PCaPと名づけた新規の金属結合タンパク質は、少なくともカルシウムと銅イオンを結合し、ミリストイル脂質修飾により細胞膜に結合している。PCaP遺伝子を欠損した植物株を選抜し表現型を観察したところ、銅が不足または過剰な生育条件において、顕著な生育阻害がみられた。これらの生理現象、とくに金属イオンストレスについて、金属の種類、濃度を変化（不足と過剰）させつつ、PCaP遺伝子の発現と翻訳産物のレベルがどのように変動し、応答するかを解析した。PCaPの細胞膜局在の意味を検証するため、ミリストイル化部位となるN端から2番目のグリシンを変異させた変異分子を発現させた植物体を作出したので、その生理特性を解析し、金属ホメオスタシス機構および耐塩性との関連を解析した。

(3) 液胞膜 H^+ -PPaseの構造ならびに二次輸送体との機能的協調機構： H^+ -PPaseは約80kDaの単一タンパク質で構成される。植物にはI型（液胞型）に加えてII型が存在し、その細胞内局在と量について明確な知見を得ることを目的とした。また、I型については、部位特異的変異導入法によって見出した高機能型分子について植物体に導入し、応用展開の可能性を明らかにする。さらに、 H^+ -PPase欠失株も利用して、金属イオン輸送体とプロトンポンプ（ H^+ -PPase）の機能的協調性と独自性について、遺伝子発現レベルで差異を

明らかにする。これらを総合して、金属イオンホメオスタシスに関する膜輸送系を中心にモデルを提案することとした。

4. 研究成果

(1) 液胞膜亜鉛輸送体 AtMTP1

シロイヌナズナの輸送体 AtMTP1 を対象に、特定のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換し、これを酵母で異種発現し、亜鉛輸送機能の測定を実施し、構造と機構の関係を明らかにした。

AtMTP1 が Zn^{2+}/H^+ exchanger である事をはじめて実証し、さらに亜鉛に対する親和性が高く ($K_m = 0.30 \mu M$)、亜鉛選択性が高いことを明らかにした。AtMTP1 は複数の特徴的な配列を持つ。構造と機能の関係を明らかにするためこれら特徴的な配列に変異を加え解析を行った。His 領域には 25 個のヒスチジンが含まれる。この領域の大部分(185-216 残基目)を欠失させると V_{max} が野生型 AtMTP1 の 11 倍に増加することを発見し His 領域が亜鉛輸送速度調節に関与することを明らかにした。His 領域はイオンを集積し、かつ細胞質亜鉛濃度センサーとして働いていると推定した。細胞質に一定濃度以上の亜鉛が存在する時にのみ AtMTP1 は亜鉛を輸送し、細胞質亜鉛濃度の極端な低下と過剰を防ぎ、適切な濃度範囲に調節する機能を果たしているとの機能モデルを提案し論文等で発表した。

さらに CDF ファミリー特徴的配列、ロイジンジッパーモチーフなど保存性の高いアミノ酸への部位特異的変異導入より、2 番目の膜貫通ドメイン(TM2)の CDF 保存領域の His90 と Asp94、そして TM5 の His265 と Asp269 が推定亜鉛結合部位であること、C 末端領域が亜鉛輸送に必須であること、N 末端が植物の亜鉛輸送体特有の輸送速度調節およびイオ

ン選択性に関わること、ロイシンジッパーモチーフが厳密な亜鉛選択性に必須であること、TM5 の Asn258 が活性調節に関わる事を示す実験結果を得た。His 領域についても、個別 His 残基の役割、His 残基の個数の重要性等も検討した。これらの結果をもとに、AtMTP1 のイオン選択および活性調節の分子機構を明らかにしつつある。とくに、Asn258 は His 領域に直接繋がっており、細胞に微量必須元素としての亜鉛を一定量残すための安全弁の役割を果たすと推測される。これらの成果は投稿論文執筆中である。

(2) 新規金属結合タンパク質の金属・塩ストレス応答機構

シロイヌナズナの PCaP1 および PCaP2 と名付けた新規金属カチオン結合タンパク質については、生化学的な特性を解明するとともに、それぞれの遺伝子改変株の生理的な特性を解析した。生化学的特性として、PCaP1 と PCaP2 のいずれも、N 末端側でミリスチル化され、安定的に細胞膜に局在することを明らかにした。細胞膜局在は、各 PCaP の C 端側に緑色蛍光タンパク質 GFP を付加したものを、自己プロモーター制御下で発現させ根、茎、葉、花等を、共焦点レーザー顕微鏡により観察し、銅イオン過剰状態を含むいずれの状況でも細胞膜局在であり、細胞膜から遊離することはないことを明らかにした。なお、PCaP1 は植物のいずれの組織でも発現し、PCaP2 は根、とくに根毛、そして受粉後の花粉管で発現することを明らかにした。

PCaP2 の過剰発現株は、発芽および初期成長段階での耐塩性が高くなることを見出した。また、PCaP1 の遺伝子欠失株では暗所においても葉の気孔閉口が十分達成できない障害が生ずることが判明した。

これらの知見から、PCaP1 と PCaP2 はスト

レス等、ネガティブな生理的条件の際に、信号を伝達する役割を担い、その機能を失う事により、塩 (PCaP1) や暗所 (PCaP2) への応答ができない状況に至っていると推定した。詳細を含めて、学術論文をまとめている。

(3) 液胞膜プロトンポンプ: I 型が液胞膜に局在することに加えて、II 型の H⁺-PPase が培養細胞や若い根および花卉組織細胞のゴルジ装置に局在することを、特異抗体を用いることにより明らかにした。I 型 H⁺-PPase については、自己プロモーター制御下で H⁺-PPase-GFP を発現する植物株を数ライン得て、安定した液胞形態の観察が可能な系を確立した。成果は、論文としてまとめている。かつ、いずれの細胞においても II 型は、I 型の 0.3%以下のタンパク質量しか存在しないことを明らかにし、複数種の中で、液胞の金属耐性に寄与するのは I 型 H⁺-PPaseであることを明確にし、論文発表した。また、I 型 H⁺-PPase の遺伝子破壊株あるいは機能欠失株、および過剰発現株のホモラインも作出し、金属イオン耐性等の生理的特性を解析できる段階に達した。

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 15 件) いずれも査読有り。
(1) Fukao, Y., Ferjani, A., Tomioka, R., Nagasaki, N., Kurata, R., Nishimori, Y., Fujiwara, M. & Maeshima, M. (2011) The iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, In press (DOI:10.1104/pp.110.169730).

(2) Kato, M., Nagasaki-Takeuchi, N., Ide, Y., Tomioka, R. & Maeshima, M. (2010) An *Arabidopsis* hydrophilic Ca²⁺-binding protein with a PEVK-rich domain, PCaP2, is associated with the plasma membrane and interacts with calmodulin and phosphatidylinositol phosphates. *Plant Cell Physiol.*, 51, 366–379.

(3) Kato, M., Nagasaki-Takeuchi, N., Ide, Y.,

- Tomioka, R. & Maeshima, M. (2010) PCaPs, possible regulators of PtdInsP signals on plasma membrane. *Plant Signaling & Behavior*. 5, 848–850.
- (4) Segami, S., Nakanishi, Y., Sato, H.M. & Maeshima, M. (2010) Quantification, organ-specific accumulation and intracellular localization of type II H⁺-pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 51: 1350–1360.
- (5) Kamiya, T., Tanaka, M., Mitani, N., Ma, J.F., Maeshima, M. & Fujiwara, T. (2009) NIP1;1, an aquaporin homologue, determines the arsenite sensitivity of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 284, 2114–2120.
- (6) Kim, Y.-Y., Choi, H., Segami, S., Cho, H.-T., Martinoia, E., Maeshima, M. & Lee, Y. (2009) AtHMA1 contributes to detoxification of excess Zn(II) in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 58, 737–753.
- (7) Kawachi, M., Mori, H., Kobae, Y., Tomioka, R., and Maeshima, M. (2009) A mutant strain *Arabidopsis* that lacks vacuolar membrane zinc transporter MTP1 revealed the latent tolerance to excessive zinc. *Plant Cell Physiol.*, 50, 1156–1170.
- (8) Yoshida, K., Miki, N., Momono, K., Kawachi, M., Katou, K., Okazaki, Y., Uozumi, N., Maeshima, M. & Kondo (2009) Synchrony between flower opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Proceedings of the Japan Academy (Ser. B, Physical and Biological Sciences)*, B85 (6), 187–197.
- (9) Hirono, M. & Maeshima, M. (2009) Functional enhancement by single-residue substitution of *Streptomyces coelicolor* A3(2) H⁺-translocating pyrophosphatase. *J. Biochem.*, 145, 617–621.
- (10) 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. & Mimura, T. (2009) Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 50, 2023–2033.
- (11) Kawachi, M., Kobae, Y., Mimura, T. & Maeshima, M. (2008) Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *J. Biol. Chem.*, 283, 8374–8383.
- (12) Hamamoto, S., Marui, J., Matsuoka, K., Higashi, K., Igarashi, K., Nakagawa, T., Mori, Y., Murata, Y., Nakanishi, Y., Maeshima, M., Yabe, I. & Uozumi, N. (2008) Characterization of a tobacco TPK-type K⁺ channel as a novel tonoplast K⁺ channel using yeast tonoplast. *J. Biol. Chem.*, 283, 1911–1920.
- (13) Nagasaki, N., Tomioka, R. & Maeshima, M. (2008) A hydrophilic cation-binding protein of *Arabidopsis thaliana*, AtPCaP1, is localized to plasma membrane via N-myristoylation and association with phosphatidylinositol phosphates, PtdIns(3,4,5)P3 and PtdIns(3,5)P2. *FEBS J.*, 275, 2267–2282.
- (14) Lee, M., Choi, Y., Burla, B., Kim, Y.-Y., Jeon, B., Maeshima, M., Yoo, J.-Y., Martinoia, M. & Lee, Y. (2008) The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nature Cell Biology*, 10, 1217–1223.
- (15) Nagasaki-Takeuchi, N., Miyano, M. & Maeshima, M. (2008) A plasma membrane-associated protein of *Arabidopsis thaliana* AtPCaP1 binds copper ions and changes its higher order structure. *J. Biochem.*, 144, 487–497.
- [学会発表] (計 30 件)
- (1) 長崎菜穂子、加藤真理子、永田千咲子、宮野雅司、前島正義：植物細胞膜に局在する天然変性タンパク質 PCaP、シンポジウム「“ひらひら”した不定形の領域を介する蛋白相互作用：医薬、農薬の新たな探索標的」、日本農芸化学会 2011 年度大会、京都、2011 年 3 月 25–28 日 (要旨集記載。東北関東大震災のため大会中止となったが、大会は成立した。)
- (2) Fukao Y., Kawachi, M., Kogawa, S., Tomioka, R., Mimura, T., Krämer, U. & Maeshima, M.: Crosstalk between zinc and iron homeostasis: iTRAQ analysis and zinc transporters. The Winter Conference, POSTECH, Pohang, Korea, January 10-11, 2011.
- (3) Kawachi, M., Kogawa, S., Kraemer, K., Mimura, T., & Maeshima, M.: Structural, functional property of the His-rich region of *Arabidopsis* vacuolar membrane Zn transporter AtMTP1. International Symposium on Protein structure and dynamics: from molecules to assembly. GCOE/Structural Biology Research Center, Nagoya University, November 23-24.2010
- (4) Kawachi, M., Kogawa, S., Kraemer, K., Mimura, T. & Maeshima, M.: Molecular physiological analysis of His-rich region of *Arabidopsis* vacuolar membrane Zn transporter AtMTP1. The 60th Fujiwara Symposium on “Zinc Signal and Cellular Function”. Osaka, Japan, October 29-31, 2010
- (5) Nagata, C., Kato, M., Kinoshita, T. & Maeshima, M.: A novel, hydrophilic cation-binding protein PCaP1 is stably associated with plasma membrane and is

- involved in regulation of stomatal apertures. 21st International Conference on Arabidopsis Research. Yokohama, June 6 to 10, 2010.
- (6) Segami, S., Makino, S. & Maeshima, M.: H⁺-pyrophosphatase is localized in the membrane of vacuole and the bulb-like structure. 21st International Conference on Arabidopsis Research. Yokohama, June 6 to 10, 2010.
- (7) Kato, M., Nagasaki-Takeuchi, N., Ide, U. & Maeshima, M.: A hydrophilic Ca²⁺-binding protein with PEVK-rich domain, PCaP2, is associated with plasma membrane via N-myristoylation and interacts with calmodulin and phosphatidylinositol phosphates in Arabidopsis thaliana. Plant Biology 2009, Hawaii, USA, July 19-22, 2009.
- (8) Ouchi, Y., Nagatani, A. & Maeshima, M.: Analysis of Ca²⁺-binding proteins, CCaP1 and CCaP2, in Arabidopsis thaliana. Plant Biology 2009, Hawaii, USA, July 19-22, 2009.
- (9) Hirono, M., Segami, S., Muto, Y., Kawachi, M. & Maeshima, M.: Structure-function relationship and physiological meanings of H⁺-pyrophosphatase. The XII Meeting of the SBFV (The Brazilian Society of Plant Physiology), Fortaleza, Brazil, September 7-12 (presentation, Sep. 9), 2009.
- (10) Kawachi, M., Mori, H. & Maeshima, M.: Structure-function relationship of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter and defense mode against zinc stress in atmt1 mutant plant. The GRL Symposium on Phytoremediation. Pohang University of Science and Technology, Pohang, June 12-14, 2008.
- (11) Kato, M., Nagasaki, N., Ide, Y. & Maeshima, M.: Molecular characterization of a novel Ca²⁺-binding protein of Arabidopsis thaliana PCaP2 associated with plasma membrane via N-myristoylation. Plant Biology 2008. Merida, Mexico, June 26 – July 1, 2008.
- (12) Kawachi, M., Kobae, Y., Mimura, T. & Maeshima, M.: Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter of Arabidopsis thaliana, stimulates the transport activity. Plant Biology 2008. Merida, Mexico, June 26 – July 1, 2008.

ほか18件。

[図書] (計2件)

- (1) Kawachi, M., Kobae, Y., Tomioka, R., and Maeshima, M. (2011) The role of membrane transport in the detoxification and accumulation of zinc in plants. *In A Soil Biology Series: Detoxification of Heavy Metals*. Springer-Verlag. In Press

(2) 河内美樹、前島正義：4.2.7. 植物に含まれる物質。「生物の事典」(石原勝敏、末光隆志編)朝倉書店、pp.109-114 (2010) 総頁数 560 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前島正義 (MAESHIMA MASAYOSHI)
名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号：80181577

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：