

平成22年4月1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770024

研究課題名 (和文) 硝酸シグナル伝達ネットワーク解明のための新たな解析法の開発

研究課題名 (英文) Development of a new analytical tool for elucidating nitrate signaling networks

研究代表者

GOTO Derek (GOTO DEREK)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：40419205

研究成果の概要 (和文)：

本研究の目的は、植物根の硝酸塩レベルによって変化を起こす、新たな硝酸塩濃度蛍光指示薬を開発するものである。例えば、蛍光タンパク質の発光比率が変化することにより、硝酸レベルは変化する。このように、この指示薬は、二つの蛍光タンパク質間に起こる蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) に大きく依存している。*Synechococcus* PCC 7924 cyanobacteriumシアノバクテリアは、高親和性硝酸結合タンパク質NrtAを含み、その遺伝子によりコード化されたタンパク質は新指示薬として使用された。NrtAが適切なベクターでクローン化された後、そのクローン化された遺伝子は、CFPとYFPをコード化する遺伝子と融合された。この新たに作られた融合タンパク質で、FRET活動での発現に成功し、CFPが励起した時のみにCFPとYFPの両蛍光タンパク質の発光が見られた。わずかであるが、タンパク質が高濃度硝酸に露光された際、FRET比率でも上昇が見られた。高濃度硝酸比率は低硝酸レベルにおいても発現されるが、その比率は植物に使用するには不十分である。NrtA内の保存残基は同定され、部位特異的変異誘発に使用するために改良された。大きな硝酸反応の結果は得られなかったが、これにより硝酸高初期FRET比率を抑える事に成功した。植物根研究に用いるために、この指示薬の実用化に向けた最適化が今後期待される。

研究成果の概要 (英文)：

This project aimed to develop a new fluorescent indicator of changes in nitrate concentration within living plant roots. This indicator relies on Forster Resonance Energy Transfer (FRET) between two fluorescent proteins, such that a change in nitrate level is shown by a ratio change in emission from the two proteins. *Synechococcus* PCC 7924 cyanobacterium contains a high-affinity nitrate binding protein, NrtA, and the gene encoding this protein was used for the new indicator. After the NrtA was cloned into the appropriate vectors, the gene was fused between genes encoding CFP and YFP. The new fusion protein successfully showed FRET activity, and dual emission from both CFP and YFP when only the CFP protein was excited. A slight increase in the FRET ratio was also observed when the protein was exposed to higher nitrate concentrations. However, a high FRET ratio was present even at low nitrate levels, and the ratio increase was not enough for use in plants. Conserved residues in NrtA were identified and modified using site-directed mutagenesis. This successfully reduced the high initial FRET ratio but did not result in a greater nitrate response. Further optimization is expected to provide the new practical indicator for plant research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物、根、栄養応答、栄養輸送

1. 研究開始当初の背景

多細胞性植物の器官が成長し発達する期間中に、バランスのとれた栄養素を全細胞に供給させるということは必須条件である。このバランスを補い維持するためには、外部状況によって起こる変化に対する適切な対応と、栄養素の安定した供給を図らなければならない。

窒素は、生物形成に影響を与える重要な栄養成分の一つである。窒素は、植物根より土中から吸収され、最終的に硝酸塩として植物に供給される。現在のところ、根細胞組織内の硝酸集積との相違点は明確にはなっていない。

外的供給差異によって硝酸集積量が変化するが、どの細胞が最初に変化するのかは現時点では未だ解明されていない。硝酸を検知し摂取する構造を理解するためには、細胞レベルでの生体組織の特異点が、識別可能にならなければいけない。

2. 研究の目的

この研究の目的は、細胞硝酸集積の遺伝子をコード化した新たな蛍光タンパク指示薬の開発することである(図1)。この指示薬を植物根に用いるためには、最適化をさせなければならない。この指示薬開発が成功すれば、遺伝子組換え植物や植物根内にある硝酸集積の時差や位置差の研究実験に使用可能となる。

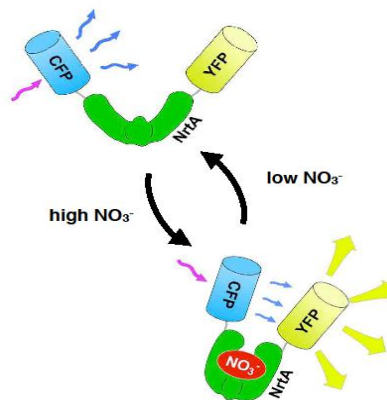


図1：新たな硝酸指示薬の開発概念

3. 研究の方法

シアノバクテリア *Synechococcus* PCC7924は、たいへん特徴的な高親和性硝酸結合タンパク質NrtAを含んでいる。このアミノ酸残基81-433 NrtAタンパク質をコード化する、NrtA遺伝子領域のクローン化を第一番目に試みた。クローン化には、複数の段階を踏む方法を選択した。NrtA遺伝子は、異なる組合せの蛍光タンパク質 (CFP, GFP, YFP, DsRed) を符号化する遺伝子にクローニングされ、新たな融合タンパク質を発生させた。

細菌細胞内で発現し精製された新融合タンパク質のFRETの活動を、濃縮硝酸を用いて検査を行った。また、新融合タンパク質の比率変化向上させるため、NrtAタンパク質内の残基を部位特異的変異に誘発させ、融合タンパク質を同様に試験を行った上で

改良することができた。

#### 4. 研究成果

新蛍光性融合タンパク質 (PNin) は、NrtA硝酸結合タンパク質を含んでおり、CFP蛍光タンパク質とYFP蛍光タンパク質を融合したシネココカス伸長部 (81—433アミノ酸域) より発現された。低硝酸レベル (100 pM) において、436 nm (CFPの励起波長) の励起に露光する際、PNin融合タンパク質は、485 nm (CFP発光波長) と528 nm (YFP発光波長) で発光ピークが確認された (図2A)。これにより、FRET発生成功が認められたが、YFP発光波長はCFPよりも高く、予測していたものより大幅に上回った結果になった。PNinタンパク質を高濃度 (320 uM) で培養すると、FRET活動変動と一致する軽度のCFP発光低下とYFP発光上昇が見とめられた (図2B、2C: YFP/CFPの比率変化: 1.40/100 pM、1.52/320 uM)。

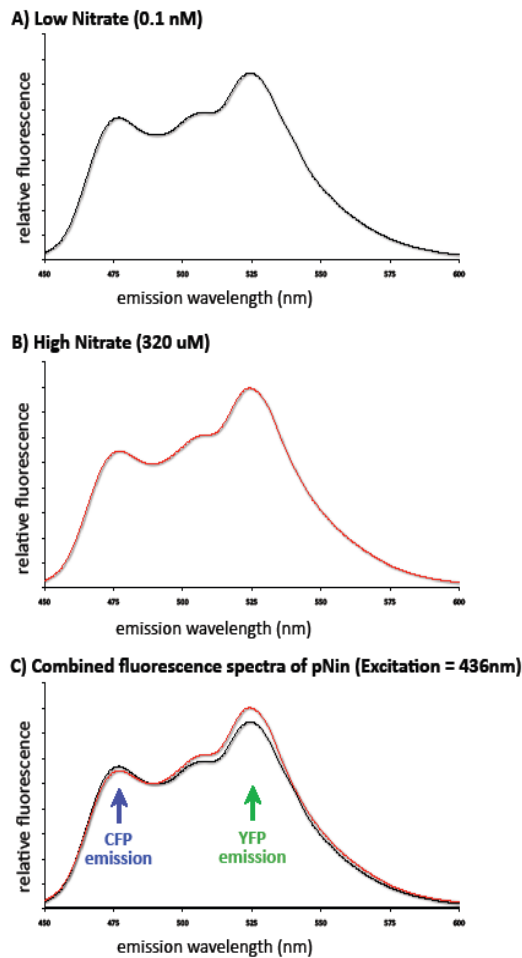


図 2 : 新PNin硝酸塩指示薬における蛍光スペクトル変化

NrtAタンパク質は、硝酸結合親和性に関与していると考えられているアミノ酸残基 W251、Q305、H350P、K423 を含有している。この4つの残基を、PNin指示薬の最適化を図るため、アラニンに改良した (図3)。

Ligand-binding residues <sup>a)</sup>	pNin Residue (mutate to Ala)	DNA Sequence Codon Mutation <sup>b)</sup>
W102	W251	TGG -> GCG
Q155	Q305	CAG -> GCG
H196	H350	CAC -> GCC
K269	K423	AAA -> GCA

a) NrtA nitrate-binding residues identified by Koropatkin *et al* (2006)  
b) mutated DNA residues shown in red

図 3 : PNin内の変異操作された残基

低硝酸濃度において、各置換変異は、YFPとCFPの比率を1 (1.02~1.12) 近くまで引き下げることに成功した。

しかし、硝酸濃度の増加があっても、YFPとCFPの比率の上昇は見られなかった (図4)。

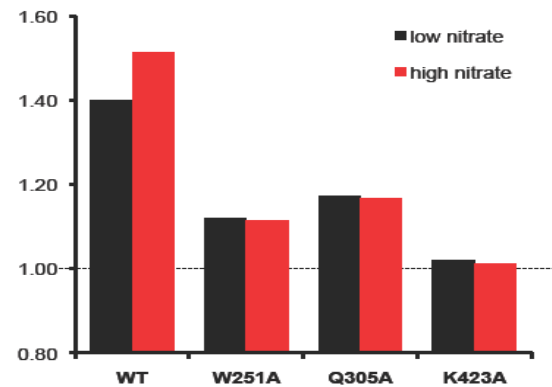


図 4 : YFPとCFPの比率

植物組織に使用するPNin指示薬の最適化改善は不可欠である。この融合蛍光タンパク質には、硝酸塩指示薬のような特性の働きを持っている可能性が大いにあると考えられる。

## 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)

[学会発表] (計3件)

### ①Goto, D. :

「トマトとイモムシの隠れた戦い」  
第5回北大-九大合同活動報告会、  
東京、日本  
2009年12月10日  
(日本語)

### ②Goto, D. :

「Initiation of specialised nutrient transfer within plant roots by a sedentary parasite」  
International Symposium on Plant Membrane Transport、  
東京大学、東京、日本  
2009年3月12-13日  
(英語)

### ③Goto, D. :

「Disruption of plant root function by a parasite: How do root-knot nematodes establish permanent infection sites inside plant roots?」  
Invited Seminar,  
Australian Centre for Plant Functional Genomics,  
University of Adelaide,  
Adelaide,  
AUSTRALIA  
2009年2月22日  
(英語)

[その他]

ホームページ等

<http://gotolab.cris.hokudai.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

**GOTO Derek** (GOTO DEREK)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：40419205