

令和 6 年 9 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19060

研究課題名（和文）輸送活性未検出の植物イオン輸送体の機能同定と大腸菌機能解析法の開発

研究課題名（英文）Functional expression system for plant ion transport system in Escherichia. coli

研究代表者

魚住 信之（Uozumi, Nobuyuki）

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：40223515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：輸送活性未同定の植物K輸送体ホモログの機能発現を目標に検討を行った。真核生物由来のイオン輸送体の大腸菌発現の報告に基づいて大腸菌のKおよびNa輸送体の多重変異体を作成後、輸送活性測定や生理的役割を明らかにして、真核生物のホモログのイオン輸送体の機能解明と役割を解明した。さらにこれまで輸送機能が明らかになっていない植物Kチャネルを異種発現系によってK輸送活性の測定に成功した。Kチャネルの発現組織とその役割について解析を行った。以上により、機能が分からなかった植物イオン輸送体のKチャネル活性が検出され、植物内で機能発現することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能未同定の植物イオン輸送体のKチャネル活性が明らかになり、植物内における養分吸収や恒常性維持に関与する分子の一つが明らかになった。この結果は、他の生物において機能未同定のイオン輸送体の機能解明の可能性を示唆する。本申請で扱ったKチャネルは動物、微生物やウイルスにも存在することから、同様の測定手段を踏襲することで新たにイオン輸送体の解明が可能となる。また、本研究で明らかになった大腸菌のK輸送体のホモログは真核生物にも存在しており、そのK輸送体の機能と役割に関する情報となる。

研究成果の概要（英文）：We have pursued investigations aimed at elucidating the functional expression of homologs of uncharacterized plant potassium transporters. Based on reports of expression of eukaryotic ion transporters in Escherichia coli, we created multiple mutants of potassium and sodium transporters in E. coli, followed by elucidating their transport activities and physiological roles, thereby revealing the function and roles of homologous ion transporters in eukaryotes. Furthermore, successful measurement of potassium transport activity was achieved for previously uncharacterized plant potassium channels using heterologous expression systems. Analysis was conducted on the expression tissues and roles of potassium channels. As a result, the potassium channel activity of functionally unreported plant ion transport system was detected, clarifying their functional expression within plants.

研究分野：膜輸送機能学

キーワード：イオン輸送体 Kチャネル Arabidopsis thaliana E. coli 輸送解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノムには数多くの膜輸送体ホモログ遺伝子が存在していることが分かっているが、解析が行われ機能が明らかになったものは一部である。特殊な環境において輸送活性を示す輸送体が存在していると考えられる。この未知の輸送体ホモログの機能活性を明らかにするには多様な輸送活性発現系の構築と輸送活性測定が必須である。申請者らは、大腸菌に真核生物由来のイオン輸送体を機能発現させることが可能であることを報告植物のイオン輸送体の機能発現系として確立されている。植物ゲノムには輸送機能が未知となっている輸送体が存在している。

2. 研究の目的

ゲノム配列情報から推定されるイオン輸送体ホモログの中で、輸送機能が判明しているイオン輸送体は限られている。申請者はこれらの輸送体を本研究において機能発現させることの可能性を見だし、イオン輸送体の機能解析を行ない役割を明らかにすることを行った。また大腸菌には真核生物にも存在する輸送体の原型となる先祖となる輸送体がコードされている新核生物由来のイオン輸送体の解析には原核生物である大腸菌の輸送機能の解析が重要である。大腸菌の変異株を用いた解析によって、真核生物のホモログ輸送体の機能解明が可能になる。今回大腸菌の K 輸送体の中から詳細な検討がなされていない輸送体について検討することによって先祖方イオン輸送体の性質を解明することも目的とした。

ゲノム配列情報から推定されるイオン輸送体ホモログの中で、輸送機能が判明しているイオン輸送体は限られている。植物シロイヌナズナのゲノムにコードされ K チャネルの中で、輸送活性が報告されていない K チャネルホモログがある。イオン輸送活性を実測されている輸送体の数は限られており、詳細に輸送活性が調べられた分子の数はさらに少ないのが現状である。本研究では、K チャネル輸送活性が見いだされていないシロイヌナズナの K チャネルホモログを対象にして、K 輸送の検出を試みるとともに、その輸送体が生理的に機能すること、生理的な役割を明確にすることを目的とした。一般に異種機能発現系として用いられる酵母変異株や動物細胞の機能発現系に加えて、申請者らが独自に開発した大腸菌変異株を用いた機能解析系も利用して K 輸送体を解明することにより、生物種を超えて機能未知の輸送体の活性発現の検出をはかる方法構築する。機能未知のイオン輸送体の機能発現の解明を示すことができれば、現在、機能未知となっているイオン輸送体ホモログの輸送体の同定を可能にする筋道を提案することとなり、新たな機能分子の同定の可能性を広げることとなる。

3. 研究の方法

大腸菌 K 輸送である TrkG, TrkH, Kup, Kdp の各遺伝子の単独変異株を作製した。さらに、多重変異株を作成して、四重変異株を作製した。測定を妨害する宿主大腸菌の内在性 K 排出系の不活化を試みる。通常利用する K 要求性大腸菌変異株の K 排出系遺伝子の変異株の取得も同様に行った。これは、植物 K 輸送体により細胞内に取込まれた K が排出されることから、大腸菌で K 排出活性をもつ数種類の候補輸送体遺伝子に変異を導入して外来輸送体の K 輸送取込み活性の検出感度を高めることを試みた。さらに電気生理学的測定を用いてイオン輸送活性を調べた。大腸菌内在性の高親和性 K 輸送体を含む K 輸送体遺伝子変異株を宿主細胞として用いるが、外来の植物の低親和性 K チャネルによる K 取込みだけでは生育が悪化することがある。最低限の K 濃度の維持に重要である。高親和性 K 輸送体を維持した K 輸送体の大腸菌多重変異株の選別を行い異種発現による宿主細胞の生育障害の緩和を検討した。脱/リン酸化修飾による輸送体活性調節による K チャネルの活性化を検討する目的で、脱/リン酸化酵素と K チャネルを酵母に共発現させて、植物 K 輸送体の機能の検出を行った。原子吸光分析もしくは放射性 ^{42}K / ^{43}K などを用いて K 輸送を実測する。組織別発現を検出する目的で、GUS レポーター遺伝子をプロモーターに連結した遺伝子を導入して植物における遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

新規 K 輸送活性の測定を行うための宿主大腸菌の変異株となる 4 種類の K 取込み輸送体 (TrkG, TrkH, Kup, Kdp) の遺伝子の多重変異株を用いて、TrkG と TrkH の性質を調べた。調節因子である TrkA の遺伝子が必要であり、TrkG と TrkH は K 取り込み輸送活性が同等であった。しかし、培地の K 濃度を変化させて大腸菌の増殖を検討すると TrkH を維持する大腸菌の方が、TrkG を発現している大腸菌よりも増殖速度は高かった。また、TrkH は K 輸送活性のみであったが、TrkG は Na も輸送することが分かった。さらに、TrkG の K 輸送活性は Na 依存性であった。これらの性質が植物 K 輸送体の機能解析に与える影響は少ないと考えられるが、大腸菌がその生育に TrkG が有する Na 輸送活性を要求する場合、植物 K 輸送体に Na 輸送活性がある場合と無い場合において、宿主となる大腸菌の増殖に影響を与える可能性がある。植物 K 輸送体の中には Na 透過性をもつ輸送体も知られており、また、Na 依存的に K 輸送が活性化する輸送体も存在する。植物 K 輸送体の機能において、Na の影響にも考慮することが必要であることが明らかになった。TrkG はウイルスがゲノムに入った形跡のある遺伝子としてコードされている。外来遺伝子由来のタ

ンパク質であることから、サイレンシングを起こす H-NS (histone-like nucleoid structuring protein or heat-stable nucleoid-structuring protein)によって遺伝子発現が抑制されていることが分かった。また、Na⁺によって活性化される部位の一つに酸性アミノ酸の Asp であることが示された。この Asp は Na 依存性の同族輸送体に高く保存されている。

活性未同定の K チャネルにおいて酵母で複数のリン酸化酵素を導入して K 輸送取り込み活性の変異を相補について検討を行った。K チャネルおよびリン酸化酵素群を同時に共発現させて低濃度の K 培地において増殖するコロニーを取得した。一方、リン酸化酵素のみを導入した酵母においても、見かけ上相補する酵母が出現した。これらのリン酸化酵素は除外した。またいくつかのリン酸化酵素の共発現酵母は増殖しないことも分かった。この相補アッセイを合計 3 回行い、より確実な相補結果が得るために慎重に検討した。さらに獲得した候補リン酸化酵素と K チャネルを異種発現解析系に導入し、二電極を用いた膜電位固定法による K チャネル電流測定を行い明瞭な K 電流が検出された。リン酸化酵素部位と考えられ酢アミノ酸を置換して K 輸送活性の消失と維持を検討したところ、範囲限定的にリン酸化が必要となる部位を示すことができた。K チャネルが植物でも K 輸送体として機能する可能性が強く示唆された。またこの K チャネル遺伝子変異株植物体を取得して、表現型の観察を行った。さまざまな環境で植物変異株の表現の観察を行った結果、表現型が見られる条件を決定した。またこの K チャネルの植物における組織別発現を検討するために K チャネルのプロモーターに GUS レポーター遺伝子を導入した植物を取得した。組織別および時期特異的な遺伝子発現を調べたところ、維管束で発現が観察された。以上より、K チャネルが植物でも K 輸送体として機能する可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanudjaja Ellen, Hoshi Naomi, Yamamoto Kaneyoshi, Ihara Kunio, Furuta Tadaomi, Tsujii Masaru, Ishimaru Yasuhiro, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 299
2. 論文標題 Two Trk/Ktr/HKT-type potassium transporters, TrkG and TrkH, perform distinct functions in <i>Escherichia coli</i> K-12	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102846 ~ 102846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坂本胡桃, 齋藤俊也, 辻井雅, Ryoung Shin, 石丸泰寛, 魚住信之
2. 発表標題 植物 K+チャネルのカリウム欠乏の感知と調節
3. 学会等名 日本生物工学会北日本支部2021 年度
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ellen, 星直美, 古田忠臣, 山本兼由, 辻井雅, 石丸泰寛, 魚住信之
2. 発表標題 大腸菌の Trk 系 K トランスポーターの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度(令和4年度)大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuyuki Uozumi, Ellen Tanudjaja, Masaru Tsujii, Yasuhiro Ishimaru
2. 発表標題 The Structural Characteristics and Distinct Fundamental Roles of Two Types of K Transporters, Trk/Ktr/HKT and KUP/HAK/KT
3. 学会等名 IWPMB2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石丸 泰寛 (Ishimaru Yasuhiro) (80590207)	東北大学・大学院工学研究科・准教授 (11301)	
研究協力者	辻井 雅 (Tsuji Masaru) (30865887)	東北大学・大学院工学研究科・助教 (11301)	
研究協力者	エレン (Ellen) (40870176)	東北大学・大学院工学研究科・特任助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------