

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 5月 22日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780300

研究課題名（和文） 酵母における細胞内マグネシウム濃度設定実験系の開発

研究課題名（英文） Development of setting up the magnesium concentration in yeast using Mg transporter.

研究代表者

田野井慶太郎（TANOI KEITARO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90361576

研究成果の概要（和文）：

本研究では、マグネシウムを輸送するタンパク質（遺伝子）を、マグネシウム輸送ができない酵母へ導入することで、様々なマグネシウム環境となる酵母を作成した。この酵母を用いることで、様々なマグネシウム環境下にある mRNA の制御に関する研究を *in vivo* で実施することができるが、細胞質のマグネシウム濃度を知ることはできないことから、さらなる研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have made the yeast lines whose magnesium concentration was varied by introduction of the magnesium transporter genes whose affinity to magnesium was varied with a wide range of concentration. Using these yeast lines, it is expected that the control of mRNA stability could be studied *in vivo*. Further study is required to observe the magnesium concentration in cytosol.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学、応用分子細胞生物学

キーワード：発現制御

1. 研究開始当初の背景

Mg は生命活動に深く関わる必須元素である。植物では葉緑素の構成成分であること、ほぼ全ての代謝経路に Mg²⁺依存性の酵素が関与すること（Cowan 2002）、ATP 消費に Mg²⁺が不可欠であること等の役割が知られている。さらに近年、転写・発現の制御に関与する Mg²⁺の役割について研究が進められており、trans-regulatory function（Horlitz

and Klaff, 2000）と呼ばれる機構が提唱されている。その機構は、mRNA の分解速度（mRNA の半減期）が Mg²⁺濃度依存的であり、かつ各遺伝子固有の値を保持するものであり、本機構に関与する可能性のあるタンパク質も発見されている（Thomas et al., 2003）。ただし、Mg²⁺濃度を変化させて mRNA の半減期を測定する実験をはじめ、手法の多くは *in vitro* であり、*in vivo* での実験には至って

いない。in vivo で実験を行うための障壁としては、細胞内 Mg^{2+} 濃度の把握が難しいことに加え、細胞内 Mg^{2+} 濃度を人為的に設定する手段がないことが考えられる。

細胞内の Mg^{2+} 濃度を厳密に調整することは、細胞が恒常性を保つ上で大変重要であり、その調整を担う候補として CorA(MRS2) 遺伝子がある。CorA 遺伝子は主にサルモネラ菌 (*S. typhimurium*) で研究が進んでおり、 Mg^{2+} の吸収および排出を行っていることが報告されている (Smith and Maguire 1998)。また、酵母においては、MRS2 遺伝子 (CorA 遺伝子と同様のファミリーを形成する) が Mg^{2+} 輸送を担っていることが報告されている。これらの遺伝子の特徴として、 Mg^{2+} の吸収と排出の両方を担っていることが示唆されており、細胞内の Mg^{2+} 濃度を一定に保つ機能があるものと推察される。特に、バクテリアでは他の Mg^{2+} 輸送体が Mg^{2+} 恒常性に関与していることが明らかとなっているが、植物では、MRS2 以外の Mg 輸送体は未だ発見されておらず、MRS2 単独で細胞内 Mg^{2+} 濃度を制御している可能性が高い。

当申請者はこれまでに、植物における Mg^{2+} 吸収・移行・恒常性の研究を始めるにあたり、イネにおいて MRS2 のオーソログ遺伝子を検索し、 Mg 輸送能が欠損した酵母 (CM66) を用いた機能的相補実験を行い、イネにおいて 3 つの MRS2 遺伝子が Mg^{2+} 輸送能を持つことを発見した。これに加え、植物ではシロイヌナズナで 2 つの MRS2 遺伝子に Mg^{2+} 輸送能があることが既に判明している (Li et al. 2001)。現在解析している Mg 輸送体は全て MRS2 ファミリーであるから吸収と排出を担っている可能性が高い。よって、これら Mg 輸送体を用いて酵母内の Mg^{2+} 濃度を人為的に設定することが可能なのではないかと発想に至った。

<参考文献>

Cowan, J.A. (2002). "Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes". *BioMetals* 15: 225-235.

Horlitz and Klaff (2000). "Gene-specific trans-regulatory functions of magnesium for chloroplast mRNA stability in higher plants". *The Journal of Biological Chemistry* 275(10): 35638-35645

Li et al. (2001). "A novel family of magnesium transport genes in arabidopsis". *The Plant Cell* 13:

2761-2775

Smith and Maguire (1998). "Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity". *Molecular Microbiology* 28(2): 217-226

Thomas et al. (2003). "CSP41a a multifunctional RNA-binding protein, initiates mRNA turnover in tobacco chloroplasts". *The Plant Journal* 36: 842-852

2. 研究の目的

Mg 輸送能を欠損させた酵母と輸送能の異なった Mg 輸送体を駆使することで、細胞内 Mg^{2+} 濃度を任意に設定できる酵母ラインの作成を目的とする。酵母の Mg 含量・吸収様式解析には破壊実験による Mg 濃度の定量に加えて、放射性同位元素を用いる。本実験系を用いることで、mRNA 安定性や酵素の活性測定・ATP 利用効率への Mg の関与を in vivo で試験することが可能となる。

3. 研究の方法

<遺伝子の単離と酵母への導入>

RAP-DB (The Rice Annotation Project DataBase) と TIGR Plant Transcript Assemblies database を利用し、AtMRS2 のアミノ酸配列をクエリーとして BLAST 検索を行い、イネにおいて相同性の高い配列を列挙した。cDNA や ORF の配列情報は RAP-DB および KOME データベース (Knowledge-based Oryza Molecular biological Encyclopedia) に登録されている情報を参照し、イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) から得られた cDNA の塩基配列を解読して決定した。当該ファミリーには全部で 9 個の候補遺伝子が存在し、これらを OsMRS2-1 から -9 とした。これらの ORF 部分は pENTR/D-TOPO vector に導入し、pYES-DEST52 と LR 反応にて、酵母での発現ベクターを作成した。酵母は CM52 株 (野生型株)、ALRI/2 を欠損した CM66 株を用いた (Gardner 博士提供)。

< Mg 輸送能欠損酵母を用いた機能相補実験>

1. 形質転換酵母をウラシル抜き SC 平板培地で画線培養し、シングルコロニーアイソレーションを行った。
2. 単一コロニーをピックアップし、 Mg を終濃度 20 mM で含有させた SC-URA+アンピシリン液体培地に継代し、30 °C でプレインキュベーションした。
3. OD600 が 0.5~1.0 の時点で培養を止め、

4,000×g で1分間遠心して集菌した。
4. Mg を除いた SC-URA 培地を加え、ボルテックスにより酵母を再懸濁させ、再び4,000×g で1分間遠心して集菌する洗浄操作を3回繰り返した。
5. それぞれの酵母の OD600 を合わせた後、細胞数が 10²~10⁴ となる様に希釈系列を作製し、Mg 濃度を 0~200 mM の間で設定した SC-URA 平板培地に 2 µl ずつスポットして、コロニーの形成を毎日観察した。また、プレートリーダー (DS Pharma Biomedical 社製) を用いて OD600 を経時的に測定し、0~36 時間までの増殖曲線を比較した。各遺伝子についてコロニーを 3 つずつピックアップし、3 連のデータとした。
<放射性同位体マグネシウム 28 の製造と酵母での吸収実験>

Iwata et al., (1992) の方法を一部改変して行った。

1. 純アルミニウム箔 (99.999%、ニラコ: 厚さ 0.1 mm、直径 10 mm) 20 枚に対して、AVF サイクロトロン (CYRIC、東北大学) で発生させた 50 MeV アルファ線ビーム (約 3 µA) を約 6 時間照射し、²⁷Al (α , 3p) ²⁸Mg の核反応で ²⁸Mg を製造した。
2. 照射終了後の純アルミニウム箔を照射側から 10 枚分取り出し、少量の酢酸銅存在下において 20ml の 3N HCl で完全に溶解した。
3. 溶解液はロータリーエバポレータで減圧乾固させた後、4ml の 2M NH₄SCN 溶液に再溶解した。
4. この再溶解液を、4 本連結させた Sep-Pak Plus tC18 カートリッジ (Waters) を通し、溶出液を回収した。なお、カートリッジはあらかじめ、メタノールと 2ml の tri-n-butyl phosphate (TBP、和光)、さらに 10ml の 2M NH₄SCN 溶液で洗浄しておいた。
5. 溶出液回収後のカートリッジに、4ml の 2M NH₄SCN 溶液を通してさらに溶出液を集め、これらの回収液を混合した後、20ml の 0.5M シュウ酸溶液を加えた。
6. この溶液を陽イオン交換樹脂に通した後、400ml の 0.5M シュウ酸溶液を通すことでアルミニウムを除去したのち、40ml の 0.01N HCl で洗浄した。なお、イオン交換樹脂としては、陽イオン交換樹脂 AG50W-X4 (H⁺; 100-200 mesh) を内径 12mm のガラスカラムに 22cm の高さまで詰め、洗浄のため 150ml の 2M HCl、次に 15ml の脱イオン蒸留水、最後に 0.5M シュウ酸溶液 100ml を通過させたものを用いた。
7. 続いて 60ml の 2N HCl をカラムにマウントし、最初に溶出した 20ml は捨て、次に溶出した 40ml 中の ²⁸Mg を回収した。
8. この回収液を減圧乾固し、脱イオン蒸留水に再溶解させて再度減圧乾固する操作を 2 回繰り返した後、脱イオン蒸留水に溶解した

ものを、28Mg 溶液として回収した。
9. OD が 0.5-1.0 付近の酵母について、OD を約 0.1-0.3 に調整し、製造した ²⁸Mg を 40kBq/ml の濃度で投与した。5 時間後、酵母に取り込まれた ²⁸Mg を定量した。

<参考文献>

Iwata R, Kawamura M, Ido T, Kimura S 1992: Chromatographic purification of no-carrier-added magnesium-28 for biological studies. J. Radioanal. Nucl. Chem., 159(2), 233-237.

4. 研究成果

<OsMRS2 の Mg 輸送能の解析>

Mg を 1.0 mM 含有させた SC-URA 平板培地に形質転換酵母をスポットし、2 日後のコロニー形成の様子および、Mg を 0.1 mM、1.0 mM 含有させた SC-URA 液体培地で増殖曲線を比較した。Mg 濃度が 1.0 mM の平板培地では、OsMRS2-1/3/6/9 の導入酵母はネガティブコントロール (以下、N. C.) よりもコロニー形成速度が大きく、Mg 輸送能を有することが示唆された。一方、OsMRS2-2/4/5/7/8 の導入酵母は、N. C. よりもむしろ増殖が抑制される結果となり、Mg 輸送能の有無を判定することが出来なかった。Mg 濃度を 0.1 mM に設定した液体培地では、OsMRS2-6 の導入酵母の増殖速度が N. C. に比べて顕著に大きかった。ところが、Mg 濃度が 1.0 mM の液体培地では、OsMRS2-1 導入酵母の増殖速度が最も大きく、次いで OsMRS2-3/6/5 導入酵母のが N. C. の増殖速度を上回った。したがって、この酵母を用いた 2 つの実験系において OsMRS2-1/3/5/6/9 の Mg 輸送能が確認され、特に OsMRS2-6 は 0.1 mM、OsMRS2-1 は 1.0 mM 以上の Mg 濃度で高い Mg 輸送能を有するタンパク質であることが示唆された。さらに、OsMRS2-6 の導入酵母では、Mg 濃度を 20 mM 以上とした場合は増殖が抑制される傾向が確認された。このことから、細胞内方向への輸送活性が高い故に、細胞内蓄積量が過剰となっている可能性が考えられた。

形質転換酵母を Mg を除いた培地で 1 日間培養し、細胞内の Mg 濃度の減少を確認した後、Mg を 0.2 mM 含有する培地に継代し、2 時間後に酵母を採取して細胞内の Mg 濃度を測定した。すると OsMRS2-1/6 の導入酵母では急激な細胞内 Mg 濃度の回復が見られ、細胞内への Mg 輸送を介することが確認された。AtMRS2 ファミリーの報告においては、本実験と同様に CM66 株を用いて 0.1 mM の Mg 濃度で AtMRS2-11 の機能相補性が確認され、OsMRS2-6 が同様の濃度帯で Mg 輸送を担うオーソログであることが推察された。

²⁸Mg により、OsMRS2-1 と OsMRS2-6 の輸送速度を求めたところ、OsMRS2-6 は OsMRS2-1 の約 3 倍の Mg 吸収速度であった (図 1)。

今回判明した輸送体を駆使することで、様々な細胞内 Mg 濃度をもった酵母が作成できることが示唆されたが、mRNA として最も重要なサイトゾルの Mg 濃度を評価する必要があり、今後の課題である。

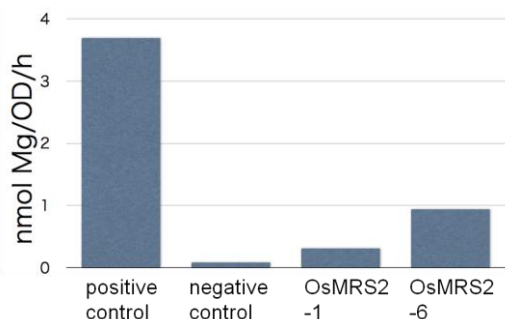


図1 酵母における 28Mg の取り込み実験による Mg 吸収速度の解析

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 2 件)

1. 田野井 慶太郎; 斉藤 貴之; 岩田 直子; 大前 芳美; 広瀬 農; 小林 奈通子; 岩田 錬; 中西 友子, “28Mg の製造とイネにおける Mg 吸収解析への利用”, RADIOISOTOPES 60 299-304 (2011).
2. 田野井 慶太郎; 小林 奈通子; 斉藤 貴之; 岩田 直子; 大前 芳美; 広瀬 農; 岩田 錬; 中西 友子, “アルミニウム及び阻害剤で処理されたイネ根における Mg 吸収様式の 28Mg イメージング解析”, RADIOISOTOPES 60 497-503 (2011).

[学会発表] (計 14 件)

1. Tanoi, K.; Saito, T.; Iwata, N.; Kobayashi, N. I.; Hirose, A.; Ohmae, Y.; Iwata, R.; Suzuki, H. and Nakanishi, T. M., “Application of Mg-28 to the Kinetic Study of Mg Uptake by a Rice Plant”, MARC IX (9th International Conference on Methods and Applications of Radioanalytical Chemistry) (Kailua-Kona, Hawaii USA) (2012, Mar 28).
2. Kobayashi, N. I.; Iwata, N.; Saito, T.; Suzuki, H.; Iwata, R.; Tanoi, K. and Nakanishi, T. M., “Application of Mg-28 for Characterization of Influx and Efflux of Mg in The Roots of Rice Seedlings Under Low pH and High Salinity”, MARC IX (9th International Conference on Methods and Applications of Radioanalytical Chemistry) (Kailua-Kona, Hawaii USA) (2012, Mar 28).

3. 田野井 慶太郎; 斉藤 貴之; 岩田 直子; 小林 奈通子; 広瀬 農; 大前 芳美; 岩田 錬; 鈴木 寿, “放射性同位体マグネシウム-28 を用いたイネにおける Mg 吸収様式の解析”, 第 53 回日本植物生理学会年会 (京都産業大学) (2012, Mar 18).

4. 小林 奈通子; 岩田 直子; 斉藤 貴之; 鈴木 寿; 岩田 錬; 田野井 慶太郎; 中西 友子, “イネの根におけるマグネシウムの吸収輸送様式の解析”, 第 53 回日本植物生理学会年会 (京都産業大学) (2012, Mar 16).

5. 斉藤 貴之; 小林 奈通子; 岩田 直子; 中西 友子; 田野井 慶太郎, “イネにおけるマグネシウム輸送体遺伝子 (MRS2 オーソログ) の発現解析 - 遺伝子ファミリーの発現部位、発現量の変動について -”, 日本土壤肥料学会 2011 年大会 (つくば国際会議場) (2011, Aug 8).

6. 岩田 直子; 小林 奈通子; 斉藤 貴之; 岩田 錬; 田野井 慶太郎; 中西 友子, “Multi-compartment box を用いたイネの根におけるマグネシウムの吸収輸送機構の解析”, 日本土壤肥料学会 2011 年大会 (つくば国際会議場) (2011, Aug 8).

7. 小林 奈通子; 斉藤 貴之; 岩田 直子; 田野井 慶太郎; 中西 友子, “イネにおけるマグネシウム欠乏応答の解析”, 日本土壤肥料学会 2011 年大会 (つくば国際会議場) (2011, Aug 8).

8. 田野井 慶太郎; 斉藤 貴之; 岩田 直子; 小林 奈通子; 広瀬 農; 大前 芳美; 岩田 錬; 中西 友子, “マグネシウム-28 の製造・精製とイネの Mg 吸収解析”, 日本土壤肥料学会 2011 年大会 (つくば国際会議場) (2011, Aug 8).

9. Kobayashi, I. N.; Saito, T.; Iwata, N.; Iwata, R.; Nakanishi, T. M. and Tanoi, K., “Magnesium Deficiency Responses in Rice”, Plant Growth Regulation Society of America (Intercontinental Hotel (Chicago USA)) (2011, Jul 25).

10. Iwata, N.; Kobayashi, I. N.; Saito, T.; Iwata, R.; Tanoi, K. and Nakanishi, T. M., “The Magnesium Uptake and Transport Manner in Rice Root”, Plant Growth Regulation Society of America (Intercontinental Hotel (Chicago USA)) (2011, Jul 25).

11. Kobayashi, I. N.; Saito, T.; Iwata, N.; Nakanishi, T. M. and Tanoi, K., “Physiological Characterization of Magnesium Deficiency Responses in Rice Society for Experimental Biology Annual Main Meeting”, Conference Centre in Glasgow (England) (2011, Jul 3).

12. 田野井 慶太郎; 斉藤 貴之; 岩田 直子; 小林 奈通子; 広瀬 農; 大前 芳美; 岩

田 鍊; 中西 友子, “放射性同位元素マグネシウム-28 の製造とイネ吸収実験への利用”, 第 52 回日本植物生理学会年会 東北大学 (2011, Mar 21).

1 3. 齊藤 貴之; 小林 奈通子; 田野井 慶太郎; 中西 友子, “イネにおけるマグネシウム輸送体 MRS2 オーソログの遺伝子発現解析”, 第 52 回日本植物生理学会年会 東北大学 (2011, Mar 21).

1 4. 齊藤 貴之; 岩田 直子; 小林 奈通子; 田野井 慶太郎; 中西 友子, “イネにおけるマグネシウム輸送体遺伝子 MRS2 オーソログの発現解析”, 日本土壤肥料学会 2010 年大会 (北海道大学) (2010, Jul 7).

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

放射線植物生理学研究室 HP (申請者所属研究室)

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/radio-pla ntphys/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田野井慶太郎 (Keitaro Tanoi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 90361576

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者