

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651213

研究課題名(和文)機能株群集成長解析を活用した植物有害物質膜輸送体の包括的機能ゲノム解析

研究課題名(英文)A new methodology to elucidate a molecular function of a membrane transporter gene in plant genome

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物ゲノムに存在する多数の膜輸送体様タンパク質の分子機能を解明するための新たな方法論を検証した。モデル植物シロイヌナズナの約1,400の膜輸送体候補遺伝子の97%についてクローン化し、酵母過剰発現株を作製した。ストレス下での集団成長解析により、ストレスの原因物質と膜輸送の関連づけることができる。また、系を工夫することでより一般的な化合物を輸送する膜輸送体の評価も可能である。

研究成果の概要(英文)：A new methodology to elucidate a molecular function of a large number of membrane-transporter-like proteins in plant genome was developed. 97% of 1,400 candidate genes in Arabidopsis were cloned. By analyzing growth of yeast over expression lines, relationships between genes and a cursive agent can be assessed. Moreover, range of applications of the method was extended to more general compounds.

研究分野：植物分子生物学、膜輸送

キーワード：膜輸送

1. 研究開始当初の背景

自由移動が出来ない植物は塩や重金属、農薬など環境中の有害物質による細胞ストレスから自らを守るため、有害物質を細胞外に排出したりオルガネラである液胞に隔離したりする。逆に、捕食者である動物や、寄生する細菌・真菌に対する防御のため、アルカロイドやフラボノイド、シアン化物など自らにとって有害な二次代謝産物を合成して細胞外や液胞に蓄積する。

こうした有害物質の細胞レベルでの流入、排出、液胞への出し入れ、合成する器官から蓄積する器官への移動(根から葉へなど)には、様々な膜輸送体が関わっていると予想されているが、不明なものが多い。一方、解読の進む植物のゲノム情報からは膜輸送体様のタンパク質をコードする遺伝子が一生物種あたり千の単位で見出されるがその大部分は機能未知である。よって、有害物質と膜輸送体候補分子を関連づけることができれば、植物の有害物質輸送とゲノムの理解に貢献できると考えた。

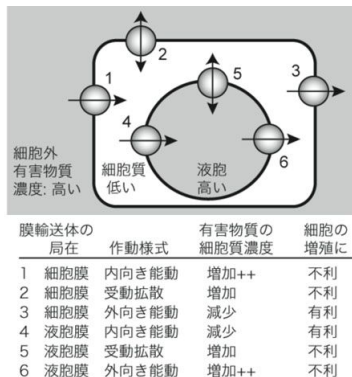


図 想定膜輸送と有害物質に対する効果

2. 研究の目的

多くの生物ゲノムには膜輸送体様タンパク質をコードする遺伝子が千を超えて存在し、それらの分子機能解明が待たれている。応募者は、モデル植物シロイヌナズナのゲノム情報から予想した約1,400の候補遺伝子について、クローン化と強制発現による網羅的な機能検証を進めている。本研究では酵母を宿主として植物膜輸送体を過剰発現させ、その機能を推定するための新たな方法論の確立を試みた。

具体的には、酵母の生育を阻害する有害物質と、植物においてその有害物質を輸送する膜輸送体の組み合わせを想定し、膜輸送体を過剰発現すると、細胞内の有害物質濃度が上昇/下降することで、成長速度が減少/増加すると仮定した。すなわち、特定の有害物質ストレス条件下において、特定の遺伝子をもつ形質転換体は、それと無関係な膜輸送体の形質転換体と比べると、生長速度が変化する。よって、あらかじめ全ての候補遺伝子の形質転換株の均一化集団を用意し、集団ごとスト

レス条件下にさらした場合に、生長量が変化するクローンを特定することで、有害物質と膜輸送体を関連づけられると考えた。

上記の作業仮説の検証と実証プラットフォームを用意するため、シロイヌナズナ膜輸送体候補遺伝子群の完全なクローニングと酵母発現系の確立、モデル有害物質での集団生育試験をおこなった。また集団生育試験で得られた、膜輸送体候補遺伝子の植物での機能について検証実験を行った。また、成長速度解析を有害物質以外の一般的な植物内在化合物に広げるための方法論を検討した。

3. 研究の方法

研究代表者らの研究グループでは、モデル植物シロイヌナズナのゲノムに存在する遺伝子がコードするタンパク質の一次構造を調べ、疎水性領域を6カ所以上もつものを「膜輸送体様タンパク質」として定義している。簡便な基準のため、疎水性領域が少ない膜輸送体については定義もれの弱点があるものの、既知の膜輸送体ホモログだけでなく未知の膜輸送体群についても調査対象にしているという特徴がある。約1400種の候補遺伝子全てについて、総当たりもしくは包括的機能解析を行う目的で、以前よりクローニングを進めてきたが、対象遺伝子の一部は正常なcDNAクローニングができない状態にあった。クローニング宿主の大腸菌内でリーク発現し生育を阻害することが理由として考えられたため、本研究では、エントリークローンベクターを酵母発現ベクターに変更するとともに、目的遺伝子についてはイントロン配列を含むゲノムDNAを許容してクローニングを進めた。

モデル植物シロイヌナズナの膜輸送体遺伝子発現ライブラリ Amethyst

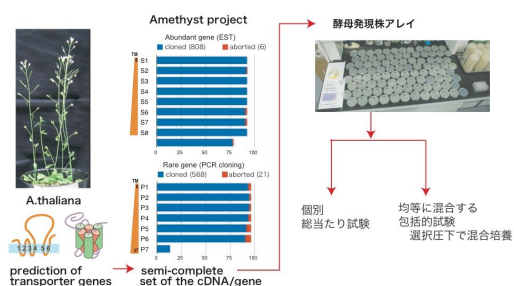


図 膜輸送体遺伝子過剰発現ライブラリ

パン酵母異種発現系で膜輸送体の機能解析を行うため、遺伝子ライブラリを酵母発現ベクターに組み換えたのち、パン酵母を形質転換した。

ストレス条件下での酵母過剰発現株集団の生育試験の一例として、過剰な亜鉛存在下での生育を調べた。亜鉛は細胞内の情報伝達や酵素の補因子として必須の無機栄養素である一方、細胞内に大過剰に存在すると有害物質として振る舞う。パン酵母では特に、液

胞の機能が不十分な場合に亜鉛感受性が高まることが知られているため、液胞型 ATPase の欠損株に遺伝子ライブラリを導入し培養試験を行った。その結果、高濃度亜鉛を含む培地で過剰発現株集団を培養すると、いくつかの植物遺伝子を含むクローンの割合が対照実験に比べ 100 倍以上増加することが分かった。興味深い遺伝子について、植物過剰発現株を作出して機能を検証した

本研究で提案する実験系で膜輸送を評価するための前提条件として、輸送体の基質が宿主（酵母）の生長量を抑制もしくは促進する必要がある。この制限を突破することで研究手法の汎用性がより広まると考え、以下のように研究を展開した。

酵母ツーハイブリッドシステム（Y2H）の改良版であるスリーハイブリッドシステム（Y3H）の構成要素として、目的化合物に結合性のタンパク質を用いると、細胞内の物質濃度を測る人工センサーとによりレポーター遺伝子の出力を制御可能になる。Y3H のレポーター遺伝子に必須栄養素合成遺伝子など順選抜遺伝子を用いると、中立的な化合物の細胞質濃度を見かけの生育促進化合物濃度に情報変換できる。一方、レポーター遺伝子に逆選抜遺伝子を用いると、中立化合物濃度を見かけの生育抑制化合物濃度に情報変換できる。

酵母では内在・外来の様々なレポーター遺伝子が実用化されているが、本研究の目的達成のためには、これまでに報告例のない外来種由来でかつ逆選抜マーカーとして働きうるタイプの遺伝子を必要とした。そこで、それ自体は毒性が低いが化学反応により毒性の高い物質に転化される薬剤前駆体（プロドラッグ）と、その反応を触媒する酵素（プロドラッグ活性化酵素）遺伝子に注目し、逆選抜マーカーとして利用可能か検討した。5 種類のプロドラッグについて、外来の活性化酵素遺伝子 7 種類（動物由来 5、植物由来 1、細菌由来 1）を強制発現させた結果、4 種類の組み合わせで、導入遺伝子依存的にプロドラッグ感受性の増加、すなわち逆選抜による生育抑制が観察された。そのうち 2 種類の遺伝子については、イーストハイブリッドシステムのレポーターとして組み込み、常時活性化型の転写因子とプロドラッグの組み合わせで、生育抑制がかかることを確認した。

次に、酵母の生育に中立なモデル化合物としてモリブデン酸（Mo）を選択し、大腸菌 Mo 結合蛋白質を用いた Y3H システムを構築した。人工 Mo 評価株は培地の Mo 濃度に応じて順選抜の表現型を示すとともに、プロドラッグ存在下で生育が抑制される逆選抜表現型を示した。さらに、細胞内 Mo 濃度を変える既知のエフェクターとしてシロイヌナズナ MOT1 輸送体の過剰発現の効果を確認した。最後に、Mo 評価株とシロイヌナズナ膜輸送体遺伝子発現ライブラリを接合させて集団生育解析に供した。

順逆レポーター遺伝子を用いたモリブデン酸膜輸送体の評価

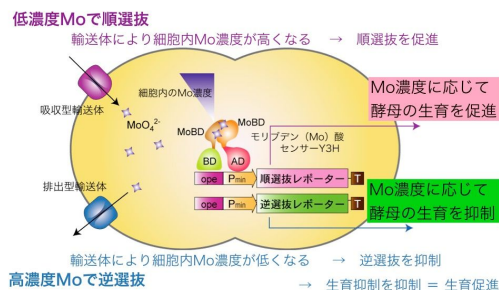


図 Y3H と順逆レポーターで酵母の生育に中立的な化合物の濃度変化を調べる方法

4. 研究成果

本研究の目的とするところは、実験手法のモデル検証でなく、実際にシロイヌナズナ遺伝子の包括的な機能解析に実践的に使用可能なリソースの開発にあった。よって、クローニング困難な一部の候補遺伝子も含め、遺伝子クローニングにかなりの労力を割いた。

その結果、新たに 100 種程度の遺伝子クローニングに成功し、クローン化率が全体で約 97% に達したため、シロイヌナズナ膜輸送体遺伝子ライブラリ Amethyst は完成の域に達したと判断した。

酵母発現ライブラリへの転換も、クローニングに成功した遺伝子全てについて、個別遺伝子を導入した酵母発現株アレイと、それらを均等に混合した均一化ライブラリを得た。遺伝子の網羅性と、形質転換体集団の均等性において、あらたに作出したライブラリは大きく向上しており、個別総当たり解析、包括的機能解析のいずれでもより精密な実験が可能になった。なお、酵母は真核生物なので前述のゲノム DNA を含むクローンについても、目的とするシロイヌナズナ膜輸送体を過剰発現しているものと考えられる。関連して、酵母実験系に比べると遺伝子のカバー率が低い、動物細胞やシロイヌナズナ形質転換植物の Amethyst 集団も作出した。

高濃度亜鉛をモデル有害物質として適用した集団生育試験で実際に、亜鉛輸送体や宿主酵母で欠損させた液胞型 ATPase サブユニットのホモログを含む形質転換クローンの割合が、対照実験と比べ変化することが示され、作業仮説が検証された。亜鉛培地で割合が増加する、クローンには亜鉛以外の金属イオン輸送体ホモログ X も含まれる。興味深いことに、ストレス下での生育が背景集団より優れるクローンの中に、これまで重金属との関連性が指摘されていないアミノ酸輸送体ホモログ Y があった。そこで、Y 遺伝子を植物過剰発現ベクターに移し替えて、シロイヌナズナを形質転換したところ、形質転換体の亜鉛感受性は対照と同程度であったが、銅やアルミニウムに対する耐性の獲得を示す予備的な知見を得ている。また、特異抗体を用

いた密度分画した膜画分の解析、および GFP 融合蛋白質の蛍光パターンから Y は植物細胞内で ER 膜もしくは液胞膜に分布することがわかった。Y のヒトホモログはリソソームへの局在と、遺伝病に関連することが報告されている。Y がどのように重金属輸送・重金属ストレスと関連するかについては今後の課題である。X や Y と重金属との関連づけが正しいかどうかは、より詳細な検証が待たれるが、本研究で提案する方法論が、既知遺伝子のホモログ解析と異なり、未知の関連因子の探索に優れることを示している。

植物膜輸送体の輸送基質の多くは、それがたとえ植物にとって重要な栄養素や生理活性物質でも、パン酵母の生育にとって益にも害にもならない物質と考えられる。よって、それらを直接酵母の生育表現型で評価することは不可能である。そこで、低分子化合物の濃度を、酵母の生育速度に影響する別の物質濃度の情報に変換することのできる、酵母スリーハイブリッドシステムを活用した。また、ライブラリ解析のために新たに逆選抜遺伝子を用意した。

Y 3 H と新たに開発した外来逆選抜レポーター遺伝子を組み合わせる方法は、遺伝学的に優性のため、既存の様々な酵母株、遺伝子発現ライブラリ、発現株アレイとの適合性がよい。実際に M o Y 3 H 株と、遺伝子ライブラリを接合させて行った集団生育のモデル実験から、細胞内モリブデン酸の濃度を变化させるエフェクター分子をスクリーニングすると既知の M O T 1 に加え、いくつかの候補膜輸送体遺伝子が見つかった。これらは植物における M o 輸送システム解明のヒントになりうる。Y 3 H システムを必要に応じて入れ替えることにより、植物ホルモンなどの植物生理活性物質についても細胞内濃度を調節する膜輸送体発見への手がかりが得られると期待される

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)

[雑誌論文](計3件)

1. Nakanishi, Y., Iida, S., Ueoka-Nakanishi, H., Niimi, T., Tomioka, R., and Maeshima, M., Exploring dynamics of molybdate in living animal cells by a genetically encoded FRET nanosensor, *PLoS One*, 8 (3), e58175, 2013

2. Ueoka-Nakanishi, H., Sazuka, T., Nakanishi, Y., Mori, H., Maeshima, M., and Hisabori, T., Thioredoxin-h regulates calcium-signaling proteins in plasma membranes, *FEBS Journal*, 280, 3220-3231, 2013

3. Yoshida, K., Ohnishi, M., Fukao, Y.,

Okazaki, Y., Song, C., Hayashi, F., Fujiwara, M., Nakanishi, Y., Saito, K., Shimmen, T., Suzaki, T., Fukaki, H., Maeshima, M., and Mimura, T., Local distribution of membrane proteins on vacuoles isolated from Arabidopsis suspension-cultured cells, *Plant and Cell Physiology*, 54, 1571-1584, 2013

[学会発表](計13件)

1, 中西 洋一, 武村 みどり, 木村 ゆり, 佐古 建志, 前島 正義, 植物色素アントシアニンの発色にかかわる膜輸送体の研究, 日本植物生理学会年会, 東京農大, 2015.3

2, 中西洋一, 川嶋輝美, 前田道子, 鶴飼杏奈, 前島正義, ハンセンラ酵母モリブデン輸送体の探索, 日本農芸化学会大会, 東京, 2014.3

3, 川嶋輝美, 今井悠, 藤原徹, 前島正義, 中西洋一, 酵母発現系を用いた総当たり解析による植物膜輸送体のモリブデン酸吸収輸送能評価, 日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12

4, 中西洋一, 川嶋輝美, 前島正義, 酵母の新規薬剤逆選抜マーカー遺伝子とイーストハイブリッド逆レポーターとしての活用, 日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12

5, Nakanishi, Y., Kawashima, T., Iida, S., Fujiwara, T., Maeshima, M., Imaging analysis of molybdate in vivo by a genetically encoded FRET nanosensor, *International Workshop on Plant Membrane Biology XVI*, Kurashiki Geibunkan, Kurashiki, 2013年3月28日

6, 中西洋一, 川嶋輝美, 前田道子, 佐古建司, 前島正義, 改良型PCRによる植物ジェノタイピングの簡便化, 日本植物生理学会2013年度年会, 岡山大学, 2013年3月21日

7, 川嶋輝美, 飯田俊太郎, 藤原徹, 中西洋二, イメージ解析による植物モリブデン酸膜輸送システムの研究, 第35回日本分子生物学会大会, 福岡国際会議場, 2012年12月13日

8, 中西洋一, 川嶋輝美, 中西華代, 新美友章, 前島正義, FRET ナノセンサーを用いた動物細胞のモリブデン酸吸収システムの解析, 第35回日本分子生物学会大会, 福岡国際会議場, 2012年12月12日

9, 結川直哉, 中塚比呂記, 周宝, 中西洋一, 前川裕美, 金子嘉信, 原島俊, メタノール資化性酵母におけるリン酸シグナル伝達系遺伝子の遺伝学的同定, 第35回日本分子生物学会大会, 福岡国際会議場, 2012年12月

10, 川嶋輝美, 前田道子, 中西華代, 中西洋二, 改良型酵素液を用いたかんたんPCRジェノタイピング, 北陸合同バイオシンポジウム, あわら温泉「美松」, 2012年11月3日

11, 川嶋輝美, 前田道子, 中西華代, 中西洋二, 改良型酵素液を用いたかんたんPCRジェ

ノタイプング，日本農芸化学会中部支部第166回例会，福井県民ホール，2012年11月2日

12，川嶋輝美、飯田俊太郎、藤原徹、中西洋二，モリブデン濃度を調節する膜輸送システムに関する研究，日本農芸化学会中部支部第165回例会，名古屋大学，2012年10月27日

13，結川直哉、中塚比呂記、周 瑩、中西洋二、前川裕美、金子嘉信、原島 俊，メタノール資化酵母におけるリン酸シグナル伝達系遺伝子の遺伝学的同定，第45回酵母遺伝学フォーラム研究報告会，京都大学宇治キャンパス，2012年9月

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページにおいて、論文1の概要を日本語記事で紹介した。

<http://cell.d.agr.nagoya-u.ac.jp/nakanishi/130312paperNakanishi.htm>

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

藤原徹 (Fujiwara Toru)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

新美友章 (Niimi Tomoaki)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

富岡利恵 (Tomioka Rie)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

中西華代 (Nakanishi Hanayo)

名古屋大学・理学研究科・博士研究員

川嶋輝美、佐古建志、武村みどり、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

飯田俊太郎、今井悠、鶴飼杏奈、木村ゆり： 以上4名、名古屋大学・農学部・学部学生