

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450522

研究課題名(和文)植物ポリアミン輸送体のストレス応答における機能と生理的役割

研究課題名(英文)Role of plant polyamine transporters on stress response

研究代表者

藤田 美紀 (Fujita, Miki)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：70332294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物におけるポリアミン輸送の分子メカニズムと生理的機能を解明することを目的として、植物のポリアミン輸送体RMV1/LAT1およびそのファミリー遺伝子の機能解析を行った。シロイヌナズメノムに存在する5つのLATファミリータンパク質は高い相同性を示す一方、多様な発現様式および細胞内局在性を示すことを明らかにした。また、LATファミリー遺伝子が、塩耐性に関与すること、更に、ポリアミンに加えてバラコートと輸送競合を示す別の基質の輸送にも関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have identified an Arabidopsis LAT (L-type Amino acid Transporter) family transporter gene, named Resistant to Methyl Viologen 1 (RMV1), responsible for uptake of PA and its analog paraquat (PQ). In Arabidopsis genome, there are five LAT family genes. The LAT proteins exhibited various subcellular localization suggesting that the proteins function in intracellular trafficking of PAs. To elucidate biological function of polyamine transporters, we analyzed the environmental response of lat-defective mutants. Furthermore, involvement of amino acid polymorphism in RMV1 that determines natural variation of PQ tolerance in Arabidopsis accessions in transport activity was analyzed.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ポリアミン トランスポーター ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

形態形成やストレス応答など多くの生理機能に関わる重要因子であるポリアミンは、細胞内では合成・代謝および輸送によってその濃度が精密に制御されている。これまでに植物におけるポリアミンの生合成および代謝機構に関する研究は盛んに行われ理解が進んでいるが、輸送機構に関しては、その輸送分子の探索が続けられてきたにもかかわらず、ほとんど明らかになっていなかった。このような背景のもと、申請者は植物のLATファミリーに属する膜タンパク質遺伝子RMV1が、ポリアミン輸送体であることを明らかにした(Fujita et al. PNAS 2012)。RMV1はもともと、除草剤パラコートの主成分であるメチルピオロゲン(MV)に対する耐性系統から単離したMV輸送体遺伝子であり、ポリアミンがMVの構造ホモログとして知られていたことなどから、我々はRMV1がポリアミン輸送活性を持つことを発見した。

2. 研究の目的

本研究では、植物のポリアミン輸送体RMV1/LAT1の機能解析を行い、これまで謎であった植物におけるポリアミン輸送の分子メカニズムと生理的機能を解明することを目的とする。ポリアミンはストレス応答に重要な役割を果たしており、その輸送体の環境ストレス応答における役割を明らかにすることで、ストレス耐性付与の分子育種への展開を目指す。

3. 研究の方法

植物のポリアミン輸送機構を明らかにするために、ポリアミン輸送体であるシロイヌナズナ RMV1 遺伝子とそのホモログの機能解析を中心に、以下の項目にそって研究を進めた。

LATファミリーの遺伝子発現やタンパク質局在を比較し、ファミリー遺伝子間の機能重複と分担を解析した

多重変異体および形質転換体を用いて、ホルモンやストレス応答の表現型を解析し、LATファミリー遺伝子の環境応答における役割を解析した

シロイヌナズナ野生系統間では、RMV1の配列に多型が見つかっており、この変異がMV耐性の多様性を規定している。この配列の差が輸送活性に及ぼす影響を形質転換体を用いて解析した

4. 研究成果

RMV1/LAT1の相同遺伝子LATファミリー遺伝子に注目しシロイヌナズナのゲノムに存在する5つのLATファミリー遺伝子の発現パターンを解析した。LATファミリー遺伝子のプロモーター領域をGUSレポーターに連結したコンストラクトを導入した形質転換植物を作製し、GUS染色により遺伝子発現を比較した結果、いずれの遺伝子も根での発現が観察された。加えて、RMV1/LAT1と同様に発芽

初期に発現するものだけでなく、地上部のみ、生殖器官のみなど、LAT遺伝子間で異なる発現パターンを示すことを明らかにした。次に、LATファミリータンパク質とGFPとの融合タンパク質を発現する植物を作成してLATタンパク質の細胞内局在観察を行った結果、RMV1/LAT1およびLAT2が細胞膜に局在するのに対し、LAT3タンパク質は小胞体、LAT4がゴルジ体、そして、LAT5は機能未知の構造体への局在が観察された。LATタンパク質は、同じファミリー内の相同タンパク質でありながら、様々な局在様式をとることを明らかにした。

LATファミリー遺伝子の欠失変異体の解析から、RMV1/LAT1に加え、LAT4もパラコート輸送に関与することを明らかにした(図)。

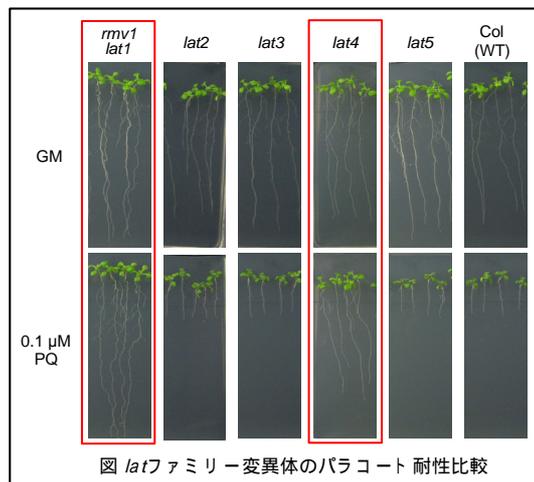


図 latファミリー変異体のパラコート耐性比較

また、ポリアミンの取り込み活性比較解析から、細胞外からのポリアミン取り込みには、LAT2が主に機能することを明らかにした。さらに、変異体の一つに塩耐性の低下する形質を見出し、ポリアミン輸送が塩耐性に関与する可能性を示唆する結果を得た。

シロイヌナズナ野生型株を用いたパラコート耐性および吸収活性解析から、RMV1/LAT1がポリアミンに加えて別の基質の吸収に関わることを見出し、パラコート耐性形質は、この基質とパラコートとの輸送競争により起こることを明らかにした。

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5件)

1. Kuromori T*, Fujita M*, Urano K, Tanabata T, Sugimoto E, Shinozaki K. (2016) Overexpression of AtABCG25 enhances the abscisic acid signal in guard cells and improves plant water use efficiency. *Plant Sci.*, 251: 75-81. (*equally contributed), 査読有
2. Takasaki H, Maruyama K, Takahashi F, Fujita M, Yoshida T, Nakashima K, Myouga F, Toyooka K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2015) SNAC-As, stress-

- responsive NAC transcription factors, mediate ABA-inducible leaf senescence. *Plant J.*, 84: 1114-1123. 査読有
3. Fujita M, Shinozaki K. (2014). Identification of Polyamine Transporters in Plants: Paraquat Transport Provides Crucial Clues. *Plant Cell Physiol.* 55(5): 855-861. (Selected as the "Editor-in-Chief's choice article"), 査読有
 4. Kobayashi Y, Ohyama Y, Kobayashi Y, Ito H, Iuchi S, Fujita M, Zhao CR, Tanveer T, Ganesan M, Kobayashi M, Koyama H. (2013) STOP2 Activates Transcription of Several Genes for Al- and Low pH-Tolerance that Are Regulated by STOP1 in Arabidopsis. *Mol. Plant* 7(2):311-22. 査読有
 5. Behnam B, Iuchi S, Fujita M, Fujita Y, Takasaki H, Yuriko Osakabe, Yamaguchi-Shinozaki K, Kobayashi M, Shinozaki K. (2013) Characterization of the promoter region of an Arabidopsis gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in dehydration-inducible transcription. *DNA Res.*, 20 (4): 315-24. 査読有

[学会発表](計 19 件)

1. 藤田 美紀, 藤田 泰成, 篠崎 一雄, “シロイヌナズナ RMV1 タンパク質はチアミン輸送に関わる” 第 58 回日本植物生理学会年会 鹿児島大学 (鹿児島・鹿児島), 3 月 16 日-18 日 2017
2. 七夕 高也, 藤田 美紀, 浦野 薫, 菊地 沙安, 篠崎 一雄, “環境ストレス評価のための自動フェノタイプングシステム”RIPPS”の開発” 第 58 回日本植物生理学会年会 鹿児島大学 (鹿児島・鹿児島), 3 月 16 日-18 日 2017
3. 藤田 美紀, 篠崎 一雄, “植物ポリアミントランスポーターのストレス応答と生理的役割” 第 11 回トランスポーター研究会年会 京都大学宇治キャンパス (京都・宇治), 7 月 2-3 日 2016
4. 藤田 美紀, 藤田 泰成, 篠崎 一雄, “シロイヌナズナポリアミントランスポーター遺伝子変異体の環境ストレス応答” 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学 (岩手・盛岡), 3 月 18-20 日 2016
5. 黒森 崇, 藤田 美紀, 杉本 絵理子, 篠崎 一雄, “AtABCG25 過剰発現による ABA シグナルの促進と植物水利用効率の向上 ” 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学 (岩手・盛岡), 3 月 18-20 日 2016
6. 高崎 寛則, 圓山 恭之進, 高橋 史憲, 藤田 美紀, 吉田 拓也, 中島 一雄, 豊岡 公德, 篠崎 和子, 篠崎 一雄, “ストレス誘導性 NAC 型転写因子 SNAC-As はアブシジン酸(ABA)による葉の老化を制御する” 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学 (岩手・盛岡), 3 月 18-20 日 2016
7. 藤田 美紀, “フェノーム解析基盤の整備” 第 4 回 Bracypodium ワークショップ つくば, 11 月 9 日 2015
8. 藤田 美紀, 篠崎 一雄, “植物ポリアミントランスポーターAtLAT ファミリーの機能解析” 第 33 回日本植物細胞分子生物学会, 東京大学 (東京・文京区), 8 月 10-12 日 2015
9. 藤田 美紀, 篠崎 一雄, “植物ポリアミントランスポーターAtLAT ファミリーの細胞内局在性による機能分担” 第 10 回トランスポーター研究会年会, 慶應義塾大学 芝共立キャンパス (東京・港区), 6 月 20-21 日 2015
10. Takasaki H, Maruyama K, Fujita M, Yoshida T, Nakashima K, Myouga F, Toyooka K, Takahashi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, “Important roles of stress-responsive NAC transcription factors SNAC-A in leaf senescence” 2015 年度農芸化学会大会 岡山大学浮島キャンパス (岡山・岡山), 3 月 26-29 日 2015
11. 藤田 美紀, 篠崎 一雄, “植物ポリアミントランスポーターAtLAT ファミリー遺伝子変異体の解析” 第 56 回日本植物生理学会年会 東京, 3 月 16-18 日 2015
12. Nakashima K, Maruyama K, Goto S, Fujita M, Urano K, Tanabata T, Ishizaki T, Selvaraj M, Dedicova B, Ishitani M, Shinozaki K, “Genetic improvement toward enhancing drought tolerance and water use efficiency in rice” International Workshop on Plant Water Stress Responses and Water-Use Efficiency Tokyo, Japan, Nov 26th 2014
13. 藤田 美紀, 篠崎 一雄, “パラコート耐性研究から見出された植物ポリアミントランスポーター” 日本植物学会第 78 回大会 明治大学生田キャンパス (神奈川・川崎), 9 月 12-14 日 2014
14. Takasaki H, Maruyama K, Fujita M, Yoshida T, Nakashima K, Myouga F, Toyooka K, Takahashi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, “Important roles of stress-responsive NAC transcription factors SNAC-A in leaf senescence.” Gordon Research Conference on Salt & Water Stress in Plants Newry, USA, August 3-8 2014
15. Tanabata T, Fujita M, Urano K, Shinozaki K, “Development of phenotype analysis system RIPPS for evaluating water stress response and water use efficiency” Plant Biology 2014 Portland, USA, July 12-16 2014
16. Fujita M, Shinozaki K, “Functional analysis of Arabidopsis polyamine/paraquat transporters” Plant Biology 2014 Portland, USA, July 12-16 2014
17. Takasaki H, Maruyama K, Fujita M, Yoshida T, Nakashima K, Myouga F, Toyooka K, Takahashi F, Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (2013). Stress-responsive NAC transcription factors involved in ABA inducible leaf senescence. Seventh EPSO

- Conference; Sep 1-4; Porto Heli, Greece.
18. Behnam B, Iuchi S, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K., Kobayashi M. and Shinozaki K. (2013). Promoter analysis of an Arabidopsis gene for 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase-3 (AtNCED3) involved in dehydration-inducible transcription. 24th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2013); June 24-28; Sydney, Australia.
 19. Fujita M and Shinozaki K. (2013). Transport of paraquat in plants is mediated by a polyamine transporter. Gordon Research Conference Polyamines; June 16-21; New Hampshire, USA.

〔図書〕(計2件)

1. Fujita M and Shinozaki K. (2015). Polyamine Transport Systems in Plants. in "Polyamines", edited by Tomonobu Kusano and Hideyuki Suzuki, pp.179-185. Springer Publishing. 査読無
2. Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Fujita M, Shinozaki K, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki K. (2013) Role of Abscisic Acid Signaling in Drought Tolerance and Preharvest Sprouting Under Climate Change. in "Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance" edited by Narendra Tuteja and Sarvajeet S. Gill, pp.521-554 Wiley Press. 査読有

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 美紀 (Miki Fujita)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源
科学研究センター・研究員
研究者番号：70332294

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし