

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650128

研究課題名(和文)植物細胞における生体膜共役輸送系の分子基盤と進化を探る

研究課題名(英文)Evolutional study on the membrane co-transport system in plant cell.

研究代表者

三村 徹郎(Mimura, Tetsuro)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20174120

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):生体膜共役輸送系は、栄養物質や老廃物の輸送に働き、細胞存続の基盤となる。共役イオンとしてH⁺共役型とNa⁺共役型が知られているが、陸上高等植物はH⁺共役型である。我々は祖先植物シャジクモのリン酸輸送系はNa⁺共役型であることを報告し、本研究においてその輸送系遺伝子の全長決定に成功した。配列系統解析から、シャジクモのリン酸輸送体は、全ての陸上植物の祖先型となり、アオミドロなど一つのクレードを形成した。配列情報の解析から、H⁺輸送に必要とされるアミノ酸残基が保存されておらず、Na⁺共役であることが強く示唆された。また、最初の陸上植物と考えられているゼニゴケについても系統、生理解析を進めている。

研究成果の概要(英文):The membrane co-transport systems work on the uptake of nutrition or extrusion of wastes. This is the fundamental mechanism of all living cells. There are two kinds of co-transport systems; H⁺ coupled or Na⁺ coupled. The land plants usually have H⁺ coupled co-transport systems. We have reported that the phosphate (Pi) transport system of characean plant, which is an ancestor of land plants is a Na⁺ coupled type. In the present study we succeeded in sequencing the full length of a gene of the Pi transporter in Chara cells. From sequence analysis, Chara Pi transporter was the ancestor type of all land plants and formed a single clade together with Spirogyra. In Chara Pi transporter gene, amino acid residue required for H⁺ coupled transport was not kept, and this strongly suggests that Chara Pi transporter is a Na⁺ coupled type. In addition, we are analyzing about Pi transport systems of the first land plant; the liverwort.

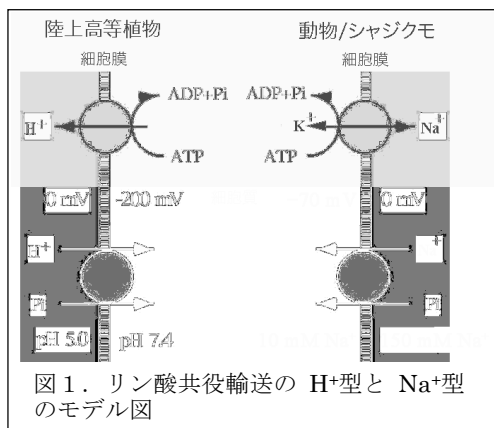
研究分野：植物細胞生物学

キーワード：共役輸送 リン酸 シャジクモ ゼニゴケ 進化

1. 研究開始当初の背景

全ての細胞において、栄養物質の取り込みや老廃物の排出の大半が生体膜の共役輸送系によって行われる。共役輸送系は、細菌や菌類の多くと植物では H^+ の電気化学ポテンシャル勾配で、細菌の一部と動物では Na^+ の電気化学ポテンシャル勾配で駆動される。種子植物の膜輸送活性は細胞膜 H^+ -ATPase による H^+ の排出と起電力形成に依存する。

陸上植物の祖先の一つとされるシャジクモは、古くから膜輸送のモデル細胞として研究が進められてきた。申請者の三村は、約 10 年前に必須栄養素のリン酸の輸送が、シャジクモでは Na^+ 依存であることを初めて証明した(図 1)。近年確立したシャジクモ類の EST データベースから、シロイヌナズナと相同性を持つリン酸輸送体遺伝子の探索を行ったところ、ただ一つの遺伝子が見つかり、それはシロイヌナズナが持つ 9 つの細胞膜リン酸輸送体全ての祖先型であることが判明した。このことは、陸上植物が進化する過程で、 Na^+ 共役輸送系が H^+ 共役輸送系に変わったことを強く示唆していた。



2. 研究の目的

本研究では、高等植物の H^+ 共役リン酸輸送系が、シャジクモのリン酸輸送系とどのように異なっているのか、またその輸送系がどのように進化してきたのかを検討する。

生理学的研究からは、シャジクモのリン酸輸送が $1Pi/6Na^+$ の共役輸送を行うことが判っている。EST データから明らかになったリン酸輸送体がこの輸送活性を担うかどうかを、酵母発現系等を用いて明らかにすることを目指す。さらに、シロイヌナズナリン酸輸送体との比較解析から、共役イオンとして H^+ と Na^+ を使うことの差がどのような構造に依存するのかを明らかにし、最後に植物の共役輸送系がどのように進化してきたのかを、他の植物群とも比較しつつ明らかにする。

3. 研究の方法

(1) シャジクモ (*Chara braunii*) のリン酸輸送機構の解析

Na^+ 依存のリン酸輸送機構の存在が証明されているのはオーストラリアシャジクモ (*Chara australis*) である。ここでは、ゲノムや EST データが整備されつつある *Chara braunii* のリン酸輸送機構が Na^+ 依存であるかどうかの検証を、リンの放射性同位体を用いて検証した。

(2) *Chara braunii* の EST データを利用したリン酸輸送体遺伝子の同定と単離

Chara braunii の EST データベースから、シロイヌナズナと相同性を持つリン酸輸送体遺伝子の探索を行ったところ、ただ一つの遺伝子が見つかった。この遺伝子は、全長が明らかではなかったため、ゲノムデータや新たに作成した cDNA から全長のシーケンスを行った。

(3) リン酸輸送体遺伝子の輸送活性の測定

共役膜輸送系においては、配列データのホモロジーだけから共役イオンを一義的に決めることはできない。そこで、全長を単離した *Chara braunii* リン酸輸送体遺伝子を酵母に形質転換し、リン酸輸送活性を測定することを試みた。

(4) ゼニゴケのリン酸輸送活性の測定

陸上植物として進化段階の基部に近いとされるゼニゴケのリン酸輸送機構について、生理活性解析と遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) シャジクモ (*Chara braunii*) のリン酸輸送機構の解析

シャジクモ (*Chara braunii*) のリン酸輸送機構が Na^+ 依存であるかどうかと、リン欠乏環境下においてリン酸輸送活性の上昇が生じるかの検証を、リンの放射性同位体を用いて検証した(図 2)。

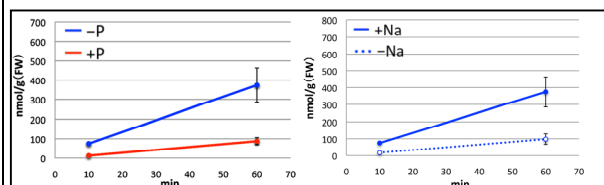


図 2. シャジクモリン酸輸送能。左：リン欠乏下での輸送活性。右： Na^+ の有無によるリン酸輸送活性

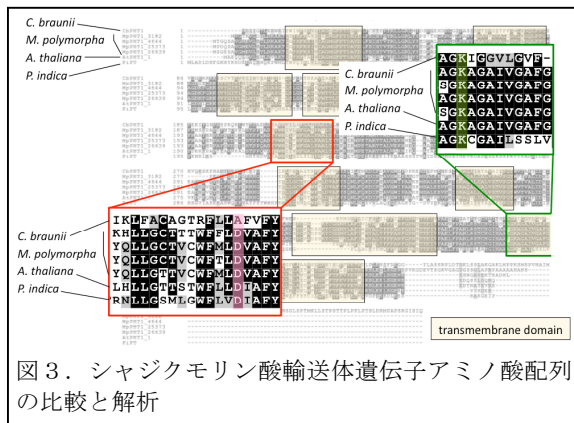
図 2 に示すように、シャジクモ (*Chara braunii*) のリン酸輸送は、リン欠乏下で輸送活性が上昇し、かつ輸送に Na^+ を必要とし

たことから、シャジクモは、オーストラリアシャジクモと同様のNa⁺共役型のリン酸輸送機構を持つことが証明された。

(2) *Chara braunii* の EST データを利用したリン酸輸送体遺伝子の同定と単離

Chara braunii の EST データベースから、シロイヌナズナと相同性を持つリン酸輸送体遺伝子の探索を行ったところ、ただ一つの遺伝子の部分配列が見つかった。

この遺伝子の全長を明らかにするため、シャジクモゲノムを用い、全長を決定することが出来た。それによると、高等植物の高親和性リン酸輸送体と同じく12回膜貫通領域を持つことが明らかとなったが、分子中央部の細胞質ドメインのホモロジーは低く、またC末端が他の陸上植物よりもかなり長いことが見いだされた(図3)



リン酸輸送体アミノ酸配列の解析から、シャジクモリン酸輸送体分子は、リン酸への高親和性を示すためのK(リジン)は持つが、共役イオンとしてH⁺が結合するとされるD(アスパラギン酸)がA(アラニン)に代わっていることが明らかとなった。

リン欠乏下で、遺伝子発現レベルが変動するかは現在検討中である。

また、シャジクモリン酸輸送体遺伝子のヌクレオチド配列解析から、この遺伝子が陸上植物の祖先型となることを見いだされた。

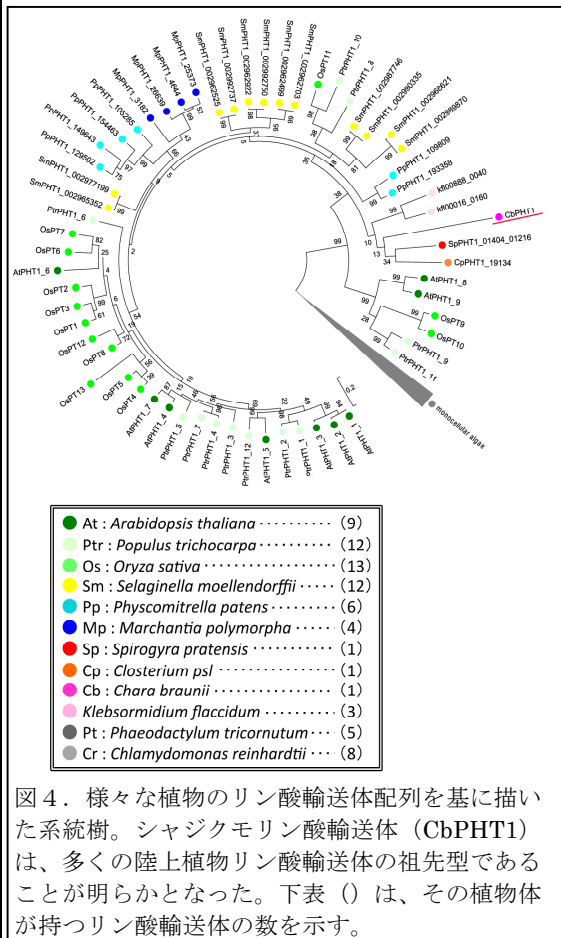
(3) リン酸輸送体遺伝子の輸送活性の測定

Chara braunii リン酸輸送体遺伝子の全長を単離することができたので、この遺伝子をリン酸輸送活性を欠く酵母に形質転換し、リン酸輸送活性を測定することを試みている。

(4) シャジクモリン酸輸送体遺伝子の系統解析

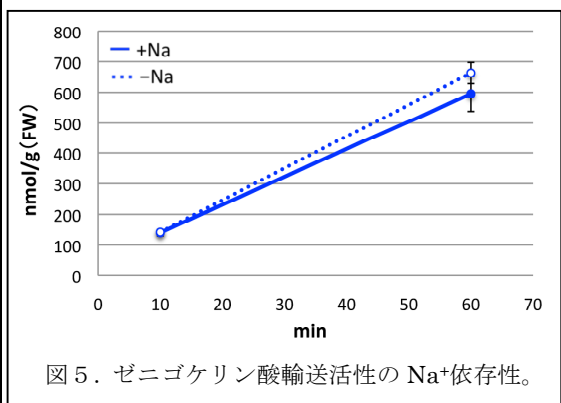
(2) で明らかになった、陸上植物の祖先型とされるシャジクモリン酸輸送体遺伝子

のヌクレオチド配列を用い、これまで明らかにされている陸上植物、車軸藻植物の配列情報を基に、系統樹(図4)を書いたところ、シャジクモリン酸輸送体は、陸上植物の祖先型であることが示された。



(5) ゼニゴケのリン酸輸送活性の測定

陸上植物の祖先とされるシャジクモのリン酸輸送活性がNa⁺共役型であることから、同様に陸上植物として進化段階の基部に近いとされるゼニゴケのリン酸輸送機構について、生理活性解析と遺伝子発現解析を行った。図5に示すように、ゼニゴケでは、リン酸輸送活性がNa⁺共役型を示す証拠は得られなかった。



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 19 件)

- 1) Kurita Y, Baba K, Ohnishi M, Anegawa A, Shichijo C, Kosuge K, Fukaki H, Mimura T (2014) Establishment of a shortened annual cycle system; a tool for the analysis 1 of annual re-translocation of phosphorus in the deciduous woody plant (*Populus alba* L.). , *Journal of Plant Research* 127(4) :545-551, DOI 10.1007/s10265-014-0634-2.
- 2) Kurita Y, Kanno S, Ohnishi M, Mimura T (2014) Extraction of Ions from Leaf Sections. *Bio-protocol* 4(13): e1174. <http://www.bio-protocol.org/e1174>
- 3) Kanno S, Kurita Y, Ohnishi M, Mimura T (2014) Autoradiography of Pi Distribution in Barley Seedlings. *Bio-protocol* (2014) 4(13): e1175. <http://www.bio-protocol.org/e1175>
- 4) Kosuge K, Iida S, Katou K, Mimura T (2013) Circumnutation on the water surface: female flowers of *Vallisneria*. *Scientific Report*, 3: 1133, DOI 10.1038/srep01133
- 5) Kadohama N, Goh T, Ohnishi M, Fukaki H, Mimura T, Suzuki Y (2013) Sudden collapse of vacuoles in *Saintpaulia* sp. palisade cells induced by a rapid temperature decrease. *PLoS One* 8(2): e57259. doi:10.1371/journal.pone.0057259.
- 6) Nagai M, Ohnishi M, Uehara T, Yamagami M, Miura E, Kamakura M, Kitamura A, Sakaguchi S, Sakamoto W, Shimmen T, Fukaki H, Reid RJ, Furukawa A, Mimura T (2013) Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant, Cell & Environment*, 36:1826-1837. DOI: 10.1111/pce.12090
- 7) Yoshida K, Ohnishi M, Fukao Y, Okazaki Y, Fujiwara M, Song C, Nakanishi Y, Saito K, Shimmen T, Suzuki T, Hayashi F, Fukaki H, Maeshima M, Mimura T (2013) Studies on vacuolar membrane microdomains isolated from *Arabidopsis* suspension-cultured cells: Local distribution of vacuolar membrane proteins. *Plant & Cell Physiology*, 54(10):1571-1584. DOI: 10.1093/pcp/pct107

[学会発表] (計 4 0 件)

- 1) 藤原ひとみ、大西美輪、坂山英俊、石崎公庸、豊倉浩一、関本弘之、西山智明、七條千津子、小菅桂子、深城英弘、三村徹郎: 植物細胞リン酸輸送機構とその進化について、

((一社) 日本植物生理学会第56回年会 (東京、平成27年3月16日~18日) 口頭 (三村代理)

- 2) H Fujiwara; M Ohnishi; H Sakayama; K Ishizaki; K Toyokura; T Goh; H Sekimoto; T Nishiyama; C Shichijo; K Kosuge; H Fukaki; T Mimura: Evolutionary analysis of phosphate transport mechanisms in plant cells. The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing, Tokyo (Japan), March 13-14, 2015 (Poster)
- 3) Fujiwara H, Ohnishi M, Sakayama H, Ishizaki K, Toyokura K, Sekimoto H, Nishiyama T, Shichijo C, Kosuge K, Fukaki H, Mimura T: Evolutionary analysis of phosphate transport mechanisms in plant cells. Marchantia Workshop 2014, Kobe (Japan), December 8-10, 2014 (Poster)
- 4) 藤原ひとみ、大西美輪、坂山英俊、石崎公庸、豊倉浩一、関本弘之、西山智明、七條千津子、小菅桂子、深城英弘、三村徹郎: 植物細胞リン酸輸送機構とその進化について、((公社) 日本植物学会第78回大会 (生田、平成26年9月12日~14日) (口頭)
- 5) 藤原ひとみ、大西美輪、坂山英俊、石崎公庸、関本弘之、西山智明、七條千津子、深城英弘、三村徹郎: 植物細胞リン酸輸送機構とその進化について、((一社) 日本植物生理学会第55回年会 (富山、平成26年3月18日-20日) (口頭)
- 6) 三村徹郎、大西美輪、姉川彩、栗田悠子、岡田和哉、益田陽平、菅野里美、深城英弘、馬場啓一: 植物におけるリン環境認識とリン利用の新しい視点、((一社) 日本植物生理学会第55回年会 (富山 平成26年3月18日-20日) シンポジウム (植物の三大栄養素 (N-P-K) の感知と利用の新理解) (Invited)

[図書] (計 1 件)

- 1) 三村徹郎・川井浩史 編著 (2014) 「光合成生物の進化と生命科学」、培風館、総ページ数: 194

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

三村 徹郎 (Mimura Tetsuro)
神戸大学大学院・理学研究科・教授
研究者番号：20174120

(2)研究協力者

神戸大学

藤原 ひとみ (Fujiwara Hitomi)
大西 美輪 (Ohnishi Miwa)
姉川 彩 (Anegawa Aya)
坂山 英俊 (Sakayama Hidetoshi)
深城 英弘 (Fukaki Hidehiro)
石崎 公庸 (Ishizaki Kimitsune)
七條 千津子 (Shichijo Chizuko)
小菅 桂子 (Kosuge Keiko)
豊倉 浩一 (Toyokura Koichi)
郷 達明 (Goh Tatsuaki)

金沢大学

西山 智明 (Nishiyama Tomoaki)

日本女子大学

関本 博之 (Sekimoto Hiroyuki)