

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850037

研究課題名(和文)植物の小胞体ストレス応答における亜鉛の役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of physiological function of zinc transporter MTP12 for ER stress in *Arabidopsis thaliana*

研究代表者

藤原 崇志 (Fujiwara, Takashi)

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号：50724499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛は、生体内において様々なタンパク質の活性または構造維持に必要な微量必須元素であり、これまで様々な植物から細胞膜や液胞膜に局在する亜鉛輸送体が同定されてきた。本研究では、新たにシスゴルジに局在する亜鉛輸送体MTP12 (metal tolerance protein 12) をシロイヌナズナから同定し、その生理機能の解明を目指した。その結果、MTP12は植物体全体で発現し、別のMTPメンバーであるMTP5と複合体を形成してシスゴルジ内に亜鉛を輸送することが強く示唆された。さらに、MTP12遺伝子破壊株を用いて小胞体ストレス応答機構に対する関与について検証した。

研究成果の概要(英文)：In plant, zinc (Zn) is an essential micronutrient that functions as a catalytic and structural cofactor for many proteins. Until now, various Zn transporters that are localized at the plasma membrane or vacuolar membrane have been reported in plants. However, Zn must be properly distributed in each subcellular compartment to maintain Zn homeostasis.

This study was done to determine the biochemical and physiological function of MTP12 (metal tolerance protein 12) in *Arabidopsis thaliana*. I found that MTP12 is expressed throughout the plants, interacts with MTP5 in the cis-Golgi and Zn transport activity of MTP12 is MTP5 dependent. These results strongly suggested that AtMTP12 forms a heteromeric functional complex with AtMTP5 to transport Zn into the cis-Golgi. In addition, involvement of AtMTP12 in ER stress response was also assessed using AtMTP12 knockout plants.

研究分野：植物生理学

キーワード：亜鉛輸送体 ゴルジ体 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

植物において亜鉛は微量必須元素であるが、植物は亜鉛欠乏だけでなく亜鉛過剰に晒されても生育が阻害される。そのため、植物が備える亜鉛欠乏または亜鉛過剰耐性機構に関する研究が精力的に行われ、これまでに様々な亜鉛輸送体が同定されてきた。植物の主な亜鉛輸送体として、ZIP (zinc-regulated transporter / iron-regulated transporter-like protein)、HMA (heavy metal ATPase)、そして MTP (metal tolerance protein) ファミリーがあり、ZIP はサイトソルの亜鉛濃度を増加させる方向に、HMA および MTP はその逆の方向に亜鉛を輸送する。

これまでに同定された亜鉛輸送体の多くは細胞膜または液胞膜に局在している。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の場合、細胞膜局在型の HMA2 や HMA4 は地上部への亜鉛の長距離輸送に関与しており、AtHMA2 および AtHMA4 の二重遺伝子破壊株は亜鉛欠乏条件下で生育が著しく阻害される [Hussain *et al.* 2004, Sinclair *et al.* 2007]。一方、液胞膜局在型の AtMTP1 や AtMTP3 は液胞内に亜鉛を輸送することで、植物の亜鉛過剰耐性獲得に貢献している [Arrivault *et al.* 2006, Kawachi *et al.* 2009]。

それに対し、液胞以外の細胞内小器官に局在する亜鉛輸送体およびその生理的意義については知見が限られている。亜鉛は様々なタンパク質の活性または構造維持に働く微量必須元素であり、*A. thaliana* では約 10% ものタンパク質が亜鉛結合ドメインを有すると予測されていることから、細胞内に取り込まれた亜鉛は亜鉛輸送体を介して細胞内小器官内にも分配されると考えられる。これまでに研究代表者は、*A. thaliana* の MTP ファミリーの一つである AtMTP12 が液胞膜以外の細胞内小器官に局在すること、さらに、酵母の AtMTP12 ホモログである MSC2 の遺伝子破壊株の表現型が、AtMTP12 と別の MTP メンバーの AtMTP5 を共発現させることで回復することを明らかにしている。これまでに、酵母や哺乳動物における MTP12 ホモログ (酵母 : MSC2、哺乳動物 : ZnT5) についてもそれぞれ別のメンバー (酵母 : ZRG17、哺乳動物 : ZnT6) と複合体を形成して亜鉛を輸送するが、興味深いことに、MSC2 や ZnT5 は小胞体ストレス応答機構に関与することが示されている [Ellis *et al.* 2004, Ishihara *et al.* 2006]。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本研究では、AtMTP12 および AtMTP5 を介して細胞内小器官に輸送された亜鉛の生理機能を明らかにすることを目的とし、AtMTP12 と AtMTP5 の相互作用性の検証、AtMTP12 の亜鉛輸送能の評価、AtMTP12 および AtMTP5 の遺伝子発現解析、そして AtMTP12 遺伝子破壊株の生育試験を行った。

3. 研究の方法

(1) AtMTP12 と AtMTP5 の相互作用性の検証

AtMTP12 が AtMTP5 と相互作用するのかを調査するにあたり、まず両タンパク質の細胞内局在性を検証した。AtMTP12 または AtMTP5 と GFP の融合遺伝子を PCR 法により作製し、35S プロモーターの下流に配置した。作製したプラスミドに加えて、各オルガネラマーカーと mRFP の融合遺伝子を 35S プロモーターの下流に配置したプラスミドを *A. thaliana* の葉肉細胞から単離したプロトプラストに導入し、共焦点レーザー顕微鏡により蛍光を観察した。続いて、BiFC (bimolecular fluorescence complementation) 法により両者が相互作用するかを検証するため、分割した YFP の C 末端側または N 末端側をコードする遺伝子領域をそれぞれ AtMTP12 および AtMTP5 遺伝子に PCR 法で連結させた。作製した両プラスミドおよび各オルガネラマーカープラスミドを *A. thaliana* プロトプラストに導入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により、相互作用性および複合体の細胞内局在性を調査した。

(2) AtMTP12 の亜鉛輸送能の評価

AtMTP12 の亜鉛輸送能の有無を検証するため、ニワトリの B リンパ細胞 DT40 を用いた。AtMTP12 または AtMTP5 遺伝子を chicken - actin プロモーターの下流に配置したプラスミドを作製し、早期分泌経路上に局在する亜鉛輸送体 ZnT5、ZnT6 および ZnT7 の三重遺伝子破壊株 (DT40 TK0) に導入した。得られた形質転換体から粗膜画分を単離し、アルカリフォスファターゼ活性を測定した。また、免疫共沈を行うため、AtMTP12 に HA、AtMTP5 に FLAG タグを繋いだ融合遺伝子を chicken - actin プロモーターの下流に配置したプラスミドを作製し、DT40 TK0 に導入した。得られた形質転換体から粗膜画分を単離し、抗エピトプタグ抗体を用いて免疫沈降、続いてイムノブロットを行った。

(3) AtMTP12 および AtMTP5 の遺伝子発現解析

6 日齢の *A. thaliana* 植物体、12、18 日齢の地上部および根、40 日齢の根、ロゼット葉、葉柄、茎、茎生葉、花、蕾および果実から total RNA を抽出し、逆転写により cDNA を合成した。得られた cDNA サンプルを用いて、リアルタイム PCR を行い、各生育時期や器官における AtMTP12 および AtMTP5 遺伝子の発現量を調査した。また、AtMTP12 遺伝子の発現組織を明らかにするため、AtMTP12 遺伝子のプロモーターの下流に GUS (-glucuronidase) 遺伝子を繋いだプラスミドをアグロバクテリウムを介して *A. thaliana* に導入し、得られた形質転換体を用いて GUS 染色を行った。

(4) AtMTP12 遺伝子破壊株の生育実験

AtMTP12 および AtMTP5 遺伝子の T-DNA 挿入株を入手し、DTT (ジチオスレイトール) を含む培地で生育させた。また、小胞体ストレ

応答機構を司る転写因子である bZIP60 や bZIP28 の T-DNA 挿入株との掛け合わせを行い、同様の生育試験を行った。

4. 研究成果

(1) AtMTP12 と AtMTP5 の相互作用性の検証

これまでの研究から、酵母 *MSC2* 遺伝子破壊株の表現型は AtMTP12 のみでは相補せず、AtMTP5 を共発現させることで相補されることを明らかにしている。このことは、AtMTP12 による亜鉛輸送が AtMTP5 依存的事であることを強く示唆している。そこで、AtMTP12 および AtMTP5 の細胞内局在性を明らかにするため、GFP との融合タンパク質を *A. thaliana* 葉肉細胞プロトプラストにおいて一過的に過剰発現させたところ、両 MTP ともドット状の蛍光が観察された。各オルガネラマーカーとの比較から、AtMTP12 がシスゴルジに局在することが示された。一方、AtMTP5-GFP では、シスまたはトランスゴルジマーカーと共発現させると、ドット状の蛍光の一部が各オルガネラマーカーと共局在した。このことから、AtMTP5 はシスゴルジとトランスゴルジの両方に局在すると考えられた。

次に BiFC を行ったところ、ドット状の YFP 蛍光が観察され、AtMTP12 と AtMTP5 が複合体を形成できることが明らかとなった。また、この複合体の細胞内局在性を明らかにするため、各オルガネラマーカーと共発現させたところ、AtMTP12/AtMTP5 複合体はシスゴルジに局在することが明らかとなった (図 1)。

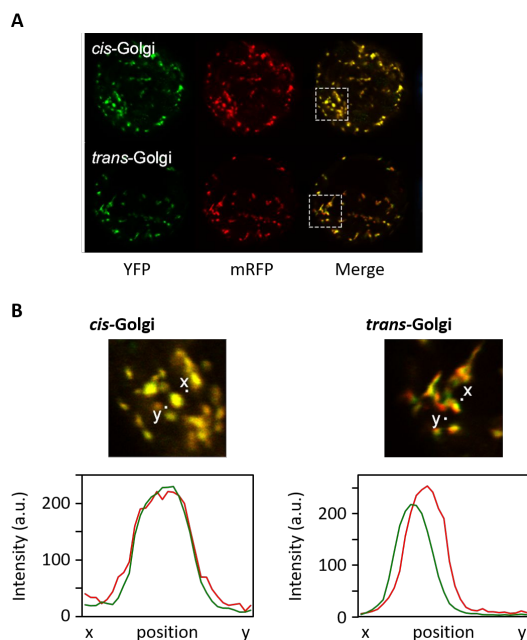


図1. BiFC

- A) AtMTP12-cYFP, AtMTP5-nYFP および各オルガネラマーカーをシロイヌナズナ葉肉細胞プロトプラストにおいて一過的に発現させた。シスゴルジおよびトランスゴルジマーカーにはそれぞれ mRFP-SYP31 と ST-mRFP を用いた。
- B) A) における破線部分の拡大図。代表的な蛍光に対して 2 点 xy をとり、xy 間の YFP 蛍光 (緑線) と mRFP 蛍光 (赤線) の蛍光強度をプロファイリングした。

(2) AtMTP12 の亜鉛輸送能の評価

DT40 TKO では、非組織特異的アルカリフォスファターゼ (TNAP : tissue non-specific alkaline phosphatase) 活性がほぼ完全に消失することが示されている [Suzuki *et al.* 2005]。TNAP は分泌型亜鉛要求性酵素であり、早期分泌経路上で亜鉛を受け取ることで活性化となるが、ZnT5/ZnT6 複合体や ZnT7 は TNAP に亜鉛を供給するだけでなく、TNAP タンパク質自体の安定化にも関与することが報告されている [Fukunaka *et al.* 2011]。

そこで、AtMTP12 の亜鉛輸送能の有無を検証するため、AtMTP12 および AtMTP5 遺伝子を DT40 TKO に導入したところ、両遺伝子を導入した時のみ、TNAP 活性が 20% 程度回復した (図 2)。さらに、この時 AtMTP12 と AtMTP5 が複合体を形成することを確認するため、免疫共沈を行った。まず、AtMTP12 と AtMTP5 にそれぞれ HA、FLAG タグを融合させた遺伝子を DT40 TKO に導入し、各 MTP にエピトプタグを付加しても TNAP 活性に影響がないことを確認した。得られた形質転換体から粗膜画分を単離し、抗 HA または抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降、続いて抗 FLAG または抗 HA 抗体を用いてイムノプロットを行った結果、AtMTP12 が AtMTP5 と相互作用することが示された。

MTP メンバーは 6 回の膜貫通領域を持ち、ホモダイマーを形成して働くと考えられている。しかし本研究により、N 末端側にさらに 8 回の膜貫通領域を有する巨大分子である AtMTP12 は、ホモダイマーではなく AtMTP5 とヘテロマーを形成することが示された。興味深いことに、酵母の *MSC2* や哺乳動物の ZnT5 もファミリーの中で唯一 N 末端側にさらに複数回の膜貫通領域を持つメンバーであり、別のメンバーとヘテロマーを形成して機能する。ZnT5/ZnT6 については、複合体がヘテロダイマーであることが示されている。このことから、巨大分子のヘテロマー形成は様々な生物種で保存されていることが示唆された。しかし、AtMTP12、*MSC2*、ZnT5 間で N 末端側のアミノ酸配列は類似性が低く、その役割については今後の課題である。

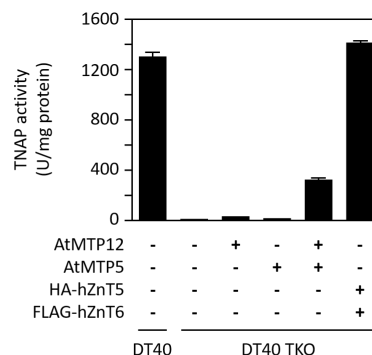


図2. DT40 および各形質転換体における TNAP 活性

導入した各 *AtMTP* 遺伝子については、RT-PCR により DT40 TKO 細胞内で発現していることを確認している。

大腸菌の MTP ホモログである YiiP の結晶

構造解析から、2番目の膜貫通領域 (TM2) 内および TM5 内の親水性アミノ酸残基が亜鉛結合部位を形成することが示されている [Lu and Fu, 2007]。そこで、AtMTP12 においてその場所に相当する TM10 (他のメンバーに比べて N 末端側にさらに 8 回の膜貫通領域があるため) のヒスチジンまたは TM13 のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体に HA タグを付加し、FLAG-AtMTP5 とともに DT40 TKO に導入した。その結果、AtMTP12 および AtMTP5 タンパク質の発現は確認できたが、TNAP 活性はほとんど検出されなかった。一方、相互作用相手である AtMTP5 では、亜鉛結合部位を形成する親水性アミノ酸残基が保存されていない。これは ZnT6 においても同様であることから、ヘテロマーを形成する亜鉛輸送複合体では、AtMTP12 ホモログ側 (巨大分子側) が亜鉛輸送を担っていることが示唆された。

(3) AtMTP12 および AtMTP5 の遺伝子発現解析

A. thaliana 植物体の異なる生育時期および器官から cDNA を調製し、リアルタイム PCR を行った。その結果、*AtMTP12* および *AtMTP5* 遺伝子ともにその発現は同様であった。内部標準遺伝子として *PP2AA3* と *UBQ5* を用いたが、どちらの場合においても同様の結果であった。次に、*AtMTP12* 遺伝子の発現組織を明らかにするため、プロモーター-GUS 解析を行った。その結果、根の成熟領域や根冠、葉の周縁部で強い GUS 染色が見られた。

(4) *AtMTP12* 遺伝子破壊株の生育実験

シロイヌナズナ T-DNA 挿入遺伝子破壊株については、ABRC または NASC から入手した。目的遺伝子への T-DNA の挿入部位をシーケンスにより決定し、野生株との戻し交雑を 3 回行った後、ホモ化したものを実験に用いた。しかし、*AtMTP12* 遺伝子破壊株 (*atmtp12*) については、RT-PCR により *AtMTP12* 遺伝子の発現が見られないことを確認したが、個体による生育差が大きく、表現型 (生育差) の分離比から、T-DNA が複数挿入されていることが考えられた。そこでさらにもう一度戻し交雑を行い、世代を回して個体間での生育差が見られないラインを *atmtp12* として以降の実験に用いた。その後、*atmtp5* や *atbip60*, *atbip28* と *atmtp12* を掛け合わせ、多重遺伝子破壊株を作製した。小胞体ストレスは DTT を培地に加えることで行った。通常の 1/2 × MS 培地で 7 日間生育させた後、DTT を含む 1/2 × MS 培地で 7 日間生育させた。その結果、*atmtp12* 単独破壊株および多重遺伝子破壊株では *atbzip60atbzip28* ほどの顕著な生育阻害は観察されなかった。

本研究により、*AtMTP12* 遺伝子は植物体全体で発現し、シスゴルジで *AtMTP12*/*AtMTP5* 複合体を形成することでシスゴルジ内に亜鉛を輸送することが強く示唆された。

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 3 件)

Fujimoto S, Tsuji T, Fujiwara T, Takeda TA, Merriman C, Fukunaka A, Nishito Y, Fu D, Hoch E, Sekler I, Fukue K, Miyamae Y, Masuda S, Nagao M, Kambe T “The PP-motif in luminal loop 2 of ZnT transporters plays a pivotal role in TNAP activation.” *Biochemical Journal*, 473: 2611-2621, 2016, 査読有

Fujiwara T, Kawachi M, Sato Y, Mori H, Kutsuna N, Hasezawa S, Maeshima M “A high molecular mass zinc transporter MTP12 forms a functional heteromeric complex with MTP5 in the Golgi in *Arabidopsis thaliana*.” *The FEBS Journal*, 282: 1965-1979, 2015, 査読有

河内美樹、藤原崇志、田中奈月、前島正義「亜鉛輸送体 Cation Diusion Facilitator の機能を支える構造」*Biomedical Research on Trace Elements* 26: 134-139, 2015, 査読無

[学会発表](計 2 件)

藤原崇志、河内美樹、前島正義「シロイヌナズナ亜鉛輸送体 *AtMTP12* の機能解析」第 10 回メタルバイオサイエンス研究会、2015 年 8 月 26-27 日、名古屋国際センター (愛知県名古屋市)

藤田早紀、長崎 (武内) 菜穂子、藤原崇志、深尾陽一郎、前島正義、河内美樹「シロイヌナズナ亜鉛輸送体 ZIP13 の花粉管伸長における役割」第 56 回日本植物生理学会、2015 年 3 月 16-18 日、東京農業大学 (東京都世田谷区)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 崇志 (FUJIWARA Takashi)
名古屋大学・生命農学研究科・研究員
研究者番号 : 50724499