

2014 年東京大会
シンポジウムの概要

Mineral transport and sensing in plants

高野順平¹・Kuo-Chen Yeh²・河内美樹³・早川俊彦⁴・小山博之⁵・
時澤陸朋⁶・小林佑理子⁵・神谷岳洋⁷・三輪京子⁸

1. はじめに

植物は根で必須ミネラルを吸い上げ、体内を循環させ利用する。アルミニウムなど有害元素もまた根から吸収され、害を及ぼす。近年の植物栄養学の進歩により、必須ミネラルや主要な有害元素について輸送体が見つかり、土壌からの吸収、根外への排出、導管／篩管への積み込み／積み降ろしなど輸送メカニズムが次々と明らかになった。さらには、それぞれの輸送体が土壌中あるいは植物体内のミネラル／有害元素の濃度に応じて発現量や活性を変化させる応答も次々と報告されている。必須ミネラルであっても組織や細胞中で適量にコントロールされる必要があり、過剰蓄積は生育を阻害する。したがって環境に応答した輸送システムの調節は非常に重要であり、今日の植物栄養学の中心課題の一つである。しかしながら、輸送システムを制御するためのミネラル／有害元素の濃度感知（センシング）についてはほとんど未解明で、研究が始まったばかりと言ってもよい。

Junpei TAKANO, Kuo-Chen YEH, Miki KAWACHI, Toshihiko HAYAKAWA, Hiroyuki KOYAMA, Mutshutomo TOKIZAWA, Yuriko KOBAYASHI, Takehiro KAMIYA and Kyoko MIWA: Mineral transport and sensing in plants

¹ 北海道大学大学院農学研究科 (060-8589 札幌市北区北9条西9丁目)

² Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica (128 Academia Rd. Section 2, Taipei, Taiwan 11529)

³ 名古屋大学大学院生命農学研究科 (464-8610 名古屋市千種区不老町)

⁴ 東北大学大学院農学研究科 (981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1)

⁵ 岐阜大学応用生物科学部 (501-1193 岐阜市柳戸1-1)

⁶ 岐阜大学大学院連合農学研究科 (501-1193 岐阜市柳戸1-1)

⁷ 東京大学大学院農学生命科学研究科 (113-8657 文京区弥生1-1-1)

⁸ 北海道大学地球環境科学研究院 (060-0810 札幌市北区北10条西5丁目)

2014 年 12 月 22 日受付・2015 年 1 月 30 日受理

日本土壌肥科学雑誌 第 86 巻 第 2 号 p.152~158 (2015)

本シンポジウムでは、ミネラルや有害元素の輸送システムとそれらを制御するセンシングメカニズムに焦点を当て、これらの課題に精力的に取り組んでいる演者を集めた。講演内容は多岐に渡り、本分野の今後の発展をおおいに期待させるシンポジウムとなった。以下に講演の概要を紹介する。
(高野順平)

2. 鉄ホメオスタシスと重金属耐性：

亜鉛集積植物 *Arabidopsis halleri* における 金属のセンシングと吸収制御

重金属集積植物は、非常に高濃度の重金属を集積し、かつそのストレスに耐えることができる。亜鉛集積植物 *Arabidopsis halleri* は亜鉛の吸収、錯体形成、体内輸送、隔離など様々な適応メカニズムを発達させている。非集積植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、過剰な亜鉛供給は鉄の吸収と地上部への鉄の蓄積を抑制し、二価鉄トランスポーター IRT1 の発現を劇的に誘導する (Shanmugam *et al.*, 2011)。一方、鉄の供給は亜鉛過剰害を緩和する。これは IRT1 が鉄に加えて亜鉛も輸送することによって考えられる。IRT1 の誘導による亜鉛吸収は、通常の亜鉛解毒システムの許容量を超えて亜鉛を蓄積させてしまう。したがって、亜鉛と鉄の輸送競合は亜鉛過剰耐性におけるキーポイントと言える。興味深いことに、我々は *A. halleri* において鉄制御型 ZIP 輸送体である IRT1 の発現量は *A. thaliana* においてと比較してずっと低いことを見いだした。*A. halleri* は主に亜鉛制御型 ZIP 輸送体により亜鉛を吸収するため、鉄制御型 ZIP 輸送体の発現を攪乱することなく適量の亜鉛を吸収することができる。

さらに我々は、*A. halleri* において錯体形成が金属の吸収と耐性に重要な役割を持つことを明らかにした。我々は、代謝物の網羅的な解析によって *A. halleri* の根から亜鉛に応答してニコチアナミンが分泌されることを見いだした (Tsednee *et al.*, 2014)。分泌されたニコチアナミンは二価亜鉛と安定な錯体を形成する。非集積植物にニコチアナミンを供給したところ、亜鉛の吸収が抑制され、亜鉛耐性が劇的に向上した。これらの結果は、*A. halleri* の根圏ではニコチアナミン-二価鉄錯体が形成されることにより遊離の二価亜鉛イオンの根への急速な吸収が抑制され、亜鉛耐

性がもたらされることを示唆している。我々はまた、三価鉄と錯体を作る未知の分泌成分も見いだしている。この成分は、亜鉛過剰時の鉄吸収能の維持に寄与しているのかもしれない。以上のように、我々の研究は重金属の耐性と集積に関わる新たな分泌メカニズムを明らかにした。

(Kuo-Chen Yeh, 訳：高野順平)

3. CDF ファミリーの亜鉛輸送機構

亜鉛は植物にとって必須元素で、300以上の酵素が亜鉛を必要とする。しかし亜鉛の至適濃度は非常に低く、過剰量の亜鉛は植物にとって毒となる (Clemens, 2010)。そのため、植物は複数の亜鉛輸送体を持ち細胞内亜鉛濃度を厳密にコントロールしている。細胞質内の亜鉛濃度を低下させるために、Cation Diffusion Facilitator (CDF) ファミリーが重要な役割を果たしている (Kawachi *et al.*, 2011)。

シロイヌナズナには12分子のCDFが存在し、Metal Tolerance Protein (MTP) 1~12と呼ばれている。我々はこれまでの研究で、MTP1は液胞膜に局在し、細胞質内の Zn^{2+} と液胞内の H^+ を交換輸送する Zn^{2+}/H^+ exchanger であること、過剰亜鉛耐性に重要な役割を担っていることを明らかにし報告してきた (Kawachi *et al.*, 2009, Kawachi *et al.*, 2008)。しかし、MTP1がどのように細胞質亜鉛濃度を感知し、過剰な細胞質亜鉛を液胞へ輸送しているかについては不明であった。MTP1のmRNA量は亜鉛濃度に応じて変化しなかったため、MTP1タンパクの構造に注目して研究を行なうことにした。MTP1は6回膜貫通型で4番目と5番目の膜貫通ドメインの間にHis-loopと呼ばれる特徴的な配列を持つ。His-loopには25個のヒスチジン残基がある。ヒスチジンは Zn^{2+} と親和性が高いアミノ酸であるため、His-loopが亜鉛輸送に何らかの影響を与えている可能性があると考えた。そこで酵母異種発現系を用いてHis-loop変異導入解析を行なったところ、His-loopの大部分(186~216番目のアミノ酸残基)を欠失させると亜鉛輸送初速度が野生型MTP1よりも11倍高くなることが分かった。これはHis-loopはMTP1本体が持つ高い亜鉛輸送能を抑制していることを意味している。この結果から、His-loopは細胞質亜鉛濃度を感知して、輸送速度を調節する役割があることが示唆された (Kawachi *et al.*, 2008)。さらに部位特異的変異導入解析と大腸菌のCDFタイプ亜鉛輸送体YiiPの結晶構造を基にしたホモロジーモデリング解析より、MTP1の活性調節機構をより詳細に調べた。その結果、膜貫通領域にある亜鉛結合サイトへ続く孔の細胞質側に位置するAsn258とSer101をそれぞれAlaに置換すると亜鉛耐性が増加した。立体構造モデリング解析において、Asn258とSer101は膜貫通領域の亜鉛結合サイトへ続く孔を塞ぐように位置すると予測される。Asn258はHis-loopに直接繋がっており、細胞質に必須元素としての亜鉛を残すための安全弁の役割を果たすと推測した。つまり、

細胞質亜鉛濃度を厳密に調節するために、His-loopは細胞質亜鉛濃度を感知して、Asp250の位置を変えることで活性調節をしているのではないかと考えた (Kawachi *et al.*, 2012)。この仮説を確かめるため、全長MTP1とHis-loopの大部分を欠失した変異型MTP1(Δ 185-216)の過剰発現株を作製し、表現型解析を行なった。通常条件下で生育すると野生株、全長MTP1過剰発現株、 Δ 185-216過剰発現株の間に生育差は見られなかったが、亜鉛欠乏条件下で生育すると Δ 185-216過剰発現株は野生株や全長MTP1過剰発現株よりも顕著に地上部の生重量が小さかった。ICP-AESによりこれらの植物に含まれる亜鉛濃度を分析したところ、亜鉛欠乏条件下では、野生株や全長MTP1過剰発現株と比較して Δ 185-216過剰発現株の根に含まれる亜鉛濃度が顕著に高く、地上部の亜鉛濃度が顕著に低いことが分かった。これは Δ 185-216が根の液胞に亜鉛を過剰に輸送し、地上部へ輸送する亜鉛が不足していたためと考えられる。一方全長MTP1は過剰発現させても根の液胞へ亜鉛を過剰に輸送することなく、地上部へも亜鉛が輸送されていた。これは細胞質に栄養素として必要な亜鉛を残すためにはHis-loopが必要であること、His-loopが細胞質亜鉛濃度を感知して細胞質亜鉛濃度が低い時には活性を負に制御していることを示唆している (Tanaka *et al.*, *in press*)。 (河内美樹)

4. 高濃度アンモニウム供給下の植物の根におけるアンモニウム吸収の負の制御

窒素は、植物の必須多量栄養素であり、植物の成長や生産性を規定する。植物は、根付いた生育場所の利用可能な窒素の量・質的変動に、自らの窒素吸収・利用代謝を適応させてきた。嫌氣的・低酸素環境の水田土壌で栽培されるイネは、主に無機態のアンモニウム(NH_4^+)を外來窒素源として根で吸収し利用する (Yamaya and Oaks, 2004)。しかし、mM濃度の NH_4^+ の単一窒素源供給は、多くの陸上植物に有害である (Britto and Kronzucker, 2002)。この NH_4^+ 毒性の機序は明確ではないが、本質的に根の NH_4^+ のフラックスと同化に左右される。ここでは、好 NH_4^+ 性イネと NH_4^+ 感受性シロイヌナズナの2種のモデル植物における、高濃度 NH_4^+ 供給下の根の NH_4^+ 吸収の負の制御に関する最近の知見を紹介する。

1) 根の高親和性 NH_4^+ 吸収系の負の制御の分子基盤

植物根細胞の原形質膜には、高親和性(HATS)と低親和性(LATS)の NH_4^+ 吸収系が存在する。低濃度 NH_4^+ 供給下では、飽和型能動輸送のHATSが機能し、1 mM以上の高濃度 NH_4^+ 供給下では、さらに、非飽和型受動輸送のLATSが機能する。吸収 NH_4^+ は、主にグルタミン合成酵素(GS)とグルタミン酸合成酵素(GOGAT)の共役酵素反応により、根でGlnに初期同化される。ここで、イネ根では、外來 NH_4^+ 供給濃度上昇にตอบสนองして、HATSの NH_4^+ 輸送活性が、 V_{max} 値の低下と K_m 値の増加を伴う負の制御を受ける (Wang *et al.*, 1993)。こ

の負の制御は、シロイヌナズナ根でも生じ (Rawat *et al.*, 1999), 植物共通の根細胞内 NH_4^+ 過負荷回避機構と推察される。近年、シロイヌナズナ根では、I 型アンモニウム輸送体 (AtAMT1; 1, AtAMT1; 2, AtAMT1; 3) が高親和性 NH_4^+ 吸収の 90 % 以上を担うことが示され、AMT1 が根 HATS の主構成因子であることが判明した (Yuan *et al.*, 2007)。高 NH_4^+ 供給下のシロイヌナズナ根の AMT1 は、転写レベルと翻訳後レベルで負の制御を受ける。三量体で機能する AtAMT1; 1 と AtAMT1; 2 及び AtAMT1; 3 は、サブユニット C 末端側のサイトゾル露出したトランス活性化ドメインの保存 Thr 残基の高濃度 NH_4^+ 供給に応答したリン酸化を介して、アロステリックに不活性化される (Yuan *et al.*, 2013)。過剰 NH_4^+ 供給下では、AtAMT1; 3 は密集化後エンドサイトーシスされる (Wang *et al.*, 2013)。しかし、上記の負の制御の、情報感知・伝達も含めた詳細な分子機構は不明である。

2) タンパク質キナーゼを介した NH_4^+ 吸収制御

我々は、網羅的転写産物解析により、高濃度の NH_4^+ 供給下のイネ幼植物根で高発現するタンパク質キナーゼ遺伝子 (ACTPK1) を見出した。レトロトランスポゾン Tos17 ホモ挿入による ACTPK1 遺伝子破壊イネ変異体 (ACTPK1-KO) の 2 アリルと ACTPK1 対立遺伝子上に Tos17 挿入のない分離系統 (対照) を確立後、各幼植物を比較解析した。対照と比較して、ACTPK1-KO は、充足濃度 NH_4^+ 供給下では、 NH_4^+ とアミノ酸 (特に、Gln と Gln から合成される Asn) の蓄積増加を伴う根の生育阻害及びアミノ酸と全窒素の蓄積増加を伴う地上部生育促進を示すが、過剰 NH_4^+ 供給下では、全身的生育阻害を示した。充足濃度 NH_4^+ 供給下の ACTPK1-KO 根では、AMT1 遺伝子は対照と同様に発現抑制されたが、HATS の NH_4^+ 吸収活性の $V_{\max}$ 値は低下せず、高レベルの NH_4^+ 吸収を示した。 NH_4^+ 初期同化を担う GS1 と NADH-GOGAT1 の含量も増加した。さらに、大腸菌内発現組換え ACTPK1 の試験管内リン酸化活性は、GOGAT 反応の炭素骨格基質 2-オキソグルタル酸の供給系の有機酸で阻害された。

以上の結果は、外来 NH_4^+ 供給濃度上昇に伴い、ACTPK1 が根で発現蓄積して、根細胞内 NH_4^+ 過負荷を避けるための HATS の NH_4^+ 吸収活性の負の制御に関わることを示す。この制御が、 NH_4^+ 初期同化への炭素骨格供給に依存した動的調節を受ける可能性もある。これらの知見は、植物根の過剰 NH_4^+ 吸収回避における情報感知・制御分子機構解明の突破口となりえる。(早川俊彦)

5. STOP1 / AtALMT1 によるアルミニウムセンシング機構

アルミニウム (Al) の根圏での毒性は、土壌 pH が 5.5 を下回ると可溶化する Al^{3+} による細胞毒性や遺伝毒性であり、根の生育を著しく阻害する。最近の研究で、細胞膜表面の Al^{3+} が Al 毒性と Al 耐性機構の細胞応答の決定要因であることが示された。Al 耐性機構の活性化は、植

物ホルモン調節やプロトン (H^+) や生物学的ストレスのシグナル経路とのクロストークなど、複雑な様式で制御されていることがわかってきた。今回は、STOP1 / AtALMT1 システムの分子生物学的研究から明らかにした Al 耐性機構の複雑な転写制御機構について紹介する。

1) 陸上植物間で保存される STOP1/AtALMT1 システム

自然環境において、 Al^{3+} ストレスはおそらく H^+ ストレスに付随しており、植物は Al 耐性と H^+ 耐性機構を共に進化させたと考えられる。実際に、シロイヌナズナの変異体の解析で、両耐性に関わる複数遺伝子の転写調節を行う転写因子が同定された。シロイヌナズナのジンクフィンガーを持つ転写因子 STOP1 (Sensitive TO Proton rhizotoxicity 1) は、当初 H^+ 感受性変異体の原因遺伝子として同定されたが、stop1 変異体では Al 耐性に必須であるリンゴ酸トランスポーター AtALMT1 (ALuminum-activated Malate Transporter 1) が発現抑制されるために Al 毒性に対しても超感受性を示した (Iuchi *et al.*, 2007)。さらに、AtSTOP1 は ALS3 (ALuminum Sensitive 3) やクエン酸トランスポーター MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) などの Al 耐性遺伝子の発現調節も行っていることが明らかになった (Sawaki *et al.*, 2009)。イネ ART1 (STOP1 ホモログ) / STAR2 (ALS3 ホモログ) 制御系を含む、STOP1 制御による耐性システムはタバコ、木本やコケなど様々な陸上植物間で保存されていることが明らかになった (Ohyama *et al.*, 2013)。

2) STOP1/AtALMT1 システムの複雑な制御

分子生理学研究と静電理論のコンピュータモデル研究によって、STOP1/AtALMT1 システムに制御される Al^{3+} 耐性は、 Al^{3+} に対して高感度に応答することが示された (Kobayashi *et al.*, 2013a)。AtALMT1 遺伝子破壊株の生育を抑制しない低い Al^{3+} レベルでも、AtALMT1 の転写を活性化することができ、このことは Al センシング機構が非常に敏感であることを示している。一方、有機酸分泌は植物のストレス耐性における他の生物学的機能も担っている。AtALMT1 遺伝子発現は、STOP1 によって厳密に制御され、Al (有機酸でキレート化され無毒化される) と flg22 (微生物鞭毛タンパク質の共通アミノ酸配列) によって活性化され (Kobayashi *et al.*, 2013b)、flg22 による AtALMT1 発現を介したリンゴ酸分泌は、根表面のバイオフィームを作る有用根圏微生物を誘引することで植物免疫のトリガーとなっている。また、これらの AtALMT1 の転写活性化過程ではタンパク質リン酸化/脱リン酸化修飾の関与も示唆されている。AtALMT1 プロモーター解析では、細胞内シグナル伝達分子である IAA, ABA や H_2O_2 が AtALMT1 発現を誘導することが明らかになった (Kobayashi *et al.*, 2013b)。一方、Al 応答や stop1 変異体のマイクロアレイ解析データを用いた網羅的なシスエレメント予測解析により、AtALMT1 プロモーター上のシスエレメントを推定した。その予測配列を置換した組換え

体のプロモーター解析から、AI誘導の遺伝子発現過程に関与している調節エレメントを含む複数のシスエレメントの存在が示唆された (Tokizawa *et al.*, unpublished). 複合的な転写制御機構は明らかにされつつあるが、植物がどのように Al^{3+} や H^{+} ストレスを感知しシグナルを伝達しているのか、今後はセンサータンパク質の同定が期待される。

(小山博之・時澤睦朋・小林佑理子)

6. カスパリー線形成の分子機構と物質輸送における役割

植物は根を介して土壌から栄養分を吸収する。土壌には植物にとって必要な必須元素だけではなく、毒性元素など不必要な元素や物質も含まれている。この様な複雑な組成よりなる土壌から、植物は必須元素を選択的に吸収し生育している。この選択的な吸収は根の内皮細胞に形成されるカスパリー線とタンパク質である輸送体によって達成されている。本シンポジウムでは、前者のカスパリー線の形成機構と物質輸送における機能を発表した。

カスパリー線は内皮細胞の周囲に形成される構造体であり、シロイヌナズナでは、その化学組成がリグニンであることが報告されている。カスパリー線はアポプラスト輸送の障壁として機能し、タンパク質である輸送体と共に機能することにより、植物が特異性を持って栄養素を吸収することを可能にしている。カスパリー線は重要な構造体であるにもかかわらず、その形成機構や物質輸送における機能は長年未解明のままであった。これは、これまでにカスパリー線に異常を有する変異株が利用可能でなかったことに起因している。

近年、スイスの Niko Geldner のグループが、カスパリー線の形成に関与するタンパク質 [Casprian strip membrane domain protein (CASP)] をシロイヌナズナにおいて同定した (Roppolo *et al.*, 2011). Robert Caspary がカスパリー線を発見してから 150 年後のことである。彼らは *caspl/casp3* の二重破壊株でカスパリー線の形態に異常があることを見出し、さらに、CASP1 がリグニンの重合に必要な PER64 と RBOHF のカスパリー線形成部位への局在に重要であることを示した (Lee *et al.*, 2013).

本シンポジウムでは、私たちが同定したカスパリー線変異株の解析とカスパリー線の物質輸送における機能を発表した。1つ目の変異株は、私が所属していた David Salt らのグループによって同定された *enhancedsuberin1* (*esb1*) である。*esb1* は元々、地上部イオノームパターンが異なる変異株として単離された (Baxter *et al.*, 2009). *esb1* は *caspl/casp3* と同様のイオノームパターンを示し、物質輸送の障壁としてのカスパリー線の機能を失っていた。また、カスパリー線の蓄積パターンも野生型とは異なっており、*caspl/casp3* と似ていた (Hosmani *et al.*, 2013). 2つ目の変異株は、低カルシウムに感受性を示す変異株 *cad825* である。この変異株の解析の過程で、*cad825* のイオノームが *esb1* や *caspl/casp3* と類似したパターンを示すことに

気がついた。カスパリー線のパターンを観察したところ、*esb1*, *caspl/casp3* と異なる異常なパターンを示した。すなわち、*cad825* の原因遺伝子は、これらのタンパク質とは異なる経路でカスパリー線形成に関与していることが示唆される。

次に、これらの変異株を用いて、カスパリー線の物質輸送における役割を解析した。上述したようにカスパリー線変異株は地上部のイオノームに異常がある。これは、カスパリー線の機能が失われたことに起因すると予想された。しかし、これまでに上述したカスパリー線変異株はカスパリー線に異常があるだけではなく、内皮細胞へのスベリンの過剰蓄積が観察される。すなわち、地上部のイオノーム変化がカスパリー線の障壁としての機能が失われたことによって起きたのか、それともスベリンの蓄積によって起きたのか区別する必要がある。そこで、我々はカスパリー線破壊株でスベリン分解酵素を発現させた系統を作出した。具体的には、*esb1* 破壊株でスベリンを分解する *CDEF1* 遺伝子を内皮細胞特異的に発現させた。この系統の地上部のイオノームは一部の元素 (カルシウムや鉄) について部分的に回復した。すなわち、地上部の変化の一部はスベリンの過剰蓄積により引き起こされていることが明らかになった。

これらの変異株に加えて、我々は3番目のカスパリー線変異株 *kudol* を有している。*kudol* は低 Mg で生育が阻害される変異株として単離された。イオノーム分析の結果、複数の元素濃度が変化していたが、そのパターンは既知のカスパリー線変異株とは異なっていた。この変異株ではスベリンのパターンは野生型と同様であり、カスパリー線の蓄積パターンのみが異なっている。カスパリー線形成の分子機構を明らかにする重要な変異株であるのと同時に、生理学的な機能を解析する重要なツールになると考えている。

上述したように、現在私達は、複数のカスパリー線変異株を有している。イオノーム解析だけではなく、これらの変異株を用いて元素のイメージングを行うことにより、カスパリー線の物質輸送における機能や、元素の吸収部位を明らかにすることができると考えている。今後は、輸送体だけではなくカスパリー線やスベリンを研究することにより、根における栄養の輸送経路を正確に記述できるのではないかと考えている。

(神谷岳洋)

7. ホウ酸センシングとホウ酸トランスポーターの細胞内輸送機構の理解に向けて

ホウ素は高等植物の必須ミネラルの一つであり水溶液中では主にホウ酸 $B(OH)_3$ の形態で存在する。ホウ酸は細胞壁のペクチン質多糖ラムノガラクトン II を架橋することにより、細胞壁構造に重要な役割を果たす (小林, 2010). ホウ酸は雨水に溶けて流失しやすいため、日本を含む世界の湿潤な地帯においてホウ素欠乏が作物の生育を阻害する農業上の問題となっている。一方、南オーストラ

リアやカリフォルニア、中東といった乾燥地ではホウ酸が土壤に蓄積し、作物が過剰害を受けやすい。植物はホウ素欠乏および過剰環境に適応するため、土壤中のホウ酸濃度に応じてホウ素の吸収と体内移行を厳密に制御する必要がある。

1) ホウ素輸送のメカニズム

ホウ酸は無電荷の小分子であるため生体膜を比較的自由に透過できるが、低ホウ素環境に置かれた植物では輸送体によるより効率の良い輸送が必要とされる。シロイヌナズナ NIP5;1 は細胞へのホウ素の吸収を促進する細胞膜局在型ホウ酸チャネルであり、ホウ素の根への吸収を担う (Takano *et al.*, 2006)。一方、BOR1 はホウ素の細胞外への排出を促進する細胞膜局在型ホウ酸トランスポーターであり、ホウ素の導管方向への輸送を担う (Takano *et al.*, 2002)。NIP5;1 は根の根冠・表皮・内皮細胞において外寄り (土壌側) の細胞膜ドメインに、BOR1 は根の様々な細胞において内寄り (根の中心側) の細胞膜ドメインに偏在する (Takano *et al.*, 2010)。これらの偏在性はホウ素の土壌からの吸収と中心柱への輸送の方向性を決定する普遍的な要因と考えられる。一方、BOR1 は高濃度のホウ素に応答し、その翻訳が抑制されるとともに、細胞膜からエンドサイトーシス経路ですみやかに液胞に輸送されて分解される (Takano *et al.*, 2005, 2010)。これは、ホウ素の地上部への輸送を抑制しホウ素過剰を予防するための応答反応である。

2) ホウ酸チャネル NIP5;1 の局在

根の表皮、外皮、内皮細胞において土壌側の細胞膜ドメインへの偏在性を示す輸送体としては、NIP5;1 の他にジャガイモのリン酸トランスポーター、イネのケイ酸チャネル、トウモロコシの鉄-ムギネ酸錯体のトランスポーター、イネのマングントランスポーター、シロイヌナズナのオーキシン様植物ホルモンのトランスポーター ABCG37、病害応答に関与する PEN3 等が報告されている。土壌側偏在には共通の分子メカニズムが存在が予想される。

私たちは NIP5;1 の細胞内局在メカニズムを明らかにするため、GFP 融合 NIP5;1 を指標とした遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、偏在性とは直接関係しないものの予想外の発見が得られたので紹介したい。スクリーニングの結果、GFP-NIP5;1 が小胞体膜、液胞膜、あるいは内膜の凝集構造に局在する変異株をそれぞれ複数獲得した。NIP5;1 が細胞内の凝集構造に蓄積する変異株について、次世代シーケンサーを利用して原因遺伝子を同定したところ *UDP-glucose 4-epimerase 4 (uge4)* / *root hair defective 1 (rhd1)* / *root epidermal bulgar 1 (reb1)* のアレルであった (Uehara *et al.*, 2014)。*uge4/rhd1/reb1* 変異株はガラクトース合成に欠損を持ち細胞壁構造に異常を持つことが知られていたが、細胞内膜系の維持にガラクトースが必要とされることを新たに示唆する発見となった。

私たちはまた、偏在性に重要なアミノ酸領域の同定と解析を進めている。シロイヌナズナの NIP family のメンバーの細胞内局在を解析したところ、NIP5;1 と同様に偏在性を示すホモログと、細胞膜において一様に局在するホモログを見いだした。続いてこれらのアミノ酸配列と局在の関係を解析し、NIP5;1 の N 末端細胞質領域が極性局在に必要なことを明らかにした。N 末端領域を NIP5;1 のものと置き換えたキメラを作出することで、偏在性を持たない NIP や水チャネルを偏在させることもできた。将来的には本領域を利用して様々な輸送体に偏在性を付与することも可能になるかもしれない。本 N 末端領域の解析を通して、輸送体の偏在メカニズムを明らかにしていきたい。

3) ホウ酸トランスポーター BOR1 のエンドサイトーシス

BOR1 の中心柱側への偏在性はどのように形成され、またホウ素に応答した液胞輸送はどのようなメカニズムで引き起こされるのであろうか? これまでの実験結果より考えられるモデルを以下に述べる。BOR1 をはじめとして多くの細胞膜局在タンパク質の細胞膜中での拡散速度は比較的遅く (Takano *et al.*, 2010)、小胞輸送による偏在性維持が可能である。BOR1 の偏在性はチロシンモチーフと呼ばれるアミノ酸配列に依存し、方向性を持ったエンドサイトーシスとエキソサイトーシスによって維持される。一方、高濃度のホウ素は BOR1 のユビキチン化を引き起こし、その結果 BOR1 は液胞へ輸送されて分解される (Kasai *et al.*, 2011)。それでは、偏在維持のためのリサイクリング経路と分解のための液胞輸送経路への選別はどこで起こるのであろうか? 私たちの最近の結果は、リサイクリング経路と液胞経路に向かう BOR1 は細胞膜上で選別され、異なったエンドサイトーシス小胞に入ることを示唆している。今後の課題は、BOR1 のユビキチン化を引き起こすホウ酸センシングのメカニズムである。なんらかのホウ酸センサーの存在と、BOR1 そのものがホウ酸のレセプターとして働き自身の運命を決定する可能性の両方を追っている。(高野順平)

8. 5' 非翻訳領域に存在する上流 ORF によるホウ素輸送体 BOR1 のホウ素栄養依存的な翻訳制御

ホウ素は植物の微量必須元素であるが、過剰なホウ素は毒性を持つ。特にホウ素は植物体内の至適濃度が狭いことが知られ、植物は環境中のホウ素濃度に応答して、ホウ素の体内への取り込みを調節する必要がある。シロイヌナズナのホウ酸輸送体 BOR1 は、低濃度ホウ素条件において、根から地上部への効率的なホウ酸輸送を担う。BOR1 はホウ素条件に応じた転写後制御を受け、mRNA はホウ素条件で変化しないが、高ホウ素条件において BOR1 タンパク質の蓄積が抑制される。この転写後の発現抑制機構として、これまでにホウ素十分条件 ($>100\mu\text{M}$) での選択的なタンパク質分解が明らかにされていた (Takano *et al.*, 2005)。本研究では新たに、より高いホウ素濃度 (mM

レベル) 条件下における mRNA の 5' 非翻訳領域 (UTR) を介した *BOR1* の翻訳制御が起こることを見いだした。異なる濃度範囲で起こる複数の発現制御のしくみとホウ素栄養環境への適応の意義を明らかにすることを目指した。

1) 5'UTR を介したホウ酸輸送体 *BOR1* の翻訳制御

BOR1 プロモーター制御下で GUS を発現する形質転換シロイヌナズナを低ホウ素濃度および高ホウ素濃度で栽培したところ、GUS mRNA はホウ素条件で変化しなかったが、タンパク質蓄積の指標となる GUS 活性は高ホウ素濃度で低下した。さらに、このホウ素栄養条件に応答した GUS 活性の変化は、5'UTR の 3' 欠損させたコンストラクトでは認められなかった。これより、5'UTR を介するホウ素栄養条件に応じた翻訳制御の存在が示唆された。さらに、*BOR1* 5'UTR がホウ素依存的な翻訳制御に関与することを示すため、コムギ胚芽抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系を用いて翻訳制御を検証した。*In vitro* 翻訳系において、反応液のホウ酸濃度の上昇に伴って、*BOR1* 5'UTR は下流のレポーター遺伝子の発現を低下させた。これより、細胞膜や細胞壁といった細胞構造が存在しない状況において、*BOR1* 5'UTR の配列がホウ素依存的な翻訳抑制を引き起こすのに十分であることが示された。この結果は、ホウ酸分子それ自身が *BOR1* mRNA やリボソームと直接相互作用して、ホウ素栄養条件に応答した遺伝子発現を引き起こしている可能性を示唆するものであった。*BOR1* 5'UTR には 4 つの upstream open reading frame (上流 ORF) が存在しており、翻訳制御の分子機構を明らかにするため、これらの上流 ORF の開始コドンに変異を導入した。上流 ORF の破壊がホウ素依存的な翻訳抑制の応答の程度を弱めたことから、ホウ素依存的な翻訳抑制に上流 ORF が関与することが考察された。様々な植物種における *BOR1* 相同遺伝子の 5'UTR には上流 ORF の存在が保存されており、ホウ素依存的な *BOR1* の翻訳制御は植物間で広く保存されている可能性がある。

2) *BOR1* 発現抑制によるホウ素過剰害の回避

タンパク質分解と翻訳抑制の 2 つの転写後制御のホウ素栄養環境における適応的な意義を実験的に明らかにするため、どちらか一方または両方の転写後制御を欠損した *BOR1* を発現するシロイヌナズナを作出した。翻訳制御は *BOR1* 5'UTR の欠損、タンパク質分解制御は変異型 *BOR1* (K509A) 発現によって制御を失わせた。4 種類の形質転換体を異なるホウ酸濃度条件下で生育させたところ、翻訳抑制 (>1 mM) は分解制御 (>100 μ M) と比較してより環境中のホウ素濃度が高濃度時に誘導されることが示された。さらに、両方の転写後制御を失った植物体では *BOR1* タンパク質が環境中のホウ素濃度に関わらず常に蓄積し、高ホウ素濃度条件下において地上部に高濃度のホウ素を蓄積し、著しい生育抑制を示した。この結果より、*BOR1* の転写後制御が高ホウ素条件下でのホウ素の過剰な取り込みを防ぎ、過剰害の発生を抑制することが示された。異なる濃度範囲で起こる二段階の *BOR1* の転写

後制御は、環境中のホウ素濃度に応答して効率的にホウ素輸送を制御し、結果として植物の幅広いホウ素環境への適応に貢献すると考えられる。(三輪京子)

9. おわりに

2000 年代の様々なミネラル輸送体分子の同定を経て、私たちの問いは「輸送システムの制御」そして「制御のための感知機構」に進んできた。本シンポジウムにおいては、輸送システム制御としてカスパリー線の形成、輸送体タンパク質の細胞内偏在、栄養条件に応答した転写・翻訳・タンパク質分解制御、リン酸化を介した輸送体活性制御といった多段階での質的・量的な制御が紹介された。また、感知機構に対しては、輸送体タンパク質自身による基質との相互作用による輸送活性制御、代謝産物を介したリン酸化制御などが紹介された。これらの結果は、ミネラル栄養環境の感知が、植物ホルモンなどで見られる受容体タンパク質による「センサー」を介した情報伝達モデルを適用できないことを示唆しているだろう。植物が、何を (ミネラル/代謝産物)、どこで (局所/システム)、どのように (受容分子)、ミネラル栄養環境を感知しているかを分子レベルで明らかにすることは今後の基礎研究のひとつの主要な課題である。そして、その感知を通じた輸送システムの制御が全体として、変動する栄養環境への適応に意義をもつのか、どの程度最適化されているのか、という環境応答としての意義を明らかにするのがもうひとつの課題であろう。さらに、しくみを理解する基礎研究によるミネラル輸送制御の全体像の理解や鍵となる分子の同定は、効率的な施肥方法の開発、貧栄養や有毒元素に対する耐性の品種選抜や植物開発といった応用につながるものと期待される。(三輪京子)

文 献

- Britto, D. T., and Kronzucker, H. J. 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiol.*, **159**, 567-584.
- Clemens, S. 2010. Zn: A versatile player in plant cell biology. *In* Cell Biology of Metals and Nutrients, Plant Cell Monographs **17**, p. 281-298. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Hosmani, P. S., Kamiya, T., Danku, J., Naseer, S., Geldner, N., Guerinot, M. L., and Salt, D. E. 2013. Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root. *Prashant. Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 14498-14503.
- Iuchi, S. *, Koyama, H. *, Iuchi, A., Kobayashi, Y., Kitabayashi, S., Kobayashi, Y., Ikka, T., Hirayama, T., Shinozaki, K. and Kobayashi, M. 2007. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 9900-9905.
- Baxter, I., Hosmani, P. S., Rus, A., Lahner, B., Borevitz, J. O., Muthukumar, B., Mickelbart, M. V., Schreiber, L., Franke, R. B., and Salt, D. E. 2009. Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.*, **5**, e1000492.

- Kawachi, M., Kobae, Y., Tomioka, R., and Maeshima, M. 2011. The role of membrane transport in the detoxification and accumulation of zinc in plants. *Detoxification of Heavy Metals*, p.129-142. Springer, Heidelberg, Germany.
- Kawachi, M., Kobae, Y., Mori, H., Tomioka, R., Lee, Y., and Maeshima, M. 2009. A mutant strain *Arabidopsis thaliana* that lacks vacuolar membrane zinc transporter MTP1 revealed the latent tolerance to excessive zinc. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1156-1170.
- Kawachi, M., Kobae, Y., Mimura, T., and Maeshima, M. 2008. Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn^{2+} / H^{+} antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *J. Biol. Chem.*, **283**, 8374-8383.
- Kawachi, M., Kobae, Y., Kogawa, S., Mimura, T., Krämer, U., and Maeshima, M. 2012. Amino acid screening based on structural modeling identifies critical residues for function, ion selectivity and structure of *Arabidopsis* MTP1. *FEBS J.*, **279**, 2339-2356.
- 小林 優 2010. 植物栄養学 第2版. 文英堂出版.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Watanabe, T., Shaff, J. E., Ohta, H., Kochian, L. V., Wagatsuma, T., Kinraide, T. B., and Koyama, H. 2013. Molecular and physiological analysis of Al^{3+} and H^{+} rhizotoxicities at moderately acidic conditions. *Plant Physiol.*, **163**, 180-192.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Sugimoto, M., Lakshmanan, V., Iuchi, S., Kobayashi, M., Bais, H. P., and Koyama, H. 2013. Characterization of the complex regulation of AtALMT1 expression in response to phytohormones and other inducers. *Plant Physiol.*, **162**, 732-740.
- Lee, Y., Rubio, M. C., Allassimone, J., and Geldner, N. 2013. A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell*, **153**, 402-412.
- Ohyama, Y., Ito, H., Kobayashi, Y., Ikka, T., Morita, A., Kobayashi, M., Imaizumi, R., Aoki, T., Komatsu, K., Sakata, Y., Iuchi, S., and Koyama, H. 2013. Characterization of AtSTOP1 orthologous genes in tobacco and other plant species. *Plant Physiol.*, **162**, 1937-1946.
- Rawat, S. R., Silim, S. N., Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y., and Glass, A. D. M. 1999. AtAMT1 gene expression and NH_4^{+} uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant J.*, **19**, 143-152.
- Roppolo, D., De Rybel, B., Tendon, V. D., Pfister, A., Allassimone, J., Vermeer, J. E. M., Yamazaki, M., Stierhof, Y. D., Beekman, T., and Geldner, N. 2011. A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature*, **473**, 380-383.
- Sawaki, Y., Iuchi, S., Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Ikka, T., Sakurai, N., Fujita, M., Shinozaki, K., Shibata, D., Kobayashi, M., and Koyama, H. 2009. Stop1 regulates multiple genes that protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol.*, **150**, 281-294.
- Shanmugam, V., Lo, J. -C., Wu, C. -L., Wang, S. -L., Lai, C. -C., Connolly, E. L., Huang, J. -L., and Yeh, K. -C. 2011. Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana* - the role in zinc tolerance. *New Phytologist*, **190**, 125-137.
- Takano, J., Miwa, K., Yuan, L., von Wirén, N., and Fujiwara, T. 2005. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12276-12281.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., and Fujiwara, T. 2002. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature*, **420**, 337-340.
- Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K., Onouchi, H., Naito, S., and Fujiwara, T. 2010. Polar localization and degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 5220-5225.
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., von Wirén, N., and Fujiwara, T. 2006. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell*, **18**, 1498-1509.
- Tanaka, N., Fujiwara, T., Tomioka, R., Krämer, U., Kawachi, M., Maeshima, M. Characterization of the Histidine-rich Loop of *Arabidopsis* Vacuolar Membrane Zinc Transporter AtMTP1 as A Sensor of Zinc Level in Cytosol. *Plant Cell Physiol.*, in press.
- Tsednee, M., Yang, S. -C., Lee, D. -C., and Yeh, K. -C. 2014. Root-secreted nicotianamine from *Arabidopsis halleri* facilitates zinc hypertolerance by regulating zinc bioavailability. *Plant Physiol.*, **166**, 839-852.
- Uehara, M., Wang, S., Kamiya, T., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Fujiwara, T., Naito, S., and Takano, J. 2014. Identification and characterization of an *Arabidopsis* mutant with altered localization of NIP5;1, a plasma membrane boric acid channel, reveals the requirement for D-galactose in endomembrane organization. *Plant Cell Physiol.*, **55**, 704-714.
- Wang, M. Y., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., and Glass, A. D. M. 1993. Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of $^{15}\text{NH}_4^{+}$ influx across the plasmalemma. *Plant Physiol.*, **103**, 1259-1267.
- Wang, Q., Zhao, Y., Luo, W., Li, R., He, Q., Fang, X., De Michele, R., Ast, C., von Wirén, N., and Lin, J. 2013. Single-particle analysis reveals shutoff control of the *Arabidopsis* ammonium transporter AMT1;3 by clustering and internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 13204-13209.
- Yamaya, T., and Oaks, A. 2004. Metabolic regulation of ammonium uptake and assimilation. In S., Amancio, and I., Stulen (eds) *Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants*, p. 35-63. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
- Yuan, L., Gu, R., Xuan, Y., Smith-Valle, E., Loqué, D., Frommer, W. B., and von Wirén, N. 2013. Allosteric regulation of transport activity by heterotrimerization of *Arabidopsis* ammonium transporter complexes in vivo. *Plant Cell*, **25**, 974-984.
- Yuan, L., Loqué, D., Kojima, S., Rauch, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Takahashi, H., and von Wirén, N. 2007. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *Plant Cell*, **19**, 2636-2652.