

アイソトープイメージングを利用した
ミヤコグサのリン酸トランスポーターの機能解析

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻

放射線植物生理学研究室

菅野 里美

平成 21 年度

指導教員 中西 友子

目次

序章	1
第1章 ラジオアイソトープイメージングシステムの開発	6
第1節 ラジオアイソトープイメージングシステムの開発	6
1-1-1 緒言	6
1-1-2 実験方法	8
1-1-3 結果と考察	10
1-1-4 1節のまとめ	13
第2節 ラジオアイソトープイメージングシステムの改良	14
1-2-1 緒言	14
1-2-2 実験方法	14
1-2-3 結果と考察	16
1-2-4 2節のまとめ	18
第2章 ミヤコグサリン酸トランスポータの単離と解析	33
2-1. 緒言	33
2-1-1 リン酸トランスポータ遺伝子単離の歴史	33
2-1-2 リン酸トランスポータ遺伝子の局在	34
2-2. 実験方法	36
2-2-1 遺伝子の検索	36
2-2-2 リン酸輸送体遺伝子欠損酵母での相補実験	39
2-2-3 遺伝子発現解析	42
2-3. 結果と考察	51
2-3-1 リン酸トランスポータ遺伝子検索	51
2-3-2 酵母での遺伝子機能相補実験	53
2-3-3 リン酸トランスポータ遺伝子の発現解析	55
2-4. 2章のまとめ	57
第3章 リン酸欠乏ストレス時の ^{32}P 動態とリン酸トランスポータ遺伝子発現	77
第1節	79

3-1-1 緒言	79
3-1-2 実験方法	81
3-1-3 結果と考察	84
第2節	92
3-2-1 緒言	92
3-2-2 実験方法	92
3-2-3 結果と考察	93
第4章 形質転換体の作出とイメージング解析	113
4-1. 緒言	113
4-2. 実験方法	114
4-3. 結果および考察	123
総合考察	135
謝辞	140
引用文献	141
論文内容の要旨	149

序章

「植物の生育と無機栄養元素」

植物の生育に必須な無機元素には、多量元素と微量元素をあわせて 17 の元素がある。この中の一元素が欠乏したり、供給のバランスが崩れたりすると植物の生育は減退してしまう。そのため、適切に無機元素を施与することは、作物生産を確保するために重要な要素である。そして無機元素の適量を調べるためには、各元素がどのように植物体に取り込まれ、どのように機能するのかを理解する必要がある。特に、植物の無機元素の吸収移行を理解することは、作物栽培における肥料の適切な化学形態や、効果的な施肥方法（経根吸収あるいは葉面吸収）を検討する上で重要である。

「イメージングツール開発について」

近年めざましい発展を遂げている分子生物学的手法により、無機元素の吸収や分配機構を制御する遺伝子の単離や機能解析が進められてきている。一方で、無機元素の動態解析方法は、1950 年代から行われている古典的なラジオアイソトープを用いたトレーサ実験が主流であり、これにより無機元素の吸収と移行についての基本的な知見が得られてきた(Biddulph *et al.*, 1958)。このような、トレーサ実験では、採取したサンプルを液体シンチレーションカウンターやガンマカウンター、X 線フィルム等を用いて破壊的に解析するため、経時的な動態を同一個体で解析することは困難であった。しかし、無機元素の吸収や分配機構を理解するためには、吸収移行の鍵となる化合物や遺伝子の機能と同時に、基質（無機元素）そのものを解析する必要があり、そのための技術の発展が必要であると考えている。例えば、GFP を用いて遺伝子の発現やタンパク質の局在を可視化するように、植物体内の無機元素の動態を非破壊で解析することができれば植物の無機元素輸送や無機元素応答機構

を調べるための有効なツールになると考えた。そこで、「非破壊で無機元素動態解析を行うシステムを構築し、無機元素吸収動態を解析することと同時に、分子生物学的手法を用いて吸収移行の鍵となる遺伝子を解析し、植物の無機元素の輸送機構を調べる」ことを目的として研究を開始した。本研究では、無機元素のうち多量必須元素であるリンを対象として実験を行った。

「農業におけるリンの施肥について」

リンは、窒素やカリウムとともに最も多量に田畑へ投入される肥料である。この肥料原料であるリン鉱石は、輸入により賄われてきた。リン鉱石は、資源の枯渇が懸念されていることから、アメリカなどの諸外国において輸出規制が行われており、かつ途上国での需要の高まりの影響から世界的に価格の高騰が進んでいる。これを受け、日本国内でもリン肥料の価格は 2008 年の 7 月に前年比で 2 倍近く高騰しており、農業生産コストの上昇が生じている。そのため、農業従事者の施肥節約への意識は高まっている。

リン施肥節約への対策には、次の二点が重要ではないかと考えている。一つ目は、「有機物や難溶性の塩としてすでに土壤中に存在するリンを植物が吸収できるようにすること」である。二つ目は、「田畑へのリン肥料の投入量そのものを減少させていくこと」である。まず、「有機物や難溶性の塩として存在する土壤中のリンを植物が吸収できるようにする」ための研究として、リン酸欠乏時の植物が行う、根からの有機酸およびホスファターゼ分泌機構の研究および菌根菌との共生を効果的に利用する研究が進められている。一方、「田畑への投入量そのものを減少させていく」ためには、田畑の土壌の状態に合わせた施肥が必要である。これまでも一部の農家では土壌中の元素量を分析し、それに基づいた施肥を行っているが、このような土壌診断を基にした効率的な施肥方法は、今後ますます進められていくと思われる。そして、さらなる施肥の効率化を考えるには、これまで必要とされてきた投入量を見直す必要がある。そのためには、植物のリンに対する基礎的な知見に基づいた新

たな工夫が必要である。植物はリンの過剰施用による障害があらわれにくいと言われている。そのため、これまでの施肥量は必要量を超えている可能性がある。そこで、植物のリン吸収および器官への移行と代謝を解明し、器官ごとに最低限必要なリン量を詳細に算出することができれば、これまで経験的に投入されてきた肥料量を、大幅に減少することができるかもしれない。

「植物とリン」

植物体内においてリンは、生体膜や核酸の材料および ATP として代謝に関与する役割を持つ。植物はリンをリン酸(H_3PO_4)の形で吸収しているが、土壌中に存在するリンの 20-80%はイノシトール 6 リン酸などの有機態リンであり、無機リン酸もアルミニウム、鉄、カルシウムと結合した難溶性のリン酸化合物として固定されているため、自然環境下では、低リン酸環境状態にあることが多いと言われている。植物は低リン酸環境において、以下に示すようにさまざまな応答を通して植物体の生育を保とうとする。

植物の地下部では、根の生育量が増加し、土に対する根の表面積が拡大する(Bates *et al.*, 1996)。トランスポータの発現量の増加によりリン吸収能を上昇させる(Raghothama *et al.*, 2000)。根から有機酸（クエン酸、リンゴ酸、コハク酸）を分泌し、リン酸と難溶性化合物を作っている鉄やアルミニウム、カルシウムなどのカチオンとキレートすることによりリン酸を吸収できるようにする(Tadano *et al.*, 1991)。酸性ホスファターゼを分泌して土壌の有機体化合物に含まれているリン酸を遊離し、吸収する(Watt and Evans, 1999)。菌根菌との共生を強化し、根の届かない領域まで張り巡らされた菌糸が獲得したリン酸を光合成産物と引き換えに受け取る (Harrison *et al.*, 1999)。

一方、地上部では、低リン環境下では、液胞中に蓄えていたリン酸を細胞質へ放出し利用することや、細胞質のリン含有化合物からリン酸を遊離させて、新葉へ輸送し利用することが知られている(Greenway and Gunn, 1966、Mimura *et al.*,

1996)。葉の細胞では、このような液胞や細胞質のリン酸の輸送制御に加え、呼吸代謝におけるリン酸依存的代謝経路そのもののバイパス化(Schachtman *et al.*, 1998)や、リン脂質をガラクト脂質へ変えるなどの適応を示す(Hartel *et al.*, 2000)。

以上から、植物は地下部では「いかにリン酸を獲得するか」、地上部では「いかにリン酸を有効に利用するか」という応答を示しているといえる。

これらの応答は、分子レベルで機構が解明されてきている。植物のリン酸応答の分子機構解明は、酵母においてリン酸環境が変化した際の高親和性トランスポータやホスファターゼの遺伝子発現制御機構 (*pho* レギュロン) が明らかにされたことにより、植物にも同様の制御機構が存在する可能性があると考えられたことから始まる(Raush and Bucher, 2002)。シロイヌナズナでは、リン酸トランスポータの AtPT1;2 と TPSI はリン酸欠乏環境下で転写因子に結合していた阻害因子が外れることにより遺伝子が発現するという負の制御下にあることが示され、酵母のリン酸トランスポータ PHO84 の制御機構に類似していた。また、シロイヌナズナでのマイクロアレイや変異体の解析により、リン酸応答に関与する転写因子として PHR1, WRKY75, ZAT6 が単離されている (Rubio *et al.*, 2001, Franco-Zorrilla *et al.*, 2004, Devaiah *et al.*, 2007a, 2007b)。また、microRNA が地上部から根へ移行し遺伝子発現を制御すること(Chiou *et al.*, 2006)や、サイトカイニンが植物個体全体の広範囲なシグナルとしてリンの応答に関与すること(Chiou *et al.*, 2006, Martin *et al.*, 2000)が報告されている。これらのシグナル伝達機構は、酵母とは異なる植物独自の機構であることが判明しているが、全貌は明らかではない。特にシグナルの発端となるリン酸濃度の感知がどのように行われているかは未解明である。

以上のようなシグナル伝達機構を解明するためにも、植物体内のリン酸そのものの分布や動態解明が重要だと思われるが、リン酸動態の研究についての研究結果は分子生物学的な解析結果に比較して圧倒的に少ない。

リンの体内での循環や転流は、³²P トレーサを使った実験、およびリン酸の測定に

よる実験が行われてきた。これまでの知見から植物のリン輸送の特徴をまとめると、1) 若い組織への輸送が優先的である。2) 葉は成長に伴いリンのシンクからソースになる。3) リン欠乏に至ると古い葉に蓄積したリン酸や有機態のリンが放出され、若い葉や成長中の根へ篩管を介して移行する。4) 転流により根に移行したリンは再び導管によって地上部に運ばれる。という4点が挙げられる(Greenway and Gunn, 1966、Mimura *et al.*, 1996、Jaschke *et al.*, 1997)。これらの知見は、ある生育段階での組織中のリン含量から考察されたものであり、根から吸収されたリン酸が移行と代謝を受けた結果の蓄積分布を観察しているものである。根や葉から吸収されたリン酸の移行速度や様式は、これまでの技術では解析困難であり輸送の詳細は未解明であった。

本研究では、植物無機栄養元素のリンに注目し、植物のリン酸輸送機構を調べるため「リンの吸収移行を解明するための動態解析システムの構築と植物でのリン酸の動態解析」を行うと同時に「リン酸の吸収、分配制御を担うリン酸トランスポータの遺伝子を解析」した。

第1章 ラジオアイソトープイメージングシステムの開発

第1節 ラジオアイソトープイメージングシステムの開発

1-1-1 緒言

植物体内における物質の移行や蓄積の解析は、古くから放射性同位体を用いたトレーサ実験により調べられてきた。放射性トレーサの検出には、植物を採取し、種々の処理を加えた後に液体シンチレーションカウンターやガンマーカウンターでの測定、もしくは植物サンプルと X 線フィルムや Imaging Plate(FujiFilm Co.) をカセット内に封入しての露光が必要である。このようなサンプルの測定に破壊等の処理が求められる検出方法では、同一の個体を用いて生理状態を一定に保ちつつ経時的な解析をするのは困難である。一方で、植物体内の生理現象は刻一刻と変化しており、例えば、導管、篩管による物質の長距離輸送はそれぞれ 1.2-15 cm/min、0.83-1.6 cm/min の速度で行われている（森敏ら、植物栄養学Ⅲ章）。そのため、植物体内の物質動態を解析するためには、時間分解能の高い解析が可能な新たな実験手法の開発が必要である。

そのような中で、植物体内の物質動態を生きたままに解析できるシステムとして、医学分野で使われている PET(Positron Emission Tomography) を応用した研究が報告されている(Fujimaki *et al.*, 2009、Nakanishi *et al.*, 2003)。このシステム(Positron Emitting Tracer Imaging System : PETIS) は、ポジトロン放出核種から放出されるポジトロン (β^+ : プラス電荷を持った電子) が電子と対消滅する際に互いに 180°反対の向きに放出される一対の γ 線を同時に計数する方法で、植物中の物質動態を計測するものである。しかし、放出されるポジトロンは、一般に 1 MeV 以上とエネルギーが大きいことから、厚さが数 mm 以下の植物組織においては、かなりの割合のポジトロンが組織から空気中に飛び出してしまう。つまり、本来物質がある場所以外からも γ 線放出が生じてしまうという問題があるため定量的な解析が

できない。PETIS では、無機元素の中で利用可能なポジトロン放出核種が存在し、 ^{11}C , ^{13}N , ^{38}K , ^{62}Zn , ^{52}Fe などを解析することができる(Tanoi *et al.*, 2005)。しかし、ポジトロン放出核種は、その調製のために大規模な施設を要すること、半減期が短く使用時間が限られるなど実験実施上の困難がある。また、解析画像を構成する 1 ピクセルが約 2mm であることから、植物内の物質移行を調べる実験手法としては解像度の面から限界がある。

また、高解像度のイメージング解析として、NMR イメージング法がある。NMR は、磁気共鳴を利用した技術であり、医学分野において脳などの断層像を撮影する際に用いられている。この手法を植物茎に適用し、導管流や篩管流を測定した例がある(Peuke *et al.*, 2001、Windt *et al.*, 2006)。解像度も高く、画像から定量まで可能であるが、 ^1H 以外の元素については検出感度が極端に低いことから事実上、水の動きのみが測定対象とされている。しかし、NMR 用の試験管の大きさが小さく、測定できるサンプルが限定されること、測定中の光照度、温度や湿度などの環境制御が非常に困難であるなどの欠点もある。

このような中で、本研究では、1) 植物体の生理状態をできるだけ保持し、1 つの植物サンプルを連続解析できる、2) 高い時間分解能と解像度で解析できる、3) 一般の放射性同位体利用施設で使用できる汎用性の高い核種を対象にできる。の 3 点を備えたシステムの構築を目指した。まず、無機栄養元素であるリン、カルシウムに注目し、また光合成産物などの有機化合物の解析も期待できることから、炭素も対象とした。核種は ^{32}P (Max. 1.710 MeV、Ave. 0.695 MeV)、 ^{45}Ca (Max. 0.257 MeV、Ave. 0.076 MeV)、 ^{14}C (Max. 0.156 MeV、Ave. 0.049 MeV) を用いた。

植物体内の物質動態を解析するにあたり、感度と直線性および解像度は重要な要素である。そこで、本節では、システムの構築および構築したシステムの放射性トレーサ検出特性を述べる。

1-1-2 実験方法

(1)ラジオアイソトープイメージングシステムの構成

物質動態を解析する際、分単位の現象を解析するためには、一画像をより短時間で検出する必要がある。検出時間は、放射線量を多くすることでも短縮できるが、植物内での物質量、比放射能などによる限界がある。そこで、放射性同位体から放出される β 線の検出感度を高めることが求められた。

放射線の検出法の一つに、シンチレーションによって放射線を光に変換し、その光を検出する手法がある。光の検出は、既に多くの技術開発がなされており、現在の技術では、1 フォトンまでも検出することができる。そのため、放射線を光へと変換し、その光を高感度で検出するという方法に基づいたシステムの構築を試みた。

まず、シンチレータについては、プラスチックやフッ化カルシウムなどさまざまな素材を用いて変換効率を比較した結果、CsI(Tl)シンチレータを用いることにした。よって、本システムの構造は、CsI(Tl)シンチレータ板により β 線を光へと変換し、その光をフォトンカウンティングに用いられる GaAsP イメージインテンシファイアを搭載した CCD カメラ(Hamamatsu Photonics Co.) で検出するというものとなった (Fig.1-1)。CsI(Tl)シンチレータによって変換された微弱な可視光は、GaAsP イメージインテンシファイアの光電面において電子へと変換され、その電子がマイクロチャネルプレート (電子増倍管をキャピラリー状に束ねたものである。キャピラリーにかけられた電圧により生じる電界により壁面に衝突した電子が電子を放出する現象を繰り返す) において増幅されることによりシグナルが増加する。最終的に電子は蛍光面で像となり、CCD カメラで撮像される。カメラの制御および画像解析は、AQUACOSMOS システム(Hamamatsu Photonics Co.) で行った。

(2)感度・直線性と解像度の検討

ラジオアイソトープの検出に際しては、現在、最も多く利用されている Imaging Plate と比較することにより、本システムの検出感度と解像度を評価した。

^{32}P の標準線源(1 Bq (0.025 nCi) - 3.5 kBq (100 nCi) /半径 6 mm のスポット)をろ紙上に作成し、塩化ビニル製のラップで表面を覆った後 CsI(Tl)シンチレータ板に接触させ、1-20 分の積算時間で検出した。同様の標準線源を Imaging Plate(FujiFilm Co.) で検出し、放射線量と画像輝度値から検量線を作成して感度および測定値の直線性を比較した。

また、解像度の検討は β 線放出核種を根から吸収させた植物の葉を Imaging Plate および本システムで撮像したものを比較することにより行った。 $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ (9.25 Bq(0.25 mCi) /50 ml)、 $[^{45}\text{Ca}]\text{CaCl}_2$ (16.65 MBq(0.45 mCi)/50 ml) および $[^{14}\text{C}]\text{sucrose}$ (3.7 MBq(0.1 mCi) /50 ml)の各水耕液を根から 20 時間吸収させたダイズの葉の 10 秒、1 分、5 分、15 分の積算画像を本システムと Imaging Plate で撮像した。

(3)ダイズサンプルを用いた撮像

(3)-1. 植物栽培

ダイズ (*Glycyne max* L., エンレイ) の種子をバーミキュライト内で発芽させた後、Hoagland 水耕液(Table 1) に移植して 16 h Dark/8 h Light($250 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-1}$)、気温 25°C 、湿度 60%で栽培した。組織別の撮像には 6 週間栽培したものをを用いた。地上部全体の撮像には、4 週間栽培したものをを用い、4 週間のうちリン酸を除いた培地で 2 週間栽培したものをリン酸ストレス処理区とした。水耕液は一週間ごとに交換した。

(3)-2. 撮像方法

ダイズの葉および子実は、暗箱内のステージに固定し、その上に $5 \times 5 \text{ cm}^2$ の CsI(Tl)シンチレータ板をセットした(Fig.1-2)。Hoagland 水耕液（無リン酸）に ^{32}P を $1\text{--}4 \text{ MBq/ml}$ (Ortho-phosphate H_3PO_4 , Wako Co.) 添加し、植物の根もしくは茎から吸収させた。3 分間の積算時間で 1 枚の像を撮像した。

広い視野で撮像するため CsI(Tl)シンチレータ 2 枚を並べ $10 \times 20 \text{ cm}^2$ にし、ダイズ地上部全体の撮影を試みた。CsI(Tl)シンチレータをアクリルで作成したボックスの側面に固定し、そこへ植物サンプルを密着させた。Hoagland 水耕液（無リン酸）に ^{32}P を 10 kBq/ml 添加し、植物の根から与え、3 分間の積算時間で 1 枚の像を撮像した。画像の S/N 比は、サンプルと背景の領域中から同面積を選択し、シグナル数値を割ることにより求めた。

1-1-3 結果と考察

(1)感度・直線性と解像度の検討

結果

^{32}P の検出における RI 線量とシグナルの直線性は、Imaging Plate（20 分露光）、本システム（5 分積算）ともに $0.04\text{--}0.18 \text{ nCi/spot}$ ($1.3\text{--}6.5 \times 10^4 \text{ Bq/cm}^2$) の範囲で保たれていた。検出限界は、Imaging Plate が 5 分間の露光で 1.8 nCi/spot (65 Bq/cm^2) であるのに対し、本システムでは 5 分の積算で 0.18 nCi/spot (6.5 Bq/cm^2) まで検出可能であった(Fig.1-3)。また、本システムではわずか 10 秒間の積算時間の撮像で Imaging Plate の 1 分間の積算時間の撮像よりもコントラストのついた画像が得られた(Fig.1-4a,b)。Imaging Plate の 15 分間積算した画像とリアルタイムイメージングシステムの 5 分積算の画像を比較したところ、同程度の解像度であることが分かった(Fig.1-4a,b)。 ^{45}Ca は、Imaging Plate と本システムともに 1 分間の積算時間

による撮像で β 線の検出が可能であった(Fig.1-4c,d)。しかし、Imaging Plate は 1 分間露光読み取りの際のノイズが高くシグナルが弱かったことと比較して、本システムではノイズの影響は低かった(Fig.1-4c,d)。

^{14}C は、Imaging Plate では、5-15 分の積算時間で画像を得ることが出来なかった。一方、本システムでは、5 分の積算で像を得ることが可能であった(Fig.1-4e,f)。

考察

1 Bq/spot の標準線源の検出では、Imaging Plate では 20 分の積算が必要であったが、本システムでは 1 分の積算時間で撮像が可能であったことから、本システムでは単位時間あたりの検出感度が Imaging Plate よりも 20 倍程度高いことが示された。また、 β 線放出核種を吸収させたダイズ器官の撮像では、本システムでも Imaging Plate と同様に葉脈を確認することができた。そのため、葉脈を通過する物質の動態を追跡するのに十分な解像度を持つことが分かった。Imaging Plate と本システムは、それぞれの検出原理によりシグナルとノイズの影響が異なっていた。Imaging Plate では露光中のノイズが低いため、長時間感光させて検出することでノイズに対するシグナル比 (S/N 比) を上げることができる。このことから、長時間の積算で検出することに長けている。一方、本システムは、CCD カメラの暗電流による読み取りノイズが常に存在 (最大 200 cps/cm²) するため、ノイズは積算時間に比例する一方、感度が大変高いので短い時間で画像を取得するのに優れていた。また、積算時間 5 分で ^{32}P を測定した場合、 $6.5\text{--}1.3 \times 10^4$ Bq/cm² の広範囲で RI 量とカウント値の直線性が確認でき、濃度として 10^3 の広範囲で動態解析ができることがわかった。また、 ^{14}C の検出が可能であったことから、 ^{14}C 標識化合物の動態解析に応用できることが示された。

(2)ダイズサンプルを用いた撮像

(2)-1. ダイズのそれぞれの器官における ^{32}P 動態解析

ダイズの葉や子実での ^{32}P 移行の撮像を試みたところ、時間あたりの ^{32}P 移行量は器官により異なっていた。発達段階の異なる葉を比較すると、より新しい葉の方が時間あたりの移行量が多く、撮像終了時の蓄積量は Fig.1-5(a)が Fig.1-5(b)の約 5 倍多かった。また、移行様式に注目すると、葉へ移行した ^{32}P は、中央の葉脈を辿るように葉の全体へ広がった後、葉脈の一部や、葉と茎の接合部への集積が観察された(Fig.1-5a,b,c)。ダイズの子実での ^{32}P は、子実全体へと広がった後に種子部分へ蓄積する移行様式を示した(Fig.1-5d)。

以上の結果から、単位時間あたりの ^{32}P 移行量は、葉の成熟度により異なることが分かった。これまでの Imaging Plate による検出でも器官別の蓄積の違いを観察することはできたが、今回の撮像により、時間あたりの移行量、すなわち速度の違いが生じていることが分かった。また、根から吸収された ^{32}P リン酸(H_3PO_4) は、さまざまな代謝を受け、主にリン脂質、リン酸エステル、糖リン酸、核酸、無機態リン酸として液胞に蓄積されている。本システムで検出した ^{32}P がどのような形態であるか知るには各種分析が必要である。

(2)-2. 地上部全体での ^{32}P の動態解析

ダイズの器官ごとの撮影では、それぞれの新旧の葉への ^{32}P の単位時間あたりの移行量が異なることがわかった。次に、新旧の葉を同時に撮像し、それぞれの葉への移行分配を調べることにした。ダイズ幼植物の地上部全体の撮像を行うため、これまでの撮影に用いていた 5 cm×5 cm の CsI(Tl)シンチレータ板から、10 cm×10 cm の CsI(Tl)シンチレータ板を用い、2 枚組み合わせることにより 10 cm×20 cm の視野で撮影できるように改良した。リン酸が潤沢な培地で栽培したダイズ（コントロール区）では、 ^{32}P は新芽に集中し、初生葉や第一本葉など成熟葉への移行蓄積量

は少なかった(Fig.1-6a,c)。一方、リン酸欠乏ストレスを施したダイズは、単位時間あたりの ^{32}P 移行量がコントロール区と比較して多く、初生葉など成熟葉への移行量が多かった(Fig.1-6b,d)。また、第 1 本葉よりも第 4 本葉へ分岐する茎内の ^{32}P 量が多く見られるなど、茎の分岐点から各葉への移行量は異なっていた。

以上の結果に示される ^{32}P の分配の違いは、これまでに Imaging Plate で検出した結果と一致するものであり(Fig.1-6e,f)、本システムでもこれまでの手法と同様に生理現象を解析できることがわかり、得られた連続画像から、地上部の各葉へ移行する時間当たりの ^{32}P 量を求めることができた。

1-1-4 1 節のまとめ

1. 植物サンプルから放出される β 線(^{32}P 、 ^{45}Ca 、 ^{14}C) を光に変換させることにより、組織内の放射線同位体の局在を画像として検出することができた。また、画像の解像度は Imaging Plate と同等であったが、検出感度は約 20 倍程度高いことが示された。
2. 本システムは、1 枚の画像を短時間で取得することに優れており、連続した撮像を繰り返すことによって分単位の物質動態を解析することに成功した。
3. ダイズを用いた解析により、生きた植物サンプル内の時間あたりの ^{32}P 移行量を解析できるようになった。

第2節 ラジオアイソトープイメージングシステムの改良

1-2-1 緒言

これまでの実験から、開発したシステムを用いて放射性同位体トレーサ(^{32}P)の植物体内の動態を分単位で解析できることが確認できた。ただし、第1節のダイズを用いた撮像は、高感度 CCD カメラでフォトンを検出するというシステムの特長上、すべて暗条件下での解析であり、植物の生理現象を解明するためには、明条件下で撮影が行えるように改良する必要があった。また、CsI(Tl)シンチレータは最大 10 cm × 20 cm であり、今後、生育ステージの進んだダイズサンプルを観察するには視野が狭いという問題があった。そこでリン酸トランスポータの働きとリン酸の動きを理解するために個体の大きさが最適なマメ科モデル植物のミヤコグサを対象として以後の解析を進めることにした。ミヤコグサを用いたことから地下部と地上部の同時撮影が可能になり、さらに分子生物学的手法へも着手しやすくなった。なお、以降の装置開発、研究では放射性同位体元素として ^{32}P を対象として行った。本節では、システム改良とその結果撮影できるようになったミヤコグサの ^{32}P イメージを示した。

1-2-2 実験方法

(1)植物設置方法の改良

改良は、1) 光の照射、2) 温度と湿度、3) 根圏の撮影の3点において行った。

(1)-1 光の照射

アルミニウム製の箱内に植物サンプルを置き、白色 LED 光を植物に照射するように設置した。CsI(Tl)シンチレータは、LED 光を透過する性質を持つため、LED の光が撮像時のバックグラウンドを上げる原因となってしまう。そこで、サンプル側のシンチレータ面に 100 μm のアルミニウム箔を貼り、LED からの光が透過し

ないように加工を行った。これにより、アルミニウムで覆った内部に植物体と LED を配置し、アルミニウムを透過してきた放射線をアルミニウムの外部に配置したシンチレータで画像化する機構となった。

(1)-2 温度と湿度

撮影中に植物の蒸散で湿度が上昇することが判明したため、植物サンプルを入れる箱に穴を開け、外気と常に入れ替わる加工を施した。また、シンチレータ板の固定部分、LED 固定部分は、熱を放散しやすいアルミニウム板を用いた。

(1)-3 根圏の撮影

根圏の撮影のために、水耕液や土を入れることができる水槽を作成した。厚さ 1 cm のアクリル板を用いて水耕液や土が 10 cm×10 cm×1 cm の容量でセットできるようにした。

(2)³²P 動態解析実験

(2)-1. ミヤコグサ栽培方法

サンドペーパーで種子の表面に傷をつけ、次亜塩素酸による殺菌後、蒸留水をしみ込ませたろ紙上に種子を播種し 7 日間培養した。発芽した実生を Hoagland 水耕液に植え替え、16 h Dark/8 h Light(250 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$) で栽培した。10 日間栽培したサンプル、20 日間栽培したサンプル、15 日間した後 10 日間無リン酸培地で栽培したサンプル、30-40 日間栽培したものを子実期のサンプルとして撮影に用いた。水耕液は培養容器のサイズにより 3 日から 1 週間ごとに交換し、コントロール区栽培では含有するリン酸濃度を一定に保った。土耕での撮像では、(1)-3 で作製した水槽に培養土（サカタスーパーソイルミックス A）を入れ、発芽した実生を植え替え 30 日間栽培したものをを用いた。

(2)-2. ミヤコグサ ³²P 動態解析

水耕栽培での撮像では、Hoagland 水耕液 40 ml に ³²P を 1 MBq 添加したものを水

槽に入れ、1 枚の画像を 3 分間の積算で取得し、20 時間撮影した。

土耕栽培での撮像では、植物を育てた水槽の側面のアクリル板を外し、根圏の一部に Hoagland 水耕液 10 ml に ^{32}P を 5 MBq 添加したものを与え、1 枚の画像を 5 分間の積算画像として取得し、20 時間撮影した。

1-2-3 結果と考察

(1)植物設置方法の改良

明条件下での撮像の改良のため、当初、高感度 CCD カメラを遮光できる箱内に置き、グロースチャンバー内で撮影するような改良を考え加工を試みたものの、LED 光を完全に遮光しシグナルを検出するまでに至らなかった。そこで、植物サンプルの方を光が当てられる箱内にセットする、いわば、小さなグロースチャンバーを暗箱内に入れる方法に変えることにした。アルミニウム板で作成した箱内に植物栽培に適した白色 LED 光を設置し、その光が箱の外に漏れないようにした(Fig.1-7)。しかし、植物サンプルを設置した CsI(Tl)シンチレータ自体に LED 光を透過する性質があったことから、光の漏れを塞ぐ必要があった。そして、シンチレータ板をアルミニウム板(100 μm)で遮光することにより光り漏れの問題を解決することができた(Fig.1-9)。アルミ板の厚さによる放射線の強度変化を検討したが、 ^{32}P から放射される β 線はアルミニウム板を透過するのに十分なエネルギーを持つため減衰を考慮せずに解析できることが分かった(Yamawaki *et al.*, 2009)。また、温度と湿度の制御には空冷装置の取り付けを考案したが、植物サンプルを設置した箱と室内の空気をエアポンプにより交換することにより、サンプルを設置した箱内をバイオトロンとほぼ同様の温度 23-26 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60-70 %の状態を保てることが確認できたため、このシステムで解析を進めていくことにした。これまで植物組織の一部分、もしくは地上部に限定された試料の撮像だったが、サンプルの設置部分を加工することより、植物体（ミヤコグサ）個体全体の撮影系の構築を試みた。10 cm×10 cm の CsI シン

チレータ 1 枚を植物の地上部に、1 枚を地下部撮影用として設定し、地下部のシンチレータ面に対しての亚克力板で作成した水槽(8 cm×8 cm×1 cm)を取り付けることにした。液体が漏れないように改良を重ねた結果、水耕液、土耕、砂耕培地で根圏の撮影が可能となった。水耕撮影においては、シンチレータ板にサンプルの地上部を綿テープにより数箇所固定し、根はナイロンメッシュを用いて全体がシンチレータ面から離れないように固定した(Fig.1-8)。根を固定した水槽に ^{32}P を添加した Hoagland 水耕液(40 ml)を与えたのち、地上部のみに白色 LED 光(約 $250 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$)が照射されるように光源を固定した(Fig.1-8)。土や砂の場合は、水槽に培養土、川砂を入れ、ミヤコグサの実生を植え換え栽培し、土と根の適当な領域に ^{32}P (1 MBq)を添加した Hoagland 水耕液を与え、根圏と地上部をシンチレータ面に固定する方法により、 ^{32}P 動態の画像を取得することができた。

(2)ミヤコグサ ^{32}P 動態解析実験

地上部と地下部を同時に観察するにあたり、地下部の水耕液の ^{32}P から放射される放射線量が強すぎると、サンプル内の ^{32}P 検出のバックグラウンドを高める要因となるため、水耕液に混合するアイソトープの量が問題となった。とくに、根での ^{32}P 移行蓄積は、根圏の ^{32}P を根が吸収し濃縮することにより検出できることから、水耕液の ^{32}P 量が重要であった。そこで、いくつかの ^{32}P 量を検討し、1 MBq-5 MBq/40 ml の時に各組織への移行蓄積を撮像することができたため、以後、この放射濃度を用いることとした。水耕栽培 10 日および 20 日目のミヤコグサで ^{32}P の吸収移行を撮像したところ、根の発達した 20 日目のサンプルでは、撮影開始から 90 分後には、地上部の茎へ ^{32}P が到達しており、5 時間目では、サンプルの根圏の ^{32}P の減少が見られた。10 日目のサンプルでは、 ^{32}P は 2 時間目に茎へ到達し、しだいに全組織へと移行した(Fig.1-10)。リン酸欠乏ストレスを施したミヤコグサでは、撮影開始から 30 分で地上部の茎の先端まで ^{32}P が到達し、それからおのおのの葉、根へ蓄積する

様子が観察された(Fig.1-11.a)。特に、生長が著しい地上部の新芽、根端で ^{32}P が蓄積していた。根の一部に注目すると、伸長する根の先端には常に ^{32}P が集積していた(Fig.1-11.b)。子実期のサンプルでは、地上部へ移行した ^{32}P は、子実へ蓄積した(Fig.1-12)。土で栽培した植物体の場合、土に $50\text{ }\mu\text{M}$ のリン酸を含む ^{32}P トレーサを根の一部分に与え撮像を試みたところ、根での ^{32}P の吸収と蓄積、さらに地上部へ移行する様子を観察することができた(Fig.1-13)。

以上の結果の中で、子実期のサンプルにおいて幼植物期のサンプル(Fig.1-10) のような ^{32}P の葉への移行が見られず、子実に優先的に蓄積していたことから、植物体内のリン酸の移行は生育ステージにより制御が切り替わることが考えられた。土耕での吸収移行は水耕液に比べて遅く、おそらく土へのリン酸(^{32}P) の吸着が原因ではないかと考えられた。

1-2-4 2節のまとめ

1. バイオトロン内での栽培と同様の光、温度条件下で ^{32}P アイソトープイメージングができるシステムに改良することができた。
2. 培地の ^{32}P がミヤコグサによって吸収され体内を移行する過程が、地上部と地下部同時に観察できるようになった。
3. 2により植物のリン酸分配、リン酸移行様式を可視化することができ、植物のリン酸輸送機構の解明において有効なツールとなり得るものと考えられた。

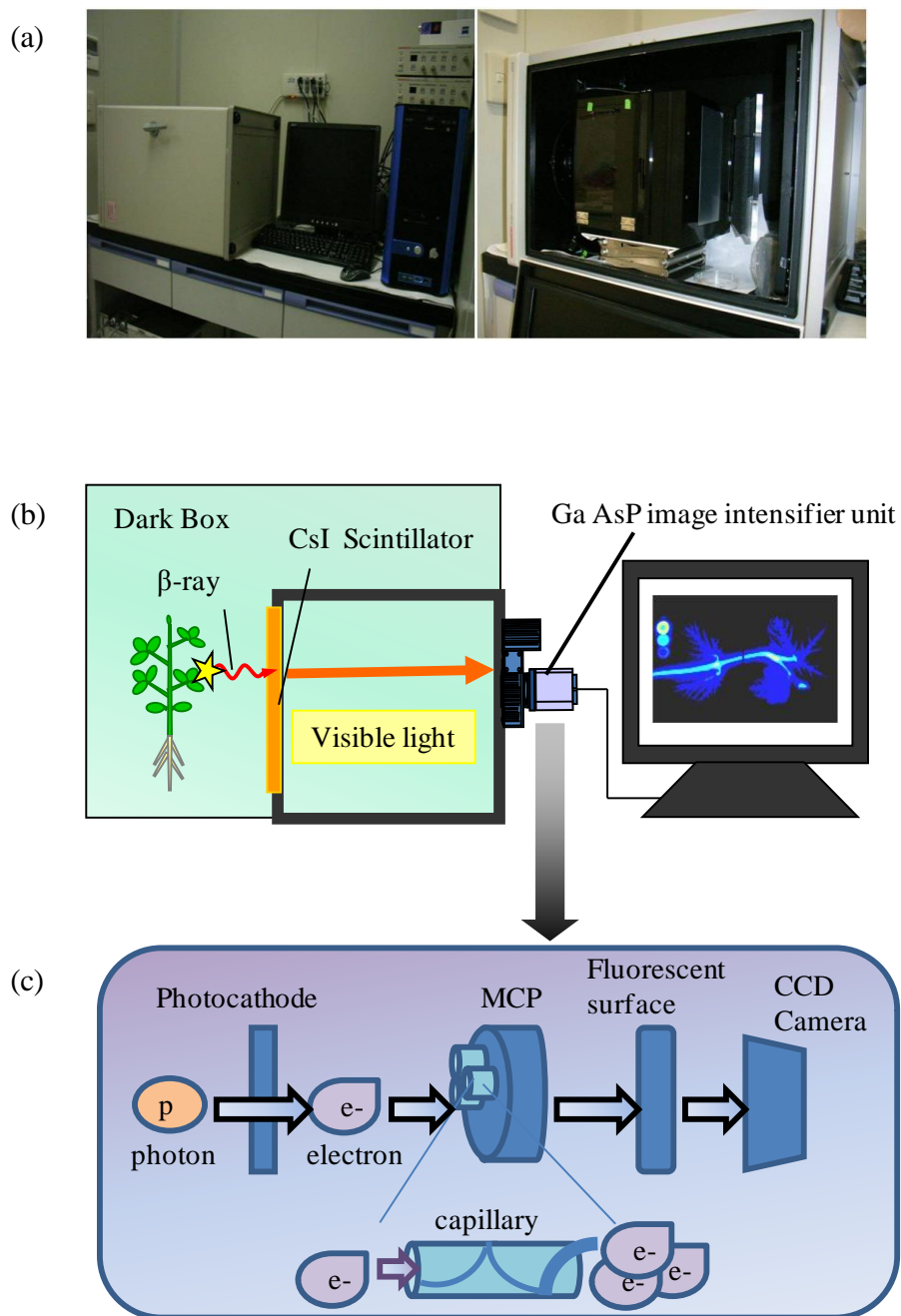


Figure 1-1 ラジオアイソトープイメージングシステム

- (a) システムの外観。(左) 暗箱内に高感度カメラを設置。(右) 暗箱内を拡大。
 (b) システムの概略。植物から放出された β 線はCsIシンチレータにより可視光に変換されCCDカメラにより検出した。
 (c) インテンシファイアユニットの仕組み。電子増倍管によりイメージを増幅した。

Table1 Hoagland水耕液の組成

Nutrients	終濃度
KNO_3	5 mM
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5 mM
H_3BO_3	46.3 μM
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	9.15 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.32 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.77 μM
Fe(III)-EDTA	20 μM
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.2 μM

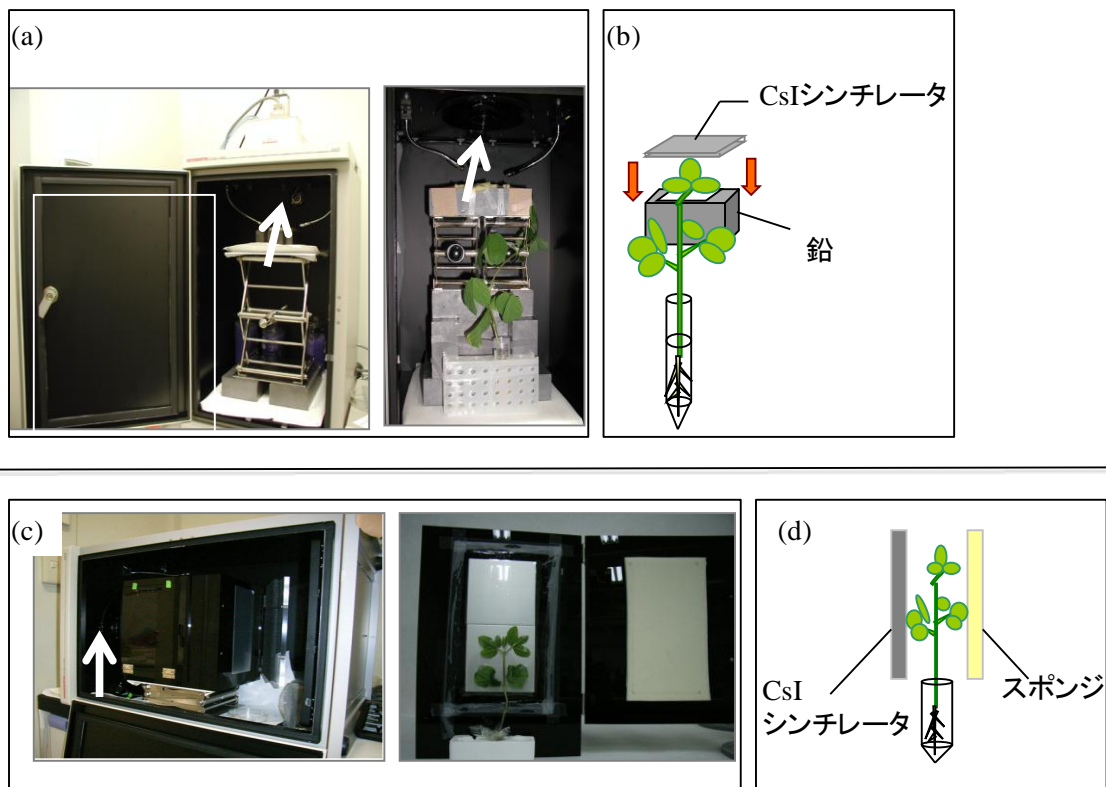


Figure 1-2 植物サンプルの設置方法

(a)器官別に撮影するためのサンプル設置方法。CCDカメラ（写真中の白矢印）

(b) (a)の時サンプルセット方法。撮影する器官の上にCsIシンチレータを載せ軽く押さえた。

(c)地上部全体を撮影するためのサンプル設置方法。CCDカメラ（白矢印）

(d) (a)の時サンプルセット方法。縦にセットしたCsIシンチレータに植物が密着するようにスポンジで軽く押さえた。

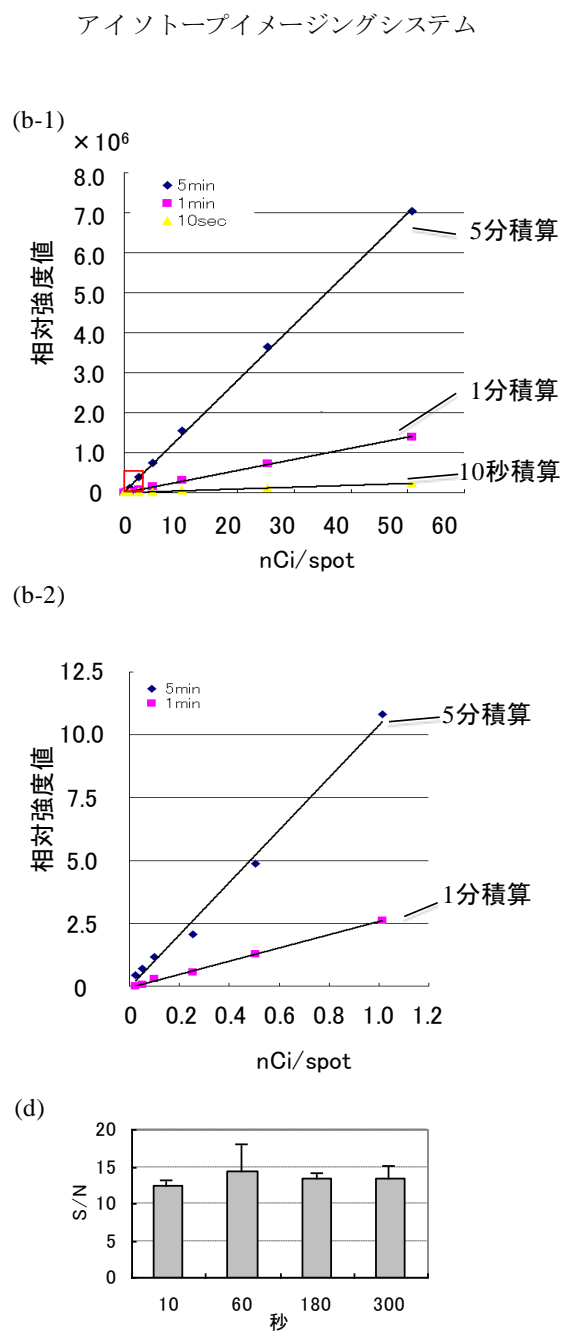
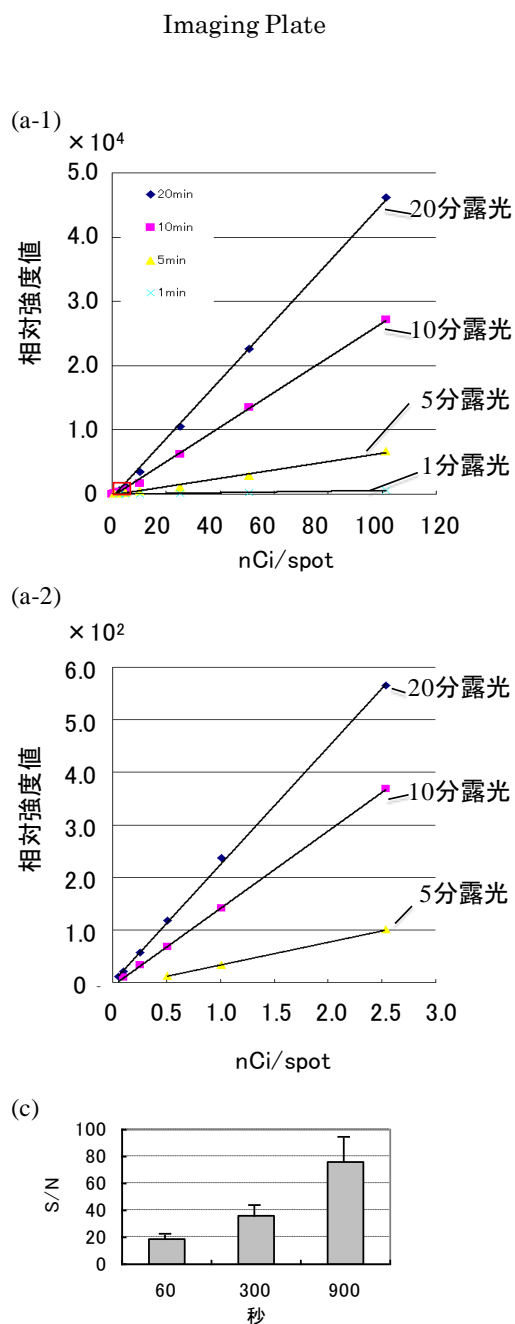


Figure1-3 6線の検出限界および直線性と感度について、Imaging Plateと本システムの比較
 (a-1) Imaging Plateでの検出結果。
 (a-2) (a-1)の領域（赤四角）を拡大したもの。
 (b-1) ラジオアイソトープイメージングシステムでの検出結果。
 (b-2) (b-1)の領域（赤四角）を拡大したもの。
 (c) Imaging Plate露光時間とS/N比の関係。
 (d) ラジオアイソトープイメージングシステムでの検出時間とS/N比の関係。

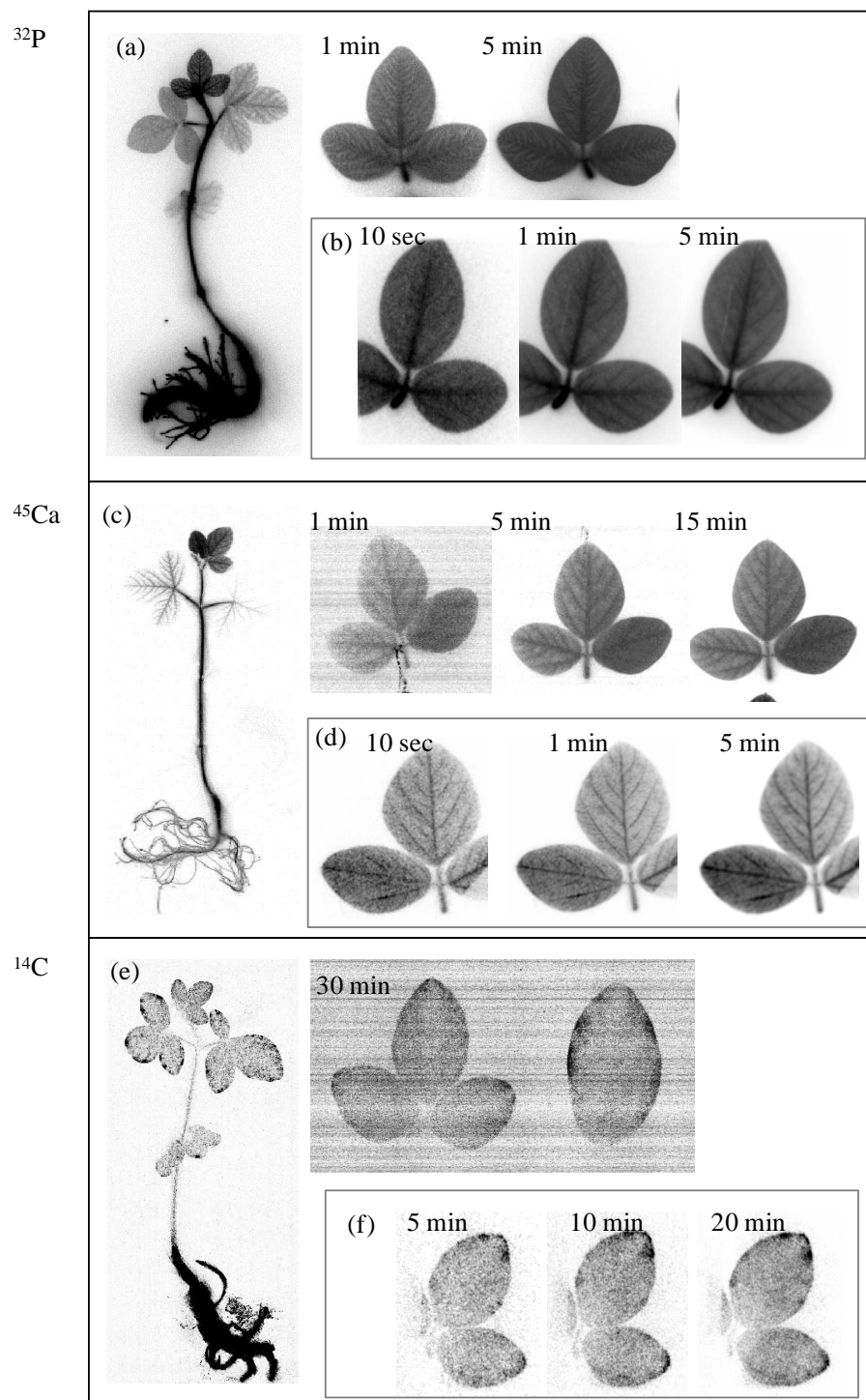


Figure 1-4 ラジオアイソトープイメージングシステムとImaging Plateの画像比較
 (a)イメージングプレートによる ^{32}P 像、(b)本システムによる ^{32}P 像。
 (c)イメージングプレートによる ^{45}Ca 像、(d)本システムによる ^{45}Ca 像。
 (e)イメージングプレートによる ^{14}C 像、(f)本システムによる ^{14}C 像。

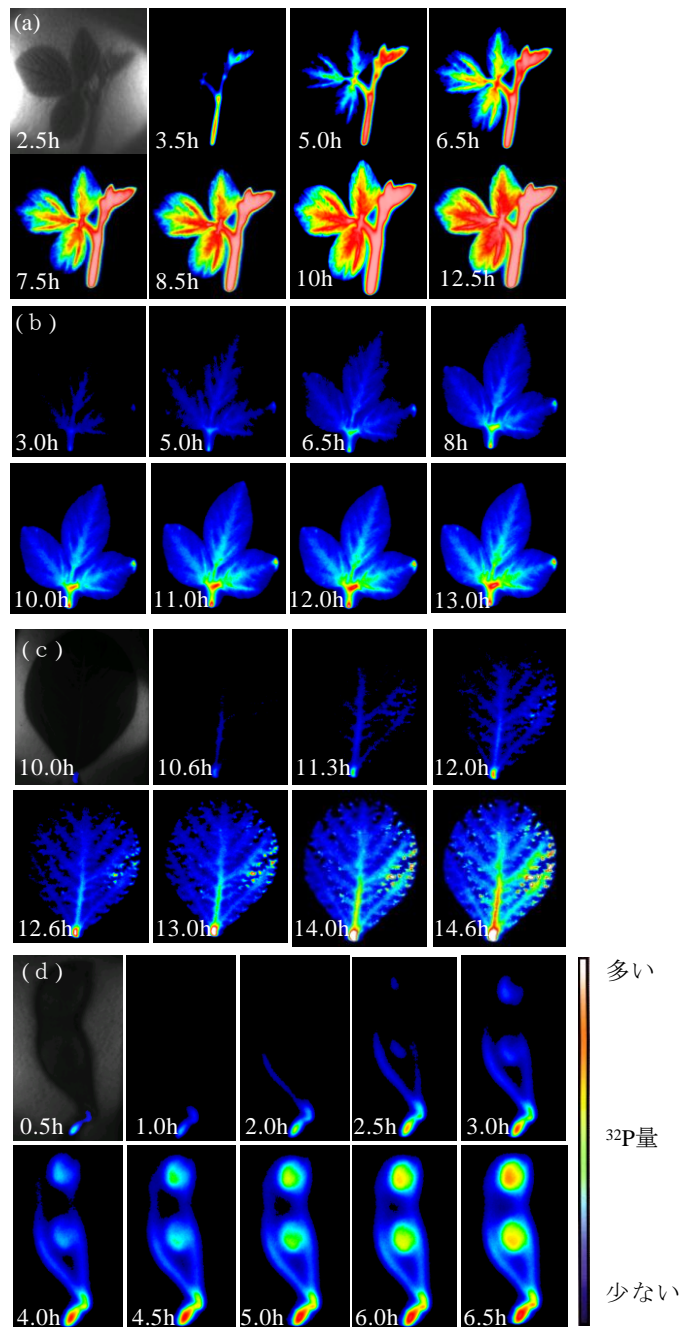


Figure1-5 ラジオアイソトープイメージングシステムによる
 ダイズ器官別の ^{32}P 経時的イメージング
 ^{32}P を含む水耕液（10MBq/50mlHoagland）を水耕栽培35日間栽培のダイズの根
 （子実撮影時は茎から）に与えて撮像した。3分間の積算時間で24時間撮影。
 (a)新葉および新芽、(b)葉、(c)さらに生育ステージが進んだ葉、(d)子実。

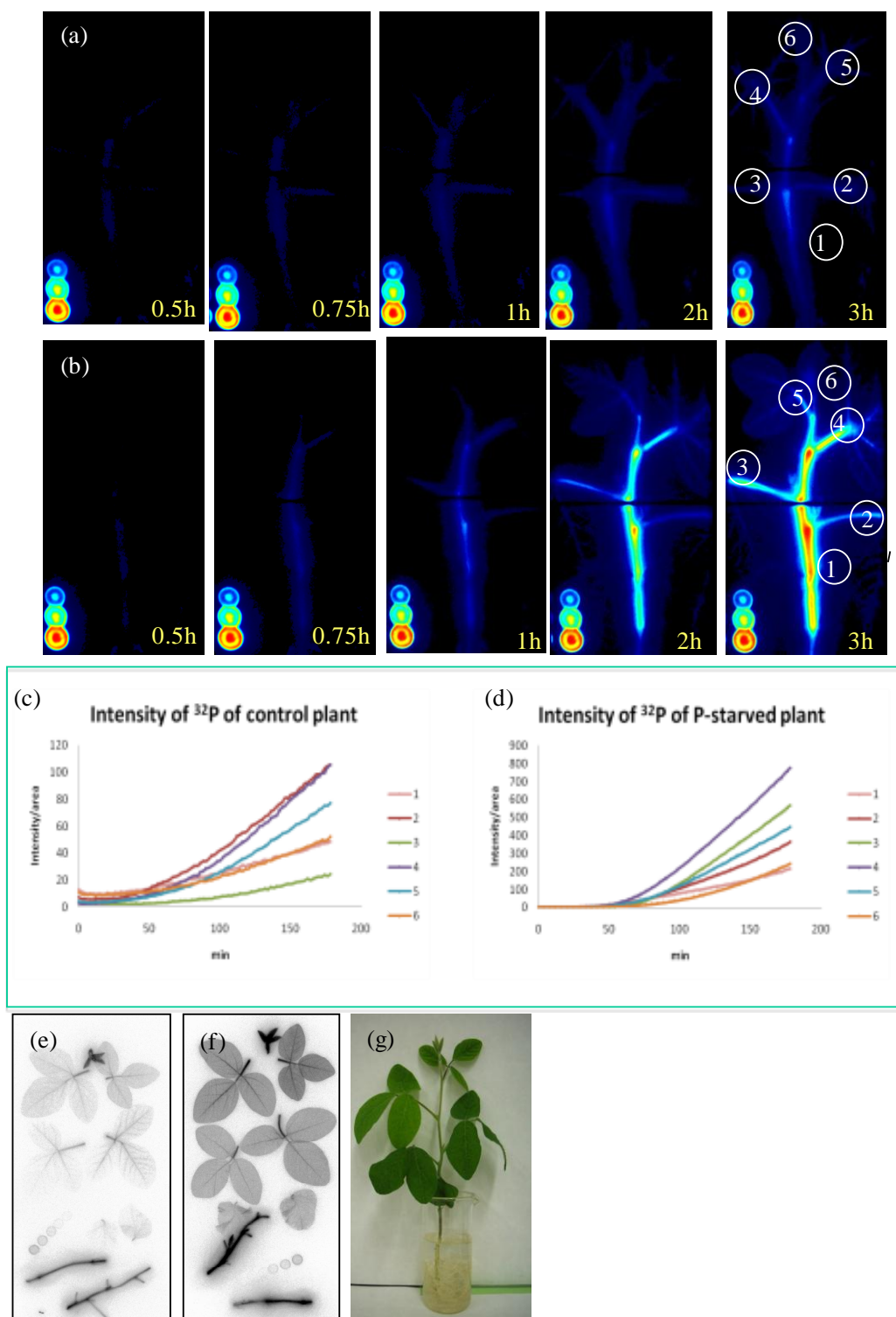


Figure1-6 ダイズ地上部の ^{32}P イメージ
 (a)コントロールサンプル 連続画、
 (b)ストレスサンプル連続画、
 (c)コントロールサンプル葉ごとの ^{32}P 移行量の変化、
 (d)ストレスサンプルの ^{32}P 移行量の変化、
 (e)Imaging plateによるコントロールサンプルの ^{32}P 分布、
 (f) Imaging Plateによるストレスサンプルの ^{32}P 分布。(g)4週間水耕栽培したダイズ

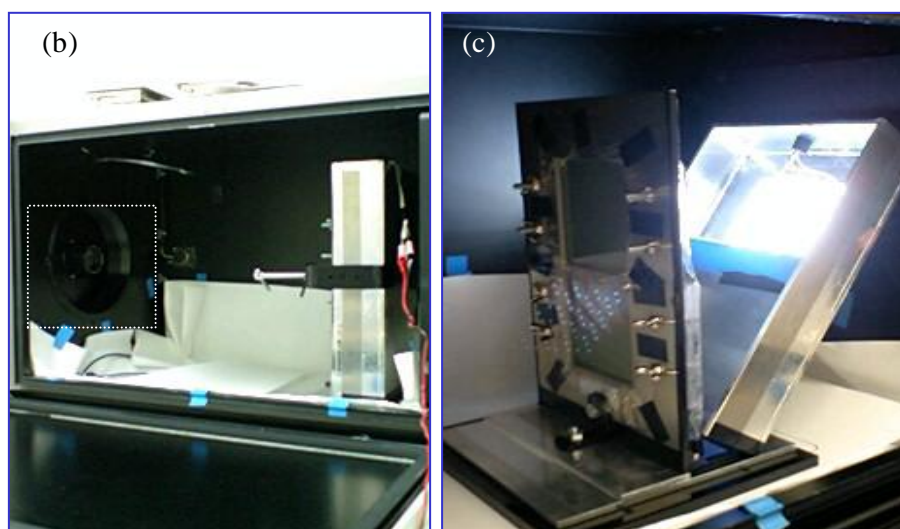
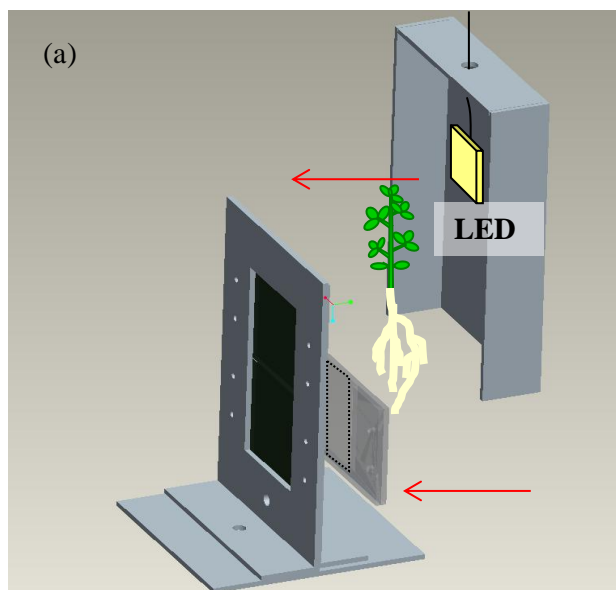


Figure 1-7 改良したラジオアイソトープイメージングシステムの構造
 (a)構造のイメージ図。アルミ箱内で植物にLED光を照射させた。
 (b)暗箱内に設置したアルミニウム製の箱。CCDカメラ（白点線）。
 (c)LED光を照射したアルミニウム製の箱。

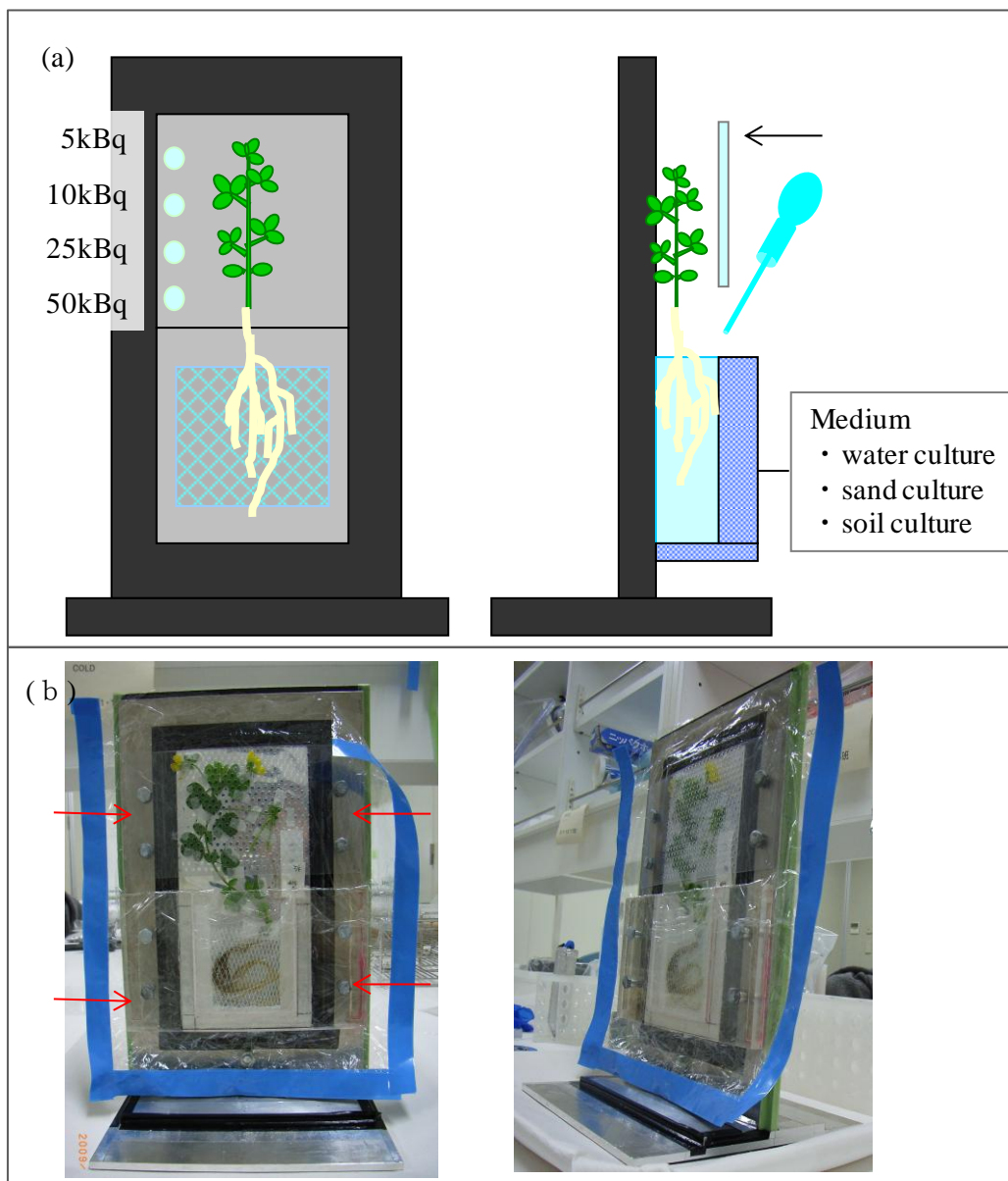


Figure 1-8 植物の設置方法

(a)植物設置のイメージ図。根はナイロンメッシュで軽く押さえる。根圏には最大45mlまでの水耕液を入れることができる。地上部は穴のあいたアクリル板（2mm）で支える（黒矢印）。

(b)実際の様子。地下部のスリット、地上部固定用のアクリル板はビスで固定した（赤矢印）。

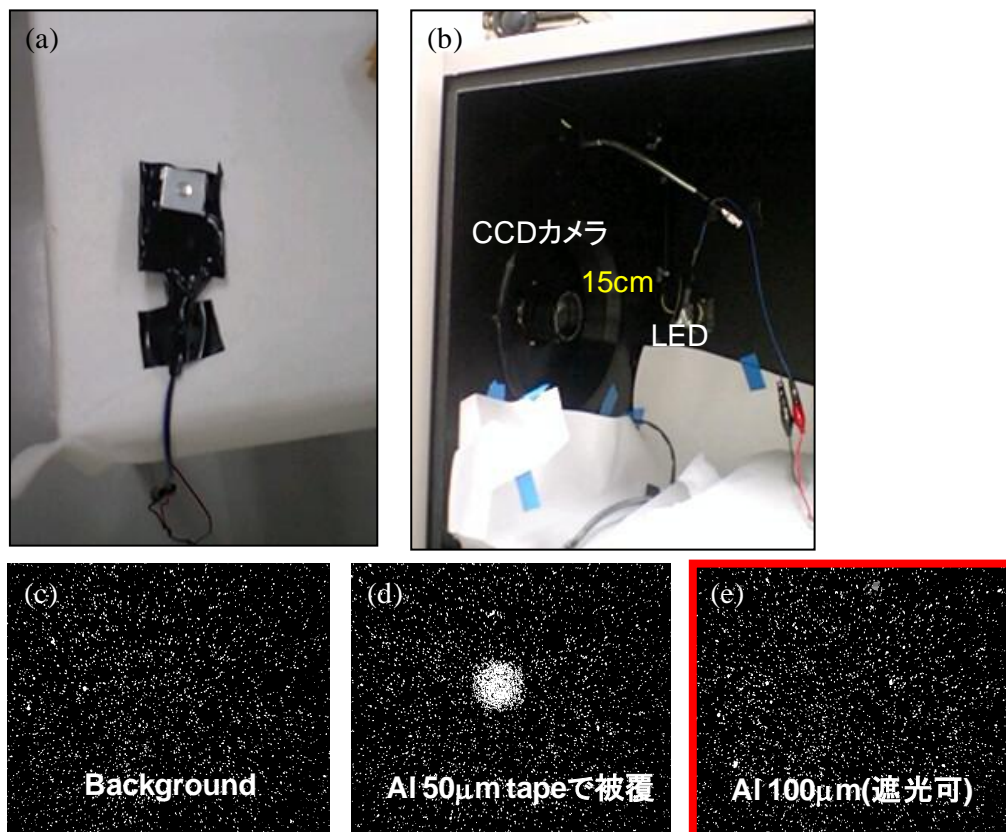


Figure 1-9 LED遮光テスト
 (a)アルミテープで覆ったLED光源、
 (b)セッティングの様子、
 (c)–(d)イメージングシステムで検出した像。

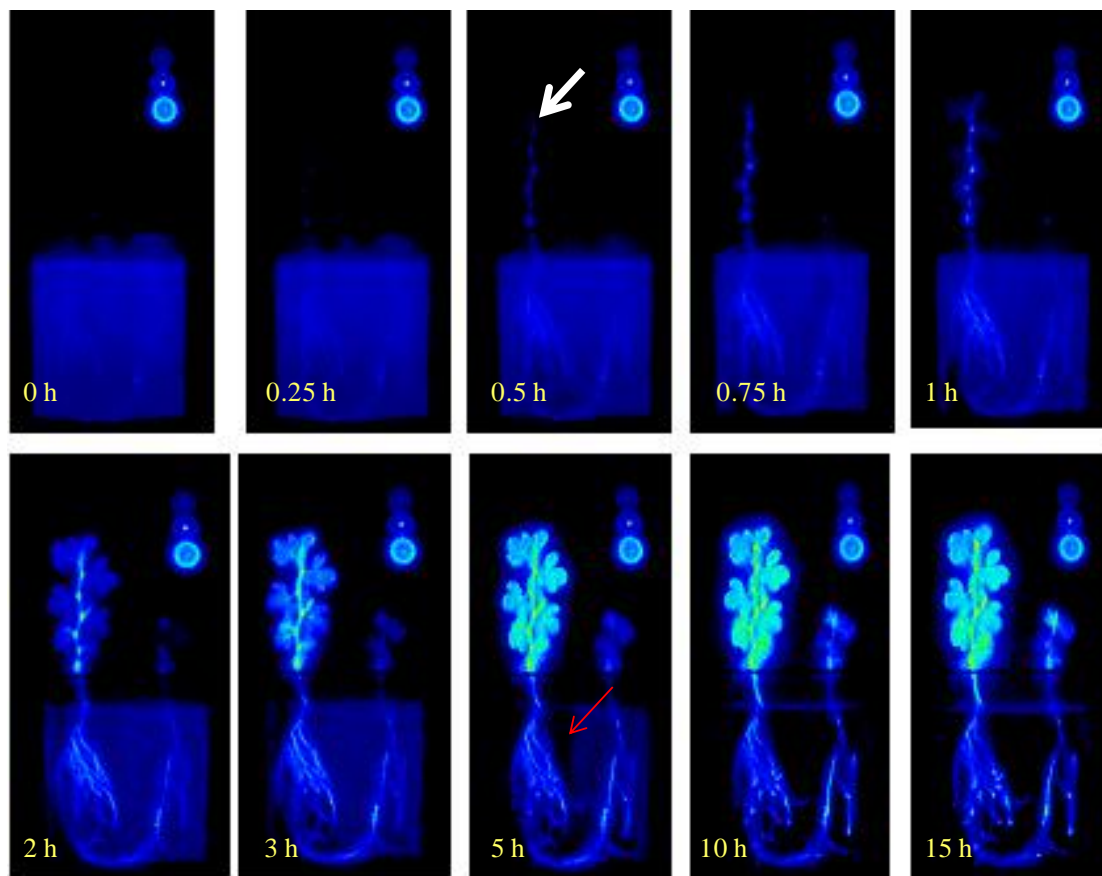


Figure 1-10 ミヤコグサ ^{32}P イメージング（幼植物期）
 ^{32}P を含む水耕液（1 MBq/30 ml Hoagland）で水耕栽培20日間（左）と10日間（右）同時に撮像した。
 根の発達した20日間個体の方が地上部への移行するまでの時間が早かった（白矢印）。
 根圏の ^{32}P が吸収されつくしてしまう様子観察された（赤矢印）。

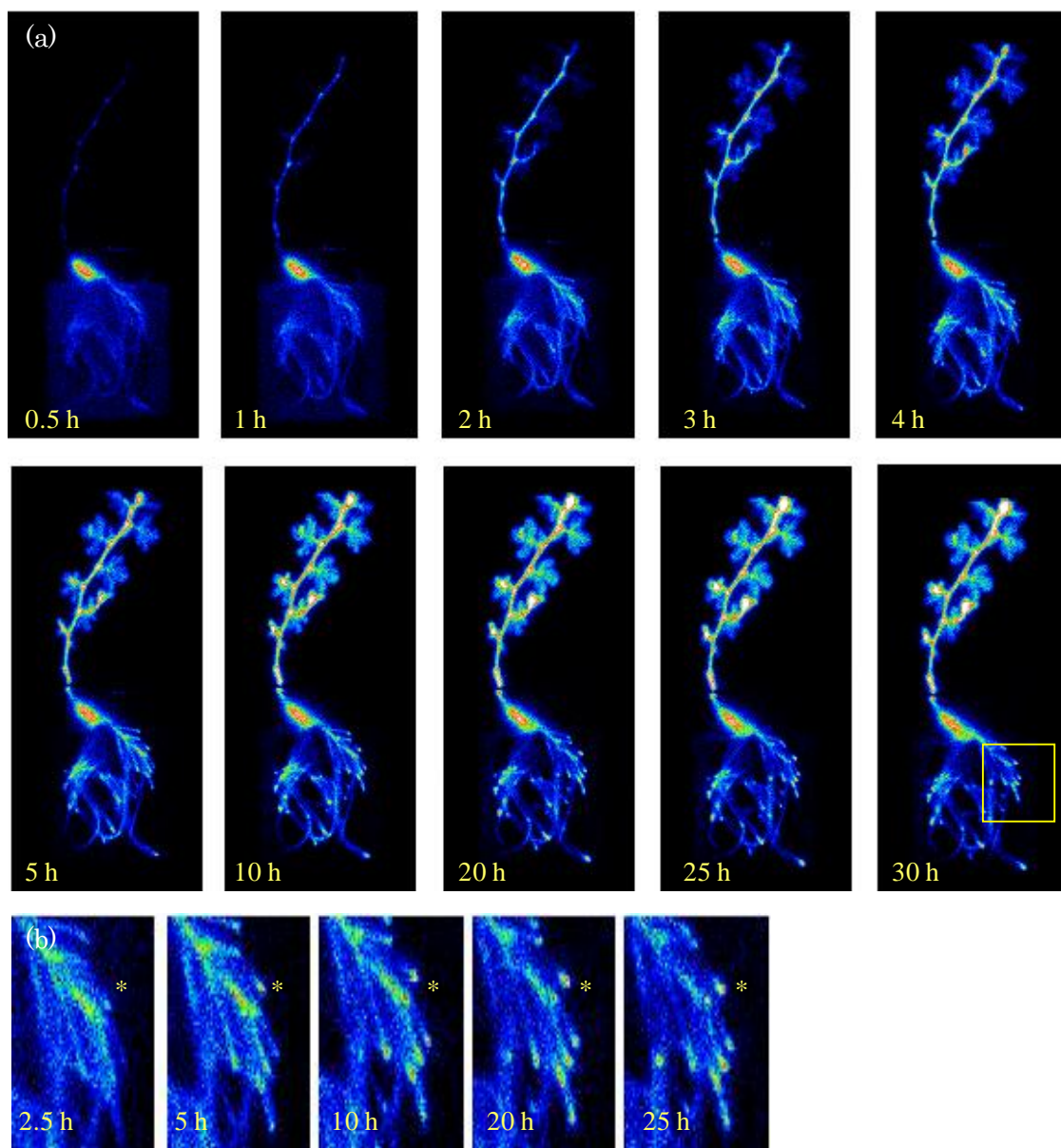


Figure 1-11 ミヤコグサ ^{32}P イメージング

^{32}P を含む水耕液 (1MBq/30mlHoagland) を水耕栽培25日間栽培のミヤコグサに与えて撮像した。3分間の積算時間で30時間撮影。

(a) ^{32}P 吸収の様子。30分で茎長まで ^{32}P が到達していた。

(b)(a)の根の一部 (黄四角) を拡大したもの。根が伸長し(*)、根端には常に ^{32}P が集積していた。

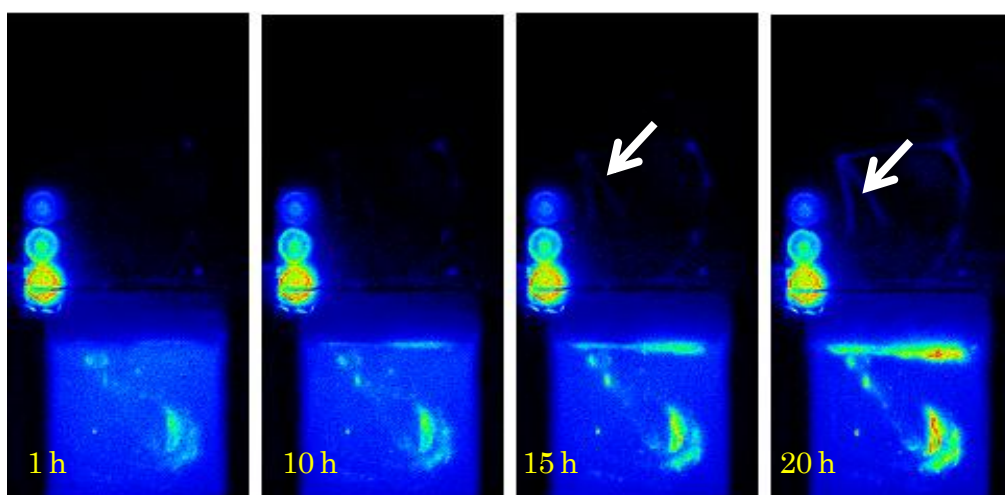


Figure 1-12 ミヤコグサ ^{32}P イメージング

^{32}P を含む水耕液（1MBq/30mlHoagland）を水耕35-45日間栽培のミヤコグサ（子実期）に与えて撮像した。子実への移行が優先的であった（白矢印）。

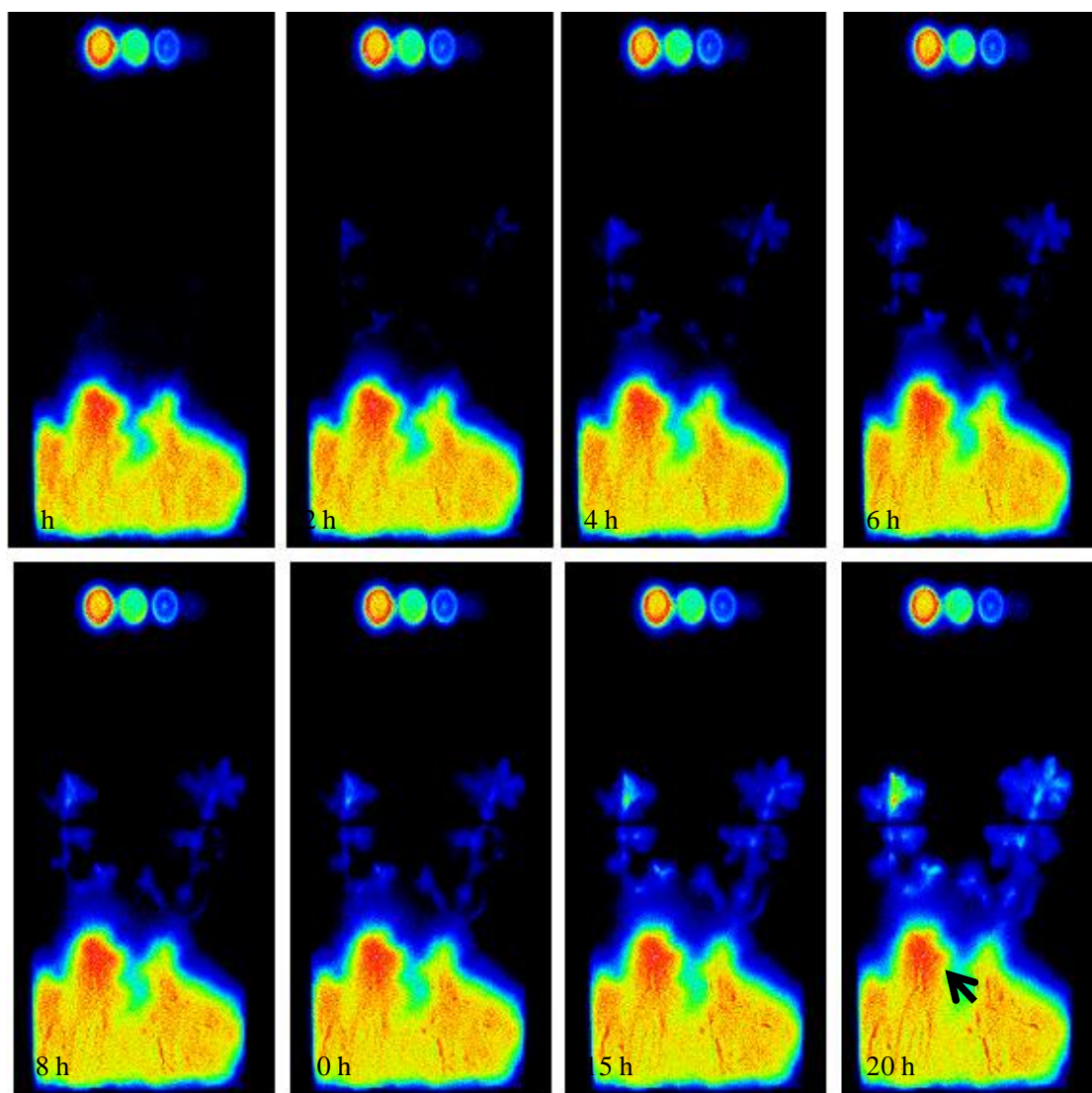


Figure 1-13 ミヤコグサ ^{32}P イメージング（土耕栽培）

^{32}P を含む水耕液（5MBq/10mlHoagland）を土耕培地へ施与し、5分の積算時間で20時間撮影した。根への集積（黒矢印）および地上部への移行の様子を初めて画像化することができた。

第2章 ミヤコグサリン酸トランスポータの単離と解析

2-1. 緒言

2-1-1 リン酸トランスポータ遺伝子単離の歴史

環境中のリン酸は、さまざまな濃度（数 μM ~ mM ）で存在しており、植物は、これらのリン酸を吸収し体内の各組織へ移行させている。リン酸は、根からの吸収および体内での移行において、細胞膜を通過する必要があるが、この膜輸送はリン酸トランスポータを介して能動的に行われている。

植物のリン酸トランスポータ遺伝子は、酵母の高親和性リン酸トランスポータ *Pho84* の配列情報をもとにしてシロイヌナズナの根の cDNA ライブラリーのスクリーニングにより *AtPT1* (Arabidopsis thaliana Phosphate Transporter1) と *AtPT2* が単離されたのが最初である (Muchhal *et al.*, 1996)。その後、同様の手法により *Lycopersicon esculentum* (トマト) の *LePT1* と *LePT2* (Daram *et al.*, 1998)、*Medicago truncatula* (アルファルファ) の *MtPT1*、*MtPT2*、*MtPT3*、*MtPT4*、*MtPT5* (Harrison *et al.*, 2002、Liu *et al.*, 2008)、*Solanum tuberosum* (ジャガイモ) の *StPT1*、*StPT2*、*StPT3* (Leggewie *et al.*, 1997)、*Catharanthus roseus* (ニチニチソウ) の *PIT1* (Kai *et al.*, 1997)、*Sesbania rostrata* (セสบニア) の *SrPT1*、*SrPT2* (Aono *et al.*, 2001)、*Hordeum vulgare* (オオムギ) の *HvPT1*、*HvPT2*、*HvPT3* (Rae *et al.*, 2003) が単離され、これらのリン酸トランスポータは、Pht1 ファミリー (phosphate/H⁺ symporter family) (高親和性リン酸トランスポータ) に属する遺伝子とされている。シロイヌナズナのリン酸トランスポータは、*AtPT1* と *AtPT2* の他に、*APT1* と *APT2* (Smith *et al.*, 1997)、*PHT1*、*PHT2*、*PHT3* (Mitsukawa *et al.*, 1997)、*AtPT4* (Lu *et al.*, 1997) が同時期に報告されたが、それぞれ、*AtPT1* と *APT2*、*PHT1*、*APT1* と *PHT2*、*AtPT4* と *PHT3*、*AtPT2* と *PHT4* が同一の遺伝子であった。現在までにシロイヌナズナの Pht1 ファミリーに属するリン酸トラン

スポート遺伝子は 9 つ報告されており (Okumura *et al.*, 1998)、遺伝子名は Pht1;1 ~Pht1;9 に整理されている。Pht1 ファミリーに属するリン酸トランスポータ遺伝子は、MFS(major facilitator superfamily)に属する膜輸送系タンパク質で、H⁺もしくは Na⁺との共輸送によりリン酸を輸送している。その構造は、12 の膜貫通領域、推定上の二次構造として中央の親水領域で分離される 6 つの N 末端膜貫通領域と 6 つの C 末端膜貫通領域からなる。また、シロイヌナズナのリン酸輸送体には、プロテインキナーゼ C とカゼインキナーゼ II によってリン酸化される部位および N 結合グリコシレーション部位が確認されている (Smith *et al.*, 1997)。シロイヌナズナでは、Pht1 ファミリー以外にも他のリン酸トランスポータファミリーの存在が確認されており、それに属する遺伝子には、葉緑体に発現が局在する Pht2 (Daram *et al.*, 1999)、Pht3 (Versaw *et al.*, 2002)、ゴルジ体特異的な Pht4 (Versaw *et al.*, 2002、Guo *et al.*, 2007) がある。

これらの遺伝子のうちいくつかは、*Pho84* (H⁺共輸送型) 欠損酵母株 (*N219*) もしくは、*Pho84* と *Pho89* (Na⁺共輸送型) の 2 遺伝子が欠損した酵母株 (*PAM2*) を用いた機能相補実験によりリン酸輸送能が確認されている。アルファアルファを例にあげると、算出された親和性 (*K_m* 値) は、*MtPT1* が 192 μ M (Liu, H. *et al.*, 1998)、*MtPT4* が 493-668 μ M (Harrison *et al.*, 2002)、*MtPT3* が 858 μ M、*MtPT5* が 13 μ M (Liu *et al.*, 2008) であった。*Pho84* の *K_m* 値が 8 μ M であることを鑑みるといずれの親和性も小さかった。その原因としては、植物の遺伝子が、酵母で発現した場合に受ける修飾が影響するためではないかと考えられている。

2-1-2 リン酸トランスポータ遺伝子の局在

上述したリン酸トランスポータの多くが根の cDNA ライブラリーから単離されており、遺伝子発現解析や機能解析も根を中心に行われてきた。*in situ* ハイブリダイゼーションの結果から、*LePT1* (トマト) が根端付近の皮層細胞と根端分裂組織、

MtPT1 (アルファルファ) が皮層細胞と根毛で発現していることが確認されている (Liu, C. *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 2008)。シロイヌナズナの *Pht1* ファミリーの遺伝子は、RT-PCR による mRNA 発現解析と GUS や GFP を用いたプロモーター解析により詳細な局在が調べられており、*Pht1;1* は根、子葉、葉、開花前の花、*Pht1;2* は成長した根の表皮細胞と若い根の皮層、*Pht1;3* は根の内子実細胞、*Pht1;4* は根と開花前の花、*Pht1;5* は葉の篩管周辺細胞、*Pht1;6* と *Pht1;7* は花粉での発現が確認されている (Mudge *et al.*, 2002, Karthikeyan *et al.*, 2002)。

さらに、リン酸トランスポータの特徴的な局在部位として菌根をあげることができる。菌根は土壌中のある種の糸状菌 (菌根菌) が、根の内部あるいは表面において植物と共生している根のことである。アブラナ科の一部の植物を除き、多くの植物は菌根菌と共生しており、菌からリン酸の供給を受ける際に根の細胞膜上に局在するリン酸トランスポータを持つ (Javot H. *et al.*, 2007)。菌根で発現するリン酸トランスポータ遺伝子には、ジャガイモの *StPT3*、*StPT4*、*StPT5*、トマトの *LePT3*、*LePT4*、*LePT5* (Nagy *et al.*, 2005)、アルファルファの *MtPT4* (Harrison *et al.*, 2002)、イネの *OSPT11*、*OSPT13* (Paszkowski *et al.*, 2002) などがあり、これらの遺伝子は、共通して菌根菌に感染すると発現量が増加していた。一方で、*StPT4*、*StPT5*、*LePT4*、*MtPT4*、*OSPT11* が菌根以外の組織では発現しないのに対して *StPT3* は葉でも発現するというような違いも見られる。

本研究で用いるミヤコグサでは、リン酸トランスポータ遺伝子は根の cDNA ライブラリーから単離された *LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3* の 3 つが報告されている (Maeda *et al.*, 2006)。菌根での遺伝子発現解析から、3 つの遺伝子のうち、菌根菌の感染によって発現量が増加するのは *LjPT3* のみであることが分かっている。また、*LjPT3* はリン酸トランスポータ遺伝子欠損酵母株 (*PAM2*) を用いた機能相補実験によってリン酸輸送能が確認されており、さらに RNAi により *LjPT3* 遺伝子の発現が抑制された毛状根では、菌根菌の感染率が減少していた。しかし、*LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3*

いずれの遺伝子も菌根以外の器官においては、発現解析は行われていなかった。さらに、Pht1 ファミリーに属する遺伝子は、シロイヌナズナで 9 個、イネで 13 個が確認されていることから、ミヤコグサにおいても、これら 3 つ以外にも複数のリン酸トランスポータ遺伝子が存在すると予想された。そして、シロイヌナズナの Pht1 ファミリー遺伝子の発現様式が、各々特徴的であり、リン酸輸送においてそれぞれが独自の役割を果たすことが示唆されていたことから、ミヤコグサにおけるリン酸輸送を解明するにあたり、できるだけ多種類のリン酸トランスポータについて解析する必要性を考えた。そこで、本実験では、Pht1 ファミリーに属する新たな遺伝子を単離し、*LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3* と合わせて局在およびリン酸輸送能を確認することにした。

2-2. 実験方法

2-2-1 遺伝子の検索

(1)シロイヌナズナとイネ、タルウマゴヤシ、トマト、ジャガイモの Pht1 ファミリー遺伝子(cDNA)配列をもとに、ミヤコグサの EST データベース (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>)を BLAST 検索し、その結果得られた配列とかずさ DNA 研究所のデータベース (Sato *et al.*, 2008, <http://www.legumebase.agr.miyazaki-u.ac.jp/index.jsp>)からダウンロードしたミヤコグサゲノムのドラフト配列 Lotus japonicus DNA, contig : DF093176~DF093536, BABK01000001~BABK01109986, Lotus japonicus genomic DNA, clone: AP009625~AP010255 に対して est2genome のプログラムを行った。本研究はかずさ DNA 研究所の佐藤修正博士、明治大学の矢野健太郎博士との共同研究により行った。

(2)ナショナルバイオリソースプロジェクト・ミヤコグサ・ダイズ中核機関 (<http://www.legumebase.agr.miyazaki-u.ac.jp/index.jsp>)から、目的の配列と同一の配列が入った BAC クローンの分譲を受け、各クローンのシーケンスを行った。シーケンス反応は BigDye Terminator v.3.1(Applied biosystems)を用いて行い、ABI PRISM 3100Genetic Analyzer で解析した。

(3)シーケンスの結果得られた配列をアライメントし、完全長ではなかった *LjPT4* に対して RACE 法により、5'領域の塩基配列を獲得した。菌根の cDNA ライブラリーから作成された BAC クローンであったため、遺伝子が確実に発現していると考えられる菌根から抽出した RNA をテンプレートとして反応を行い完全長の cDNA 配列を決定した。

(3)-1. 5'-RACE 法

GeneRacer Kit ver. L (Invitrogen)を用いた。

1. mRNA の 5'末端に phosphatase(CIP)処理、Cap 構造除去(TAP)処理を行った後、RNAOligo を付加した。その後、逆転写酵素により cDNA を合成し以下の反応系で RACE-PCR を行った。1 回目の PCR 反応に用いるプライマーを転写開始点の約 300bp 上流付近に、nestedPCR 反応に用いるプライマーを転写開始点の約 200bp 上流付近に設計した。

(3)-2. PCR 反応

試薬

- Pfx50 DNA polymerase(Invitrogen)
- Primer(Invitrogen)

1 回目の PCR

Forward primer: Gene Racer 5' primer

Reverse primer: ACGAGTGCCACACCGGTGACCAA

反応液組成

10×Pfx buffer	2 µl
dNTP(2.5 mM)	6 µl
MgSO ₄ (50 mM)	1 µl
Forward primer (10 µM)	4.5 µl
Reverse primer(10 µM)	1.5 µl
Template	2 µl
Pfx50 DNA polymerase	0.5 µl
Fill up to 50 µl	

サーマルサイクラー条件

94°C	2min		
94°C	30sec	}	×5
72°C	2min		
94°C	30sec	}	×5
70°C	2min		
94°C	30sec	}	×25
66°C	30sec		
68°C	2min		
68°C	2min		

Nested-PCR

Forward primer: Gene Racer nested 5' primer

Reverse primer: AGCCCGGAGCAAATGGCACACG

反応液組成

10×Pfx buffer	2 µl
dNTP(2.5 mM)	6 µl
Gene Racer nested 5' primer(10 µM)	1.5 µl
Reverse primer(10 µM)	1.5 µl
Template	1 µl
Pfx50 DNA polymerase	0.5 µl

Fill up to 50 µl

サーマルサイクラー条件

94°C	2min		
94°C	30sec	}	×25
65°C	30sec		
68°C	2min		
68°C	10min		

(3)-3.Nested-PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動し、ゲルからバンドを切り出して精製した後 TOPO vector にクローニングしてシーケンスを行った。

2-2-2 リン酸輸送体遺伝子欠損酵母での相補実験

(1)コンストラクトの作成

酵母形質転換ベクターpYES-DEST52(Invitrogen)にLjPT1, 2, 3, 4, 6, 7のコード配列を組み込んだ。

試薬

- ・ Pfx50(Invitrogen)
- ・ Primer(Invitrogen)
- ・ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- ・ BP clonase II
- ・ LR clonase II

(1)-1.BP 反応

LjPT1, 2, 3, 4, 6, 7 のコード配列にアダプターを付け、BP 反応によりpDONR221(Invitrogen)へ組み込んだ。

1 回目の PCR

反応液組成

10×Pfx buffer	5 µl
dNTP(2.5 mM)	2 µl
Forward primer(10 µM)	6 µl
Reverse primer(10 µM)	2.5 µl
Pfx50 DNA polymerase	2.5 µl
Template(BACclone)	1 µl
Fill up to 50 µl	

サーマルサイクラー条件

94°C	2min	
94°C	30sec	} × 25
65°C	30sec	
68°C	2min	
68°C	10min	

2 回目の PCR

反応液組成

10×Pfx buffer	2 µl
dNTP(2.5 mM)	6 µl
attB1 primer(10 µM)	1.5 µl
attB2 primer(10 µM)	1.5 µl
Pfx50 DNA polymerase	1 µl
Template	0.5 µl
<hr/>	
Fill up to 50 µl	

電気泳動で増幅を確認した後、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いて増幅産物を精製し、以下のように BP 反応を行った。

反応液組成

attB product(10 ng~150 ng)	3 µl
Donor vector (150 ng/µl)	1 µl
TE buffer(pH8.0)	4 µl
BP clonase	2 µl
<hr/>	
Fill up to 10 µl	

25℃、1hour の後、Proteinase K 1µl を混合し、37℃、10 分間の処理を行った。

大腸菌 (*Escherichia coli*. DH5α 株) ヘプラスミドを導入し、50µg/ml カナマイシンを含む LB 寒地培地で選抜した後、さらにコロニーPCR で形質転換を確認した。大腸菌からのプラスミド抽出を QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)を用いて行った。シーケンス反応により導入した遺伝子配列を確認した。

(1)-2.LR 反応

pDONR ベクターに導入した遺伝子配列を LR 反応により pYEP-DEST52 ベクターへ組み込んだ。

反応液組成

Destination vector (150 ng)	1 µl
Donor vector (150 ng/µl)	2 µl
TE buffer(pH8.0)	4 µl
LR clonase	2 µl
<hr/>	
Fill up to 10 µl	

大腸菌 (*Escherichia coli*. DH5 α 株) ヘプラスミドを導入し、50 μ g/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地で選抜した後、さらにコロニーPCR で形質転換を確認した。大腸菌からのプラスミド抽出を QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)を用いて行った。シーケンズ反応により導入した遺伝子配列を確認した。

(2)酵母の形質転換

作成したプラスミドベクターを Fast-Yeast Transformation(GBiosciences)により *Saccharomyces cerevisiae* BY1421(Δ *pho84 ura3-52 leu2-3*[*HIS4::lacZ ura3-52*]、ナショナルバイオリソースプロジェクトより分譲を受けた)に導入した。ウラシル欠損 SC 寒天培地で形質転換体を選抜した後、コロニーPCR でプラスミドの導入を確認した。ネガティブコントロールとして pYEP-DEST52 を導入した酵母を作成した。

(3)培養実験

- ・ 前培養 SC(-ura)培地

YNB*	6.7 g
CSM-URA	0.91 g
Glucose	20 g
<hr/>	
Fill up to 1 L	

*YNB w/ Amm. Sulfate w/o Dex., Amino Acid

- ・ リン酸トランスポータ誘導培地

YNB*	6.7 g
CSM-URA	0.91 g
Galactose	20 g
Rafinose	20 g
<hr/>	
Fill up to 1 L	

- ・ SC(-ura)培地

YNB*1	6.7 g
CSM-URA	0.91 g
Glucose	20 g
KH ₂ PO ₄ (1M)	適宜*2
(Agar	20 g)
<hr/>	
Fill up to 1 L	

*1 YNB w/ Amm. Sulfate w/o Dex., Amino Acid, Phosphate

*2 10, 100, 1000 μ M で設定

(3)-1. プレートスポット実験

1. シングルコロニーを 10 ml の前培養培地に植菌し、30℃で一晩振とう培養した。
2. OD600(A)を測定し、 $0.4 \text{ OD/ml} \times (5 \text{ ml}) / (a \text{ OD/ml}) = B \text{ ml}$ を見積もった。
3. ファルコンチューブに菌液を B ml 取り、1500 rpm, 4℃, 5 分間遠心した。
4. 上清を捨て、3 ml の導培地を加え懸濁した。
5. 30℃で 3～4 時間振とう培養した。
6. OD600(Absorbance)を測定し、 $0.2 \text{ OD/ml} \times (5 \text{ ml}) / (a \text{ OD/ml}) = B \text{ ml}$ を見積もった。
7. ファルコンチューブに菌液を B ml 取り、4000 rpm, 4℃, 10 分間遠心した。
8. 上清を捨て、1000 μl の蒸留水を加え懸濁した。
9. 10^{-1} ～ 10^{-4} 段階の希釈系列を作成し、3 種類のリン酸濃度の培地に 10 μl ずつスポットした。
10. 30℃で 6 日間培養し、増殖したプレートの画像をスキャナーで取り込んだ。

(3)-2. 増幅曲線

11. 1.～9.まではスポットテストと同様に行った。
12. リン酸濃度の異なる培地 200 μl に蒸留水に懸濁した菌液を OD600(Absorbance)=0.05 になるように分注した。
13. 30℃で振とう培養し蛍光プレートリーダーで 1 時間おきに OD600(A)を測定した。

2-2-3 遺伝子発現解析

(1)植物栽培方法

(1)-1.水耕栽培

ミヤコグサ (MG-20) の種子は、サンドペーパーで表面に傷をつけた後行った後、滅菌用液 (有効塩素濃度 2.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液、0.02%Tween-20) 内に入れ 10 分間振とうし、蒸留水で洗浄した。その後、蒸留水を含ませたろ紙上に播種し、7 日間培養した。ミヤコグサ実生を 1/2 濃度 Hoagland 水耕液に移しグロースチャンバー (日本医化器械) 内で温度 25℃、湿度 60%、16 h Dark/8h Light ($250 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$) で栽培した。水耕液は培養容器のサイズに応じて 3 日から 1 週間ごとに交換し、含有するリン酸濃度を一定に保った。根、茎、葉のサンプルは、水耕栽培で 15 日間栽培した植物から採取した。花と子実のサンプルは、水耕栽培で 35-40 日間栽培した植物から採取した。

(1)-2.砂耕栽培と菌根菌感染

菌根での遺伝子発現解析を行うため、砂耕栽培で植物に菌根菌を感染させた。

操作手順

1. 川砂を濁りが無くなるまで洗い、オートクレーブ(1 時間) した。
2. 底面に穴をあけた 50ml 遠沈管をオートクレーブ(20 分間)した。
3. 遠沈管に厚型ろ紙(ϕ 8 mm)を入れ、さらに滅菌川砂を薬さじで充填した。
4. 川砂をつめた遠沈管の中央に 2 cm 深ほどの穴を開け *Glomus intraradices* 孢子懸濁液 1 ml(1000 孢子/ml)をスポイトで穴に接種した。
5. ミヤコグサ実生を移植し温度 25°C、湿度 60%、16 h Dark/8h Light(250 μ E s⁻¹ m⁻²) で 1/2 濃度 Haogland 培養液を与えて栽培した。
6. 4 週間栽培後、感染率*を測定し、mRNA を抽出し、RACE および遺伝子発現解析に用いた。

*感染率測定

試薬

・ 10%KOH	10 g/100ml
・ 2%HCl	2 ml/100ml
・ 1%トリパンブルー溶液	1 g/100ml
・ 0.05%トリパンブルー乳酸溶液	1%トリパンブルー溶液 5 ml 乳酸原液 95 ml
・ ラクトグリセロール溶液	
	乳酸原液 87.5 ml グリセリン 6.3 ml 蒸留水 fill up to 100 ml

操作手順

1. 根を 1 cm 切断し試験管に入れ 10%KOH を根が浸る程度加えた。
2. 90°Cの恒温水槽で 10 分間インキュベートした。
3. KOH を捨て、蒸留水で 2-3 回置換した。
4. 2%HCl を加え、5 分間静置した。
5. HCl を捨てトリパンブルー乳酸溶液を加えた。
6. 90°Cの恒温水槽で 10 分間インキュベートした。
7. トリパンブルー乳酸溶液を捨て、ラクトグリセロール溶液を加えた。
8. 根をスライドグラス上に並べ、余分な溶液をキムワイプで吸取った後、ラクトグリセロールを 1 滴ほど滴下し、カバーグラスを重ねマニキュアで封をした。

9.顕微鏡下で根の樹枝状体、嚢状体の数を数えた。

(2)リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

(2)-1. RNA 精製方法

Lotus japonicus hand book (Springer)Chapter3.3 RNA ISOLATION USING PHASE EXTRACTION AND LiCl PRECIPITATION を一部改変した方法で抽出を行った。

試薬

CTAB(2%w/v)	2 g
Polyvinylpyrrolidone(2%w/v)	2 g
0.5 M Tris-HCl pH8.0(100 mM)	20 ml
0.5 M EDTA(25 mM)	5 ml
5 M NaCl(2 M)	40 ml
<hr/> Fill up to 100ml	

()内は終濃度を示す

使用時に β -mercaptethanol を終濃度 2%になるように添加した。

操作手順

1. サンプルを液体窒素で粉砕した。
2. 加温した乳鉢に抽出バッファー600 μ l を入れ、粉砕したサンプルを加えて攪拌した。
3. 600 μ l のフェーノールクロロホルムの入ったチューブに 2. を加えて混合した。
4. 55℃で 5 分間静置した。
5. 13000rpm, 10 分間 遠心した。
6. 上清に 1/4 量のクロロホルムを加えて攪拌した。
7. 13000rpm, 10 分間遠心した。
8. 上清に LiCl を終濃度 2M になるように加え、-80℃で一晩静置した。
9. 15000rpm, 15 分間, 4℃で遠心した。
10. 80%エタノールで沈殿をリンスし乾燥させた。
11. 沈殿を 100 μ l の蒸留水に溶解し酢酸ナトリウム(3M)を 1/10 量添加して混合後、氷上に 15 分間静置した。
12. 15000rpm, 10 分間, 4℃で遠心した。
13. 上清に 2.5 倍量の 100%エタノールを添加した。
14. 15000rpm, 15 分間, 4℃で遠心した。
15. 80%エタノールで沈殿をリンスし乾燥した。

16. RNA resque sol(Ambion)に溶解した。
17. Absorbance(260nm,280nm)を測定し、濃度を算出し、mRNA の質を確認した。
18. DNase 処理(Turbo-DNase ,Ambion)を行った。

(2)-2. cDNA 合成

Invitrogen の SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix を用いた。
詳細は付属のマニュアルに準じた。

反応液組成

2×Reaction mix	10μl
SuperScriptIII	2μl
RNA(600ng)	*-μl
DEPC Water	*-μl
Fill up to20μl	

*各々の RNA 濃度による。

(2)-3. PCR

Step One system(Applied Bio systems)を用いて内部標準(ATP syntase 遺伝子)を用いた Δ Ct 法により行った。

試薬

- ・ Fast SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)
- ・ Primer(Invitrogen)

LjPT1 _Forward primer: CATGTCCGAATACGCGAACA

LjPT1 _Reverse primer: ATAGCAAACACCGCAGCAATG

LjPT2 _Forward primer: GGGCCTAATGCCACCACAT

LjPT2 _Reverse primer: CGGAATCTAGCCGGGAAAA

LjPT3 _Forward primer: CAGGAAAAGACGGACAAGATAGC

LjPT3 _Reverse primer: GCCGAAGCTGTTCTTGTTGTT

LjPT4 _Forward primer: TCCGGGCTCTCCTTTGG

LjPT4 _Reverse primer: AGAAGCATAGCGTTCCCATCA

LjPT6 _Forward primer: CTGACCTTCTTCTTCGCCAATT

LjPT6 _Reverse primer: CCGCTGGCACGATAAATGT

LjPT7 _Forward primer: TGCCAGAAACCGCACGTTA

LjPT7 _Reverse primer: GCAGCCTTCTCCGTGTTCTT

ATP-syn._Forward primer: ACATGCTTGACCATACCAA

ATP-syn._Reverse primer: TCCCCAACTCCAGCAAATAC

各プライマーセットについて、増幅領域をクローニングしたプラスミドを用いて希

積系列を作成し増幅効率が 1 付近にあることを確認した。LjPT1 : 0.983、LjPT2 : 0.956、LjPT3 : 0.995、LjPT4 : 0.998、LjPT6 : 0.996、LjPT7 : 0.991、ATPsyn : 0.95

以上の増幅効率は $10^{(-1/\text{傾き})} - 1$ の式を用いて行った。

(3) *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析

(3)-1. サンプル固定

試薬

- ・ FAA 液 5%氷酢酸
 50%Ethanol
 3.7%Formaldehyd
- ・ EosineY 液 Eosine Yellowish(Chroma)を 20%(w/v)となるよう 100%Ethanol
 に溶解した。
- ・ HistClear(National Dignostics)
- ・ Paraplast Plus(SIGMA)

操作手順

1. 組織を切り出し、FAA 液に浸し 5 分間脱気を行った。
2. 室温で 4 時間、振とうした。
3. 100% Ethanol にサンプルを移し氷上で 2 時間振とうした。
4. Eosine Y 液にサンプルを移し氷上で一晩振とうした。
5. Eosine Y 液を交換し室温で一時間振とうした。
6. Ethanol: HistClear=3:1 溶液に移した。
7. Ethanol: HistClear=1:1 溶液に移した。
8. Ethanol: HistClear=1:3 溶液に移した。
9. HistClear に移し室温で 2 時間静置した。
10. HistClear を交換し 42℃で静置した。
11. 60℃で完全に溶解した Paraplast Plus にサンプルを移し、60℃で一晩静置した。
12. 朝と夕方に Paraplast Plus 溶液を交換し一晩静置した。
13. ディスポーザブル秤量皿に入れたパラプレストにサンプルを包埋して室温に静置した。
14. 包埋したサンプルをマイクロトームで(10 μ m)にスライスしスライドグラスにのせ、37℃のホットプレート上で一晩固定した。

(3)-2.DIG 標識 RNA probe の作成

遺伝子特異的な領域をサブクローニングしたプラスミドを鋳型として RNA polymerase による *in vitro* 転写を行い RNA probe を合成した。

(3)-2-1. プローブに用いる領域のクローニング

試薬

- ExTaq (タカラバイオ)
- Primer(Invitrogen)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)*
- pGEM-T EasyVector Systems(Promega)*
- QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)*

*操作の実際は製品付属のプロトコルに準じて行った。

LjPT1_Forward primer: GCTGCAGGGTCTAGGACAGT

LjPT1_Reverse primer: GCCAAACTTGATAAAGAACAACAA

LjPT2_Forward primer: GCCACATTCTTACAGCACCA

LjPT2_Reverse primer: CCCAACACTCGTAGTTCAACA

LjPT3_Forward primer: CGTTGGAGGAGTTGAGT

LjPT3_Reverse primer: CTCGAGTTCGAGTCTTG

反応液組成

10× ExTaq Buffer	5μl
dNTP	4μl
Forward primer(10 μ M)	2.5μl
Reverse primer(10 μ M)	2.5μl
ExTaq	0.4μl
Template cDNA	1ul
Fill up to50μl	

サーマルサイクラー条件

94℃	2min	} × 25
94℃	30sec	
54-56℃	30sec	
72℃	30sec	

電気泳動で増幅を確認した後、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いて増幅産物を精製した。pGEM-T EasyVector Systems(Promega)により増幅産物を pGEM-T EasyVector 導入した。大腸菌 (*Escherichia coli*. DH5 α 株) へプラスミドを導入し、

50μg/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地で選抜した後、さらにコロニーPCR で形質転換を確認した。大腸菌からのプラスミド抽出を QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)を用いて行った。シーケンス反応により導入した遺伝子配列を確認した。

(3)-2-2. 制限酵素処理

in vitro 転写を行うにあたりベクターを制限酵素で切断した。

試薬

- Apa I (Promega)
- Spe I (Promega)

反応液組成

Apa I (Promega) or Spe I (Promega)	1μl
10×L buffer or 10×H buffer	5μl
Plasmid (1μg)	-μl
<hr/>	
Fill up to 50μl	

37℃で 1.5 時間の反応後、エタノール沈殿を行った。Apa I 処理のものについては T4 DNA Polymerase(Primega)にて処理し平滑末端化した。

(3)-2-3.RNA polymerase による転写

試薬

- DIG RNA Labeling Kit(SP6/T7)(Roche)を用い付属のマニュアルに準じて行った。
- 10M LiCl

反応液組成

10×NTP labeling mixture	2μl
10×buffer	2μl
RNase inhibitor	1μl
RNA Polymerase(T7 or SP6)	2μl
Template	1μl
<hr/>	
Fill up to 20μl	

37℃,2 時間の反応後、LiCl 沈殿を行った。電気泳動により RNA probe の濃度を確認した。

試薬

- 49

・ RNase A 液	20 μ g/ml RNase A 0.5M NaCl 10mM Tris-HCl(pH8.0) 1mM EDTA(pH8.0)	
・ TBS	100mM Tris-HCl (pH7.5) 150mM NaCl	
・ 0.5%Blocking 溶液	Blocking Reagent(Roche)を TBS に溶解(w/v)	
・ BXT	1% BSA (w/v), 0.3% Triton-X-100 を TBS に溶解	
・ X-TBS	0.3% Triton-X-100 を TBS に溶解	
・ BufferC	100mM Tris-HCl(pH.9.5) 50mM MgCl ₂ 100mM NaCl	
・ ハイブリ液	ハイブリ mix	730 μ l
	25% 硫酸デキストラン	200 μ l
	RNA probe(100ng/100 μ l)	70 μ l
		<hr/> 1ml

操作手順

1. サンプル切片を固定したスライドグラスを 37℃に温めた。
2. Hist Clear にスライドグラスを 15 分間浸漬した。
3. Hist Clear を交換し 15 分間浸漬した。
4. 100%→30%のエタノール希釈系列に約 20 秒ずつ浸漬した。
5. 0.2N HCl に 10 分間浸漬した。
6. 1×TE(pH8.0)でリンスした。
7. Protenase K 溶液に浸漬し 37℃で静置した。
8. 4℃ PFA/PBS に 10 分間浸漬した。
9. 0.25%無水酢酸／0.1M トリエタノールアミンに 10 分間浸漬した。
10. 70%、90%、100%エタノールに 10 秒ずつ浸漬したのち風乾した。
11. Dako pen で切片を囲い風乾した。
12. プローブを含まないハイブリ溶液を切片上に置き、密閉容器に入れた後 42℃のハイブリオーブンに 2 時間静置した。

13. プローブを 85°C で 5 分間変性させた後、ハイブリ液と混合して切片上に置き一晚反応させた。
14. 2×SSC に 37°C、15 分間浸漬した。
15. 1×SSC に 15 分間浸漬し振とうした。
16. RNaseA 液に 37°C、20 分間浸漬した。
17. 0.5×SSC に 15 分間浸漬振とうした。
18. 0.5%ブロッキング試薬に浸漬して 1 時間静置した。
19. BXT に浸漬し 30 分間静置した。
20. AP 標識 DIG 抗体を BXT で 1000 倍に希釈した液に浸漬し 1 時間静置した。
21. X-TBS に浸漬して 15 分間振とうした。
22. 新しい X-TBS に浸漬して 15 分間振とうした。
23. BufferC に浸漬して 5 分間静置した。
24. BufferC で適宜希釈した NBT/BCIP 発色試薬をサンプルの上に置いた。
25. サンプルを遮光し、十分な発色が見られた時点 TE で反応を止め 100%エタノールでリンスし風乾した。
26. 顕微鏡で観察した。

(4) 花と子実への ³²P の移行解析

第 1 章第 2 節の(2)-1 ミヤコグサ栽培方法と同様に播種し、実生をリン酸濃度 500μM の 1/2Hoagland 水耕液で栽培した。

第 1 章第 2 節の(2)-2 ミヤコグサ ³²P 動態解析と同様に ³²P を処理した植物体を、20 時間後に各器官に切り分け、イメージングシステムにて撮像した。

2-3. 結果と考察

2-3-1 リン酸トランスポータ遺伝子検索

結果

ミヤコグサの EST ライブラリーおよびゲノムデータベースを利用し、Pht1 ファミリーに属するミヤコグサリン酸トランスポータ遺伝子の候補を 5 つ(*LjPT4*, *LjPT5*, *LjPT6*, *LjPT7*, *LjPT8*)に絞り込んだ(Table 2-1)。そのうち *LjPT4*, *LjPT6*, *LjPT7* を新たに単離することができた。*LjPT5* の候補の EST 配列は、アライメントの結果からリン酸トランスポータ配列ではないものと考えられた。*LjPT8* は EST 配列が得

られなかったこと、および周辺のゲノム配列がすでに他の研究機関との共同研究により非公開とされていたため解析を断念した。 *LjPT4*、*LjPT6*、*LjPT7*の遺伝子がコードすると予想されるアミノ酸配列を他のリン酸トランスポータと比較したところ、*LjPT6*と *LjPT7*は完全長の cDNA であると推定されたが、*LjPT4* に関しては 5' 領域が欠損していたため、RACE 法によって完全長 cDNA を獲得した。*LjPT4* の ORF の長さは 1584bp(アミノ酸残基 528)、*LjPT6* は 1569bp(アミノ酸残基 523)、*LjPT7*は 1566bp(アミノ酸残基 522)であった。既知の *LjPT1* は 1614bp(アミノ酸残基 538)、*LjPT2*は 1617bp(アミノ酸残基 539)、*LjPT3*は 1632bp(アミノ酸残基 544)であり(Maeda *et al.*,2006)これら 6 つのトランスポータは ORF の長さおよびアミノ酸残基数ともにほぼ同様のサイズであった(Fig. 2-1)。既知のリン酸トランスポータとあわせ 6 つの遺伝子のアミノ酸配列でアラインメントを行ったところ、*LjPT1* と *LjPT3* の類似性は 80%、*LjPT2* と *LjPT7* の類似性が 91%と高い値を示す一方、*LjPT4* は他の 5 つとの相同性が最も低かった(Fig.2-2)。また、他の植物種のリン酸トランスポータのアミノ酸配列とともに系統樹を作成したところ、*LjPT1* は Legume (マメ科のクラスター) に、*LjPT2*と *LjPT7*は Dicot type1 (双子葉植物のクラスター)、*LjPT3*は Dicot type2 (双子葉植物のクラスター) に、*LjPT4*は AM specific (菌根特異的なクラスター)、*LjPT6* はシロイヌナズナの花で発現する *Phl1;6*と同じクラスターに分類されていた(Fig.2-3)。

考察

ミヤコグサのリン酸トランスポータは、同じマメ科のアルファルファの MtPT ファミリーと近い関係にあると予想していたが、アミノ酸配列を比較したところ、マメ科のクラスターに属するのは *LjPT1* のみであることが判明した(Fig.2-3)。また、解析した 6 つのミヤコグサのリン酸トランスポータ遺伝子が一つのクラスターを形成することではなく、さまざまな既存のクラスターに分散して分類されていた。ミヤコグサが他の植物種と保存性の高い遺伝子を持つことを示していた。*LjPT3* は菌根

共生時に根において特異的に発現量が増加すると報告されているが、今回の系統分類では AM specific (菌根特異的なクラスター) に入らなかった。このことは、*LjPT3* が菌根以外の器官でも発現し、リン酸輸送に関与している可能性を示している。今回単離に成功した 3 つの遺伝子以外に、データベースの検索からは他に 2 つの候補遺伝子があった。*LjPT5* は、ミヤコグサ EST データベースにより菌根での機能が予測されたためおそらく AM specific (菌根特異的なクラスター) に、*LjPT8* は、BLAST 検索の結果からトマトの根で発現している *LePT4*、シロイヌナズナの根で発現している *Phl1;3* と相同性の高い遺伝子であり、Dicot type (双子葉植物のクラスター) に属する遺伝子ではないかと考えられた。

2-3-2 酵母での遺伝子機能相補実験

結果

6 つのリン酸トランスポータ遺伝子 (*LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3*、*LjPT4*、*LjPT6*、*LjPT7*) のリン酸輸送能を確認するため、これらの遺伝子を導入したベクターを高親和性リン酸トランスポータ欠損酵母 (N219 株) に組み換えて機能相補実験を行った。N219 株は高親和性遺伝子を 1 つ欠損しているため、リン酸濃度が低い培地においての増殖が減少する。実験に用いた培地には、他植物のリン酸トランスポータの *Km* 値 (13~858 μ M) や、N219 株のリン酸輸送をシロイヌナズナの *AtPT1,2* 遺伝子が相補した際のリン酸濃度 110 μ M を参考にし、リン酸を 10 μ M、100 μ M あるいは 1000 μ M の濃度になるよう添加した。寒天培地ならびに液体培地での増殖比較では、*LjPT2* あるいは *LjPT7* を導入した酵母は、いずれのリン酸濃度培地においても、低濃度に希釈した菌液スポットでネガティブコントロールよりも酵母が増殖した。*LjPT1*、*LjPT3* あるいは *LjPT4* を導入した酵母はネガティブコントロールとほぼ同様の増殖を示した。*LjPT6* を導入した酵母はネガティブコントロールより増殖が抑制された (Fig.2-4、 Fig.2-5)。

考察

試験した 6 遺伝子のうち、少なくとも *LjPT2* と *LjPT7* については、N219 株のリン酸輸送を相補することが確認できたことから、リン酸輸送能を持つと考えられた。さらに *LjPT2* よりも *LjPT7* の増殖が速かったことから、*LjPT7* の方がリン酸に対する親和性が高いと考えられた。また、この 2 遺伝子がそれぞれコードすると予想されるアミノ酸配列は、比較的高い類似性(89%)が見られており、cDNA を導入した酵母の増殖が、ネガティブコントロールに対して同等だったもの(*LjPT1*、*LjPT3*、*LjPT4*)、と抑制されたもの(*LjPT6*)は、予想アミノ酸配列による分類において *LjPT2* および *LjPT7* とは異なるクラスターにあった。このことから、それぞれが共通してコードする、特定のアミノ酸配列により、リン酸に対する親和性が決定されるのではないかと考えた。この点、過去の文献において、リン酸トランスポータが持つ特定のアミノ酸配列とリン酸親和性の違いが明確に示されていた例がある。アルファアルファの *MtPT1*、*MtPT2*、*MtPT3*、*MtPT5* は、アミノ酸配列を比較した場合、12 の膜貫通領域のアミノ酸配列のうち 3、7、12 番目のドメインが *MtPT5* でのみ違っていた。アミノ酸配列の等しい *MtPT1*、*MtPT2*、*MtPT3* の *K_m* 値が 587~858 μ M であるのに対し、*MtPT5* は 13 μ M とリン酸への高い親和性を示していた(Liu *et al.*, 2008)。そこで、*LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3*、*LjPT4*、*LjPT6*、*LjPT7* における同様のドメインのアミノ酸配列を比較したが、いずれのリン酸トランスポータ遺伝子も各ドメインにおいて互いに 1~3 アミノ酸残基が異なっており、アルファアルファのようなアミノ酸配列とリン酸親和性との明確な関連性は確認できなかった(Fig.2-1)。今回、*LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT4*、*LjPT6* では酵母で機能相補が確認できなかったが、アライメント等の結果から考えるとリン酸輸送体である可能性は高いと考えられたため、以後の解析にも用いることにした。

2-3-3 リン酸トランスポータ遺伝子の発現解析

結果

リン酸トランスポータ遺伝子の発現を根、葉、茎、開花前の花、開花時の花、成長期の子実、成熟期の子実においてリアルタイム PCR により解析した(Fig.2-6)。 *LjPT1* は開花前の花、開花時の花および子実で発現していた。 *LjPT2*、 *LjPT3*、 *LjPT7* は解析した全ての器官において発現が確認された。 *LjPT4* は成熟期の子実、 *LjPT6* は開花前の花でのみそれぞれ特異的に発現していた。 菌根では、 *LjPT1*、 2、 3、 4 が発現していた(Fig. 2-7)。

さらに *LjPT1*、 *LjPT2*、 *LjPT3* については、根、茎、葉、花、子実での発現部位の詳細を *in situ* ハイブリダイゼーションにより確認した。 *LjPT1* は根の表皮と維管束の周辺、茎の維管束周辺細胞、葉の葉肉細胞(Fig.2-8)、花弁、花の導管周辺細胞、将来の種子の胚乳の細胞(Fig.2-11)、子実の導管周辺、子実の組織、種子の胚乳の細胞で発現していた(Fig.2-14)。 *LjPT2* は、根および茎の維管束周辺細胞(Fig.2-9)、花弁、花の篩管周辺細胞、将来の種子の胚乳の細胞(Fig.2-12)、花粉細胞、子実の篩管周辺細胞、種子の胚乳組織で発現していた(Fig.2-15)。 *LjPT3* は、根の表皮と内皮細胞、茎の維管束周辺細胞(Fig.2-10)、花の篩管周辺細胞、将来の種子の胚乳の細胞(Fig.2-13)、子実のがく、子実の篩管周辺細胞、子実の細胞、種子の胚乳の細胞で発現していた(Fig.2-16)。

茎での発現部位は、 *LjPT1*、 *LjPT2*、 *LjPT3* とともに導管の外側の篩管周辺細胞(Fig.2-8, Fig.2-9, Fig.2-10)であったが、花や子実につながる維管束においては、 *LjPT1* が導管周辺細胞、 *LjPT2,3* が篩管周辺細胞というように発現部位の違いが明確であった。 *in situ* での発現組織は Fig.2-18 を基に確認した。

考察

LjPT3 は、根と菌根以外の組織での発現解析は行われていなかったが、今回地

上部の組織での発現を確認したところ、葉、茎、花や種子などのさまざまな器官で発現していたことが新たに分かった。*LjPT4*は、今回新たに単離した遺伝子であるが、菌根に加え子実でも発現していた。このように、菌根で発現するリン酸トランスポータ遺伝子が、生殖器官（花）においても発現していたことは、これまでのリン酸トランスポータ遺伝子研究では報告されていないものであった。

ミヤコグサのリン酸トランスポータ遺伝子の発現部位には、系統分類によって近傍のクラスターに分類された、他の植物種のリン酸トランスポータの発現部位と共通するものがいくつか見られた。*MtPT5*の近傍に位置していた *LjPT1* は、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、*MtPT5*の発現部位（根の表皮細胞や維管束周辺）(Liu *et al.*,2008)と同様の組織で発現することが分かった。また、*LjPT2* と *LjPT7* は、系統樹においてシロイヌナズナの *Ph1:4* と *Ph1:7*の近隣のクラスターに位置しており、かつ、発現部位が *Ph1:7*と *Ph1:4*とそれぞれ類似していた(Mudge *et al.* 2002)。菌根特異的な発現のクラスターに入っていた *LjPT4* は、菌根で発現していることが確認できた。開花前の花のみで発現していた *LjPT6*は、シロイヌナズナの花で発現する *Ph1:6* と同じクラスターに存在しており、*Ph1:6* は、プロモーター GFP 解析により花粉細胞で発現していることが確認されていたことから(Stephan *et al.* 2002)、*LjPT6*も同様に花粉細胞で働いていることが予想された。

花と子実における ^{32}P の移行分布

花や鞘での ^{32}P リン酸の移行、蓄積をイメージングシステムにより検出した(Fig. 3-17)。 ^{32}P は花卉や、将来鞘や種子になる部位での蓄積が高く、これは、*in situ* ハイブリダイゼーションでリン酸トランスポータ遺伝子の mRNA の局在が確認された部位と一致するものであった。

今回単離したミヤコグサの遺伝子も含め、Ph1 ファミリーに属する 6 つの遺伝子が確認できたものの、シロイヌナズナやイネで単離されている数を考慮すると全て

網羅しているとは言えない。しかし、EST ライブラリーを基にしていることから、ある程度の発現量が多く、リン酸輸送への貢献が大きいと考えられること、および今回の発現解析結果から、さまざまな器官で発現している遺伝子であることが分かったことから、植物のリン酸輸送を調べるための以後の解析において、*LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3*、*LjPT4*、*LjPT6*、*LjPT7* の 6 つの遺伝子を対象とした。

2-4. 2章のまとめ

1. ミヤコグサの Pht1 ファミリーに属する新たなトランスポータを 3 つ単離することができ *LjPT4*、*LjPT6*、*LjPT7* とした。
2. 高親和性リン酸トランスポータ遺伝子欠損酵母を用いた機能相補実験により、ミヤコグサリン酸トランスポータ *LjPT2*、*LjPT7* のリン酸輸送能を確認した。
3. *LjPT1*、2、3、7 は根、葉、茎、花、子実で、*LjPT4* は子実、*LjPT6* は開花前の花で発現していた。また、*LjPT3*、4 は菌根でも発現していた。菌根で発現する遺伝子が花や子実で発現していたという知見は今までに報告のない新しいものであった。
4. *LjPT1,2,3* は維管束周辺で発現しており、花や子実の維管束では *LjPT1* は導管周辺細胞、*LjPT2* と 3 は篩管周辺細胞と発現部位が明確に分かれていた。

Table 2-1 ミヤコグサデータベースから選んだリン酸トランスポーター候補遺伝子
ゲノムおよびEST配列でのアクセッション番号、およびESTライブラリーの器官。

gene	genome	EST	EST library	note
LjPT1	LjSGA_099256.1	BP080169	root	close to MtPT5
LjPT2	CM0295.60 (LjT30B06)	AV408419	whole	
LjPT2 like	LjSGA_133701.1	–	–	
LjPT3	–	AU251730	immature flower bud	
LjPT4	LjSGA_014433.2	–	–	close to MtPT4
LjPT5	CM1613.60 (LjB23G22)	BP067261	nodule	close to MtPT1/2/3
LjPT5 like	CM1613.60 (LjB23G22)	–	–	
LjPT6	LjSGA_023515.1	BP042583	flower bud	close to AtPht1;6
LjPT7	LjSGA_025342.1	MR089h10	root	close to AtPht1;4/7
LjPT8	LjSGA_077849.1	–	–	close to LjPT4?

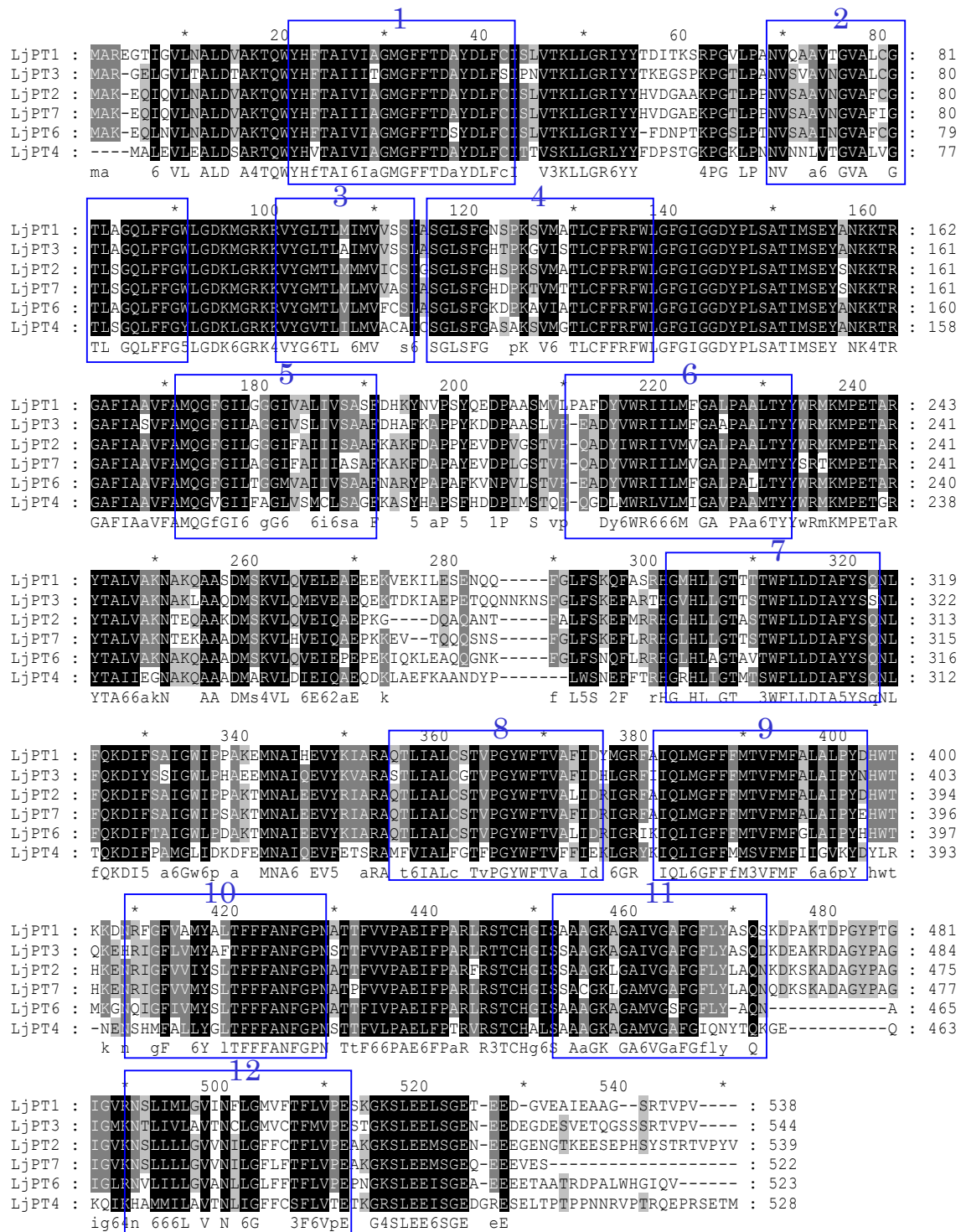


Figure 2-1 ミヤコグサリシン酸トランスポータ遺伝子の膜貫通領域の比較

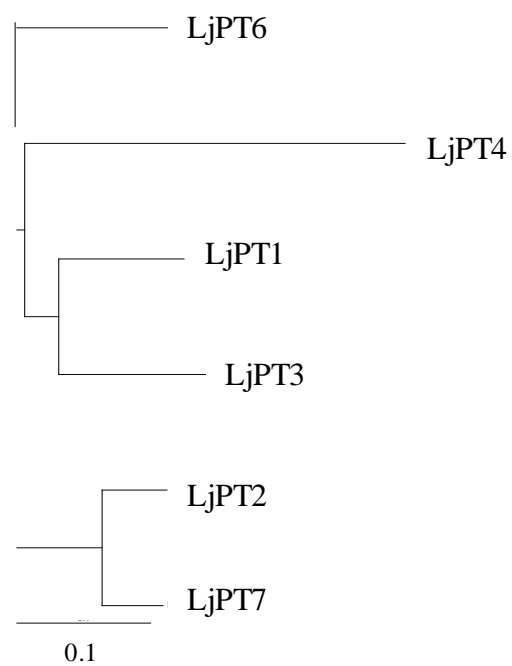


Figure 2-2 ミヤコグサリン酸トランスポータ遺伝子の相同性比較
LjPT1とLjPT3の相同性は80%、LjPT2とLjPT7の相同性は91%と高かった。

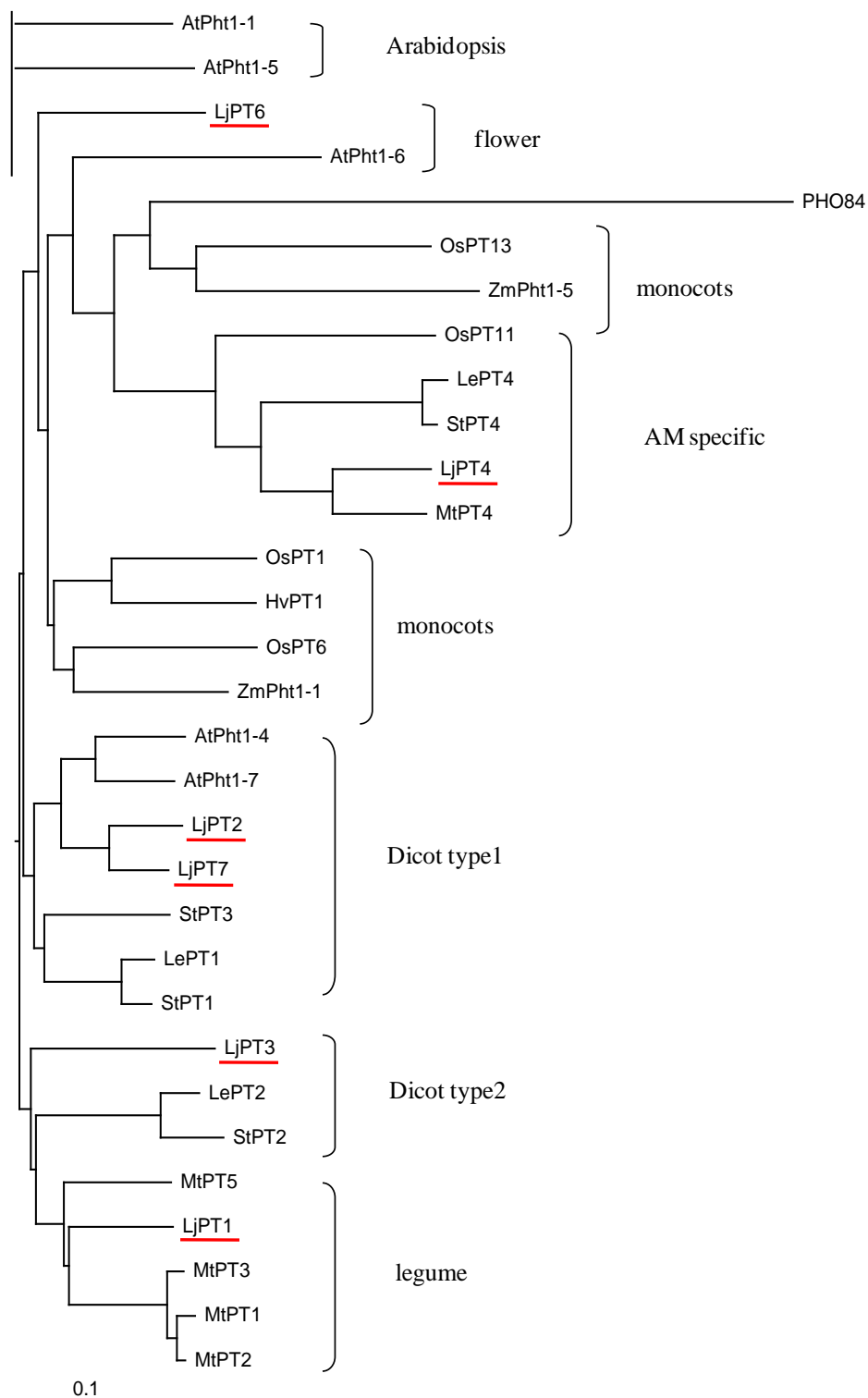


Figure 2-3 他の植物種のリン酸トランスポータ遺伝子との相同性比較
ミヤコグサのリン酸トランスポータを赤枠で示した。特徴的なクラスターをflower、monocots、AMspecific、Dicot type1、Dycot type2、legumeと分類した。

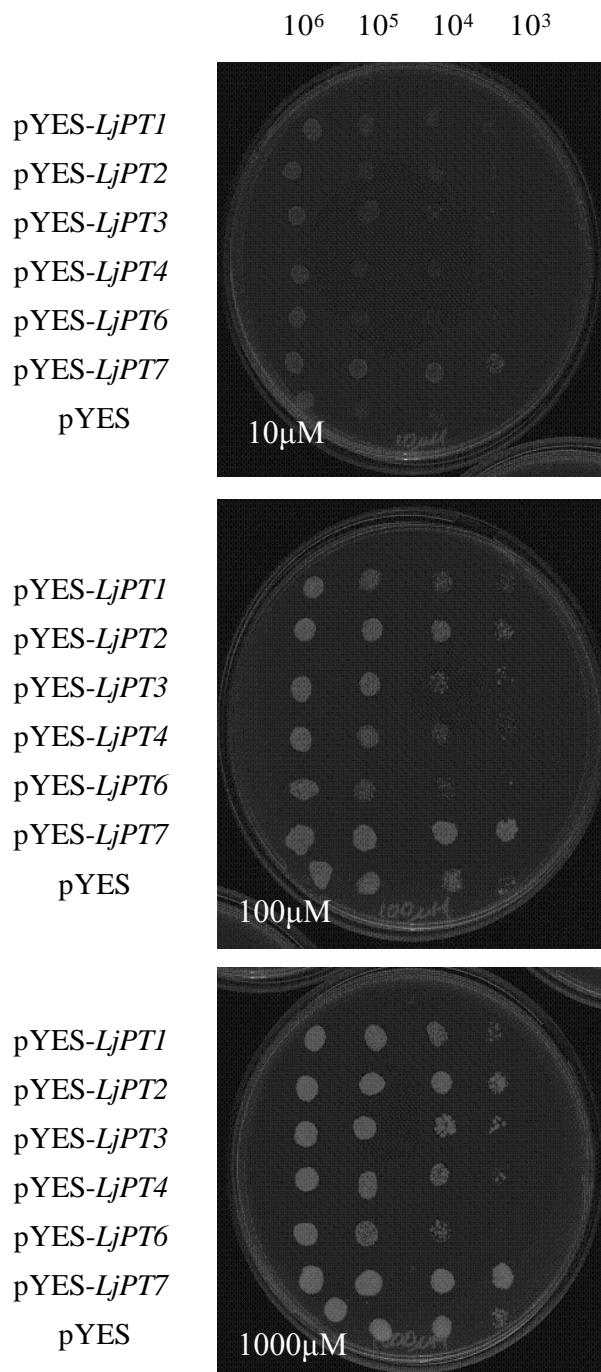


Figure 2-4 リン酸輸送体機能欠損酵母での相補実験
 $10\mu\text{M}$ (上), $100\mu\text{M}$ (中), $1000\mu\text{M}$ (下) のリン酸濃度のSD培地プレートでの生育の比較。
LjPT2、*LjPT7*を導入した酵母株の増殖がネガティブコントロールよりも高く、これらの遺伝子が機能を相補していることを確認した。

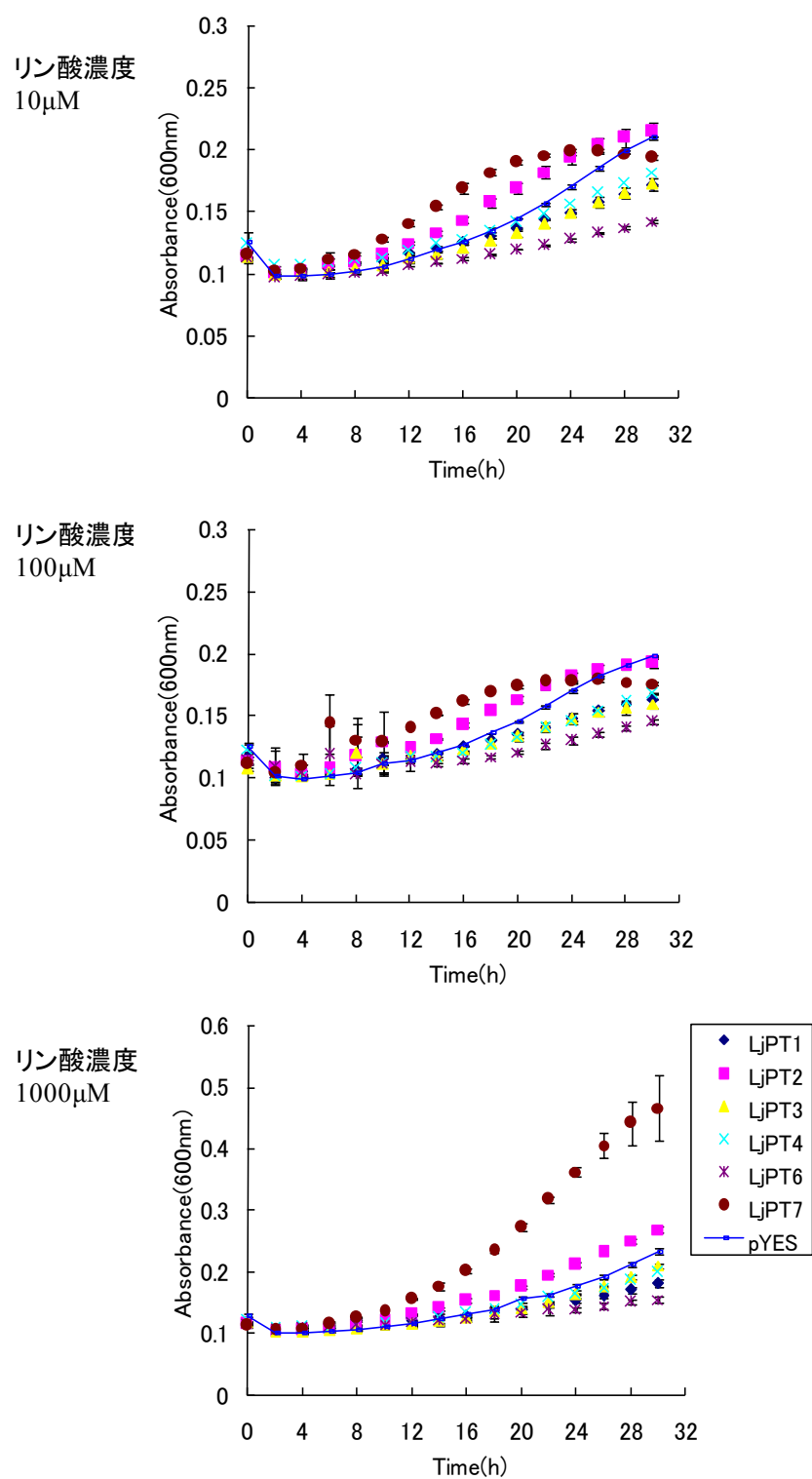


Figure 2-5 リン酸輸送体機能欠損酵母での相補実験
 10 μ M (上), 100 μ M (中), 1000 μ M (下) のリン酸濃度SD培地での増殖曲線。
LjPT2、*LjPT7*を導入した酵母株の増殖がネガティブコントロールよりも高く、
 これらの遺伝子が機能を相補していることを確認した。

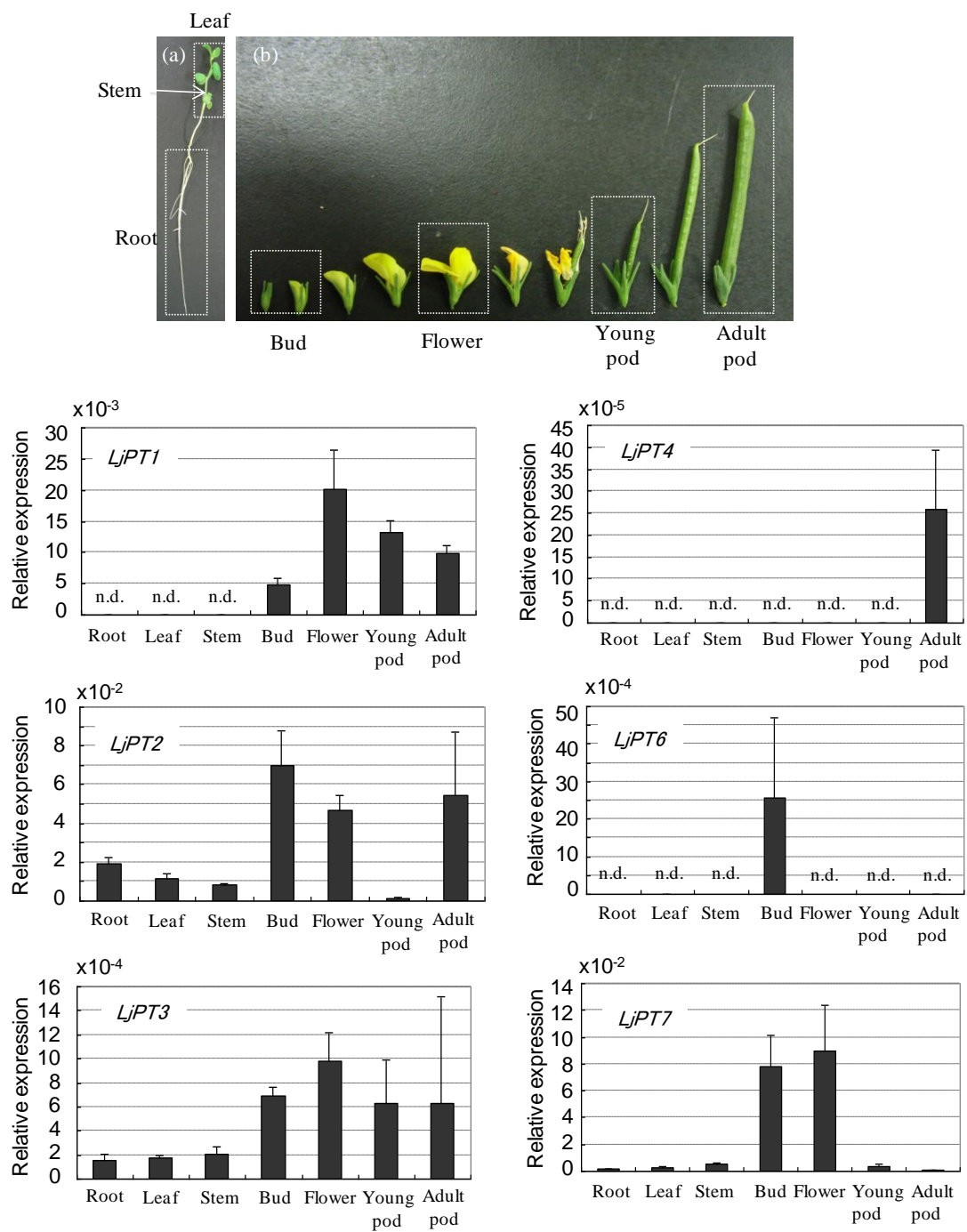


Figure 2-6 リアルタイムPCRによる*LjPT* family遺伝子の発現解析

ATP-synthaseを1としたときの相対発現量を示した。

(a)水耕2週間栽培のサンプル。枠内は根、葉、茎のサンプリング部位を示す。

(b)水耕5-7週間栽培のサンプル。枠内は開花前の花、花、さやのサンプリング部位を示す。

エラーバーは標準偏差を示す。

n.d.:検出限界以下

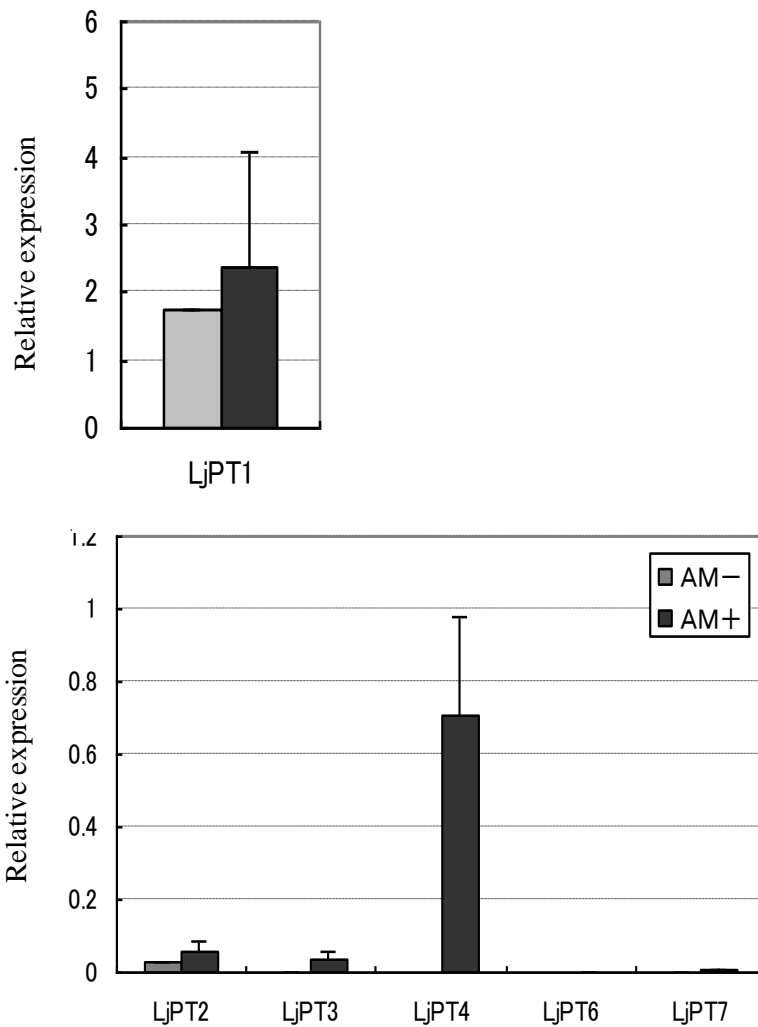


Figure 2-7 菌根でのリン酸トランスポータ発現解析
 砂耕栽培にて菌根を接種し4週間栽培したサンプルを用いた。
LjPT3、*LjPT4*は菌根で発現が誘導されていた。

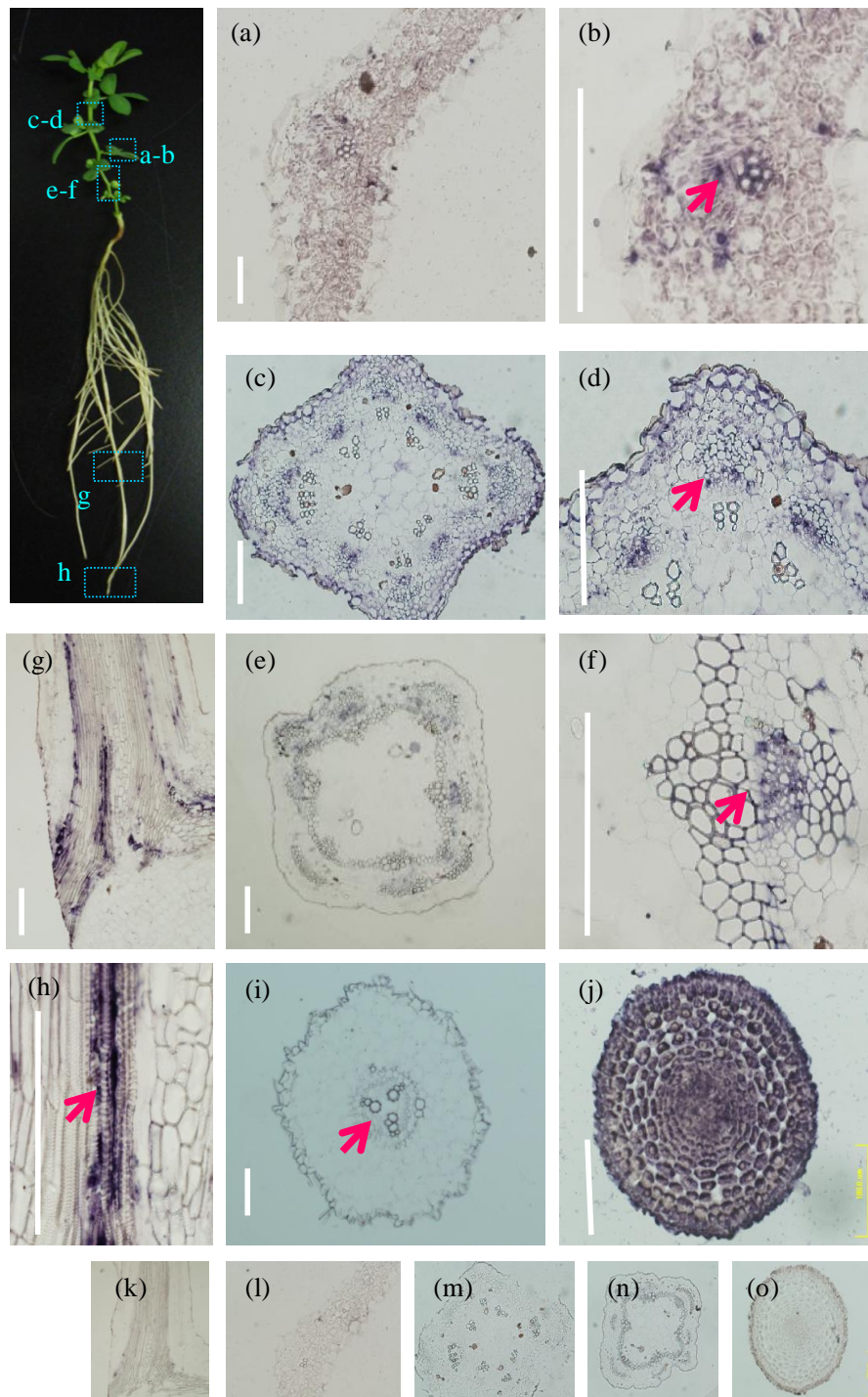


Figure 2-8 *In situ hybridization* によるLjPT1 遺伝子の局在水耕20日間栽培サンプル

- (a) (b) 葉の維管束周辺および葉肉細胞で発現。
 (c) (d) 茎の導管の外側、篩管周辺細胞での発現。
 (e) (f) 茎の導管の外側、篩管周辺細胞での発現。
 (g) (h) 茎の導管周辺細胞での発現。
 (i) 根の維管束周辺細胞での発現。
 (j) 根端組織での発現。
 (k)-(o) ネガティブコントロール スケールバー (白) 100μm

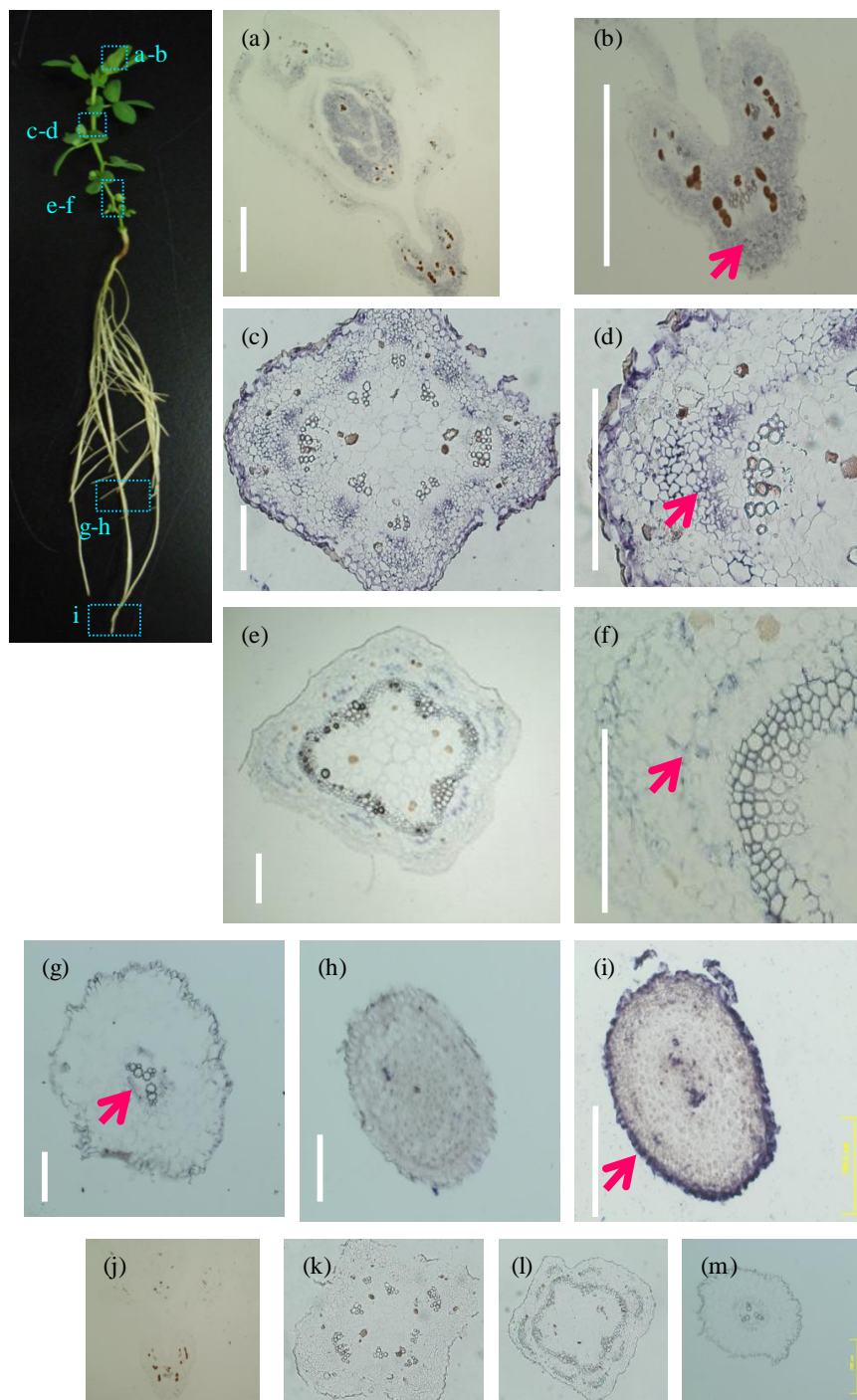


Figure 2-9 *in situ* hybridization による *LjPT2* 遺伝子の局在水耕20日間栽培サンプル

(a) (b) 葉の葉肉細胞で発現。

(c) (d) 茎の導管の外側篩管周辺細胞、cortex cellでの発現。

(e) (f) 茎の導管の外側、篩管周辺細胞での発現。

(g) 根の維管束周辺細胞での発現。

(h) (g)の側根細胞での発現。

(i) 根端組織の表皮細胞での発現。

(j) -(m) ネガティブコントロール スケールバー (白) 100μm

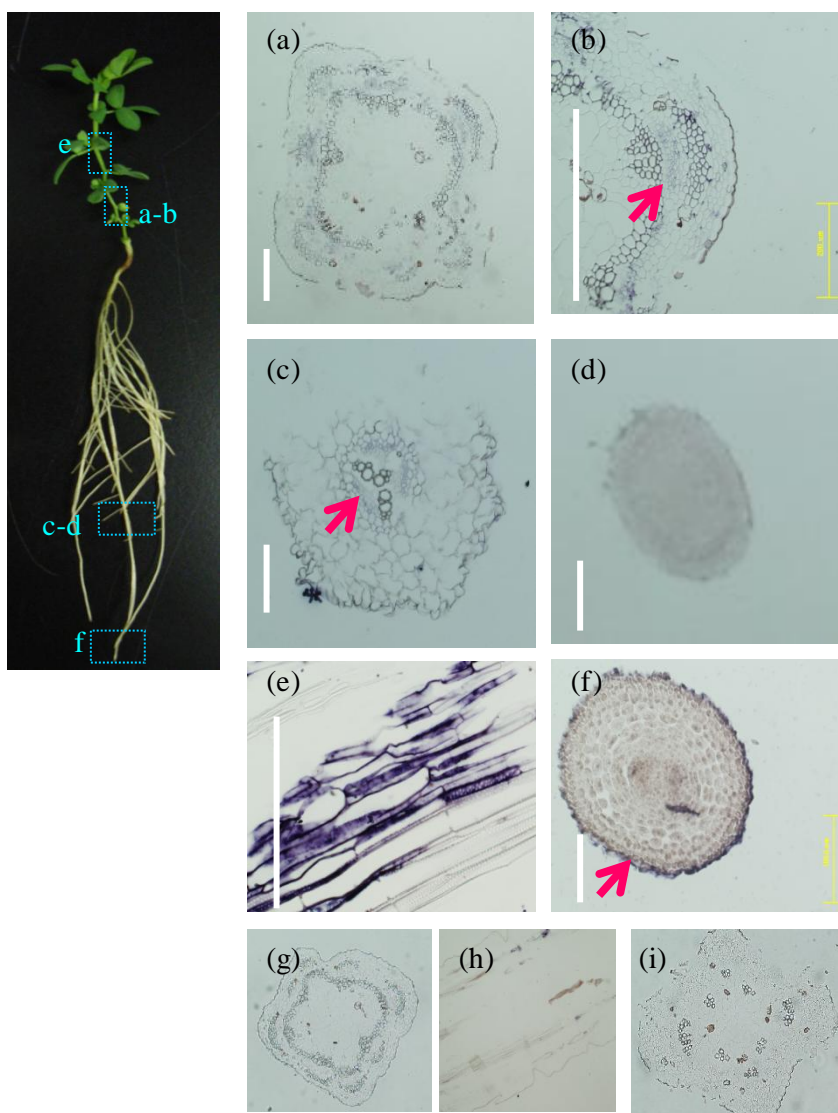


Figure 2-10 *In situ hybridization* によるLjPT3遺伝子の局在水耕20日間栽培サンプル

(a) (b) 茎の導管の外側篩管周辺細胞で発現。

(c) 根の維管束周辺細胞での発現。

(d) (c)の側根細胞での発現。

(e) 茎の維管束周辺細胞での発現。

(f) 根端細胞、根端表皮細胞での発現

(g) -(i) ネガティブコントロール スケールバー（白） 100μm

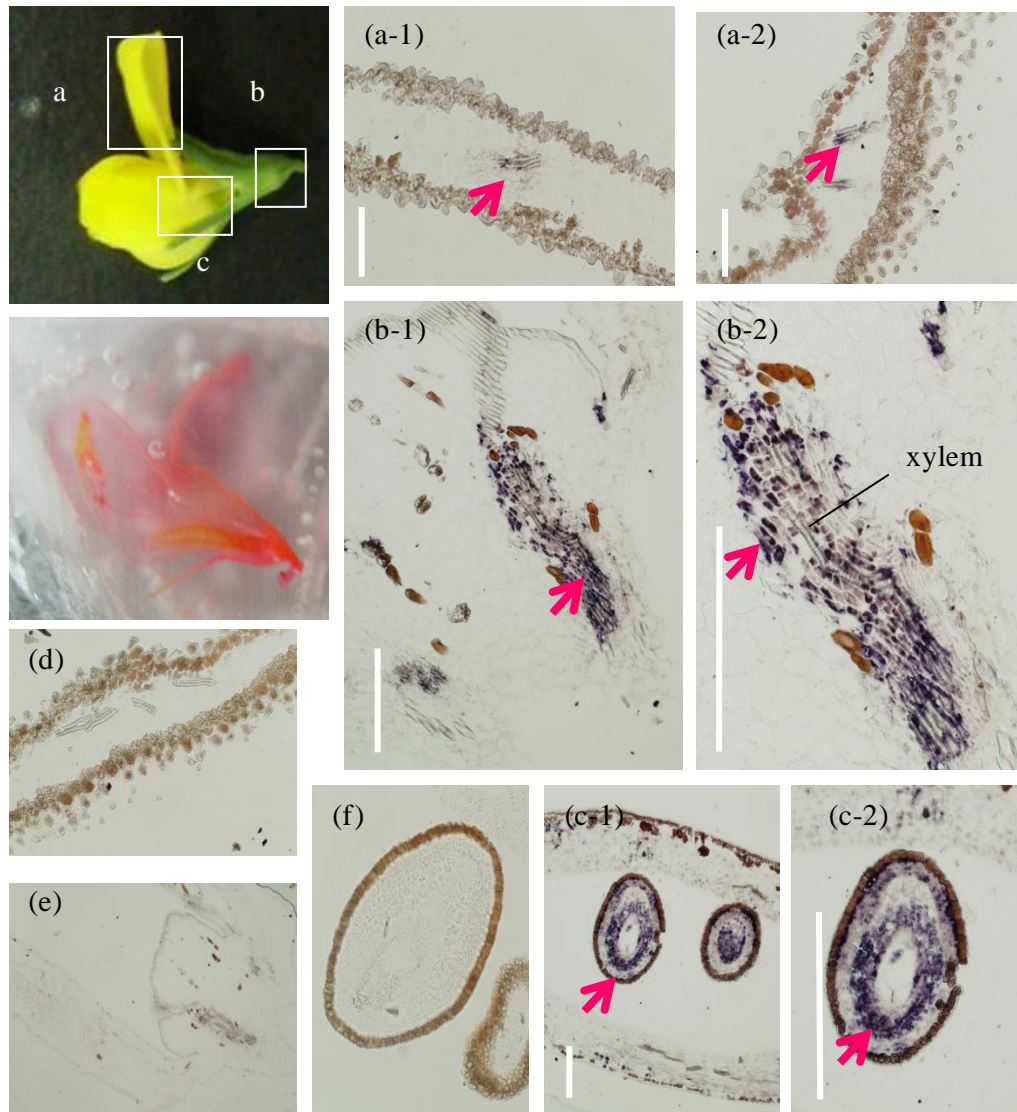


Figure 2-11 *in situ* hybridization による *LjPTI* 遺伝子の花での局在
 (a) 花弁の導管周辺細胞での発現、
 (b) 導管周辺細胞での発現、
 (c) 将来の子実器官での発現。
 (d) -(f) ネガティブコントロール スケールバー (白) 100 μ m

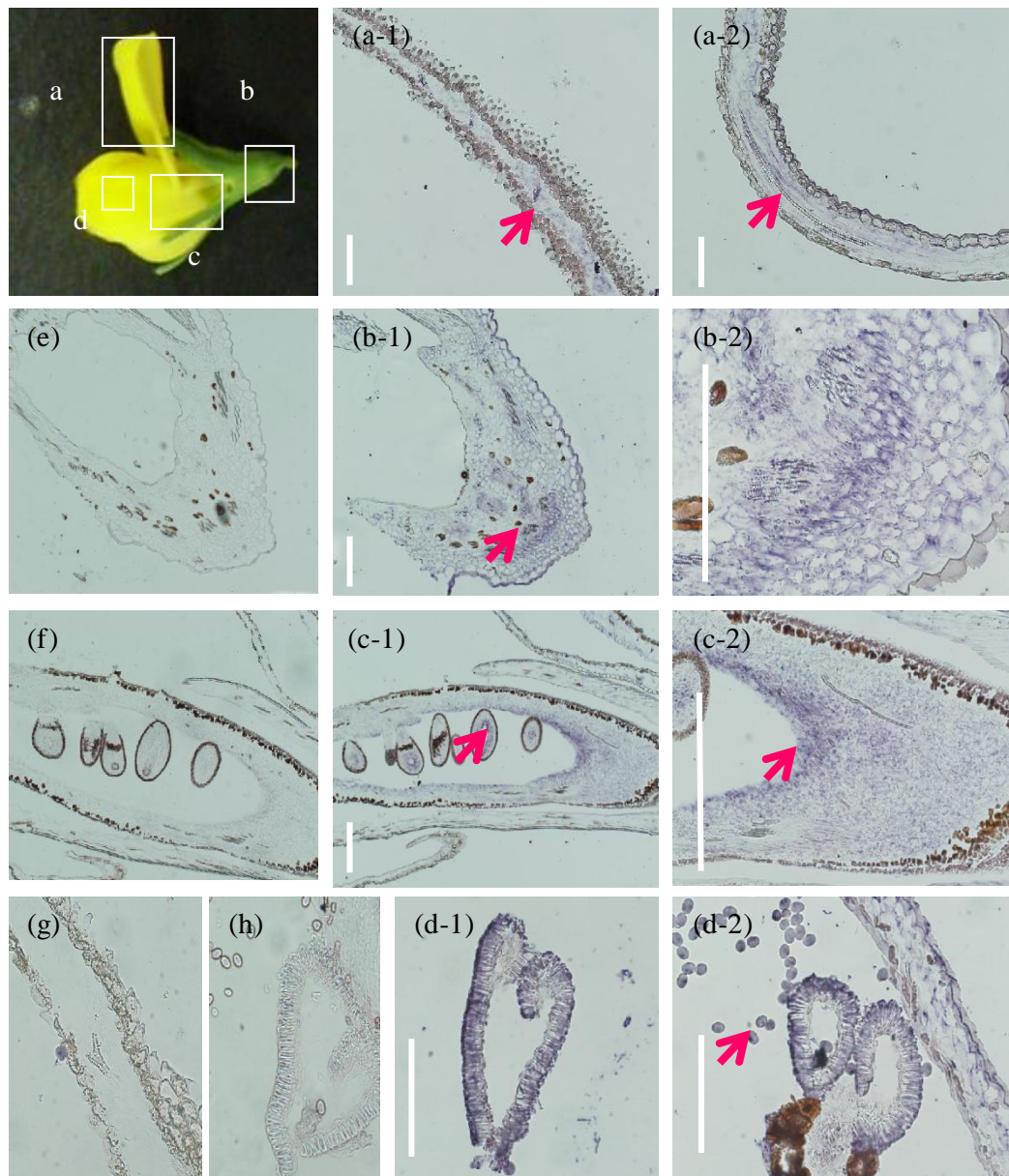


Figure 2-12 *in situ* hybridization による *LjPT2* 遺伝子の花での局在
 (a) 花弁の維管束周辺細胞での発現。
 (b) 篩管周辺細胞での発現。
 (c) 将来の子実器官での発現。
 (d) 花粉細胞での発現。
 (e)-(h) ネガティブコントロール スケールバー (白) 100μm

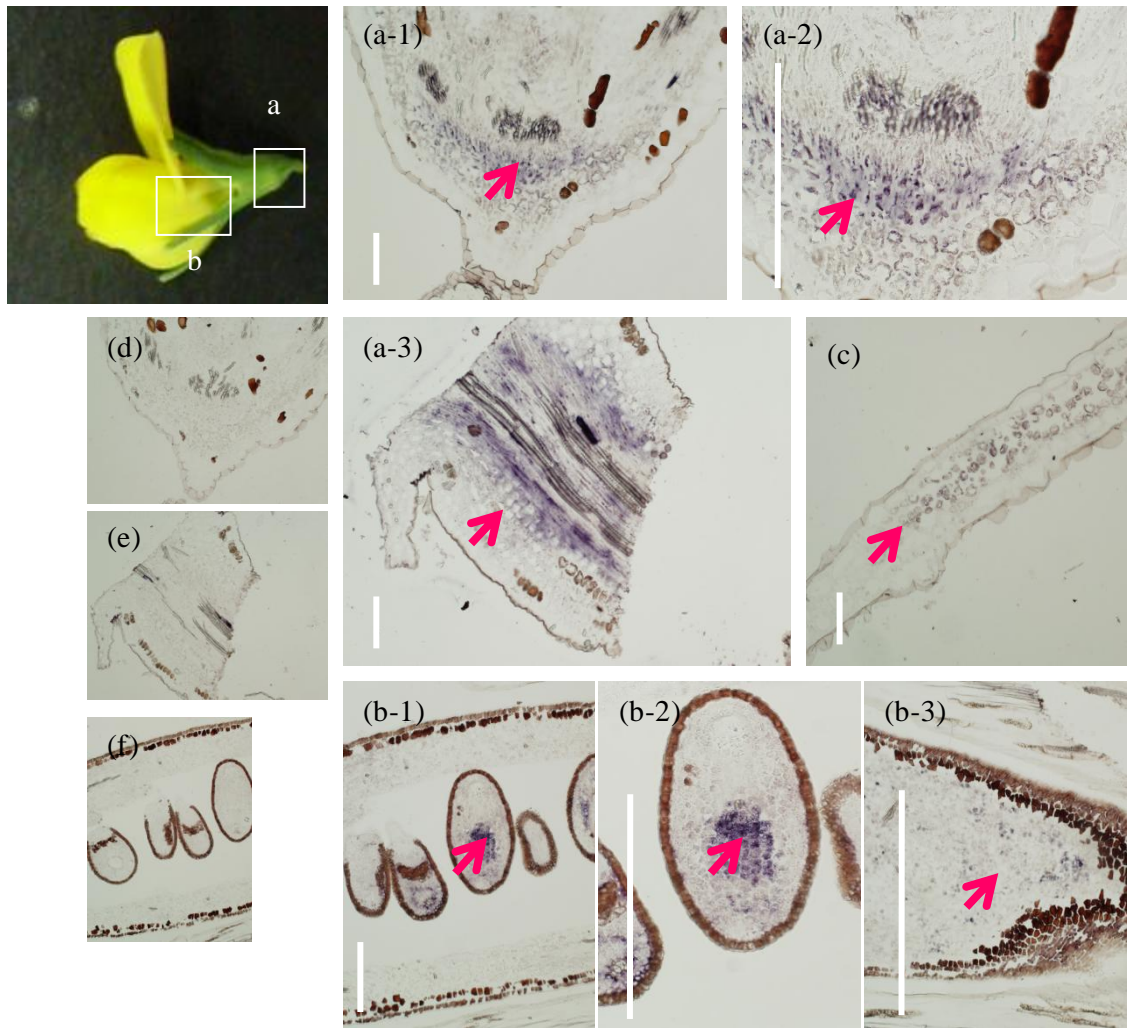


Figure 2-13 *in situ* hybridization による *LjPT3* 遺伝子の花での局在
 (a)篩管周辺細胞での発現。
 (b)将来の子実器官での発現。
 (c)がくでの発現。
 (d)-(f)ネガティブコントロール スケールバー (白) 100 μ m

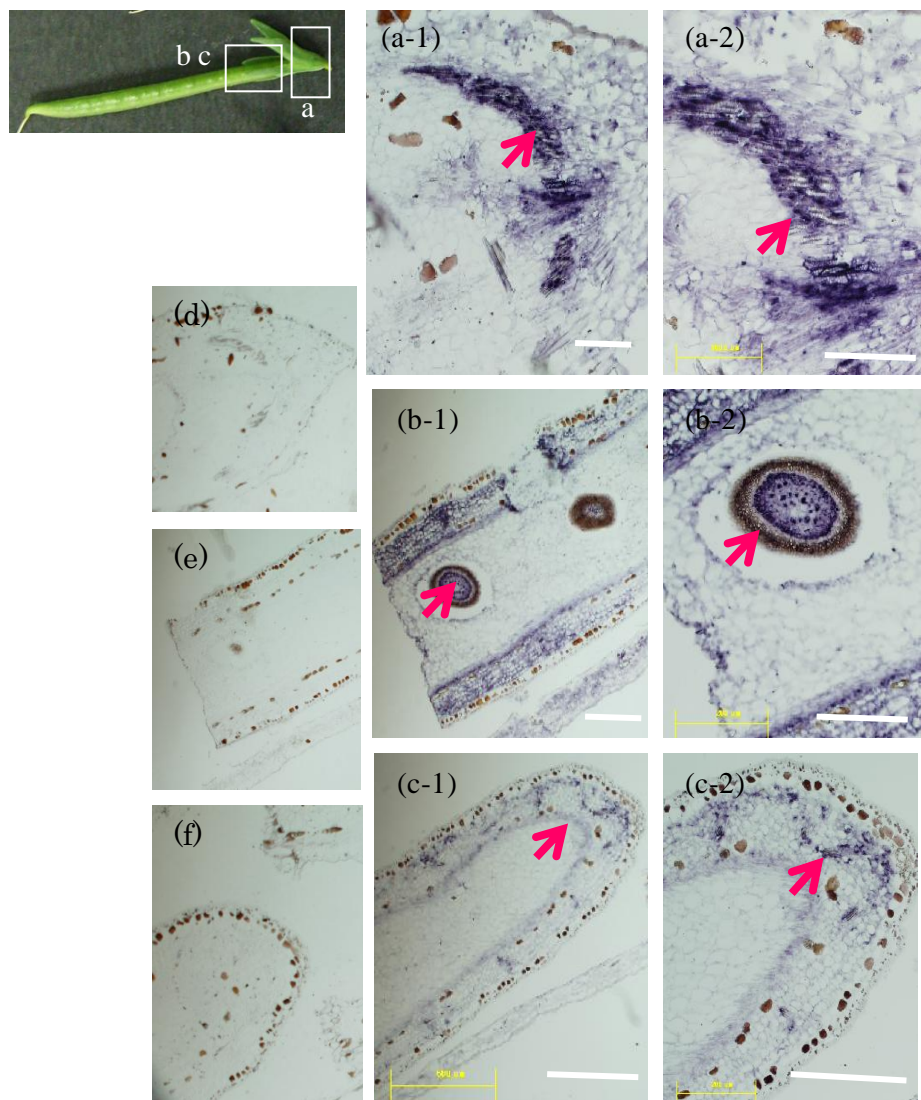


Figure 2-14 *in situ* hybridizationによる*LjPT1*の鞘での局在
 (a)維管束周辺細胞での発現。
 (b)種子での発現。
 (c)鞘の細胞での発現。
 (d)-(f)ネガティブコントロール スケールバー (白) 100μm

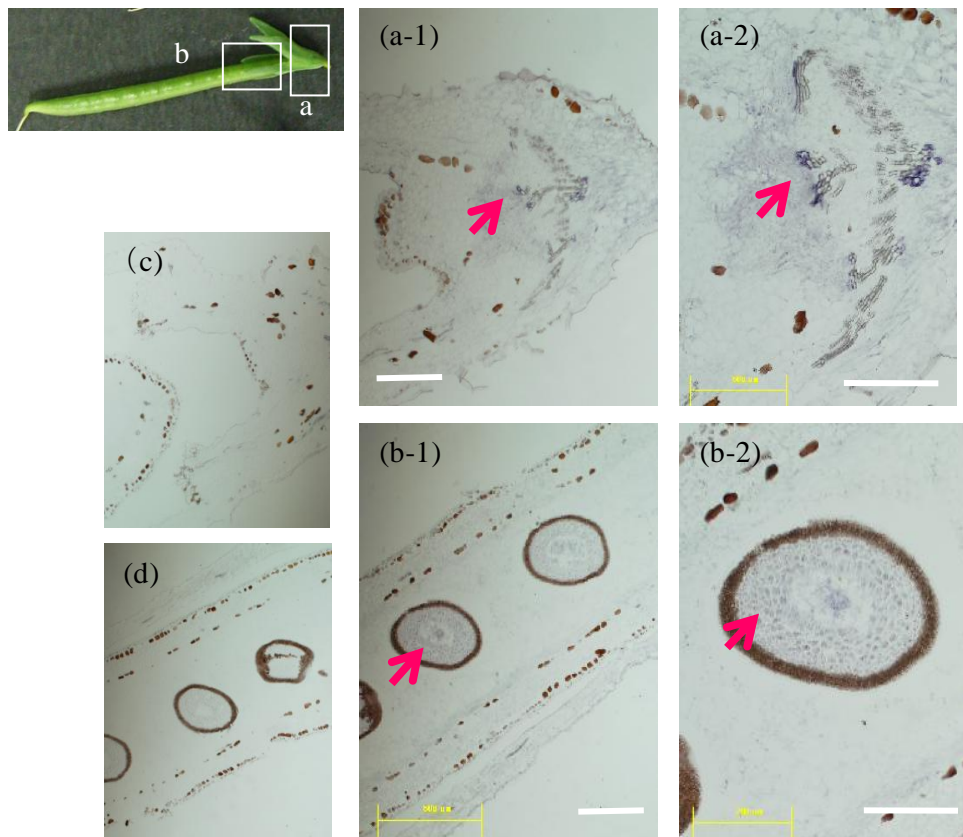


Figure 2-15 *in situ* hybridizationによる*LjPT2*の鞘での局在
 (a)維管束周辺細胞での発現。
 (b)種子での発現。
 (c)-(d) ネガティブコントロール スケールバー (白) 100μm

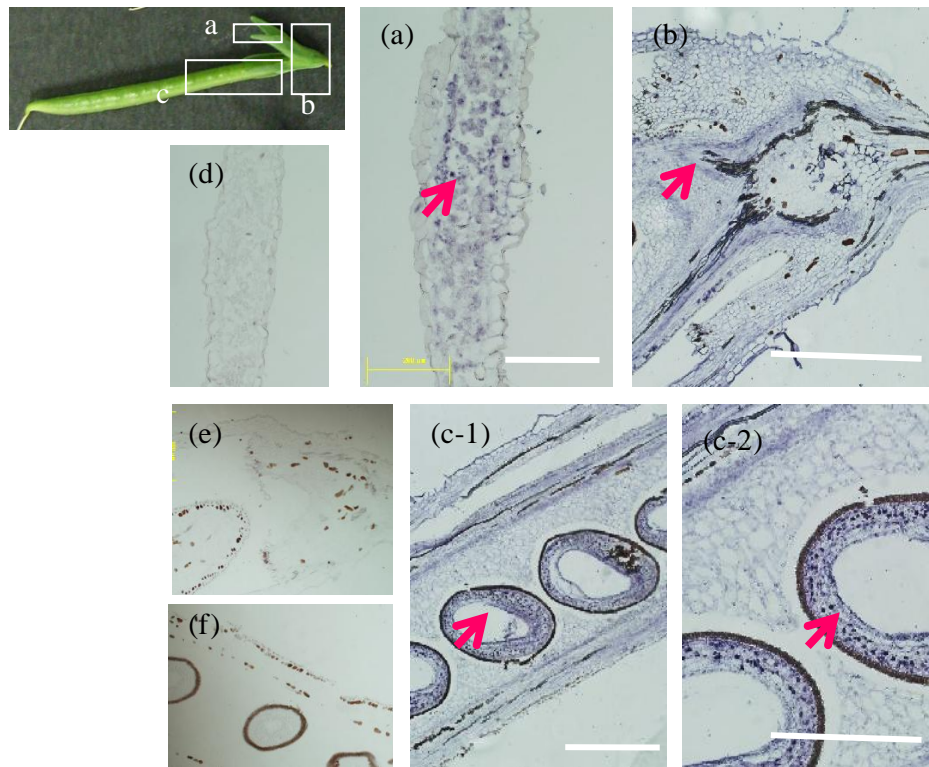


Figure 2-16 *in situ* hybridization による *LjPT3* の鞘での局在
 (a) 茎の発現。
 (b) 維管束周辺細胞での発現。
 (c) 種子での発現。
 (d)-(f) ネガティブコントロール スケールバー (白) 100μm

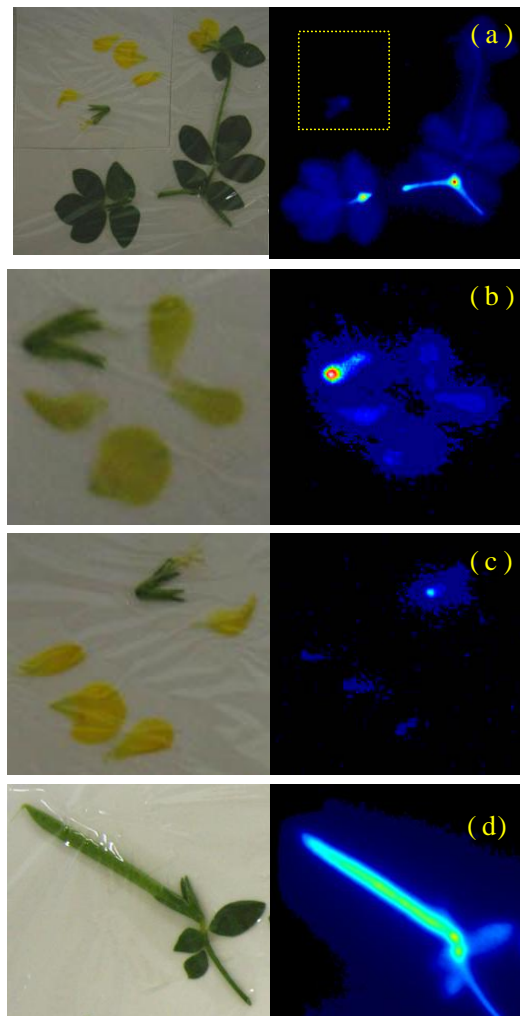


Figure 2-17 花、子実での ^{32}P 移行分布

^{32}P を $1\text{MBq}/40\text{ml_Hoagland}$ 与え20時間後の分布をアイソトープイメージングシステムにより検出した。5分間の積算時間による画像。

(a)花付近の組織と開花時の花での ^{32}P 分布、

(b)開花前の花での ^{32}P 分布、

(c)開花時の花での ^{32}P 分布(a)の黄四角内を拡大したもの、

(d)さやでの ^{32}P 分布。

in situ hybridizationで判明したmRNA蓄積場所と ^{32}P 蓄積場所が共に見られる組織が観察できた。たとえば、開花時の花の種子になる部分や花弁である。

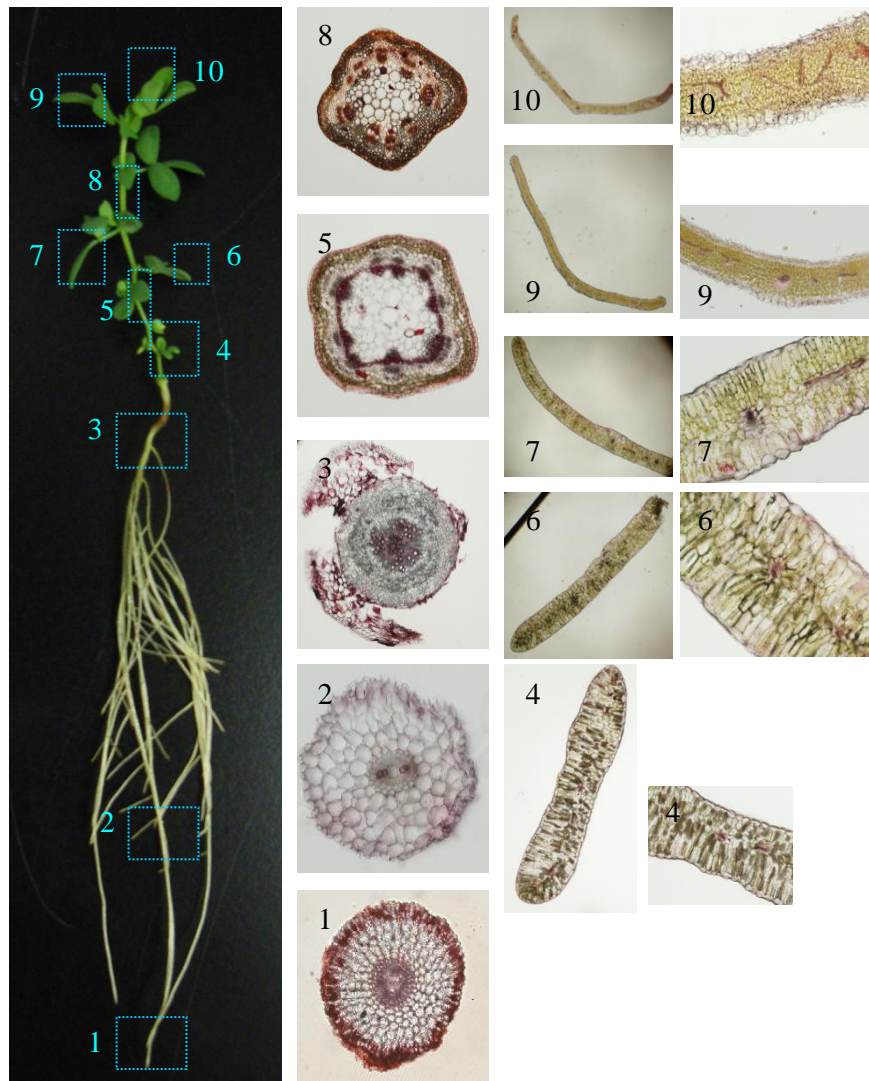


Figure 2-18 ミヤコグサの組織
 80 μ mにスライスした組織をサフラニンおよびアニリンブルーで染色した後、
 構造を観察した。
in situ hybridization のmRNAを表すシグナルが見られた維管束を確認するのに
 用いた。