

### 第3章リン酸欠乏ストレス時の $^{32}\text{P}$ 動態とリン酸トランスポータ遺伝子発現

植物はリン酸濃度の異なる培地へ移植した場合に、リン酸トランスポータの発現量を変化させることが知られている。シロイヌナズナを用いたマイクロアレイ解析によると、22810 の遺伝子解析結果のうち 621 の遺伝子が誘導され、254 の遺伝子が抑制されていた(Misson *et al.*, 2005)。リン酸欠乏環境において誘導される 621 の遺伝子には、リン酸トランスポータファミリー遺伝子も含まれており、それぞれのリン酸トランスポータは、リン酸欠乏の処理時間や、根と地上部器官ごとの発現が異なっていた。*Phl1;4* は、12 時間のリン酸欠乏処理により根での発現が誘導されていたのに対し、*Phl1;2*、*Phl1;3*、*Phl1;8*、*Phl1;9* は 2 日間のリン酸欠乏処理、および発芽時から低リン酸培地で培養した根および葉で発現の誘導が見られた。また、*Phl1;1* と *Phl1;4* の発現量は、培地のリン酸濃度と負の相関関係にあった(Muchhal *et al.*, 1996, Karthikeyan *et al.*, 2002)。さらに、トマトのリン酸トランスポータ遺伝子解析の結果、リン酸欠乏処理により、*LePT1* は根と葉の両方、*LePT2* は根でのみ発現量が増加した(Liu *et al.*, 1998)。根における発現量の増加に要した時間は、*LePT1* がリン酸欠乏処理から 24 時間、*LePT2* はリン酸欠乏処理から 12 時間以内であった。

さらに、リン酸欠乏により発現が誘導されていた遺伝子群の転写産物量が、リン酸の再施与によって、減少に転じる例も報告されている(Müller *et al.*, 2004)。これらの遺伝子群には、シロイヌナズナのリン酸トランスポータ遺伝子、*Phl1;7* が含まれており、*Phl1;7* の発現量はリン酸の再施与から 30 分後には減少し始めた。このようなリン酸の再施与実験はアルファルファのリン酸トランスポータ遺伝子(*MtPT3*、*MtPT5*)においても行われている。*MtPT5* は、リン酸の再施与から 24 時間以内に発現が全く検出されなくなるのに対し、*MtPT3* の発現量は、序々に減少するものの 54 時間後も発現し続けていた(Liu *et al.*, 2008)。

以上のように、植物は、リン酸濃度の異なる培地へ移植すると、トランスポータ遺伝子の発現量を 30 分から数日の間に変化させる。このとき、植物が検知するものが、植物体内のリン酸濃度なのか、あるいは環境中（根圏）のリン酸濃度なのか問題となった。この点を明らかにするため、トマトの根を 2 つに分け、それぞれをリン酸が潤沢な培地とリン酸を含まない培地に移植した際、両方の根のリン酸トランスポータ遺伝子(*LePT1*、*LePT2*)の発現量を解析した研究例がある。それによると、*LePT1*、*LePT2*の発現量は、いずれの根においても、リン酸が潤沢な培地の発現量とリン酸欠乏培地での発現量の間値であった(Liu *et al.*, 1998)。したがって、根のリン酸トランスポータ遺伝子の発現量は、根が接する培地のリン酸濃度にはよらないと考えられた。さらに、セสบニアを用いて、リン酸トランスポータ遺伝子の発現量と組織のリン酸濃度および培地中のリン酸濃度の関係を検証した実験により、リン酸トランスポータ遺伝子は、組織中のリン酸濃度の減少によって発現が誘導されることが確認された(Aono *et al.*, 2001)。このことから、現在では、根のリン酸トランスポータ遺伝子の発現量は培地のリン酸濃度ではなく、体内のリン酸濃度に規定されるものと考えられている。また、リン酸を再施与した場合において、上述のシロイヌナズナ *Pht1;7* 遺伝子の発現量は、根、地上部の順に減少しており、この時、根のリン酸濃度は地上部より先に上昇していた。さらに、根と地上部を切り離し、それぞれをリン酸が潤沢な培地へ浸漬した場合においても、*Pht1;7* の発現量の減少はそれぞれの組織内リン酸濃度の上昇に応じて生じていた。これらの結果は、リン酸トランスポータ遺伝子の発現量は、個々の器官内のリン酸濃度によって規定されることを示すものと考えられる(Müller *et al.*, 2004)。

一方、以上に示したような器官ごとの局所的なリン酸濃度以外にも、リン酸トランスポータ遺伝子を制御する因子が存在する可能性も指摘されてきた。シロイヌナズナの *Pht1;8* と *Pht1;9* は、地上部からのシグナルにより根での発現が制御されていたことが *pho2* 変異体を用いた実験から示されている(Doerner *et al.*, 2008)。これ

は、地上部のリン酸が欠乏すると篩管を經由して根に移行する microRNA が、*Pht1;8* と *Pht1;9* の転写を抑制している PHO2(E2 ubiquitin conjugase, UBC24) に作用することにより、*Pht1;8* と *Pht1;9* が発現するという機構である。このように、根の局所的なリン酸濃度ではなく、離れた器官の局所的なリン酸濃度に応答するトランスポート遺伝子もある。

これらの研究は、リン酸輸送制御機構においては、体内リン酸濃度が非常に重要な因子となっていることを示している。したがって、リン酸輸送制御機構の解明のためには、各器官でのトランスポート遺伝子の発現解析と同時に、同じ器官におけるリン酸濃度を定量することが必要である。さらに、トランスポート遺伝子の発現量に変化した植物体におけるリン酸の吸収輸送を解析すれば、リン酸輸送制御機構に果たすトランスポートの役割を検討することができると考えられた。そこで本研究では、第 1 節において、リン酸トランスポート遺伝子の発現量とリン酸濃度を解析し、特徴の見られた植物体が実際にリン酸を吸収輸送する様子を、アイソトープイメージングシステムを用いて調べた。さらに、イメージングシステムによる撮像の結果から、ミヤコグサにおけるリン酸の輸送制御機構には節(Node)が関与することが予想されたので、第 2 節では Node におけるリン酸トランスポート遺伝子の発現について解析し、リン酸輸送制御機構の全体像の解明を目指した。

## 第 1 節

### 3-1-1 緒言

植物体内でのリン酸輸送制御機構にはリン酸トランスポート遺伝子が関与し、その遺伝子の発現には、体内リン酸濃度が重要な制御因子となっている。そのため、リン酸トランスポートやリン酸濃度の解析が積極的におこなわれてきたが、それらのほとんどが、植物の個体全体もしくは、地上部と地下部にのみ切り分けて調べられ

たものである。しかし、リン酸トランスポータ遺伝子の発現量、リン酸濃度はともに器官によって異なる。例えば、本研究で単離したミヤコグサの *LjPT7* 遺伝子の茎における発現量は、葉での発現量の約 2 倍であった(Fig. 2-6)。また、*LjPT3* 遺伝子の発現量は葉と茎では同等であるが、つぼみでの発現量はそれらの約 3.5 倍であった(Fig. 2-6)。地上部におけるリン酸濃度も、葉では葉柄の約 1.5 倍であることがイチゴを用いた分析によって報告されている(Keutgen and Pawelzik, 2009)。ヒマにおいては、葉位によってリン酸含量に最大で 30 倍程度の差異が認められている(Jeschke *et al.* 1997)。このような、器官ごとに異なるリン酸トランスポータ遺伝子の発現量やリン酸濃度は、器官ごとの、さらには生育段階に応じたリン酸輸送の制御に重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。そこで本実験では、根と各葉のリン酸濃度と、そこで発現しているリン酸トランスポータ遺伝子の種類および発現量の変化、および、それらに対するリン酸欠乏ストレスの影響を経時的に調べた。そして、トランスポータ遺伝子の発現量が変化した植物体における  $^{32}\text{P}$  (リン酸) の吸収移行を、第 1 章で開発したイメージングシステムにより解析し、リン酸の吸収、移行と分配がどのように変化するかを調べた。これにより、ミヤコグサの葉へのリン酸輸送制御機構に果たす *LjPT* ファミリー遺伝子の役割を検討した。また、遺伝子の発現量やリン酸濃度が特徴的に変化した器官については、その器官への  $^{32}\text{P}$  の移行速度を算出し、*LjPT* ファミリー遺伝子の発現量の影響も考察した。なお、本実験でリン酸欠乏ストレス処理を施すにあたり、培地のリン酸濃度によりミヤコグサの生育にどのような違いが生じるのかを最初に確認した。

### 3-1-2 実験方法

#### 3-1-2-(1)植物栽培方法

##### 培地中のリン酸濃度の予備実験

第 1 章 2 節のミヤコグサ栽培方法と同様に播種し、リン酸濃度を 0、10、25、50、100、500 $\mu$ M に調整した 1/2Hoagland 水耕液に実生を移植した。7 日ごとに水耕液を交換し 40 日間栽培し、重量および葉、花芽の数を比較した。

##### リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

第 1 章 2 節のミヤコグサ栽培方法と同様に播種し、リン酸ストレスはサンプルを無リン酸培地に移植することで行った。根、葉、茎を採取したサンプルは、実生をリン酸濃度 500 $\mu$ M の 1/2Hoagland 水耕液で 5 日栽培した後、10 日間無リン酸培地で栽培したものを用いた。花と子実を採取したサンプルは実生をリン酸濃度 500 $\mu$ M の 1/2Hoagland 水耕液で 10 日栽培した後、17-20 日間無リン酸培地で栽培したものを用いた。

##### ストレス時の経時変化解析

第 1 章 2 節の植物栽培方法と同様に播種し、実生をリン酸濃度 500 $\mu$ M の 1/2Hoagland 水耕液で 20 日栽培したものをコントロール区とし、リン酸濃度 500 $\mu$ M の 1/2Hoagland 水耕液で 10 日栽培した後、10 日間無リン酸培地で栽培したものをストレス処理区とした。ストレス処理から、0、4、7、10 日のサンプルを採取し無機リン酸の濃度、遺伝子発現解析用の mRNA 抽出を行った。

### 3-1-2-(2)植物体内無機態リン酸量の測定

モリブデンブルー法(Ames 1966)を改変したものを用いた。コントロール区およびストレス処理区の 0、4、7、10 日の植物体 3 個体から採取した根、葉を 1 サンプルとし、n=3 で無機態リン酸の抽出を行った。

#### 試薬

・ 2.5M 硫酸	14ml/100ml
・ モリブデン酸アンモニウム	4g/100ml
・ アスコルビン酸 L-アスコルビン酸	1.76g/100ml
・ 酒石酸アンチモニルカリウム	0.27g/100ml

#### 混合発色液

2.5M 硫酸	100ml
モリブデン酸アンモニウム	30ml
アスコルビン酸	60ml
酒石酸アンチモニルカリウム	10ml
<hr/>	
	200ml

1. 液体窒素で植物を粉砕した。
2. 0.1 g/ml となるように冷却 DW を加えた (on ICE)。
3. 混合液の一部、約 500 $\mu$ l を 1.5ml チューブに移した (on ICE)。
4. 14000rpm、10min、4°Cで遠心した。
5. 上清を Microcon (Milipore) フィルターにのせた。
6. 14000rpm、20min、4°Cで遠心した。
7. 混合発色液と反応させた (室温 20 分間)。
8. 710nm での Absorbance を測定し、リン酸量を算出した。

### 3-1-2-(3)リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

2 章の方法に準じた。コントロール区およびストレス処理区の 0、4、7、10 日の植物体 3 個体から採取した根、葉を 1 サンプルとし、 $n=3$  で mRNA の抽出を行った。

### 3-1-2-(4) $^{32}\text{P}$ 動態解析

#### リン酸濃度の異なる培地での $^{32}\text{P}$ 吸収と地下部と地上部の分配

1、25、100 $\mu\text{M}$ にリン酸濃度を調整した 1/2Hoagland 水耕液 20ml に  $^{32}\text{P}$  を 2kBq/ml 添加したものを上記したコントロール区とストレス処理区の根に与えた。20 時間後、水耕液からサンプルを取り出し根を蒸留水で洗い流した後、Imaging Plate により検出した。

#### アイソトープイメージングシステムを用いた $^{32}\text{P}$ 動態解析

第 1 章で開発したラジオアイソトープイメージングシステムにコントロール区とストレス処理区のサンプル（3-1-2(1)の栽培方法に準じた）を設置し、リン酸濃度 500 $\mu\text{M}$  の 1/2Hoagland 水耕液 40ml に  $^{32}\text{P}$  を 1MBq 添加したものを根に与えた。1 枚の画像を 3 分間の積算で取得し、20 時間撮影した。

#### アイソトープイメージングシステムを用いた $^{32}\text{P}$ 動態解析（花芽期）

第 1 章で開発したラジオアイソトープイメージングシステムにコントロール区とストレス処理区のサンプル（3-1-2(1)の栽培方法に準じ、リン酸濃度 500 $\mu\text{M}$  の 1/2Hoagland 水耕液で 30 日栽培したものをコントロール区とし、リン酸濃度 500 $\mu\text{M}$  の 1/2Hoagland 水耕液で 10 日栽培した後、20 日間無リン酸培地で栽培したものをストレス処理区とした。）を設置し、リン酸濃度 500 $\mu\text{M}$  の 1/2Hoagland 水耕液 40ml に  $^{32}\text{P}$  を 1MBq 添加したものを根に与えた。1 枚の画像を 3 分間の積算で取得し、20 時間撮影した。

### 3-1-3 結果と考察

#### 培地中のリン酸濃度の予備実験

リン酸を 0 $\mu$ M - 50 $\mu$ M で含有した培地栽培したミヤコグサは、地上部よりも地下部の生重量が大きく、培地中のリン酸濃度の上昇に伴い地上部の生重量が増加した(Fig.3-1)。10 $\mu$ M 以上の培地で栽培したミヤコグサは、花芽を形成し、リン酸濃度の上昇とともに葉数と花芽の数が増えた(Fig.3-1)。いずれの試験区でも主軸の葉が 9-10 枚展開したのちに生殖生長に移る過程は同様であったため、花芽の数の増加は分けつ数の増加によるものと考えられた(Fig.3-1)。

一般的に、植物はリン酸欠乏の際に、地下部/地上部比の増加、分けつの減少、子実数の減少といった欠乏症が顕在化するといわれている。本実験では、0 $\mu$ M - 50 $\mu$ M リン酸濃度培地のミヤコグサにおいてこれらの表現形が見られた。また、水耕栽培サンプルの根には根毛はほとんど発達せず、特にリン酸欠乏下における根では、主根と側根が著しく伸長し、側根数はあまり変化しないという形態的特徴が見られた。

以上の結果に基づき、本実験では、リン酸欠乏症状を示さない 100 $\mu$ M 以上のリン酸濃度をコントロールとして設定することにし、水耕液の濃度をより一定に保ちやすいことからリン酸を 500 $\mu$ M 含む培地で栽培したサンプルをコントロール区として以後の実験を行った。また、リン酸欠乏ストレスの処理（ストレス区）は、過去の文献に基づき(Mimura *et al.*,1996)、培地のリン酸のみを除くことで行うこととした。

#### リン酸欠乏ストレス処理における *LjPT* ファミリー遺伝子の発現解析

*LjPT1* は、第 2 章でリン酸が潤沢な培地で栽培したミヤコグサ（通常条件下）においては発現していなかった根、葉、茎でリン酸欠乏ストレス処理により発現が見られた(Fig.3-2)。花、子実（図中の pod）での発現量にはリン酸欠乏処理による変化が見られなかった(Fig.3-3)。リン酸欠乏ストレス処理による *LjPT1* の発現量の増加



は他の遺伝子よりも多く、*LjPT1* がリン酸欠乏時のミヤコグサにおけるリン酸輸送に重要な役割を果たしていることが予想された(Fig.3-2, Fig.3-3)。*LjPT2*の発現量は、葉と茎で約 3 倍に増加していたが、根でも 2 倍ほどに増加した(Fig.3-3)。花での発現量はリン酸欠乏ストレス処理により、通常条件下の約半分程度に減少し子実での発現量は通常条件下とほぼ同等であった(Fig.3-3)。*LjPT3* の発現量は、リン酸欠乏ストレス処理により、根で約 8 倍、葉で約 5 倍、茎で約 4 倍に増加していたが、花と子実の発現量は通常条件下とほぼ同等であった(Fig.3-3)。*LjPT4* は、通常条件下では発現が見られなかった根と葉でストレス区においてわずかに発現していたが、発現量の増加が極めて少なかったので以後の解析の対象からは除外した(Fig.3-2)。*LjPT6* は、開花前の花のみで通常条件下と同等に発現していたが、開花前の花以外でのリン酸輸送には関与しないと考えられたことから以後の解析対象からは除外した(Fig.3-3)。また、*LjPT7* は、茎での発現量が 3 倍ほどに増加する一方、葉と根での発現量はやや低下し、花と子実での発現量は通常条件下と同等もしくは 1.5 倍ほど増加した(Fig.3-3)。

花や子実においては、根や葉、茎と比較すると、リン酸欠乏ストレス処理によるリン酸トランスポータ遺伝子の発現量の変化が極めて小さかった(Fig.3-3)。このことは、花や子実が次世代のために種子として多量のリン酸を蓄積させる器官であり、これらの器官にはリン酸栄養環境によらず、恒常的に多くのリン酸が輸送されるような機構が存在することを示唆するものと考えられた。

#### リン酸欠乏ストレス下における体内リン酸濃度の経時変化

10 日間、水耕栽培(リン酸 500 $\mu$ M)したサンプルを、コントロール区(リン酸 500 $\mu$ M)とストレス区(リン酸 0 $\mu$ M)に分け、それぞれを移植後 4、7、10 日目にサンプリングし、根と各葉の重量と無機態リン酸濃度を測定した(Fig.3-4, Fig.3-5)。

根の生重量は、コントロール区とストレス区においてほぼ同様に増加したものの、

地上部の生重量の増加は、コントロール区よりもストレス区で抑制されており、特に 7 日目と 10 日目の間に大きく差が生じていた(Fig.3-4)。地上部の葉位別にみると Leaf1+Leaf2 の生重量の増加は両区ともほぼ同等であったが、Leaf3、Leaf4、Leaf5、Leaf6 の 10 日目におけるストレス区での生重量はコントロール区の約 1/2 であった(Fig.3-4)。

根におけるリン酸濃度は、コントロール区では 4 日目まで上昇し、その後はやや減少していた(Fig.3-5)。ストレス区では、4 日目までに移植時の半分以下まで減少し、10 日目には 1/8 程度になった(Fig.3-4)。葉内のリン酸の濃度は、コントロール区では Leaf1+Leaf2 は、やや減少したものの、Leaf3 では実験期間を通してほぼ一定であり、新しく展開した葉である Leaf4、Leaf5 では上昇した(Fig.3-5)。葉の生長は成熟期において抑制され、また、リン酸濃度も一定になることから(Greenway and Gunn *et al.*, 1966)、Leaf1+Leaf2 は、葉の生長の後期にあることが考えられた。一方、ストレス区では、移植後すべての器官でリン酸濃度が減少した(Fig.3-5)。また、Leaf3、Leaf4、Leaf5 におけるリン酸濃度は、それぞれが植物個体の中で新葉として存在していた時(Leaf3 の 0 日目、Leaf4 の 4 日目、Leaf5 の 7 日目)に最もリン酸濃度が高かった(Fig.3-5)。特に、10 日目の新葉である Leaf6 のリン酸濃度は、10 日目におけるすべての器官の中で最も高く保たれていた(Fig.3-5)。

このように、地上部の葉のうち、成熟葉(Leaf1+Leaf2)と新葉は、リン酸濃度変化がそれぞれ対照的であることがわかった。

そこで、以後の地上部での解析では、成熟葉(Leaf1+Leaf2)とそれぞれのサンプリング時の新葉(リン酸欠乏処理後、4 日目の Leaf4、7 日目の Leaf5、10 日目の Leaf6)に注目して解析を進めることにした。

### リン酸欠乏ストレス下におけるリン酸トランスポータ遺伝子発現量の経時変化

コントロール区とストレス区の、根、成熟葉、新葉におけるリン酸トランスポー

タ遺伝子(*LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3*、*LjPT7*)の発現量を経時的に解析した(Fig.3-6, Fig.3-7)。

ストレス区の根における *LjPT1* の発現量は、4 日目と 7 日目にコントロール区の約 4 倍に増加しており、10 日目には 7 倍に達した(Fig.3-7)。*LjPT2* は、4 日目にコントロール区とほぼ同等、7 日目には 2 倍程度、10 日目においては 4 倍の発現量が見られた(Fig.3-7)。*LjPT3* の発現量は、4 日目および 7 日目にはコントロール区の約 2 倍、10 日目では約 3 倍であった(Fig.3-7)。*LjPT7* は 4 日目と 7 日目にコントロールの約半分の発現量、10 日目ではコントロールとほぼ同等の発現量であった(Fig.3-7)。

ストレス区の成熟葉では、*LjPT1* の発現量は 4 日目にコントロール区の 2 倍、7 日目にはコントロール区と同等であったが、10 日目では 4 倍に増加した(Fig.3-7)。*LjPT2* は 4 日目に 4 倍に発現量が増加したが、7 日目および 10 日目ではコントロール区と同等であった(Fig.3-7)。*LjPT3* は実験期間中、常にコントロール区とほぼ同等の発現量であった(Fig.3-7)。*LjPT7* の発現量は 4 日目と 10 日目においてはコントロール区とほぼ同等であったが、7 日目は約 2 倍であった(Fig.3-7)。

ストレス区における新葉での 4 遺伝子の発現量は、10 日目のみでコントロール区との違いが見られた(Fig.3-7)。10 日目における発現量は、コントロール区に対して *LjPT1* は 4 倍、*LjPT2* は 9 倍、*LjPT3* は 2 倍、*LjPT7* は 5 倍であった。解析前、各部位における主要なリン酸輸送を「根＝根圏からの取り込みと地上部への排出」「新葉＝取り込み」、「成熟葉＝排出」と考え、機能するトランスポータの種類も器官ごとにそれぞれ異なると予想していたが、新葉では 4 遺伝子全ての発現量が同時期に増加した(Fig.3-7)。

成熟葉では、4 日目に複数のリン酸トランスポータ遺伝子の発現量変化が見られたのに対し、新葉での変化は 10 日目においてのみ見られた原因として、植物体内において新葉がシンク器官として機能していることが考えられた。すなわち、新葉での

リン酸トランスポータ遺伝子の発現量は、他器官から導管と篩管の双方を通じて供給されるリン酸量に応じて変動する可能性がある。リン酸欠乏ストレス処理時には、速やかに導管内のリン酸濃度が低下するため、主に導管からリン酸を獲得し、かつ転流によってリン酸を失う成熟葉（ソース器官）においては、葉のリン酸濃度が急速に減少し、リン酸トランスポータ遺伝子が発現したと考えられる。一方、新葉は導管および篩管からのリン酸、あるいは他の形態でリンの供給を受けている。リン酸欠乏ストレス処理時による篩管内のリン酸濃度の低下は導管に比べて遅く、そのため、供給されるリン酸量の低下によるリン酸トランスポータの誘導は、根や成熟葉に比較して遅いとも考えられた。

また、*LjPT1* は、根と成熟葉においてリン酸濃度の低下に伴い発現量が増加していた(Fig.3-7)。したがって、*LjPT1* は、器官内のリン酸濃度に応じ、同じ器官で誘導される遺伝子であると考えられた。また、*LjPT2* は、ストレス区における 4 日目の成熟葉での発現がコントロール区に比較して高いものの、7、10 日目ではコントロール区とほぼ同等であった(Fig.3-7)。これには、ストレス区の成熟葉における *LjPT2* の発現量は 7、10 日目においても 4 日目と同等に保たれているが、7、10 日目にはコントロール区での *LjPT2* の発現量も増加していることが反映されている(Fig.3-6)。ストレス区の成熟葉におけるリン酸濃度は 4 日目には移植時の 1/5 にまで低下しており、コントロール区においても成熟葉でのリン酸濃度は 7、10 日目にはやや減少に転じていた(Fig.3-5)。これらのことから、成熟葉において *LjPT2* はリン酸の転流に関与しているのではないかと考えられた。*LjPT2* は新葉でもストレス区において 10 日目に発現が増加しており(Fig.3-7)、導管あるいは篩管から供給されたリン酸の、細胞への再吸収に関与することが考えられる。*LjPT2* は高親和性のリン酸トランスポータであることが第 2 章の結果から示されていることから、*LjPT2* が植物体の各器官において、リン酸濃度の低い組織から高い組織（成熟葉の篩部細胞、新葉の葉肉細胞）への輸送に関与することが予想された。この点、第 2 章でお

こなった *in situ* ハイブリダイゼーションの結果から、*LjPT2*は新葉では葉肉細胞で発現していることも確認されている。*LjPT3*と *LjPT7*はストレス処理によって新葉のみで発現量が増加しており(Fig.3-7)、篩管からのリン酸の排出、もしくは新葉が発達する際の特異的な機能を持つ可能性が考えられた。

以上のことから、リン酸欠乏ストレス処理の開始から 10 日目には、各器官におけるリン酸トランスポータ遺伝子の発現量が大きく変化することがわかった。そこで、コントロール区とストレス区における 10 日目の植物体において、実際のリン酸の移行に差異があるのかを、 $^{32}\text{P}$  動態解析により調べることにした。

#### リン酸濃度の異なる培地での $^{32}\text{P}$ 吸収と分配

コントロール区とストレス区で画像解析を行うにあたり、初めに撮像時のリン酸濃度について検討した。リン酸濃度を 1、25、100 $\mu\text{M}$  に調整した水耕液に  $^{32}\text{P}$  を添加し、サンプル内の  $^{32}\text{P}$  分布を Imaging Plate により検出した。ストレス区のサンプルは、リン酸濃度が 1 $\mu\text{M}$  では、根が 80%、地上部 20%、25 $\mu\text{M}$  では根が 60%、地上部が 40%、100 $\mu\text{M}$  では、根が 40%、地上部 60%であった(Fig.3-8)。コントロール区のサンプルは、リン酸濃度が 1 $\mu\text{M}$  では、根が 65%、地上部 30%、25 $\mu\text{M}$  では根が 60%、地上部が 40%、100 $\mu\text{M}$  では、根が 55%、地上部 45%であった(Fig.3-8)。いずれの試験区においても、水耕液中のリン酸濃度が上昇するにつれて地上部への  $^{32}\text{P}$  の移行量が増加する傾向が見られるものの、コントロール区では、水耕液中のリン酸濃度が 1 $\mu\text{M}$  のサンプルにおいても地上部へ  $^{32}\text{P}$  が移行した(Fig.3-8)。

水耕液内リン酸濃度が 1 $\mu\text{M}$  の時、ストレス区のサンプルの地上部への  $^{32}\text{P}$  分配が根よりも少なかったことは、ストレス区の根が吸収したリン酸のほとんどを、根の生長に利用するためと考えられた。したがって、コントロール区、ストレス区の両方のサンプルで地上部の器官へのリン酸移行を撮像するためには、水耕液中のリン酸濃度を 100 $\mu\text{M}$  以上に設定して撮像する必要があった。そこで、以後のイメージン

グ撮像時の水耕液のリン酸濃度は、コントロール区のリン酸濃度である 500 $\mu$ M を基準とした。

#### アイソトープイメージングシステムを用いた $^{32}\text{P}$ 動態解析

第 1 章第 2 節で改良を行ったアイソトープイメージングシステムを用い、 $^{32}\text{P}$  を含むリン酸濃度 500 $\mu$ M の 1/2Hoagland 水耕液を根圏に与え、コントロール区とストレス区のサンプルの撮像を行った(Fig.3-9, Fig.3-11)。

コントロール区とストレス区の両方のサンプルにおいて、根から吸収され地上部へ移行した  $^{32}\text{P}$  は、まず、茎の先端まで達するように移行した後、各葉へ移行・蓄積していた(Fig.3-9, Fig.3-11)。コントロール区では、吸収開始から 4 時間後に地上部へ  $^{32}\text{P}$  が移行し、ストレス区では、吸収開始から 1 時間後に地上部へ  $^{32}\text{P}$  が移行していた。次に、根のリン酸吸収と地上部への移行を評価するため、単位時間あたりに地上部全体へ移行したリン酸量（以下、移行速度）をコントロール区とストレス区で算出した(Fig.3-10, Fig.3-12)。 $^{32}\text{P}$  量をリン酸量に換算すると、それぞれの区における地上部全体への移行速度は 40.2nmol/h、187.8mol/h であり、ストレス区ではリン酸移行速度がコントロール区の約 3-5 倍に増加していた(Fig.3-12)。同様に、新葉への移行速度は、コントロール区が 5.6nmol/h、ストレス区が 41.0nmol/h であり、ストレス区で約 3-6 倍に増加していた(Fig3-12)。成熟葉への移行速度は、コントロール区が 2.9nmol/h、ストレス区が 33.5nmol/h であり、ストレス区の方が約 9-18 倍に増加していた(Fig.3-12)。以上の数値は同条件での撮像をそれぞれ 3-4 回行った平均である。

以上の結果から、ストレス区における 10 日目のサンプルでは、根によるリン酸の吸収および地上部への移行速度が上昇することが示された。この時、根でリン酸トランスポータ遺伝子(*LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3*)の発現が増加しているため、これらのトランスポータがリン酸の吸収・移行速度の上昇に関与する可能性が考えられた。

特に、*LjPT1* と *LjPT2* は根の表皮以外にも、根の維管束周辺細胞でも発現しており、リン酸の地上部への輸送に関与している可能性が高いと思われた。新葉(Leaf6)では、4 つの遺伝子(*LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3*、*LjPT4*)が発現量を増加させており、実際のリン酸移行速度も増加していた。成熟葉(Leaf1+Leaf2)では、リン酸ストレス処理によってコントロール区よりも増加したリン酸トランスポータは *LjPT1* のみであったが、コントロール区と比較したストレス区の  $^{32}\text{P}$  の移行速度増加は、根や新葉に比較して最も高かった。このことから、成熟葉において、導管を経由して供給されたリン酸を再吸収する過程には *LjPT1* が関与する可能性が考えられた。

#### 花芽期の $^{32}\text{P}$ 動態解析

Leaf6 が展開したミヤコグサの各器官においてはトランスポータ遺伝子の発現量がリン酸欠乏ストレスによって増加するが、花や子実では発現量に大きな変動は見られなかった(Fig.3-3)。そのため、花や子実へのリン酸移行量は恒常的に多いことが予想された。そこで、花芽が形成された植物体においては、どのようなリン酸分配が行われているのかを調べるため、花芽を形成した植物体を用いて  $^{32}\text{P}$  動態解析を試みた。

コントロール区では、地上部へ移行した  $^{32}\text{P}$  は茎および茎の先端にある開花前の花へ移行し、その速度は  $3.7\text{nmol/h}$  であった(Fig.3-13, Fig.3-14)。一方、ストレス区は、 $3.8\text{ nmol/h}$  であり(Fig.3-16)、リン酸欠乏ストレス処理によっても花へのリン酸の移行速度は変化しないことが示された。ストレス区では地上部への  $^{32}\text{P}$  の移行が、撮像開始後すみやかに観察されたが、コントロール区では 10 時間後以降に観察された(Fig.3-14, Fig.3-16)。

## 第2節

### 3-2-1 緒言

第1節で撮像した画像を観察すると、根から吸収され地上部へ移行した  $^{32}\text{P}$  は、まず、茎の先端まで達するように移行した後、各葉へ移行・蓄積する。この時、茎の節(Node)において  $^{32}\text{P}$  が集積する様子が見られたため、葉位ごとの  $^{32}\text{P}$  の移行と蓄積の制御機構には、Node が関与している可能性を考えた。そこで本節では、新葉と成熟葉および、それぞれの Node でのリン酸トランスポータ遺伝子の発現量を調べ、ミヤコグサにおけるリン酸輸送制御機構に対する葉と Node の関与を比較検討した。また、第1節の結果から、リン酸欠乏ストレスによって、根から地上部へと輸送されるリン酸量、すなわち導管内のリン酸濃度が変化することが示された。そこで、Node でのリン酸の輸送を制御する要因として、導管内のリン酸濃度、地上部が予め含有するリン酸量、あるいは根からの何らかのシグナルが関わる可能性を検討するため、根を切除し、茎から  $^{32}\text{P}$  を吸収させることで導管内リン酸濃度をそろえた植物体を用い、各葉への  $^{32}\text{P}$  の移行を撮像した。

### 3-2-2 実験方法

1、1000 $\mu\text{M}$  にリン酸濃度を調整した 1/2Hoagland 水耕液 20ml に  $^{32}\text{P}$  を 2kBq/ml 添加したものを上記したコントロール区とストレス区 (3-1-2(1)の栽培方法に準じた) の茎から与えた。20 時間後、水耕液からサンプルを取り出し、Imaging Plate により検出した。



### 3-2-3 結果と考察

#### 節でのリン酸トランスポータ遺伝子の発現解析

コントロール区とストレス区の両サンプルとも  $^{32}\text{P}$  が移行していた新葉、および両サンプルで  $^{32}\text{P}$  の移行が異なっていた成熟葉の節においてリン酸トランスポータ遺伝子の発現量を比較した。新葉の節では、コントロールと比較して *LjPT1* が約 10 倍、*LjPT2* が約 20 倍、*LjPT3* が約 3 倍、*LjPT7* が約 10 倍に増加していた(Fig.3-17)。成熟葉の節では、コントロールと比較して *LjPT1* が約 9 倍、*LjPT2* が約 10 倍、*LjPT3* はほぼ同等、*LjPT7* が約 10 倍に増加していた(Fig.3-17)。新葉の節と成熟葉の節で異なっていた遺伝子は *LjPT3* のみであった。このことから、リン酸トランスポータ遺伝子は節においても発現量を増加させており、分配にも関与する可能性が考えられた。

#### $^{32}\text{P}$ を茎から吸収させた場合の地上部の $^{32}\text{P}$ 分配

リン酸濃度を 1 $\mu\text{M}$ 、1000 $\mu\text{M}$  に調整した 1/2Hoaglnad 水耕液に  $^{32}\text{P}$  を添加し、根を切断したサンプルの茎から与えると、1 $\mu\text{M}$  では、コントロール区ストレス区ともに茎と新葉へ移行していた(Fig.3-18)。一方、1000 $\mu\text{M}$  では、コントロール区の成熟葉への移行が新葉に比べ少ないのに対し、ストレス区では成熟葉へも  $^{32}\text{P}$  が移行していた(Fig.3-18)。このことから、コントロール区とストレス区の根による地上部へのリン酸輸送量の違いに関わらず、地上部では、リン酸の分配が制御されていることが分かった。

### 3 章のまとめ

1. リン酸欠乏ストレスにより、リン酸トランスポータ遺伝子は主に根、葉、茎で発現を増加させており、開花前の花、花、鞘での発現はコントロールと同様であった。
2. リン酸欠乏処理の結果、成熟葉のリン酸は減少し、新葉のリン酸濃度は生長とともに減少した。
3. リン酸欠乏時の根では、*LjPT1*、*LjPT2* が増加しており、コントロールに比較して単位時間あたりの地上部への移行絶対量は 3-5 倍に増加していた。
4. リン酸欠乏時の新葉では *LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3*、*LjPT7* が増加しており、コントロールに比較して単位時間あたりの移行絶対量は 3-6 倍に増加していた。
5. リン酸欠乏時の成熟葉では *LjPT1* が増加しており、コントロールに比較して単位時間あたりの移行絶対量は 9-18 倍に増加していた。
7. リン酸トランスポータは、リン酸欠乏ストレス時に茎の節でも発現量が増加しており、茎から葉への移行に何らかの働きをしていることが予想された。
8. 花芽期のサンプルにおいても、リン酸欠乏ストレス処理により成熟葉へのリン酸移行が高まる傾向が見られた。
9. リン酸欠乏時のサンプルでは、成熟葉へ移行したリン酸が転流されやすいことが分かった。

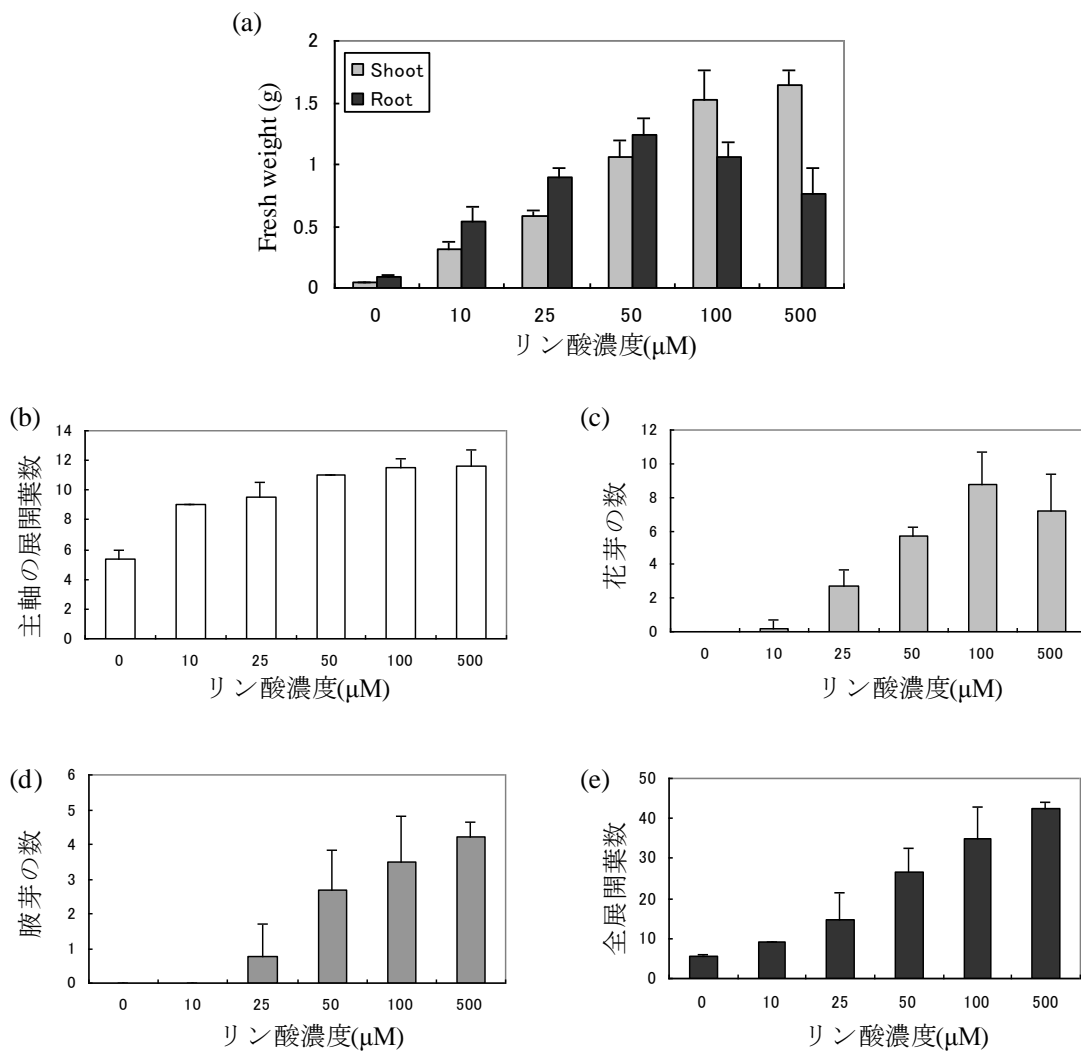


Figure 3-1 リン酸濃度の異なるHoagland水耕液におけるミヤコグサの生育比較  
(a)生重量 (b)主軸の展開葉数、(c)花芽の数、(d)腋芽の数、(e)全展開葉数

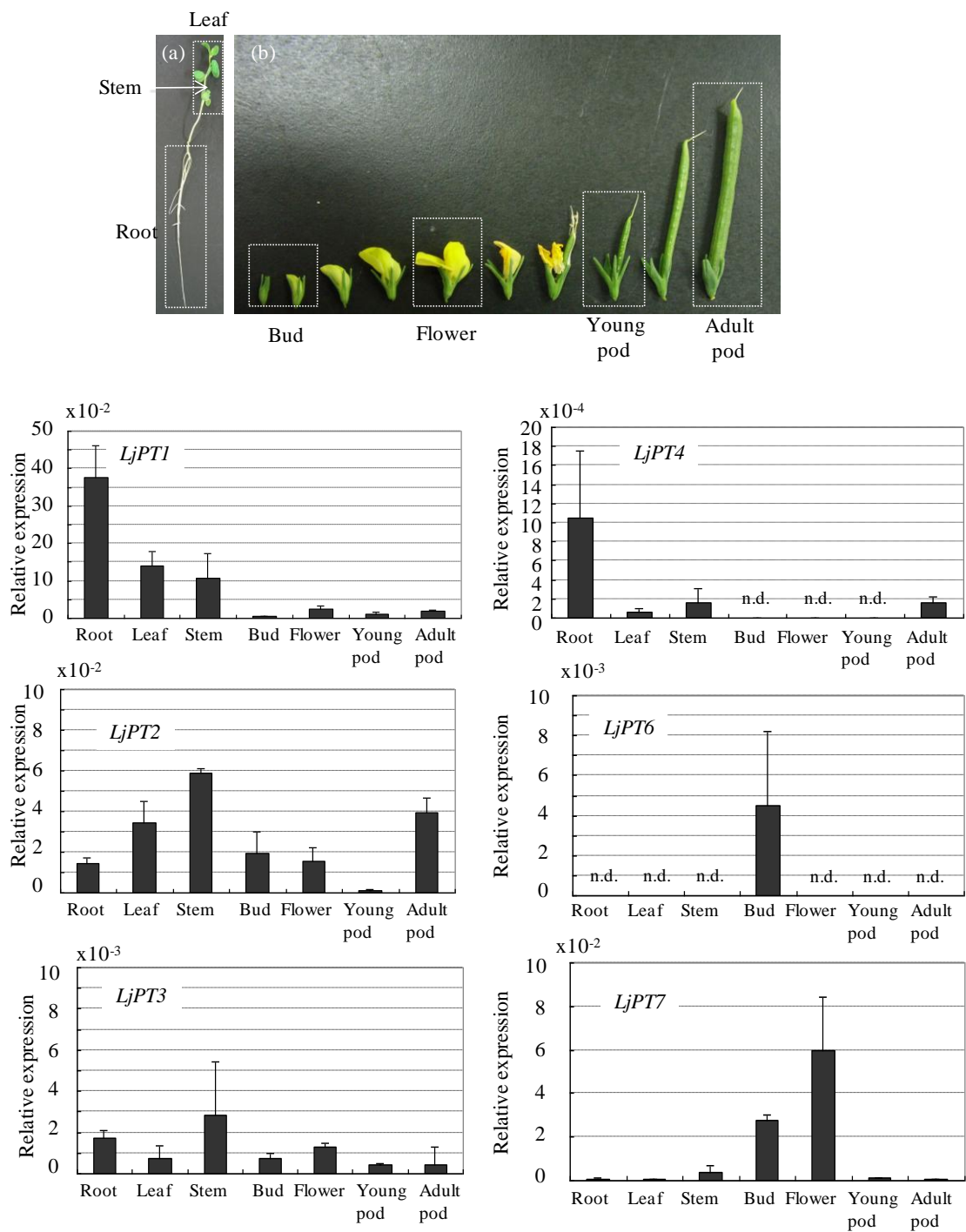


Figure3-2 リン酸欠乏ストレス処理サンプルでのLjPT family遺伝子の発現解析

(a)水耕2週間栽培（うち1週間リン酸0μMで栽培）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（うち3-7週間Pi,0μMで栽培）のサンプル。枠内はつぼみ、花、さやのサンプリング部位を示す。内部標準遺伝子（ATPsynase）を1とした時の相対値。

エラーバーは標準偏差を示す

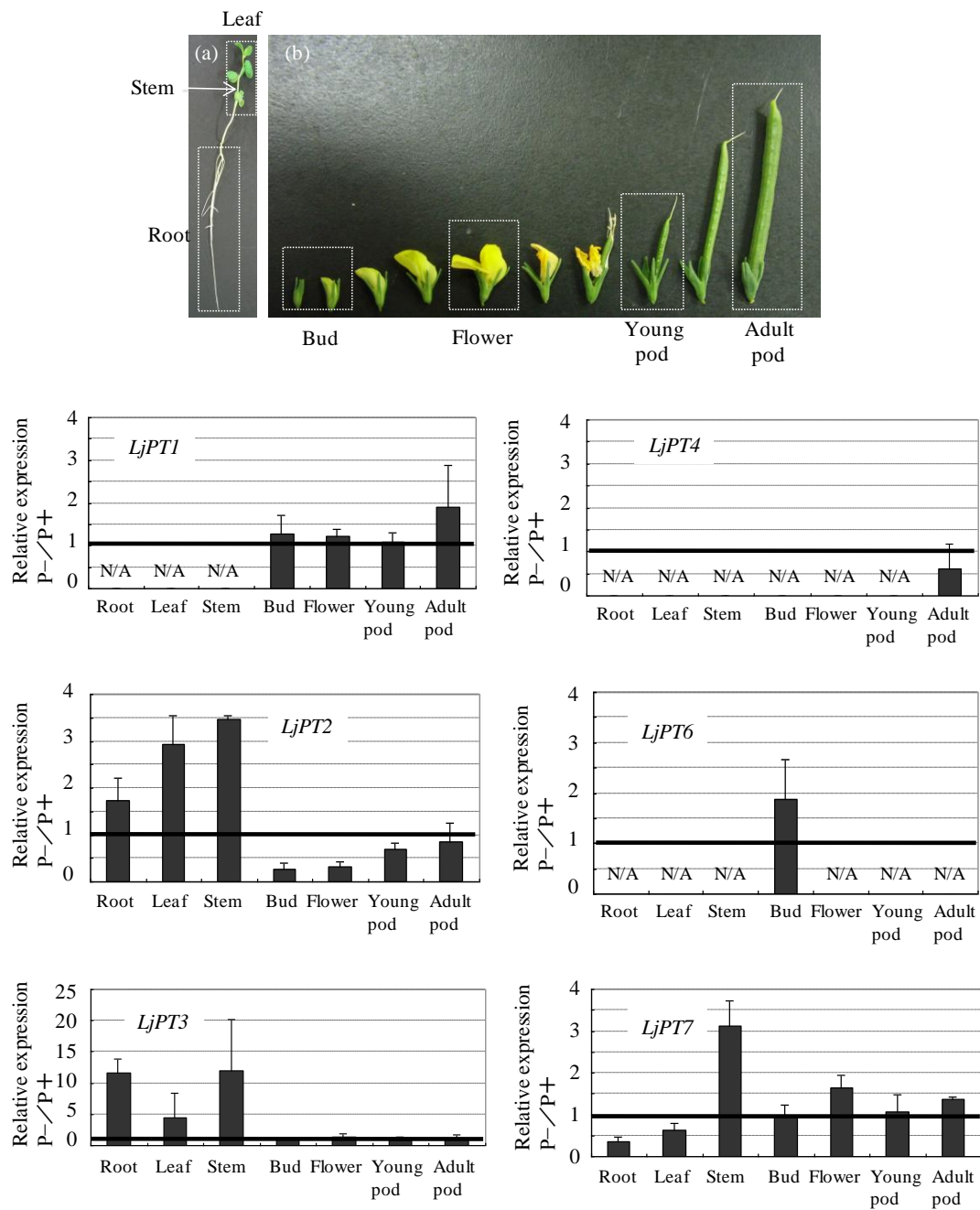


Figure3-3 リン酸欠乏処理サンプルでのLjPT family遺伝子の発現解析

(a)水耕2週間栽培（うち1週間Pi,0μMで栽培）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（うち3-7週間Pi,0μMで栽培）のサンプル。枠内はつぼみ、花、さやのサンプリング部位を示す。

コントロール栽培区の結果を基準とした時の欠乏区の発現量変化。エラーバーは標準偏差を示す。  
 N/A:欠損値（分母であるP+の発現量がn.d.であるため）

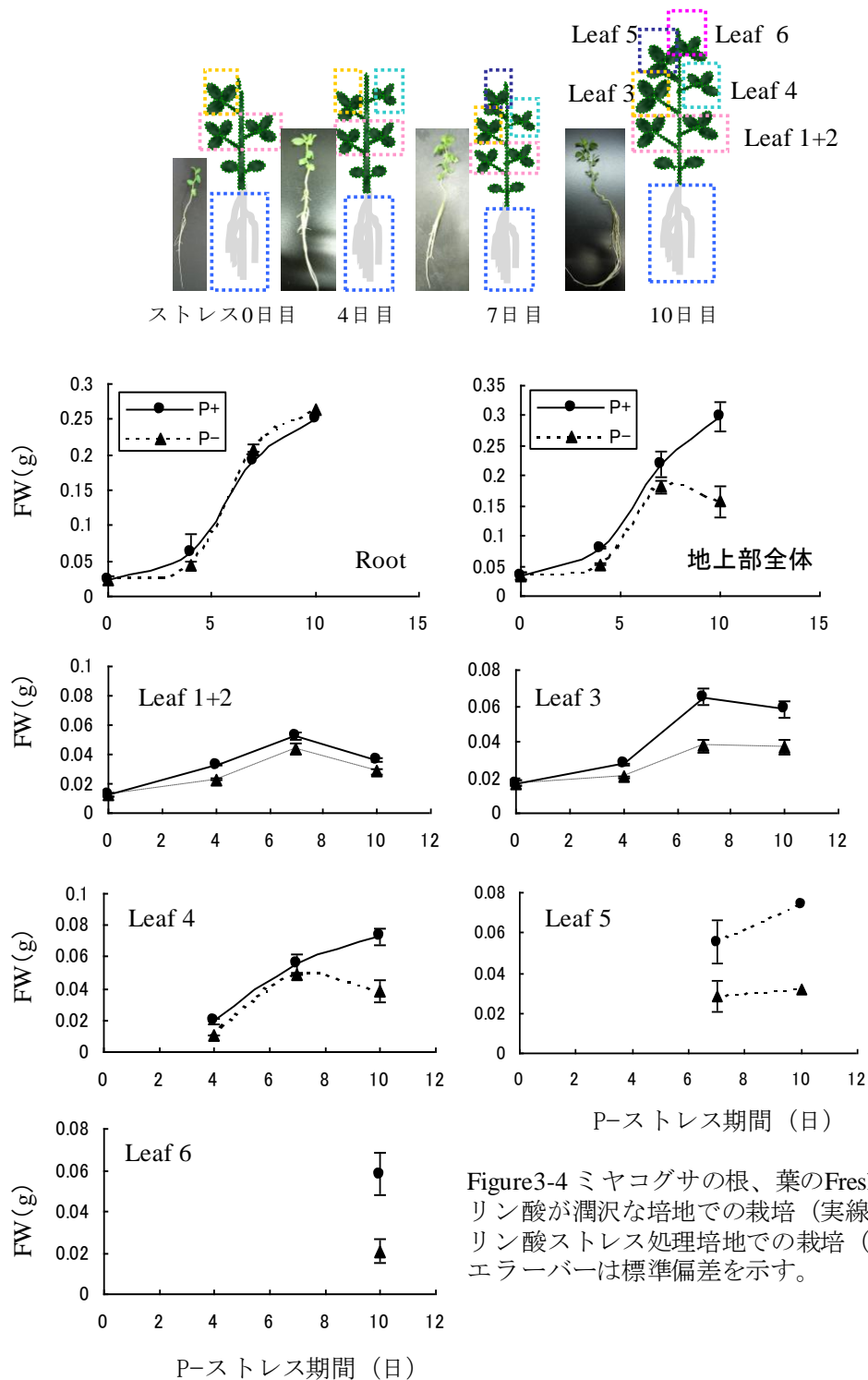


Figure3-4 ミヤコグサの根、葉のFresh weightの変化  
リン酸が潤沢な培地での栽培（実線）。  
リン酸ストレス処理培地での栽培（点線）。  
エラーバーは標準偏差を示す。

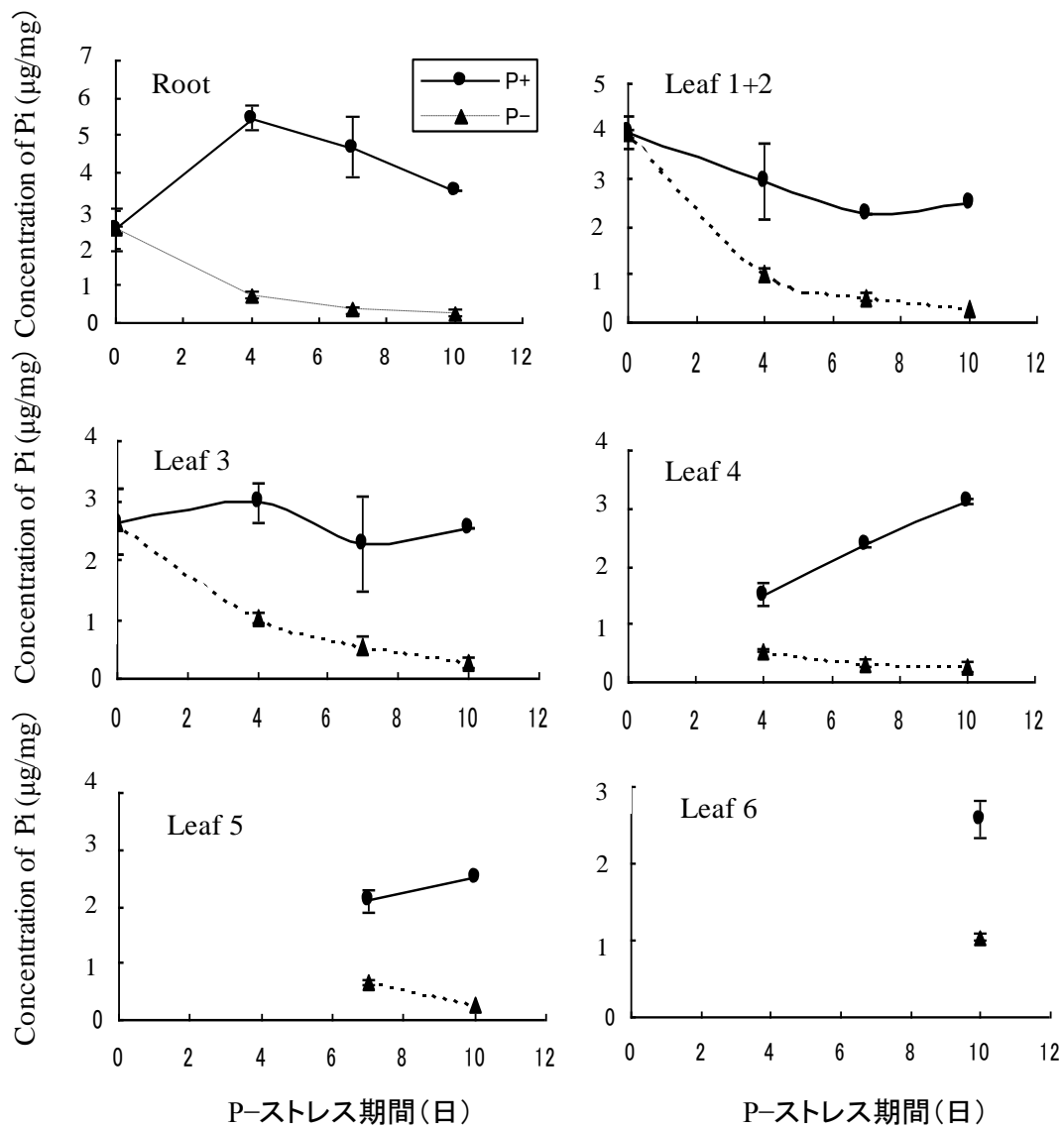
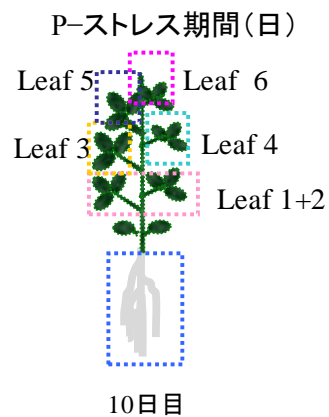


Figure3-5 ミヤコグサの根、葉のリン酸濃度変化  
リン酸が潤沢な培地での栽培（実線）。  
リン酸ストレス処理培地での栽培（点線）  
エラーバーは標準偏差を示す。



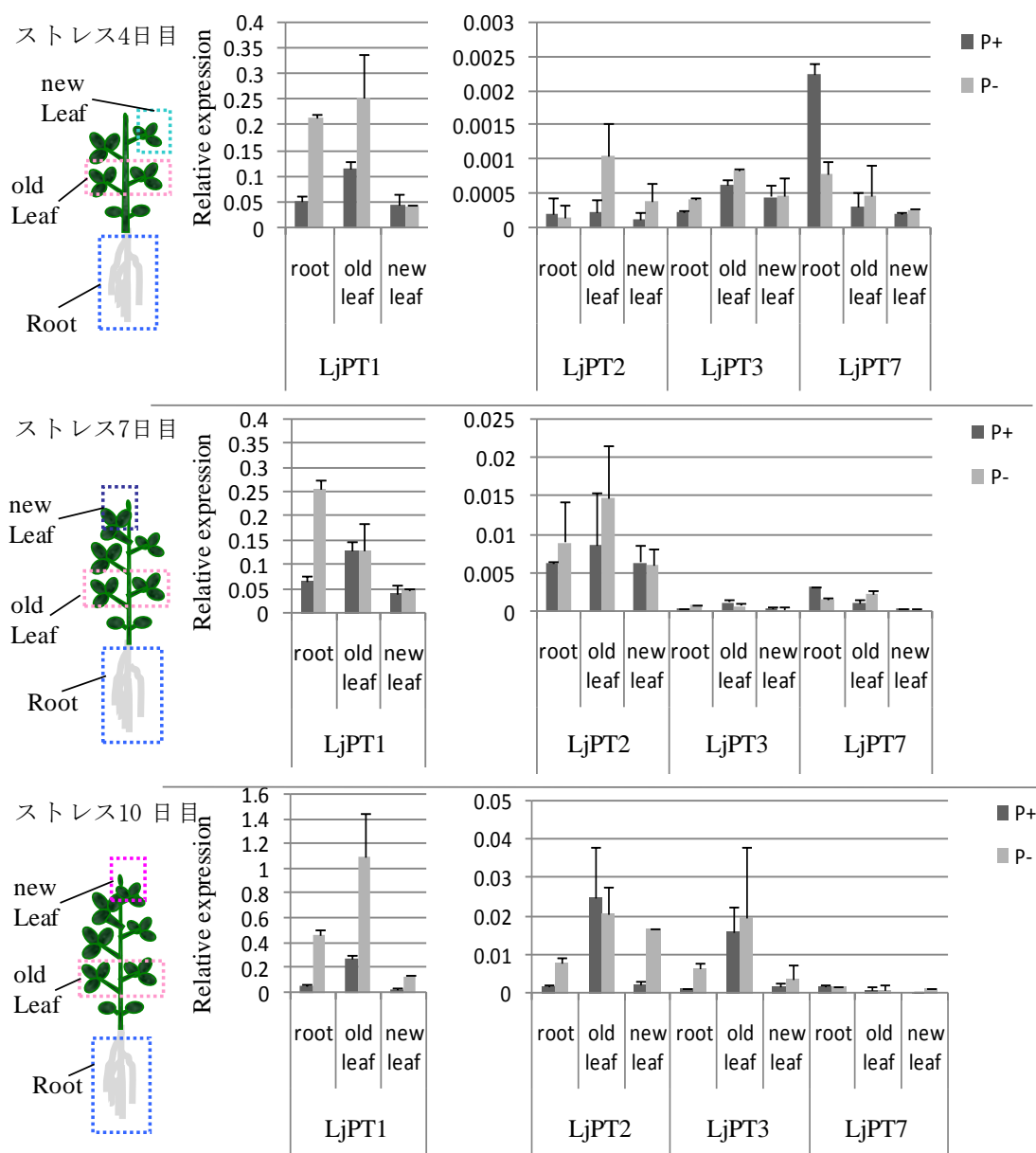


Figure3-6リン酸欠乏ストレス処理過程のリン酸トランスポータ遺伝子発現量の変化  
内部標準 (ATP synthase) を 1 とした時の相対値。  
エラーバーは標準偏差を示す。



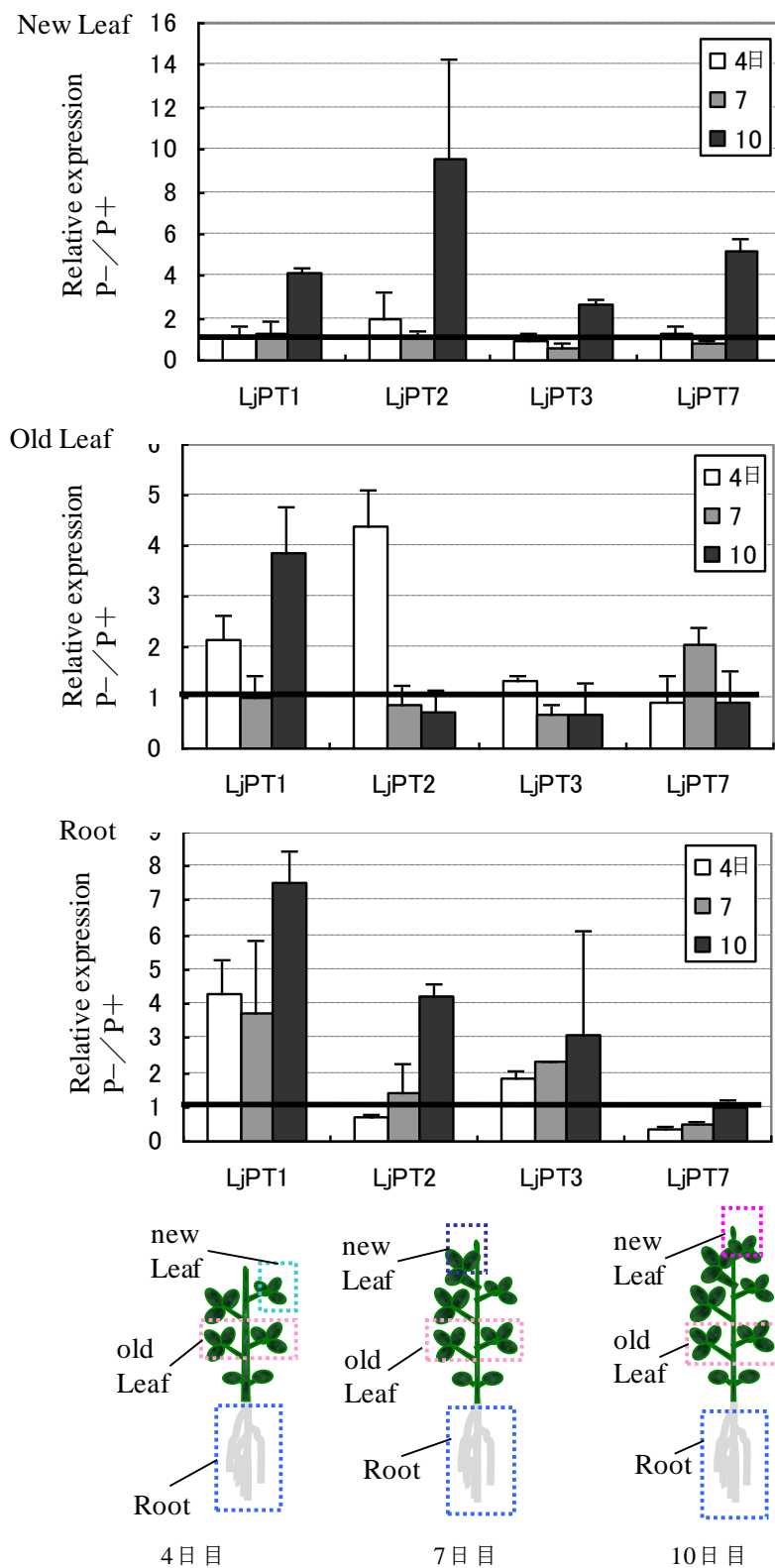


Figure3-7 リン酸欠乏ストレス処理過程のリン酸トランスポータ遺伝子発現量の変化  
P+を 1 とした時のP-の相対発現量値。エラーバーは標準偏差を示す。

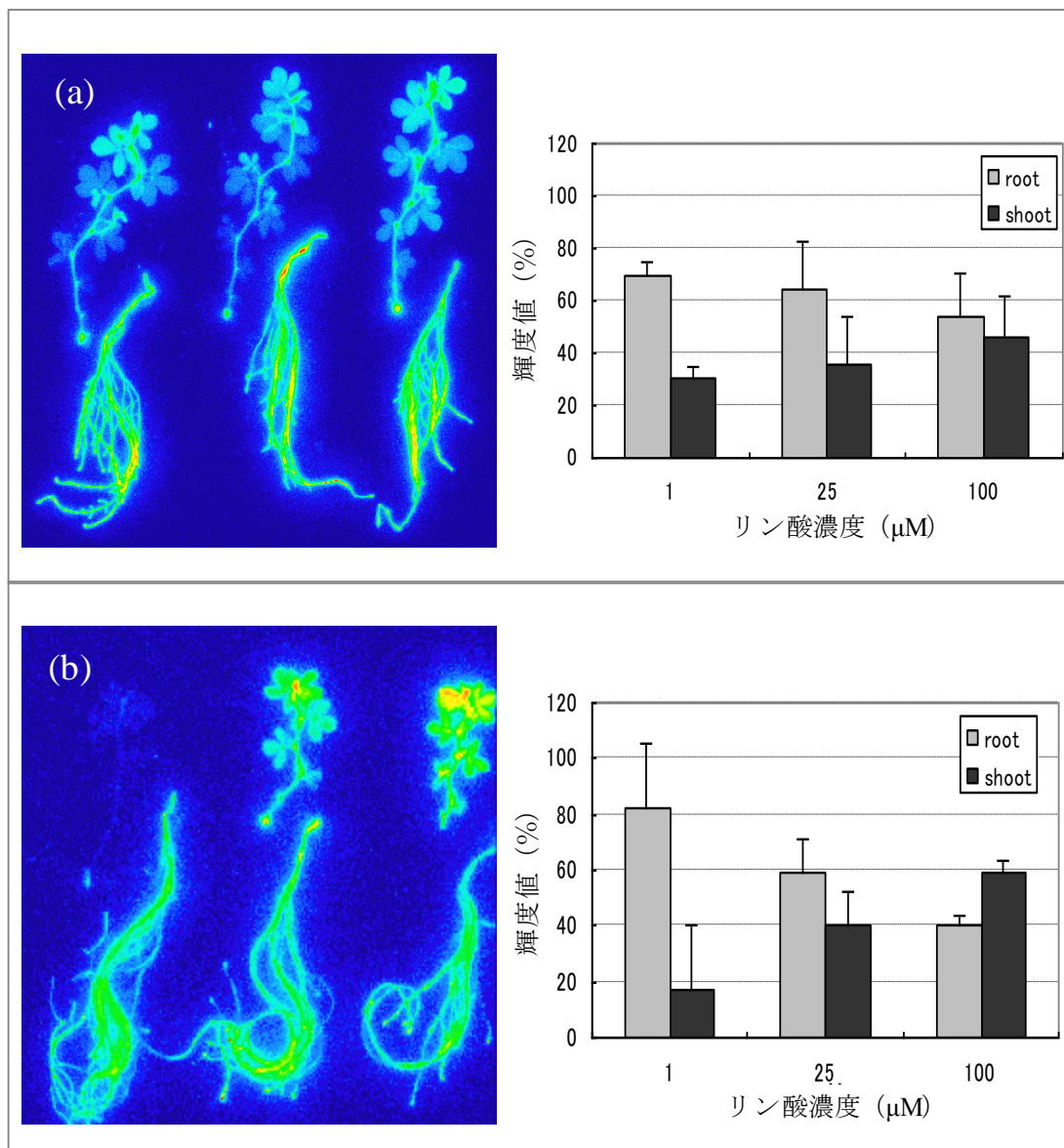


Figure3-8 リン酸欠乏ストレスとコントロールサンプルでの $^{32}\text{P}$ の分配

$^{32}\text{P}$ (a)コントロール栽培区(b)ストレス栽培区。

左からリン酸濃度1, 25, 100 $\mu\text{M}$ のHoagland水耕液に $^{32}\text{P}$ を20kBq/20ml混合し、根から与え20時間後Imaging Plateにより検出した。

低リン酸濃度培地においてトレス栽培区サンプルは、根への分配が多かった。

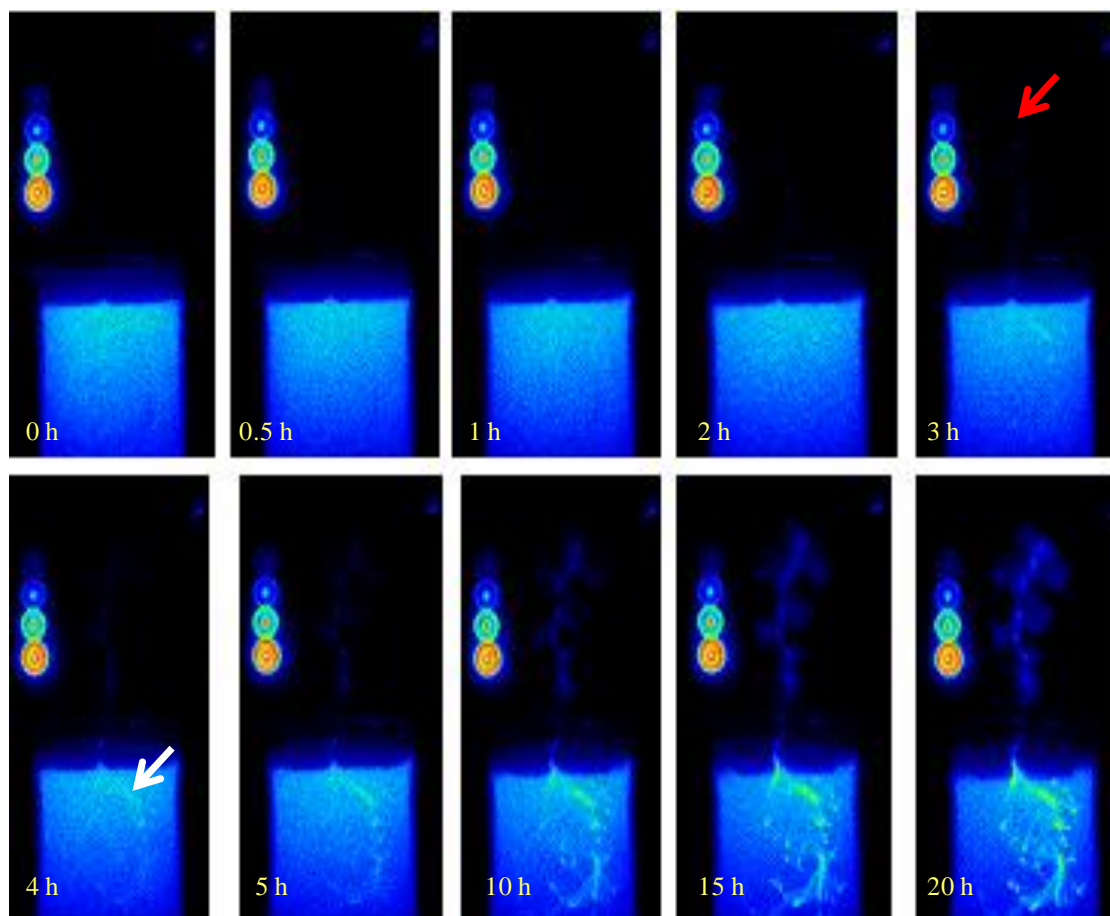
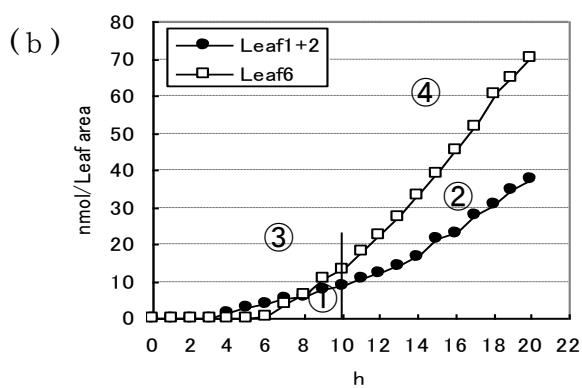
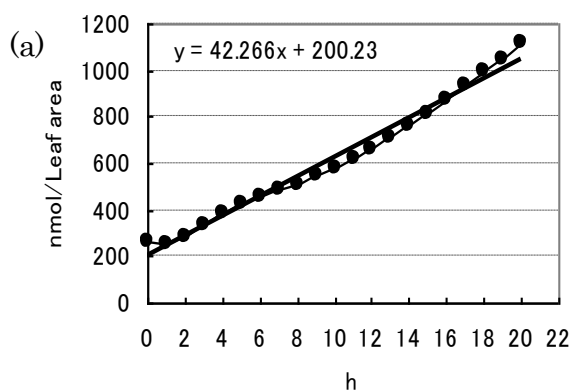
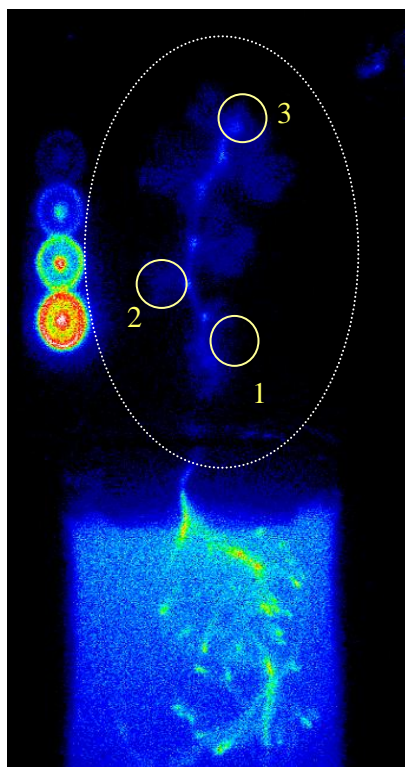


Figure3-9 コントロールサンプルの $^{32}\text{P}$ 動態解析

40ml Hoagland 水耕液に $^{32}\text{P}$ を1MBq/混合し、根から与えた。

積算時間3分間で20時間撮像した。

$^{32}\text{P}$  施与後3時間後には地上部に達する様子が（赤矢印）、4時間では根への集積が（観察された白矢印）。



Leaf1+2

①  $y = 0.9684x - 1.5227$

②  $y = 3.1325x - 25.656$

Leaf6

③  $y = 2.7829x - 15.159$

④  $y = 6.0101x - 49.952$

Figure3-10 コントロールサンプルの $^{32}\text{P}$ 動態解析

(a)単位時間あたりの地上部への $^{32}\text{P}$ 移行量変化のグラフ。

(b)葉の $^{32}\text{P}$ 移行量変化のグラフ。グラフの傾きから $^{32}\text{P}$ 移行速度を求めた。

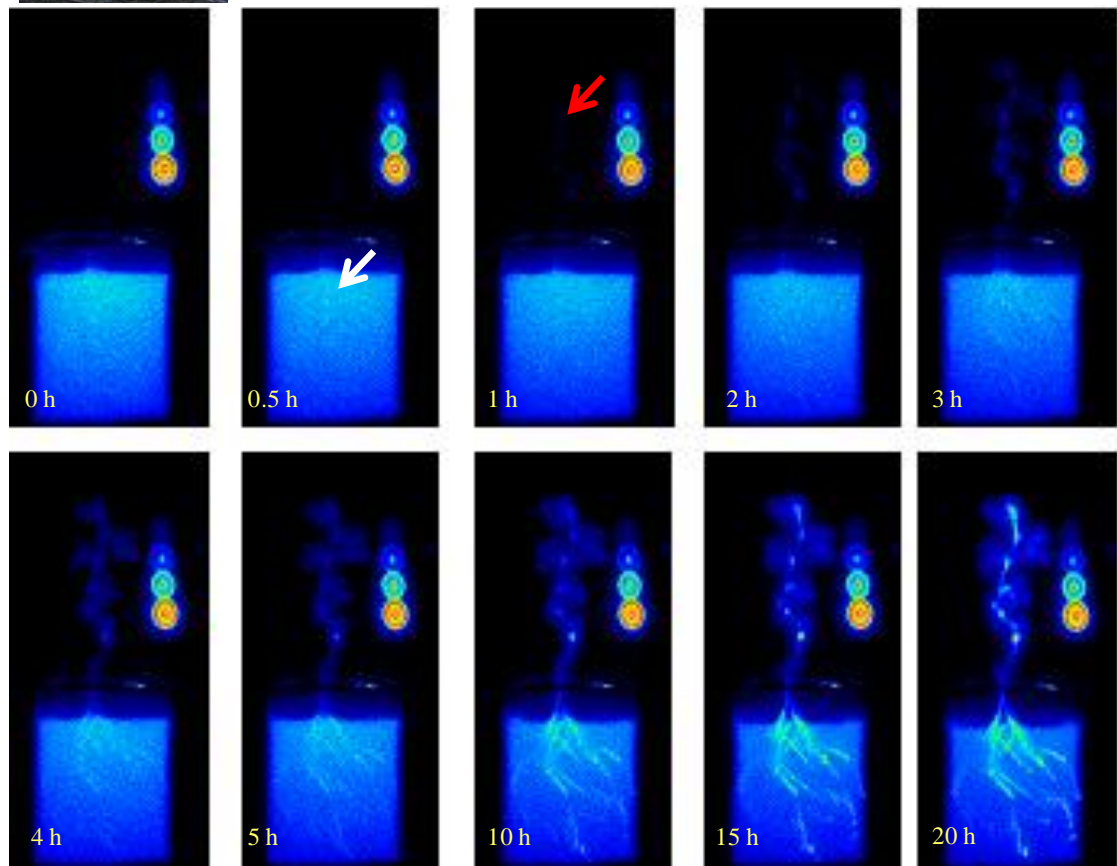


Figure3-11 ストレスサンプルの $^{32}\text{P}$ 動態解析  
 40ml\_Hoagland 水耕液に $^{32}\text{P}$  を 1MBq/混合し、根から与えた。  
 積算時間3分間で20時間撮像した。 $^{32}\text{P}$  施与後30分では根への集積が観察された（白矢印）。1時間後には地上部に達する様子が観察された（赤矢印）。

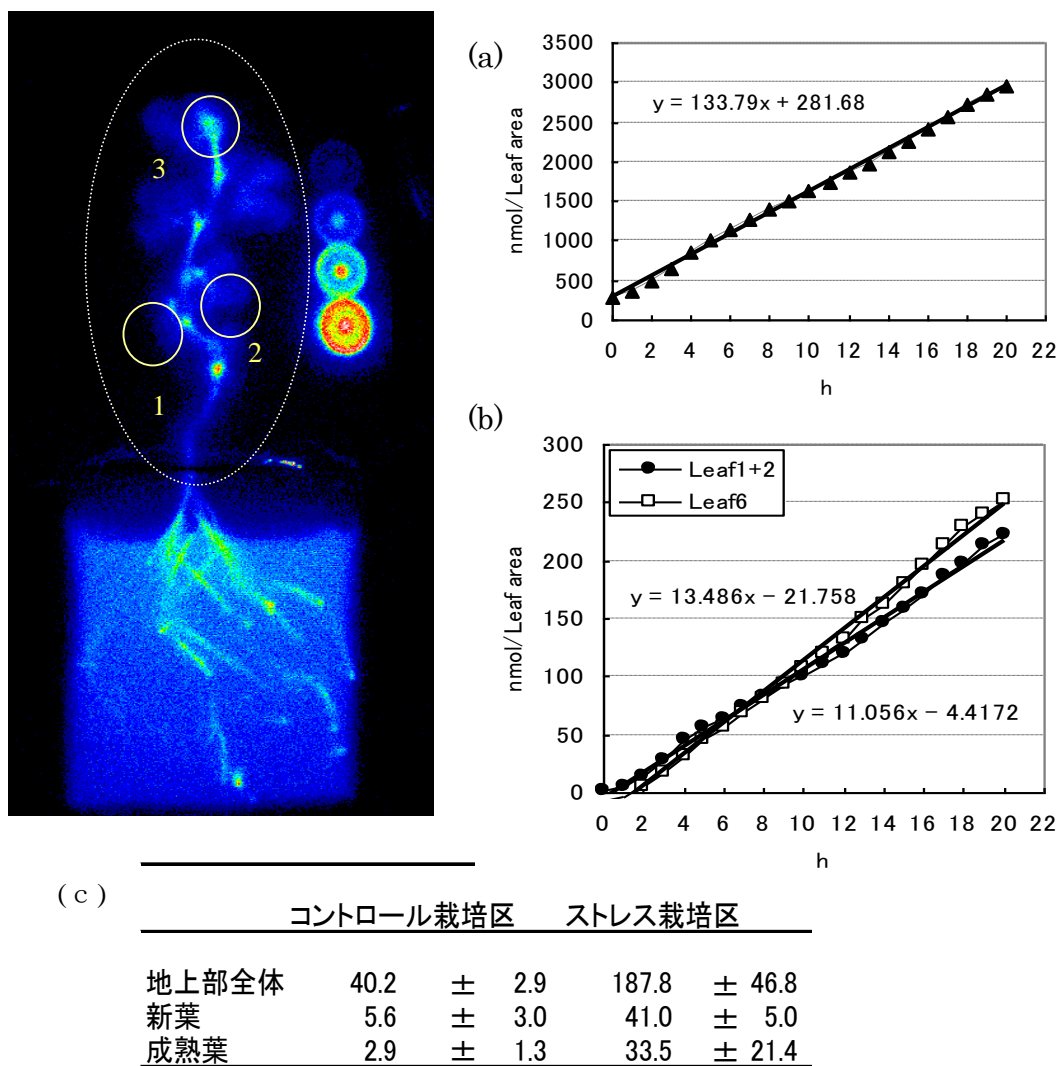


Figure3-12 ストレスサンプルの $^{32}\text{P}$ 動態解析

(a)単位時間あたりの地上部への $^{32}\text{P}$ 移行量変化のグラフ。

(b)葉の $^{32}\text{P}$ 移行量変化のグラフ。グラフの傾きから $^{32}\text{P}$ 移行速度を求めた。

(c)コントロール区とストレス区での移行速度。

n=3-4の平均値および標準偏差を示した。



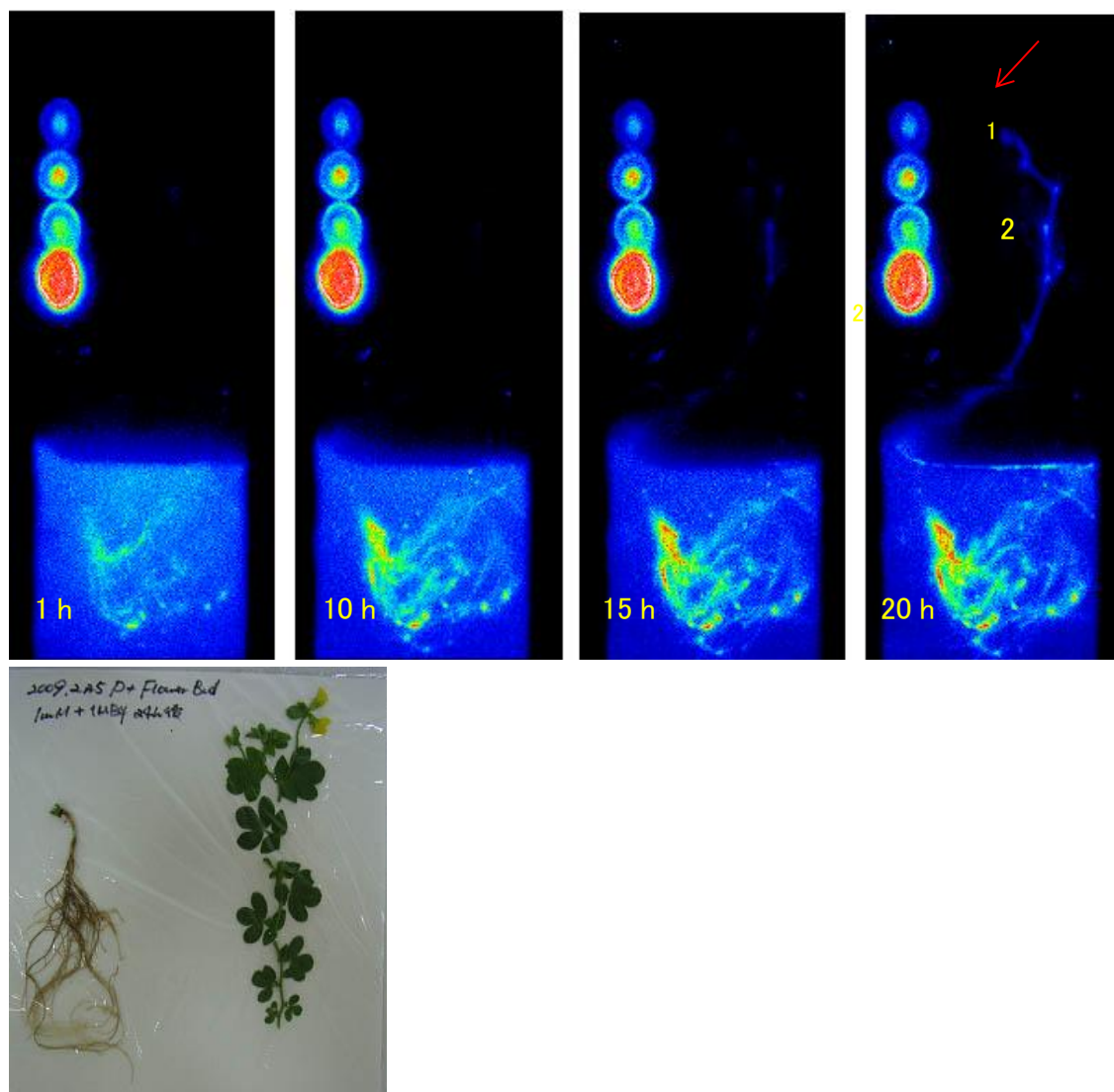


Figure3-13 コントロール区のサンプル（花芽期）の $^{32}\text{P}$ 動態解析  
 40ml\_Hoagland 水耕液に $^{32}\text{P}$ を1MBq/混合し、根から与えた。  
 積算時間3分間で20時間撮像した。  
 地上部に達した $^{32}\text{P}$ は花芽へ優先的に移行した（赤矢印）。

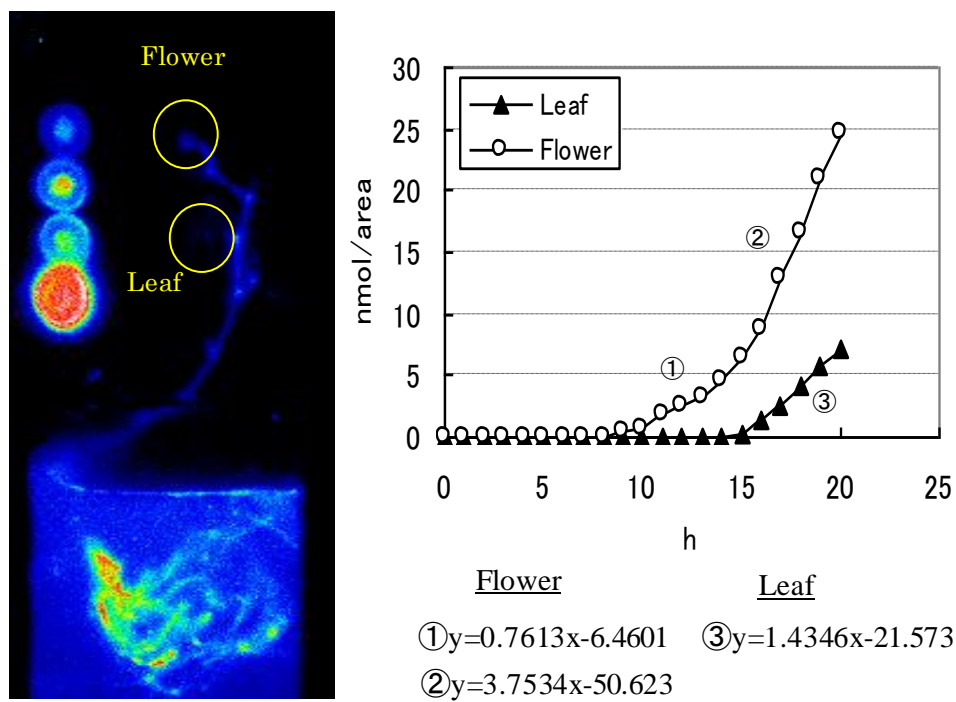


Figure3-14 コントロールサンプルの $^{32}\text{P}$ 動態解析  
 (a)単位時間あたりの地上部への $^{32}\text{P}$ 移行量変化のグラフ。  
 (b)葉の $^{32}\text{P}$ 移行量変化のグラフ。グラフの傾きから $^{32}\text{P}$ 移行速度を求めた。



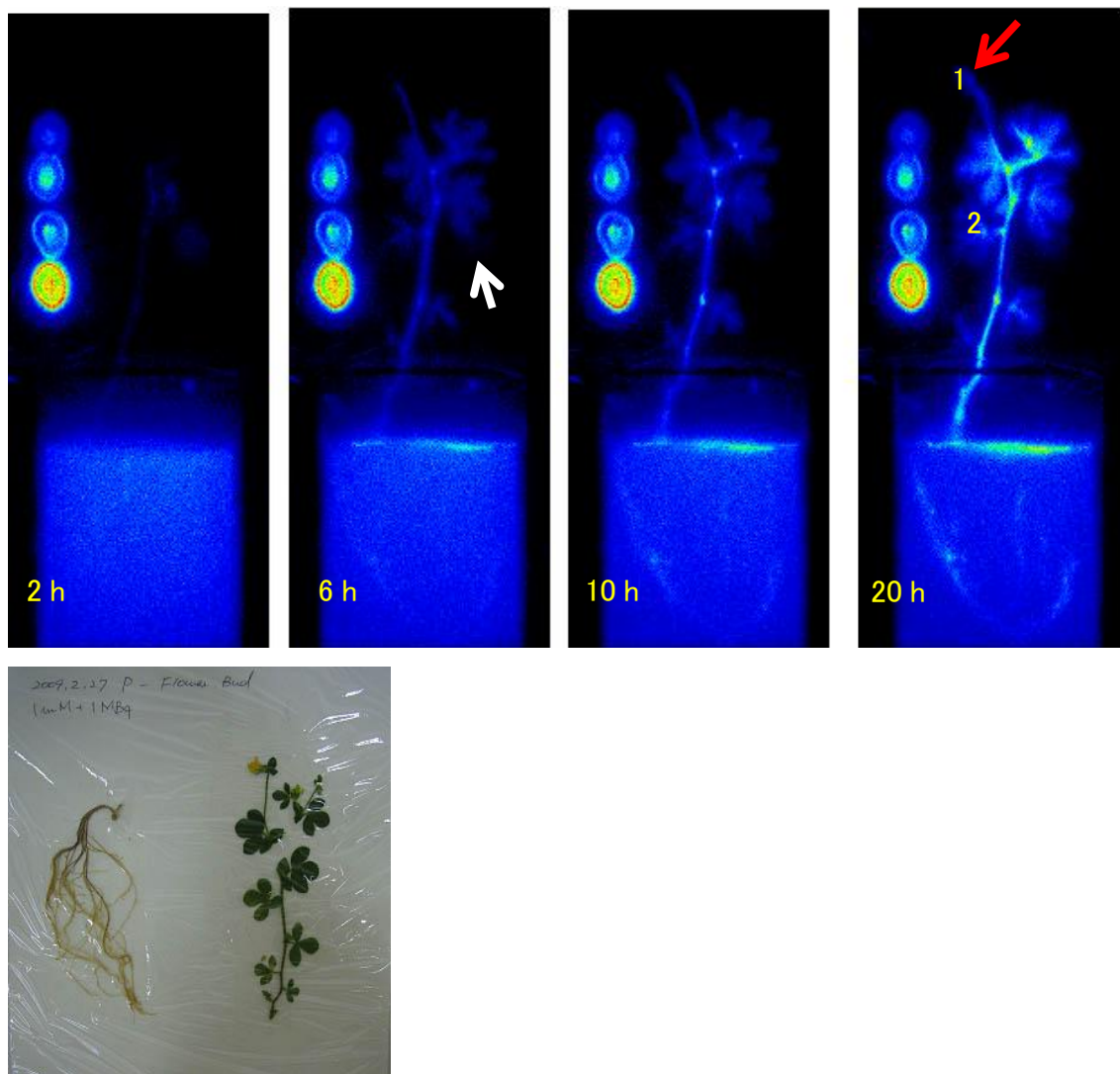


Figure3-15 リン酸欠乏ストレスサンプル（花芽期）の $^{32}\text{P}$ 動態解析  
 40ml\_Hoagland 水耕液に $^{32}\text{P}$ を1MBq/混合し、根から与えた。  
 積算時間3分間で20時間撮像した。  
 葉へ $^{32}\text{P}$ が集積していた（白矢印）。  
 1時間後には地上部に達する様子が観察された（赤矢印）。

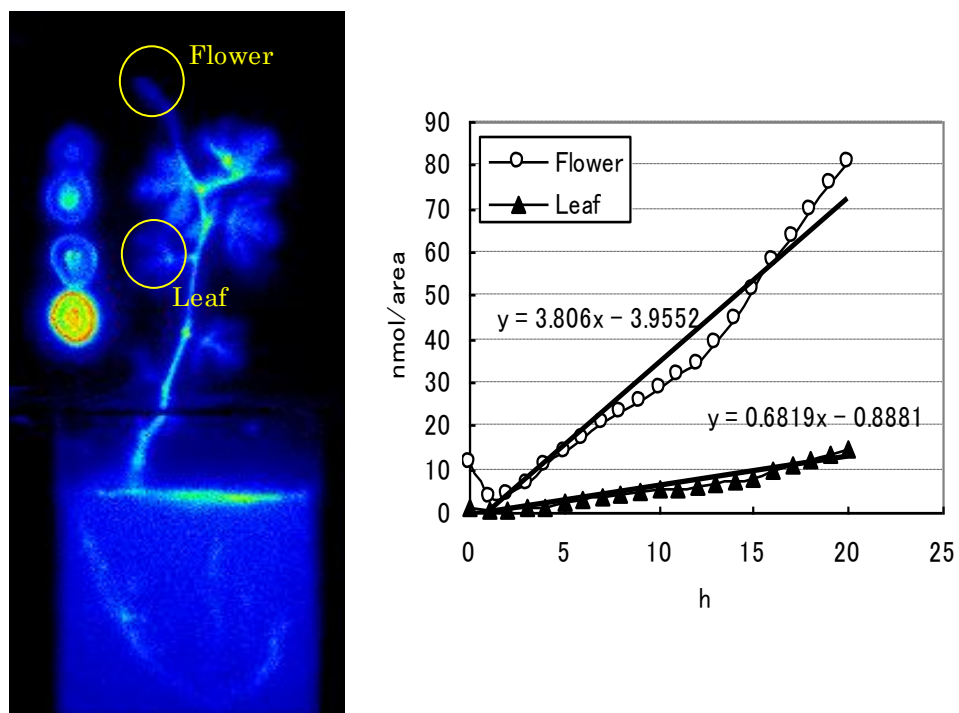


Figure3-16 ストレスサンプルの $^{32}\text{P}$ 動態解析  
 (a)単位時間あたりの地上部への $^{32}\text{P}$ 移行量変化のグラフ。  
 (b)葉の $^{32}\text{P}$ 移行量変化のグラフ。  
 グラフの傾きから $^{32}\text{P}$ 移行速度を求めた。

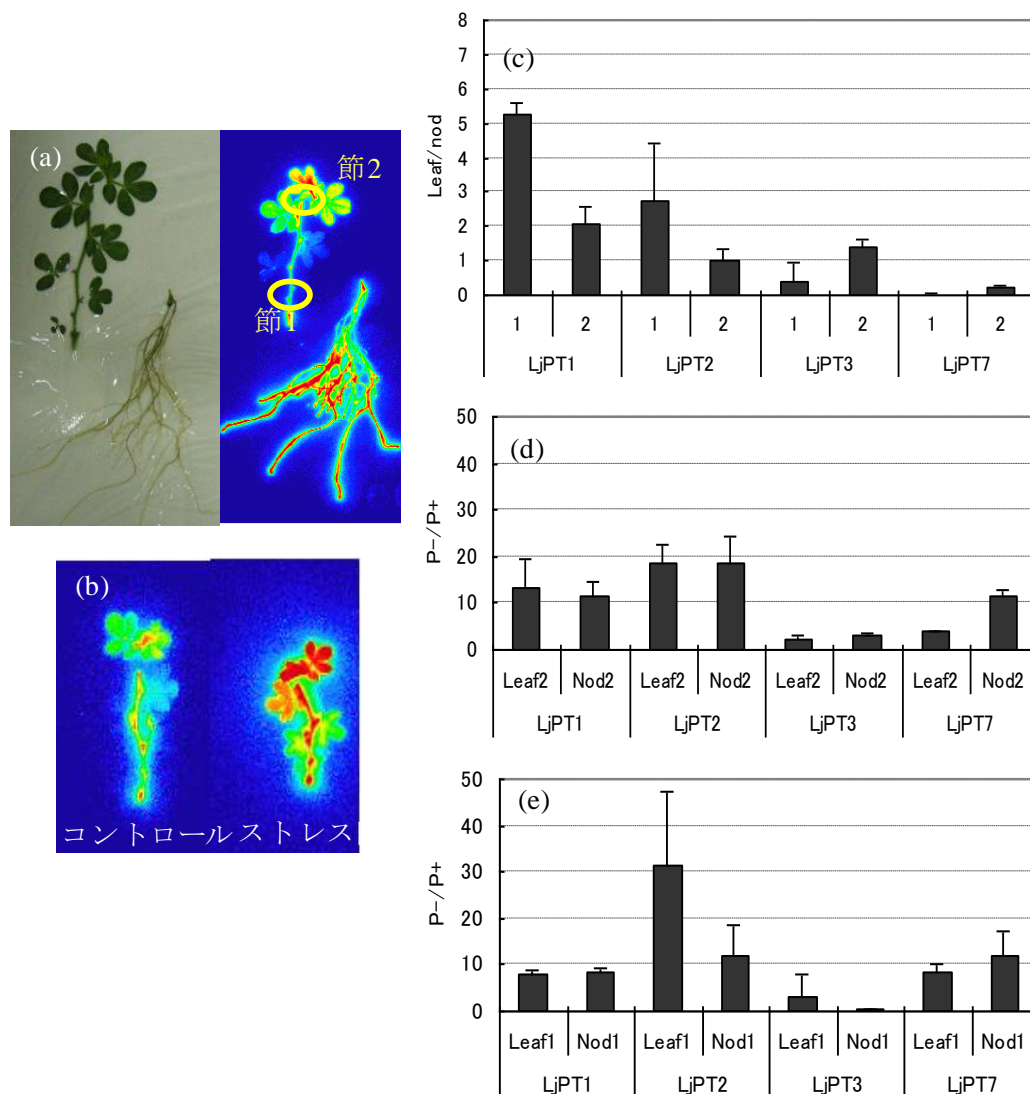


Figure3-17 リン酸トランスポーターの茎での発現解析

(a)コントロール区サンプルの $^{32}\text{P}$ の分布と解析した節の位置。

(b)コントロール区とストレス区での $^{32}\text{P}$ 分配の違い。

(c)リアルタイムPCRによる発現解析結果。コントロール区の葉と茎での発現量の比較

(d)節2でのストレス処理によるトランスポーター遺伝子の発現変化。

(e)節1でのストレス処理によるトランスポーター遺伝子の発現変化

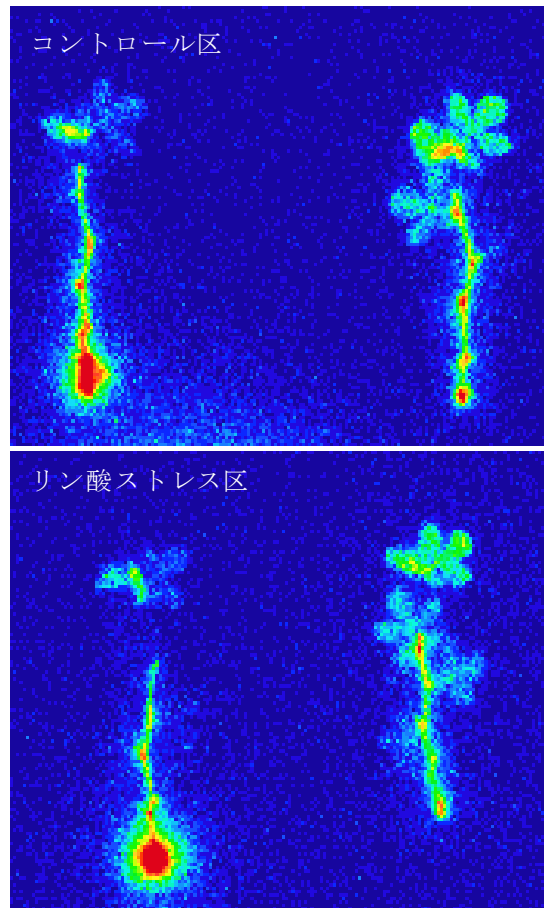


Figure3-18 茎から吸収させた $^{32}\text{P}$ の分配  
 導管内の濃度を一定にするため、根を切断して $^{32}\text{P}$ トレーサ実験を行った。  
 20時間の吸収後、Imaging Plateにより検出したイメージ。  
 リン酸 $1\mu\text{M}$ 水耕液（左）リン酸 $1000\mu\text{M}$ 水耕液（右）

## 第4章 形質転換体の作出とイメージング解析

### 4-1. 緒言

シロイヌナズナでは、リン酸輸送が野生型株とは異なるユニークな変異体に *pho1* と *pho2* が知られている。*pho1* は、根からのリン酸吸収は正常だが、地上部への移行に異常を示し地上部のリン酸濃度が極端に少なくなる変異体であり(Poirier *et al.*, 1991)、一方の *pho2* は地上部に過剰のリン酸を蓄積する表現型、すなわち *pho1* と正反対の特性を持つ変異体であった。これらのリン酸輸送に係る遺伝子は、ともに輸送体遺伝子ではなかった。近年の研究で、PHO2 は、リン酸トランスポータ(*Pht1;8* と *Pht1;9*)を制御する因子であることが報告されている。リン酸輸送制御機構を調べるには、*pho1* と *pho2* のようなリン酸の蓄積に異常を示すような変異体を解析することも有効であるが、個々の輸送体遺伝子の機能を欠損および抑制させた変異体を解析すれば、各々の遺伝子の機能を知ることができる。シロイヌナズナの 9 つのリン酸トランスポータ遺伝子のうち、*Pht1;1*、*Pht1;4* は、変異体を用いた解析により植物個体のリン酸の取り込みや輸送への寄与についての研究報告がある。*Pht1;4* の機能が欠損した T-DNA 挿入変異株の解析では、低リン酸培地(5  $\mu$ M)でのリン酸吸収が野生株より 40%減少していた(Misson *et al.*, 2004)。さらに、*Pht1;1*、*Pht1;4* の両方の機能を欠損させた場合には、低リン酸培地(2  $\mu$ M)でのリン酸吸収が野生株より約 60%減少していた(Shin *et al.*, 2004)。このうち、*Pht1;4* では、 $^{33}\text{P}$  を用いたトレーサ実験が行われていた。すなわち  $^{33}\text{P}$  ラベルのリン酸を水耕液に 10 分間投与し、その後画像化したものであった。その画像データからは吸収速度の違いが見られなかった。ある特定の吸収時間では、たとえ違いが生じていたとしても検出できていない測定点である可能性も高いと思われた。このような時に本研究で開発したイメージングシステムによる解析を行えば、培地からの取り込み速度や地上部の移行速度についての表現型を検出できる可能性が上がると思われる。

本節では、ミヤコグサのリン酸トランスポータ遺伝子によるリン酸輸送への寄与を解析するために、リン酸トランスポータ遺伝子をノックダウンした変異体での  $^{32}\text{P}$  動態解析を行った。

第3章までの解析結果から、リン酸トランスポータ遺伝子の *LjPT1* はリン酸欠乏誘導性が他の遺伝子よりも高かった。また、*LjPT2*、*LjPT3* は、根や葉で通常発現し、かつリン酸欠乏誘導性も持つことが分かった。これらの遺伝子は、ミヤコグサのリン酸輸送において寄与率が高い重要な遺伝子であると考えられたことから、それぞれの遺伝子の変異体を解析し、それぞれの機能を調べることにした。

ミヤコグサでは、シロイヌナズナの T-DNA ラインのようなリソースは整備されていなかったため、RNAi により遺伝子発現を抑制した形質転換体を作成することにした。作成に成功した *ljpt1* と *ljpt3* での  $^{32}\text{P}$  動態解析結果を示した。

## 4-2. 実験方法

### (1)RNAi 形質転換体の作出

#### (1)-1.コンストラクトの作成

LjPT1、LjPT2、LjPT3 についてそれぞれの遺伝子特異的な 3' 領域(80-200bpORF 領域も含む)について以下のプライマーを設計し、PCR 反応によりアダプター配列を結合させた。BP 反応により pDONR221(Invitrogen)に導入した後、LR 反応により pk7GWIWG2( II )(pCAMBIA1300(pUB-GWseries)) (Materials Distribution Administrator CAMBIA より分譲を受けた)へ導入した。

試薬

- ・ pfx50 DNA polymerase(Invitrogen)
- ・ primer(Invitrogen)
- ・ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- ・ BP clonase II
- ・ LR clonase II

## BP 反応

### 1 回目の PCR

LjPT1\_ForwardPrimer :AAAAAGCAGGCTGAGTAAAGATCCTGCTAAGACTG

LjPT1\_Reverse Primer :AGAAAGCTGGGTGCCAAACTTGATAAAGAACAAC

LjPT2\_ForwardPrimer: AAAAAAGCAGGCTACAAGGACAAGAGCAAAGC

LjPT2\_Reverse Primer:AGAAAGCTGGGTTCCTCAACACTCGTAGTTC

LjPT3\_ForwardPrimer:AAAAAGCAGGCTCGTTGGAGGAGTTGAGT

LjPT3\_Reverse Primer:AGAAAGCTGGGTCTCGAGTTCGAGTCTTG

### 1 回目の PCR

#### 反応液組成

Buffer	5μl
2.5mM dNTP	6μl
ForwardPrimer(10pmol/ul)	1μl
Reverse Primer (10pmol/ul)	1μl
Template (cDNA)	1μl
Pfx50(5u/ul)	1μl
Fill up to50μl	

#### サーマルサイクラー条件

95°C	2min	} × 10
94°C	15sec	
50°C	30sec	
68°C	1.5min	

以上の反応液の 10μl を次の反応の鋳型とし、3 回目の PCR 反応を行った。

attB1 adapter primer GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT

attB2 adapter primer GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

### 2 回目の PCR (アダプター配列の付加)

Buffer	5μl
2.5mM dNTP	6μl
attB1 adapter Primer(10pmol/μl)	4μl
attB2 adapter primer(10pmol/μl)	4μl
template	10μl
Pfx50(5u/μl)	1μl
Fill up to50μl	

サーマルサイクラー条件

95°C	1min	}	× 5
94°C	15sec		
45°C	30sec		
68°C	1.5min		
94°C	15sec	}	× 20
55°C	30sec		
68°C	1.5min		

電気泳動により増幅を確認した後、QIAGEN のキットによりゲルを切り出して精製し以下の BP 反応に用いた。

反応液組成

attB product(10ng~150ng)	3μl
Donor vector (150ng/μl)	1μl
TE buffer(pH8.0)	4μl
BP clonase	2μl
Fill up to10μl	

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

大腸菌 (*Escherichia coli*. DH5 α 株) ヘ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。

LR 反応

反応液組成

Destination vector (150ng)	1μl
Donor vector (150ng/μl)	2μl
TE buffer(pH8.0)	4μl
LR clonase	2μl
Fill up to10μl	

大腸菌 (*Escherichia coli*. DH5 α 株) ヘ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。また、2 つの attR サイトに存在する制



制限酵素サイトで制限酵素処理\*1を行い、インサートが正しく挿入された場合には切断されなくなることを利用してコンストラクトが正しく作成されていることをバンドパターンから確認した。

\*1 制限酵素処理

Buffer(A or H)	2μl
Plasmid	1μl
Sma I or Sal I	1μl
Fill up to 20μl	

37℃で 1.5 時間反応後、電気泳動によりバンドパターンを確認した。

**(1)-2.アグロバクテリウム (*A.tumefaciens* LBA4404 株) へのプラスミド導入**

1.*A.tumefaciens* LBA4404 株を YEP 培養液で 550nm での OD が 0.5 になるまで培養した。遠心分離後、上清を除いた菌体を CaCl に溶解したものをコンピテントセルとした。

2.プラスミド約 1μl 分と 100μl のコンピテントセルを混合し、液体窒素で凍結した後、37℃で 5min 静置して氷冷後 YEP 培養液で 28℃、1hour 培養した。

3.選抜のための抗生物質が入った寒天培地に撒き、コロニーPCR によりアグロバクテリウムへの目的のプラスミド導入を確認した。以下の方法でアグロバクテリウムからプラスミドを抽出し\*1、(1)-2.LR 反応と同様に制限酵素処理を行いバンドパターンからコンストラクトの確認を行った。

\*1 アグロバクテリウムからのプラスミド抽出方法

試薬

- GTE buffer      1M Glucose  
                         0.5M EDTA  
                         1M Tris-HCl(pH 8.0)
- 0.2N NaOH/1% SDS
- 5M KOAc

1. 目的のプラスミドの導入が確認されたコロニーを YEP 培地に抗生物質 (+Km+Spe) を添加した培地で 2 日間、28°C で培養を行った。
2. 培養液を遠心後、沈殿を GTE buffer に溶解し 0.2N/1% SDS を加えて混和した。
3. KAc 溶液を添加し混和し、遠心した。
4. 上清にフェノールクロロホルム抽出を行った。
5. 上清にエタノールを添加し氷冷後、遠心した。
6. 沈澱を 70% エタノールでリンスした後、蒸留水に溶解した。

### (1)-3. 植物への形質転換

#### 試薬

##### ・ YEP 培地

Bacto Yeast Extract	10g
Bacto Peptone	10g
NaCl	5g
Agar	15g
<hr/>	
	1L

##### ・ YMB 培地

マンニトール	2g
Bacto Yeast Extract	0.4g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2g
NaCl	0.1g
<hr/>	
	1L

\* 使用直前に 0.3M リン酸カリウムバッファー (pH 6.8) を加えた (1/100 量)

##### ・ 共存培養培地

B5 Basal Salts	0.33g
B5 vitamin stock	100μl
BAP	0.5μg/ml
NAA	0.05μg/ml
MES(pH 5.2)	5mM
アセトシリンゴン	20μg/ml
<hr/>	
	1L

#### 操作手順

1. 4～5ml の YMB に丸シャーレに培養したアグロバクテリウムを懸濁した。
2. ガラスシャーレに滅菌ろ紙を入れ、20～25ml の共存培養培地を加えた。
3. 別のガラスシャーレ中に置いた滅菌ろ紙にアグロバクテリウム懸濁液を加えた。
4. 幼植物の胚軸を子葉の直下と根の境目で切り 3.のろ紙上に並べた。
5. 10 本程度束ね、ピンセットで押さえながらメスで 3mm 程度に細切した。
6. 切片を 2.のろ紙上に並べた（シャーレあたり 150～200 切片）。
7. パラフィルムでシールし、21℃、暗条件下で 6 日間培養した。

#### (1)-3-1.カルス誘導

##### 試薬

・カルス培地・再分化培地

B5 Basal Salts	0.33g
Succharose	2%
B5 vitamin stock	1ml
BAP	0.5μg/ml
NAA	0.05μg/ml
Cefataxime	150μg/ml
Phytigel	0.3%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10mM
<hr/>	
1L(pH.5.5)	

\* カルス培地には G418 を 20μg /ml 添加した。

1. 共存培養培地から胚軸切片の載った一番上のろ紙だけをピンセットで取り上げ、カルス誘導培地の上に置いた。
  2. 23℃、17h Light/7h Dark で 5 日間培養した。
  3. 切片を一つずつ新しいカルス培地に植えついだ。
  4. 5 日ごとに新しい培地に植えつぎ 4～5 週間培養した。
- \* カルスが 1mm 以上になったら褐変した胚軸を取り除いた。

#### (1)-3-2.再分化

##### 試薬

・前項と同様の培地

1. カルスを再分化培地に植えついだ。
2. 5 日ごとに植えつぎ 3～7 週間培養した。

### (1)-3-3.シュート伸長

試薬

・シュート伸長培地

B5 Basal Salts	3.3g
Succharose	2%
B5 vitamin stock	1ml
BAP	0.2µg/ml
Cefataxime	150µg/ml
Phytigel	0.3%

---

1 L (pH 5.5)

1. シュート原基が形成されたカルスをシュート伸長培地に植えついだ。
2. 7 日間ごとに植えつぎ 3～6 週間培養した。

### (1)-3-4.発根誘導

試薬

・発根誘導培地

B5 Basal Salts	1.66g
Succharose	1%
B5 vitamin stock	0.5ml
NAA	0.5µg/ml
Phytigel	0.3%

---

1 L (pH. 5.5)

1. 1cm 程度に成長したシュートを基部で切り取った。
2. 発根誘導培地に浅く突き刺し 10 日間培養した。

### (1)-3-5.根伸長

試薬

・根伸長培地

B5 Basal Salts	1.66g
Succharose	1%
B5 vitamin stock	0.5ml
Phytigel	0.3%

---

1 L (pH. 5.5)

1. 根伸長培地プラントボックスに植物を浅く突き刺し 2～3 週間培養した。

#### (1)-3-6.鉢あげ

1. 根が 1.5～2cm 程度伸びたら、根伸長培地から取り出し、プラントボックスにバーミキュライトをつめたものに移植した。
2. ふたをしたまま 2 週間培養した。
3. ふたをはずして 2～3 週間培養した。
4. シュートが 3～4cm になったら培養土に移植した。

#### (1)-3-7.導入遺伝子の確認

T1、T2、T3 植物からゲノム DNA を抽出し、PCR により遺伝子の導入を確認した。

##### (1)-3-7a.ゲノム抽出方法

試薬

Extraction buffer	
1M Tris(pH 7.5)	200mM
0.5M EDTA	25mM
5M NaCl	250M
10%SDS	0.5% (w/v)
<hr/>	
Fill up to50ml	

1. T1 植物の葉に抽出バッファーを 500ml 加えペッスルで粉碎した。
2. 室温で 30 分静置した。
3. 13000rpm、1 分間遠心した。
4. 上清にフェノールクロロホルムを添加し混合した。
5. 13000rpm、10 分間遠心した。
6. 上清と等量のイソプロパノールを加え混和した。
7. 15000rpm、15 分間遠心した。
8. 70%エタノールでリンス乾燥後、蒸留水に溶解した。

##### (1)-3-7b.PCR 反応

試薬

- ・ ExTaq (Takara)
- ・ primer (Invitrogen)

プロモーター35S 領域\_Forward primer: AGTGACAACGTCGAGCACAG

プロモーター35S 領域\_Reverse primer: GCGTTCAAAAGTCGCCTAAG

カナマイシン領域\_Forward primer: CGGCGAGTTCTGTAGATCC

カナマイシン領域\_Reverse primer: TGCTGACCCACAGATGGTTA

Ubiquitin(positivecontrol)Forwardprimer:ATGCAGATCTTCGTCAAGACCTTGAC

Ubiquitin(positivecontrol)Reverse primer: ACCTCCCCTCAGACGAAGGA

反応液組成	
10×buffer	2μl
dNTP	1.6μl
Forward Primer	1μl
Reverse primer	1μl
Template	1μl
ExTaq	0.16μl
<hr/>	
Fill up 10μl	

### (1)-3-7c.ホモ系統の選抜方法

ホモ系統の選抜は以下の方法で行った。

- 1.T1 植物で PCR により導入遺伝子の確認を行った。
- 2.T2 植物を育て、PCR でポジティブな約 8 系統から採取した。
- 3.T2 系統に由来する T3 植物を育て 18 個体すべてが PCR ポジティブである T2 系統をホモ系統とした。

## (2) 変異体の解析

### (2)-1.植物栽培方法

3-4-1(1)に準じた。リン酸濃度 500μM の 1/2Hoagland 水耕液で 20 日栽培したものをコントロール区とし、リン酸濃度 500μM の 1/2Hoagland 水耕液で 10 日栽培した後、10 日間無リン酸培地で栽培したものをストレス処理区とした。

### (2)-2.無機態リン酸の測定

3-4-1(2)に準じた。

### (2)-3.リアルタイム PCR による発現解析

2 章の方法に準じた。コントロール区およびストレス処理区の植物体の根、地上部を採取し、n=3 で mRNA の抽出を行った。

### (2)-4. <sup>32</sup>P 動態解析

第 1 章で開発したラジオアイソトープイメージングシステムにコントロール区とストレス処理区のサンプルを設置し、リン酸濃度 100μM に調整した 1/2Hoagland 水耕液 40ml に <sup>32</sup>P を 1MBq 添加したものを根に与えた。1 枚の画像を 3 分間の積算で取得し、20 時間撮影した。n=3 で行った。

### 4-3. 結果および考察

ミヤコグサの形質転換方法には、毛状根による形質転換系、およびカルスからの再分化を行うカルス形質転換系がある。毛状根は一過的な変異であり、変異を入れることができるのは根のみである。今回、さまざまな器官で発現するリン酸トランスポータ遺伝子をターゲットとしているため、カルス形質転換系により形質転換体の作出を行った。

アグロバクテリウムを感染させた胚軸から、個体まで再生し、変異の導入を確認できた T1 世代は、*ljpt1* は 33、*ljpt2* は 35、*ljpt3* は 40 であった。T1 世代において、一部の個体ではリン酸欠乏症状の一つであるアントシアニンの蓄積が茎や葉で観察された(Fig.4-1-h)。また、*ljpt3* では、開花後に結実しないラインが見られた。(Fig.4-1-i)。 *ljpt1*、*ljpt3* の子実は、野生株よりも小さいものが多く見られた(Fig.4-1-j-k)。 *ljpt1* では、根の側根が発達した個体も見られた(Fig.4-1-l)。

T2、T3 世代の選抜が終了したものうち、遺伝子発現の抑制を確認することができた *ljpt1-5*、*ljpt3-1* を用いて、リン酸濃度の測定、<sup>32</sup>P 動態解析を行った。

これらの変異体は、第 3 章と同様にコントロール区、ストレス区（10 日間）で栽培しリン酸欠乏ストレス時の遺伝子発現量、リン酸濃度を調べ、その後イメージングシステムで <sup>32</sup>P-リン酸の動態解析を行った。

#### *ljpt1-5* の解析

*ljpt1-5* のさやは野生型株に比較して 60%程度の大きさのものが多く見られた。第 2 章で行った *in situ Hybridization* では、*LjPT1* は花における将来の鞘や種子になる組織での発現および、さやと種子での発現が確認されており、RNAi による抑制の結果として鞘の発達が進まなかったためであると思われる。

*ljpt1-5* を通常リン酸濃度で生育した場合、野生型株に比較し、*LjPT1* 遺伝子の発

現が 1/7 に抑制されていた(Fig.4-2d)。リン酸濃度は、野生型株と比較した場合に、根では 1/5、葉では 1/4-1/8 に減少した(Fig.4-2bc)。リン酸ストレス処理を施した *ljpt1-5* では、コントロール区と比べ根のリン酸濃度が約 1/3 に減少したが、葉のリン酸濃度はコントロール区とほぼ同等であり、リン酸欠乏ストレスによる濃度の減少が見られなかった(Fig.4-2bc)。また、*ljpt1-5* のコントロール区のリン酸濃度は野生株のリン酸濃度の 1/3 ほどに低下していた(Fig.4-2d)。

*ljpt1-5* のイメージング解析において、地上部への  $^{32}\text{P}$  移行が確認されたのは、ストレス区サンプルは 1 時間目、コントロール区のサンプルでは 2 時間目であった(Fig. 4-5)。ストレス区のサンプルのリン酸吸収移行はコントロール区に比べて地上部への移行が 1.8-5.2 倍、新芽への移行が 1.9-8.3 倍、成熟葉への移行が 1.6-6.3 倍であった(Table 4-1)。

以上の結果から、*ljpt1-5* はリン酸欠乏時のリン酸吸収移行速度が野生型株ほどに上昇していないと言える。Table4-1 に示されているように、地上部全体へのリン酸輸送について、ストレス栽培区のリン酸移行速度は野生型株とほぼ同様であり、コントロール区サンプルのリン酸の移行速度が野生型株に比べて上昇していた。コントロール区で栽培した *ljpt1-5* は、リン酸濃度が野生株の 1/3 程度であった。これらをふまえると、*ljpt1-5* は、通常どおりのリン酸水耕液での生育中でも、リン酸欠乏状態であることが示唆された。すなわち、*ljpt1-5* の発現を抑えたことにより、培地からのリン酸吸収が減少し、常にリン酸欠乏状態になったと考えられる。

以上の解析結果では、注意が必要である。発現量解析の結果に注目すると、*LjPT2* も発現抑制が生じており(Fig. 4-2)、培地からのリン酸吸収が減少した背景には *LjPT2* の抑制による影響の可能性もある。*LjPT1* の RNAi に用いた配列には、3' 領域側の ORF を含んでいるが、その配列のうちの一部分が *LjPT2* にも作用した可能性が否定できない。



### *ljpt3-1* の解析

*ljpt3-1* を通常リン酸濃度で生育した場合、野生型株に比較し遺伝子発現が 1/4 に抑制されていた(Fig.4-3d)。*ljpt5-3* で見られたのと同様に、ターゲットである LjPT3 以外の LjPT1 の発現量も 7 割程度に減少していた。*LjPT3* の RNAi に用いた配列にも、3' 領域側の ORF を含んでおり、*LjPT1* にも作用した可能性がある。コントロール栽培区における根および葉のリン酸濃度は、根では野生型株の 1/4、葉では 1/4-1/6 に減少していた(Fig. 4-3bc)。リン酸ストレスを施した場合の *ljpt3-1* は、根のリン酸濃度が約 1/5 に減少し、他の器官でのリン酸濃度は約 1/3 に減少していたが、新葉の濃度は他の葉に比較して高く保たれていた。

*Ljpt3-1* のイメージング解析において、地上部への  $^{32}\text{P}$  移行が確認されたのは、ストレス区サンプルは 1 時間目、コントロール区のサンプルでは 4 時間目であった(Fig.4-6)。コントロール区とストレス区のサンプルのリン酸吸収移行の違いは、地上部への移行が 5.2-6.4 倍、新芽への移行が 5.1-6.4 倍、成熟葉への移行が 5.1-8.5 倍であった(Fig.4-1)。

*ljpt3-1* は、組織内のリン酸濃度が野生型株に比較して低く(Fig.4-3)、リン酸が潤沢な培地からのリン酸の吸収に寄与しているものと思われた。ストレス処理を施した場合では、新葉以外の組織でのリン酸濃度減少が著しく、このような傾向は野生型株のリン酸欠乏時の応答と類似していた(Fig.4-3b)。また、 $^{32}\text{P}$  イメージング解析では、ストレス時のリン酸移行速度が野生株と同様に上昇しており、リン酸ストレス時のリン酸吸収における *LjPT3* の寄与は *LjPT1* よりも低いと考えられた。

*LjPT3* の発現抑制では、吸収移行速度および様式は野生株に類似していた。今回の手法では遺伝子機能を完全に抑えられるものではないため、わずかに発現する遺伝子で十分に機能が果たせる場合もある。また、リン酸トランスポータ遺伝子は、例えば、根においても異なる遺伝子が複数発現しており、個々の特性はあるが、機能を相補しあう可能性もある。他のリン酸トランスポータ遺伝子を複数抑制した上

で、*LjPT3*をノックダウンするような実験系を組む必要がある。

—リン酸輸送体の複数欠損変異体（シロイヌナズナでの試行）

複数のリン酸輸送体をノックダウンする実験系の例として、シロイヌナズナの変異体を入手し当システムでイメージングを試みた。

シロイヌナズナを用いてリン酸応答機構を研究されている CEA の Nussaume 博士から、複数のリン酸トランスポータ遺伝子の機能が抑制された変異体(*phf mutant*)の種子を提供して頂き、 $^{32}\text{P}$  動態解析を行うことができた。画像解析を試みたところ、根の取り込み、地上部への移行速度が野生株に比べて減少している様子を観察することができた。野生株と比較して時間当たりの  $^{32}\text{P}$  吸収移行は約 10 倍も異なっていた(Fig.4-7)。この変異体による  $^{32}\text{P}$  の取り込みは、吸収開始から 1 時間後では十分な取り込みもなく、違いを検出するのは難しい。連続して動態解析することにより変異体の特徴をより際立たせて解析できることをシロイヌナズナにおいて示すことができた。今後、ミヤコグサ形質転換体の他のラインでの同様の実験を続けるとともに、複数の遺伝子を抑制した個体の作出および画像解析を行っていきたいと考えている。

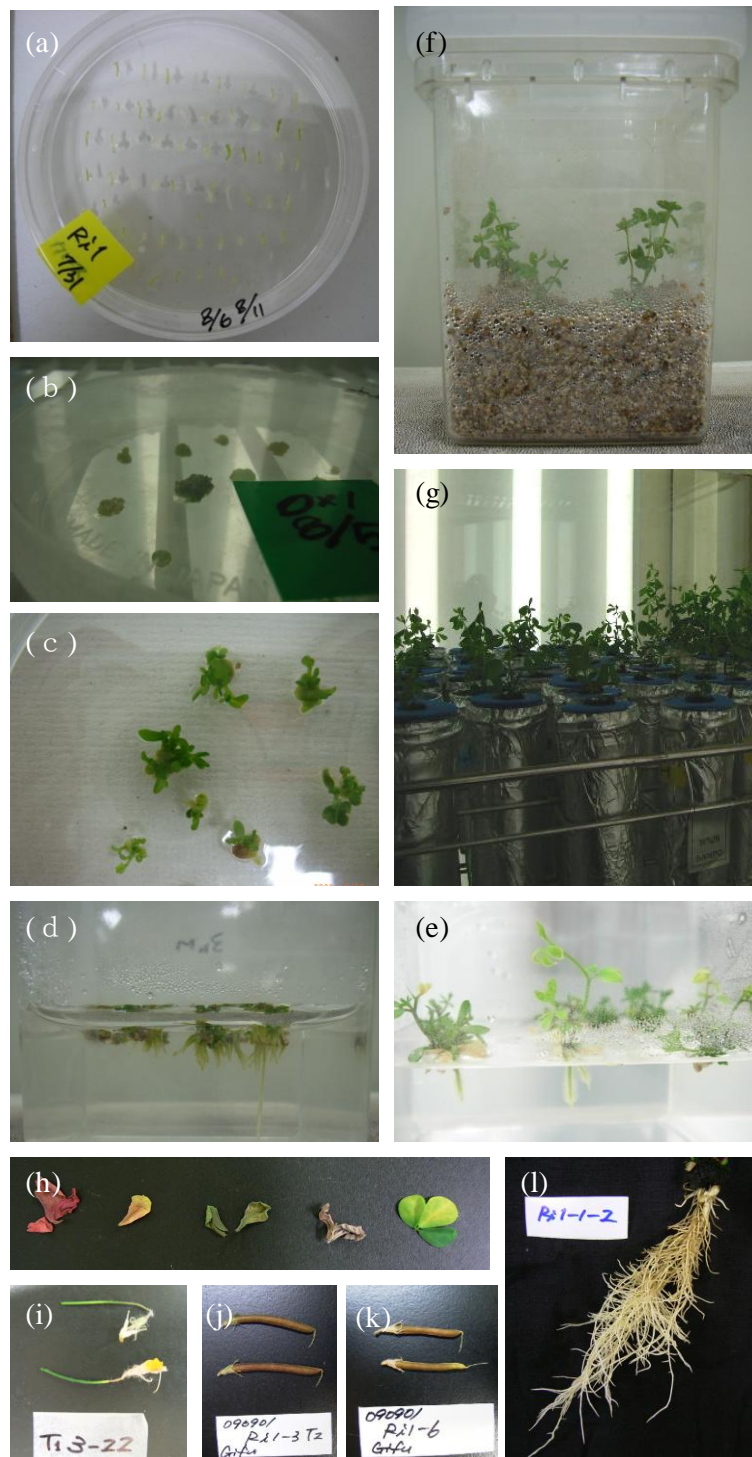


Figure 4-1 形質転換体作出過程

(a)アグロバクテリウムが感染した胚軸(b)カルス(c)Shoot再生(d)Root伸長(e)再生  
(f)鉢上げ(g)水耕栽培の様子(h)アントシアニンが蓄積した枯葉(i)T1で結実しな  
かった花(j)-(k)野生株より小さい種子(l)側根が発達した根

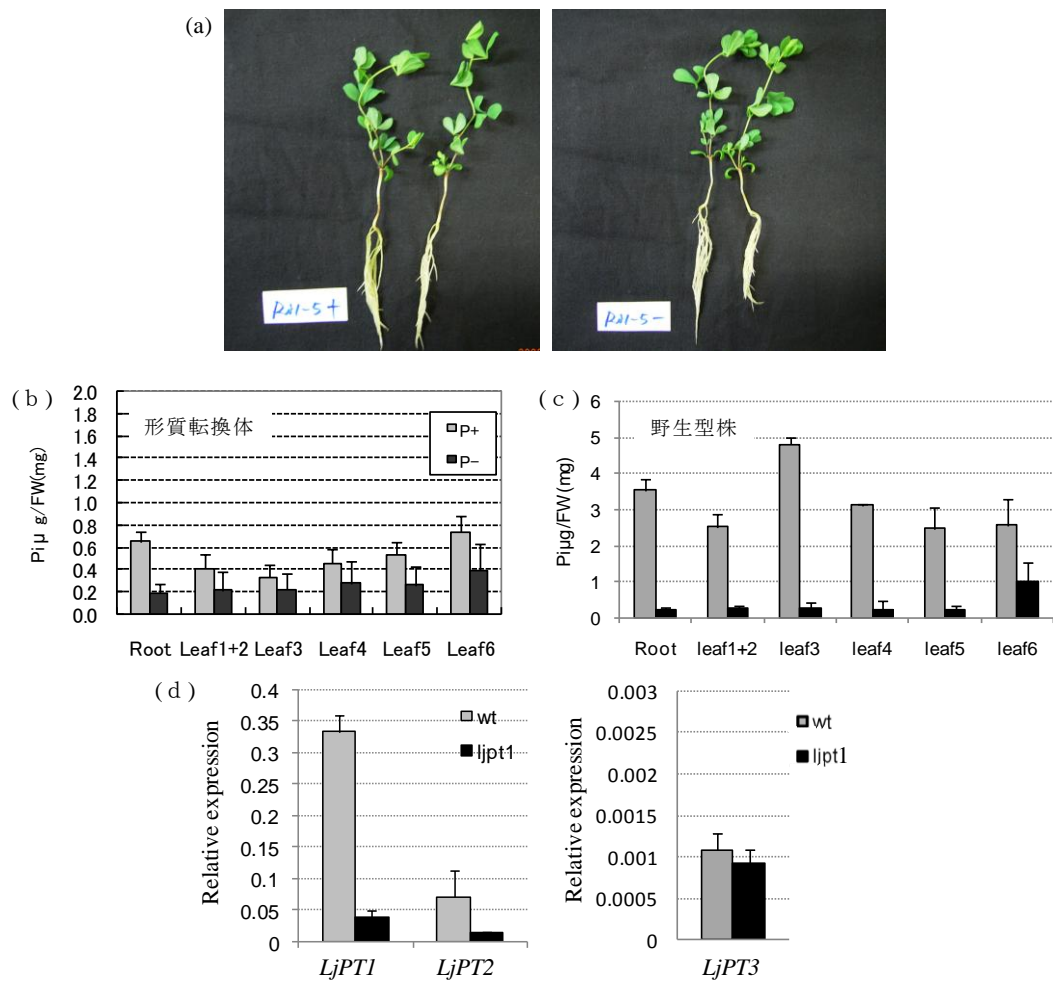


Figure 4-2 *lpt1-5*の表現型、リン酸濃度および遺伝子発現解析

(a)リン酸欠乏ストレス処理を施した*lpt1-5*（ストレス栽培区）（左）。

通常リン濃度（コントロール栽培区）で栽培した*lpt1-5*（右）。

(b)形質転換体の根、葉のリン酸濃度。野生型株に比べてコントロール区とストレス区での差が小さかった。(c)野生型株の根、葉のリン酸濃度。(d)コントロール栽培区における形質転換体と野生型株(wt)のリン酸トランスポータ遺伝子発現量。

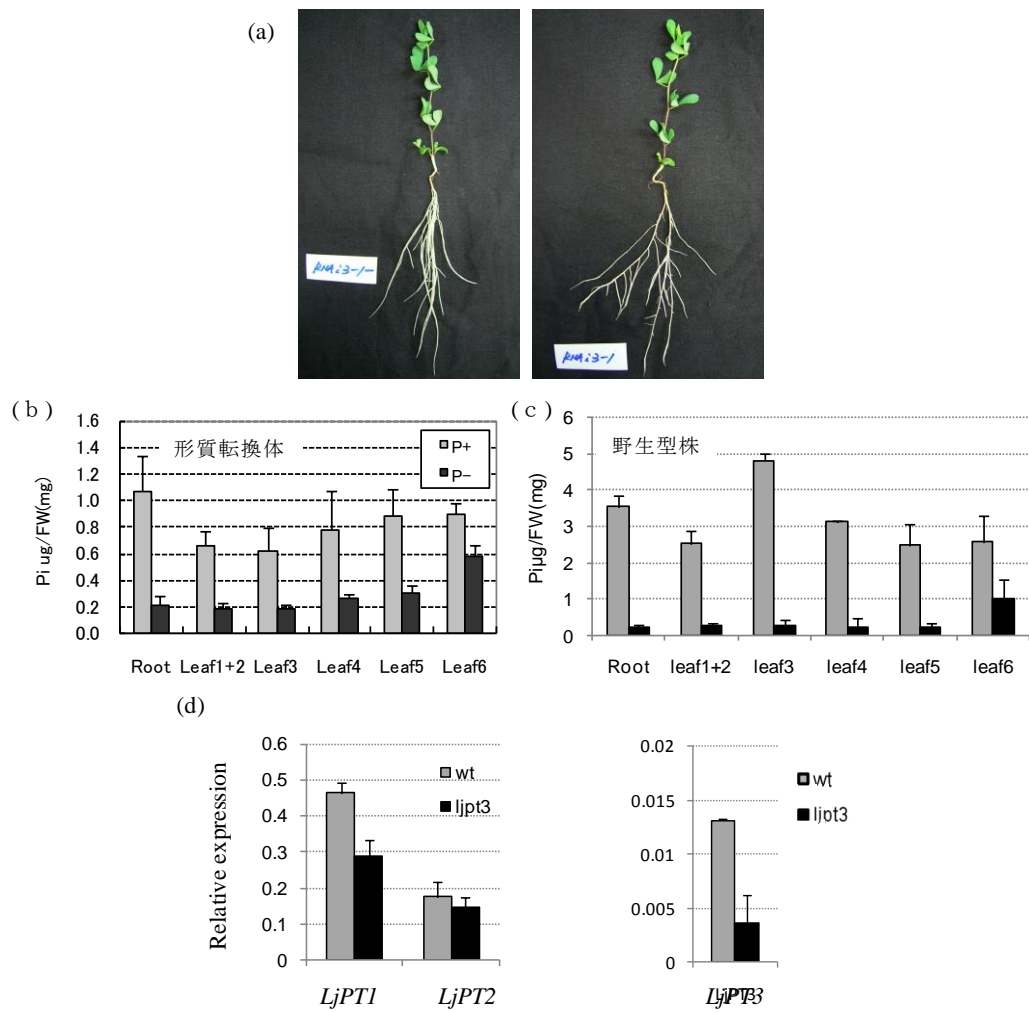


Figure.4-3 *lpt3-1*変異体表現型、リン酸濃度および遺伝子発現解析  
 (a)リン酸欠乏ストレス処理を施した*lpt3-1* (ストレス栽培区) (左)  
 通常リン濃度 (コントロール栽培区) で栽培した*lpt3-1* (右)  
 (b)形質転換体の根、葉のリン酸濃度(c) 野生型株の根、葉のリン酸濃度。  
 (d)コントロール栽培区における形質転換体と野生型株(wt)のリン酸トランスポータ遺伝子発現量。

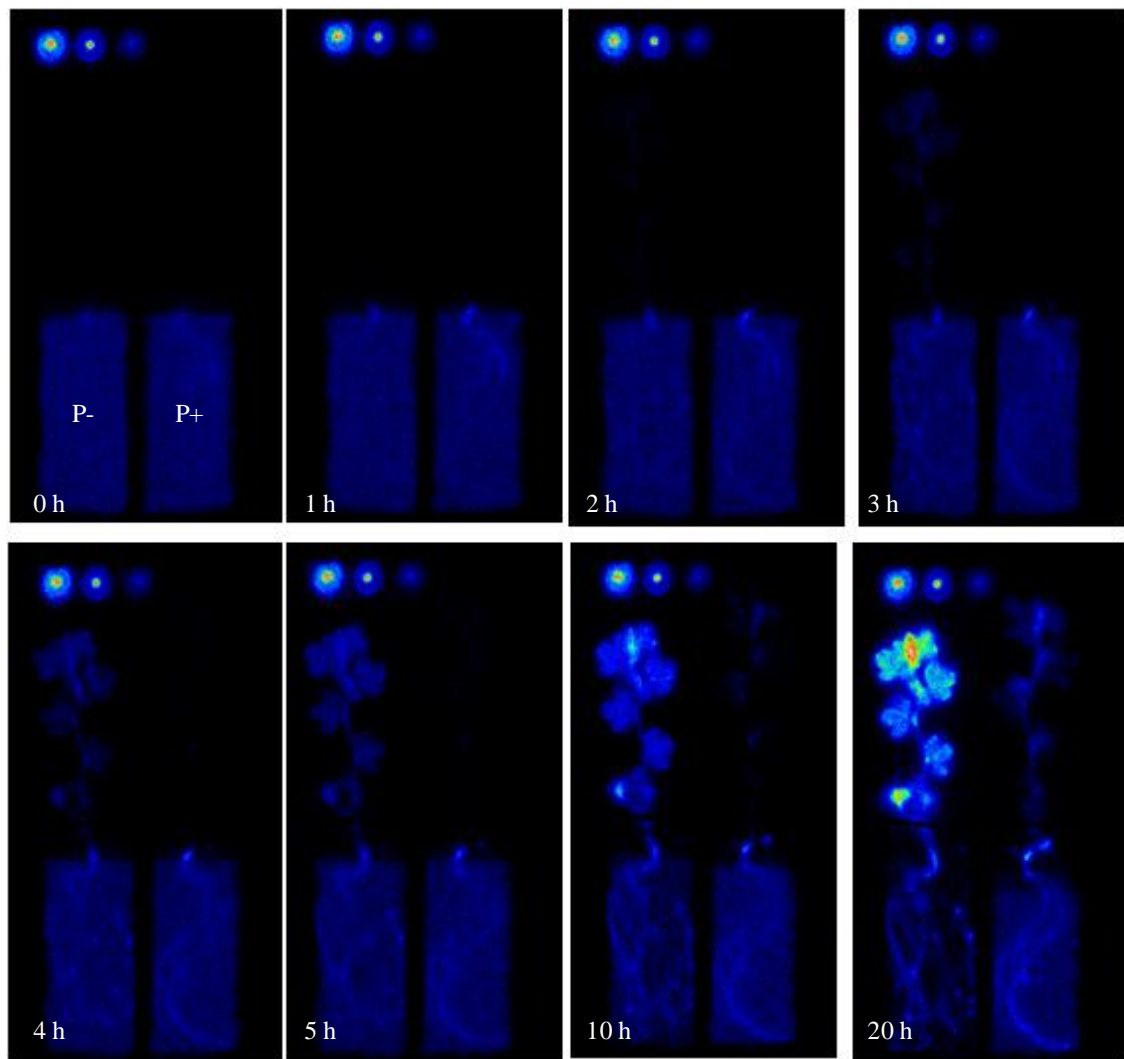


Figure4-4 ミヤコグサ野生型株 $^{32}\text{P}$ 動態解析

Hoagland水耕液20mlに $^{32}\text{P}$  500kBqを混合し根に与え、3分積算時間で20時間撮像した。

リン酸欠乏ストレス栽培区（左）、コントロール栽培区（右）。

ストレス栽培区の $^{32}\text{P}$ の移行（nmol/h）は、コントロール栽培区と比較し地上部への移行は約6.1-7.1倍、新芽への移行は約6.5-7.6倍、成熟葉への移行は約9.4-18倍に増加した。

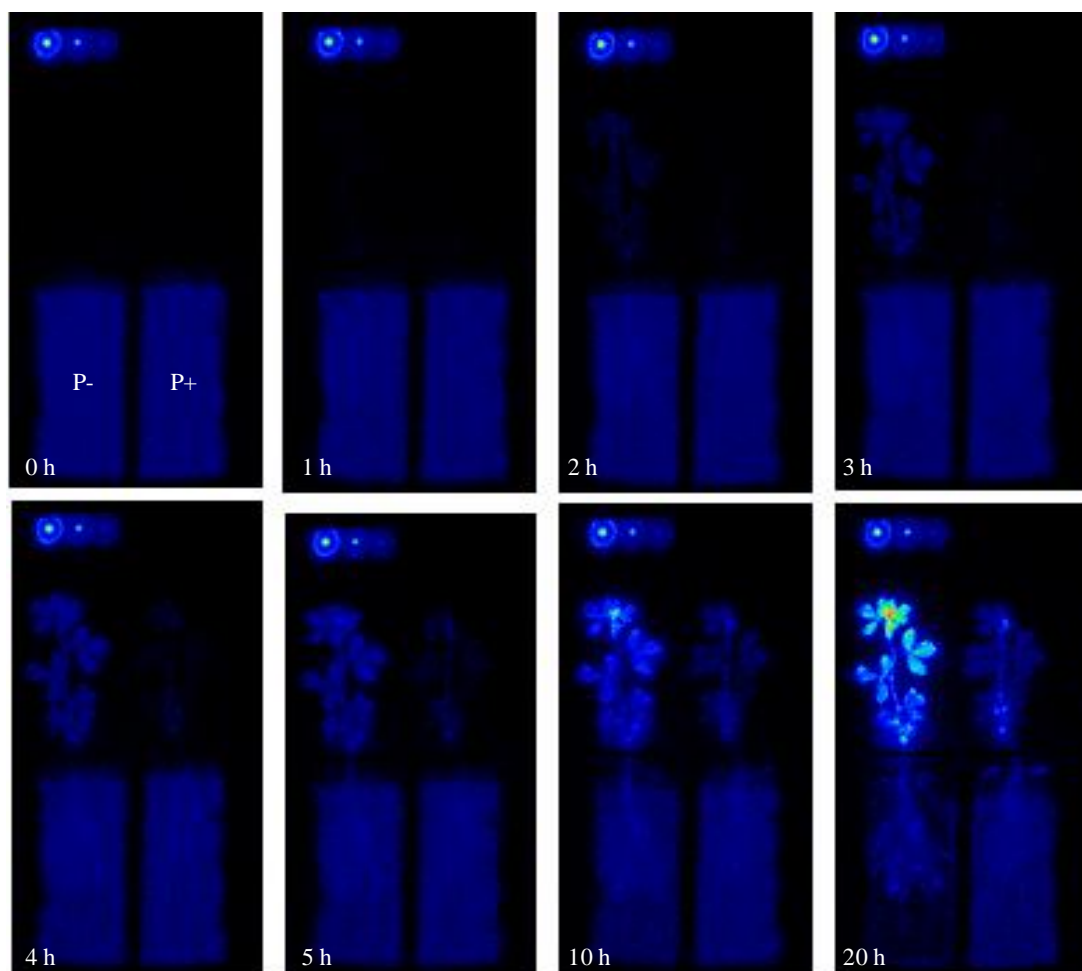


Figure.4-5 *ljpt1-1*変異体の<sup>32</sup>P動態解析

Hoagland水耕液20mlに<sup>32</sup>P 500kBqを混合し根に与え、3分積算時間で20時間撮像した。

リン酸欠乏ストレス栽培区（左）、コントロール栽培区（右）。

ストレス区の<sup>32</sup>Pの移行（nmol/h）は、コントロール区と比較し地上部への移行は約1.8-5.2倍、新芽への移行は約1.9-8.3倍、成熟葉への移行は約1.6-6.3倍に増加した。

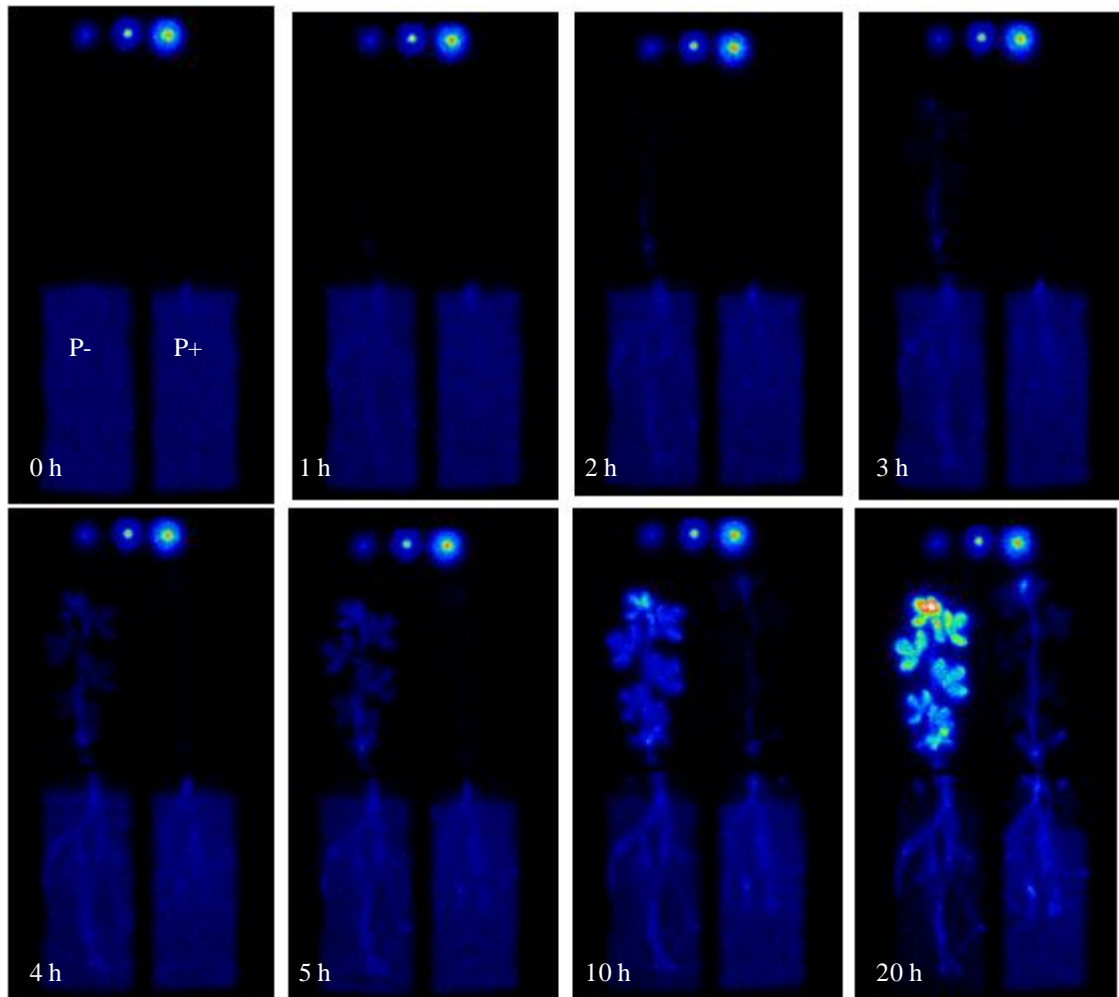


Figure4-6 *ljpt3-1*変異体の<sup>32</sup>P動態解析

Hoagland水耕液20mlに<sup>32</sup>P 500kBqを混合し根に与え、3分積算時間で20時間撮像した。

リン酸欠乏ストレス栽培区（左）、コントロール区栽培区（右）。

ストレス区<sup>32</sup>Pの移行速度（nmol/h）は、コントロール区と比較し地上部への移行は約5.2-6.4倍、新芽への移行は約5.1-8.5倍、成熟葉への移行は約7.9-22倍に増加した。



Table4-1  $^{32}\text{P}$ 移行速度の比較

通常リン濃度で栽培したサンプル（コントロール区）とリン酸欠乏ストレス処理を施したサンプル（ストレス栽培区）の $^{32}\text{P}$ の移行速度（nmol/h）。  
n=3で行った平均値と標準偏差を示した。

(a)地上部全体

	コントロール栽培区			ストレス栽培区		
野生株	15.5	±	11.2	43.0	±	0.2
<i>ljpt1-5</i>	23.3	±	12.8	42.2	±	9.7
<i>ljpt3-1</i>	13.2	±	4.9	61.2	±	12.8

(b)新葉

	コントロール栽培区			ストレス栽培区		
野生株	2.9	±	2.0	8.2	±	1.0
<i>ljpt1-5</i>	3.8	±	2.1	8.7	±	3.3
<i>ljpt3-1</i>	1.9	±	0.1	9.5	±	0.8

(c)成熟葉

	コントロール栽培区			ストレス栽培区		
野生株	1.7	±	1.3	8.8	±	3.2
<i>ljpt1-5</i>	3.3	±	2.0	5.7	±	1.0
<i>ljpt3-1</i>	1.5	±	1.2	12.5	±	6.9

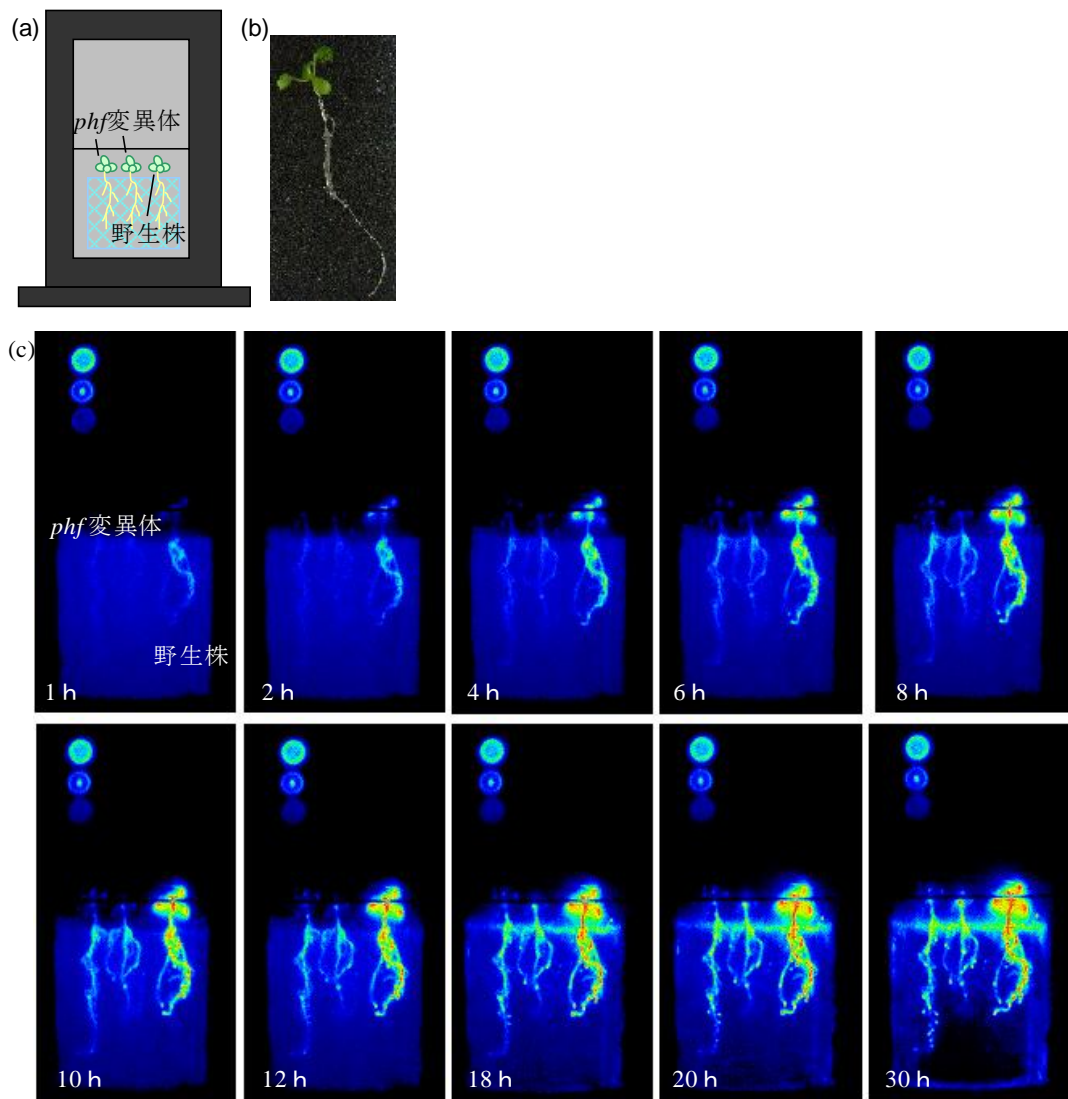


Figure4-7 シロイヌナズナでの $^{32}\text{P}$ イメージング

(a)植物セットの模式図。(b)撮影に用いたシロイヌナズナの野生株

(c)リン酸トランスポーターファミリー遺伝子の変異株（左）野生株（右）MS培地（水耕）で15日間栽培したサンプル。

0.5×MS培地30mlに $^{32}\text{P}$  500kBqを混合し根に与えた。3分積算時間で30時間撮像した。

リン酸トランスポーター遺伝子を欠損した変異体の $^{32}\text{P}$ 吸収移行が野生株よりも遅い様子が観察された。

## 総合考察

本研究は、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」、「開発したシステムによる植物体内のリン酸動態解析」「リン酸輸送制御を担うリン酸トランスポーター遺伝子の解析」について行い以下の結果を得ることができた。

### 物質動態解析システムの開発

第1章第1節では、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利用できる汎用性の高い核種を対象にできる。の三点を備えたシステムの構築を目指した。放射線（ベータ線）をシンチレーションにより光へと変換し、その光を高感度に検出する方法に基づいたシステムの構築を試みた。本システムは、一枚の画像を短時間で取得することにすぐれており、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解析に成功することができた。第2節では、1) グロースチャンバーと同様の光環境下において撮像できる、2) 植物の地下部と地上部を同時に撮像できる、の二点についてシステムの改良を行った。アルミニウムで作成した箱内に LED 光源と植物を設置し、その箱を CCD カメラが設置された暗箱に入れることにより、明条件下での撮像が可能となった。さらに、根と地上部で同時に  $^{32}\text{P}$  動態解析できる環境を整えることができた。

分子生物学的手法による植物の解析に比べ、無機元素そのものの動態解析に関する近年の研究報告は少ない。その背景には解析手法開発が分子生物学的手法ほどに行われていないことによると考えられた。物質の蓄積や分布は従来のトレーサ実験方法により行うことができるが、開発したシステムは、トレーサの移行様式および移行速度を解析できるという点で新たな解析ツールとなり得る。本システムにより

物質の移行様式、移行速度の解析手法を用いることで、変異体解析や核種ストレス時の応答解析においてこれまで見えてこなかった表現型が現れることが期待できる。

#### 開発したシステムのリン酸輸送制御機構の解析への応用

植物のリン酸輸送機構を調べるにあたり、まず、リン輸送を担うトランスポータの単利と機能解析を行った。第 2 章では、ミヤコグサのリン酸トランスポータ遺伝子 *LjPT4*、*LjPT6*、*LjPT7* を新たに単離し、トランスポータ遺伝子ファミリー (*LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3*、*LjPT4*、*LjPT6*、*LjPT7*) の発現器官を調べた。また、*LjPT2*、*LjPT7* については、酵母において輸送活性を確認することができた。リン酸トランスポータの発現制御には、体内リン酸濃度が非常に重要な因子であることから、3 章では、組織のリン酸濃度と遺伝子発現量に着目した。根、成熟葉、新葉では、ストレス処理下におけるリン酸濃度変化が対照的であったため、根、成熟葉、新葉での *LjPT1*、*LjPT2*、*LjPT3*、*LjPT7* の発現量をリン酸欠乏の各段階（ストレス後 4 日、7 日、10 日）で調べた。*LjPT1* は、すべての組織において組織の濃度減少に負の相関を持つように発現量の増加を示した。*LjPT2* は、4 日目の成熟葉、10 日目の新葉および根で発現が増加した。*LjPT3* は、10 日目の新葉で増加し、根においても若干の増加していた。*LjPT7* は 10 日目の新芽でのみ発現が増加した。根や成熟葉でのリン酸トランスポータ遺伝子の発現増加に比較し、新葉での応答がストレス処理の 10 日目で生じる背景には、ソースである成熟葉は無機リン酸が導管経由でしか供給されないが、シンクである新葉は、転流により無機リン酸・有機リン酸ともに供給されと考えられ、そのために総リン濃度が高く保たれる機構があるものと考えられた。以上より、根、成熟葉、新葉はリン酸欠乏ストレス時には異なったリン酸応答（輸送体遺伝子発現）を示すことが分かった。器官ごとのリン酸応答が異なることを考慮すると、例えば、これらのトランスポータ遺伝子の上流制御因子を解析しリン酸応答の分子機構を解析する際においても、器官を分けて解析する必要があるのではないかと思われた。

開発したシステムを用い、トランスポータ遺伝子発現が異なるストレス処理 10 日目のサンプル、のリン酸輸送の違いを解析した。本システムの特徴は、吸収速度を算出できることである。画像強度から、リン酸移行速度(mol/h)を算出した結果、新葉への移行速度はコントロールの約 3 倍に、成熟葉への移行速度はコントロールの約 9 倍にまで増加した。成熟葉では、*LjPT1* のみがリン酸欠乏ストレスで誘導があったこと、成熟葉での移行速度がリン酸ストレスで上昇したことから、*LjPT1* がリン酸の取り込みに対する寄与が高いことが考えられた。第 4 章では、個々のトランスポータの輸送への寄与を調べるため、RNAi により *LjPT1*、*LjPT3* それぞれの遺伝子発現を抑制した形質転換体を作成し、開発したシステムでの解析を行った。野生株に比較して *ljpt1-5* はリン酸欠乏時の地上部への移行速度は約 20%減少し、成熟葉への移行速度は約 40%減少していた。一方、*ljpt3-1* のリン酸欠乏時の移行量は野生株とほぼ同様の移行速度を示した。

第 4 章までの結果から、ミヤコグサのリン酸トランスポータ遺伝子について得られた知見およびそこから予想される機能を以下に示した。

*LjPT1* は、発現量が増加した成熟葉において、イメージングシステムによりリン酸移行を解析した結果、 $^{32}\text{P}$ -リン酸の移行量および速度が増加した。*in situ* ハイブリダイゼーションによると *LjPT1* は、成熟葉の導管周辺組織と葉肉細胞で発現しており、リン酸の取り込みに働くことが示された。ノックダウン個体は、組織のリン酸濃度が野生株よりも減少し、培地からのリン酸の取り込みにも働くことがわかった。また、花、子実の導管周辺細胞で発現していたこと、およびトレーサ実験からこれらの発現部位に  $^{32}\text{P}$  が蓄積していたことにより、導管により輸送されたリン酸の取り込みに働いていると考えられた。また、*LjPT1* は、発現部位、リン酸欠乏ストレス時の誘導およびミヤコグサのリン酸吸収に対する寄与率の高さから、シロイヌナズナのリン酸トランスポータ遺伝子 *Pht1;4* に機能が類似していると考えられた。

*LjPT2* は、根、葉、茎、花、子実解析した全組織で発現し、さらにリン酸欠乏ストレスにより発現が誘導される遺伝子であった。根の表皮細胞で発現しており、コントロールおよびリン酸欠乏ストレス時のリン酸の取り込みに機能すると考えられた。リン酸欠乏ストレス時に新葉において発現が増加しており、また、*in situ* ハイブリダイゼーションでは新葉の葉肉細胞で発現していたことから、*LjPT2* は新葉のリン酸の取り込みに働くことが示された。

*LjPT3* は、先行研究により菌根での機能が解析されていた遺伝子であったが、今回の解析により、葉、花、子実でも発現していたことが新たに示された。*in situ* ハイブリダイゼーションの結果から、根の表皮細胞で発現しリン酸吸収に働いていることが示された。*LjPT3* は、リン酸欠乏ストレス処理により、根、葉、茎でも発現量が増加するものの、リン酸欠乏処理下のノックダウン体でのイメージング解析では、リン酸の吸収移行が野生株と同等であり、リン酸欠乏ストレス時におけるリン酸輸送への寄与は *LjPT1* ほどに高くはないものと考えられた。

*LjPT4* は、他の植物とのアライメントの比較から、菌根特異的な遺伝子のクラスターに分類され、発現解析のからも菌根により誘導されていることが確認できた。リン酸ストレス処理時には菌根以外の組織（葉、子実）においてわずかながら発現することがわかった。

*LjPT6* は、他の植物とのアライメントの比較から、シロイヌナズナの花粉において発現する *Phl1:6* 遺伝子のクラスターに分類された。発現解析では開花前の花でのみ発現を示していた。

*LjPT7* は、*LjPT2* との相同性が高く、発現組織も *LjPT2* と同様において根、葉、茎、花、子実など解析した全組織で発現していた。*LjPT2* と比較して茎の特に節での発現が高い点が異なっていた。リン酸欠乏時には、根、葉、茎で発現が増加していたが、特に茎の節での発現量が増加するという特徴を示した。節は、維管束間での物質輸送が生じることがあり、*LjPT7* も同様の機能を持つ可能性が示された。

## 今後の展望

これまでの研究は、根から与えたリン酸が生体内をどのように移動していくかを経時的に観察したものだが、その移動には導管を介した蒸散流と篩管を介した転流の二つが存在する。導管では主に無機態のリンが、篩管では無機態に加えて有機態のリンも移動している。今後の研究は生理解析と分子生物学的解析を組み合わせることで、リン酸の植物体内動態のより詳細な解析を進めることを予定している。

また、イメージングシステムの改良においては、現在、顕微鏡搭載型のアイソトープイメージングシステムの開発を続けている。これにより、蛍光顕微鏡でのトランスポータ遺伝子の詳細な局在部位と生体内でのリン酸移行を同時に解析し、輸送機構の解明に活かしていきたい。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、指導教官として御指導、ご鞭撻を賜りました放射線植物生理学研究室教授 中西友子先生にお礼申し上げます。手法の開発から独創的に考え研究に取り組む姿勢は私の大学院での研究生活において何よりも学ぶところとなりました。同研究室助教 田野井慶太郎先生には研究においてアドバイスとご協力を頂き深く感謝申し上げます。山脇正人特任助教には、イメージングシステムの改良と放射線検出の実験において惜しみないご協力を頂き深く感謝いたします。

信州大学の齋藤勝晴准教授には信州大学での実験環境を提供して頂くとともにミヤコグサの栽培から形質転換体作成の手法について丁寧に御指導頂き感謝申し上げます。また、折に触れリン研究についての質問に丁寧に答えて頂きました広島大学の和崎淳准教授に感謝いたします。そして、神戸大学の三村徹郎教授にはリン研究についての御助言およびイメージング解析の可能性についてお話を頂き、自分の研究の大きな励みとすることができました。Commissariat à l'énergie atomique の Laurent Nusaume 博士には、シロイヌナズナの *Phl1* 変異体の種子を提供して頂くとともに植物のリン酸応答機構について貴重なお話し頂き感謝いたします。

放射線植物生理学研究室の皆様には日々の研究生活について暖かいサポートをして頂きました。小林奈通子氏には折に触れ研究の御助言を頂きました。深く感謝いたします。

最後に、大学院での研究生活をいつも応援してくれた家族に心から感謝いたします。

平成 22 年 1 月

菅野 里美



## 引用文献

- Abel, S., Ticconi, C. and Delatorre, C.** (2002) Phosphate sensing in higher plants. *Physiologia Plantarum* **115**, 1-8.
- Ames, B.N.** (1966) Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases. *Methods in enzymology* **8**, 115-118.
- Aono, T., Kanada, N., Ijima, A. and Oyaizu, H.** (2001) The response of the phosphate uptake system and the organic acid exudation system to phosphate starvation in *Sesbania rostrata*. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1253-1264.
- Bari, R., Pant, B.D., Stitt, M. and Scheible, W.-R.** (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology* **141**, 988-999.
- Bates, T. and Lynch, J.** (1996) Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell and Environment* **19**, 529-538.
- Biddulph, O., Biddulph, S., Cory, R. and Koontz, H.** (1958) Circulation patterns for phosphorus, sulfur and calcium in the bean plant. *Plant Physiology* **33**, 293-300.
- Bun-ya, M., Nishimura, M., Harashima, S. and Oshima, Y.** (1991) The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 3229-3238.
- Burleigh, S. and Harrison, M.** (1997) A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. *Plant Molecular Biology* **34**, 199-208.
- Burleigh, S. and Harrison, M.** (1999) The down-regulation of Mt4-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant Physiology* **119**, 241-248.
- Chiou, T., Aung, K., Lin, S., Wu, C., Chiang, S. and Su, C.** (2006) Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 412-421.
- Daram, P., Brunner, S., Persson, B., Amrhein, N. and Bucher, M.** (1998) Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* **206**, 225-233.
- Daram, P., Brunner, S., Rausch, C., Steiner, C., Amrhein, N. and Bucher, M.** (1999) *Pht2;1* encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**, 2153-2166.
- Delhaize, E. and Randall, P.J.** (1995) Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis-thaliana*. *Plant Physiology* **107**, 207-213.

- Devaiah, B.N., Karthikeyan, A.S. and Raghothama, K.G.** (2007a) WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in Arabidopsis. *Plant Physiology* **143**, 1789-1801.
- Devaiah, B.N., Nagarajan, V.K. and Raghothama, K.G.** (2007b) Phosphate homeostasis and root development in Arabidopsis are synchronized by the Zinc Finger Transcription factor ZAT6. *Plant Physiology* **145**, 147-159.
- Doerner, P.** (2008) Phosphate starvation signaling: a threesome controls systemic P-i homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 536-540.
- Drew, M.C. and Saker, L.R.** (1984) Uptake and long-distance transport of phosphate, potassium and chloride in relation to internal ion concentrations in barley: evidence of non-allosteric regulation. *Planta* **160**, 500-507.
- Drissner, D., Kunze, G., Callewaert, N., Gehrig, P., Tamasloukht, M., Boller, T., Felix, G., Amrhein, N. and Bucher, M.** (2007) Lyso-phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science* **318**, 265-268.
- Franco-Zorrilla, J., Gonzalez, E., Bustos, R., Linhares, F., Leyva, A. and Paz-Ares, J.** (2004) The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *Journal of Experimental Botany* **55**, 285-293.
- Fujimaki, S., Ishii, S. and Ishioka, N.S.**, in: “*Nitrogen Assimilation in Plants*”, Ed. by Ohyama, T. and Sueyoshi, K., (Research Signpost, in press).
- Gonzalez, E., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A. and Paz-Ares, J.** (2005) PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**, 3500-3512.
- Greenway, H. and Gunn, A.** (1966) Phosphorus retranslocation in *Hordeum vulgare* during early tillering. *Planta* **71**, 43-67.
- Guether, M., Balestrini, R., Hannah, M., He, J., Udvardi, M.K. and Bonfante, P.** (2009) Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist* **182**, 200-212.
- Guo, B., Jin, Y., Wussler, C., Blancaflor, E.B., Motes, C.M. and Versaw, W.K.** (2008) Functional Analysis of the Arabidopsis Pht Family of Intracellular Phosphate Transporters. *New Phytologist* **177**, 889-898.
- Hammond, J., Bennett, M., Bowen, H., Broadley, M., Eastwood, D., May, S., Rahn, C., Swarup, R., Woolaway, K. and White, P.** (2003) Changes in gene expression in Arabidopsis shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiology* **132**, 578-596.
- Harrison, M.** (1999) Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant fungal symbioses. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1013-1022.

**Harrison, M., Dewbre, G. and Liu, J.** (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**, 2413-2429.

**Harrison, M.** (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* **59**, 19-42.

**Härtel, H. and Benning, C.** (2000) Can digalactosyldiacylglycerol substitute for phosphatidylcholine upon phosphate deprivation in leaves and roots of *Arabidopsis*?. *Biochemical Society Transactions* **28**, 729-732.

**Himelblau, E. and Amasino, R.** (2001) Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* **158**, 1317-1323.

**Javot, H., Pumplin, N. and Harrison, M.J.** (2007) Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell and Environment* **30**, 310-322.

**Jeschke, W., Kirkby, E., Peuke, A., Pate, J. and Hartung, W.** (1997) Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L). *Journal of Experimental Botany* **48**, 75-91.

**Jin, J.B., Jin, Y.H., Lee, J., Miura, K., Yoo, C.Y., Kim, W.-Y., Van Oosten, M., Hyun, Y., Somers, D.E., Lee, I. et al.** (2008) The SUMO E3 ligase, AtS1Z1, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through affects on FLC chromatin structure. *Plant Journal* **53**, 530-540.

**Kai, M., Masuda, Y., Kikuchi, Y., Osaki, M. and Tadano, T.** (1997) Isolation and characterization of a cDNA from *Catharanthus roseus* which is highly homologous with phosphate transporter. *Soil Science and Plant Nutrition* **43**, 227-235.

**Kanno, S., Rai, H., Ohya, T., Hayashi, Y., Tanoi, K. and Nakanishi, T.M.** (2007) Real-time imaging of radioisotope labeled compounds in a living plant. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **272**, 565-570.

**Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY(TM) vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends In Plant Science* **7**, 193-195.

**Karthikeyan, A., Varadarajan, D., Mukatira, U., D'Urzo, M., Damsz, B. and Raghothama, K.** (2002) Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiology* **130**, 221-233.

**Keutgen, A.J. and Pawelzik, E.** (2009) Impacts of NaCl stress on plant growth and mineral nutrient assimilation in two cultivars of strawberry. *Environmental and Experimental Botany* **65**, 170-176.

**Leggiewie, G., Willmitzer, L. and Riesmeier, J.** (1997) Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: Identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell* **9**, 381-392.

- Lin, S.-I., Chiang, S.-F., Lin, W.-Y., Chen, J.-W., Tseng, C.-Y., Wu, P.-C. and Chiou, T.-J.** (2008) Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiology* **147**, 732-746.
- Liu, C., Muchhal, U., Uthappa, M., Kononowicz, A. and Raghothama, K.** (1998) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiology* **116**, 91-99.
- Liu, H., Trieu, A., Blaylock, L. and Harrison, M.** (1998) Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: Regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Molecular Plant-microbe Interactions* **11**, 14-22.
- Liu, J., Versaw, W.K., Pumplin, N., Gomez, S.K., Blaylock, L.A. and Harrison, M.J.** (2008) Closely related members of the *Medicago truncatula* PHT1 phosphate transporter gene family encode phosphate transporters with distinct biochemical activities. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 24673-24681.
- Lu, Y.-P., Zhen, R.-G. and Rea, P.A.** (1997), "AtPT4 A Fourth Member of the Arabidopsis Phosphate Transporter Gene Family (Accession No. U97546, *Plant Gene Register* 97-082)".
- Maeda, D., Ashida, K., Iguchi, K., Chechetka, S.A., Hijikata, A., Okusako, Y., Deguchi, Y., Izui, K. and Hata, S.** (2006) Knockdown of an arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporter gene of *Lotus japonicus* suppresses mutualistic symbiosis. *Plant and Cell Physiology* **47**, 807-817.
- Márquez, A.J.** (2005) *Lotus Japonicus Handbook*. Springer.
- Martin, A., del Pozo, J., Iglesias, J., Rubio, V., Solano, R., de la Pena, A., Leyva, A. and Paz-Ares, J.** (2000) Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in Arabidopsis. *Plant Journal* **24**, 559-567.
- Mimura, T., Sakano, K. and Shimmen, T.** (1996) Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. *Plant Cell and Environment* **19**, 311-320.
- Misson, J., Thibaud, M., Bechtold, N., Raghothama, K. and Nussaume, L.** (2004) Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Molecular Biology* **55**, 727-741.
- Misson, J., Raghothama, K., Jain, A., Jouhet, J., Block, M., Bligny, R., Ortet, P., Creff, A., Somerville, S., Rolland, N. et al.** (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **102**, 11934-11939.
- Mitsukawa, N., Okumura, S. and Shibata, D.** (1997) High-affinity phosphate transporter genes of *Arabidopsis thaliana* (Reprinted from Plant nutrition for

sustainable food production and environment, 1997). *Soil Science and Plant Nutrition* **43**, 971-974.

**Muchhal, U., Pardo, J. and Raghothama, K.** (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **93**, 10519-10523.

**Mudge, S., Rae, A., Diatloff, E. and Smith, F.** (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **31**, 341-353.

**Müller, R., Nilsson, L., Krintel, C. and Nielsen, T.** (2004) Gene expression during recovery from phosphate starvation in roots and shoots of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **122**, 233-243.

**Nagy, R., Karandashov, V., Chague, W., Kalinkevich, K., Tamasloukht, M., Xu, G., Jakobsen, I., Levy, A., Amrhein, N. and Bucher, M.** (2005) The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant Journal* **42**, 236-250.

**Nakamori, K., Takabatake, R., Umehara, Y., Kouchi, H., Izui, K. and Hata, S.** (2002) Cloning, functional expression, and mutational analysis of a cDNA for *Lotus japonicus* mitochondrial phosphate transporter. *Plant and Cell Physiology* **43**, 1250-1253.

**Nakanishi, T.M., Okuni, Y., Furukawa, J., Tanoi, K., Yokota, H., Ikeue, N., Matsubayashi, M., Uchida, H. and Tsiji, A.** (2003) Water movement in a plant sample by neutron beam analysis as well as positron emission tracer imaging system. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **255**, 149-153.

**Nielsen, J., Joner, E., Declerck, S., Olsson, S. and Jakobsen, I.** (2002) Phospho-imaging as a tool for visualization and noninvasive measurement of P transport dynamics in arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* **154**, 809-819.

**Okumura, S., Mitsukawa, N., Shirano, Y. and Shibata, D.** (1998) Phosphate Transporter Gene Family of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* **5**, 261-269.

**Pant, B.D., Buhtz, A., Kehr, J. and Scheible, W.-R.** (2008) MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant Journal* **53**, 731-738.

**Paszkowski, U., Kroken, S., Roux, C. and Briggs, S.** (2002) Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **99**, 13324-13329.

**Peuke, A., Rokitta, M., Zimmermann, U., Schreiber, L. and Haase, A.** (2001) Simultaneous measurement of water flow velocity and solute transport in xylem and

phloem of adult plants of *Ricinus communis* over a daily time course by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Plant Cell and Environment* **24**, 491-503.

**Poirier, Y., Thoma, S., Somerville, C. and Schiefelbein, J.** (1991) A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiology* **97**, 1087-1093.

**Rae, A., Cybinski, D., Jarmey, J. and Smith, F.** (2003) Characterization of two phosphate transporters from barley; evidence for diverse function and kinetic properties among members of the Pht1 family. *Plant Molecular Biology* **53**, 27-36.

**Raghothama, K.** (2000) Phosphate transport and signaling. *Current Opinion In Plant Biology* **3**, 182-187.

**Rausch, C. and Bucher, M.** (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* **216**, 23-37.

**Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A., Iglesias, J., Leyva, A. and Paz-Ares, J.** (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development* **15**, 2122-2133.

**Sanchez-Calderon, L., Lopez-Bucio, J., Chacon-Lopez, A., Gutierrez-Ortega, A., Hernandez-Abreu, E. and Herrera-Estrella, L.** (2006) Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. *Plant Physiology* **140**, 879-889.

**Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K. et al.** (2008) Genome Structure of the Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research* **15**, 227-239.

**Schachtman, D., Reid, R. and Ayling, S.** (1998) Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiology* **116**, 447-453.

**Shin, H., Shin, H., Dewbre, G. and Harrison, M.** (2004) Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant Journal* **39**, 629-642.

**Smith, F., Ealing, P., Dong, B. and Delhaize, E.** (1997) The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant Journal* **11**, 83-92.

**Svistoonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., Nussaume, L. and Desnos, T.** (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics* **39**, 792-796.

**Tadano, T. and Sakai, H.** (1991) Secretion of Acid Phosphatase by the Roots of Several Crop Species under Phosphorus-Deficient Conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* **37**, 129-140.

**Tanoi, K., Hojo, J., Suzuki, K., Hayashi, Y., Nishiyama, H. and Nakanishi, T.M.** (2005) Analysis of potassium uptake by rice roots treated with aluminum using a positron emitting nuclide, K-38. *Soil Science and Plant Nutrition* **51**, 715-717.

**Versaw, W. and Harrison, M.** (2002) A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell* **14**, 1751-1766.

**Wang, Y., Garvin, D. and Kochian, L.** (2002) Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiology* **130**, 1361-1370.

**Wasaki, J., Yonetani, R., Shinano, T., Kai, M. and Osaki, M.** (2003) Expression of the OsPII gene, cloned from rice roots using cDNA microarray, rapidly responds to phosphorus status. *New Phytologist* **158**, 239-248.

**Watt, M. and Evans, J.** (1999) Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiology* **121**, 317-323.

**Windt, C.W., Vergeldt, F.J., De Jager, P.A. and Van As, H.** (2006) MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco. *Plant Cell and Environment* **29**, 1715-1729.

**Wu, P., Ma, L., Hou, X., Wang, M., Wu, Y., Liu, F. and Deng, X.** (2003) Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in Arabidopsis roots and leaves. *Plant Physiology* **132**, 1260-1271.

**Yamawaki, M., Kanno, S., Ishibashi, H., Noda, A., Hirose, A., Tanoi, K. and Nakanishi, T.M.** (2009) The development of real-time RI imaging system for plant under light environment. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **282**, 275-279.

**Yi, K., Wu, Z., Zhou, J., Du, L., Guo, L., Wu, Y. and Wu, P.** (2005) OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant Physiology* **138**, 2087-2096.

**Zhou, J., Jiao, F., Wu, Z., Li, Y., Wang, X., He, X., Zhong, W. and Wu, P.** (2008) OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiology* **146**, 1673-1686.

森 敏, 前 忠彦, 米山 忠克 (2001) 植物栄養学. 文永堂出版.

菅野 里美, 田野井 慶太郎, 中西 友子 (2009) ダイズ地上部におけるリン酸移行のリアルタイムイメージング. *RADIOISOTOPES* **58**, 743-747.



## 論文内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 19 年度博士課程 進学

氏 名 菅野 里美

指導教員名 中西 友子

## 論文題目

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の機能解析

植物の無機元素の吸収や分配機構を解明することは植物学分野において重要なテーマである。これを解明するには、吸収移行の鍵となる分子（遺伝子）の機能と同時に、基質（無機元素）そのものの動態を解析する必要がある。そこで、植物栄養元素のうちリン酸に注目し、放射性同位体を利用した非破壊で経時的なリン酸の観察ができる新たな解析ツールを開発する一方、ミヤコグサリン酸トランスポータを単離し、その機能解析へ新規ツールの応用を試みた。本研究は、リン酸の輸送を担うトランスポータとリン酸の植物体内の詳細な動態を関連させた初めての研究である。

## ラジオアイソトープイメージングシステムの開発と改良

放射性同位体を用いた植物のトレーサ実験は、植物を採取し、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 線フィルム等による検出が行われてきており、同一サンプルを経時的に解析するのは困難であった。しかし、GFP を用いて遺伝子を可視化するように植物体内のイオンや化合物を非破壊解析することができれば、植物の物質輸送や無機元素の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、放射線（ベータ線）のシンチレーション反応による微弱光を高感度に検出する原理を基に、非破壊で植物体内のトレーサを検出するシステムを組み立てた。標準線源や植物サンプル

のイメージ検出のための条件検討を行ったところ、通常用いられているイメージングプレート(IP)より感度が10倍以上高く、同程度の分解能を示すことが判った。このことは、1フレームの画像取得が短時間で行えるため、連続的な画像取得が可能であることを意味する。微弱光を検出する原理であることから、開発当時は暗条件下での計測しかできなかったが、植物生理を解析するためには明条件下で撮影する必要があった。そこで、植物体地上部にLED光を照射し、かつ植物体から放出される放射線を暗条件下でシンチレーションを起こさせ検出するよう装置の改良を行った結果、明条件下でのイメージング撮影が可能となった。さらに、根と地上部を同時に撮影し植物個体全体の $^{32}\text{P}$ -リン酸の動態を解析できるように装置の改良と工夫を重ねた結果、植物体内の $^{32}\text{P}$ -リン酸動態をリアルタイムでイメージング解析できる環境が整った。

本システムを用い、ダイズやミヤコグサの幼植物期から子実肥大期までの各生育ステージにおける各植物組織内の $^{32}\text{P}$ 動態を分単位の変化の下に解析したところ、 $^{32}\text{P}$ の移行様式は組織の発育段階や生育ステージにより特異的であることが示された。開発したイメージングシステムにより同一サンプルでの連続した物質動態解析を行うことができるようになった。

### ミヤコグサリン酸トランスポータ遺伝子の単離

リン酸は細胞膜を通過する際にリン酸輸送のためのタンパク質を介することが知られている。このリン酸輸送体タンパク質（以下リン酸トランスポータ）は、植物のリン酸輸送を制御する重要な因子であり、 $^{32}\text{P}$ 蓄積の異なる組織でトランスポータの特異的な働きが予想される。そこでまず、イメージング解析を進めていたミヤコグサのリン酸トランスポータを単離し、発現解析を行った。

植物のリン酸トランスポータは主にPht1ファミリーに属する遺伝子について多くの植物から単離され解析されている。ミヤコグサのPht1ファミリーに属するリン酸トランスポータは、3つ報告されており、菌根菌感染根の応答について調べられてきた。しかし、シロイヌナズナやイネでは9~13の遺伝子が単離されており、ミヤコグサにも他のファミリー遺伝子が存在する可能性が高いことから、新たな遺伝子を探索した。ミヤコグサのESTライブラリーやゲノムデータベースを利用し新たに3つの遺伝子(LjPT4、LjPT6、LjPT7)を単離することができた。

これらの遺伝子がどの組織のリン酸吸収や移行の制御に関わっているのか調べるため、水耕栽培2週目の幼植物と6週目の花と子実からRNAを抽出し、これらのリン酸トランスポータ遺伝子の発現をリアルタイムPCRおよび*in situ*ハイブリダイゼーションにより解析した。LjPT1は花や子実、LjPT2とLjPT3、LjPT7は根、茎、葉、花、子実、LjPT6は開花前の花、LjPT3とLjPT4は菌根菌感染根で発現していた。リン酸欠乏時、LjPT1は、花や子実に加え、通常は発現が少ない根（根端および維管束細胞周辺）、茎、葉でも発現が増加し、LjPT2とLjPT3では根、葉、茎での発現が4~8倍に増加し

ていた。特に LjPT2 は根の皮層細胞および維管束周辺細胞で発現していた。また、LjPT7 は茎での発現が 2 倍に増加していた。一方、花やさやでの各遺伝子の発現量は、リン酸欠乏により大きな変動を示さなかった。以上をまとめると、LjPT1、LjPT2、LjPT3、LjPT7 はリン酸欠乏条件下では、根、葉、茎における発現量が増加していたので、体内リン酸濃度に応答して誘導されるリン酸トランスポータである可能性が考えられた。

### リン酸欠乏ストレス時のリン酸トランスポータの発現と $^{32}\text{P}$ 移行の解析

$^{32}\text{P}$  イメージング解析によりリン酸は組織特異的に分配されることが示され、かつトランスポータの発現解析により LjPT1、LjPT2、LjPT3、LjPT7 遺伝子がリン酸欠乏時に根、茎、葉で発現量を増加することが示された。そこで次に、これらの遺伝子がリン酸輸送にどの程度関与しているのかを知るため、トランスポータの発現量と  $^{32}\text{P}$  移行量の関係を調べることにした。

十分なリン酸を含む水耕液で栽培したミヤコグサをリン酸抜きの培地に移植し（以下、リン酸欠乏ストレス処理）、根、第一・第二本葉、新葉の 3 組織のリン酸濃度とトランスポータ遺伝子の発現量を調べた。ストレス処理から 10 日目にコントロール栽培区と比較して遺伝子の発現量が大幅に増加していたことから、同条件下における植物体内の  $^{32}\text{P}$ -リン酸イメージングを行った。イメージングでは、新たに施与した  $^{32}\text{P}(\text{H}_3\text{PO}_4)$  の組織への移行蓄積からリン酸量(mol/h)を換算した。

根では、リン酸濃度がコントロールの約 1/14 であり、LjPT1 は 7 倍、LjPT2 は 4 倍に mRNA 発現量が増加していた。このとき根が吸収し地上部へ移行した単位時間あたりのリン酸量は、コントロールの 3-5 倍に増加した。前章で見られた LjPT1 と LjPT2 の根での発現組織を考慮すると、リン酸欠乏ストレス時に根圏からのリン酸の取り込みおよび導管へのローディング能を高めることに関与していることが示唆された。

第一本葉と第二本葉は、リン酸濃度がコントロールの約 1/9 であり、LjPT1 の発現量は 4 倍に増加した。このとき、これらの葉へ移行した単位時間あたりのリン酸量はコントロールの 9-15 倍に増加していた。LjPT1 は、特に葉肉細胞で発現しており、葉の組織細胞のリン酸取り込みに働くことが考えられた。

新葉では、リン酸濃度がコントロールの約 1/3 であり、LjPT1、LjPT2、LjPT3、LjPT7 すべての遺伝子の発現量は 3-6 倍に増加した。このとき移行したリン酸はコントロールの 3-6 倍であった。LjPT3、LjPT7 は、新葉でのみ増加しており、新葉特異的な機能があることが考えられた。

以上から、各組織は、組織のリン酸濃度の減少に伴い特定のリン酸トランスポータ遺伝子の発現量を増加させており、また、リン酸の輸送量を上昇させていることが分かった。

## リン酸トランスポータ遺伝子のノックダウン個体の作出とイメージング解析

LjPT1、LjPT2、LjPT3 は、それぞれリン酸欠乏に応答し、また、他の遺伝子よりも発現量が高く、輸送に寄与する割合が高いことが考えられた。そこで、これらの遺伝子機能を抑制した場合にリン酸の移行蓄積に違いが生じることを考え、形質転換体の作成と解析を試みることにした。RNAi コンストラクトを導入したアグロバクテリウムの胚軸感染方法により形質転換体を作成した結果、それぞれの遺伝子で約 30 ラインの T1 世代を作成することができた。そのうち、T2、T3 世代の選抜を行い遺伝子の導入を確認したところ、*ljpt1-5* は LjPT1 遺伝子の発現が 1/7、*ljpt3-1* は LjPT3 遺伝子の発現が 1/5 に抑制されており、これらの形質転換体を用いて、<sup>32</sup>P イメージングを試みた。その結果、野生株に比較して *ljpt1-5* はリン酸欠乏時の地上部への移行は約 20%減少し、成熟葉への移行は約 40%減少していた。一方、*ljpt3-1* のリン酸欠乏時の移行量は野生株とほぼ同様の結果となった。また、これらの形質転換体は子実の形態が野生株と比較して短くなる傾向が見られた。これらの結果から、リン酸欠乏時のリン酸輸送に寄与する割合は LjPT1 遺伝子が高く、LjPT3 遺伝子が低いことが分かった。このことは、組織別の発現解析の結果から得られたリン酸欠乏時のリン酸輸送の結果と同様であった。また、LjPT3 は子実の形態に異常を示す点から、子実形成時に重要な役割を担う遺伝子である可能性が考えられた。

本研究は、ミヤコグサにおけるリン酸トランスポータの種類と発現量が変化したときの実際のリン酸輸送量変化について、新たに開発して組み立てたイメージングシステムにより解析したものである。本システムは、ラジオアイソトープの移行量および速度を解析できる点を植物の物質動態機構の解明に応用することにより、新たな知見につながる有効なツールになりうる。今後、トランスポータの詳細な局在部位と生体内でのリン酸移行を同時に解析するためには、顕微鏡レベルで観測する必要があるため、現在、顕微鏡搭載型のアイソトープイメージングシステムの開発を続けている。

## 発表論文

Yamawaki M., Kanno S., Ishibashi H., Noda A., Hirose A., Tanoi K., Nakanishi T.M.  
The development of real-time RI imaging system for plant under light environment  
Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry, 282, p275-279, 2009

菅野里美、田野井慶太郎、中西友子  
ダイズ地上部におけるリン酸移行のリアルタイムイメージング  
RADIOISOTOPES, vol.58、No.11、2009

Kanno S., Rai H., Ohya T. Hayashi Y., Tanoi K., Nakanishi T. M.  
Real-time imaging of radioisotope labeled compounds in a living plant  
Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry, 272, p.565-570, 2007