

平成 23 年 4 月 7 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～ 2009
 課題番号：17078005
 研究課題名（和文）
 膜電位形成・環境に関する植物の K⁺および Na⁺輸送体の解析
 研究課題名（英文）
 Study on plant Na and K transport system, which is involved in the formation of membrane potential and adaptation of osmolality
 研究代表者 魚住 信之 (UOZUMI NOBUYUKI)
 東北大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：40223515

研究成果の概要（和文）：

植物とラン藻の輸送体の塩と高浸透圧への関与を詳細に解析し、乾燥や塩の集積によるストレスに関わる本輸送系の機能的意義を明らかにすることを目標に研究を行った。Na や細胞内主要イオン K の植物の輸送系には他の生物とは異なる特徴がある。植物において K/Na トランスポーターと K チャネルは、植物の生体膜の物質移動を支配するイオン輸送体である。本研究は、K/Na トランスポーターと K チャネルを研究対象に解析をすすめ、膜輸送系の制御機構と膜を介した情報伝達を解析した。

研究成果の概要（英文）：

The membrane transport system is closely involved in the formation of membrane potential and adaptation to the abiotic stress. We aimed the physiological role of the channels and the transporters which mediated Na and/or K permeation across the plasma membrane and thylakoid membrane. There are some difference in Na and K transport system between animal cells and plant cells. We have studied the structure and function of the Na/K transporters and K channels in plant cells and cyanobacteria which are an essential system for the controlling the solute flux across the membrane.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	17,100,000	0	17,100,000
2006年度	17,100,000	0	17,100,000
2007年度	17,100,000	0	17,100,000
2008年度	16,100,000	0	16,100,000
2009年度	16,100,000	0	16,100,000
総計	83,500,000	0	83,500,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：浸透圧 イオンチャネル 塩 ナトリウム カリウム 膜輸送 膜電位

1. 研究開始当初の背景

K/Na バランスが環境適応に大切であることは知られていたが、それらを司る輸送体の詳細な解明は始まったばかりであった。イオンバランスや膜電位形成に関する輸送体

を理解することで、植物の恒常性の維持と環境ストレス適応が明らかになることが推定されていた。

2. 研究の目的

シロイヌナズナのKチャンネルとNaトランスポーターの同定、構造機能、生理的意義を解析した。膜輸送活性を直接測定することにより機能をさぐる。浸透圧ストレス・塩ストレスに関与するKチャンネルの細胞内調節の一部を明らかにして、植物のホモログ遺伝子となるラン藻のNa/HアンチポーターおよびNa活性型KトランスポーターKtr/HKTの機能解析と調節系に関して知見を得る。膜電位形成・環境に関与する植物のKおよびNa輸送体に関して、イオンチャンネルの膜組込み、トランスポーターのゲート機構の新たな知見の獲得を目的とした

3. 研究の方法

輸送体遺伝子の単離、輸送活性を大腸菌、酵母などもちいて電気生理学的手法を中心に調べた。(パッチクランプ法・アフリカツメガエル卵母細胞膜電位固定法、反転膜・細胞を用いたイオン分析等)中でも、酵母液胞膜のパッチクランプ測定は特徴的な手法であり、新規チャンネルの精緻な性質を解析することができた。輸送体の細胞内局在性や発現に関しては抗体を調製して検出した。

4. 研究成果

シロイヌナズナのAtHKT1は高塩培地における植物の生育に寄与していることが知られている。その機構を探る目的で、大腸菌・昆虫細胞にシロイヌナズナAtHKT1の部分ペプチド抗原-GST融合蛋白質を作成してウエスタンブロット法により、AtHKT1抗体の特異性が高いことを確認した。次にAtHKT1の組織別発現と細胞内局在性を免疫電子顕微鏡観察において調べた。野生株の道管に隣接する細胞である木部柔組織の細胞の原形質膜にAtHKT1が局在していることが明らかとなった。またathkt1変異株の道管と篩管内イオン濃度を測定したところ、塩ストレスを負荷した生育条件におけるNa⁺/K⁺濃度の比は、道管で高く篩管で低かった。高浸透圧負荷におけるシロイヌナズナ培養細胞のAtHKT1の転写物の量を調べた。Na, K添加により約50mM辺りまでは濃度依存的にAtHKT1の転写量は増加したが、100mM程度では低下した。また、ソルビトールやマンニトールでも同様の傾向が観察されたことから、AtHKT1の発現はある程度の高浸透圧で最も増加することが明らかとなった。以上の結果から、AtHKT1は植物へのNa取り込み口として機能して、塩害を防ぐために重要な役割をもち、また高浸透圧に対しても働くことが示された。

AtHKT1のラン藻におけるオルソログ蛋白質であるKtr系は、高浸透圧ショックの適応に関与するK⁺取り込み輸送体である。さらに、Ktr系以外のKdp系の浸透圧調節に関与を、変異株を用いて検証した。その結果、Kdpは高浸

透圧への適応に必須ではないことが明らかとなった。この結果は、Ktr系が主なK輸送系として機能していることを示している。以上の結果は、HKT/Ktr系輸送系が浸透圧調節に重要な役割を担っていることを示している。

シロイヌナズナのAtHKT1は高塩ストレスに対抗する輸送系として機能することが分かっている。原形質膜に発現してNaを排出するNa/Hアンチポーター(SOS1)と、液胞膜に発現してNaを液胞内へ隔離することにより細胞質からNaを取り除くNa/Hアンチポーター(AtNHX1)が存在する。今回、AtNHX1とAtHKT1の役割を明らかにする目的で両輸送系の二重変異株を作成した。二重変異株は野生株と比較して背丈が小さく、また葉も小さい表現型を示した。この表現型はatnhx1の表現型と類似していた。一方、100mMNaClを添加した培地では二重変異株はathkt1とほぼ同様の感受性を示し、atnhx1変異株よりも塩に対する感受性が高かった。さらに、道管内のNa濃度を調べたところ、二重変異株と同様であった。以上のことはAtHKT1はNaの取り込み口として機能していることが示された。

HKT系の膜貫通領域に存在する正電荷アミノ酸の役割を調べた。AtHKT1および小麦のTaHKT1の本アミノ酸を置換した変異体を作成して、酵母およびアフリカツメガエル卵母細胞発現系で輸送活性を調べた。TaHKT1のK輸送は中性電荷アミノ酸であるGlnでは、輸送活性がある程度維持されたが、Alaや負電荷アミノ酸の置換体は顕著に輸送活性が阻害された。

Ktr系はHKT系とホモログ蛋白質である。Naで活性化される機構を探る目的で、細胞外に面する側に存在する電荷アミノ酸をAlaに置換した変異体を作成して、輸送活性に必須となるアミノ酸を同定した。

イオンチャンネルの中には、膜電位の変化でチャンネル孔の開口率が調節されているものがある。この調節を行う膜電位センサーは、正電荷アミノ酸および負電荷アミノ酸を有する3つの膜貫通領域(S2, S3, S4)で構成されている。疎水度が低いにもかかわらず膜貫通領域を形成する理由は知られていなかった。私たちは2002年と2003年に、シロイヌナズナのKAT1チャンネルを研究対象に選び、膜貫通領域翻訳後に、正電荷および負電荷アミノ酸同士が電氣的相互作用をすることにより電荷を互いに中和して、小胞体膜に組み込まれることを示した。これはタンパク質の膜への挿入様式としては極めて珍しい様式である。一方、他のイオンチャンネルにおける膜電位センサーを形成する膜貫通領域には、疎水度が比較的高い場合も存在することが分かっている。今回、そのような場合でも上記の機構が成り立つのか否かを、最もよく機能解析されているShakerチャンネル(ShakerB)を対象に検討し

た。Shaker の S4 には6つの正電荷残基(Arg Lys)が4残基ごとに存在しているにもかかわらず、疎水度は KAT1 の S4 よりも高い。In vitro 転写翻訳系、イヌ小胞体膜を用いた実験によって、Shaker の各膜貫通領域の性質と膜挿入に関する能力を検討した。Shaker の S4 は一般的な疎水度を利用して膜に組み込まれる能力があるものの、それだけでは十分な組み込み能力はなかった。Shaker の膜電位センサーの場合でも、KAT1 の場合と同様な膜貫通領域同士が相互作用をして翻訳後に組み込まれる機能も保持していることが分かった。さらに、S2 の負電荷アミノ酸と S4 の正電荷アミノ酸の電荷相互作用を同定するとともに、アミノ酸の側鎖の長さが C-C の距離が一つでも異なれば起こらないことが明らかとなった。

植物と微生物には、動物にはみられないトランスポーターの Ktr/Trk/HKT 系トランスポーターが存在している。このトランスポーターの構造は K チャンネルとほぼ同じ構造である。Ktr/Trk/HKT 系トランスポーターの最後の膜貫通領域のほぼ真ん中に G-R 配列が高く保存されている。この R がチャンネルとトランスポーターの差異を示す原因と予測して、R を他のアミノ酸に置換した（シロイヌナズナ AtHKT1, 小麦 TaHKT1, ラン藻 KtyB）。正電荷のアミノ酸 (Lys) では輸送活性を維持したものの、中性および負電荷アミノ酸では輸送活性に影響がみられた。これまで得られている結晶解析データをもとに構築した予測構造から、高く保存されている4つ目のループに存在している負電荷アミノ酸と本 R アミノ酸の間で電気的相互作用をとると推定した。その相互作用は、イオン透過孔の開孔に制限を制限を与えていると予想した。このため、Ktr/Trk/HKT 系はトランスポーターであり、チャンネルのような大きなイオン電流を示さないと考えられた。

液胞膜に局在することが示されている機能未知のチャンネル分子(遺伝子)の数は、生細胞の液胞膜において輸送活性が検出されたチャンネルの種類の数よりも多い。本研究において、タバコの液胞膜に存在する K チャンネルの遺伝子を見出した(NtTPK1)。BY2 から NtTPK1 のプロモーター配列の単離をはかったところ3つの配列が得られた。そのうち、ひとつはほとんど遺伝子発現の活性はなく、残り2つにプロモーター活性が存在した。さらに、その2つのプロモーター活性はタバコ培養細胞において高浸透圧で促進されることが明らかとなった。植物液胞膜には数々のイオン輸送系が存在しそれらがバックグラウンド電流として観察されることから、内在性チャンネル遺伝子の破壊が可能な酵母を宿主細胞に用いて NtTPK1 の機能解析を行った。細胞質側が酸性になることによって顕著に活性化された。また、細胞質側に EF-hand モチーフが存在して

Caにより調節を受けることが予測されていたが、Caより輸送活性が若干活性化されることがわかった。また、ポリアミンによる輸送活性阻害が起こることが分かった。たばこのポリアミン成分を調べたところ、スベルミジンが最も多く含まれることが分かった。このような性質から、本 K チャンネルはこれまで電気生理学測定に基づいて分類されているチャンネル特性とは一致しないことから、新規の K チャンネルと考えられる。

植物のKチャンネルの中でも膜電位センサーを持たないタイプのKチャンネルである液胞膜TPKチャンネルの性質を酵母液胞膜に発現させて検討した。たばこKチャンネルTPKは細胞質内側が酸性化することによって、輸送活性が強くなることが知られている。今回イオン選択孔の置換体の中には、この性質が失われるものが存在した。イオン選択孔の構造が pH依存性に関係することが強く示唆された。

シロイヌナズナのKチャンネルKAT1の構造と機能を明らかにするために、精製系について検討した。昆虫細胞系を用いて全長の蛋白質を生産させたところ、これまでは得られない量の蛋白質を精製することが可能となった。以前に、ペプチドにおいて昆虫細胞系で精製を行ったことがあるが、今回のように全長の蛋白質が得られることとは、今後のKAT1の機能と構造解析に有効である。

野性株の酵母を巨大化する方法を用いて、巨大化細胞とその液胞膜の調製を試みてきたが、酵母の液胞膜に植物の K チャンネルと同様のイオン輸送系が観察された。その本体は原核生物や真核生物に存在する陽イオン輸送体であり植物のイオンチャンネル測定系として利用するにあたり、重要な知見であることからそのイオン特性について検証を行った。Ca で活性化されることが明らかとなり、たばこ K チャンネルと類似の性質をもつことが明らかとなった。さらに、陽イオン選択性が低いことも予測されたことから、今後植物の液胞膜に存在するイオン輸送系の機能解析には、本遺伝子変異株を用いた解析がバックグラウンド電流を抑制する上で有効であることが示された。

シロイヌナズナのKチャンネルKAT1のC末領域に存在するリン酸化を受けるアミノ酸が植物から抽出されたリン酸化酵素においてもリン酸化を受けるのかを、シロイヌナズナ由来の抽出液を用いて反応させた。そのアミノ酸残基は³²Pラベル実験においてリン酸化されること、質量分析においても相当する残基がリン酸化されることの両方に関して検討した、さらに、置換体を電気生理学的手法で調べたところ、輸送活性を維持する場合としない場合に評価を分けた結果、T306がリン酸

化を受けてK輸送に関与することを明らかにした。

Ca依存性リン酸化酵素もKAT1の輸送活性の調節を行うことを明らかにした。CDPKキナーゼはPMAによって活性化されるキナーゼと類似のアミノ酸認識を示すことから、その系を用いて行った。KAT1のNa末領域およびC末領域のリン酸化がKAT1の輸送活性を低下させることを電気生理学測定によって明らかにした。

植物やそのオルガネラは高浸透圧によって細胞は水分を奪われて細胞体積は小さくなる。その後、K取り込み系が機能して、それに応じて水が輸送されて、細胞体積が戻ることが知られているがその詳細は分かっていない。細胞観察が比較的容易である単細胞ラン藻を用いてKの吸収と高浸透圧調節に関するK輸送体の同定と役割を解析した。Kup変異株、Kdp変異株その二重株などを作成して、それらの高浸透圧環境における細胞体積回復についてマイクロ体積変化の観察が可能な培養装置を用いて体積変化を追跡した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 26 件) 全て査読有

1. Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Takahashi, M., Sato, Y., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H., and Nishizawa, NK. Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. **J. Biol. Chem.** **286**, 5446-5454, (2011)
2. Kobayashi, D., Uozumi, N., Hisamatsu, S., and Yamagami, M. (2010) AtKUP/HAK/KT9, a K⁺ transporter from *Arabidopsis thaliana*, mediates Cs⁺ uptake in *Escherichia coli*. **Biosci. Biotech. Biochem.** **74**:203-205
3. Sato, A., Gambale, F., Dreyer, I., and Uozumi, N. (2010) Modulation of the Arabidopsis KAT1 channel by an activator of protein kinase C in *Xenopus laevis* oocytes. **FEBS J.** **277**:2318-2328.
4. Mosimann, M., Goshima, S., Wenzler, Y., Lu'scher, A., Uozumi, N., and Ma'ser, P. (2010) Trk/HKT-type K⁺ transporter from *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, **9**:539-546
5. Zanetti, M., Teardo, E., Rocca, N. L., Zulkifli, L., Checchetto, V., Shijuku, T, Sato, Y., Giacometti, G. M., Uozumi, N., Bergantino, E., and Szabò, I. (2010) A novel potassium channel in photosynthetic cyanobacteria. **PLoS ONE**, **5**, e10118, 1-10.
6. Voelker, C., Gomez-Porrás, J. L., Becker, D., Hamamoto, S., Uozumi, N., Gambale, F., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K., and Dreyer, I. (2010) Roles of tandem-pore K⁺ channels in plants – a puzzle still to be solved. **Plant Biology**, **12**, 56-6.
7. Yamauchi, S., Fusada, N., Hayashi, H., Utsumi, T., Uozumi, N., and Tozawa, Y. (2010) Cell-free protein N-myristoylation system utilizing wheat-germ extracts facilitates update of consensus motif for the modification of plant proteins. **FEBS. J.** **277**, 3596-3607.
8. Zulkifli, L., Akai, M., Yoshikawa, A., Shimojima, M., Ohta, H., Guy HR., and Uozumi, N. (2010) The KtrA and KtrE subunits are required for Na⁺ dependent K⁺ uptake by KtrB across the plasma membrane in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **J. Bacteriol.** **192**, 5063-5070.
9. Umemura, K., Satoh, J., Iwata, M., Uozumi, N., Koga, J., Kawano, T., Koshihara, T., Anzai, H., and Mitomi, M. (2009) Contribution of salicylic acid glucosyltransferase, OsSGT1, to chemically-induced disease resistance in rice plants. **Plant J.** **57**:463-472.
10. Tsunekawa, K., Shijuku, T., Hayashimoto, M., Kojima, T., Onai, K., Morishita, M., Ishiura, M., Kuroda, T., Nakamura, T., Kobayashi, H., Sato, M., Toyooka, K., Matsuoka, K., Omata, T., and Uozumi, N. (2009) Identification and characterization of the Na⁺/H⁺ antiporter NhaS3 from the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. **J. Biol. Chem.** **284**:16513-16521.
11. Yoshida, K., Miki, N., Momonoi, K., Kawachi, M., Katou, K., Okazaki, Y., Uozumi, N., Maeshima, M., and Kondo, T. (2009) Synchrony between flower opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B** **85**:187-197.
12. Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., and Uozumi, N. (2009) Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target

- site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem. J.* 424:439-448.
13. Ito, T., Uozumi, N., Nakamura, T., Takayama, S., Matsuda, N., Aiba, H., Hemmi, H., and Yoshimura, T. (2009) The implication of YggT of *Escherichia coli* in osmotic regulation. *Biosci. Biotech. Biochem.* **73**:2698-2704.
 14. Hamamoto, S., Marui, K., Matsuoka, K., Higashi, K., Igarashi, K., Nakagawa, T., Kuroda, T., Mori, Y., Murata, Y., Nakanishi, Y., Maeshima, M., Yabe, I., and Uozumi, N. (2008) Characterization of a tobacco TPK-type K⁺ channel as a novel tonoplast K⁺ channel using yeast tonoplasts. *J. Biol. Chem.* 283:1911-1920.
 15. Hibi, T., Aoki, S., Oda, K., Munemasa, S., Ozaki, S., Shirai, O., and Uozumi, N. (2008) Purification of the functional plant membrane channel KAT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374:465-469.
 16. Suga, H., Nagasaki, H., Kondo, T., Okajima, Y., Suzuki, C., Ozaki, N., Arima, H., Yamamoto, T., Ozaki, N., Akai, M., Sato, A., Uozumi, N., Inoue, M., Hasegawa, M., and Oiso, Y. (2008) Novel treatment for lithium induced nephrogenic diabetes insipidus rat model using the Sendai-virus vector carrying aquaporin 2 gene. *Endocrinology* 149:5803-5810.
 17. Hamamoto, S., Yabe, I., and Uozumi, N. (2008) Electrophysiological property of NtTPK1 expressed in yeast tonoplast. *Biosci. Biotech. Biochem.* **72**:2785-2787.
 18. Zhang, L., Sato, Y., Hessa, T., von Heijne, G., Lee, J.-K., Kodama, I., Sakaguchi, M., and Uozumi, N. (2007) Contribution of hydrophobic and electrostatic interactions to the membrane integration of the Shaker K⁺ channel voltage sensor domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:8263-8268.
 19. Kato, N., Akai, M., Zulkifli, L., Matsuda, N., Kato, Y., Goshima, S., Hazama, A., Yamagami, M., Guy, H. R., and Uozumi, N. (2007) Role of positively charged amino acids in the M2_D transmembrane helix of Ktr/Trk/HKT-type cation transporters. *Channels* 1:161-171.
 20. Matsuda, N. and Uozumi, N. (2006) Ktr-mediated potassium transport, a major pathway for potassium uptake, is coupled to a proton gradient across the membrane in the *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biosci. Biotech. Biochem.* **70**: 273-275.
 21. Gambale, F. and Uozumi, N. (2006) Properties of *Shaker*-type potassium channels in higher plants. *J. Membrane Biol.* 210:1-19.
 22. Platten, J.D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R.J., Fairbairn, D.J., Horie, T., Leigh, R.A., Lin, H-X., Luan, S., Mäser, P., Pantoja, O., Rodríguez-Navarro, A., Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Sentenac, H., Uozumi, N., Véry, A-A., Zhu, J-K., Dennis, E.S., and Tester, M. (2006) Nomenclature for *HKT* transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Sciences* **11**:372-374.
 23. Zulkifli, L. and Uozumi, N. (2006) Mutation of His-157 in the second pore loop drastically reduces the activity of *Synechocystis* Ktr transporter. *J. Bacteriol.* **188**:7985-7987.
 24. Iida, T., Masaharu, K., Uozumi, N., Inui, T., and Imai, K., (2005) Further application of a two-step heparin affinity chromatography method using divalent cations as eluents: Purification and identification of membrane-bound heparin binding proteins from the mitochondrial fraction of HL-60 cells. *J. Chromatography B*, 823:209-212.
 25. Sunarpi, Horie, T., Motoda, Jo, Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W-Y., Leung, H-Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J.I., Uozumi, N. (2005) Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* 44: 928-938.
 26. Tholema, N., von der Brüggem, M., Mäser, P., Nakamura, T., Schroeder, J.I., Kobayashi, H., Uozumi, N., and Bakker, E.P. (2005) All four putative selectivity filter glycine residues in KtrB are essential for high affinity and selective K⁺ uptake by the KtrAB system from *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* 280:41146-41154

[学会発表] (計 3 件)

1. Uozumi, N., Sato A, Sato Y, Fukao Y, Fujiwara M, Umezawa T, Shinozaki K, Hibi T, Taniguchi M, Miyake M, Dreyer I, Gambale F, Goto D.
KAT1 is differentially phosphorylated by SnRK2.6 and calcium-dependent kinase, which reduces its transport activity.
XV International Workshop on Plant Membrane Biology, 2010, 9, 23 Adelaide, Australia
2. Sato, A., Taniguchi, M., Miyake, H., Umezawa, T., Shinozaki, K., Goto, D.B., Uozumi, N.
Phosphorylation Of KAT1 C-terminus Modulates K⁺ Uptake Activity
Biophysical Society 53rd Annual Meeting 2009, 3, 2, Boston, USA
3. Zhang, L. and Uozumi, N.
Membrane topogenesis of the voltage dependent K channels
Membrane Transport as a Universal Biological Mechanism 2007, 1, 11 Kyoto

[図書] (計 2 件)

1. Uozumi, N. and Schroeder J.I. (2010) Ion channels and plant stress: past, present and future pp. 1-22 In Demidchik, V. and Maathuis, F. (ed.) Ion Channels and Plant Stress Responses. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
2. Uozumi, N. and Dreyer, I. Structure-Function Correlates in Plant Ion Channels. Montal, M. (ed.) Comprehensive Biophysics Volume 6 – Channel Proteins, Elsevier, in press

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

魚住 信之 (UOZUMI NOBUYUKI)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：40223515