

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05722

研究課題名（和文）カラマツにおけるカリウム膜輸送体遺伝子の機能および時空間的発現パターンの解明

研究課題名（英文）Function and spatio-temporal expression pattern of genes encoding potassium transport proteins in Japanese larch

研究代表者

細尾 佳宏（Hosoo, Yoshihiro）

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：80377184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：カラマツのカリウムチャンネル遺伝子およびカリウムトランスポーター遺伝子の特性を明らかにするために研究を行った。大腸菌のカリウム取り込み能欠損株を用いた相補性試験の結果、2個のチャンネルと3個のトランスポーターでカリウム取り込み機能が見られた。そして、これらのトランスポーターによるカリウム取り込みは、セシウムなどの陽イオンに影響を受けることが分かった。発現解析の結果、解析を行った全ての遺伝子の針葉、内樹皮、分化中木部、根における発現量が月によって変動することが明らかになった。また、2個のチャンネル遺伝子では内樹皮、分化中木部、根で、3個のトランスポーター遺伝子では雄花で高い発現が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、カラマツの複数個のカリウム膜輸送体遺伝子について、遺伝子産物のカリウム輸送機能やカラマツ樹体内での発現パターンを明らかにした。情報が極めて少ない針葉樹のカリウム膜輸送機構について、新規の知見を多く得ることができた。本研究の成果は、新たな遺伝子の単離を含むカラマツ由来カリウム膜輸送体遺伝子の特性に関するさらに詳細な研究に加え、分子育種による成長（木材生産性）、塩ストレス耐性などの形質に優れた樹木の開発にもつながる可能性があり、今後の学術的・実用的研究に幅広い波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Characterization of potassium channel genes and potassium transporter genes of Japanese larch was conducted. Complementation tests using an Escherichia coli mutant deficient in potassium uptake function demonstrated that two potassium channels and three potassium transporters have a function in potassium uptake. Potassium uptake mediated by these transporters was indicated to be influenced by other cations, including cesium. Expression analysis showed that the expression levels of all analyzed genes in needles, inner bark, differentiating xylem, and roots fluctuated from month to month. Two channel genes were highly expressed in inner bark, differentiating xylem, and roots, and three transporter genes were also highly expressed in male strobili.

研究分野：森林科学、樹木生理学

キーワード：カラマツ カリウム チャンネル トランスポーター 膜輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

樹木を含む植物において、カリウムイオン (K^+) は細胞内で最も豊富かつ成長や生理機能に必須な陽イオンであり、細胞の増殖・成長、気孔の開閉、木部 (木材) 形成、生殖 (花・種子形成)、塩ストレス適応など、様々な過程で重要な役割を果たしている (例えば Wang et al. Int J Mol Sci 2013)。植物体内における K^+ の働きは、細胞の生体膜 (細胞膜、液胞膜) を横切る K^+ の選択的輸送 (膜輸送) と密接な関係があり、この K^+ の膜輸送はチャネル、トランスポーターと呼ばれる膜輸送体 (膜中に存在する膜タンパク質の 1 種) が担っている。従って、樹木の成長・生理の仕組みを正確に理解するためには、 K^+ 膜輸送の機構や役割を分子 (遺伝子、タンパク質) レベルで明らかにすることが必要である。

植物の K^+ 膜輸送に関する研究は、モデル植物 (主にシロイヌナズナ) を中心に草本植物で精力的に進められてきた。 K^+ 膜輸送体をコードする遺伝子が数多く見出され、機能や成長・生理過程への関与が明らかにされた (例えば Dreyer et al. FEBS J 2011; Véry et al. J Plant Physiol 2014)。一方、樹木の K^+ 膜輸送に関する知見は少なく、針葉樹では特に少ない。このような中、代表者らは針葉樹のスギから複数の K^+ 膜輸送体遺伝子を単離し、解析を行ってきた。そして、これらがコードする膜輸送体の機能や、樹体内での発現パターンを明らかにした (例えば Hosoo et al. rees 2014)。しかし、針葉樹の K^+ 膜輸送には未だ不明な点が多く残されている。この要因の 1 つとして、スギ以外の針葉樹において K^+ 膜輸送体遺伝子の単離・解析がほとんど進んでいないことが挙げられる。

カラマツは、スギとともに日本の主要な造林樹種の 1 つである。カラマツから新たに K^+ 膜輸送体遺伝子を単離し、その様々な特性を解析することにより、針葉樹における K^+ 膜輸送の機構や役割のより詳細な解明が期待できる。また、カラマツは年による着花の豊凶が激しく、受精後に胚が退化する割合も高いため、種子や苗木の不足が問題となっている。カラマツの K^+ 膜輸送遺伝子について調べることは、この樹種の成長 (木材形成) や花・種子形成の機構に関する新規の知見を得ることにともつながり、育種や種苗安定生産の観点からも重要な課題である。

2. 研究の目的

針葉樹における K^+ 膜輸送の機構を分子レベルで解明し、それをもとに成長・生理に関する様々な過程での K^+ 膜輸送の役割を明らかにすることを目的としている。そのために、カラマツの K^+ 膜輸送体遺伝子に焦点を当て、遺伝子産物の K^+ 輸送機能やカラマツ樹体内での時間的・空間的発現パターンを明らかにすることを目指して研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、カラマツの K^+ チャネル遺伝子 3 個 (*LkTPK1*、*LkTPK2*、*LkK1*) と K^+ トランスポーター遺伝子 3 個 (*LkKUP1*、*LkKUP2*、*LkKUP3*) について、 K^+ 輸送機能やカラマツ樹体内での発現特性の解析を行った。*LkKUP1*、*LkKUP2* 以外は、新たな K^+ 膜輸送体遺伝子として単離から行い、その後解析を行った。

(1) 試料採取・total RNA 抽出

カラマツの 3 年生ポット苗または約 60 年生のカラマツ成木から、各部位の試料を採取した。ポット苗からは、針葉、内樹皮、分化中木部、根を採取した。採取は、3 月から 10 月まで 1 か月おきに計 8 回行った。また、成木からは雄花 (4 月)、雌花 (4 月)、球果 (8 月)、種子 (8 月) を採取した。そして、採取した試料から CTAB 法 (Chang et al. Plant Mol Biol Rep 1993) により total RNA を抽出した。

(2) 新たな K^+ 膜輸送体遺伝子の単離

アメリカ国立生物工学情報センターの BLAST 検索を用いて、既知の K^+ チャネルまたは K^+ トランスポーターと相同性を有するカラマツの塩基配列を見出した。そして、見出した塩基配列をもとに、3. (1) で抽出した total RNA を用いて RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 法と RT-PCR (reverse transcription PCR) 法により目的遺伝子 (K^+ チャネル遺伝子: *LkTPK1*、*LkTPK2*、*LkK1*、 K^+ トランスポーター遺伝子: *LkKUP3*) に相当する cDNA を単離した。

(3) 機能解析

大腸菌の K^+ 取り込み能欠損株 (LB2003 株) を用いた相補性試験により、 K^+ 取り込み機能の解析を行った。LB2003 株は全ての K^+ 取り込み系 (Trk、Kup、Kdp) が欠損しており、 K^+ 濃度が低い (15mM 以下) 環境下では生育できない変異株である。各 K^+ 膜輸送体遺伝子を大腸菌発現用ベクター pPAB404 に挿入し、このベクターで LB2003 株を形質転換した。これにより、各 K^+ 膜輸送体遺伝子がコードするタンパク質 (チャネルまたはトランスポーター) を LB2003 株に発現させた。そして、低濃度の K^+ (KCl) を含む固形培地に形質転換した LB2003 株を播種し、生育能力を検証した。

さらに、各 K⁺トランスポーター (LkKUP1~3) の K⁺取り込みに対する K⁺以外の陽イオンの影響を調べた。各種のイオン塩 (NaCl、CsCl など) を添加した低濃度 K⁺液体培地に形質転換した LB2003 株を播種し、振とう培養した。同時に、イオン塩を添加していない低濃度 K⁺液体培地でも形質転換した LB2003 株を培養し、対照とした。そして、培養中に一定間隔で 600nm の光学密度を測定し、各陽イオンによる生育への影響を検証した。

(4)発現解析

3.(1)で抽出した total RNA から、逆転写により cDNA を合成した。合成した cDNA、各 K⁺膜輸送体遺伝子をそれぞれ特異的に検出するプライマー、そして市販の試薬を用いて、リアルタイム PCR 反応液を調製し、リアルタイム PCR 装置で反応を行った。そして、各部位における各 K⁺膜輸送体遺伝子の発現量を測定し、発現の有無、針葉、内樹皮、分化中木部、根における発現量の季節変動など、カラマツ樹体内での発現パターンを調べた。

4. 研究成果

(1)カラマツ K⁺膜輸送体の推定膜トポロジー

K⁺チャンネルの LkTPK1 と LkTPK2 は、K⁺チャンネルの基本構造である MPM(膜貫通部位-イオン透過孔-膜貫通部位)構造が 2 回繰り返された 4 回膜貫通構造を持ち、イオン透過孔中に K⁺選択フィルターとなる GYG (グリシン-チロシン-グリシン) 配列が存在するという、two-pore 型 K⁺チャンネルに共通する構造上の特徴を持つと推定された。また、同じく K⁺チャンネルの LkK1 は、6 個の膜貫通部位を持ち、5 番目と 6 番目の膜貫通部位とそれらの間に存在するイオン透過孔が MPM 構造を構成していると推定された。イオン透過孔中には、GYG 配列も確認された。さらに、環状ヌクレオチド結合ドメイン、植物の K⁺チャンネルに特有の KHA ドメイン、そしてチャンネル活性を調節する因子が結合するアンキリンリピートドメインを持つことが分かった。これらの LkK1 の特徴は、他の植物の Shaker 型 K⁺チャンネルと一致した。

K⁺トランスポーターでは、LkKUP1 と LkKUP2 は 12 個、LkKUP3 は 14 個の膜貫通部位を持つと推定された。また、3 つの K⁺トランスポーターとも N 末端が膜の内側に存在し、2 番目と 3 番目の膜貫通部位の間に長いループが存在すると推定された。これらの特徴は、既知の KUP/HAK/KT 系の K⁺トランスポーターと一致した。

(2) カラマツ K⁺膜輸送体の K⁺取り込み機能

K⁺チャンネルの LkTPK2、LkK1、K⁺トランスポーターの LkKUP1~3 をそれぞれ発現させた LB2003 株は、K⁺が低濃度 (10mM 以下) の培地で生育できるようになった。この結果から、これらの K⁺チャンネルおよび K⁺トランスポーターは LB2003 株の K⁺取り込み能欠損を相補する、すなわち K⁺取り込み機能を持つことが明らかになった。一方、LkTPK1 を発現させた LB2003 株は同じ培地で生育が見られず、K⁺取り込みは観察されなかった。LkTPK1 は K⁺取り込み機能を持たず K⁺排出機能のみを持つ、または大腸菌での異種発現では正常なチャンネルが形成されず K⁺取り込み活性を発揮できない可能性が示唆された。

各 K⁺トランスポーターの K⁺取り込みに対する K⁺以外の陽イオンの影響を調べた結果、LkKUP1 を発現させた LB2003 株は Cs⁺ (CsCl) の添加によって生育阻害が見られた。そして、LkKUP2 または LkKUP3 を発現させた LB2003 株については、Na⁺ (NaCl)、Cs⁺、Ca²⁺ (CaCl₂)、NH₄⁺ (NH₄Cl) の添加によって生育阻害が見られた。これらのことから、LkKUP1 の K⁺取り込みは Cs⁺に、LkKUP2 と LkKUP3 の K⁺取り込みは Na⁺、Cs⁺、Ca²⁺、NH₄⁺の各陽イオンに影響を受けると考えられる。

(3) カラマツ K⁺膜輸送体遺伝子の発現パターン

LkTPK1

針葉では、3 月の発現量が最も低く、9 月から 10 月にかけて発現量の大きな増加が見られた。内樹皮では、6 月から 8 月にかけて発現量が減少して最も低くなり、8 月から 10 月にかけて発現量が増加した。分化中木部では、3 月から 9 月にかけて発現量が小さく変動し、10 月に増加が見られた。根では、4 月の発現量が最も低く、8 月から 10 月にかけて発現量が増加した。10 月の針葉、根、内樹皮、分化中木部での発現量は、他の部位 (雄花、雌花、球果、種子) に比べて高かった。

LkTPK2

針葉、内樹皮、分化中木部、根の 4 部位ともに、春先 (針葉は 4 月、針葉以外は 3 月) に発現量が最も高くなることが分かった。針葉では、3 月から 7 月にかけて発現量の増減を繰り返し、8 月から 10 月にかけて緩やかに増加した。内樹皮では、3 月から 5 月、6 月から 8 月にかけて発現量が減少した一方で、8 月から 10 月にかけて緩やかに増加した。分化中木部では、3 月から 10 月にかけて緩やかな発現量の減少の傾向が見られたが、4 月から 5 月にかけてのみ増加した。根では、3 月から 5 月にかけて急激に発現量が減少し、5 月から 6 月、9 月から 10 月にかけて発現量の緩やかに増加した。3 月の内樹皮、分化中木部、根における発現量は、他の

部位と比較して高かった。

LkKUP1

針葉では、8月から10月にかけて発現量が大きく増加し、10月に最も高くなった。そして、内樹皮では3月、4月、分化中木部では5月、8月、根では3月、4月、9月での発現量が高くなることが分かった。また、雄花での発現量は、他の部位と比較して高かった。

LkKUP2

針葉、内樹皮、分化中木部では、3月から4月にかけて発現量が増加した。根では、3月と4月の発現量が他の月よりも高かった。4部位ともに、5月以降は発現量が減少するという傾向が見られた。また、針葉と雄花での発現量は、他の部位と比較して高かった。

LkKUP3

針葉では、3月の発現量が最も低く、5月から9月にかけて発現量が増加した。内樹皮では、3月から6月にかけて発現量が減少し、6月に最も低くなった。そして、6月から10月にかけて発現量が増加する傾向が見られた。分化中木部では、3月と4月の発現量が低く、5月から9月は発現量が高くなり、10月には発現量が減少した。根では、3月から6月は発現量が低く、7月から9月に発現量が高くなり、10月には発現量が減少した。9月の針葉、3月の内樹皮、9月の根での発現量は他の部位よりも高く、次いで雄花、球果、種子で高い発現量が確認された。

(4)その他

RACE法により、新たなカラマツの K^+ トランスポーター候補遺伝子(*Lk4869*、*Lk5064*)を単離した。配列解析を行った結果、これらの遺伝子がコードするタンパク質は既知のKUP/HAK/KT系の K^+ トランスポーターと相同性を有することが明らかになった。さらに、KUP/HAK/KT系の K^+ トランスポーターに特徴的な構造を全て持つと推定された。

(5)まとめと今後の展望

複数個のカラマツの K^+ 膜輸送体遺伝子について、これらがコードする K^+ 膜輸送体のほとんどが K^+ 取り込み機能を持ち、 K^+ 取り込み機能がいくつかの陽イオンに影響を受けることを明らかにした。針葉樹の K^+ 膜輸送体の機能についての知見は、これまでスギ K^+ 膜輸送体に関するもののみであったが、本研究により新規の知見を多く得ることができた。本研究の成果をもとに、より定量的な解析を行うことにより、これらの K^+ 膜輸送体の機能的詳細が明らかになるものと期待される。

複数個のカラマツの K^+ 膜輸送体遺伝子について、針葉、内樹皮、分化中木部、根における発現量の季節変動、様々な部位における発現量など、カラマツ樹体内での発現パターンに関する新規の知見を得た。組織・細胞レベルでの発現解析、より細かい発現の季節変動の解析など、さらに研究を進めることにより、成長(木材形成)・花・種子形成などの成長・生理過程と K^+ 膜輸送の関係のより詳細な解明につながるものと期待される。

モデル植物のシロイヌナズナは、 K^+ チャンネル遺伝子と K^+ トランスポーター遺伝子を合わせて30個以上の K^+ 膜輸送体遺伝子を保持している。カラマツから単離され、解析が行われた K^+ 膜輸送体遺伝子の数は未だ少ない。さらにカラマツから K^+ 膜輸送体遺伝子の単離を進め、その特性を明らかにしていくことが必要である。

将来的には、本研究で得られた K^+ 膜輸送に関する遺伝子レベルでの成果をさらに発展させて、分子育種を利用した成長(木材生産性)・塩ストレス耐性などの形質向上による各用途に適した森林・木質資源の開発といった応用的・実用的研究への展開も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大塚彩葵、西村佳穂、細尾佳宏
2. 発表標題 カラマツにおけるカリウムチャネル遺伝子LKTPK2の単離および解析
3. 学会等名 第133回日本森林学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細尾 佳宏、山田 越季、西村 佳穂
2. 発表標題 カラマツにおけるカリウムチャネル遺伝子の単離および解析
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihiro Hosoo, Kaho Nishimura, Tatsuya Ishikawa
2. 発表標題 Molecular cloning and analysis of a novel <i>Larix kaempferi</i> gene that encodes a potassium uptake transporter
3. 学会等名 IUFRO Tree Biotechnology 2019 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 佳穂、細尾 佳宏
2. 発表標題 カラマツにおけるカリウムトランスポーター遺伝子LkKUP1およびLkKUP2の解析
3. 学会等名 第9回中部森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 佳穂、石川 達也、杉本 真理、細尾 佳宏
2. 発表標題 カラマツ由来のカリウムトランスポーター遺伝子の機能および発現解析
3. 学会等名 第5回山岳科学学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 佳穂、杉本 真理、石川 達也、細尾 佳宏
2. 発表標題 カラマツにおける3種のカリウムトランスポーター遺伝子の機能と発現の解
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaho Nishimura, Tatsuya Ishikawa, Yoshihiro Hosoo
2. 発表標題 Functional and expression analysis of a novel potassium transporter gene in <i>Larix kaempferi</i>
3. 学会等名 International Symposium on Forest Tree Molecular Biology and Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村佳穂、石川達也、細尾佳宏
2. 発表標題 カラマツにおけるカリウム膜輸送体遺伝子LkKUP2の機能および発現解析
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------