

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380056

研究課題名(和文)耐塩性植物の創生をめざしたNaおよびK輸送体の統合的基盤の構築

研究課題名(英文)Elucidation of the Na and K transport system conferring salinity tolerance in plant cells

研究代表者

魚住 信之(Uozumi, Nobuyuki)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40223515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円、(間接経費) 3,480,000円

研究成果の概要(和文)：乾燥や塩の集積によって環境の浸透圧が上昇することにより、その環境に生育する植物細胞は脱水による生命の危険にさらされる。水の移動は浸透圧に影響を受けており、具体的には生物においては陽イオンのNaとKが中心となる。この陽イオンの細胞内の濃度の調節を担う物質輸送体は植物細胞のイオン環境の維持において重要な役割を果たすこととなる。本研究では、NaとKの輸送体に関して、検討を加えて、膜輸送体の成り立ちを解析した。これまで輸送機能や役割が分かっていなかった輸送体を明らかにすることができた。環境ストレスに対抗するために必要なNaやKの輸送体の解析を通じて耐ストレス植物の分子育種の基盤の解明を行った。

研究成果の概要(英文)：Drought stress and accumulation of salt lead to increase the osmolarity of the environmental space. This gave the dehydration of plant cells, which ends up to jeopardize the plant life. The water movement across the biological membrane is affected by osmolarity and therefore the concentrations of cation, sodium ion and potassium ion are crucial for them. The intracellular concentrations of these cation play an important role in ion homeostasis in plant cells. In this study, membrane transport system for sodium ion and potassium ion has been analyzed and their structure and function has been investigated. The increase of the resistance against the environmental stress in plant cells has been studied through the elucidation of their sodium and potassium transport system, which is closely involved in understanding the molecular mechanism of osmolarity homeostasis.

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：輸送体 カリウム ナトリウム 遺伝子発現 膜タンパク質 耐塩性 浸透圧

1. 研究開始当初の背景

乾燥による塩の集積で浸透圧が上昇し植物細胞が脱水をうけ、この結果、植物の生産性を抑制する。高濃度の Na が、K 摂取を阻害して細胞質のイオン恒常性を破綻させる。また、イオン環境は細胞質内の機能や膜電位の維持に必須である。陽イオンは、個体の外からの吸収となるため、吸収を行うための輸送系が生体膜に存在して、必要なときに貨イオン透過が開口して細胞内に元素を取り入れる。取り入れられた陽イオンが、脱水を防ぐ役割を担うが、適切な濃度に保たれる必要がある。また、植物内へ転流されて、組織特異的に機能して、恒常性維持をはかっている。これまでに、分子レベルにおいて K 恒常性の維持に関与するいくつかの K 輸送分子や Na 輸送体が、環境変化の適応に機能することが知られているものの、個々の Na や K 輸送体の理解は徐々にすすめられているが、輸送体の連携や協調による耐ストレス機構はほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

Na や K 輸送体の理解と、これらの輸送体の耐ストレス機構の解明を行い、環境変化への耐性を高めるための基盤的な知見を獲得するために、AtHKT1 や K チャネルと K トランポーターの構造、機能と細胞内や固体における役割の解明を進める。これにより、Na や K の輸送体の解析を通じて耐ストレス植物の分子育種の基盤と耐塩性植物の創生を目的とする。

3. 研究の方法

実験材料は、モデル植物のシロイヌナズナと、オルガネラ膜の解析に向けて、光合成細菌のラン藻、酵母、大腸菌とその変異株を用いて解析した。イオン輸送活性については、電気生理学的な測定を行い、構造解析に関しては、アルカリフォスファターゼ遺伝子を融合する方法を大腸菌において行った。また、概日性に関しては、分解速度が比較的早いルシフェラーゼ遺伝子をプロモーターの下流につなげた遺伝子を構築した後、野生株に本遺伝子を導入した。個々の実験操作に関しては、研究成果においても概説した。植物の変異株の作出に関しては、次世代の種子の作出により、目的の植物変異株の取得を行った。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母に 2 つの Na 輸送体 (AtHKT1 と AtNHX1) を共発現させて、Na 輸送と液胞内の Na 蓄積にともなう液胞および細胞体積の比較をめざし、出芽酵母の原形質膜と液胞膜に存在する Na の K 輸送体遺伝子に変異を導入したが、予定していた 4 重変異株の取得はできなかった。次に、酵母の Na 輸送体遺伝子の不活化 (原形質膜 Na 排出系 *ena1-4* と液胞膜 Na/H アンチポーター *nhx1*) を行って、作成

された酵母変異体に AtHKT1 と AtNHX1 を導入した。Na 高濃度培地、ソルビトール高浸透圧の影響は明瞭に検出することはできなかった。

(2) 植物の栄養元素ではない Na の植物細胞への流出入経路の可能性が期待されている AtHKT1 植物体に関して、その輸送体の Na 循環系およびイオンバランスの制御を司る機構の解析を行った。シロイヌナズナの AtHKT1 の promoter 領域には様々な制御因子が存在していることが報告されている。athkt1 のプロモーター活性の検討を目的に GUS 融合遺伝子の構築を行った。開始コドンから上流の約 5kb に存在している 2 回のダイレクトリピート配列の有無を施した 5.4kb と 2.3kb のプロモーター配列に GUS 遺伝子を連結して、その遺伝子を植物体に導入した。この 5.4kb のプロモーター領域にしばしば変異等が生じたことなどから、導入植物までの時間が予想以上にかかった。この理由は、長さの問題に加えて、プロモーター領域に結合する制御因子の存在や、二次構造の形成が影響を与えていることが考えられた。また、作成したプラスミドの形質転換効率も極めて低かった。AtHKT1 プロモーター配列に GUS 遺伝子を連結した遺伝子が導入された植物の GUS 活性の測定を行った。AtHKT1 プロモーター-5.4k と 2.3k のプロモーターは、過去に作成されていた 0.8kb のプロモーターと比べて、GUS 染色の度合いは小さいことが分かった。このことは、プロモーターの -2.3kb ~ -0.8kb の間に抑制領域が挿入されていることを示唆している。

(3) AtHKT1 の機能を調べる目的で、シロイヌナズナの *athkt1* 変異株に AtHKT1 を強制的に発現植物体の作成を行った。AtHKT1 プロモーターの下流に AtHKT1 を導入した遺伝子を作成した。さらに、Na に比較して K に選択性のある S68G の AtHKT1 輸送体や K 選択性の高い TaHKT1 においてもそのプラスミド構築を行い植物へ導入した。また、Na 循環の中心的役割を担う輸送である AtHKT1 や AtNHX1-8 の概日性リズム発現の検討を行った。各遺伝子 promoter 下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結して野生株に本遺伝子の導入を行った。ヘテロ体からホモ体を複数株得るために、PCR における遺伝子導入具合の検討と形質転換体の作成を行った。作出された植物を用いて発現を検討したが、発現レベルの小さいものが多く、詳細な検出測定が必要であった。

(4) これまでに解析されていないシロイヌナズナの Ca と H を輸送すると考えられていた CHX は、K も輸送する可能性が高いと考えられている。K 輸送体不活化した大腸菌において CHX の K 輸送活性が検出された。この CHX は花部で発現しており、稔性に関わる輸送体であることが示唆された。また、細胞膜以外の細胞内小器官の膜で機能して、細胞内イオ

ンの恒常性に関与することが明らかとなった。

(5) K トランスポーターであり耐塩性にも関わっている AtKUP1 の遺伝子発現が、塩・乾燥ストレスのセンサーとして知られている転写因子の膜結合型 b-ZIP に制御される可能性について、シロイヌナズナを用いて解析した。シロイヌナズナの b-ZIP 転写因子の中から、乾燥や塩ストレスで活性化する転写因子の候補として AtHB5,6,16 を選択して AtKUP1 発現誘導を検討した。膜浸透性のデキサメタゾンに植物に添加して、不活性型から活性型へコンフォメーション変化するデキサメタゾン結合タンパク質に構造変化を与えて、AtHB5,6,16 を融合したタンパク質遺伝子の構築を行い、シロイヌナズナに導入した。このシロイヌナズナは AtKUP1 プロモーター発現活性をレポーター遺伝子 GUS に連結した遺伝子が導入されている。検討を加えたところ、転写因子の活性をデキサメタゾンの添加の有無によって GUS 活性の変化の検出はできなかった。

(6) AtKUP1 シロイヌナズナに 13 種類ホモログ遺伝子が存在する。KUP は原核生物から真核生物に存在する輸送体であるにもかかわらず、アミノ酸構造からの疎水性予測のみの情報しかなく、実験的な構造解析はなされていなかった。大腸菌で AtKUP1 の構造解析するために機能発現を、大腸菌の K トランスポーター欠損株に導入して機能相補を行い、本研究で用いるベクターでも機能することを確認した。その後、PhoA 融合蛋白質を作成した。しかし、生産物の細胞毒性を示すコンストラクトが見いだされたことから、植物の KUP のホモログタンパク質である大腸菌 EkKUP で検討することとした。PhoA を Kup の推定される膜貫通領域の間およびその後融合させて膜貫通構造の解析を行ったところ、全てのコンストラクトで発現が確認された。疎水性から推定される膜貫通領域に同じであり、C 末領域に存在する疎水性領域は膜貫通領域とならないことが明らかとなった。

(7) Na および K 輸送体の協調的な機能統御が耐塩性植物の作出に重要な基盤となる。ラン藻の浸透圧変化に機能するチャネルの解析を行った。葉緑体の先祖であるラン藻の機械受容性チャネルを検討した。浸透圧変化に対応することを明らかにするとともに、概日リズム発現を行うことを見いだした。

(8) ラン藻のチラコイド膜で機能する K チャネルの存在を見いだした。H 駆動力に影響を与える輸送体であり、光合成とエネルギー変換に重要なことが明らかとなった。一方、このホモログ輸送体は、植物のオルガネラにも存在することが予想され、葉緑体においても耐塩性の維持に重要な機能を持つことが予

測された。

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 11 件)

Checchetto, V., Segalla, A., Allorent, G., Rocca, N. L., Leanza, L., Giacometti, G.M., Uozumi, N., Finazzi, G., Bergantino, E., and Szabò, I.

Thylakoid potassium channel is required for efficient photosynthesis in cyanobacteria.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109, 11043-11048 (2012)

DOI: 10.1073/pnas.1205960109 査読有

Sato, Y., Aizawa, K., Edure, T., Ando E., and Uozumi, N.

A simple fed-batch method for transcription and insect cell-free transition.

J. Biosci. Bioeng.114,677-679 (2012)

doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.06.015 査読有

Uozumi, N. and Deryer, I.

Structure-Function Correlates in Plant Ion Channels

In Egelman, E. (ed.) Comprehensive Biophysics Volume 6 - Channel Proteins Elsevier BV Amsterdam, 234-245 (2012)

doi:10.1016/B978-0-12-374920-8.00628-7

査読有

Ishimaru, Y., Hamamoto, S., Uozumi N., and Ueda, M.

Regulatory mechanism of plant nyctinastic movement: An ion channel-related plant behavior

Plant Electrophysiology 125-142

In Volkov, A. G. (ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2012)

DOI: 10.1007/978-3-642-29110-4_5 査読有

Yamaguchi1, T., Uozumi, N., and Horie, T.

Potassium and sodium transporters: Improving salinity tolerance in plants
In Tuteja, N., Gill, S.S., Tiburcio, A. F., Tuteja, R. (ed.), Improving Crop Resistance to Abiotic Stress, Chapter 23, 523-542 (2012)

DOI: 10.1002/9783527632930.ch23 査読有

Akai, M., Onai, K., Kusano, M., Sato, M., Redestig, H., Toyooka, K., Morishita, M., Miyake, H., Hazama, A., Checchetto, V.,

Szabò, I., Matsuoka, K., Saito, K., Yasui, M., Ishiura, M., and Uozumi, N.
Plasma membrane aquaporin AqpZ protein is essential for glucose metabolism during photomixotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803.

J. Biol. Chem. 286, 25224-25235 (2011)
DOI: 10.1074/jbc.M111.236380. 査読有

Lu, Y., Chanroj, S., Zulkifli, L., Johnson, MR., Uozumi, N., Cheung, A., and Sze, H.

Pollen tubes lacking a pair of K⁺ transporters fail to target ovules in *Arabidopsis*.

Plant Cell. 23, 81-93 (2011)
doi: 10.1105/tpc.110.080499. 査読有

Dreyer, I. and Uozumi, N.
Potassium channels in plant cells
FEBS Journal 278 4293-4303, 2011
DOI:10.1111/j.1742-4658.2011.08371. 査読有

Chanroj, S., Lu, Y., Padmanaban, S., Nanatani, K., Uozumi, N., Rao, R., and Sze, H.

Plant-specific cation/H⁺ exchanger 17 and its homologs are endomembrane K⁺ transporters with roles in protein sorting
J. Biol. Chem. 286, 33931-33941, (2011)
DOI 10.1074/jbc.M111.252650 査読有

Zulkifli, L., Akai, M., Yoshikawa, A., Shimojima, M., Ohta, H., Guy HR., and Uozumi, N.

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 (2010)
DOI: 10.1128/JB.00569-10 査読有

Voelker, C., Gomez-Porrás, J. L., Becker, D., Hamamoto, S., Uozumi, N., Gambale, F., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K., and Dreyer, I.

Roles of tandem-pore K⁺ channels in plants - a puzzle still to be solved.

Plant Biology, 12, 56-63 (2010)
DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00353.x 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

七谷圭、四十九俊彰、高野洋佑、山崎智子、Lalu Zulkifli、赤井政郎、飯塚龍、松本秀之、丸山央峰、新井史人、魚住信之
Synechocystis sp. PCC 6803 の浸透圧調節に
関与する Kdp 系 K トランスポーターの機能

解析

創立 90 周年記念 第 64 回日本生物工学会大会、平成 24 年 10 月 23-26 日、神戸市

浜本晋、中山浩太、松本尚樹、佐藤裕樹、七谷圭、魚住信之

植物 K 流入系チャネル AKT1 のリン酸化活性制御

創立 90 周年記念 第 64 回日本生物工学会大会、平成 24 年 10 月 23-26 日、神戸市

Nanatani, K., Shijuku, Y., Takano, Y., Yamazaki, T., Zulkifli, L., Akai, M., Iitsuka, R., Matsumoto, H., Maruyama, H., Arai F., and Uozumi, N.

Functional characterization of K transporters in *Synechocystis* sp. PCC 6803.

The IUBMB & FEBS 2012 Congress, September 4-9 2012, Seville, Spain

Hamamoto, S., Mori, Y., Yabe, I., Uozumi, N.

Characterization of YVC1 Channel in Yeast Vacuolar Membrane

2012 International Ion Channel Conference, August 26 (24-27) 2012, Jeju, Korea

Uozumi, N., Nanatani K., and Hamamoto, S.

Membrane transport system conferring the salinity tolerance to bacteria and plant cells.

6th Japan-Finland Biotechnology Symposium 2012, June 5, 2012, Sendai

中山浩太、松本尚樹、浜本晋、魚住信之
Shaker 型 K⁺チャネルファミリーに保存されている活性制御部位の解析

日本農芸化学会 2012 年度大会 平成 24 年 3 月 25 日 京都市

南雲隆太、七谷圭、山形敦史、深井周也、魚住信之

Arabidopsis thaliana Shaker チャネルの昆虫細胞系構築とリン酸化部位の検討

第 53 回日本植物生理学会年会 平成 24 年 3 月 16 日、京都市

魚住信之

植物のセシウム吸収力について

西郷村・生物学シンポジウム 平成 23 年 11 月 17 日、福島県西郷村

魚住信之

膜駆動系を構成する植物・ラン藻の輸送体

第 5 回ハイスループットスクリーニングシステムと次世代 DNA シーケンサーの相乗的応用、

平成 23 年 9 月 14 日 名古屋市

魚住信之

植物イオンチャネル・トランスポーターの機能制御と分子基盤
第6回トランスポーター研究会年会 平成23年6月11日、仙台市

浜本晋、森泰生、矢部勇、魚住信之

巨大化酵母パッチクランプ法を用いた酵母陽イオンチャネルYVC1の輸送特性
第62回日本生物工学会大会、平成22年10月29日、宮崎市

七谷圭、高野洋佑、鈴木石根、四十九俊彰、魚住信之

高・低浸透圧ストレス適応に寄与するラン藻 *Synechocystis* PCC6803 の Kdp・Msc 膜輸送系の解析
日本農芸化学会東北支部・北海道支部合同支部大会(東北支部第145回大会) 平成22年9月28日、仙台市

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, 9,19-24 Adelaide, Australia

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
浜本 晋 (HAMANMOTO Shin)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：10533812

七谷 圭 (NANATANI Kei)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：00547333