

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850041

研究課題名(和文) 新奇な塩輸送体の機能改変を通じた植物の耐塩性の改善

研究課題名(英文) Improvement of salinity tolerance in plants through fine-tuning of the function of the novel Na transporter

研究代表者

上田 晃弘 (Ueda, Akihiro)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：10578248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物の耐塩性を向上させるために、ナトリウムやカリウム、塩素の共輸送を担っているNKCC遺伝子の機能解析を行った。AtNKCC遺伝子は根の先端部位で強く発現しており、カリウム欠乏によってさらにその発現量が増加することが分かった。イネにおけるホモログであるOsNKCC1はカリウム取り込み能を有していることや、塩ストレス下でもナトリウムをあまり蓄積しないイネ品種においては塩ストレスによってOsNKCC1遺伝子の発現量が増加していたことから、OsNKCC1はカリウム取り込みに重要であることが分かった。AtNKCC遺伝子内へのランダム変異の導入を行ったが、輸送能が変化した変異体の単離には至っていない。

研究成果の概要(英文)：To improve salinity tolerance in plants, functional characterization of NKCC, which is responsible for uptake of sodium, potassium and choline, was conducted in this study. AtNKCC gene was highly expressed in the root tip regions, and its expression was inducible by potassium deficiency. OsNKCC1, a homolog of AtNKCC in rice, showed the ability for potassium uptake in yeast. Furthermore, a low-Na accumulating rice variety induced expression of the OsNKCC1 gene in response to salinity stress, suggesting that OsNKCC1 participates in potassium uptake in rice. Random mutagenesis was used to understand molecular mechanisms of sodium and potassium transport by AtNKCC. So far, important amino acid residues of AtNKCC for substrate transport have not been identified.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：塩ストレス ナトリウム カリウム シロイヌナズナ イネ

1. 研究開始当初の背景

過剰量の塩分(主にナトリウム)が土壌に蓄積されることで発生する塩ストレスは植物の生産性を減じるため、植物の耐塩性を向上させる試みは重要である。塩ストレスが植物の生育を抑制する機構としては、土壌中に蓄積された高濃度の塩分による浸透圧ストレスや体内に高濃度のナトリウムが蓄積されることによるイオンストレスが挙げられる。また土壌中に過剰量のナトリウムが存在すると、カリウムの吸収量が低下することが知られている。カリウムは窒素やリンと並び、植物にとっての多量必須元素であり、その要求量は他の必須元素よりも多い。よって、カリウム吸収量の低下は植物の生産性の減少にもつながる。植物の耐塩性を向上させるためには、塩ストレス下において植物体内に流入するナトリウム量を減少させる一方で、カリウム吸収量を増加させることが有効であると考えられる。つまり、植物の根において土壌からのナトリウムやカリウムの吸収を担っている輸送体タンパク質を同定し、その機能改変を行うことが重要である。本研究では、植物細胞内へのナトリウムやカリウム、塩素の共輸送を担う NKCC 輸送体 (Na-K-Cl Cotransporter) に着目し、その機能解析を行うことで植物の耐塩性向上のための基盤を築く。

2. 研究の目的

NKCC は植物細胞内へのナトリウムやカリウムの取り込みを担う輸送体である。塩ストレス下において、NKCC はナトリウムの取り込みに寄与しているため、NKCC 遺伝子のノックアウトはナトリウム吸収量の減少につながり、耐塩性の向上にも寄与する。しかしながら NKCC 遺伝子のノックアウトは必須元素であるカリウム吸収量の減少にもつながる。もし NKCC の機能改変を行うことで、低ナトリウム吸収・高カリウム吸収型の NKCC を創出することができれば、植物の耐塩性に大きく寄与しうることが期待される。本研究ではシロイヌナズナやイネなどのモデル植物を用いて NKCC 遺伝子の発現様式や機能解析、機能改変を行うことで、NKCC 機能のファインチューニングによる植物の耐塩性向上を図る。

3. 研究の方法

(1) *AtNKCC*、*OsNKCC* 遺伝子の発現解析

AtNKCC 遺伝子上流プロモーター領域 2 kb を用いたプロモーター-GUS 系統を作出して、*AtNKCC* 遺伝子の組織特異的発現部位を調べた。またイネにおける *AtNKCC* ホモログ遺伝子である *OsNKCC1* および *OsNKCC2* 遺伝子の発現解析を qRT-PCR 法により行った。

(2) *AtNKCC* 変異株を用いたトランスクリプトーム解析

NKCC 機能喪失が与える影響を調べるため

に、シロイヌナズナの *AtNKCC* 変異株を用いたマイクロアレイ解析を行った。

(3) ナトリウム蓄積量が異なるイネ品種群の選抜

イネ在来品種群(約 100 品種)を用いて塩ストレス下でナトリウム蓄積量が高い品種と低い品種を選抜した。さらに選抜された品種を用いて塩ストレス下における *OsNKCC* 遺伝子群の発現量の比較解析を行った。

(4) *AtNKCC* 機能の相補性試験

シロイヌナズナの *AtNKCC* 変異株に *AtNKCC* 遺伝子を導入し、相補性試験を行った。

(5) *AtNKCC* 遺伝子内へのランダム変異の導入と酵母発現系を用いた選抜

ナトリウムやカリウム輸送に関わる重要なアミノ酸残基の同定を行うために、*AtNKCC* 遺伝子内にランダム変異を導入し、ナトリウムやカリウム輸送体遺伝子が欠損した酵母変異株 (AB11c 株および CY162 株) を用いた選抜を行った。

4. 研究成果

シロイヌナズナを用いたプロモーター-GUS 解析の結果、*AtNKCC* 遺伝子は特に根の先端部位でその強い発現が確認された。またカリウム欠乏ストレス下では、*AtNKCC* 遺伝子の強い発現誘導が確認されたことから、根の先端部位において、*AtNKCC* はカリウムの取り込みに寄与していることが推察された。

シロイヌナズナの *AtNKCC* 変異株を用いて野生株との比較トランスクリプトーム解析を行ったところ、変異株では *AtCNGC8* や *AtPGP1* の発現量の増加とともに *AtHAK5* や *AtCHX1* の発現量の減少がみられた。HAK5 はカリウムの取り込みに、また CNGC8 や CHX1 はカチオンの輸送に関わっていることから、*AtNKCC* の機能喪失下でのイオン恒常性を維持するために、これら輸送体遺伝子の発現量を変化させたものと考えられる。今後、これら遺伝子産物の機能同定や *AtNKCC* との二重変異体の機能解析を行う必要がある。また *AtNKCC* 変異株は野生株と比較して、非ストレス下では生育量が低下する表現型を示すが、*AtNKCC* 遺伝子の導入による相補性試験を行ったところ、表現型の回復がみられた。

イネ在来品種群から塩ストレス下においてナトリウム蓄積量が異なる品種を選抜した。ナトリウム蓄積量が高い品種と低い品種において *OsNKCC* 遺伝子群の発現解析を行った。*OsNKCC1* 遺伝子の発現が低ナトリウム蓄積型品種で塩ストレスにより誘導されることが分かった。酵母発現系を用いた機能解析を行ったところ、*OsNKCC1* はカリウムの取り込み能を有していることが明らかになったことから、*OsNKCC1* は塩ストレス下においてナトリウムよりはむしろカリウム

の取り込みに寄与していることが分かった。
ナトリウムとカリウムの取り込みに寄与している *AtNKCC* 遺伝子の機能改変を行うために、error-prone PCR 法によるランダム変異を *AtNKCC* 遺伝子内に導入し、酵母発現系を用いた選抜を行った。これまでのところ、*AtNKCC* によるナトリウムとカリウム取り込みに関する表現型が大きく異なる変異体の単離には至っていないため、引き続き輸送機能が改変された *AtNKCC* 変異体の単離を行う必要がある。

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9件)

Assaha DVM, Liu L, Mekawy AMM, Ueda A, Nagaoka T, Saneoka H (2015) Effect of salt stress on Na accumulation, antioxidant enzyme activities and activity of cell wall peroxidase of huckleberry (*Solanum scabrum*) and eggplant (*Solanum melongena*). *International Journal of Agriculture and Biology* **17**: 1149-1156. (査読有)

Mekawy AMM, Assaha DVM, Yahagi H, Tada Y, Ueda A, Saneoka H (2015) Growth, physiological adaptation, and gene expression analysis of two Egyptian rice cultivars under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **87**: 17-25. (査読有)

Ueda A, Saneoka H (2015) Characterization of the ability to form biofilms by plant associated *Pseudomonas* species. *Current Microbiology* **70**: 506-513. (査読有)

Assaha DV, Mekawy AM, Ueda A, Saneoka H (2015) Salinity-induced expression of HKT may be crucial for Na⁺ exclusion in the leaf blade of huckleberry (*Solanum scabrum* Mill.), but not of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **460**: 416-421. (査読有)

Kondo T, Fujikawa Y, Ueda A, Nagaoka T, Saneoka H, Martínez M, Calcaño M, Martich JDH, Esaka M (2015) Cloning and gene expression analysis of ascorbic acid biosynthesis enzymes in *Moringa oleifera*. *African Journal of Agricultural Research* **10**: 2274-2285. (査読有)

Liu L, Nguyen NT, Ueda A, Saneoka H (2014) Effects of 5-aminolevulinic acid on Swiss chard (*Beta vulgaris* L. subsp. *cicla*) seedling growth under saline conditions. *Plant Growth Regulation* **74**: 219-228. (査読有)

Ueda A, Yahagi H, Fujikawa Y, Nagaoka T, Esaka M, Calcaño M, Martínez M, Martich JDH, Saneoka H (2013) Comparative physiological analysis of salinity tolerance in rice. *Soil Science and Plant Nutrition* **59**: 896-903. (査読有)

Assaha DVM, Ueda A, Saneoka H (2013) Comparison of growth and mineral accumulation of two solanaceous species, *Solanum scabrum* Mill. (huckleberry) and *S. melongena* L. (eggplant), under salinity stress. *Soil Science and Plant Nutrition* **59**: 912-920. (査読有)

Liu L, Ueda A, Saneoka H (2013) Physiological responses of white Swiss chard (*Beta vulgaris* L. subsp. *cicla*) to saline and alkaline stresses. *Australian Journal of Crop Science* **7**: 1046-1052. (査読有)

[学会発表](計18件)

宗廣理子, 上田晃弘, 実岡寛文, 塩類腺はローズガラスの耐塩性に寄与しているのか?, 日本土壌肥料学会2015年度関西支部講演会, 2015年12月11日, メルパルク松山(松山市).

Mekawy AMM, Assaha DVM, Munehiro R, Ueda A, Saneoka H. Characterization of a

type 3 metallothionein-like gene (*OsMT3-a*) from rice through functional screening in *Escherichia coli*, and its overexpression enhanced its tolerance to salinity and heavy-metal stresses, 日本土壤肥料学会2015年度関西支部講演会, 2015年12月11日, メルパルク松山(松山市).

Assaha DVM, Akahori T, Mekawy AMM, Ueda A, Saneoka H. The co-expression of *SOS1* and *HKT* genes in *Solanum scabrum* Mill. is important for reducing Na transport to the leaf blade and in maintaining low Na^+/K^+ ratios under saline and alkaline stress conditions, 日本土壤肥料学会2015年度関西支部講演会, 2015年12月11日, メルパルク松山(松山市).

中野瑞己, 上田晃弘, 実岡寛文. トランスポゾン変異による難溶性リン可溶化細菌のバイオフィーム形成能力の向上, 日本土壤肥料学会2015年度京都大会, 2015年9月9日~9月11日, 京都大学(京都市). 宗廣理子, 上田晃弘, 実岡寛文. ローブグラス在来品種群の塩ストレス下における塩類排出特性の解明, 日本土壤肥料学会2015年度京都大会, 2015年9月9日~9月11日, 京都大学(京都市).

Assaha DVM, Mekawy AMM, Ueda A, Saneoka H. Salinity-induced expression of *SsHKT* may be crucial for Na^+ exclusion from the leaf blade in huckleberry (*Solanum scabrum* Mill.), 日本土壤肥料学会2014年度関西支部講演会, 2014年12月11日, サポートホール高松(高松市).

Mekawy AMM, Assaha DVM, Yahagi H, Tada Y, Ueda A, Saneoka H. Growth, physiological adaptation and gene expression analysis of two Egyptian rice cultivars under salt stress, 日本土壤肥料学会2014年度関西支部講演会, 2014年12月11日, サポートホール高松(高松市). 赤堀巧, 若林幹太, 上田晃弘, 前田照夫, 小櫃剛人, 実岡寛文. 低フィチンダイズ添加飼料を給与した家禽の成長とそれから排出された鶏糞が小松菜の生育に及ぼす影響, 日本土壤肥料学会2014年度東京

大会, 2014年9月9日~9月11日, 東京農工大学(府中市).

若林幹太, 原由枝, 赤堀巧, 上田晃弘, 実岡寛文. 低フィチンダイズの生産性と栽培学的特性の解明, 日本土壤肥料学会2014年度東京大会, 2014年9月9日~9月11日, 東京農工大学(府中市).

小田泰士郎, 上田晃弘, 実岡寛文. 高オレイン酸ヒマワリの生育と脂肪酸組成に及ぼすN施肥の影響, 日本土壤肥料学会2014年度東京大会, 2014年9月9日~9月11日, 東京農工大学(府中市).

大隅彰太, 上田晃弘, 実岡寛文. 塩ストレス下における耐塩性野生トマトの生理学的特徴, 日本土壤肥料学会2014年度東京大会, 2014年9月9日~9月11日, 東京農工大学(府中市).

多田祐真, 矢萩裕之, 上田晃弘, 実岡寛文. 生殖生長期における耐塩性イネ品種の選抜, 日本土壤肥料学会2014年度東京大会, 2014年9月9日~9月11日, 東京農工大学(府中市).

松本真由美, 上田晃弘, 実岡寛文. イネの塩ストレス馴化機構の解明, 日本土壤肥料学会2014年度東京大会, 2014年9月9日~9月11日, 東京農工大学(府中市).

秋吉智紀, 上田晃弘, 藤川愉吉, 長岡俊徳, 江坂宗春, 実岡寛文, Calcaño M, Martínez M. 熱帯樹木モリンガの葉位別成分濃度の変動と地上部切除が生産性に及ぼす影響, 日本土壤肥料学会2013年度関西支部会, 2013年11月28日, KKRあさくら(山口市).

熊谷菜里, 若林幹太, 上田晃弘, 実岡寛文. リン酸施肥量が穀類子実へのフィチン酸の集積に及ぼす影響, 日本土壤肥料学会2013年度関西支部会, 2013年11月28日, KKRあさくら(山口市).

Yahagi H, Tada Y, Mekawy AMM, Junrey AC, Aniceta BD, Glenn GB, Ueda A, Saneoka H. Screening of low Na accumulating rice cultivars under salinity stress, 日本土壤肥料学会2013年度名古屋大会, 2013年9月11日~13日, 名古屋大学(名古屋市).

実岡寛文，松山豪紀，若林幹太，上田晃弘．低フィチンダイズの生育，窒素固定および子実生産に及ぼすリン酸施肥の影響，日本土壤肥料学会2013年度名古屋大会，2013年9月11日～13日，名古屋大学（名古屋市）．

多田祐真，矢萩裕之，上田晃弘，実岡寛文．異なるイネ品種間に見られる塩ストレス応答機構の差異，平成25年度日本作物学会中国支部講演会，2013年7月30日，県立広島大学（庄原市）．

〔図書〕（計0件）

6．研究組織

（1）研究代表者

上田 晃弘（UEDA AKIHIRO）

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：10578248