

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17078003

研究課題名（和文）浸透圧ストレス応答性トランスポーター遺伝子の発現機構と機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of stress-responsive transporter genes in plants

研究代表者

篠崎 和子 (SHINOZAKI KAZUKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30221295

研究成果の概要（和文）：（200字程度）

我々は、浸透圧ストレス条件下で、ストレス耐性に関与すると考えられる多数の植物輸送体遺伝子の発現が上昇することを明らかにした。シロイヌナズナ浸透圧ストレス誘導性単糖トランスポーター様遺伝子 ESL1 は液胞膜に局在性を示し、その局在には N 末端アミノ酸モチーフが必須であった。細胞膜局在性変異型 ESL1 をタバコ培養細胞に導入し、駆動力としてプロトン勾配を必要としない促進拡散型低親和性グルコース輸送体であることを明らかにした。浸透圧誘導性カリウムトランスポーター KUP6 の発現様式と組織特異性、タンパク質の細胞膜局在性を明らかにし、KUP6 高発現体は乾燥ストレス耐性が向上することを示した。また、低温ストレス応答性遺伝子 *Cor413* ファミリー遺伝子 *IM1*、*IM2*、*PM1* 遺伝子について発現様式と組織特異性、タンパク質の細胞内局在性を明らかにした。シロイヌナズナ浸透圧ストレス誘導性ヒスチジンキナーゼ遺伝子 *AHK1* について、その欠損変異体および過剰発現体の解析を行った結果、*AHK1* が浸透圧ストレスを受容し耐性の獲得に働く遺伝子群の発現を正に制御する浸透圧センサーであることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Plants respond to survive under water-deficit conditions via a series of physiological, cellular, and molecular processes culminating in stress tolerance. Plants accumulate osmolites, such as sugars, amino acids and potassium, during osmotic stress. We identified various transporter genes were upregulated during osmotic stress in *Arabidopsis*. We analyzed an osmotic stress-inducible sugar transporter, ESL1, from *Arabidopsis*. ESL1 is mainly expressed in pericycle and xylem parenchyma cells. The fluorescence of ESL1-GFP-fused protein was detected at tonoplast in transgenic plants. Alanine-scanning mutagenesis revealed that an N-terminal LXXXLL motif in ESL1 was essential for its localization at the tonoplast. Transgenic tobacco BY-2 cells expressing mutated ESL1, which was localized at the plasma membrane, showed the uptake ability for monosaccharides. The value of  $K(m)$  for glucose uptake activity of mutated ESL1 in the transgenic BY-2 cells was extraordinarily high, and the transport activity was independent from a proton gradient. These results indicate that ESL1 is a low affinity facilitated diffusion transporter. We also analyzed an *Arabidopsis* stress-inducible potassium transporter, KUP6. The localization of KUP6-GFP was observed at plasma membrane. *KUP6*-overexpressing transgenic plants showed less transpirational water loss and increased tolerance to drought stress. Furthermore, we also analyzed *Arabidopsis* stress-inducible transporter-like proteins, Cor413 family, whose expression was regulated by DREB1A during cold stress. COR413-IM1 and COR413-IM2.1 were localized at the chloroplast membrane, while COR413-PM1 was localized at ER. Furthermore, we used both gain- and loss-of-function analysis of a histidine kinase, AHK1, and showed that it acts as a positive regulator in osmotic stress signaling in *Arabidopsis*. Overexpression of AHK1 improved the drought tolerance of transgenic plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	12,000,000	0	12,000,000
2006年度	12,000,000	0	12,000,000
2007年度	12,000,000	0	12,000,000
2008年度	12,000,000	0	12,000,000
2009年度	12,000,000	0	12,000,000
総計	60,000,000	0	60,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境ストレス応答

### 1. 研究開始当初の背景

植物は移動の自由を持たないため、厳しい環境変化を耐え抜いて生長分化を続けていかなければならない。植物を取り巻く環境因子の中で、乾燥等の浸透圧ストレスは陸上植物にとって生存に関わる重要な因子の一つである。植物は浸透圧ストレスをうけると、イオン環境の恒常性維持や、ストレス耐性の獲得に関わる物質を細胞内に蓄積する等して環境変化に柔軟に適応している。これまでに、浸透圧ストレス時には数種のイオンチャネルや代謝産物の膜輸送体が機能することが明らかにされてきた。さらに、植物体全体でストレス時にどのようなトランスポーターが発現し機能するのかについて、その詳細と制御メカニズムを解析することで植物のストレス耐性機構が解明できると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では全ゲノム配列が同定され、ゲノム全体の遺伝子発現を解析することが可能になったシロイヌナズナとイネを用いて、網羅的にストレス時に発現が変化するトランスポーターを同定する。また、同定された遺伝子群の詳細な発現機構を解析する。また、分子生物学的または生化学的手法を用いて、これらのトランスポーターの機能を解明するとともに、ストレス時の植物体のイオン環境の恒常性維持機構や、ストレス耐性獲得における膜輸送系の役割を明らかにする。ストレス時に機能するトランスポーターの網羅的解析により、ストレス時において種々のトランスポーター遺伝子の発現誘導がもたらす植物細胞でのダイナミックなイオンや代謝産物の動きを解明する。

### 3. 研究の方法

乾燥・塩ストレス処理したシロイヌナズナを材料として 22k オリゴマイクロアレイ解析を行い、乾燥・塩ストレス条件で発現している浸透圧ストレス誘導性のトランスポーター遺伝子を選抜した。また、これらのトランスポーターの構造をこれまで同定されているトランスポーターと比較することで機能を類推して、より重要性が高いと考えられる遺伝子を選抜した。

選抜されたそれぞれの遺伝子について、乾燥や塩および低温ストレス処理を行った植物を用いて、ノーザンブロットおよび定量的 RT-PCR 法を用いて詳細な発現様式の解析を行った。また、これらの遺伝子のプロモーターに連結した GUS レポーター遺伝子を形質転換したシロイヌナズナを用いて、トランスポーター遺伝子群の植物体における発現の組織特異性を解析した。次に、トランスポーター遺伝子のコード領域に GFP を連結したタンパク質を、35SCaMV プロモーターおよびトランスポーター遺伝子自身のプロモーターの発現制御下で発現するシロイヌナズナを用いて、ストレス誘導性トランスポーター遺伝子群のストレス下における細胞内局在性の解析を行った。さらに、ストレス誘導性トランスポータータンパク質の機能を明らかにするために、トランスポータータンパク質を発現する酵母株および形質転換植物体を用いて、トランスポーターの輸送活性を解析した。また、ストレス条件下における糖トランスポーターの機能と糖蓄積の協調性を明らかにするために、液胞型インベルターゼ遺伝子の発現様式の解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ESL1 および ERD6 の発現様式の解析

シロイヌナズナ 22k オリゴマイクロアレイより、100 個以上のトランスポーター遺伝子

群が強い発現誘導を示すことが明らかになった。これらの遺伝子がシロイヌナズナの浸透圧ストレス耐性獲得に関与すると考えられた。選抜された乾燥誘導性トランスポーター様遺伝子群には、乾燥ストレス条件下で初期に発現誘導する単糖トランスポーター様遺伝子 *ERD6* (EARLY-RESPONSIVE to DEHYDRATION 6)の相同遺伝子群である、*ERD6* ファミリー遺伝子が存在しており、*ERD6* ファミリーの浸透圧ストレス耐性における機能について解析を行った。*ERD6* と分子系統的に最も近縁である遺伝子 *ESL1* (*ERD SIX-LIKE 1*) は、*ERD6* 様ファミリーの中で最も強いストレス誘導性を示した。*ERD6*(*AT1g08930*)、*ESL1*(*AT1g08890*)、*AT1g08900*、*AT1g0892*について、これらのトランスポーター遺伝子群の植物体における発現様式をノーザンブロットにより明らかにした。その結果、これらの遺伝子は乾燥・塩・低温ストレス条件下で強く発現誘導することが明らかになった(図1)。さらに、*ERD6* ファミリー遺伝子のプロモーター活性の組織特異性を明らかにした。*ERD6* ファミリー遺伝子の多くが浸透圧ストレス誘導性を示し、根において、*ESL1* は内皮、内鞘、木部柔細胞に、*ERD6* は表皮と皮層で発現していることが示された。

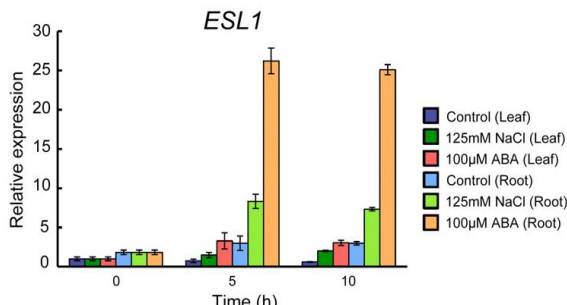


図1. *ESL1* の発現様式

(2) *ESL1* および *ERD6* の単糖輸送活性の解析

タバコ懸濁培養細胞 BY-2 を用いて *ESL1* および *ERD6* 過剰発現細胞を作製し、単糖輸送活性を測定した。*ESL1* 過剰発現細胞はコントロール細胞と比べてグルコース輸送活性に差は見られなかった。これは *ESL1* が液胞膜に局在していることによると考えられたので、細胞膜局在型の *ESL1*(*LLL/AAA*)過剰発現細胞を作製しグルコース輸送活性を測定した。その結果、コントロール細胞に比べて有意にグルコースを吸収することが示された(図2)。*ESL1*(*LLL/AAA*)のグルコース輸送の  $K_m$  値は 102mM であった(図3)。次に *ERD6* 過剰発現細胞を作製し、同様にグルコース輸送の  $K_m$  値を測定した結果、309mM であり、*ESL1* と *ERD6* は低親和性の単糖トランスポーターであることが示され

た。

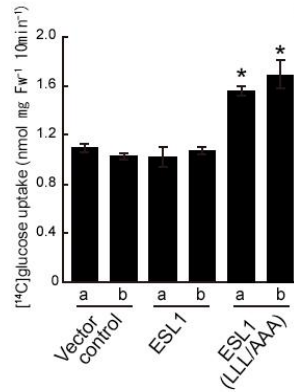


図2. *ESL1* および *ESL1* (*LLL/AAA*) のグルコース輸送活性

*ESL1*(*LLL/AAA*)および *ERD6* 過剰発現細胞では CCCP を添加してもグルコース輸送活性に変化が見られなかったことより、*ERD6* 様ファミリーの輸送機構は二次的能動輸送ではなく促進拡散であるということが示唆された。

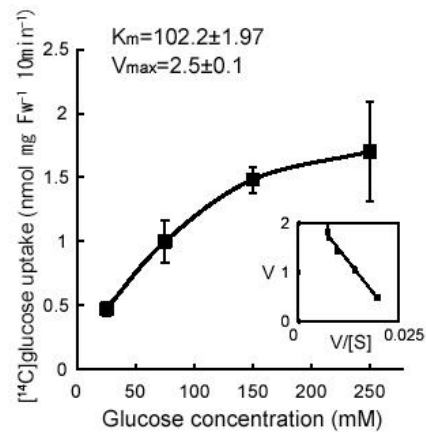


図3. *ESL1* (*LLL/AAA*) のグルコース輸送におけるカインेटクス解析

(3) 液胞型インベルターゼ遺伝子の解析

*ESL1* は液胞膜局在であるため、浸透圧ストレス下における液胞内の単糖の質的量的な変化を明らかにすることは、*ESL1* の機能を明らかにするために重要であると考えられた。液胞内の単糖生成経路の1つとして液胞型インベルターゼによるスクロースの分解に着目した。浸透圧ストレス下における液胞型インベルターゼの活性を測定した結果、乾燥、高塩、ABA 処理によって活性上昇が生じることが示された。このことより、浸透圧ストレス下で液胞内により高濃度の単糖が蓄積することが予測された。シロイヌナズナには液胞型インベルターゼ遺伝子として *Atβfruct3*、*Atβfruct4* の2遺伝子が存在する。

RNA ブロット解析により *Atβfruct3* は浸透圧ストレス誘導性遺伝子であることが示された。また、定量的 RT-PCR 法および *GUS* 遺伝子を用いたプロモーター解析により *Atβfruct3* の発現の組織特異性を解析した結果、*Atβfruct3* は根において mRNA の蓄積が高く、またプロモーター活性は表皮、皮層、内皮で強く、中心柱で弱いことが明らかになった。液胞型インベルターゼ遺伝子の組織特異的発現は *ESL1* と一部重なっており、協調的な働きを示すことが示唆された。

#### (4) 浸透圧ストレス応答性カリウムトランスポーター *KUP6* の機能解析

カリウムイオントランスポーター *KUP6* は植物、酵母、大腸菌に広く存在する *KUP/HAK/KT* ファミリーに属し、乾燥・塩ストレス条件およびアブシシン酸 (ABA) 処理で発現が誘導される。*KUP6pro:GUS* を植物に導入し発現組織特異性を解析した結果、*KUP6* プロモーターは根の維管束組織で強い発現を示した。*KUP6-GFP* を導入した植物において *KUP6* は細胞膜局在性を示した。*KUP6* および相同性遺伝子 *KUP8* の二重変異体 *kup6kup8* は通常の生育条件下で根毛及び側根数が増大しており、さらに、その側根形成はオーキシンに高感受性を示し、ABA およびオーキシン輸送阻害剤 *NPA* に対し非感受性を示した。また、*KUP6* を恒常的に高発現する形質転換シロイヌナズナの成熟葉では水分損失が低下しており、土植えた形質転換体は、長期の乾燥ストレスに対し耐性の向上を示した。一方、*kup6kup8* の気孔閉鎖における ABA 応答性は低下しており、成熟葉の水分損失は増大していた。以上の結果より、*KUP6* は植物体の成長制御および浸透圧ストレス応答に重要な機能を持つカリウム輸送体であることが考えられた。

#### (5) 転写因子 *DREB1A* に制御されるトランスポーター遺伝子 *Cor413* の機能解析

低温ストレス応答性転写因子 *DREB1A* により制御される *Cor413* 遺伝子ファミリーは、植物の低温ストレス耐性に何らかの機能を有していると考えられる。RNAi 法を用いて *Cor413* 遺伝子ファミリーに属する *IMI* および *IM2* 遺伝子の二重機能欠損形質転換体を作成した。RNA ブロット法により、この形質転換体の複数のラインにおいて 2 つの遺伝子の発現が抑制されていることを明らかにした。*IMI* *IM2* 機能欠損体は、凍結ストレスに対して野生型株と比べて差が見られず、これらの遺伝子は凍結耐性には関与していないことが示唆された。一方で、凍結しない程度の低温スト

レス下で機能欠損体を長期間生育させると、高濃度のアントシアニンを蓄積した。以上のことから *Cor413* タンパク質は低温条件下の光障害に関与している可能性が考えられた。

#### (6) 浸透圧ストレス誘導性のヒスチジンキナーゼ *AHK1* 遺伝子の機能解析

乾燥や塩ストレスによって誘導されるシロイヌナズナのヒスチジンキナーゼ遺伝子 *AHK1* について、その欠損変異体および過剰発現体の解析を行った結果、*AHK1* が浸透圧ストレスを受容して、耐性の獲得に働く遺伝子群の発現を正に制御する受容体であることを示した。*AHK1* 遺伝子高発現体は乾燥や塩ストレスが向上することが明らかになった。

#### 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 9 件)

1. Osakabe, Y., Mizuno, S., Tanaka, H., Maruyama, K., Osakabe, K., Todaka, D., Fujita, Y., Kobayashi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Overproduction of the membrane-bound receptor-like protein kinase1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 285(12), 9190-9201.
2. Yamada, K., Osakabe, Y., Mizoi, J., Nakashima, K., Fujita, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Functional analysis of an *Arabidopsis thaliana* abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. *J. Biol. Chem.* 285(2), 1138-1146.
3. 佐久間洋・篠崎和子 (2007) 水分・温度ストレスに応答した転写制御ネットワーク. 蛋白質 核酸 酵素 52(6), 543-549.
4. Tran, L.-S. P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Functional analysis of *AHK1/ATHK1* and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought and salt stresses in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 20623-20628.
5. Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 781-803.

[学会発表] (計 3 2 件)

1. 刑部祐里子・桂彰吾・有永直子・山田晃嗣・田中秀典・Seo Souk・小平憲祐・篠崎一雄・篠崎和子 (2010) シロイヌナズナにお

- るカリウムトランスポーターKUP6を介した浸透圧ストレス応答と成長制御. 第51回日本植物生理学会年会, 3月18-21日, 熊本.
2. 金井要樹・圓山恭之進・山田晃嗣・城所聡・篠崎一雄・篠崎和子 (2010) シロイヌナズナの転写因子 DREB1A が制御するCOR413 ファミリータンパク質の解析. 第51回日本植物生理学会年会, 3月18-21日, 熊本.
  3. Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Plant response and tolerance under abiotic stress conditions. International Symposium on Plant Membrane Transport, Mar 12-13, Tokyo.
  4. 山田晃嗣・刑部祐里子・溝井順哉・中島一雄・藤田泰成・篠崎一雄・篠崎和子 (2009) シロイヌナズナの浸透圧ストレス誘導性単糖トランスポーターの機能解析. 第32回日本分子生物学会年会, 12月9-12日, 横浜.
  5. 篠崎和子 (2009) 植物の環境ストレス応答と耐性獲得の分子機構. 第81回岩手大学COEフォーラム, 3月5日, 盛岡.
  6. 山田晃嗣・刑部祐里子・溝井順也・且原真木・笠原道弘・篠崎一雄・篠崎和子 (2008) シロイヌナズナの浸透圧ストレス誘導性糖トランスポーターERD6の機能解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 12月9-12日, 神戸.
  7. Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Membrane bound regulators in plant response and tolerance to abiotic stress. International Symposium on Plant Membrane Transport -New development of the Membrane transporter research-, Dec. 8, Tokyo, Japan.
  8. Arinaga, N., Osakabe, Y., Yamada, K., Maruyama, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Functional analysis of an osmotic stress-inducible potassium transporter, *KUP6*, in *Arabidopsis*. 7<sup>th</sup> APSRC International Symposium: Abiotic Stress and Plant Growth and Development, Nov 8, Gwangju, Korea.
  9. Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2007) Regulatory networks of gene expression in abiotic stress responses in *Arabidopsis* and rice. 2007 International Symposium on Plant Stress and Metabolism & Annual Meeting of the KSABC, Oct 11-13, Gyeongju, Korea.
  10. Yamada, K., Osakabe, Y., Maruyama, K., Fujita, Y., Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Functional analysis of osmotic stress-inducible sugar

transporter genes in *Arabidopsis*. 2007 International Symposium on Plant Stress and Metabolism & Annual Meeting of the KSABC, Oct 11-13, Gyeongju, Korea.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠崎 和子 (SHINOZAKI KAZUKO)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：30221295

### (2) 研究分担者

刑部 祐里子 (OSAKABE YURIKO)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・講師  
研究者番号：50444071