

平成23年 5月 20日現在

機関番号： 82401

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21870045

研究課題名（和文）

カリウム欠乏の感知・応答に関わる植物シグナル伝達因子の解明

研究課題名（英文）

Elucidating signaling components under low potassium conditions

研究代表者

申 怜 (SHIN RYOUNG)

独立行政法人理化学研究所・機能調節研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号： 80525577

研究成果の概要（和文）：

AtHAK5 promoter::luciferase (HAK5pro::LUC) のシロイヌナズナ株に FOX(Full-length cDNA over-expressor genes)ライブラリを導入してスクリーニングを行った。完全な栄養条件下で、高いルシフェラーゼ活性を示す 200 以上の遺伝子組み換え植物体を選抜し、そのうち 15 系統の遺伝子組み換え植物体を分析。過剰発現している遺伝子の確認をし、栄養欠乏状態での発現パターンを調査した。また、WRKY 転写因子の過剰発現植物体を作製。WRKY 転写因子(TF)の過剰発現植物体はカリウム不足条件に耐性を示すことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Arabidopsis FOX (Full-length cDNA over-expressor genes) *agrobacterium* libraris were transformed into established *AtHAK5 promoter::luciferase Arabidopsis* plants. These *AtHAK5 promoter::luciferase* plants with FOX library have been screened and more than 200 candidate transgenic plants that have higher luciferase activity under full nutrient condition have been isolated. Among them, fifteen lines were analyzed to determine which gene is overexpressed, and some candidates were analyzed for their expression in response to nutrient deficiency. The overexpression plants and knockout plants of WRKY TF were obtained. The overexpression plants showed increased tolerance to potassium deficient condition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

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：カリウムトランスポーター、FOX ライブラリ、栄養欠乏、非生物的ストレス、転写因子

1. 研究開始当初の背景

カリウムは窒素やリンと並んで植物に大量に必要とされる主要栄養素の一つである。土壌中のカリウムの濃度変化は根からのカリウム吸収に影響を及ぼす。土壌中の栄養素が欠乏すると植物の根は生長に必要な量の栄養素を取り込むための様々な戦略を用いる。農作物は高い収量を得るために比較的多量の無機栄養素を必要とするが、栄養素が効率よく根から吸収されないと余剰の肥料は地表や地下水を汚染する原因になる。一方、発展途上国においては十分な量の肥料の入手が困難であり、低濃度の栄養素の下でも高い収量を与える作物が必要とされている。このような背景から、植物が土壌中から栄養素を取り込む能力を強化し、低栄養条件下でも生育できる植物を作り出すことが望まれている。そのためには、栄養素の欠乏時に植物がどのような反応をしているのかを解明することが必須である。

主要栄養素（特にカリウムや窒素）は以下のような特徴をそれぞれ持っている。1) 主要栄養素は、植物の生長や分化のそれぞれの段階で重要な役割を果たしている。2) 窒素は代謝され、様々な分子に取り込まれるが、カリウムは同化されて分子内に取り込まれることはない。3) これらの栄養素は、植物内でそれぞれ異なる役割を果たしており、欠乏時における植物の反応も異なっているが、反応の仕方を明らかにすることで栄養欠乏時の植物の反応を総体的に理解することができる。4) 主要栄養素欠乏時における反応は重要な課題であり、窒素やリン欠乏に関しては過去10年以上にわたり多くのグループが解明に取り組んでいるが、カリウムについてはその重要性にも関わらずあまり理解が進んでいない。栄養欠乏に関するシグナル伝達、つまり、その欠乏を感知・応答するメカニズムとそのシグナルを伝える細胞内の情報伝達経路についてはほとんど解明されていない。カリウム欠乏に対する植物の反応を研究することで、変化する環境に植物がどのように適応しているかについて理解することが出来る。さらに、これらの成果は作物の栄養素の利用効率を改善することにも応用できる。具体的には、栄養素の欠乏はしばしば作物の生長を妨げるきっかけとなり、ひいては収量の低下を引き起こすが、カリウム欠乏を感知して伝えるシグナル経路に関わる因子を見つけ出す

ことは土壌の栄養素を効率的に取り込む作物の開発につながると期待される。このような作物の開発は肥料の使用削減、すなわち農業コストの削減につながるだけでなく、肥料による地質や水質の汚染から環境を保護することにもつながる。同じ量の肥料でより良い生長、つまり収量の増加が見込まれるので、年々重要性の高まっている植物燃料の単価削減にも大きく貢献すると思われる。

2. 研究の目的

カリウムは植物に最も多く含まれる陽イオンであり、植物の生長に必須の栄養素である。カリウムを十分に取り込むために植物はカリウム・イオン・トランスポーター関与する様々なメカニズムを通じてカリウムの吸収・輸送を行っている。カリウムの吸収は植物の生長や収量、ひいては農業コストに直接関わる要因である。また、肥料の過剰投与による土壌や水質の汚染が近年問題になっているため、植物が土壌からより効率的に養分を取り込むことができれば、肥料の使用量を減らすことが可能になり、より高い収穫につなげることが期待できる。植物がカリウムを取り込むメカニズムを解明することは、基礎科学の面からだけでなく農業および環境保護の面からも重要である。アラビドプシス（シロイヌナズナ）の13のカリウムイオン・トランスポーター遺伝子を含むファミリーの中で **AtHAK5** 遺伝子だけがカリウムイオン濃度と相関する発現パターンを示すことを我々は明らかにした。このファミリーの中で **AtHAK5** 遺伝子はカリウム・イオン濃度の低下に伴って遺伝子発現が誘導され、カリウムの供給によって発現が急激に抑制される。**AtHAK5** は高親和性のカリウム吸収とそれに関連したシグナル伝達に関与する主要な因子であることが知られている。我々は **AtHAK5** プロモーターからルシフェラーゼを発現させる融合遺伝子をアラビドプシスに組み込み、この形質転換株において **AtHAK5** とルシフェラーゼの発現が相関していることを確認している。本研究ではアグロバクテリウムを用いてこの遺伝子組換えアラビドプシスに **FOX (Full-length cDNA over-expressor genes)** ライブラリを導入した。**FOX** ハンティング・システムは効率のよい遺伝子クローニング方法である。**FOX** で形質転換したアラビドプシス株の中から高いルシフェラーゼ活性が誘導される植物体を単離することでカリウム吸収・輸送のシグナル伝達に働く因子の単離を試みる。シグナル伝達のメカニズムが解明されることで植物の生長促進と環境保護に

役立つことが期待される。

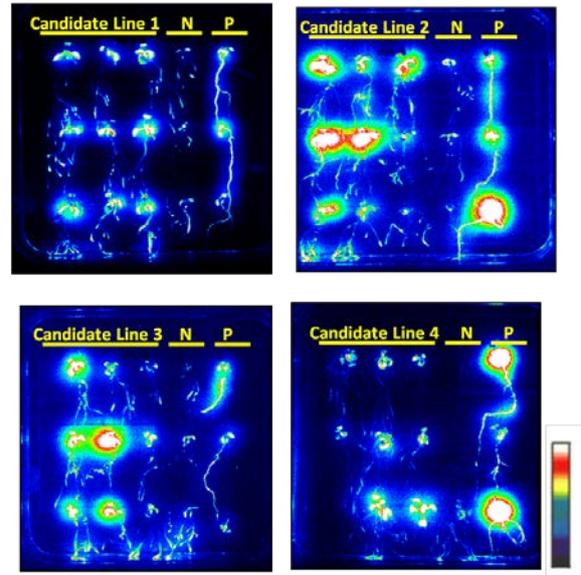
3. 研究の方法

カリウム欠乏を感知し、その情報を伝えるメカニズムに関わる因子を明らかにし、植物体において高親和性のカリウム取り込み機構がどのように制御されているかを明らかにすることを目的とした。そのために AtHAK5 プロモーターと融合したルシフェラーゼ遺伝子(HAK5pro::LUC)を発現するように形質転換されたアラビドプシス株を用いた。この遺伝子組み換えを行ったアラビドプシス株は以前の研究ですでに確立されており、HAK5pro::LUC の発現は十分な栄養条件下ではほとんど検出されないが、カリウムを欠乏させると 6 時間以内に劇的に誘導され、7 日間以上持続する。この遺伝子組み換えれたアラビドプシスに FOX ライブラリーを導入した。それぞれの FOX 遺伝子はハイグロマイシン耐性を選択マーカーとして持つので、FOX が導入された HAK5pro::LUC の組み換え植物はハイグロマイシン培地で選抜することができる。次に高いルシフェラーゼ活性を示す植物体を単離し、内在性 AtHAK5 遺伝子の発現がルシフェラーゼ活性同様に上昇しているかを調べた。この解析は擬陽性の植物体を除くために必要なステップである。その後、ゲノム DNA から PCR によって FOX 遺伝子をクローニングした。選抜され、クローニングされたすべての遺伝子は、それぞれ野生型アラビドプシスで過剰発現させ、AtHAK5 の発現に影響を与えるか否かを確認した。また、これらの遺伝子についてそれぞれ遺伝子欠損植物体を作成し、遺伝子過剰発現株や遺伝子欠損株について、カリウム欠乏の影響を観察した。

4. 研究成果

FOX を導入した AtHAK5promoter::luciferase (HAK5 pro:: LUC)株を作成し、スクリーニングを行った結果、完全な栄養条件下で高いルシフェラーゼ活性を示す 200 以上の遺伝子組み換え植物体を選抜した。2009 年度には 6 系統の遺伝子組み換え植物体でルシフェラーゼ活性および内生 AtHAK5 遺伝子発現の増加を確認した。

そしてそれら遺伝子組み換え植物体の中から 4 つの遺伝子を単離することに成功した。2010 年度には、2009 年度と同様の手法でさらに 17 系統の遺伝子組み換え植物体候補を単離した。2009 年度および 2010 年度の 2 年間で単離した合計 23 系統の遺伝子組み換え植物体候補から HAK5 遺伝子の発現が増加している 15 系統を分析した。2009 年度にはトポイソメラーゼ、原形質膜タンパク、glycine-rich protein、vesicle-associated



Luciferase activities of selected T2 FOX in HAK5pro::luciferase lines. N indicates the negative control which has only HAK5pro::Luciferase. P indicates the positive control that has 35S promoter fused with luciferase.

v-SNARE タンパク ; 2010 年度には、カゼインキナーゼ、F-box タンパクファミリー、auxin signaling F-box タンパク 1、EAR-motif containing タンパク、ACC oxidase 2、lipid transfer protein (LTP protein)、alpha helix membrane protein、tyrosine specific protein phosphatase、WRKY 転写因子 (WRKY TF)、sucrose nonfermenting kinase 3.5 (SnRK3.5) および mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase の分析を終えた。さらに、WRKY TF、SnRK 3.5、ACC oxidase 2 および LTP タンパクの遺伝子発現解析をカリウム欠乏、窒素欠乏、リン欠乏、塩ストレスなどの様々な条件下で実行した。その結果、LTP protein、ACC oxidase 2 および WRKY TF の遺伝子発現は栄養欠乏条件下で特異的に発現されることが判明した。また、作成した WRKY TF の過剰発現植物体および ABRC から入手したノックアウト植物体を用いて、q-PCR および Western blot 分析を行った。その結果、WRKY TF の過剰発現植物体はカリウムが不足した条件下で耐性を示す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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 申 愴, Dissection of Potassium Signaling in *Arabidopsis thaliana*, 21st International Conference on Arabidopsis Research, June 6th-10th 2010, Yokohama, Japan
- ② 申 愴, Identification of Arabidopsis potassium deficient signaling components via full-length cDNA overexpressor (FOX) gene hunting system and AtHAK5, Plant Genomics and Beyond

d, July 6th 2009, Evry, France

- ③ 申 怜, Identification of Arabidopsis potassium deficient signaling components via full-length cDNA overexpressor (FOX) gene hunting system and AtHAK5, 20th International Conference on Arabidopsis Research, July 2nd 2009, Edinburgh, Scotland,

[その他]

ホームページ等

<http://labs.psc.riken.jp/rnru/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

申 怜 (SHIN RYOUNG)

独立行政法人理化学研究所・機能調節研究ユニット・ユニットリーダー

80525577

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし