

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月19日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380044

研究課題名（和文）

高等植物における塩ストレスによるイオン輸送体タンパク質の酸化

研究課題名（英文）

Oxidation of ion transporters induced by salt stress in higher plants

研究代表者

村田 芳行 (Yoshiyuki Murata)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授

研究者番号：70263621

研究成果の概要（和文）：

植物にとって、根からの養分の吸収や気孔での蒸散・ガス交換は、その生育のために不可欠である。また、これらの活動には、多くのイオン輸送体が関与している。中でも、カリウムチャンネルは、植物の全身で機能している極めて重要なイオンチャンネルであり、塩ストレス下での細胞内のカリウムとナトリウムのバランスを維持するために極めて重要なイオン輸送体である。

種々のストレスが引き起こす酸化による傷害は、タンパク質や脂質などの生体成分の酸化や過酸化を介して、細胞の機能不全を引き起こし、動物のイオンチャンネルの酸化は重篤な疾病につながる事が知られている。しかし、植物のイオンチャンネルは、植物の生長やストレス耐性に重要であるにも関わらず、その酸化や酸化による機能不全に関する報告はほとんどない。

本研究では、塩ストレスによって蓄積する活性酸素種やアルデヒドに着目し、イオンチャンネルへの影響について精査した。

研究成果の概要（英文）：

A number of ion transporters are involved in uptake of nutrients from roots and gas exchange of stomata that are vital for higher plants to grow. Potassium channel is one of requisite channels that function on maintenance of ratio of potassium to sodium in salt-stressed plants. Environmental stresses induce oxidative stress to damage physiological function of plant cells. However, cellular mechanisms remain to be clarified.

In this study, we examined effects of reactive oxygen species and aldehydes on plant potassium channels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学

キーワード：塩ストレス、イオン輸送、酸化、タンパク質、チャンネル、パッチクランプ法、二電極膜電位固定法、修飾

## 1. 研究開始当初の背景

植物にとって、根からの養分の吸収や気孔での蒸散・ガス交換は、その生育のために不可欠である。また、これらの活動には、多くのイオン輸送体が関与している。中でも、カリウムチャンネルは、植物の全身で機能している極めて重要なイオンチャンネルである。

一般に、塩ストレス下で植物が生育する上で、細胞内からのカリウム流出は、細胞外からのナトリウムの流入と同様に極めて重要であり、その流出入には、カリウムイオンチャンネルを含むイオン輸送体が関与している。

種々のストレスが引き起こす酸化による傷害は、タンパク質や脂質などの生体成分の酸化や過酸化を介して、細胞の機能不全を引き起こす。これまでに、動物のイオンチャンネルの酸化は、重篤な疾病につながる事が知られている。しかし、植物のイオンチャンネルは、植物の生長やストレス耐性に重要であるにも関わらず、その酸化や酸化による機能不全に関する報告はほとんどない。

このような学術的背景の中、申請者はこれまでに以下のような知見を得てきた。

- (1) 外向きカリウムチャンネル活性の抑制とその発現の抑制が、細胞内からのカリウム流出の抑制を介して、植物の耐塩性を向上させる。(Plant Cell Physiol. 1998a, 1998b, 2000, 2006)
- (2) 原形質膜カルシウム(非選択性カチオン)チャンネル活性が、酸化還元のレベルによって制御されている。(Nature 2000, Plant Cell 2000, Plant Physiol. 2002)
- (3) 適合溶質であるプロリンとグリシンベタインが、活性酸素種除去やアルデヒド除去に関わる酵素の活性化によって、タンパク質の酸化や脂質の過酸化の抑制することによって、塩ストレス下にある植物の生育を改善する。(Soil Sci Plant Nutr. 2000, 2002, 2004, J. Plant Physiol. 2007a, 2007b, 2008, 2009a, 2009b, Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009a, 2009b)

## 2. 研究の目的

本申請研究では、以下の点を明らかにする。

(1) イオンチャンネル活性を直接的に測定できる電気生理学的手法(パッチクランプ法と二電極膜電位固定法)を用いて、塩ストレスによって産生される活性酸素種やアルデヒドによって引き起こされるカリウムチャンネルタンパク質の酸化や修飾が及ぼすチャンネル活性への影響を明らかにする。

(2) MALDI TOF-MSを用いて、(1)チャンネル活性への影響に関与する酸化・修飾されたアミノ酸残基を同定する。(酸化されたアミノ酸残基の同定)

(3) (2)で同定したアミノ酸残基のポイントミューテーションによって、タンパク質の酸化・修飾による活性阻害の原因となるアミノ酸残基を同定する。(活性阻害に関わるアミノ酸残基の同定)

(4) 多くのイオンチャンネルが関与する気孔開閉運動における環境ストレスによるチャンネル酸化による活性変化を明らかにし、蒸散を介した乾燥ストレス耐性についても調査する。(植物の耐性評価)

## 3. 研究の方法

(1) パッチクランプ法によるカリウムチャンネル電流測定: Murataら(2003)の方法に従って、シロイヌナズナ孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャンネル活性を測定した。

(2) 二電極膜電位固定法によるカリウムチャンネル電流測定: Sasakiら(2010)の方法に従って、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたイオンチャンネルタンパク質の活性を測定した。

(3) 活性酸素種(ROS)産生測定:  
2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA)を用いて孔辺細胞内のROS産生を、また、nitro blue tetrazolium (NBT)を用いてロゼッタ葉でのROS産生を測定した。

(4) 気孔閉口と気孔開口測定: Murataら(2001)とMurataら(2003)の方法に従って、気孔閉口と気孔開口を測定した。

(5) 酵素活性測定 : Hoqueら (2008) の方法に従って、グルタチオンS-トランスフェラーゼ活性を測定し、また、Nakanoら (1981) の方法に従ってアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を測定した。

#### 4. 研究成果

以下では、塩ストレスによって植物体内に蓄積するメチルグリオキザールが及ぼすイオンチャンネルを含むタンパク質への影響についてのみ報告する。

塩ストレスによるメチルグリオキザールの蓄積、イオン輸送タンパク質や種々の酵素への影響、メチルグリオキザールによるタンパク質の修飾について調べた。

(1) メチルグリオキザールによって、気孔開口に不可欠な孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャンネル電流が阻害された。(Biosci. Biotechnol. Biochem., 2012)

(2) メチルグリオキザールによって、内向き整流性カリウムチャンネルの一つであるKAT1が阻害された。(Biosci. Biotechnol. Biochem., 2012)

(3) メチルグリオキザールによって、光誘導気孔開口が阻害された。(Biosci. Biotechnol. Biochem., 2012)

(4) メチルグリオキザールによって、気孔閉口が誘導された。(J. Plant Physiol., 2012)

(5) (4)の気孔閉口は、ペルオキシダーゼ阻害剤によって阻害された。また、NADPHオキシダーゼ変異体では野生株と同様の気孔閉口が観察された。(J. Plant Physiol., 2012)

(6) メチルグリオキザールは、イオンチャンネルだけでなく、グルタチオンS-トランスフェラーゼや細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼも阻害した。(Biosci. Biotechnol. Biochem., 2010, J. Biochem. Mol. Toxicol.,

2012)

(7) (6)での阻害は、ナトリウムによる阻害ではなく、メチルグリオキザールによるシステイン残基の修飾によるものであることが示唆された。(Biosci. Biotechnol. Biochem., 2010, J. Biochem. Mol. Toxicol., 2012)

以上の結果より、塩ストレスを含む種々のストレスによる成長阻害の機構の一つとして、ストレスによって生じたメチルグリオキザールがイオン輸送タンパク質や種々のタンパク質を修飾し、活性を阻害することによって、植物の生理的機能を阻害していることが明らかになった。

また、これらタンパク質のシステイン残基の置換によって、メチルグリオキザール耐性ならびにストレス耐性を付与することができる可能性が示唆された。

#### 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5件)

① Hoque, M. A., Uraji, M., Banu, M. N. A., Torii, A., Mori, I. C., Nakamura, Y. and Murata, Y. (2012) Methylglyoxal modification of cytosolic ascorbate peroxidase from *Nicotiana tabacum*. J. Biochem. Mol. Toxicol., 査読有, 26, 315-321.

② Hoque, T. S., Uraji, M., Aodengtuya, Nakamura, Y., and Murata, Y. (2012) Cytotoxic effects of methylglyoxal on seed germination and root elongation in *Arabidopsis*. Plant Biol., 査読有, 14, 854-858.

③ Hoque, T. S., Uraji, M., Ye, W., Hossain, M. A., Nakamura, Y., and Murata, Y. (2012)

Methylglyoxal-induced stomatal closure and peroxidase-mediated ROS production in Arabidopsis. J. Plant Physiol., 査読有, 169, 979-986.

④ Hoque, T. S., Okuma, E., Uraji, M., Furuichi T., Sasaki, T., Hoque, M. A., Nakamura, Y., and Murata, Y. (2012) Inhibitory effects of methylglyoxal on light-induced stomatal opening and inward K<sup>+</sup> channel activity in Arabidopsis. Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 76, 617-619.

⑤ Hoque, M. A., Uraji, M., Banu, M. N. A., Mori, I. C., Nakamura, Y., and Murata, Y. (2010) Effects of methylglyoxal on glutathione S-transferase from Nicotiana tabacum. Biosci. Biotechnol. Biochem., 74, 2124-2126. (査読有)

[学会発表] (計2件)

① ○Tahsina Sharmin Hoque、裏地美杉、Mohammad Anowar Hossain、中村宜督、村田芳行、Physiological Functions of Methylglyoxal in Arabidopsis、第29回日本農芸化学会中四国支部講演会(徳島)、2011年1月22日

② ○Tahsina Sharmin Hoque、裏地美杉、Wenxiu Ye、中村宜督、村田芳行、Methylglyoxal induces stomatal closure

accompanied by peroxidase-mediated ROS production in Arabidopsis、第32回日本農芸化学会中四国支部講演会(鳥取)、2012年1月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 芳行 (Yoshiyuki Murata)  
岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授  
研究者番号：70263621

### (2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：