

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06708

研究課題名(和文)デュアル輸送機能を示す新型アクアポリンの分子機構と生理機能の解明

研究課題名(英文)Molecular Mechanism and Physiological Function of a New Type of Aquaporin Exhibiting Dual Transporting

研究代表者

且原 真木 (Katsuhara, Maki)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：00211847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：水輸送機能と同時にイオン輸送機能も合わせ持つ新型アクアポリン(イオンチャンネルアクアポリン:icAQP)分子について、(1)水透過能だけを失ってイオン透過能を維持する変異や、逆にイオン輸送能を喪失しても水輸送機能に変化のない変異icAQPを同定して水とイオンの透過経路が分子内で異なることを証明し、(2)イオン透過に關与する分子構造を明らかにし、(3)icAQPがイネ根の水透過性とカリウム蓄積、塩ストレス下でのナトリウム流入において機能していることをicAQP欠損イネ系統の解析によって明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型アクアポリン研究は、塩ストレス環境における水輸送とイオン輸送の交点としてのアクアポリンの未解明な役割と機能を明らかにする。これまで別々の分子が担っていると考えられてきた水とイオンの輸送を同一分子で実現している新しい分子機構が見つかり解明された。最終的には新型アクアポリンを利用して、作物の水輸送とイオン輸送とを同時に改良する新しい栽培技術や育種につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We have identified new ion channel aquaporins (icAQPs), which have both water and ion transport functions in barley and rice. (1) We identified a mutated icAQP that causes loss of only water permeability but retains ion permeability and another mutated icAQP that causes loss of ion transport capacity but no change in water transport capacity. These data demonstrate that different water and ion transport pathways in the molecule. (2) We have revealed molecular mechanisms separately for water and ion permeation. (3) We have clarified that icAQP functions in water permeability, potassium accumulation in rice roots, and sodium influx under salt stress by analyzing icAQP-deficient rice lines.

研究分野：植物生理学

キーワード：アクアポリン 水輸送 イオン輸送 イネ オオムギ 塩ストレス 生体膜 イオンチャンネルアクアポリン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化にともなう土壌水分の蒸発増加、人間活動による塩分の高い灌漑水の使用や土壌乾燥化に伴っておこる塩集積等が要因となり、塩類土壌が世界的に増えている。このため植物の耐塩性機構は近年活発に研究されるようになってきている。細胞内の過剰なナトリウムイオン( $\text{Na}^+$ )を細胞外に排出する輸送系や液胞にイオンを隔離する輸送系、浸透圧ストレスに対抗する浸透圧調節物質の合成について先行研究が多くある。しかし細胞への $\text{Na}^+$ 流入に関わる輸送体の実体が何かは未だはっきりしていない。植物細胞に過剰な $\text{Na}^+$ が流入する経路を明らかにして、この流入経路を遮断することができるようになれば、 $\text{Na}^+$ の細胞内蓄積を低下させて耐塩性を向上させる技術につながると期待される。細胞に $\text{Na}^+$ が流入する経路は1つだけではなく、複数のシステムの関与が指摘されている。そのなかで、これまで見落とされていたが実は重要な $\text{Na}^+$ 流入経路があるのではないかと最近考えられるようになった。それが $\text{Na}^+$ 輸送性アクアポリンである。

アクアポリンの主要な輸送基質は水分子であるが、2017年にシロイヌナズナ(アブラナ科)の原形質膜型(PIP)アクアポリンの一部の分子種が $\text{Na}^+$ や $\text{K}^+$ に対する輸送性を持つイオンチャネルアクアポリン(icAQP)であることが報告された。本研究代表者はこの報告を追試して確認すると同時に、水とイオンの輸送活性をデュアルで持つ新型アクアポリンが作物も持つかどうかを調べた。その結果イネおよびオオムギのなかに、 $\text{Na}^+$ 輸送性をもつicAQPがあることを見出した。

### 2. 研究の目的

$\text{Na}^+$ の細胞への流入経路として機能している可能性のある新型アクアポリンの分子機構を解明すること、および細胞と個体のレベルでの作物の耐塩性機構における $\text{Na}^+$ 輸送性アクアポリンの生理的役割を明らかにすることを目的とする。浸透圧ストレスの面から、水吸収の分子機構としてアクアポリンと塩ストレスとの関係がこれまで研究されてきた。しかし耐塩性におけるイオンストレスやイオン輸送制御の面からアクアポリンが研究されたことはなかった。本研究では水とイオンの両方、すなわちデュアルな輸送機能を示す新型アクアポリンの塩ストレス応答と耐塩性機構における役割を、分子、細胞、個体レベルにおいて解明する。最終的には新型アクアポリンを利用して、作物の水輸送とイオン輸送とを同時に改良する新しい栽培技術や育種につながる基盤知見を得ることを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、研究方法に応じて以下の2つ実験課題を設定した。

実験課題(1):  $\text{Na}^+$ 輸送性アクアポリンのイオン輸送特性と分子機構の解明

実験課題(2):  $\text{Na}^+$ 輸送性アクアポリンによる形質転換植物体の解析

#### 3-(1) $\text{Na}^+$ 輸送性アクアポリンのイオン輸送特性と分子機構の解明

$\text{Na}^+$ 輸送性をもつ植物icAQP由来のcRNAを人工合成した。これをアフリカツメガル卵母細胞に顕微注入して卵母細胞の膜上にタンパク質を発現させた。この異種細胞機能発現系は植物の輸送体研究においてユニークかつ有力な手法である。イネとオオムギのすべての原形質膜型アクアポリン(PIPアクアポリン)が水を輸送できることをこの実験系で確認している。水輸送活性は、浸透圧を変化させた時の卵の体積変化を画像解析で算出して流入した水の量を計測するSwelling assay法により定量した。イオン輸送活性、すなわちイオン輸送性はicAQPを発現させた卵母細胞に電極を挿入してイオン輸送をイオン電流として計測する二電極電圧固定(TEVC)法で測定した(図1)。予備実験でオオムギ12分子種、イネ8分子種のアクアポリンをこの方法で調べ、イオン輸送性をもつオオムギHvPIP2;8(図2)とイネOsPIP2;4を見出している。本研究ではまず測定外液を変化させてicAQPのイオン選択性などの輸送特性を解明した。次にicAQP

と非 icAQP を比較して特定のアミノ酸を人為置換した変異 icAQP を作製してイオン輸送活性を測定した。これらの実験から OsPIP2;4 と HvPIP2;8 という一部のアクアポリン分子種だけが Na<sup>+</sup> や K<sup>+</sup> を輸送させる icAQP 活性をもつ分子機構を明らかにする。

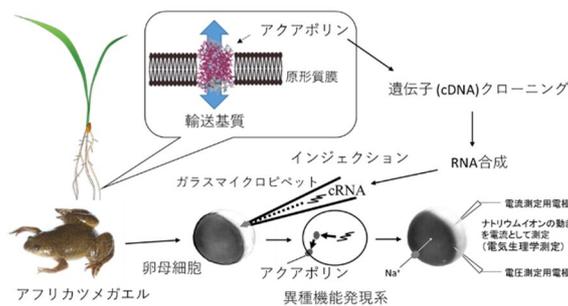


図1 異種機能発現系と電気生理学測定

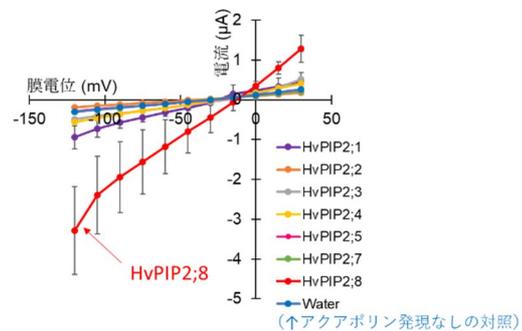


図2 オオムギアクアポリン (HvPIP2s) のイオン電流

### 3-(2) Na<sup>+</sup>輸送性アクアポリンによる形質転換植物体の解析

この項目では Na<sup>+</sup>輸送性アクアポリンとして OsPIP2;4 を取り上げる。OsPIP2;4 のイネ組織中での発現部位については免疫組織化学によって調べた。形質転換体として 35S プロモータによる過剰発現イネと T-DNA 挿入による発現抑制イネを得ている。またクリスパーキャス 9 のシステムによって *OsPIP2;4* 遺伝子の推定上の開始コドンから 40bp 付近をガイド RNA のターゲットサイトと定めた新規ノックアウトシステムも作成した。クリスパーキャス 9 のシステムでは、C-末端付近をターゲットにした機能変異 *OsPIP2;4* 変異体の作成も試みた。イネの形質転換は秋田県立大学へ業務委託した。

これら形質転換植物を塩ストレス環境下で生育させて生体重量やミネラル含量を測定することで塩ストレス応答を調べた。

## 4. 研究成果

### 4-(1) Na<sup>+</sup>輸送性アクアポリンのイオン輸送特性と分子機構の解明

#### HvPIP2;8 のイオン輸送特性解析

NaCl、Choline-Cl、Na-gluconate 溶液中での TEVC 測定から HvPIP2;8 によるイオン電流は Na<sup>+</sup> 輸送によるものであり、Cl<sup>-</sup> 輸送によるものではないことが示された。1価陽イオンを置き換えた外液を使って得られた逆転電位の値からゴールドマンの式を使って Na<sup>+</sup>透過性に対する K<sup>+</sup>透過性の比は 0.93 で、Rb<sup>+</sup>では 0.4 であった。Cs<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>ではイオン電流、すなわち透過性は認められなかった。また2価陽イオンの Ba<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>は HvPIP2;8 の 1価陽イオン輸送を阻害した。Mg<sup>2+</sup>も阻害効果があったが Ca<sup>2+</sup>の阻害効果の半分程度であった。

#### OsPIP2;4 のイオン輸送特性解析

OsPIP2;4 も Cl<sup>-</sup> 輸送活性は持たず陽イオン輸送体であることが示された。また Ca<sup>2+</sup>で Na<sup>+</sup>輸送活性が阻害された。Na<sup>+</sup>透過性に対する K<sup>+</sup>、Rb<sup>+</sup>、Cs<sup>+</sup>の透過性の比はそれぞれ 1.3、0.84、0.78 であった。Li<sup>+</sup>によるイオン電流は観察されなかった。外液の Na<sup>+</sup>や K<sup>+</sup>の濃度を変えてコンダクタンス(抵抗値の逆数)の最大値の半値を示す濃度(見かけの Km)を調べたところ Na<sup>+</sup>については見かけの Km が 24 mM、K<sup>+</sup>については見かけの Km が 23 mM と算出された。

#### 改変 OsPIP2;4 および改変 HvPIP2;8 の作成とイオン輸送/水輸送特性

水輸送性が失われることが既に知られていた OsPIP2;4T227M に加えて、イオン輸送性と非輸送性の PIP アクアポリンのアミノ酸配列比較から以下に示す変異 PIP を作製して水輸送性とイ

オン (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>) の輸送性を調べた。結果は表 1 の通りであった。水輸送とイオン輸送は輸送体分子内で区別される機構によって実行されていることが示唆された。

表 1 ○ : 輸送性あり      : 輸送性低下      × : 輸送性なし      (WT:野生型すなわち非改変)

	OsPIP2;4				HvPIP2;8		
	WT	T227M	A143G	G278K	WT	A147G	F283K
水輸送性	○	×	○	○	○	○	○
イオン輸送性	○	○		×	○		×

アクアポリンは生体膜において四量体で存在している。その分子構造を Homology modeling によって推測した。上部(細胞外)から見た予測構造を図 3 に示す。水は単量体モノマーの孔を通過することが知られている。CO<sub>2</sub> の透過孔の可能性が議論されているセンター孔は、疎水的で孔径が狭く、イオンの透過は困難と考えられた。第三の孔としてモノマーが互いに接する側面 4 か所にイオン透過の可能性のある経路(仮説的イオン透過孔)の存在することが推測された(図 3)。

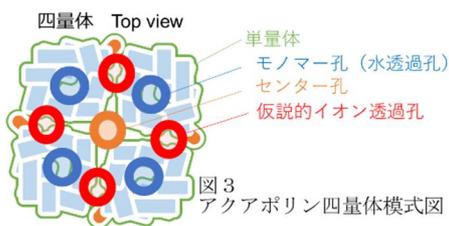


図 3 アクアポリン四量体模式図

この仮説的イオン透過孔に面して存在すると推定されたアミノ酸の一つバリン (V) を側鎖のより長い(アミノ酸として嵩高い)イソロイシン (I) やフェニルアラニン (F) に置換して経路を塞ぐことでイオンの透過がどうなる調べた結果(表 2) 予想のようにイオン輸送性が阻害されていた。これらのデータから仮説的イオン透過孔が実際に機能していることが示唆された。

また HvPIP2;8 では透過孔が OsPIP2;4 と比べて少し広いために、イオン輸送性に違いが生じていると考えられた。

表 2 ○ : 輸送性あり      : 輸送性低下      × : 輸送性なし      (WT:野生型すなわち非改変)

	OsPIP2;4		HvPIP2;8	
	WT	V54I	WT	V64F
水輸送性	○	○	○	○
Na <sup>+</sup> 輸送性	○	×	○	○
K <sup>+</sup> 輸送性	○	×	○	

#### 4-(2) Na<sup>+</sup>輸送性アクアポリンによる形質転換植物体の解析

##### OsPIP2;4 の組織局在

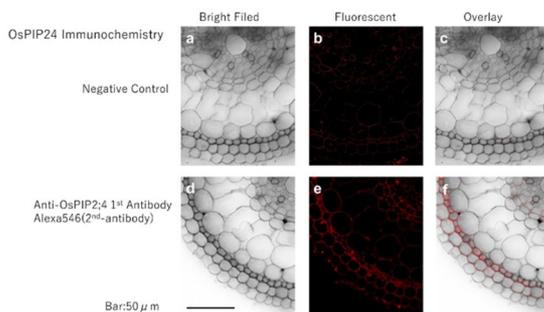


図 4 根での免疫組織化学

OsPIP2;4 は主に根で発現していることが既に分かっていたので、間接蛍光抗体法で根における発現部位を調べた。その結果、外皮および内皮で標識した蛍光が観察され OsPIP2;4 が発現していることが認められた(図 4)。イネ根では外皮、内皮どちらにも

カスパー線があることから外皮、内皮はイネ根での水とイオンの組織透過を制御する部位と考えられている。

##### OsPIP2;4 過剰発現イネ (OE) と T-DNA 挿入による欠損変異イネ (KO) の解析

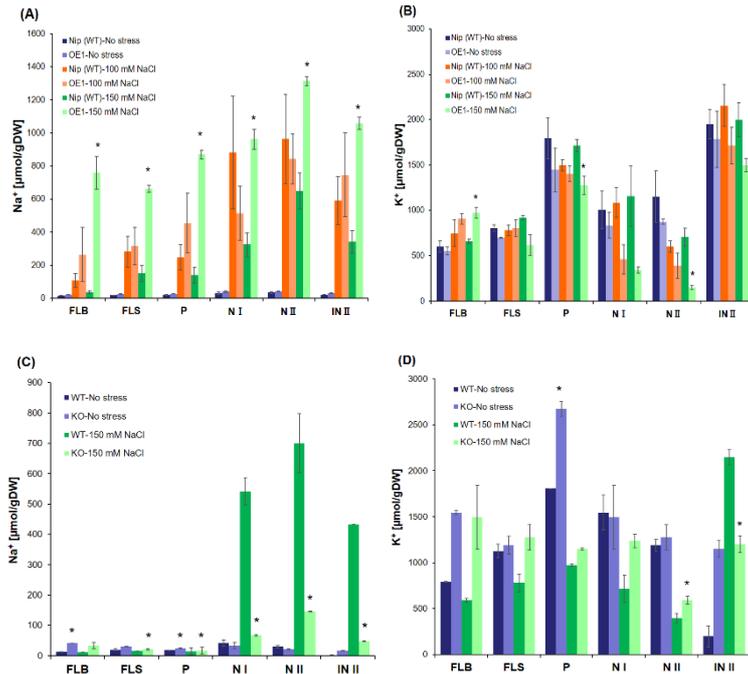
OsPIP2;4 の OE では 150 mM NaCl の塩ストレスによってナトリウムの含量が上昇すること、

K0 では塩ストレスによって節および節間でのナトリウム含量が著しく低下することが示された (図5)。このことから *OsPIP2;4* は塩ストレス下でイネにナトリウムが流入する経路の一つとなっている可能性が高いと結論された。

成苗期については、50 mM NaCl で3日間処理した実験において K0 で根でのカリウム蓄積が大きく低下していた。*OsPIP2;4* は根でのカリウム恒常性維持にも重要であることが示唆された。

図5 過剰発現イネ(OE)と欠損イネ(K0)出穂時期の各部位におけるナトリウム、カリウムの含量。FLB: 止葉葉身、FLS: 止葉葉鞘、P: 穂、NI: 節1、NII: 節2、INII: 節間2。

塩ストレスは2週間ごとに灌水中のNaClを25 mMずつ濃度を100 mMまで上げ、最終的に100 mM 2週間または150 mMで1週間の処理とした。OEの背景(WT)は日本晴れ(Nip)、K0の背景(WT)はHawayoungである。



#### クリスパーキャス9のシステムによる新規欠損体の作出と解析

T-DNA 遺伝子破壊株に加えて、*OsPIP2;4* 遺伝子の機能欠損を伴う独立した変異アリルを取得するため、クリスパーキャス9のシステムを利用した。単純な null 変異株を狙ったものとして1つは開始コドン付近をターゲットとした。一方これまで蓄積した研究から、iCAQPとしてイオン輸送も媒介するために重要な構造的要因は、PIP アクアポリンのC末端側である可能性が見出されつつある。C末端に欠失・挿入変異が入ったために、周辺部の一部のアミノ酸配列が変更されるような変異を狙って、2つ目として *OsPIP2;4* 遺伝子の推定上のストップコドンから30bp程度の付近もガイドRNAのターゲットサイトと定めてプラスミドDNAを構築した。これら2種類の独立したプラスミドDNAを用いて形質転換イネ系統(候補)を複数取得した。各候補個体のゲノムPCRとターゲット塩基配列の解析から、複数の独立した変異が検出された。現在までに、null 変異アリルとして独立3系統、C末端部位のアミノ酸が数残基置換されている系統を1系統、およびC末端の推定上のリン酸化サイトの一つであるSerが一残基欠失している系統を1系統取得した。それらの系統のホモ変異株も取得され、少ないながらも種子を確保した。種子が比較的多く取れた null 変異系統、独立2系統を用いて、上記T-DNA挿入変異系統と類似の水耕栽培条件下で生育させた。3-4週齢の段階で50 mM NaClの塩処理を数日間施し、根や葉に蓄積する元素の分析を行った所、一部NaやKの蓄積に、野生型と異なり、かつT-DNA挿入系統と類似の蓄積パターンを示す試料が存在した。しかし、現時点において、元素蓄積の表現型が、全変異系統で必ずしも完全に一致するわけでもなく、より詳細な解析が求められる。そのためには、諸実験に耐え得る十分量の種子の取得が必須であり、種子のバルクアップが進行中である。近い将来、詳細な生理解析を実現したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 且原真木	4. 巻 94
2. 論文標題 植物のアクアポリン	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 635-641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tran, S.T.H., Horie, T., Imran, S., Qiu, J., McGaughey, S., Byrt, C.S., Tyerman, S.D., Katsuhara, M.	4. 巻 21
2. 論文標題 A Survey of Barley PIP Aquaporin Ionic Conductance Reveals Ca <sup>2+</sup> -Sensitive HvPIP <sub>2</sub> ;8 Na <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> Conductance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21197135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 且原真木、Sen Tran、堀江智明
2. 発表標題 イネにおけるイオン輸送性アクアポリンの同定と機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会（京都）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tran S.
2. 発表標題 Ca <sup>2+</sup> -sensitive and non-selective Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> channel activity of aquaporins HvPIP <sub>2</sub> ;8 and OsPIP <sub>2</sub> ;4.
3. 学会等名 International Plant WEB Forum 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tran S, Ono S, Horie T, Katsuhara, M.
2. 発表標題 Identification, characterization, and molecular mechanisms of ion-channel aquaporins in plants.
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2023, Taipei, Taiwan (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 且原真木、Sen Tran、小野修太郎、堀江智明
2. 発表標題 植物のイオン輸送性アクアポリン
3. 学会等名 第17回トランスポーター研究会 (名古屋)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中野明正、小泉光久	4. 発行年 2023年
2. 出版社 文研出版	5. 総ページ数 48
3. 書名 根っこのふしぎな世界 1 根っこってなんだろう? 第1巻 (且原真木、松波麻耶 根っこはどうやって水を吸収するの? 10-11ページ)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堀江 智明  (Horie Tomoaki)  (90591181)	信州大学・学術研究院繊維学系・教授   (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------