

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780070

研究課題名（和文） 植物の主要なナトリウム吸収経路及びその分子実体の同定

研究課題名（英文） Molecular identification of a major pathway for sodium absorption in plants

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・講師

研究者番号：10578248

研究成果の概要（和文）：植物の耐塩性向上のためには植物の持つナトリウム吸収経路を同定することが重要である。シロイヌナズナのカチオン-塩素共輸送体（AtCCC）変異株の塩ストレス下での表現型解析を行ったところ、AtCCC はナトリウムとともにカリウムの吸収に関わっていることが示唆された。また、AtCCC 遺伝子の発現量は外部のカリウム栄養によって制御されていることから、AtCCC はカリウムの獲得に重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Identification of pathways for sodium absorption is crucial for improvement of salinity tolerance in higher plants. Phenotypic analyses of the *AtCCC* (*Arabidopsis thaliana* cation-chloride cotransporter) mutant under salinity conditions showed that *AtCCC* participated in both sodium and potassium absorption. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that expression of *AtCCC* gene was regulated by availability of potassium nutrition, suggesting importance of *AtCCC* function in K acquisition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物栄養生理学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：塩ストレス，シロイヌナズナ，ナトリウム，カリウム，耐塩性機構

## 1. 研究開始当初の背景

土壌に高濃度の塩分（主にナトリウム）が蓄積されると塩害（塩ストレス）が発生する。多くの植物は塩ストレスに感受性であるために、植物の耐塩性を向上させる試みは重要である。塩ストレス下では植物は高濃度の土壌塩分が作り出す高浸透圧により水分獲得が困難になる浸透圧ストレスや次第に細胞内に蓄積されてくるナトリウムが細胞内で様々な機能を阻害するイオンストレスが発生するためにその生育量が減少する。これらのストレスに対して、植物は適合溶質の合成・蓄積や吸収したナトリウムの細胞外への

排出あるいは液胞への隔離などの耐塩性機構を発揮する。近年の精力的な研究により、これらの分子機構についてはよく理解されてきている。その一方で、植物がどのようにしてナトリウムを外環境から吸収するのかは依然、不明のままである。塩ストレス下で植物が過剰量のナトリウムを蓄積することで生育が阻害されるのであれば、植物細胞はナトリウムを取り込む経路（輸送体）を持っていることが推察される。ナトリウムの吸収を担う輸送体を同定し、その機能を抑制することは塩ストレス下にある植物のナトリウム蓄積量の減少、ひいては植物の耐塩性向上

にも寄与しているのではないかと考えられる。

本研究では植物の主要なナトリウム吸収経路を明らかにするために、シロイヌナズナのカチオン-塩素共輸送体 (AtCCC) に着目して研究を行った。カチオン-塩素共輸送体は動物ではゲノム上に多コピー見られ、ナトリウムやカリウム、塩素の輸送に関わっている。植物ではシロイヌナズナのゲノムに1コピー見られるほか、イネには2コピーみられるなど、動物ゲノムと比較してコピー数が少ない。ナトリウム輸送における AtCCC の機能を明らかにし、その機能抑制がシロイヌナズナの耐塩性向上に寄与するのかを検討した。

## 2. 研究の目的

植物におけるナトリウム吸収経路の候補として AtCCC の機能解析を行った。AtCCC 遺伝子座に T-DNA が挿入された変異株を用いた表現型解析や AtCCC 遺伝子発現解析を行うことで、AtCCC の生理的機能とストレス耐性への関与について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) CCC 遺伝子の発現解析

シロイヌナズナの AtCCC 遺伝子について、組織別あるいは様々な環境ストレス (浸透圧, NaCl, KCl) 下での発現量について RT-PCR により調べた。またイネにおけるホモログ OsCCC1 遺伝子, OsCCC2 遺伝子についての発現量の調査も行った。

またおよそ AtCCC 遺伝子の上流約 2 kb の DNA 断片を用いたプロモーター-GUS コンストラクトを作成してシロイヌナズナ Col-0 株に形質転換を行った。得られた形質転換体を用いて GUS レポーター発現解析を行った。

### (2) AtCCC 変異株の表現型解析

シロイヌナズナ野生株と AtCCC 遺伝子内に T-DNA が挿入された変異株を 1/2 MS 培地に NaCl や KCl 存在下で生育させた後、生育量やイオン蓄積量の解析を行った。

### (3) 酵母変異株を用いた AtCCC のイオン輸送活性

酵母用高発現ベクター-pYES2 を用いて低カリウムに感受性である酵母 CY162 株で AtCCC 遺伝子を発現させ、AtCCC によるカリウム吸収能について調査を行った。

## 4. 研究成果

浸透圧ストレスや塩ストレス下でのシロイヌナズナの AtCCC 遺伝子の発現応答を調べたところ、200 mM NaCl ストレス下ではその発現が抑制されることがわかった。同様の発現様式はイネにおいても観察された。また

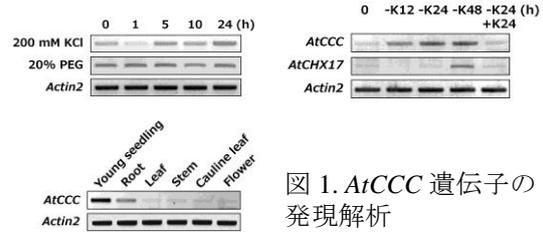


図 1. AtCCC 遺伝子の発現解析

AtCCC 遺伝子は 200 mM KCl 処理により、一過的な発現量の減少が見られた (図 1)。一方で低カリウム栄養条件下にシロイヌナズナを移したところ、AtCCC 遺伝子の発現誘導が見られたが、カリウムの添加によりその発現量の減少が確認された。浸透圧ストレス (20% PEG600) 処理は AtCCC 遺伝子の発現量に影響を与えなかったことから、AtCCC 遺伝子発現は KCl や NaCl 処理による浸透圧変化の影響ではなく、イオン環境の変化がもたらした結果であることが推察された。

AtCCC 遺伝子の組織特異的発現を調べるため、様々な部位を用いて RT-PCR 解析を行った。その結果、特に若い実生期や根において発現量が高いことが分かった (図 1)。プロモーター-GUS 解析を行ったところ、同様に根において強い発現が確認された。

次に AtCCC の機能を推定するために AtCCC 変異株の表現型の解析を行った。その結果、高濃度の NaCl や KCl に耐性を示すことがわかった。また低カリウム栄養条件下で生育させたところ、野生株と比較してクロロシスの症状を呈した (図 2)。これらのことは AtCCC がナトリウムの吸収以外にもカリウムの吸収に重要な機能を果たしていることが考えられた。

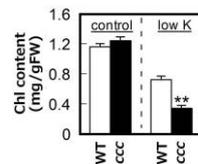


図 2. 低カリウム栄養条件下における野生株と AtCCC 変異株の葉のクロロフィル含量

また酵母のカリウム吸収能が低下した CY162 株に AtCCC 遺伝子を発現させると、CY162 株の低カリウム栄養感受性の表現型が改善されることが分かった。

以上の結果から AtCCC はシロイヌナズナにおいてナトリウムの吸収とともにカリウムの吸収にも関与していることが分かった。カリウムは植物の生育に必要な多量必須元素であり、植物の耐塩性を向上させるには AtCCC によるイオン輸送機構の更なる解明とその基質特異性のファインチューニングが必要であると考えられた。

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 2 件)

- ① Liu L, Ueda A, Saneoka H. Physiological responses of white Swiss chard (*Beta vulgaris* L. subsp. *cicla*) to saline and alkaline stresses. Aust. J. Crop Sci. 7: 1046-1052, 2013. 査読あり.
- ② Islam MS, Akhter M, Sabagh SAE, Liu YL, Nguyen NT, Ueda A, Masaoka Y, Saneoka H. Comparative studies on growth and physiological responses to saline and alkaline stresses of Foxtail millet (*Setaria italica* L.) and Proso millet (*Panicum miliaceum* L.). Aust. J. Crop Sci. 5: 1269-1277. 2011. 査読あり.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Assaha VMD, Liu LY, Ueda A, Saneoka H. Comparative evaluation of salinity stress tolerance in *Solanum scabrum* Mill. and *S. melongena* L., 2012年度日本土壌肥料学会関西支部会, 2012年12月6日~7日, 倉敷.
- ② Liu LY, Assaha VMD, Ueda A, Saneoka H. Effects of 5-aminolevulinic acid on development and salt tolerance in white Swiss chard (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*), 2012年度日本土壌肥料学会関西支部会, 2012年12月6日~7日, 倉敷.
- ③ 上田晃弘, 矢萩裕之, 実岡寛文. シロイヌナズナのカリウム輸送体 AtCCC の機能解析, 日本土壌肥料学会 2012年度鳥取大会, 2012年9月4日~6日, 鳥取.
- ④ Yahagi H, Ueda A, Fujikawa Y, Nagaoka T, Esaka M, Calcaño M, Martínez M, Hernandez JDM, Saneoka H. Comparative Physiological Analysis of Salt Tolerance in

the Local Rice Cultivars of Dominican Republic. 日本土壌肥料学会 2012年度鳥取大会, 2012年9月4日~6日, 鳥取.

- ⑤ Akiyoshi T, Fujikawa Y, Ueda A, Nagaoka T, Esaka M, Calcaño M, Martínez M, Hernandez JDM, Saneoka H. Effect of poultry manure application on the productivity and quality of moringa oleifera, 日本土壌肥料学会 2012年度鳥取大会, 2012年9月4日~6日, 鳥取.
- ⑥ Ueda A, Yahagi H, Saneoka H. The cation-chloride cotransporter AtCCC regulates potassium uptake in Arabidopsis. Plant Biology 2012, July 20-24, 2012, Austin, Texas, USA.
- ⑦ Ueda A, Yahagi H, Fujikawa Y, Nagaoka T, Esaka M, Calcano M, Martinez M, Hernandez JDH, Saneoka H. Nutrio-physiological characterization of the local rice cultivars in Dominican Republic under salinity stress, 8<sup>th</sup> International Congress on Interdisciplinary Investigation, June 14-15, 2012, Santo Domingo, Dominican Republic.
- ⑧ Fujikawa Y, Kondo T, Akiyoshi T, Ueda A, Nagaoka T, Calcano M, Martinez M, Hernandez JDH, Saneoka H, Esaka M. Characterization of ascorbic acid biosynthesis in Moringa. 8<sup>th</sup> International Congress on Interdisciplinary Investigation, June 14-15, 2012, Santo Domingo, Dominican Republic.
- ⑨ Martinez M, Ueda A, Fujikawa Y, Nagaoka T, Esaka M, Calcano M, Hernandez JDH, Saneoka H. Prospection on libertad (*Moringa oleifera* Lam) ecological adaptation, utilization, and first agronomy trials in the Dominican Republic. 8<sup>th</sup>

International Congress on Interdisciplinary Investigation, June 14-15, 2012, Santo Domingo, Dominican Republic.

⑩ 近藤隆之, 藤川愉吉, 上田晃弘, 長岡俊徳, 実岡寛文, Manuel Calcaño, Milton Martínez González, David Hernandez Martich, 江坂宗春. モリングにおけるアスコルビン酸生合成酵素遺伝子の発現解析, 日本農芸学会 2012 年京都大会, 2012 年 3 月 22 日~26 日, 京都.

⑪ Islam MS, Liu LY, Ueda A, Saneoka H. Growth and metabolic responses of Foxtail millet (*Setaria italica* L.) and Proso millet (*Panicum miliaceum* L.) under saline and alkaline stress, 2011 年度日本土壤肥料学会関西支部会, 2011 年 12 月 8 日~9 日, 大阪.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/shokuei/>

## 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・講師

研究者番号: 10578248

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし