

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292055

研究課題名(和文)陽イオン輸送系の協奏調節による細胞内浸透圧の恒常性の維持機構の解析

研究課題名(英文) Intracellular osmotic homeostasis on cation membrane transporters

研究代表者

魚住 信之 (Uozumi, Nobuyuki)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40223515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物や微生物の細胞内浸透圧の調節は、環境変化の適応に必要である。KとNaの輸送体は、養分やホルモンなどの吸収と循環、膜駆動力の維持、細胞内浸透圧調節、光合成活動に必須であり、植物の生存を根底で支えている。K/Naバランスの恒常性維持を司る機構の中心的役割を果たすイオン輸送体やその発現の解析、細胞内因子によるチャネルの活性調節、K輸送体、機械受容体の分子的成り立ちを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Control of the Intracellular osmolarity of the plant and microorganism is necessary for adaptation of environmental change. The membrane transport of K and Na is indispensable to absorption of nutrients and hormone, circulation, maintenance of membrane potential, and a photosynthesis, which supported plant growth. We have elucidated the control mechanism of the ion translocator which plays the central role of the system to control homeostasis maintenance of K/Na balance in plant cells, the manifested analysis and regulation of the channels, and the molecular construction of mechanosensitive channel in cyanobacteria.

研究分野：生物化学

キーワード：浸透圧 耐塩性 イオン 輸送体 シロイヌナズナ 脂質修飾 環境ストレス イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

植物の三大必須栄養元素である K の取込みと、耐塩性に重要な K/Na バランスの恒常性維持を司る機構を解明する。植物は独自に K 取込み系と、Na を細胞外に排出または液胞に隔離するシステムを発達させた。K と Na の輸送体は、養分やホルモンなどの吸収と循環、膜駆動力の維持、細胞内浸透圧調節、花粉管の伸長に必須であり、植物の生存を根底で支えている。また、土壌から植物に侵入する細胞毒性を示す金属の標的分子でもある。K-Na 輸送体が互いに協調して機能して、植物の環境適応を明らかにする。

2. 研究の目的

シロイヌナズナの複数の K-Na 輸送体を統括的に調節する細胞内分子(リン酸化酵素・膜結合型 Ca 依存性制御因子)、K-Na 輸送体の概日性・組織発現(排水組織)、および非生体金属イオンの輸送体への作用に関する解析を行う。K-Na 輸送体とそれを統御する細胞内調節系の探索により、環境ストレス適応性を強化した植物の創生につながる基盤的知見の獲得をめざして、申請者が単離解析している植物の上記ストレスに關与する重要な標的輸送系の選別と膜輸送が担う恒常性維持機構の分子レベルの解明をめざす。

3. 研究の方法

Na 輸送体遺伝子の発現評価

HKT と NHX 輸送体遺伝子(AtHKT1 および AtNHX1 ~ 8)の輸送体の発現を検討するために、1.9~2.3kb のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子(luxAB)に連結した。次に、シロイヌナズナに導入した。ヘテロ株、ホモ株の取得を行った。9種類のプロモーターの概日性発現を暗条件の培養の後に、連続明培養を行い概日性を調べた。GUS 遺伝子を AtHKT1 プロモーター5.4、2.3、0.8kb に連結して植物へ導入した。

Na 輸送体遺伝子変異株の表現型の評価

シロイヌナズナの野生株、athkt1 変異株、atnhx1 変異株、athkt1,atnhx1 の二重変異株を培養して、明暗変化や環境ストレス処理を行った。

リン酸化による活性調節機構の解析

K チャンネル(KAT2, AKT1, AKT2, GORK, SROK および AtKC1)の細胞内 C 末端領域を発現するプラスミドを大腸菌に導入した。タンパク質を精製後、リン酸化を検討した。

Ca 結合タンパク質による輸送体の活性調節

Ca に結合するタンパク質の CPK1~CPK34、CRK1~CPK8、CBL1,4,5,9 の N 末端領域 10 アミノ酸に相当する遺伝子を、レポータータンパク質遺伝子に連結した。無細胞翻訳系を用いた放射性標識による脂肪酸の検出をすすめた。

陰イオンチャンネルの細胞内因子による制御系の解析

シロイヌナズナの陰イオンチャンネル遺伝子の RNA を卵母細胞に導入して、二本差し法を用いた膜電位固定法により電流測定を尾もなった。

4. 研究成果

Na 輸送体遺伝子の発現評価

植物のシロイヌナズナで、Na および K の膜輸送を担う HKT と NHX 輸送体遺伝子(AtHKT1 および AtNHX1~8)の輸送体の概日性などの発現に関して検討するために、1.9~2.3kb のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子(luxAB)に連結したプラスミドの作成を行った。これまでに一部作成しており上記全ての9種類のプラスミドの完成を行った。次に、シロイヌナズナへ導入して抗生物質耐性と PCR による検出を行って、目的の植物の取得を行った。ヘテロ株の取得後、ホモ株の取得を行った。9種類のプロモーターの概日性発現を暗条件の培養の後に、連続明条件において調べたところ、概日性のリズムが見いだされた。輸送体の発現の概日性は光合成などの機能と関連することが考えられ、細胞伸長や膜電位維持の面で関与することがさらに示された。

また、GUS 遺伝子を 5.4、2.3、0.8kb の AtHKT1 プロモーターに連結して植物へ導入して活性を比較したところ、短いプロモーターでは活性が強いことが分かった。-2.3 ~ -0.8kb の領域の発現を抑制する領域が存在すると考えられた。

Na 輸送体遺伝子変異株の表現型の評価

野生株、athkt1 変異株、atnhx1 変異株、athkt1,atnhx1 の二重変異株を用いて、明暗条件や環境ストレス環境において地上部および根の生長、度合いを比較する予定であったが、上記変異株の表現型において、種子の取得の難しいものが見つかった。これは、目的と異なる変異が導入されていることが明らかとなった。

リン酸化による活性調節機構の解析

シロイヌナズナの6種類のKチャンネル(KAT2, AKT1, AKT2, GORK, SROK および AtKC1)の細胞内側のC末端領域を大腸菌で発現、精製してリン酸化反応の検討を行った。Thr がリン酸化されない状態を真似た Ala(擬非リン酸化残基)置換体と Thr がリン酸化された状態を真似た Asp に置換した輸送体の作成も行い、リン酸化検出をすすめた。Thr のリン酸化が殆どのチャンネルで抑制されることが分かった。

Ca 結合タンパク質による輸送体の活性調節

Ca に結合するタンパク質であり、膜への移行とそれによる膜輸送体との接触が予測さ

れている CPK1 ~ CPK34、CRK1 ~ CPK8、CBL1,4,5,9 の Myristoylation 候補 Gly(N 末端から 2 残基目)を含む N 末端領域 10 アミノ酸をレポータータンパク質の N 末端に連結した融合タンパク質を作成した。無細胞翻訳系によって放射性標識による Myristoylation により、脂肪酸の付与を検討した。多くの MG 配列をもつタンパク質が脂肪酸付与された。

KUP 系の機能と役割

K トランスポーターの中でも KUP 系は微生物から植物まで機能する輸送体の一つである。細胞内の K 濃度に関与する輸送体であり、浸透圧ストレスに関与する。ポプラの KUP を単離して、KUP がポプラでも環境変化に適応することを見いだした。

環境変化と浸透圧に関与するチャネルとその制御機構の解析

パッチクランプ法を用いてオルガネラに発現するチャネルを検討した。動物の茶円器ホモログでは P1(3,5)P2 は輸送活性の調節に関与したが、植物の液胞型チャネルには関与しないことが分かり、調節系はそれぞれ異なることが分かった。

浸透圧に対応する機械受容性チャネルの機能解析

ラン藻は葉緑体の先祖と考えている。ラン藻に発現する機械受容性チャネルを単離して検討を行ったところ、浸透圧変化に適応していることが分かった。さらに、本遺伝子発現は概日リズムを示しており、太陽の影響を透けて浸透圧調節に関与していることが強く示唆された。

陰イオンチャネルの細胞内因子による制御系の解析

植物の原形質膜で発現する陽イオン輸送体と対をなすと考えられている陰イオンチャネルも、細胞内の浸透圧の調節に関与することが示されている。今回、両輸送体の関係が示されている。シロイヌナズナ遺伝子の complementary RNA を卵母細胞に導入して、電極二本差しイオンチャネル活性の測定による輸送体の発現検討を行った。この結果、いくつかの CPK6 タンパク質が脂質を受けると輸送活性を示すが、脂質修飾を受けないと輸送活性が極端に減少することが明らかとなった。Myristoylation が植物の細胞内で生じた後に、Palmitoylation が効率よく生じることが推定される。このことにより、水溶性タンパク質が生体膜に移行するために、脂質修飾がおこったのち原形質膜上の陰イオンチャネルを活性化することが明らかとなった。

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 10 件)

Checchetto, V., Segalla, A., Sato, Y., Bergantino, E., Szabo, I., and Uozumi, N. Involvement of potassium transport systems in the response of *Synechocystis* PCC 6803 cyanobacteria to external pH change, high-intensity light stress and heavy metal stress. *Plant Cell Physiol.* 57, 862-877 (2016). doi: 10.1093/pcp/pcw032. 査読有

Carraretto, L., Teardo, E., Checchetto, V., Finazzi, G., Uozumi, N., and Szabo, I. Ion channels in plant bioenergetic organelles chloroplast and mitochondria: from molecular identification to function. *Mol. Plant* 9, 371-395 (2016) doi: 10.1016/j.molp.2015.12.004 査読有

Hamamoto, S., Horie, T., Hauser, F., Deinlein, U., Schroeder J.I. and Uozumi, N. HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field *Curr. Opin. Biotechnol.* 32, 113-120 (2015) doi: 10.1016/j.copbio.2014.11.025. 査読有

Saito, H., Oikawa, T., Hamamoto, S., Ishimaru, Y., Kanamori-Sato, M., Sasaki-Sekimoto, Y., Utsumi, T., Chen, J., Kanno, Y., Masuda, S., Kamiya, Y., Seo, M., Uozumi, N., Ueda, M., and Ohta, H. The jasmonate-responsive GTR1 transporter is required for gibberellin-mediated stamen development in Arabidopsis *Nature Commun.* 6:6095 (2015) doi:10.1038/ncomms7095 査読有

Sato, Y., Nanatani, K., Hamamoto, S., Shimizu, M., Takahashi, M., Tabuchi-Kobayashi, M., Mizutani, A., Schroeder, J. I., Soma, S., and Uozumi, N. Defining membrane spanning domains and crucial membrane-localized acidic amino acid residues for K⁺ transport of a Kup/HAK/KT-type *Escherichia coli* potassium transporter *J. Biochem.* 155, 315-323 (2014) doi: 10.1093/jb/mvu007 査読有

Hamamoto, S., and Uozumi, N. Organelle-localized potassium transport system in plants *J. Plant Physiol.* 171, 743-747 (2014) doi.org/10.1016/j.jplph.2013.09.022

Hosoo, Y., Kimura, Y., Nanatani, K., and Uozumi, N.
Molecular cloning and expression analysis of a gene encoding KUP/HAK/KT-type potassium uptake transporter from *Cryptomeria japonica*.
Trees, 28, 1527-1537 (2014)
doi/10.1007/s00468-014-1059-1 査読有

Boccaccio, A., Scholz-Starke, J., Hamamoto, S., Larisch, N., Festa, M., Gutla, P. V. K., Costa, A., Dietrich, P., Uozumi, N., and Carpaneto, A.
The phosphoinositide PI(3,5)P2 mediates activation of mammalian but not plant TPC proteins: functional expression of endolysosomal channels in yeast and plant cells
Cell. Mol. Life Sci. 71, 4275-4283 (2014)
doi: 10.1007/s00018-014-1623-2. 査読有

Yamaguchi, T., Hamamoto, S., and Uozumi, N.
Sodium transport system in plant cells
Frontiers in Plant Science, Plant Physiology, 4, Mini Review Article 410, 1-7 (2013)
doi: 10.3389/fpls.2013.00410 査読有

Nanatani, K., Shijuku, T., Akai, M., Yukutake, Y., Yasui, M., Hamamoto, S., Onai, K., Morishita, M., Ishiura M., and Uozumi, N.
Characterization of the role of a mechanosensitive channel in osmotic down shock adaptation in *Synechocystis* sp. PCC 6803
Channels 7, (4) 238-242 (2013)
Doi 10.4161/chan.25350 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

Saito, S., Hamamoto, S., Sato, Y., Uozumi, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Utsumi, T., Moriya, K., Tozawa, Y., and Yamauchi, S.
Lipidation of Arabidopsis CPK6 promotes the plasma membrane targeting and the stomata closure mediated by activation of SLAC1 in *Arabidopsis* guard cells
International workshop on Plant Membrane Biology. June 5-10, 2016, Annapolis USA

齋藤俊也, 浜本晋, 内海俊彦, 守屋康子, 松浦愛子, 佐藤陽子, 野口寛人, 戸澤譲, 山内清司, 橋本研志, Jörg Kudla, 魚住信之
シロイヌナズナ CPK の脂質修飾による細胞内局在調節および輸送体活性調節の解析
第 57 回日本植物生理学会年会, 平成 28 年 3

月 18-20 日, 盛岡

竹林昂亮, 齋藤俊也, 内海俊彦, 守屋康子, 加藤恵, 佐藤陽子, 武藤潤, 越智直樹, 橋本研志, Katrin Held, Jörg Kudla, 上田実,
横山隆亮, 西谷和彦, 浜本晋, 魚住信之
シロイヌナズナ CBL5 の発現解析と脂質修飾による細胞内局在調節機構の解析
第 57 回日本植物生理学会年会, 平成 28 年 3 月 18-20 日, 盛岡

浜本晋, 平林一輝, 加藤恵, 堀江智明, Schroeder, J.I., Blumwald E., 横山隆亮, 西谷和彦, 石川敦司, 魚住信之
シロイヌナズナ Na 輸送体 AtHKT1 の花器官の形成への関与 第 56 回日本植物生理学会年会, 平成 27 年 3 月 16-18 日, 東京

齋藤俊也, 武藤潤, 小林真由美, 佐藤陽子, 浜本晋, 魚住信之
Ca²⁺結合タンパク質の脂質修飾による細胞膜への移行
化学系学協会東北大会 平成 26 年 9 月 20-21 日, 米沢市

魚住信之
環境適応の根底で機能するイオン輸送
名城大学 DNA 講演会 平成 25 年 11 月 9 日, 名古屋市

齋藤俊也, 浜本晋, 武藤潤, 魚住信之
シロイヌナズナ CPK の脂質修飾による陰植物の気孔開閉に関与するイオン輸送体とその活性調節の解析制御因子に関する研究
第 55 回日本植物生理学会大会 シンポジウム, 平成 26 年 3 月 18-20 日, 富山市

魚住信之, 浜本晋, 七谷圭
植物生存を支えるカリウム輸送
第 55 回日本植物生理学会大会 シンポジウム, 平成 26 年 3 月 18-20 日, 富山市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

魚住信之 (UOZUMI Nobuyuki)
東北大学・大学院工学研究科バイオ工学専
攻・教授
研究者番号：40223515