

9 6 2 3 植物の高親和性 $\text{Na}^+\text{K}^+$ トランスポーターの実体の解明

助成研究者：魚住 信之(名古屋大学 生物分子応答研究センター)  
共同研究者：鳥山 尚志(名古屋大学 生物分子応答研究センター)

植物細胞内のイオン濃度は浸透圧調節に重要な役割を果たし植物細胞の耐塩性、耐乾性に寄与する。一般の高等植物は細胞内に主要なイオンとして $\text{K}^+$ を100mM以上の濃度で保持するのに対して、 $\text{Na}^+$ は低い濃度に維持されている。この事実から、 $\text{Na}^+$ が積極的に取込まれる機構の存在については重視されず、その機構については未知のままである。最近になって細胞外の高濃度の $\text{K}^+$ の取込みに中心的な役割を果たす $\text{K}^+$ チャンネルの他に、低濃度の $\text{K}^+$ に対して高い親和性を持つ $\text{Na}^+\text{K}^+$ トランスポーター(シンポーター)遺伝子が小麦からクローン化された。このことは、一定濃度の $\text{Na}^+$ を維持するためもしくは他の理由のために $\text{Na}^+$ を取込む機構が植物細胞には存在することを示している。

本研究では、 $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ の細胞内への取込みの制御機構およびトランスポーターの生理的役割を明らかにする目的でアラビドプシスから $\text{Na}^+\text{K}^+$ トランスポーター遺伝子を単離して機能解析することを試みた。アラビドプシス(*Arabidopsis thaliana*)のcDNAライブラリーから $\text{Na}^+\text{K}^+$ トランスポーターの遺伝子(ArHKT1)をクローン化した。読み取り枠から推定される蛋白質の質量は58KD、10-12程度の膜貫通領域を持ち小麦のそれと極めて類似していた。また、クローン化した本遺伝子はアラビドプシス染色体には1コピー存在した。

本遺伝子産物を*Xenopus oocyte*を用いて解析したところ、過分極した際に内向きの $\text{Na}^+$ 電流が検出された。しかし、 $\text{K}^+$ については本実験条件では小麦のHKT1で測定される $\text{K}^+$ 電流はArHKT1では測定されなかった。現段階では、本研究でクローン化したArHKT1は $\text{Na}^+$ トランスポーターであり、 $\text{K}^+$ 透過性が無い点で小麦HKT1とArHKT1の機能に相違がある。

本研究で単離したArHKT1は $\text{Na}^+$ の維持に寄与している可能性がある。現在までのところ、植物細胞における細胞内 $\text{Na}^+$ 濃度の存在理由は明らかではないが、本ArHKT1が $\text{Na}^+$ の取込みに積極的に働いていることを推定しており、本遺伝子の単離と機能解析は植物細胞における $\text{Na}^+$ の生理的意義への解明への引き金となる可能性がある。



### 9 6 2 3 植物の高親和性 $\text{Na}^+\text{K}^+$ トランスポーターの実体の解明

助成研究者：魚住 信之 (名古屋大学 生物分子応答研究センター)

共同研究者：鳥山 尚志 (名古屋大学 生物分子応答研究センター)

#### 1 研究目的

植物細胞は微生物、動物細胞と同様に $\text{K}^+$ が細胞内主要イオンとして存在し、 $\text{Na}^+$ は低濃度に維持されている。ところが、 $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ の輸送機構は植物細胞と動物細胞とは大きく異なる。植物には動物に見られる能動輸送を担う $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaseは存在しない。植物の膜電位は強力なプロトンポンプ( $\text{H}^+$ -ATPase)とイオン拡散電位の総和で形成されている。この膜電位を利用して $\text{K}^+$ 取込みと排出が行われる。一方、 $\text{Na}^+$ はアンチポータの機構によって排出が行われると考えられているが、正確なところは明らかではない(1)。

植物細胞内のイオン濃度は浸透圧調節に重要な役割を果たし植物細胞の耐塩性、耐乾性にも寄与する。一般の高等植物は細胞内に主要なイオンとして $\text{K}^+$ を100mM以上の濃度で保持するのに対して、 $\text{Na}^+$ は低い濃度に維持されている。この事実から、 $\text{Na}^+$ が積極的に取込まれる機構の存在理由については重視されず、その機構については未知のままである。

一方、最近になって細胞外の高濃度の $\text{K}^+$ の取込みに中心的な役割を果たす $\text{K}^+$ チャネルの他に、低濃度の $\text{K}^+$ に対して高い親和性を持つ $\text{K}^+$ 輸送体が小麦からクローン化された(2)。ところがその性質を調べたところ、 $\text{K}^+$ の他に $\text{Na}^+$ が同時に透過する $\text{Na}^+\text{K}^+$ トランスポーター(シンポーター)であることが証明された(3, 4)。このことは、一定濃度の $\text{Na}^+$ を維持するためもしくは他の理由のために $\text{Na}^+$ を取込む機構が植物細胞には存在することを示している。

アラビドプシスは高等植物のモデル植物として現在ゲノム解析プロジェクトが進んでおり、また、4種類の $\text{K}^+$ チャネル遺伝子が同定されている。植物細胞における $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ の輸送機構を解明する為に、アラビドプシス由来 $\text{K}^+$ チャネルと $\text{Na}^+\text{K}^+$ トランスポーターとの機能協働の解析が注目される(5, 6)。本研究では、 $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ の細胞内への取込みの制御機構およびトランスポーターの生理的役割を明らかにする目的でアラビドプシスから $\text{Na}^+\text{K}^+$ トランスポーター遺伝子を単離して機能解析することを試みた。

## 2 研究方法

### 1) Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>トランスポーターの全遺伝子(ArHKT1)の単離と一次構造の決定

アラビドプシス(*Arabidopsis thaliana*)のcDNAライブラリーをMinet博士より分譲いただいた。小麦由来のNa<sup>+</sup>K<sup>+</sup>トランスポーターの遺伝子(HKT1)配列の情報を参考にして、5種類のdegenerated DNA primerを設計して、アラビドプシスのcDNAライブラリーを鋳型にPCRによりDNA増幅した。DNA配列を決定後、目的断片を含んでいる280bpをランダムプライマー法により放射線ラベルして、コロニーハイブリダイゼーション方法によりポジティブコロニーを選択した。決定した遺伝子配列から、3種類のDNAプライマーを調製して5'側領域が欠損領域をクローン化した。

### 2) Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>トランスポーター遺伝子のXenopus oocyteにおける発現。

植物由来のK<sup>+</sup>チャンネル遺伝子を発現させた際に作成したプラスミドのK<sup>+</sup>チャンネル遺伝子とNa<sup>+</sup>K<sup>+</sup>トランスポーターの遺伝子を置き換えた。このことによってpolyAが連結され高い発現量が望まれる。このpolyAが連結したArHKT1遺伝子をBlueScript IIベクターにサブクローン化した。T3プロモーターを用いてcRNAをin vitro合成した。Na<sup>+</sup>とK<sup>+</sup>のイオン透過性の記録はAXION社の2本刺しボルテージクランプ装置を用いた。

## 3 研究結果

### 1) Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>トランスポーターの全遺伝子の単離と一次構造の決定

設計したdegenerated DNA primerの6種類の組み合わせのうち1種類で期待される長さの増幅断片が得られた。そのDNA配列を決定したところ、小麦HKT1とアミノ酸における相同性が高いことが明らかとなった。次に、得られたDNAを用いてアラビドプシス(*Arabidopsis thaliana*)のcDNAライブラリーから、目的の遺伝子を得たのち、DNA配列を決定したところ開始コドンにコードする5'側領域が欠損していた。そこで、既に判明しているDNA配列をプローブにして5'領域を5'RACE方法により5'側欠損領域を得て、全一次構造を決定した(Fig. 1)。欠損していたアミノ酸は4残基であった。読み取り枠から推定される蛋白質の質量は58KD、10-12程度の膜貫通領域を持ち小麦のそれと極めて類似していた(Fig. 2)。

クローン化した本遺伝子がアラビドプシス由来の遺伝子であることおよび染色体に類似遺伝子がいくつ存在しているかをサザンプロテイング法によって検出した(Fig. 3)。本遺伝子の全長をDNAプローブにして検出した際には、強く染色体遺伝

子とハイブリダイズし、本遺伝子中に1箇所存在するEcoRIで消化した染色体遺伝子では2箇所ハイブリダイズするバンドが推定通り検出された。このことから、クローン化した本遺伝子はアラビドプシス由来の遺伝子であり、本結果からは他には類似の遺伝子が有る証拠は得られなかった。このため、本遺伝子は1コピーの可能性が高い。

## 2 Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>トランスポーターのイオン輸送における性質

本遺伝子産物のイオン透過性を解明するために、本遺伝子から合成したcRNAを*Xenopus oocyte*に導入して、2本刺しボルテージクランプ法によりK<sup>+</sup>とNa<sup>+</sup>のイオン選択性を測定した。小麦のHKT1では、外液を0.3mMK<sup>+</sup>と1.0mM Na<sup>+</sup>の両者を共存させたRinger溶液の場合には、1.0mM Na<sup>+</sup>の単独のRinger溶液の場合に比べて、2倍程度の電流の増加が記録されている。

本実験では1mMNa<sup>+</sup>溶液にした際には、内向きのイオン電流が検出できた(Fig. 4)。ところが、0.3mMK<sup>+</sup>と1.0mM Na<sup>+</sup>の両者を共存させた溶液においては、電流の増加は起こらなかった。

現在更に解析を行っているが、現段階では、本研究でクローン化したArHKT1はNa<sup>+</sup>トランスポーターで、K<sup>+</sup>透過性が無いもしくは極めて小さいことが推定される。K<sup>+</sup>透過性が無いことは、小麦HKT1とArHKT1の大きな相違である(Fig. 5)。

## 4 考察

植物細胞においてNa<sup>+</sup>の細胞内への取込みはどのようなメカニズムで行われるか未知である。従来、Na<sup>+</sup>は細胞内の環境においては毒であるというのが一般的な考え方であり、動物の神経細胞で観察されているような活動電流発生がない植物においてはNa<sup>+</sup>の細胞内への流入に関するNa<sup>+</sup>輸送体(遺伝子)の存在は確認されていなかった。

小麦HKT1遺伝子においても、遺伝子産物が酵母のK<sup>+</sup>取込み能を相補することから単離された。小麦HKT1はNa<sup>+</sup>の共存下で明らかにK<sup>+</sup>を透過して、K<sup>+</sup>チャネルの最適濃度より低いK<sup>+</sup>濃度に最適値をもつ高親和性K<sup>+</sup>トランスポーターである。このため、K<sup>+</sup>を透過させることが機能的意義であり、Na<sup>+</sup>の透過は本来の細胞の目的ではないという解釈が成り立っている。本研究の初期にはわれわれもアラビドプシスのHKT1は小麦由来のものと同様にK<sup>+</sup>を透過させる性質が高いことを予想していた。しかし、このイオン透過性の相違を電気生理学的手法で検討したところ(Fig. 4)、ArHKT1は膜電位の変化に依存して、過分極側ではNa<sup>+</sup>を透過することが明らかと

なった。K<sup>+</sup>については実験条件では小麦のHKT1で測定されるK<sup>+</sup>は測定されなかった。小麦で考えられていたK<sup>+</sup>濃度の低い条件でNa<sup>+</sup>の透過とシンポートするK<sup>+</sup>の取り込みのためにHKT1が機能するという仮説はアラビドプシスでは成り立たない。

ArHKT1が実際の細胞ではリン酸化、脱リン酸化等の修飾調節を受けたり、調節蛋白質を介して機能していることは十分考えられる。これらの調節蛋白質によって、イオン透過能が変化することは他のイオン輸送体で報告がある。また、共役系と協調して機能していることは考えられることから真の本蛋白質の意義は今後の展開次第で明らかになると考えられる。

また、低濃度で存在しうるNa<sup>+</sup>の維持に寄与している可能性がある。現在までのところ、植物細胞における細胞内Na<sup>+</sup>濃度の存在理由は明らかではないが、本蛋白質がNa<sup>+</sup>の取り込みに積極的に働いていることが示されれば、植物細胞においては悪者としてみなされてきたNa<sup>+</sup>は、実は重要な意義を持っていることが解明されると考えられる。実際、Epsteinらは、Na<sup>+</sup>の取込みに積極的に働いている輸送体の存在を推定しており、本遺伝子の単離と機能解析は植物細胞におけるNa<sup>+</sup>の生理的意義への解明への引き金となる可能性がある(6)。

## 5 今後の課題

アラビドプシスHKT1と小麦との相違点を明らかにする必要がある。電気生理学的測定は短時間のイオン取込み機能を測定したため、イオン透過速度が非常に遅いイオン輸送体では測定が不可能である。長時間にはArHKT1はNa<sup>+</sup>の他にK<sup>+</sup>を透過させる可能性がある。これを調べるためにK<sup>+</sup>取込み能力の欠損した突然変異酵母を用いて長期間にわたる生理条件でのK<sup>+</sup>透過能を検討する。また、遺伝子から推定されるアミノ酸配列はArHKT1と小麦HKT1ではN末端からC末端全体に渡って保存されており、部分的な場所の相違がイオン選択性の相違を示していることが考えられる。イオン選択性の異同に関わる部位の同定にはキメラ蛋白質を作成することが有効である。

また、本実験はヘテロガスな発現系を用いているに過ぎない。植物細胞では実際には他の蛋白質との相互作用によって異なる機能を持つ可能性がある。あるイギリスのグループは小麦のNa<sup>+</sup>K<sup>+</sup>トランスポーターは小麦の根では測定できないことを報告している。この様に、アラビドプシスの場合においても実際の細胞のイオン輸送を測定することで、本来の性質が更に解明されると考えられる。

さらに、このHKT1は原形質膜に存在しているのかそれとも液胞等の細胞内小器官で機能を担っているのかも明らかとなっていない。HKT1の局在性を明らかにす

ることでこのイオン輸送体の意義が明らかになって行くであろう。このためには抗体を作成して、局在性を明らかにしていく必要がある。

細胞の膜電位は $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ イオン濃度差に近似できる。ArHKT1と $\text{K}^+$ チャネルとの協関を知ることは相互の輸送体の存在意義を明らかにすることにもなる。また、ある研究者らは $\text{Na}^+$ は $\text{K}^+$ チャネルを通して入ってくると予想している。これらの真偽を明らかにする上でも内向き整流性 $\text{K}^+$ チャネルの $\text{Na}^+$ に関する効果を検討することが必要である。

## 6 文献

- (1) Lacan, D., and Durand, M. (1996)  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  exchange at the xylem/symplast boundary. *Plant Physiol.*, 110, 705-711
- (2) Schachtman, D. P. and Schroeder, J. I. (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, 370 655-658
- (3) Rubio, F., Gassmann, W., and Schroeder, J. I. (1995) Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*, 270, 1660-1663
- (4) Gassmann, W., Rubio, F., and Schroeder, J. I. (1996) Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant J.*, 10, 869-882
- (5) Ping, Z., Yabe, I. and Muto, S. (1992) Identification of  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the vacuolar membrane of tobacco cell suspension cultures. *Protoplasma*, 171, 7-18
- (6) Uozumi, N., Gassmann, W., Cao, Y., and Schroeder, J. I. (1995) Identification of strong modifications in cation selectivity in an *Arabidopsis* inward rectifying potassium channel by mutation selection in yeast. *J. Biol. Chem.*, 270, 24276-24281.
- (7) Rains, D. W., and Epstein E. (1965) Transport of sodium in plant tissue. *Science*, 148, 1611





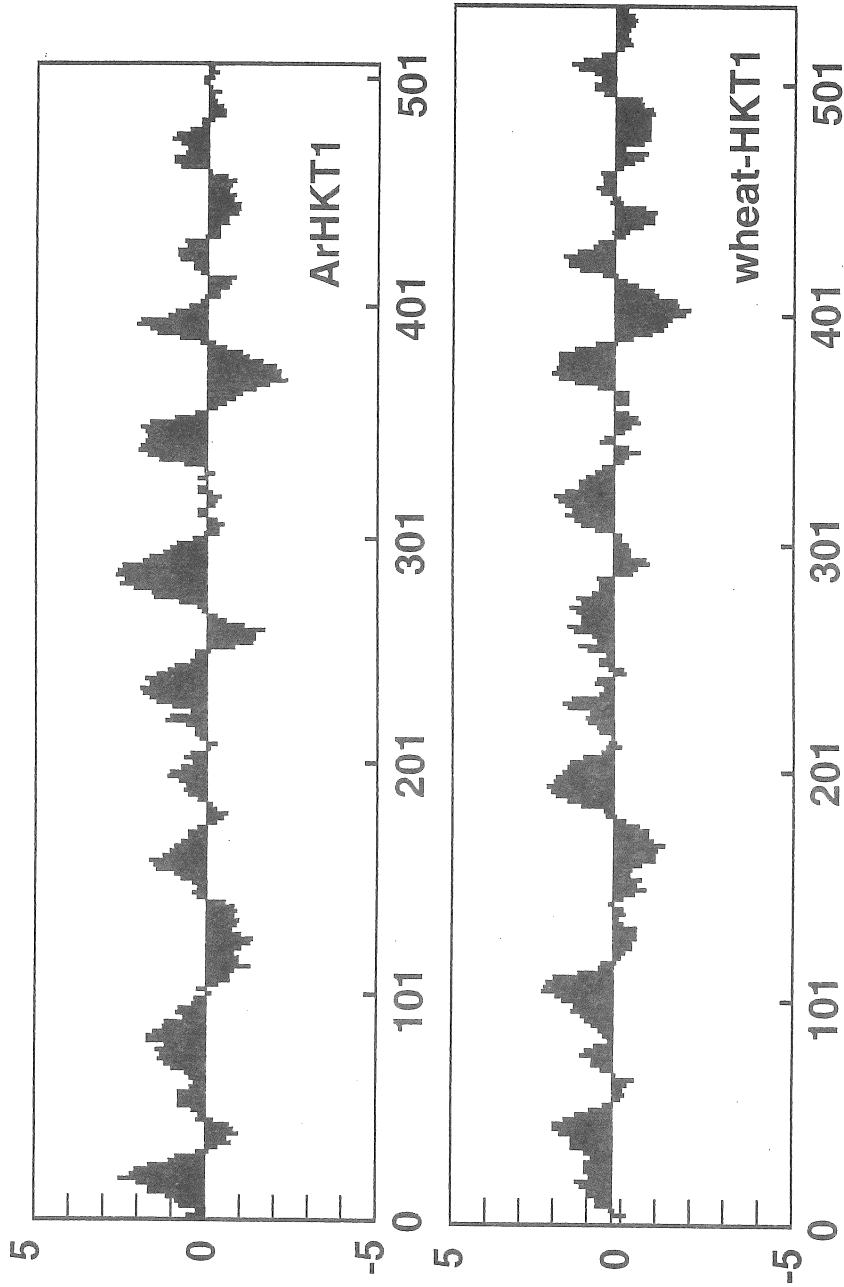


Figure 2 Hydrophobicity plot of the deduced ArHKT1 and wheat HKT1 amino acid sequence.

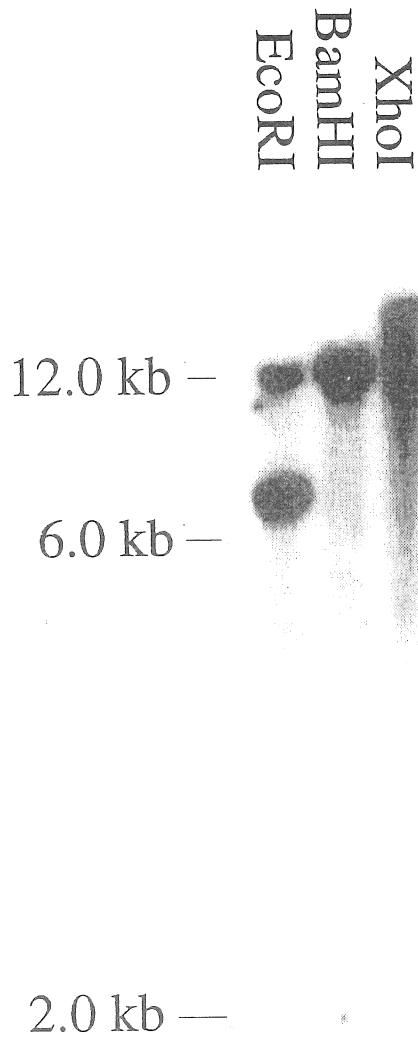


Figure 3 Genomic DNA Gel Blot Analysis of ArHKT1 Hybridizing Sequences. *Arabidopsis thaliana* genomic DNA digested with the indicated restriction enzymes was probed with the ArHKT1 cDNA.

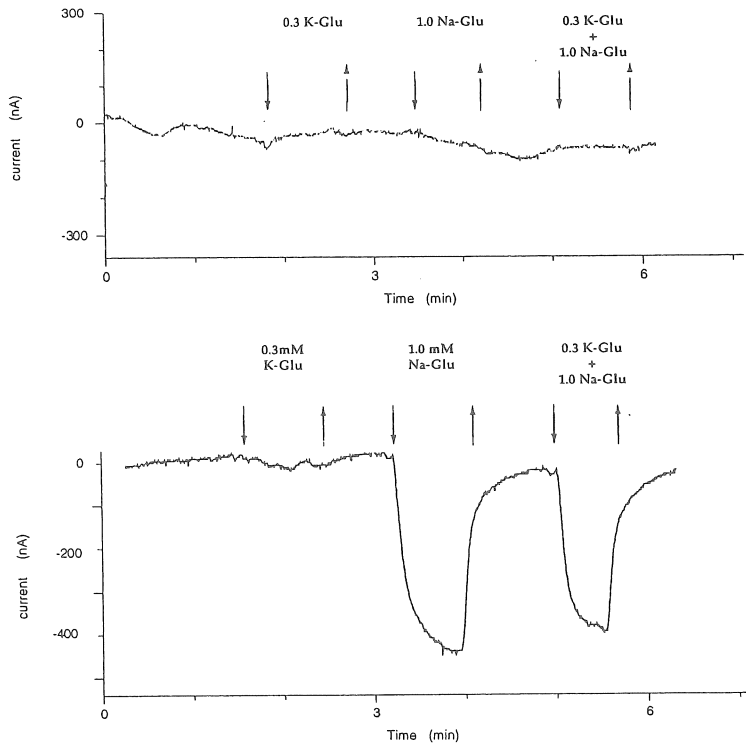


Figure 4 ArHKT1 expressed in oocytes gives rise to Na<sup>+</sup> uptake. The membrane potential in uninjected oocytes (upper) and in the ArHKT1-expressing oocytes (lower) was held at -100 mV. The bath solution contains 0.3mM K<sup>+</sup> glutamate, 1.0mM Na<sup>+</sup> glutamate, and 0.3mM K<sup>+</sup> glutamate plus 1.0mM Na<sup>+</sup> glutamate with Tris-glutamate to balance varying K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> concentrations.

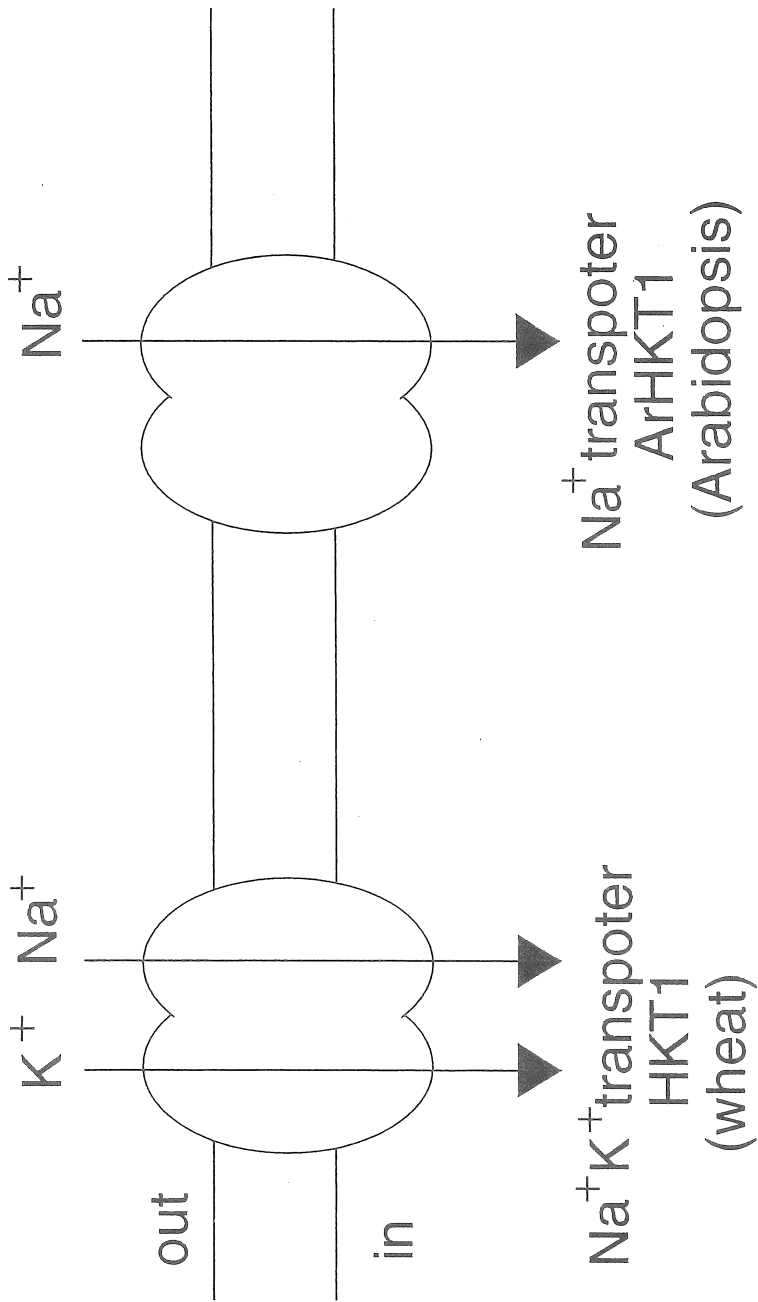


Figure 5 Model for ArHKT1-mediated Na<sup>+</sup> transport and wheat HKT1 mediated Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport

## Characterization of high affinity Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> transporter gene from higher plants

Nobuyuki Uozumi, Shoshi Toriyama  
(Bioscience Center, Nagoya University)

### Summary

The ions concentration in plant cell is crucial for plant osmoregulation, which correlated to Na<sup>+</sup> tolerance and dehydration resistance. K<sup>+</sup> is the most abundant cation in higher plant cell at the concentrations of ca. 100mM, whereas Na<sup>+</sup> concentration inside cell maintains at the lower level. Na<sup>+</sup> uptake seems to occur without any specific mechanism due to high energy gradient of Na<sup>+</sup> between the inside cell and outside. The molecular mechanism for plant Na<sup>+</sup> uptake remains unknown.

Recently, a complementary DNA from wheat was isolated that encodes a Na<sup>+</sup>-driven high-affinity K<sup>+</sup> uptake transporter. It suggests that plant cell possesses the Na<sup>+</sup> uptake mechanism to keep the Na<sup>+</sup> concentration inside at certain level.

To understand the role of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> uptake mechanism and Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>transporter more precisely, we tried to clone the Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>transporter gene from *Arabidopsis thaliana* cDNA library on the basis of the data of wheat Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>transporter amino acid sequence. The predicted molecular size of the protein was about 58KD. It seems to have 10-12 transmembrane segment. Its sequence and its hydropathy profile were very similar to those of the wheat one. ArHKT1 is a single-copy gene in *Arabidopsis thaliana* genome. The cation selectivity of ArHKT1 by voltage clamping ArHKT1 in *Xenopus* oocytes showed that inward Na<sup>+</sup> current at the hyperpolarized membrane potential. However, the K<sup>+</sup> current was not detected although the wheat HKT1 conferred the K<sup>+</sup> uptake, which is a significant difference in K<sup>+</sup> selectivity between ArHKT1 and wheat HKT1.

This report suggests that ArHKT1 may provide one of the pathways for Na<sup>+</sup> uptake to keep low concentrations of Na<sup>+</sup> inside cell although it remains unknown whether Na<sup>+</sup> is needed or not for plant cell growth. Our result in this study offer insight into a molecular pathway of Na<sup>+</sup> uptake in higher plants.