

9721 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、耐乾性にも寄与する。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、昨年度にアラビドプシスから単離した $\text{Na}^+$  $\text{K}^+$ トランスポーター遺伝子(AtHKT1)の解析を進めた。

AtHKT1のcDNAの5'領域にPCRによる突然変異が起こっていることが心配された。今回、AtHKT1のプロモーター領域のゲノムDNAを単離したところ、9番目のアミノ酸をコードする塩基がcDNAでは変異していることが明らかとなった。推定されていた開始Metの上流に終始コドンがcDNA配列に認められていたが、ゲノム配列を調べることによって再確認することができた。以上の結果から、AtHKT1は506残基をコードする遺伝子であることが明らかとなった。

前年度の電気生理学的解析から、AtHKT1は $\text{Na}^+$ を透過する輸送体であることが明らかとなっている。さらにこれを確認するために酵母における相補テストを行った。ベクターのみを保持する形質転換酵母では7mM存在している寒天培地では増殖できないことを確認した。ポジティブコントロールとして、小麦由来のHKT1遺伝子(wHKT1)およびアラビドプシス由来の $\text{K}^+$ チャネルを発現させたところ、 $\text{K}^+$ の濃度の低い培地で増殖可能であった。AtHKT1はこの酵母を相補できなかった。この結果から電気生理的測定結果が確認された。次に小麦HKT1は酵母において $\text{K}^+$ 取り込み活性を持つがAtHKT1は持たない性質を利用して、孔を形成するのに重要な領域を決定を行った。その結果、小麦HKT1のN末付近のアミノ酸が $\text{K}^+$ 取り込み活性に関与していることが示された。

AtHKT1の発現様式を探る目的で抗体を作成した。作成した抗体は大腸菌で生産したglutathione S-transferase融合蛋白質のみに反応した。本抗体を用いて根および葉における発現を検討した。その結果、AtHKT1は根および葉の両組織で発現していたが、葉の方が発現量としては多いことが示された。また、可溶性画分と膜画分では予想されたように膜画分にAtHKT1が検出され、膜蛋白質として機能していることが強く示唆された。



9721 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(1)。 $\text{Na}^+$ は植物にとって必須元素ではない。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。 $\text{Na}^+$ 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。動物には能動輸送を担う $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaseが存在するが植物には存在しないとされている。その代わりとして植物においては $\text{Na}^+$ が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(2)。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。

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(3)。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)であることが証明された(4, 5)。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 $\text{K}^+$ チャネル遺伝子と $\text{K}^+$ トランスポーター遺伝子が同定されている(6)。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関の解析が注目される(5, 6)。本研究では、昨年度アラビドプシスから単離した $\text{Na}^+\text{K}^+$ トランスポーター遺伝子(AiHKT1)プロモーター領域の検索、抗体の作成と発現部位の同定、そして、イオン選択性に関わる部位について検討を加えた。

## 2 研究方法

### 1) Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>トランスポーター(AtHKT1)の5'領域ゲノム遺伝子の単離とcDNA 5'領域の確認

アラビドプシス(*Arabidopsis thaliana*)の5'領域のゲノムDNAを単離するためにTail PCR法を用いた。既に得られているcDNAの5'から40bpと100bp下流のDNA配列に相補するオリゴDNAを合成した。また、上流側のDNAプライマーとして、3種類の17bDNAを合成してPCRに用いた。ゲノムDNAは植物体から調製した。PCR反応はプライマーの組み合わせを変えて2回または3回行い、単一バンドが形成された時点でPCR産物を単離して、DNA配列の決定を行った。

### 2) キメラ遺伝子の作成と活性発現

小麦HKT1(wHKT1)とAtHKT1のキメラ蛋白質は両者の配列を並べた際に保存性の高いところで繋ぎ換えるように遺伝子を構築した。遺伝子の発現はGALプロモーターで制御できるように構築した。作成したプラスミドをLi法で*Saccharomyces cerevisiae* CY162に導入した。本酵母は培地中での2種類のK<sup>+</sup>輸送体(TRK1 TRK2)が破壊されている変異株で、培地中のK<sup>+</sup>濃度が低いと酵母は生育することができない。形質転換体はURA3遺伝子を選抜マーカーとした。

### 3) Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>トランスポータ蛋白質を認識する抗体の作成

AtHKT1の親水性部位である部位に相当する遺伝子領域をglutathione S-transferase (GST)遺伝子と融合させたプラスミドを構築した。その領域を図1に示した。大腸菌増殖後、菌を破碎して粗酵素分画を得た。glutathione agaroseに粗酵素液を通して融合蛋白質を吸着させ、洗浄後、glutathioneを用いて融合蛋白質を溶出した。精製した蛋白質をウサギに免疫して3か月後血清を回収した。血清採取後、glutathione S-transferase (GST)遺伝子を発現した大腸菌の粗酵素液と血清を混ぜ、その上清を実験に用いた。

## 3 研究結果

### 1) Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>トランスポーター(AtHKT1)の5'領域ゲノム遺伝子の単離とcDNA 5'領域の確認

設計したDNA primerの組み合わせのうちいくつかで期待される遺伝子配列をもつDNA増幅断片が得られた。そのDNA配列を図2に示す。AtHKT1の開始コード

ンから、約800bp上流が単離できた。cDNAの塩基配列から推定されたように、開始Metと同じフレームに終始コドンが確認された。このことから、最長でもAtHKT1をコードする遺伝子は推定される開始アミノ酸からかもしかしくはそれより短いことが推定された。翻訳開始点より上流にはTATA配列やCAT配列といった転写開始に重要とされる遺伝子配列が存在した。

cDNAの5'領域を5'RACE法で延長した際、開始コドンから9番目のアミノ酸はThrである可能性があったが、これは5'RACE法の反応中における変異であることがわかった。ゲノムの配列からこのアミノ酸はAlaであることが確認された。以上の結果から、AtHKT1は506残基をコードする遺伝子であることが明らかとなった。

## 2) キメラ遺伝子の作成と活性発現

AtHKT1は前年度の電気生理学的解析から、 $K^+$ は透過しないで、 $Na^+$ を透過する輸送体であることがわかった。さらにこれを確認するために酵母における相補テストを行った。用いた酵母は $K^+$ が7mM存在している寒天培地では増殖できない性質で、ベクターのみを保持する形質転換酵母では増殖できないことを確認した(図3A)。ポジティブコントロールとして、小麦由来のHKT1遺伝子(wHKT1)およびArabidopsis由来の $K^+$ チャネル(KAT1)を発現させたところ、 $K^+$ の濃度の低い培地で増殖可能であった。AtHKT1はこの酵母を相補しなかった。この結果は、卵母細胞における電気生理的測定結果と一致した。

小麦HKT1は酵母において $K^+$ 取り込み活性を持つがAtHKT1は持たない性質を利用して、孔を形成するのに重要な領域を決定するのを目的にキメラ遺伝子の作成を行った。 $K^+$ 取り込み活性の有無は酵母の相補テストによって行った。その結果、wHKT1のN末付近のアミノ酸が $K^+$ 取り込み活性に関与していることが示された(図3B)。現在、更に $K^+$ 取り込み活性に関わるアミノ酸を限定するために、キメラ遺伝子を作成して調べている。

## 3) AtHKT1の発現様式

AtHKT1の発現様式を探る目的で抗体を作成した。図4Aに示したように作成した抗体は大腸菌で生産したGSTフュージョン蛋白質のみに反応した。本抗体を用いて、根および葉におけるそれぞれの発現を検討した。その結果、AtHKT1は根および葉の両組織で発現していたが、葉の方が発現量としては多いことが示された(図4B)。また、可溶性画分と膜画分では予想されたように膜画分にAtHKT1が検出され、膜蛋白質として機能していることが強く示唆された。

#### 4 考察

AtHKT1のcDNAの5'領域は5' RACE法で単離したことから、PCR中の突然変異が起こっていることが心配された。今回、ゲノムDNAを単離して9番目のアミノ酸をコードする塩基がcDNAでは変異していることが明らかとなった。推定されていた開始Metの上流に終始コドンがcDNA配列に認められていたが、ゲノム配列を調べることによって再確認することができた。この全遺伝子を用いて酵母におけるK<sup>+</sup>取り込み活性の有無を検討することにした。

wHKT1遺伝子はその遺伝子産物が酵母のK<sup>+</sup>取り込み能を相補する遺伝子として単離された。wHKT1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が推定されていた。しかし、このイオン透過性の相違を電気生理学的手法および今回の酵母を用いた相補テストで検討したところ、AtHKT1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wHKT1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。植物細胞においてNa<sup>+</sup>の細胞内への取り込みはどのような機構で行われるかは未知である。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>輸送体の存在は確認されていなかった。AtHKT1は実際の細胞で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予想される。輸送活性を調節をうけることによってイオン透過性が変換することは他の輸送体でも報告がある。共役系などとの相互機能も考えられることから今後の研究で解明されることが期待される。

HKT1の構造に関する情報はほとんどないことから、我々はwHKT1とAtHKT1のキメラ遺伝子の作成に基づくK<sup>+</sup>透過領域の限定を開始した。現在は、まだ途中段階であるがN末領域がK<sup>+</sup>に関与していることが明らかになりつつある。構造からの追求によって、イオン透過性の相違に関わる原因が解明されることを期待している。

低濃度で存在する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、抗体を用いた組織における本蛋白質の発現様式は主に葉で発現していることが示された。wHKT1は

葉と根の維管束周辺の細胞で発現していることが報告されているが、AtHKT1についてもその可能性がある。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、Na<sup>+</sup>の取込みに積極的に働いている輸送体の存在が推定されており、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(1)。

## 5 今後の課題

今回の結果から、AtHKT1の全遺伝子が単離されたことから、本遺伝子を用いて正確な解析が今後行っていこうと考えている。ひとつの方針としては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った。長時間にはAtHKT1のイオン輸送活性を調べるために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>透過能を検討した。この結果、遺伝子から推定されるアミノ酸配列はAtHKT1とwHKT1ではN末端からC末端全体に渡って保存されているにも関わらず、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。現在進めているキメラ蛋白質を作成しイオン選択性の異同に関わる部位の同定を行っていく意義は十分あると考えている。

HKT1とは異なる高親和性K<sup>+</sup>輸送体がアラビドプシスから単離された。これは大腸菌のホモログであり、AtHKT1とは区別される輸送体である。この新しい輸送体とAtHKT1との相違についても発現様式等から探ることは両者の役割を明確にする上で重要である。

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。AtHKT1の発現を抑制した変異体もしくは発現量を増大した変異体を作成することを行い、AtHKT1の生理的意義を追求していきたい。

AtHKT1の生理的意義を理解する上でもう一つの重要な点は植物体のどの組織、どの細胞で機能しているかを解明することである。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を今回作成した抗体を用いて明らかにしていく必要がある。さらに、生育条件によってAtHKT1の発現が変化することが期待される。様々なイオンの培地中への添加、添加量への依存性、添加時期について発現様式を調査していくことは重要な情報となる。

## 6 文献

- (1) Rains, D. W., and Epstein E. (1965) Transport of sodium in plant tissue. *Science*, 148, 1611
- (2) Lacan, D., and Durand, M. (1996)  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  exchange at the xylem/symplast boundary. *Plant Physiol.*, 110, 705-711
- (3) 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
- (4) 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
- (5) 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
- (6) Kim, E. J., Kwak, J. M., Uozumi, N., and Schroeder, J. I. (1998) *AtKUP1*: An Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell*, 10, 51-62



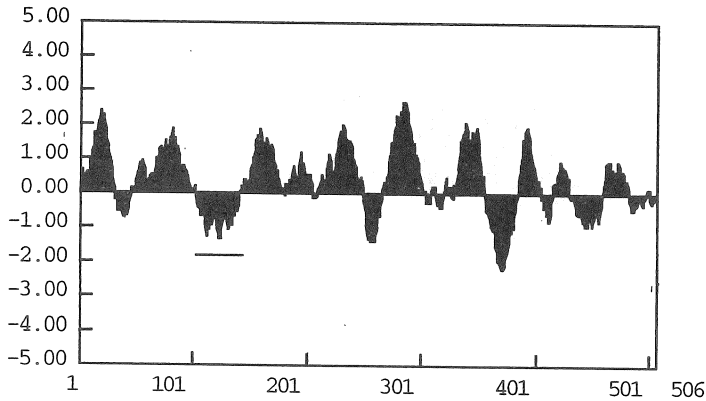


図1 AtHKT1のhydrophobicity profile  
下線部が抗体作成に用いた領域

```

ACTCCATGTGTCAATACCAAAAAGACGTAGTTTCGCCGCTTTTAACCACTACCAT
GACTGTTGATCTCTTTAAATAATTA AAAAGTGGTGTTC CCCATGAAGACCGTTC ACTTCC
ATCAATTTATGGTCTTCTTGGACCAATTCGTTTATCCAACTATTACCCCTACAACATC
GTTTATAAATTGTCTTTACATTTTGATCTAGAATTTGATCTATTTGACGCAATCCTCTT
CCACCTTTTCAGGCATGTACGAGCAATATAACATGAGTTTGATCAAATTTTGCATGGTCT
CTACGAAGTTGAGTCATGCAATTTTACCTATAATTTTGTCTCGGCATTTTATAGCT
CTCTACTTAGGATATAAGTAACATGGAGTTGGATGAATCCTTTTCTTTATATTGAAATCG
AATCTTCAATGCTAAAAATAAAATCCACTCAATCAGTGAGAGAATTATTATGGAACAAGC
TATAAAGACGAAAGAATCACTCAATCATAACAATAAAGAAGGATGTTTTTTTCATTTAAC
TAAGAAAGAGAACTTTTCCACGTGAATTA AAAATAGACATCTCAATAATAAAGACGATTTT
TTTTCTCTCTTTTCCCTCACTTTGTATTGTATTGTATTCTATATATTTCTTCTCTCT
TACAAATACCCTTTAAATTGGAAGAAAAACAGGAATCGCTATCATCAGTAATAGTCA
TCATTAATCAATTTATATGTAATATGTGGCTGACAATTTCCATGTACGTGTAATATGTAA
TATATAAACACA ACTTATGGCCAGTATAATATTAATGCT TAAACCGACTCGAGA ACTAAA
ATGGACAGAGTGGTGGCAAAAATAGCAAAAATCCGTTTCGCAGCTTACTAAATTACGTTCA
M D R V V A K I A K I R S Q L T K L R S
    
```

図2 AtHKT1のプロモーター領域  
四角は転写開始に関与すると推定される塩基配列  
下線は開始コドンとin frameとなる終始コドン

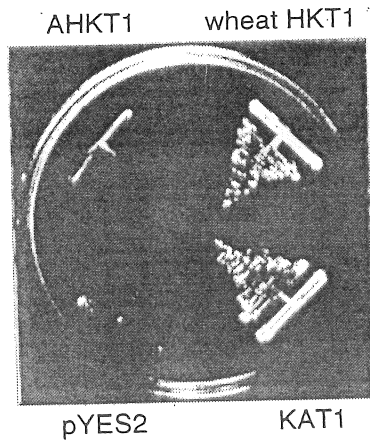


図3A 突然変異体酵母に発現させたAtHKT1の相補実験

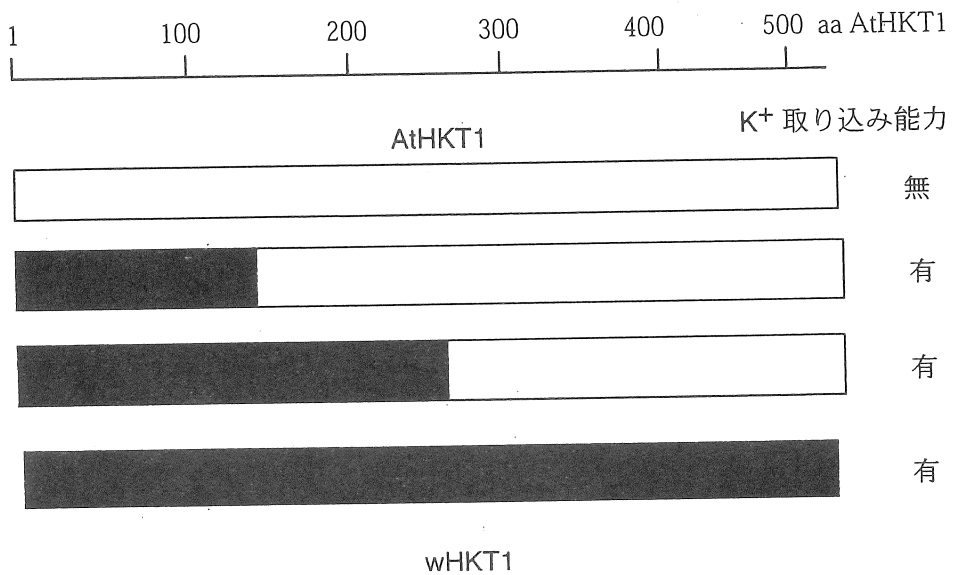


図3B AtHKT1とwHKT1のキメラ遺伝子の作成と機能発現  
上段はAtHKT1由来のアミノ酸番号を示す。

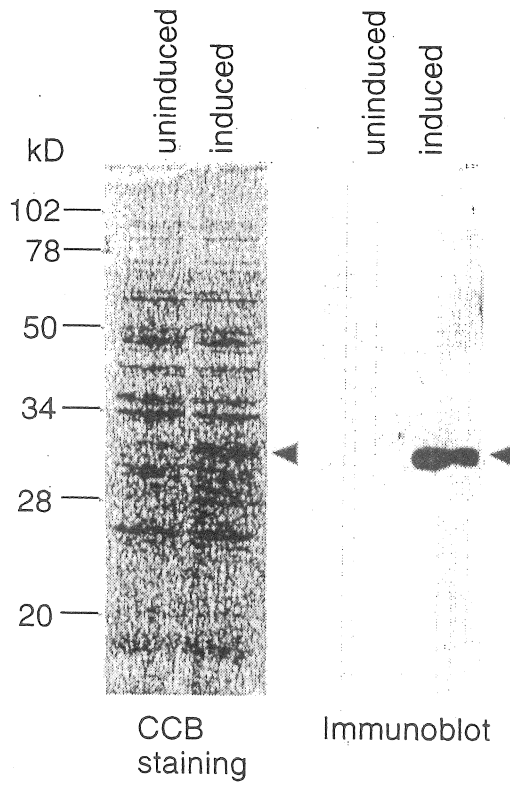


図4A 大腸菌で発現させたAtHKT1の融合蛋白質

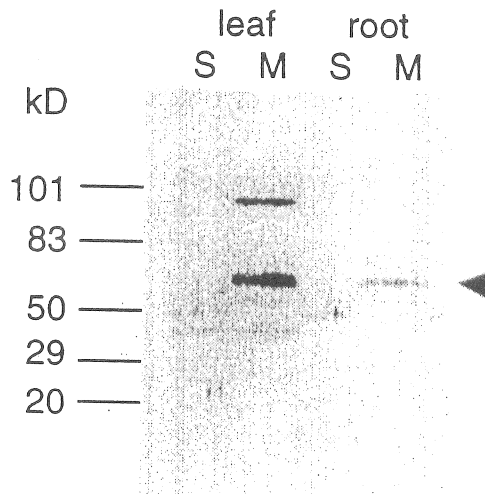


図4B アラビドプシスから単離した葉と根の組織特異的AtHKT1の分布  
Sは可溶性画分、Mは膜画分

## 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. The molecular mechanism for plant Na<sup>+</sup> uptake however remains unknown. We have isolated the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> transporter homologue from *Arabidopsis thaliana*, AtHKT1 and have determined DNA sequence.

To confirm the amplified 5' cDNA sequence and to isolate the promoter region of AtHKT1, the 5' flanking DNA sequence of AtHKT1 was isolated from genomic DNA from *Arabidopsis thaliana*. Isolation of the 5' region was performed according to thermal asymmetric interlaced (TAIL) PCR method. The longest genomic PCR products extends about 850 bp beyond the putative translation start codon. The DNA sequence was confirmed independently by isolating using PCR primers located at 5' end of the sequence and the primer inside AtHKT1 cDNA. The sequence of the genomic DNA matched RACE-extended cDNA sequence except for the one nucleotide corresponding to amino acid at the position 9. A putative TATA boxes (TATATA) that exhibit a high degree of similarity to the plant TATA consensus sequence. The two putative CAAT boxes were identified at the promoter region.

The wheat HKT1 (wHKT1) confers the K<sup>+</sup> permeation ability but AtHKT1 did not possess the K<sup>+</sup> uptake property. To elucidate the pore region which determines the ion selectivity, we constructed chimera plasmids from wHKT1 and AtHKT1. The N-terminus region of wHKT1 is responsible for K<sup>+</sup> permeation. This study is now in progress.

A glutathione-S-transferase (GST)-AtHKT fusion protein was purified for antibody production. The amino acid sequences that shows highly hydrophilic region located at the middle part of AtHKT1 protein based on the hydrophobic profile was chosen as an epitope to produce AtHKT1-antibody. Immunoblot analysis of protein from *Arabidopsis* root and leaf showed the detection of a protein at predicted molecular mass of AtHKT1 of 56kD in membrane fraction not but in soluble fraction. This is consistent with the membrane protein of AtHKT1. The antibody also recognized a higher molecular weight band that is present in only membrane fraction. The leaf fraction exhibited a slightly higher in intensity of the signal of 56kD.