

植物の塩ストレス耐性を増強するカチオン結合タンパク質と液胞機能に関する 分子生理学的研究

前島 正義, 富岡 利恵

名古屋大学大学院生命農学研究科

概要 高塩濃度の土壌に生育する植物は、異常浸透圧、脱水および塩による化学的な傷害を受け、生育に支障をきたす。耐塩性植物の多くは、塩ストレスに対して適合溶質の合成と蓄積、塩の排出、細胞質の塩の液胞への隔離等の機構を通して耐性を発揮している。当研究室では、PCaP2 とよぶ新規なカチオン結合タンパク質をコードする遺伝子の過剰発現により、植物の発芽・生育初期において、強い耐塩性を付与することを見出した。例えば、50 mM あるいは 80 mM NaCl 存在下で 2 週間生育させたシロイヌナズナを観察すると、PCaP2 過剰発現の 3 株(OX1, OX2, OX3)での生育が野生株(Columbia 0, WT)に比べて顕著に生育がよい。この現象は、発芽時期の耐性なのか、発芽後の初期生育の塩耐性が上昇しているためなのかも検討が必要である。本研究では、新規分子 PCaP2 の生理的役割と過剰発現による耐塩性付与の機構を解析し、主として以下の研究成果を得た。

(1)我々が見出した新規分子 PCaP2 は、脂質修飾を受けて細胞膜に結合する Ca^{2+} 結合タンパク質であり、PCaP2 の N 端領域(23 残基)を介してカルモジュリン(CaM)やホスファチジルイノシトールリン酸(PtdInsP)との結合性をもつユニークな分子であり、その特性に依存して情報変換に関わる分子であると推測される。すなわち、情報伝達分子として機能する PtdInsP 分子を PCaP2 が結合して機能をマスクし、細胞内外の刺激に応じて細胞質カルシウム濃度が上昇すると Ca^{2+} /CaM 複合体が PCaP2 に結合し、同時に結合している PtdInsP が遊離し、情報伝達が進行するとのモデルを提案した。

(2)PCaP2 を過剰発現した植物の耐塩性を検証したところ、NaCl を 80 mM あるいは 100 mM 含む培地に播種したところ、野生株に比べて、過剰発現株は顕著に高い発芽率を示した。すなわち、PCaP2 の過剰発現は、発芽時における塩ストレス耐性を高める。

(3)液胞への Na^+ 取込みをエネルギー的に支えるのは H^+ -ピロホスファターゼ(H^+ -PPase)と液胞膜 H^+ -ATPase である。 H^+ -PPase には I 型と II 型が存在する。そこで、いずれが液胞での Na^+ 取り込みに重要であるかを検討した。その結果、II 型はゴルジ体膜に局在し、そのタンパク質量は、I 型(液胞膜型)の 0.2% 以下であることを明らかにした。すなわち、植物の耐塩性を論じる場合は、I 型 H^+ -PPase のみを考慮すれば良いことを定量的に明らかにした。

1. はじめに

高塩濃度の土壌に生育する植物は、異常浸透圧および塩による化学的な傷害を受け、生育に支障をきたす。耐塩性植物の多くは、塩ストレスに対して適合溶質の合成と蓄積、塩の排出、細胞質の塩の液胞への隔離等の機構を通して耐性を発揮している。当研究室では、PCaP2 とよぶ新規なカチオン結合タンパク質をコードする遺伝子の過剰発現により、植物の発芽・生育初期において、強い耐

塩性を付与することを見出した(図 1)。例えば、50 mM あるいは 80 mM NaCl 存在下で 2 週間生育させたシロイヌナズナを観察すると、PCaP2 過剰発現の 3 株(OX1, OX2, OX3)での生育が野生株(Columbia 0, WT)に比べて顕著に生育がよい。この現象は、発芽時の耐性なのか、発芽後の初期生育の塩耐性が上昇しているためなのかも検討が必要である。本研究では、新規分子 PCaP2 の生理的役割と過剰発現による耐塩性付与の機構を解析し、以下

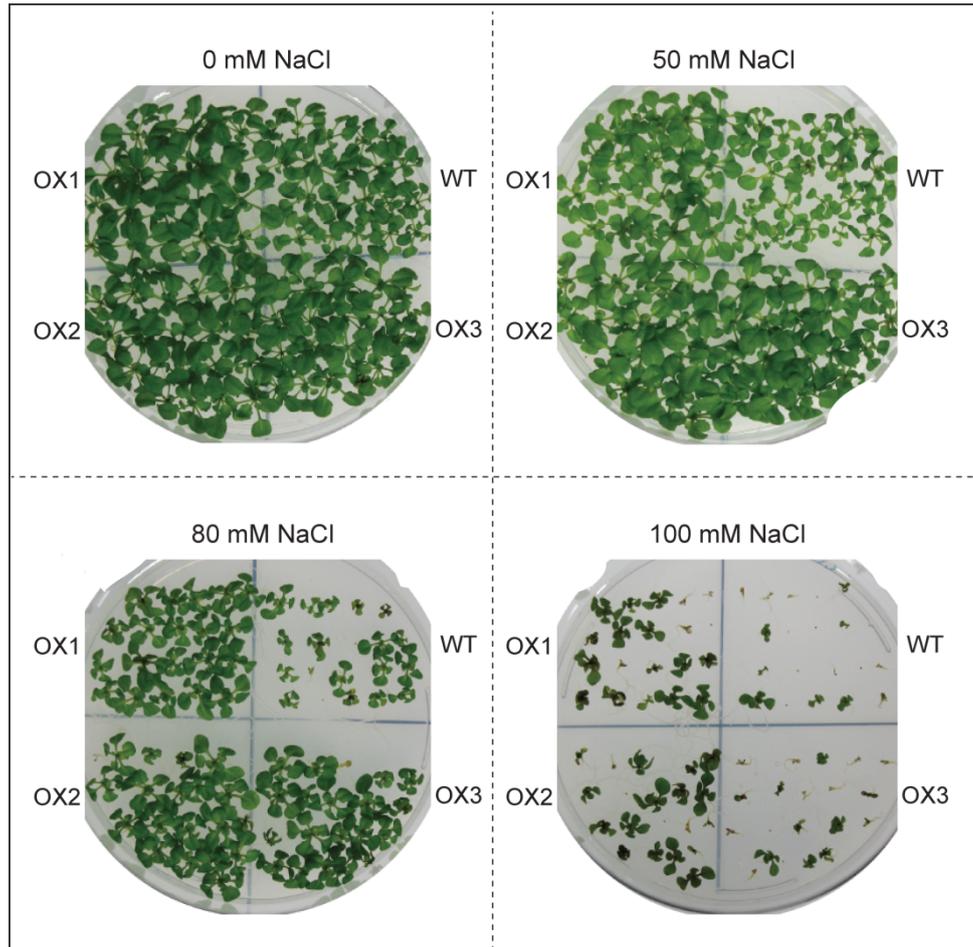


図1. シロイヌナズナ野生株 (Col. 0; WT) とPCaP2 遺伝子過剰発現株 (OX1, OX2, OX3) の耐塩性の比較。NaCl 濃度を 0、50、80、100 mM とした寒天培地のシャーレを 4 分割し、それぞれに野生株と過剰発現株を播種し、22°C、長日条件 (16 時間明期/8 時間暗期) で生育させ、2 週間後に撮影した。0 mM でも、野生株と過剰発現株で生育の差が見られるが、これは過剰発現株で発芽がやや促進されているためである (後述)。耐塩性の差異は、たとえば 80 mM NaCl プレートで顕著である。野生株の生育が著しく抑制されているのに、過剰発現株では 0 mM NaCl プレートに比べて生育の抑制は見られるものの、野生株に比して有為に生育が良い。100 mM NaCl 条件では、いずれも生育が悪く、アントシアニンの蓄積も顕著であった。

の内容を研究目的とした。

(1)我々が見出した新規分子 PCaP2 は、脂質修飾を受けて細胞膜に結合する Ca^{2+} 結合タンパク質であり、カルモジュリンやホスファチジルイノシトールリン酸との結合性をもつユニークな分子であり、その特性に依存して情報変換に関わる分子であると推測される。この点を、生化学的に明らかにする。

(2)この遺伝子を過剰発現した植物の耐塩性を確認する。分子の生理機能と耐塩性付与の機構を明らかにする。

(3)液胞への Na^+ 取込みをエネルギー的に支える H^+ -ピ

ロホスファターゼ (V-PPase) に注目し、その高機能型分子を組織特異的なプロモータ下で発現させ、効果を検証する。

塩は、必ずしもマイナスの影響のみではなく、低濃度においてはプラスの効果もあると推測される。この点を、継続的な研究活動により、生育速度、細胞膜と液胞膜のイオン輸送系、さらに植物体内のイオンバランスへの影響について解析し、塩のポジティブな面の理解を進める。

以下、上記 3 点の項目について報告する。

2. 耐塩性に関する PCaP2 分子の分子特性

カルシウム結合性タンパク質として新規に見出した分子 PCaP2 は、ユニークな分子特性をもつことを明らかにした。PCaP2 は 168 個のアミノ酸で構成され、そのアミノ酸組成と配列からは水溶性タンパク質と推測される。事実、リジン、グルタミン酸などの荷電アミノ酸を多量に含み、大腸菌に遺伝子導入して発現させたリコンビナントタンパク質は可溶性画分に回収される。PCaP2 は、N 端から 2 番目のグリシン残基を介してミリストイル基と共有結合し、細胞膜に安定に結合している。この 2 番目のグリシンをアラニンに置換するとミリストイル化は起こらず、PCaP2 は細胞膜への結合能を失う。PCaP2 は、ホスファチジルイノシトールリン酸 (PtdInsPs) との結合能をもつことが生化学的な実験により明らかになった (Kato *et al.*, 2010a)。

さらに詳細な実験により、PCaP2 の N 端領域 (23 残基) が PtdInsPs との結合に不可欠であり、なおかつ、N 端領域はカルシウムイオン存在下でカルモジュリン (CaM) と結合することが明らかになった (Kato *et al.*, 論文投稿中)。さらに $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 複合体の結合は、PCaP2 から PtdInsPs を遊離させる性質をもつことを明らかにした。こうした特性から、

PCaP2 の役割を推測し、分子機構モデルを提案した (図 2) (Kato *et al.*, 2010b)。すなわち通常状態 (静止状態) では、PCaP2 はその N 端領域で細胞膜の PtdInsPs と結合している。細胞内外の情報が入ることで、細胞質カルシウム濃度が上昇すると CaM との複合体 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が形成され、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が PCaP2 の N 端領域に結合する。このプロセスで、既に結合していた PtdInsPs は N 端領域から遊離する。ここまでの内容を本研究で明らかにした。これ以降は、すでに知られている教科書的、基礎的な内容である。遊離した PtdInsPs は、細胞膜のカリウムチャンネルを開口するなどの作用を発揮する。一部の PtdInsPs は、細胞膜結合のホスホリパーゼ C の加水分解作用により、ホスファチジルイノシトール三リン酸 (IP_3) およびジアシルグリセロール (DAG) が生成する。可溶性の IP_3 は ER 膜の IP_3 感受性カルシウムチャンネルを開口して細胞質カルシウム濃度を上げる。上昇したカルシウム濃度と DAG の作用で、細胞膜に局在するプロテインキナーゼ C (PKC) が活性化され、標的タンパク質をリン酸化して機能を調節する。

PCaP2 ではどのようなタンパク質が PKC の標的となるのか、どのようなイオンチャンネルが PtdInsPs の標的になるのか、

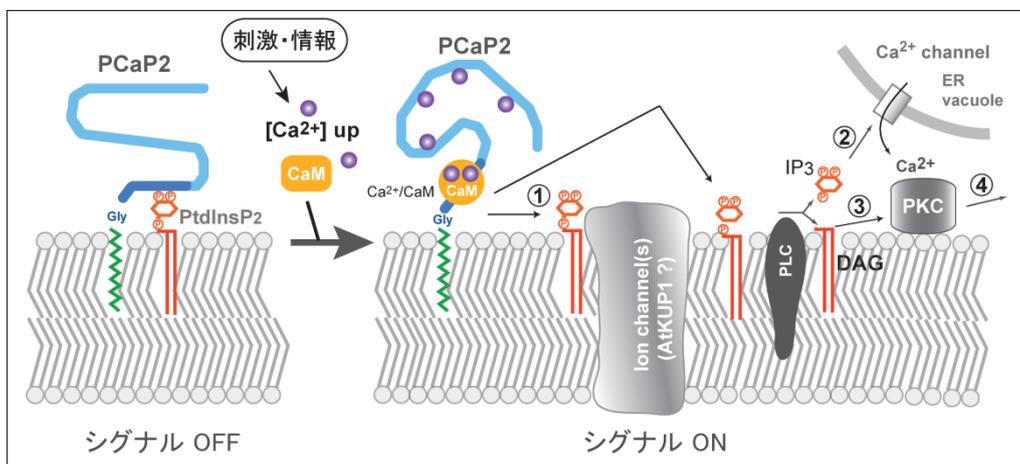


図 2. PCaP2 の機能を説明する分子モデル。PCaP2 はミリストイル化により細胞膜に安定に局在し、膜中の PtdInsPs 分子と結合している。図では、PCaP2 分子を水色で示し、その N 端領域を青色で強調している。細胞内刺激により細胞質カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) が上昇すると、カルモジュリン (CaM) との複合体 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が形成され、これが PCaP2 の N 端領域に結合し、同時に PCaP2 から PtdInsPs を遊離させる。その後、遊離した PtdInsPs はそれ自身が、イオンチャンネルを活性化 (開口) する場合もあれば、ホスホリパーゼ C の作用を受けて IP_3 とジアシルグリセロール (DAG) に加水分解され、 IP_3 と DAG がそれぞれの情報伝達を進め、プロテインキナーゼ C を活性化し、標的タンパク質のリン酸化を通して最終的な情報伝達を終える、と推測される。本研究ではこのプロセスの前半部分 ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 結合による PtdInsPs の遊離) を実験的に証明した。

か、などの点は今後の検討課題である。また、植物にはカルモジュリンおよびカルモジュリン様タンパク質は 50 種以上存在するので、どの分子種が PCaP2 と相互作用するのかも検討を進めている。次の項では、上記の分機構モデルにもとづいて、PCaP2 過剰発現による耐塩性増進との関連で議論する。

3. PCaP2 過剰発現株の高濃度塩存在下での発芽の促進効果

PCaP2 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータに連結して、シロイヌナズナに導入し複数のホモラインを得た。それぞれの過剰発現ラインと野生株の種子を同時に寒天培地に播種し、22°C、長日光条件下で生育させ

た。それぞれのライン 50 粒以上の発芽状況を観察し、結果をグラフとして図 3 に示した。野生株についてみると、塩を含まない培地では播種後 2 日目で大部分の種子が発芽するが、100 mM NaCl での野生株は 7 日目で発芽率 50% となる。一方、過剰発現株では、3 ラインとも、塩の存在しない培地では野生株と同様に 2 日目でほぼ全てが発芽するが、100 mM NaCl 存在下での 5 日目を見ると、過剰発現株では 45% (OX4)、59% (OX6)、78% (OX7) であり、野生株の 35% に対して、有為に高い値となっている。この傾向は、4 日目、6 日目、7 日目でも同様である。したがって、PCaP2 の過剰発現は、発芽時における塩ストレスの影響を軽減する作用をもつ、と結論できる。

塩は、細胞内の酵素機能に負の影響を及ぼし、また組

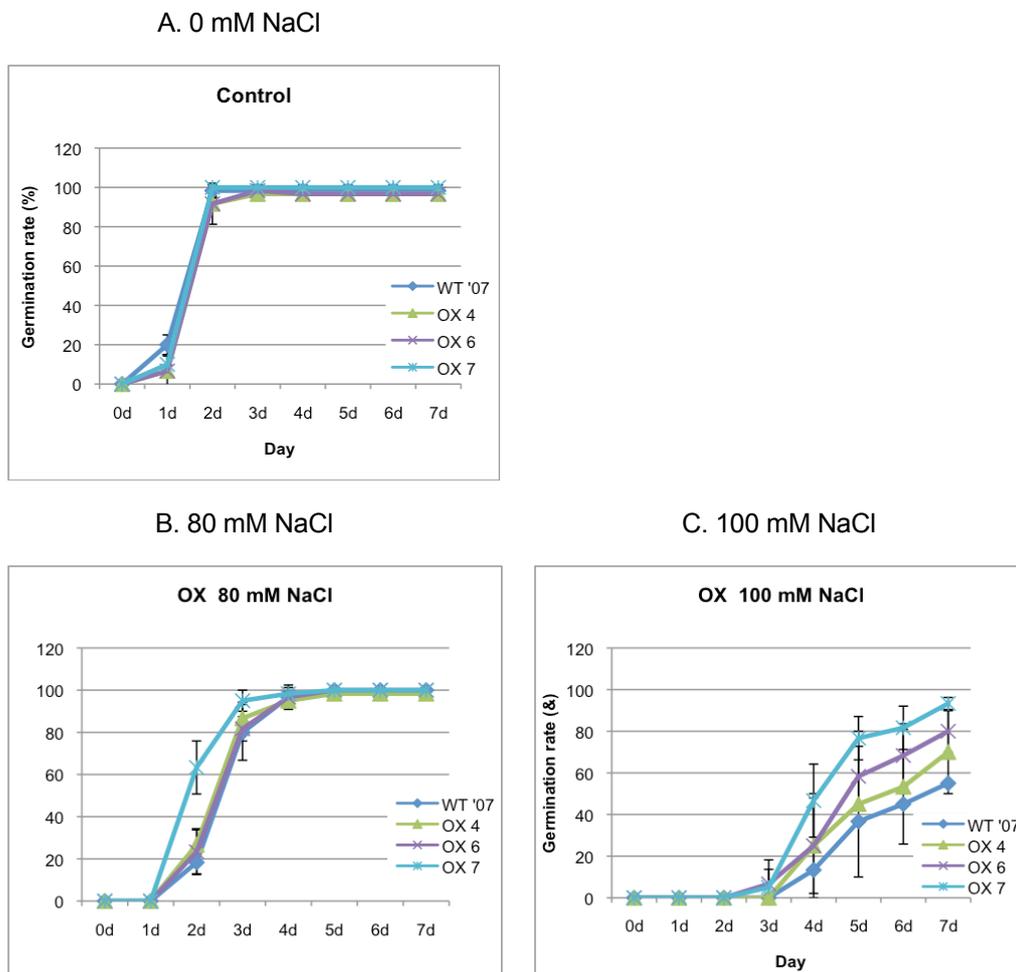


図 3. PCaP2 の過剰発現は発芽における塩ストレス耐性を向上させる。野生株 (WT) と PCaP2 の過剰発現株 (*Pro35S::PCaP2*) の 3 ライン (OX4, OX6, OX7) を 20 粒ずつ、80 mM および 100 mM NaCl を含む MS 培地 (寒天固形培地) に播種し、7 日目まで発芽率を測定した。なお、NaCl を含まない培地 (0 mM NaCl) も用意し、野生株と過剰発現株の種子を 20 粒ずつ 3 プレートに播種した。エラーバーは標準誤差を示す。

織外の浸透圧が高くなることで水の吸収、栄養成分の吸収等を阻害することで植物の生育を抑制する。種子は適切な外部環境、とくに土壌成分あるいは水溶液状況が整うことで発芽する。塩濃度が高い場合は、その発芽が抑制される。図3に示されているように、塩濃度が80 mMであれば、発芽の遅延は見られるが、5日目にはほぼ全ての種子が発芽した。100 mM NaClでは発芽の遅延は顕著である。この発芽の遅延は、PCaP2の過剰発現株では、部分的に回復している。その意味を考察したい。上述のように、PCaP2の役割は、静止状態では細胞内のPtdInsPsシグナリングを抑制しており、ストレスあるいは内部環境の変化に伴う細胞質カルシウム濃度の上昇をもたらされたとき、このPtdInsPsシグナリングの抑制が解除される。おそらく、高塩濃度存在下では、異常環境が細胞質カルシウム濃度の上昇として伝わり、塩ストレス応答が進行すると推定され、その結果、異常環境での防御応答を優先し発芽を抑制するものと推測される。PCaP2遺伝子の過剰発現株では、このPtdInsPsシグナリングの抑制状態に異変が起きているか、あるいは塩ストレス下でのPtdInsPsシグナリング抑制の解除が正常に進まないために、塩ストレス応答が適切に作動しない、と推測される。一言で表現すれば、PCaP2の過剰発現は塩ストレスに対する正常な応答反応の進行を妨げる、といえる。比喻を用いた表現が許されるのであれば、PCaP2は植物生育のブレーキ役であり、異常環境下での生育遅延や抑制に関わっており、この遺伝子の過剰発現はそのブレーキ機能を阻害する、といえる。

4. 液胞へのNa⁺取込みをエネルギー的に支えるH⁺-ピロホスファターゼについて

植物が耐塩性を向上する機構の一つとして、細胞質の過剰なナトリウムを液胞に能動輸送し、隔離するしくみが存在する。具体的にナトリウムを集積するのは、Na⁺/H⁺交換輸送体であるが、その能動輸送を支えるのは液胞膜プロトンポンプ、すなわちピロホスファターゼ(H⁺-translocating pyrophosphatase, H⁺-PPase)とH⁺-ATPaseである。

当研究室ではH⁺-PPaseの研究を積み重ねてきた。具体的な対象生物は陸上植物と放線菌である。これまで植物液胞膜および他生物種のH⁺-PPase(V-PPase)は、H⁺特異的なイオンポンプと考えられてきたが、フィンランドの

研究グループは、高度好熱菌 *Thermotoga maritima*、中度好熱菌 *Moorella thermoacetica*、好熱菌 *Methanosarcina mazei* のH⁺-PPaseを詳細に解析して、これらの酵素がH⁺ではなくNa⁺を能動輸送するナトリウムポンプであることを発表した(Malinen *et al.*, *Biochemistry*, 2007, 46:8872-8878)。当研究室で対象にしている放線菌のH⁺-PPaseはNa⁺の存在によって活性が増大することから、Na⁺輸送能をもつ可能性があるかと推測し、検証した。具体的には、H⁺-PPaseの遺伝子を欠いた放線菌株と野生株を、NaClを含む培地で培養し生育の差異を検討した。NaCl濃度を上げることにより放線菌の生育速度は低下するが、野生株と変異株の間にはまったく差異はみられず、放線菌酵素がNa⁺-PPaseである可能性はないと判断した。しかし、植物に好熱菌由来のNa⁺-PPaseを遺伝子導入したとき、この酵素が細胞膜あるいは液胞膜に局在化すれば、植物の耐塩性が向上するものと期待でき、シロイヌナズナへの導入準備を進めており、今夏には第一世代の植物株が得られる予定である。得られ次第、生育特性とともに、導入株の耐塩性を検討する。

なお、植物には液胞膜局在のH⁺-PPase(V-PPase)に加えて、他の種類のH⁺-PPaseの存在が知られている。V-PPaseをI型酵素、他をII型酵素としている。I型とII型はアミノ酸配列も異なり、同一生物種でも配列一致率は30%程度である。I型は活性発現にカリウムイオンを要求する。一般的には30 mM以上のK⁺存在下で全活性を発揮する。一方、II型酵素はカリウムを添加しても活性の上昇が生じない。本研究では、耐塩性に関わるH⁺-PPaseとしてV-PPase、すなわちI型H⁺-PPaseのみを考慮すれば良いのか、あるいはII型も考慮すべきかの検討を進めた。具体的には、以下の結論を得た(Segami *et al.* 2010, *Plant Cell Physiol.*, 51: 1350-1360)。

(1)シロイヌナズナには、I型として*AtVHP1;1*(AGI locus ID, At1g15690)、II型として*AtVHP2;1*(At1g78920)及び*AtVHP2;2*(At1g16780)が存在し、いずれも遺伝子として発現している。

(2)I型酵素は100 mMのナトリウム存在下では活性が半減するが、II型酵素は90%の活性を発揮することができ、II型酵素はI型に比べて耐塩性が高い。

(3)I型は液胞膜に局在し、II型はゴルジ装置に局在する。本研究では免疫化学的な方法でタグを付さないタン

パク質の局在を検定したが、既報の緑色蛍光タンパク質 GFP 連結型 H⁺-PPase の発現による検定結果 (Mitsuda *et al.* 2001, FEBS Lett., 488: 2-33)、あるいは植物オルガネラタンパク質のプロテオーム解析 (Dunkley *et al.* 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 6518-6523) の結果とも一致した。

(4) I 型と II 型の H⁺-PPase に特異的な抗体を調製し、精製した H⁺-PPase を標準標品として、I 型と II 型 H⁺-PPase のタンパク質量を、植物の組織毎に、免疫化学的に定量した。その結果、II 型 H⁺-PPase は子葉、若い葉、花卉で発現しタンパク質が蓄積しているが、その量は、I 型酵素の 0.2% 以下であることを明らかにした。したがって、全体としての寄与度は極めて低く、液胞でのナトリウムイオン集積には何ら貢献していないと判断した。

今後、I 型 H⁺-PPase あるいはその改変型酵素を増強した植物での耐塩性について検討を進めたい。

謝 辞

財団法人ソルト・サイエンス研究財団による研究助成により、塩に関する多面的な実験に取り組むことができたことを明記し、深謝申し上げる。

発表した関連論文

- (1) Kato, M., Nagasaki-Takeuchi, N., Ide, Y., Tomioka, R., and Maeshima, M. (2010) An *Arabidopsis* hydrophilic Ca²⁺-binding protein with a PEVK-rich domain, PCaP2, is associated with the plasma membrane and interacts with calmodulin and phosphatidylinositol phosphates. *Plant Cell Physiol.*, 51: 366-379. doi: 10.1093/pcp/pcq003
- (2) Tsuchihira, A., Hanba, Y.T., Kato, N., Doi, T., Kawazu, T., and Maeshima, M. (2010) Effect of overexpression of radish plasma membrane aquaporins on water-use efficiency, photosynthesis, and growth of *Eucalyptus* tree. *Tree Physiol.*, 30: 417-430. doi: 10.1093/treephys/tpp127
- (3) Kato, M., Nagasaki-Takeuchi, N., Ide, Y., Tomioka, R.,

and Maeshima, M. (2010) PCaPs, possible regulators of PtdInsP signals on plasma membrane. *Plant Signaling & Behavior*, 5: 848-850.

- (4) Segami, S., Nakanishi, Y., Sato, H.M., and Maeshima, M. (2010) Quantification, organ-specific accumulation and intracellular localization of type II H⁺-pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 51: 1350-1360. doi:10.1093/pcp/pcq096.
- (5) Muto, Y., Segami, S., Hayashi, H., Sakurai, J., Murai, M., Hattori, Y., Ashikari, M., and Maeshima, M. (2011) Vacuolar proton pumps and aquaporins involved in rapid internode elongation of deepwater rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75: 114-122. doi: 10.1271/bbb.100615
- (6) Fukao, Y., Ferjani, A., Tomioka, R., Nagasaki, N., Kurata, R., Nishimori, Y., Fujiwara, M., and Maeshima, M. (2011) The iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 155: 1893-1907. doi: 10.1104/pp.110.169730
- (7) Kawachi, M., Kobae, Y., Tomioka, R., and Maeshima, M. (2011) The role of membrane transport in the detoxification and accumulation of zinc in plants. In *A Soil Biology Series: Detoxification of Heavy Metals*. Springer-Verlag. In Press (単行本)
- (8) Kawachi, M., Nagasaki-Takeuchi, N., Kato, M., and Maeshima, M. (2011) Application of radioisotope in biochemical analysis: Metal binding proteins and metal transporters. In *Radioisotope*, Ed by Singh, N., InTech, In press. (単行本)
- (9) 前島正義: 項目(吸水等5項目)執筆, 生物学辞典, 東京化学同人, (2010) 2010 年 12 月 10 日. 総頁数 1615 頁
- (10) 河内美樹、前島正義: 4.2.7. 植物に含まれる物質. 「生物の事典」(石原勝敏, 末光隆志編) 朝倉書店, pp.109-114(2010) 総頁数 560 頁

Molecular Physiology of the Novel Cation-Binding Protein and Vacuolar Function, which are Related to Salt Tolerance of Plant

Masayoshi Maeshima and Rie Tomioka

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

Summary

In salinity soils, plant growth is severely suppressed due to water potential reduction, cellular dehydration, and ion toxicity. However, many plants survive or even thrive at high salt levels. Salt tolerant plants can synthesize compatible solute, exclude salt, compartmentation of excess ions in the cytoplasm into vacuoles, and suppress influx of salt ions. In addition to these biochemical mechanisms, we found that a novel signal transducing protein, PCaP2, is involved in response to salt stress. We revealed the following points.

(1) PCaP2 has an ability to bind phosphatidylinositol phosphates (PtdInsPs) and Ca^{2+} /calmodulin (Ca^{2+} /CaM) complex, which are involved in signal transduction. Under normal conditions, PCaP2 masks the physiological function of PtdInsPs. Under stress conditions, the free Ca^{2+} concentration in the cytoplasm increases and the formation of Ca^{2+} /CaM complex is stimulated. When the Ca^{2+} /CaM complex binds PCaP2, PCaP2 releases PtdInsPs. The released PtdInsPs and its hydrolysis products, PI_3 and diacylglycerol, might activate specific ion channels and protein kinase C. We revealed the first half reaction by the in vitro experiments using recombinant PCaP2 and its mutant forms.

(2) *Arabidopsis thaliana* lines over-expressing PCaP2 showed good germination rate more than 80% even in 80 mM NaCl, although the rate of wild type seeds was less than 50%. Probably PCaP2 works as a suppressor element under salt stress to maintain the integrity of plants. However, over-expression of PCaP2 causes unbalance of the PCaP2. Under the conditions, plants overexpressing PCaP2 might grow without a break.

(3) Vacuolar accumulation of Na^+ depends on the Na^+/H^+ exchanger and vacuolar proton pumps, H^+ -pyrophosphatase (H^+ -PPase) and H^+ -ATPase. *A. thaliana* has three genes for H^+ -PPase; one belongs to the type I and the others to the type II. We clarified that the type II H^+ -PPases are localized in the Golgi membrane and their protein amount account for only less than 0.2% of that of the type I (vacuolar type enzyme). Thus, the contribution of type II enzyme is negligible for understanding salt tolerance in plants.