

塩ストレスによるイオンチャネルの酸化と酸化抑制による耐塩性の向上

村田 芳行¹, 森 泉²

¹岡山大学大学院自然科学研究科, ²岡山大学資源植物科学研究所

概要 塩ストレスは、植物の生長を著しく阻害し、その結果、深刻な農業生産性の低下を引き起こす。その成長阻害の要因の一つとして、塩ストレスが植物体内に酸化ストレスを引き起こす。植物の酸化ストレスに対する戦略として、抗酸化酵素の活性化や抗酸化物質の蓄積が知られている。塩ストレス下の植物中で酸化されるタンパク質の同定は、塩ストレス耐性機構の解明につながり、酸化の標的となるタンパク質の改変や耐性タンパク質を持つ植物の作出・選抜を可能にするにも関わらず、いまだ十分ではない。

本研究では、塩ストレスによって植物に蓄積するアルデヒドの一つである「メチルグリオキザール」に着目し、

① 植物の塩ストレスを含む環境ストレス耐性に関する重要なタンパク質(原形質膜カリウムチャネル等)の活性へのメチルグリオキザールの影響の解析

② ①の活性変化の原因となる修飾されたアミノ酸の同定ならびに同定されたアミノ酸の変異と活性との関係の解析を行なった。

シロイヌナズナを材料として、ホールセルパッチクランプ法を用いて、孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャネルへのメチルグリオキザールの影響を評価した。内向きカリウムチャネル活性がメチルグリオキザールによって濃度依存的に阻害をされた。また、内向き整流性カリウムチャネルの一つである KAT1 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、メチルグリオキザールが及ぼす KAT1 電流への影響を解析した。内向きカリウムチャネル電流がメチルグリオキザールによって阻害された。また、孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャネルが深く関与する光誘導気孔開口がメチルグリオキザールによって濃度依存的に阻害された。

現在、メチルグリオキザールによる修飾アミノ酸の同定を MALDI TOF-MS を用いて行なっている。

1. 研究目的

塩ストレスは、植物の生長を著しく阻害し、その結果、深刻な農業生産性の低下を引き起こす。その成長阻害の要因として、細胞外浸透圧の上昇による給水の困難や、取り込まれたナトリウムによる代謝の阻害、脂質やタンパク質の酸化やマロンジアルデヒドやメチルグリオキザールなどのアルデヒドの蓄積が考えられている。また、プロリンによる塩ストレスの軽減は、脂質やタンパク質の酸化の減少やマロンジアルデヒドやメチルグリオキザールの蓄積の減少を引き起こす(Hoque *et al.*, 2007a; 2007b; 2008)。

メチルグリオキザールは、糖代謝によって主に生成する α -オキソアルデヒドである(Yadav *et al.*, 2008)。塩ストレス

だけでなく、他の環境ストレスによっても植物体内蓄積し、その毒性を発揮する(Kumar and Yadav, 2009)。

植物の酸化ストレスに対する戦略として、カタラーゼ、SOD、ペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素やメチルグリオキザール代謝酵素、アスコルビン酸-グルタチオンサイクルの活性化やアスコルビン酸やグルタチオンなどの抗酸化物質の蓄積が知られている(Hoque *et al.*, 2007a; 2007b; 2008)。

塩ストレスによって酸化が起きたタンパク質の同定は、塩ストレス耐性機構の解明につながる。また、酸化の標的となるタンパク質の改変は、耐性タンパク質を持つ植物の作出・選抜を可能にする。しかし、塩ストレスが引き起こす

酸化・修飾の標的となるタンパク質の同定はされていない。

植物の気孔は、水の蒸散や二酸化炭素の取り込みを調節する重要な器官である。光誘導気孔開口は、水の蒸散を介して根からの養分の吸収や、二酸化炭素の取り込みを介して光合成に深く関与しており、植物の成長にとって極めて重要である。この光誘導気孔開口は、孔辺細胞のプロトンポンプの活性化による原形質膜の過分極が内向きカリウムチャンネルの活性化、つまり、孔辺細胞へのカリウム取り込みを促進することによって起きる。

本研究では、塩ストレスによって植物に蓄積するアルデヒドの一つである「メチルグリオキザール」が酸化・修飾するタンパク質の同定を試みた。また、タンパク質としては、根からの養分吸収やナトリウムの取り込みと深く関与する気孔開口に重要な孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャンネル KAT1 に着目し、

- 1) 植物の塩ストレスを含む環境ストレス耐性に関する重要な孔辺細胞原形質膜カリウムチャンネルの活性へのメチルグリオキザールの影響の解析
 - 2) 孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャンネル KAT1 へのメチルグリオキザールの影響の解析
 - 3) 内向き整流性カリウムチャンネルが深く関与する光誘導気孔開口へのメチルグリオキザールの影響の解析
 - 4) KAT1 の活性変化の原因となる修飾されたアミノ酸の同定
- を行なった。

2. 研究方法

2.1 チャンネル電流測定(シロイヌナズナ孔辺細胞プロトプラスト)

孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャンネル電流の測定には、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 孔辺細胞を材料として用いた。バーミキュライトと園芸用の土を 1 : 1 の比で混合してものを育苗ポット(内径 9 cm、深さ 7.5 cm)にいれ、シロイヌナズナの種を蒔いた。4 日間低温 (4°C) 処理し、その後、人工気象器に移した。人工気象器内で、明期 (80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) 12 時間、暗期 12 時間、23°C の条件で生育させた。また、種を蒔く際にハイポネックス (N : P : K = 6 : 10 : 5, 株式会社ハイポネックスジャパン) を 1,000 倍に希釈したものを与え、それ以降は、週に 2 回

水やりを行なった。

6 から 8 週齢のシロイヌナズナのロゼット葉を市販のブレンダーで破碎し、ナイロンメッシュを用いて表皮をろ集した。その表皮を 10 ml の以下に示す酵素液に懸濁し、12 時間振とうした。その後、ナイロンメッシュでろ過し、残渣を取り除いた後、プロトプラスト懸濁液で洗浄し、得られたプロトプラストをパッチクランプ測定に用いた。

以下のピペット溶液 I とバス溶液 I を用いて、内向きカリウムチャンネル電流を測定した。(Kwak *et al.*, 2001)

酵素液

- 1.0% Cellulase R-10
- 0.5% Macerozyme R-10
- 0.5% BSA
- 0.1% kanamycin monosulfate
- 10 mM ascorbic acid
- 0.1 mM KCl
- 0.1 mM CaCl₂
- 500 mM D-mannitol
- KOH で pH 5.5 に調整

ピペット溶液 I

- 30 mM KCl
- 70 mM K-Glu
- 2 mM MgCl₂
- 3.35 mM CaCl₂
- 6.7 mM EGTA
- 10 mM HEPES
- Tris で pH 7.1 に調整
- D-sorbitol で 500 mosm/kg に調整

バス溶液 I

- 30 mM KCl
- 2 mM MgCl₂
- 40 mM CaCl₂
- 10 mM MES
- Tris で pH 5.5 に調整
- D-sorbitol で 485 mosm/kg に調整

ホールディング電位を -40 mV にし、1 秒間のステップパルスをも 0 mV から -180 mV まで 20 mV ずつ変化させ、電位を固定し、ホールセル電流(カリウムチャンネル電流)を

測定した。解析には、pClamp6を用いた。

2. 2 チャンネル電流測定(アフリカツメガエル卵母細胞)

KAT1 をシロイヌナズナからクローニングし、pXBG-KAT1 cRNA を作成した。50 nl の cRNA を卵母細胞にインジェクションした。インジェクションした卵母細胞を 19°C で 3 日間培養した。KAT1 電流の測定には、Two Electrode Voltage Clamp (TEVC) 法を用いた

KAT1 電流測定には、以下のバス溶液 II を用いた。

バス溶液 II

100 mM KCl
1.8 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
10 mM HEPES
pH 7.5 に調整

3 M KCl で満たされた微小電極を卵母細胞に挿入し、ホールディングポテンシャルを -40 mV にし、3 秒間のステップパルスで 20 mV から -180 mV まで 20 mV ずつ変化させ、各固定電位での KAT1 チャンネル電流を測定した。電極には、Ag/AgCl 電極を用いた。(Sato *et al.*, 2002)

2. 3 気孔口径測定(光誘導気孔開口)

5 ml のアッセイ溶液で満たしたシャーレにロゼット葉を浸漬し、暗所で 2 時間静置し、気孔を十分に閉口させた。その後、メチルグリオキザールを添加し、明所で 2 時間静置した。処理した葉をブレンダーで破碎し、ナイロンメッシュでろ集し、表皮組織を集めた。その表皮組織をスライドガラスに載せ、顕微鏡下で気孔口径を測定した。(Kwak *et al.*, 2001)

アッセイ溶液

5 mM KCl
50 μM CaCl₂
1 mM MgCl₂
10 mM MES
Tris pH 6.15 に調整

測定に偏りが生じないように 1 つの表皮組織から 4 つ以上の気孔口径を測定しないようにした。また、1 枚の葉から約 20 個の気孔口径を測定し平均値を得、1 回の実験とした。異なる 3 枚の葉からの平均値を平均して実験データとした。また、葉の裏側の気孔のみを測定した。

3. 研究結果

3. 1 メチルグリオキザールによる孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャンネル阻害

孔辺細胞プロトプラストを用いて、メチルグリオキザールが及ぼす原形質膜カリウムチャンネル電流への影響を調べた。Fig. 1 に示すように、膜の過分極によって内向きカリウム電流が観察された。以前の報告 (Khokon *et al.*, 2011; Kwak *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2008) と同様の結果であった。メチルグリオキザール処理後、時間に依存して、内向きカリウム電流が有意に減少した (Fig. 1)。処理後 15 分で 50% 内向きカリウム電流が減少した。また、この阻害は、メチルグリオキザールの濃度に依存していた (data not shown)。

3. 2 メチルグリオキザールによる KAT1 チャンネル阻害

孔辺細胞に特異的に発現する内向き整流性カリウムチャンネルの一つである KAT1 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、メチルグリオキザールが及ぼす KAT1 チャンネル電流への影響を調べた。Fig. 1 に示す内向きカリウム電流と同様の内向きカリウムチャンネル電流が KAT1 を発現させた卵母細胞でも観察された (Fig. 2)。この内向きカリウム電流は、メチルグリオキザールによって有意に阻害された (Fig. 2)。パッチクランプ法によって得られた内向き整流性カリウムチャンネルの阻害の結果 (Fig. 1) と一致した。

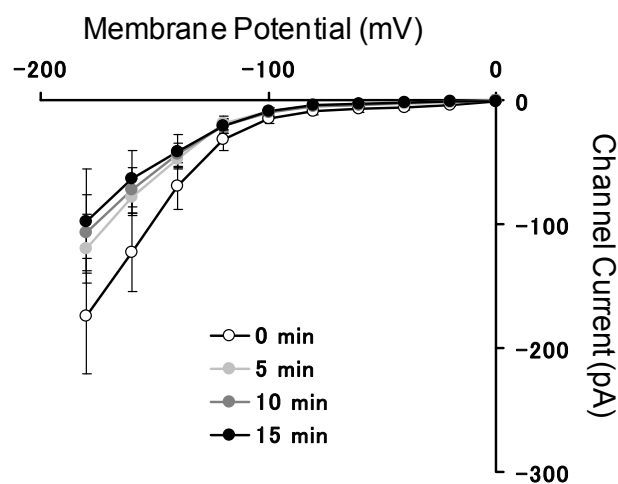


Fig. 1. Inhibition of inward-rectifying potassium channel currents in *Arabidopsis* guard cell plasma membrane by methylglyoxal. Whole-cell currents (pA) are plotted against membrane potentials (mV).

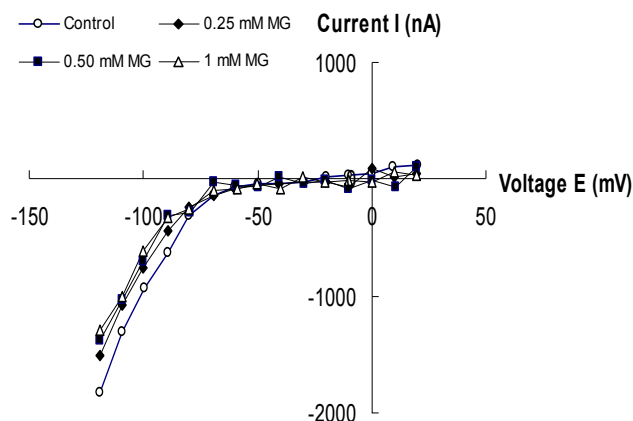


Fig. 2. Inhibition of KAT1 channel currents by methylglyoxal. KAT1 currents (nA) are plotted against membrane potentials (mV).

3.3 メチルグリオキザールによる光誘導気孔開口阻害

孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャネルの活性化が深く関与する光誘導気孔開口に及ぼすメチルグリオキザールの影響について調べた。以前の結果(Kwak *et al.*, 2001)と同様に、光刺激によって、気孔開口が誘導された(**Fig. 3**)。この光誘導気孔開口は、メチルグリオキザールによって濃度依存的に阻害された(**Fig. 3**)。内向き整流性カリウムチャネルの阻害の結果(**Fig. 1**)や KAT1 チャネル電流の阻害の結果(**Fig. 2**)と矛盾がなかった。

4. 考察

メチルグリオキザールは、KAT1 チャネルを阻害し、また、KAT1 が関与する孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャネル電流も阻害した。さらに、メチルグリオキザールは、原形質膜内向き整流性カリウムチャネルの活性化を必要とする光誘導気孔開口を阻害した。塩ストレスによって蓄積が増加するメチルグリオキザールは、カリウムチャネルの阻害を介して、植物の機能を阻害していることが明らかになった。

5. 今後の課題

塩ストレスによって蓄積するメチルグリオキザールは、孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャネルを阻害し、光誘導気孔開口を阻害している。また、メチルグリオキザールによる内向きカリウムチャネル KAT1 の阻害がその一因である可能性が示唆されたが、酸化・修飾されたアミノ

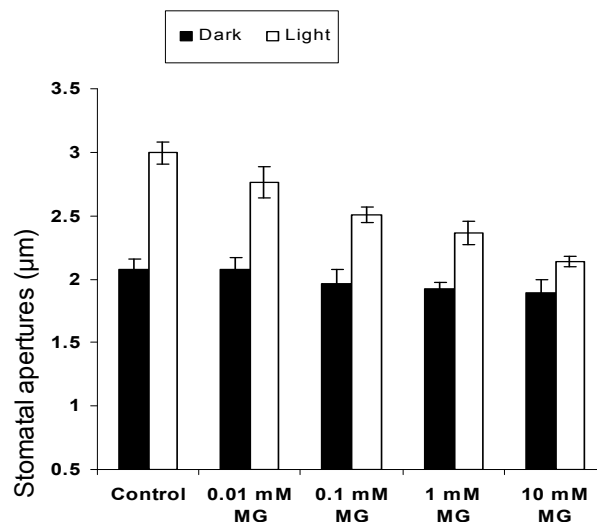


Fig. 3. Inhibition of light-induced stomatal opening by methylglyoxal. Stomatal apertures of leaves incubated for 2 h under dark condition (black bar) and for 2 h under light condition (white bar) were measured.

酸の同定には至っていない。

現在、他のカリウムチャネルならびに他のタンパク質へのメチルグリオキザールの影響を解析し、また、リコンビナントタンパク質を用いて、メチルグリオキザールによる修飾アミノ酸の同定を MALDI TOF-MS を用いて行なっている。

文献

- Hoque, M. A., Okuma, E., Banu, M. N. A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. and Murata, Y. (2007a) Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *J. Plant Physiol.*, **164**, 553-561.
- Hoque, M. A., Banu, M. N. A., Okuma, E., Amako, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. and Murata, Y. (2007b) Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension cultured cells. *J. Plant Physiol.*, **164**, 1457-1468.
- Hoque, M. A., Banu, M. N. A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. and Murata, Y. (2008) Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal

- detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.*, **165**, 813-824.
- Khokon, M. A. R., Okuma, E., Hossain, M. A., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y., Mori, I. C., and Murata, Y. (2011) Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*, **34**, 434-443.
- Kwak, J. M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V. M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A. Hawke, S. D., Tallman, G. and Schroeder, J. I. (2001) Dominant negative guard cell K⁺ channel mutants reduce inward K⁺ currents and light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **127**, 473-485.
- Sato, Y., Sakaguchi, M., Goshima, S., Nakamura, T. and Uozumi, N. (2002) Integration of Shaker-type K⁺ channel, KAT1, into the endoplasmic reticulum membrane: synergistic insertion of voltage-sensing segments, S3-S4, and independent insertion of pore-forming segments, S5-P-S6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 60-65.
- Saito, N., Munemasa, S., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Mori, I. C. and Murata, Y. (2008) Roles of RCN1, regulatory A subunit of protein phosphatase 2A, in methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid. *Plant Cell Physiol.*, **49**, 1396-1401.
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L. and Sopory, S. K. (2008) An overview on the role of methylglyoxal and glyoxalases in plants. *Drug Metabol. Drug Interact.*, **23**, 51-68.
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., Ray, M., Reddy, M. K. and Sopory, S. K. (2005) Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **337**, 61-67.

Oxidation of Ion Channels by Salt Stress and Improvement of Salt Tolerance by Suppressing Their Oxidation

Yoshiyuki Murata¹, Izumi C. Mori²

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

²Research Institute for Biological Sciences, Okayama University

Summary

Salt stress drastically inhibits plant growth, resulting in reduction in agricultural productivity. Plants have to overcome detrimental oxidative damage induced by salt stress to survive under salt stress. Therefore, plants activate antioxidant enzymes and accumulate antioxidant compounds to mitigate oxidative stress under salt stress. Oxidative damage is in part due to protein oxidation/modification.

Identification of oxidized/modified proteins allows us to elucidate salt-tolerance mechanism and to develop and screen salt-tolerant plants. However, oxidized or modified proteins remain to be identified.

In this study, we investigated effects of methylglyoxal, which accumulates in salt-stressed plants, on activities of ion channels and other salt tolerance-related enzymes and tried to identify amino acid residues of these proteins modified by methylglyoxal.

Inward-rectifying potassium channel currents in plasma membrane of *Arabidopsis* guard cell protoplasts were measured using whole-cell patch-clamp technique and inward potassium currents in KAT1-expressing *Xenopus* oocytes were measured using two-electrode voltage clamp technique. Methylglyoxal inhibited the inward-rectifying potassium channel currents in the plasma membrane of guard cell protoplasts and inhibited the inward potassium currents in the KAT1-expressing oocytes in a concentration dependant manner.

Activation of plasma membrane inward potassium currents is favorable to light-induced stomatal opening. Stomatal apertures were observed under a microscope. Methylglyoxal inhibited light-induced stomatal opening in a concentration dependant manner.

We are identifying amino acid residue of the methylglyoxal-treated proteins using MALDI TOF-MS.