

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係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、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の活性化を必要と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。カルシウムチャネルやアニオンチャネルの活性調節に関与していることが示唆された。さらに、メチルグリオキザールは、ストレス応答に関わるアスコルビン酸ペルオキシダーゼやグルタチオン S-トランスフェラーゼの活性も阻害した。

現在、メチルグリオキザールによる修飾されるアミノ酸(アルギニン, リジン, システイン)の同定を行っている。

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。この気孔開閉には、孔辺細胞原形質膜の存在する種々のイオンチャネルの活性化や不活性化が不可欠である。

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にも深く関与する気孔開閉に重要な孔辺細胞原形質膜イオンチャネルとストレス軽減に深く関与する酵素に着目し、塩ストレス耐性植物の作出を目指し、

- 1) 植物の塩ストレスを含む環境ストレス耐性に関するタンパク質へのメチルグリオキザールの影響の解析
 - 2) 植物体へのメチルグリオキザールの影響の解析と 1) の結果との比較解析
 - 3) リコンビナントタンパク質を用いた解析と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 の比で混合したものを育苗用ポット(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)

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。

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

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・メチルグリオキザール誘導気孔閉口)

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、ナイロンメッシュを用いて表皮組織をろ集した。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)

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、明所で 2 時間静置し、メチルグリオキザールを添加し、さらに明所で 2 時間静置した。処理した葉をブレンダーで破碎し、ナイロンメッシュを用いて表皮組織をろ集した。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。(Hoque *et al.*, 2012)

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。

2. 4 孔辺細胞内カルシウム濃度測定

Hossain *et al.* (2011) の方法に従って、蛍光タンパク質 Yellow Cameleon 3.6 を発現させたシロイヌナズナ孔辺細胞を用いて、細胞内カルシウム濃度の変動を調べた。溶液には、気孔口径測定に用いたアッセイ溶液を用いた。

2. 5 酵素活性測定(アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ)

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、Nakano and Asada (1981) の方法に従い、反応液 I に酵素懸濁液を加え、290 nm での吸光度の変化から求めた。

グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性は、Hoque *et al.* (2008) の方法に従い、1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) と 1 mM グルタチオンを加えた 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に酵素懸濁液を加え、340 nm での吸光度の変化から求めた。

反応液

50 mM KH₂PO₄
0.1 mM EDTA
0.1 mM H₂O₂
0.25 mM ascorbic acid
pH 7.0

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 (Biosci. Biotechnol. Biochem. 2012)

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. 1A 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. 1A)。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 チャネル阻害 (Biosci. Biotechnol. Biochem. 2012)

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. 1A 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. 1B)。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. 1B)。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. 1A) と一致した。

3.3 メチルグリオキザールによる光誘導気孔開口阻害 (Biosci. Biotechnol. Biochem. 2012)

孔辺細胞原形質膜内向き整流性カリウムチャン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. 2)。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. 2)。内向き整流性カリウムチャンネルの阻害の結果 (Fig. 1A) や KAT1 チャンネル電流の阻害の結果 (Fig. 1B) と矛盾がなかった。

3.4 メチルグリオキザールによる気孔閉口誘導 (J. Plant Physiol. 2012)

メチルグリオキザールは、濃度依存的に気孔閉口を誘導した (Fig. 3A)。その気孔閉口は、パーオキシダーゼ阻

害剤によって阻害された (Fig. 3B)。メチルグリオキザールによって、細胞内活性酸素種 (ROS) の蓄積が観察された (Fig. 4A)、また、カルシウムオシレーションが観察された (Fig. 4B)。これらのことから、メチルグリオキザールによるアニオンチャンネルやカルシウムチャンネル活性の調節が示唆された。

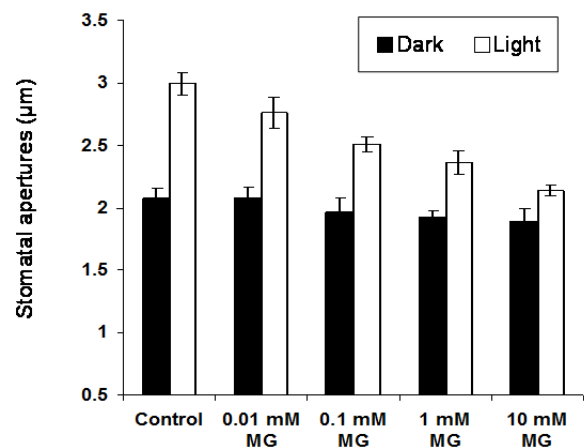


Fig. 2. Inhibition of light-induced stomatal opening by methylglyoxal. Stomatal apertures of leaves incubated for 2 h under dark condition (black bar) and for 2 h under light condition (white bar) were measured.

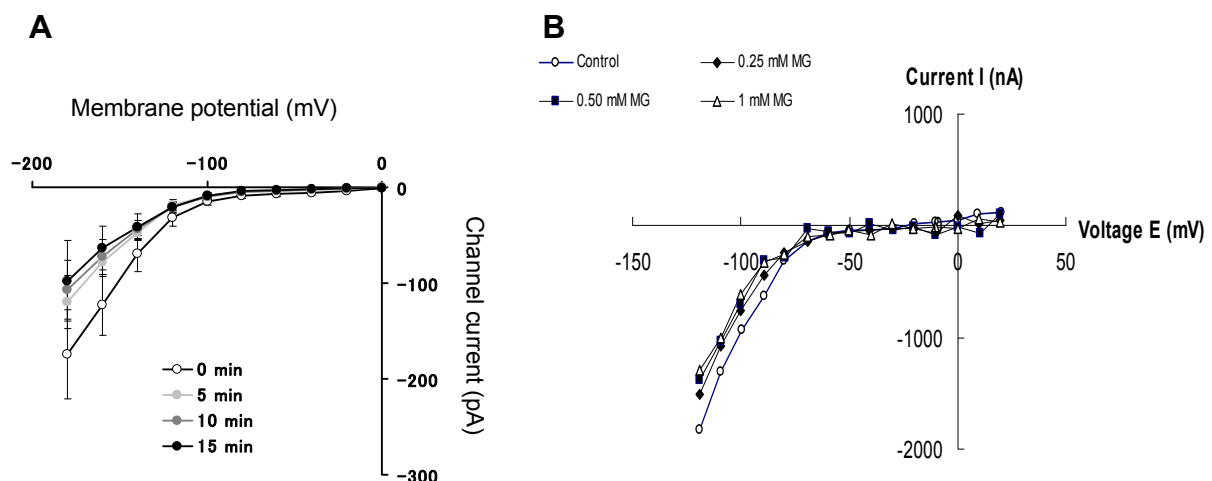


Fig. 1. Inhibition of (A) plasma membrane inward-rectifying potassium channel currents in *Arabidopsis* guard cell and (B) KAT1 channel currents by methylglyoxal. Whole-cell currents (pA) and KAT1 currents (nA) are plotted against membrane potentials (mV).

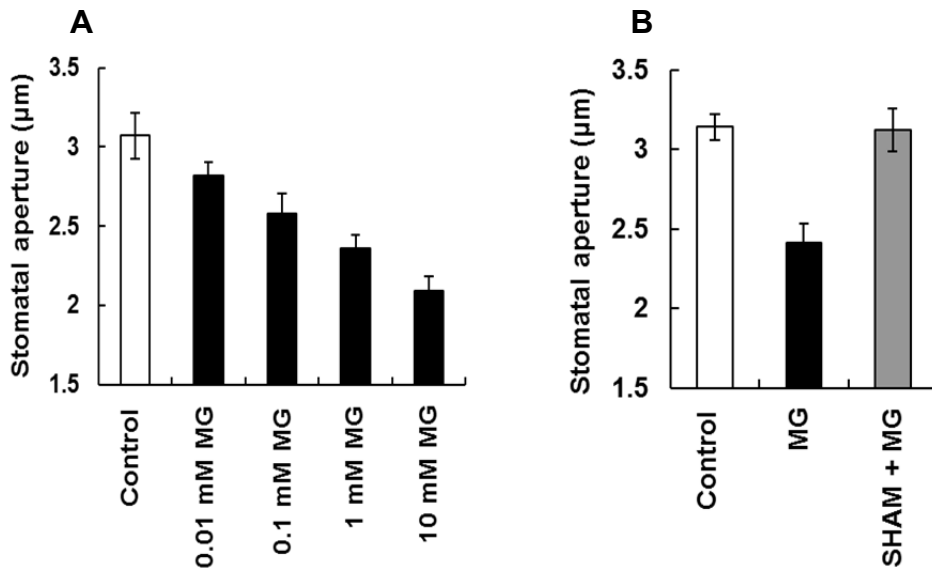


Fig. 3. Stomatal movement in Arabidopsis in response to methylglyoxal (MG). (A) MG-induced stomatal closure. (B) Effect of 1 mM salicylhydrozamic acid (SHAM) (gray bar) on 1 mM MG-induced stomatal closure. Data were obtained from at least 60 stomata. Error bars represent SEM.

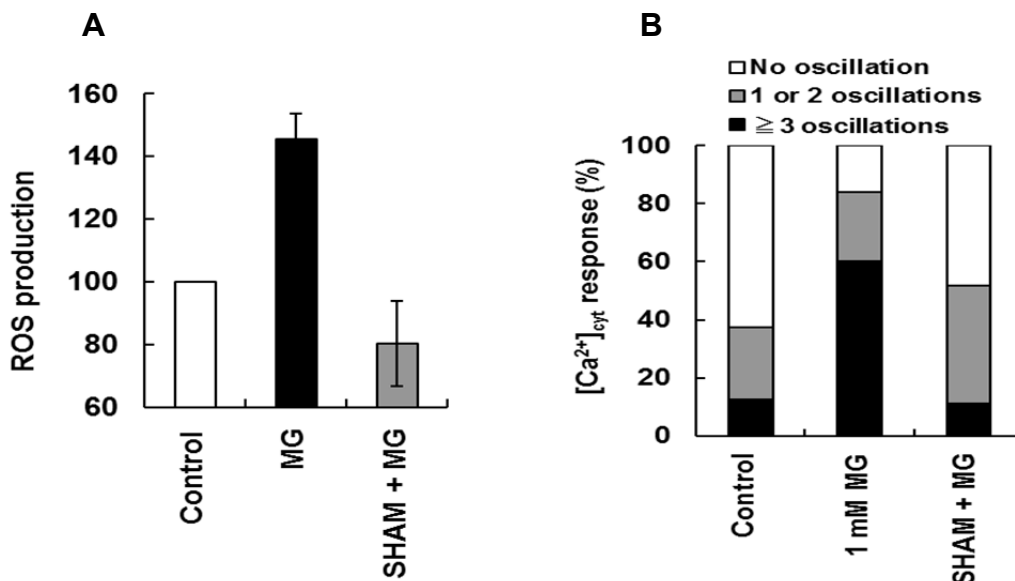


Fig. 4. (A) Reactive oxygen species (ROS) accumulation in Arabidopsis guard cells in response to methylglyoxal (MG). The vertical bars represent the percentage of fluorescence levels when fluorescent intensities of MG-treated cells are normalized to control value taken as 100% (white bars). Data were obtained from at least 60 guard cells. Error bars represent SEM. (B) Cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) in guard cells in response to MG. Percentage bar chart showing the number of MG-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillations in the guard cells untreated and treated with SHAM.

3. 5 ストレス軽減に関わる酵素へのメチルグリオキザールの影響 (Biosci. Biotechnol. Biochem. 2010; J. Biochem. Mol. Toxicol. 2012)
 ストレスの軽減に関与するアスコルビン酸ペルオキシダ

ーゼとグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (Hoque *et al.*, 2007a; 2007b; 2008) のリコンビナントタンパク質を作成した。メチルグリオキザールは、それぞれの酵素活性を濃度依存的に阻害した (data not shown)。

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ン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ン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、カリウムチャンネルやストレス軽減に重要な酵素の阻害を介して、植物の機能を阻害していることが明らかになった。これらタンパク質の改変によりストレス耐性を向上できる可能性が示された。

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ンネル KAT1 を阻害し、細胞内へのカリウムの流入を阻害した。これが一つの要因として光誘導気孔開口が阻害されてた可能性が示された。他のカリウムチャンネル KAT2 などに及ぼすメチルグリオキザールの影響は明らかにされておらず、また、酸化・修飾されたアミノ酸の同定にも至っていない。

他のカリウムチャン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、これらの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(アルギニン、リジン、システイン)の同定とその表現型の解析を行なっている。

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.
- Hoque, T. S., Uraji, M., Ye, W., Hossain, M. A., Nakamura, Y., and Murata, Y. (2012) Methylglyoxal-induced stomatal closure and peroxidase-mediated ROS production in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.*, **169**, 979-986.
- Hossain, M. A., Munemasa, S., Nakamura, Y., Mori, I. C., and Murata, Y. (2011) Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **156**, 430-438.
- 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.
- Kumar, V. and Yadav, S. K. (2009) Proline and betaine provide protection to antioxidant and detoxification systems during cold stress in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Acta Physiol. Plant*, **31**, 261-269.
- 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.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **22**, 867-880.
- 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.

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

Yoshiyuki Murata ¹, Izumi C. Mori ²

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

²Institute of Plant Science and Resources, 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.

Methylglyoxal inhibited the inward-rectifying potassium channel currents in the plasma membrane of guard cell protoplasts, the inward potassium currents in the KAT1-expressing oocytes in a concentration dependent manner, and inhibited light-induced stomatal opening in a concentration dependent manner (Hoque *et al.*, 2012a).

Methylglyoxal induced stomatal closure accompanied by extracellular ROS production mediated by SHAM-sensitive peroxidases, intracellular ROS accumulation, and cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) oscillations (Hoque *et al.*, 2012b). Moreover, methylglyoxal also inhibited stress-related enzymes, cytosolic ascorbate peroxidase (Hoque *et al.*, 2012) and glutathione *S*-transferase (Hoque *et al.*, 2010).

We are identifying amino acid residues (arginine, lysine, and cysteine) of the methylglyoxal-treated proteins.