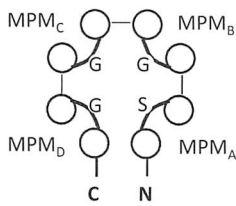


講座



トランスポーター研究が土壌・肥料・植物栄養学にもたらすインパクト

5. 植物のNa循環系と耐塩性

魚住信之

東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻

キーワード AtHKT1, Naトランスポーター, 高浸透圧適応, 塩ストレス, Kチャンネル

1. 植物と動物は異なるイオン環境を有する

植物細胞と動物細胞ではNa感受性に大きな違いがある。一般に、動物は細胞間腔に100mM程度のNaを維持している。ヒトの先祖が海から陸地にあがって生活を始めた時に、海的环境つまりNaをそのまま持ってきたと言われる根拠が、体液内の比較的高濃度となるNa環境が物語っている。実際、Naを食餌として与えられなければ、我々の生存は維持できない。一方、植物の生存に、栄養元素として（一部の例外を除いて）Naを必要としない。むしろ、このNaは高濃度では塩害をもたらすイオンとして問題となる。血を舐めてしょっぱいと感じることはあっても、野菜を食べて塩味を感じることは無い。このように、植物と動物はNaに関するイオン環境は大きく異なる。

このNaの環境の違いは、生体膜に存在するイオン輸送体の差異となって表れている（Uozumi and Schroeder, 2010）。一般に動物細胞は、Na濃度勾配等によって形成された電気化学的ポテンシャルを利用して、細胞の外から内に養分の吸収を行っている。また、教科書の神経伝達の解説では必ず引用されるNaチャンネルも、細胞外から内に取り込まれる方向で機能している。この様に、Naを積極的に取り込むトランスポーターやチャンネルという膜輸送体が動物には存在している。一方、植物においては、動物と異なりNa駆動力の代わりに、H駆動力を用いて植物は養分を吸収している。動物細胞のような強力なNa排出系のない植物においては、塩害の原因となるNaの細胞への流入は植物の成長を脅かす可能性が心配される。実際、植物の染色体には動物にみられるようなNaチャンネル遺伝子は存在しない。

植物の成長にはNaは不要かつNaチャンネル遺伝子も存在しないという事実がある。一方、Naの輸送活性に関す

る報告もあり、植物にもNaを透過する未知の膜輸送体の存在は強く示唆されていた。例えば、大豆の道管周辺のNa/H antiporterの輸送活性（Lacan and Durand, 1996）、NORCと称されるオオムギの根の細胞の原形質膜に存在するイオン選択性の低いNaチャンネル活性（Wegner and De Boer, 1997）、同様の小麦やシロイヌナズナのNCSと称されるNaチャンネル機能などがあげられる（Tyerman *et al.*, 1997；Buschmann *et al.*, 2000；Davenport and Tester, 2000；Demidchik and Tester, 2002）。しかし、これらのNa膜輸送体の実体や存在意義は明らかではなかった。

この様な状況の中で、微生物や動物にも存在するNaの排出系が見いだされた。さらに新たに細胞内にNa取り込む輸送体も同定されて、Na輸送と循環系の分子レベルにおける実体が明らかとなってきた。先駆的なシロイヌナズナにおけるNa排出輸送体と新規のNa取り込み輸送体は以下に記述したような同定と検討が行われている。

2. Na 排出輸送体

植物の高濃度のNaへの環境への適応には、細胞質に侵入したNaの細胞外への排出と、液胞内への隔離の2つが考えられる。Zhuらは、根の伸長がNaで阻害される表現型（salt oversensitive phenotype）を示す原因遺伝子であるAtSOS1を同定した（Wu *et al.*, 1996；Shi *et al.*, 2000）。AtSOS1はNaを細胞質から外へ排出するNa/H antiporterとして機能し、根や維管束で発現している。同様の表現型を示したAtSOS2遺伝子はCIPK24キナーゼをコードしており、AtSOS3遺伝子はCa sensor/protein kinase complex CBL4つまりCaセンサーキナーゼ複合体であることが分かっている（Wu *et al.*, 1996；Shi *et al.*, 2002；Zhu, 2002）。この2種類のサブユニットはAtSOS1のイオン輸送活性に必要であり、SOSは生体膜上で多量体を形成して機能する。地上部では、AtSOS3に代わりSOS3-like Ca binding protein 8 (SCaBP8)が機能して、SOS輸送体を活性化している（Lin *et al.*, 2009）。

3. Na を液胞に隔離する輸送体

液胞膜でNaとHの対向輸送を行う機能を有するNa/H アンチポーターであるAtNHX1の遺伝子をシロイヌナズ

ナで過剰発現させると、200 mM の NaCl 添加培地でも成長することが報告されている (Apse *et al.*, 1999). この耐塩性の付与は細胞質の Na を液胞へ取り除くことによって細胞毒性を回避させると説明されている. AtNHX1 は K/H 交換輸送活性もあり、また calmodulin が結合して、Ca と pH によって調節を受けていることが報告されている (Yamaguchi *et al.*, 2005).

4. Na 取込み輸送体

一部の植物を除いて、Na は植物において塩害等を誘起する“毒”とみなされており、このため Na を細胞内へ輸送する機能をもつ輸送体が存在しても、生理学的な意味は低いものと考えられてきた. しかし、AtHKT1;1 (AtHKT1) は、Na を細胞内に輸送するトランスポーターとして同定された (Uozumi *et al.*, 2000). (現在 HKT トランスポーターとその遺伝子は、AtHKT1 が AtHKT1;1 のように整理番号で呼ばれるようになっている. (Platten *et al.*, 2006)) 続いて植物にとっては塩ストレスを誘発する懸念がもたれる AtHKT1 の *in vivo* における役割が調べられた. *athkt1* 遺伝子破壊株においては、高濃度 Na 培地における地上部の生育阻害が示された. これまでの概念からすれば Na 取り込み活性をもつ輸送体を不活化すれば植物はより耐塩性をもつことが予想されたため、予測とは正反対の現象であった. AtHKT1 の発現部位は、道管に隣接する細胞である木部柔組織の原形質膜であることが分かった (Sunarpi *et al.*, 2005). また、*athkt1* 遺伝子破壊株と野生株を Na 高濃度培地に生育させて比較したところ、*athkt1* 遺伝子破壊株の道管内は高濃度の Na を蓄積することが分かった (Sunarpi *et al.*, 2005) (図 1). 以上の 2 つの知見から、AtHKT1 は下記のような機構で耐塩性を示すと考えられた. 高濃度の Na 培地では、Na は根で吸収されて道管に移行する. 道管内 (木部) に Na が蓄積することにより道管内液が高浸透圧状態となり、道管に隣接する地上部の細胞から水を奪うこととなる. しかし、これを防ぐために、AtHKT1 は Na を道管から細胞内へ組み入れて、木部柔組織の細胞質の浸透圧を高める. これにより、道管内と木部柔組織内の浸透圧は取り込まれた Na の一部は液胞に移動し液胞の浸透圧が高くなり液胞の体積が増大する (細胞質の Na はある程度の濃度に抑えることができる). また、その他の Na は原形質連絡を経て他の細胞へ移動する (図 2).

上記は、AtHKT1 の植物内における役割を調べるために、逆遺伝学的手段による解明である. これとは逆のアプローチとなる順遺伝学でも、AtHKT1 遺伝子が耐塩性に関与することが明らかとなっている. Na を多量に蓄積する原因遺伝子 (*sas2* 変異) の原因遺伝子は AtHKT1 遺伝子であることが同定されている (Berthomieu *et al.*, 2003). さらに、イネにおいても QTL 解析により Na 耐性に関与する遺伝子として OsHKT1;5 が単離された (Ren *et al.*, 2005). この OsHKT1;5 は AtHKT1;1 と同

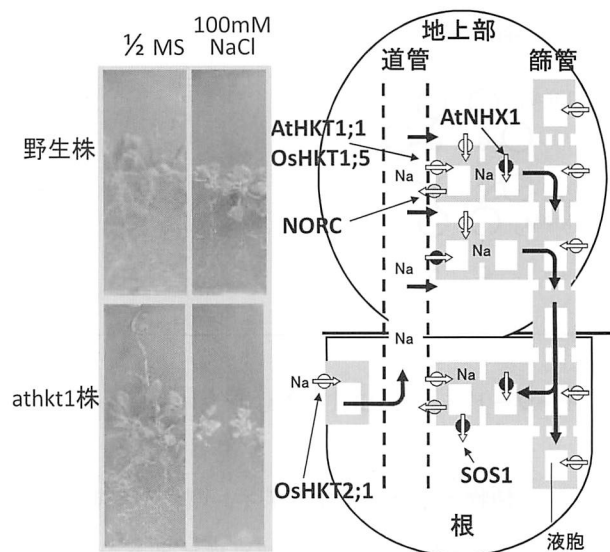


図 1 AtHKT1 の耐塩性

(左) 100 mM NaCl を添加した場合、野生株と比較して *athkt1* 変異株は生長阻害が生じる. (右) AtHKT1 (AtHKT1;1) や OsHKT1;5 は、道管に隣接する細胞の原形質膜で、道管に蓄積した高濃度の Na を細胞内に取り入れて、道管内の浸透圧と細胞内の浸透圧格差を小さくするように働くことが予想される. 液胞内に Na を輸送する AtNHX1、遺伝子の同定はなされていない陽イオン透過性チャネル NORC、根において発現する OsHKT2;1 を図に示した.

様に木部柔組織で発現しており、両輸送体はそれぞれ同じ Na 取り込みによる耐塩性の強化という役割を担っている. また、イネの OsHKT2;1 は根で発現しており、K が枯渇した場合は Na を取り込むことが明らかとなった (Horie *et al.*, 2007). これらの結果は、植物が Na ストレスを受けた時、K が枯渇した時、AtHKT1、OsHKT2;1 や OsHKT1;5 が緊急避難的に道管に蓄積した Na や外界の Na を細胞内へ輸送して浸透圧バランスを保つことを示唆している (図 2). このような知見に基づき、AtHKT1 を根の維管束で強制発現させることにより、植物の地上部の Na 阻害を緩和する応用実験報告もなされている (Moller *et al.*, 2009).

5. Na 循環系

Na は植物に取り込まれる通路として HKT 系トランスポーターが存在することが明確になり、原形質膜における Na 排出系と液胞膜における Na 隔離系の Na/H アンチポーターも同定されたことから、Na の植物内循環の実体が明らかとなってきた. 細胞に取り込まれた Na は、液胞内に液胞膜型 Na/H アンチポーター (AtNHX1) によって輸送隔離され、細胞外にも SOS1 等の原形質膜型 Na/H アンチポーターで排出される. アポプラストやシンプラストを経由して、維管束を利用して、Na の循環系の道筋が明らかとなってきた. この Na の動きは、K の動態とも互いに影響しあって、植物内イオン恒常性、生体膜の電気化学的ポテンシャルの維持、物質やエネルギー輸送の調節役を担っている (図 2).

6. HKT と K チャネルの構造と機能の相違点

上述のように、HKT は Na 輸送体として機能する。しかし、大腸菌、枯草菌、ラン藻、酵母、植物の一部の HKT は K 輸送体として機能する。(この矛盾のような現象の理由は後述) AtHKT1 は、Ktr/Trk/HKT 系トランスポーター family に属するタンパク質の仲間であり、もともと K 取り込み輸送体として機能する輸送体として分類されている。植物における最初の報告は 1994 年のコムギ遺伝子の単離であり、酵母 Trk 変異を相補する high affinity K transporter 遺伝子という名称がつけられたことに始まる。その後、K だけではなく、Na も同時に透過することが分かり、HKT 体は K に加えて Na も輸送する場合があるトランスポーターであることが分かった (Schachtman and Schroeder, 1994; Rubio *et al.*, 1995; Uozumi *et al.*, 2000)。

では、なぜ、AtHKT1 は Na 選択性の輸送体であるのか。この疑問 (矛盾) を解くために、AtHKT1 の膜貫通構造とイオン選択決定アミノ酸の同定が行われた。イオン選択性を探る上で、輸送体の立体構造の情報が重要である。Ktr/Trk/HKT トランスポーターの構造は、K チャネルの基本構造の 2 回膜貫通構造 (Membrane-Pore-Membrane) が、4 回連続した合計 8 回の膜貫通領域である (Kato *et al.*, 2001)。さらに、K チャネルのイオン選択配列 Gly-Thy-Gly の Gly が Ktr/Trk/HKT にも保存されている。この膜貫通構造とイオン選択性を決定するアミノ

酸の共通性は、イオンチャネルとイオントランスポーターの差異よりも進化的類似性を強調する事実として示されている。

Ktr/Trk/HKT には、4 つの保存された重要な Gly が存在していると上述したが、AtHKT1 などは、第一番目の Gly が Ser に置換されている (図 3)。K 透過性のある (TaHKT1 など) はすべて 4 つが Gly である。Gly か Ser の相違が、K 透過性の可否を決定していることが明らかとなった (Mäser *et al.*, 2002)。

この HKT トランスポーターと K チャネルは、膜構造とイオン選択を行うアミノ酸において、互いの類似性が示された。K が K チャネルのイオン選択孔を透過するとき、水和水が K から離れる必要がある。この水和水の乖離エネルギーを最小限にするように規則正しい美しい透過構造を形成している (Doyle *et al.*, 1998)。AtHKT1 の一か所の Gly から Ser への置換は、この透過機構の正しさを示す現象となっている (図 2)。

7. K 輸送体と耐塩性

K は植物の三大栄養素の一つであり、細胞の増殖や伸長の際、植物体内に大量に吸収される。K の吸収には、根の表皮細胞や維管束の周辺細胞で発現している K チャネルや K トランスポーターが関与している。気孔の開閉時においても孔辺細胞に発現した K チャネルによる K 輸送が起こる。細胞レベルでは、細胞内小器官に発現している K

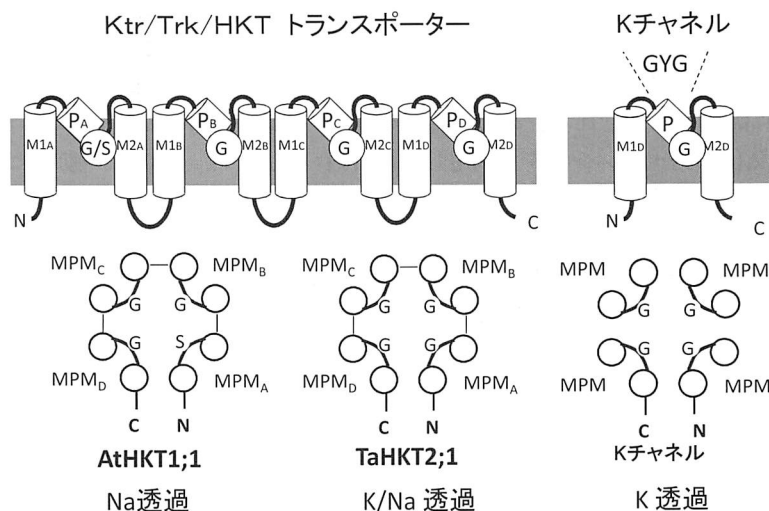


図2 Ktr/Trk/HKT トランスポーターと K チャネルの進化的構造相関

K⁺チャネルは、「膜貫通部位-イオン透過孔-膜貫通部位 (membrane-pore-membrane; MPM)」構造を基本とする。これは、微生物から動物、植物まで生物の種類を超えて保存されている。膜電位を感知して作動する (Shaker ファミリー) の K チャネルは、MPM 構造の前に、膜電位センサー (S1~S4) を有する 6 回の膜貫通部位 (S1~S6) となっている。Ktr/Trk/HKT トランスポーター (AtHKT1;1 や TaHKT2;1) は MPM が分子内で 4 回繰り返された、連続する 8 回の膜貫通部位に取り囲まれるようにイオン透過孔を形成する。シロイヌナズナの AtHKT1;1 は高い Na 透過性を有する。小麦の TaHKT2;1 は、Na と K の両イオンの透過性をもつ。K チャネルは、K 選択フィルターとして、GYG (GFG) 配列をもつ。HKT 輸送体にも、Gly は一つ保存されており、4 つの Gly がそろった場合は、K 輸送活性を有することとなる。

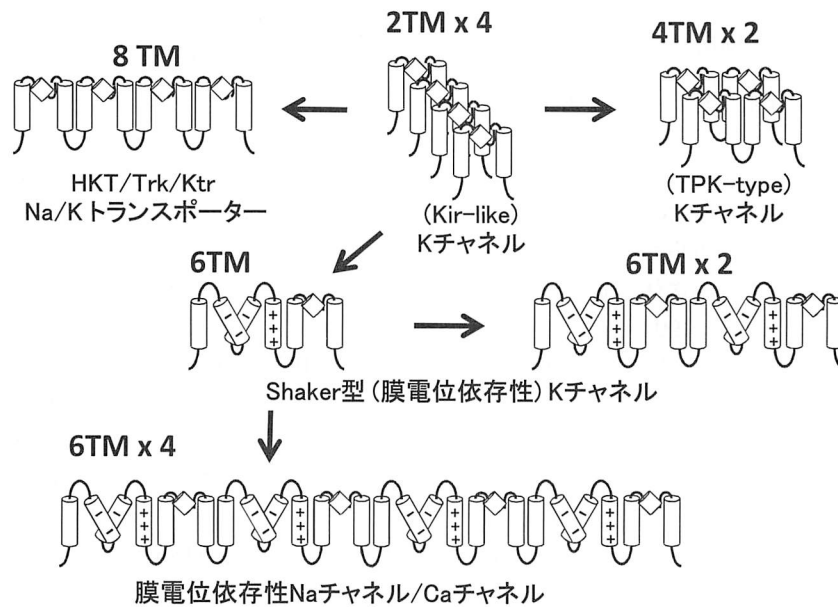


図3 イオン選択性を決める Ktr/Trk/HKT トランスポーターの アミノ酸
K チャネルや Ktr/Trk/HKT トランスポーターのイオン選択孔には4つの Gly 残基
が配置している。植物 HKT 系では、第1番目の Gly が Ser に置換されている分子
(AtHKT1;1, OsHKT2;1 など) があり、この場合、K の透過性は小さくなる。

輸送系が、原形質膜の K 輸送系とともに細胞質の恒常性を維持し小器官へのシグナル伝達に関わっている。植物や微生物の耐塩性には Na/K 比が関与していると考えられている。植物の塩害を考えると、K 濃度に関しても考慮することは重要なこととなる。面白いことに Na とは違い、K に関しては植物と動物では共通性が高い。K は全ての生物の細胞内に存在する主要な陽イオンであり、細胞内では 100 mM 程度に維持されている。K の透過性をもつ生体膜を隔て細胞内に K が高濃度に保たれるために生体膜電位が形成され、この電気化学的ポテンシャルを利用して様々な物質の輸送やエネルギー変換が行われている。このため、K の濃度勾配と膜に存在する K 輸送体による透過性があるがゆえに、外界の高い K 濃度は、細胞に大きなダメージを与えることがある。これは、K 麻酔とも呼ばれることもあり、膜の分極をなくすることから、細胞自体が機能不全に陥る。

これまでに様々な植物から K チャネルや K トランスポーター遺伝子が単離され、さらにシロイヌナズナのゲノム上には様々な K 輸送系遺伝子が存在していることが明らかとなり構造と機能が解明された (図3)。K チャネルと Ktr/Trk/HKT 系トランスポーターには、構造上高い共通性が見いだせることから、辿ってきた進化過程が両輸送体とも同一であることがうかがえる。この分子構造からも、Na と K のイオンバランスとイオン環境には深い関係が保たれている。

8. おわりに

HKT 遺伝子が植物では初めて小麦から単離された時は (TaHKT2;1), K 輸送体として報告された (Schachtman

and Schroeder, 1994)。単なるそのホモログ遺伝子産物である AtHKT1;1 も同じ K 輸送体と推定していたため、Na 透過性を見いだすまでに長い時間と焦燥感を経験することとなった (Uozumi *et al.*, 2000)。このように遺伝子から推定される機能が、現実とは異なることは自然界にはまだまだ存在するのかもしれない。Na を必要養分元素としない植物に Na を吸収する輸送経路の強い存在意義は見当たらず、Na 取り込み輸送体の必要性は考えられていなかった。実際、動物様の Na チャネルは植物の遺伝子配列上には存在しない。しかし、動物にはない Ktr/Trk/HKT トランスポーターが植物には存在して、それが Na の取り込みを行っていることが明らかとなり、本トランスポーターが浸透圧調整・耐塩性に関与していることが示された。Na/H アンチポーターの解明と並行して、植物の Na 輸送と耐塩性の分子機構の解明がすすんでいる (Uozumi and Schroeder, 2010)。既述のように、K 輸送と Na との関係も膜輸送という観点から語ることが可能となりつつあり、今後はイオン環境と植物の耐ストレス研究は分子レベルでますます明瞭な道筋で発展していくものと考えられる。

文 献

- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A., and Blumwald, E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science*, **285**, 1256–1258.
- Berthomieu, P., Conejero, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essah, P. A., Tester, M., Very, A. A., Sentenac, H., and Casse, F. 2003. Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.*, **22**, 2004–2014.

- Buschmann, P. H., Vaidyanathan, R., Gassmann, W., and Schroeder, J. I. 2000. Enhancement of Na⁺ uptake currents, time-dependent inward-rectifying K⁺ channel currents, and K⁺ channel transcripts by K⁺ starvation in wheat root cells. *Plant Physiol.*, **122**, 1387–1397.
- Demidchik, V., and Tester, M. 2002. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiol.*, **128**, 379–387.
- Doyle, D. A., Morais, Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel, molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69–77.
- Horie, T., Costa, A., Kim, T. H., Han, M. J., Horie, R., Leung, H. Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., and Schroeder, J. I. 2007. Rice OsHKT2; 1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *EMBO J.*, **26**, 3003–3014.
- Kato, Y., Sakaguchi, M., Mori, Y., Saito, K., Nakamura, T., Bakker, E. P., Sato, Y., Goshima, S., and Uozumi, N. 2001. Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the *Arabidopsis thaliana* Na⁺/K⁺ translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K⁺ transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6488–6493.
- Lacan, D., and Durand, M. 1996. Na⁺–K⁺ exchange at the xylem/symplast boundary (Its significance in the salt sensitivity of soybean). *Plant Physiol.*, **110**, 705–711.
- Lin, H., Yang, Y., Quan, R., Mendoza, I., Wu, Y., Du, W., Zhao, S., Schumaker, K. S., Pardo, J. M., and Guo, Y. 2009. Phosphorylation of SOS3-like calcium binding protein 8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, **21**, 1607–1619.
- Mäser, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman, B., Yamada, K., Yoshida, K., Bakker, E. P., Shinmyo, A., Oiki, S., Schroeder, J. I., and Uozumi, N. 2002a. Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6428–6433.
- Moller, I. S., Gilliam, M., Jha, D., Mayo, G. M., Roy, S. J., Coates, J. C., Haseloff, J., and Tester, M. 2009. Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in Arabidopsis. *Plant Cell*, **21**, 2163–2178.
- Platten, J. D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R. J., Fairbairn, D. J., Horie, T., Leigh, R. A., Lin, H. X., Luan, S., Maser, P., Pantoja, O., Rodriguez-Navarro, A., Schachtman, D. P., Schroeder, J. I., Sentenac, H., Uozumi, N., Very, A. A., Zhu, J. K., Dennis, E. S., and Tester, M. 2006. Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci.*, **11**, 372–374.
- Ren, Z. H., Gao, J. P., Li, L. G., Cai, X. L., Huang, W., Chao, D. Y., Zhu, M. Z., Wang, Z. Y., Luan, S., and Lin, H. X. 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet.*, **37**, 1141–1146.
- 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.
- 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.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., and Zhu, J. K. 2000. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6896–6901.
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M., and Zhu, J. K. 2002. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell*, **14**, 465–477.
- Sunarp, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W. Y., Leung, H. Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J. I., and Uozumi, N. 2005. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.*, **44**, 928–938.
- Tyerman, S. D., Skerrett, M., Garill, A., Findlay, G. P., and Leigh, R. A. 1997. Pathways for the permeation of NaI and Cl2 into protoplasts derived from the cortex of wheat roots. *J. Exp. Bot.*, **48**, 459–480.
- Uozumi, N., Kim, E. J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E. P., Nakamura, T., and Schroeder, J. I. 2000. The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.*, **122**, 1249–1259.
- Uozumi, N., and Schroeder, J. I. 2010. Ion Channels and Plant Stress, Past, Present, and Future. In Vadim Demidchik and Frans Maathuis (ed.), *Ion Channels and Plant Stress Responses*. Springer Berlin Heidelberg, 1–22.
- Wegner, L. H., and De, Boer, A. H. 1997. Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K⁺ homeostasis and long-distance signaling. *Plant Physiol.*, **115**, 1707–1719.
- Wu, S. J., Ding, L., and Zhu, J. K. 1996. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell*, **8**, 617–627.
- Yamaguchi, T., Aharon, G. S., Sottosanto, J. B., and Blumwald, E. 2005. Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺- and pH-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16107–16112.
- Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 247–273.