

令和元年6月12日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07476

研究課題名(和文)分子生物学的解析によるスギのカリウムイオン膜輸送機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of potassium membrane transport in sugi using molecular biological analysis

研究代表者

細尾 佳宏 (Hosoo, Yoshihiro)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：80377184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：スギのカリウム(K)イオン膜輸送に関わるチャンネル・トランスポーター遺伝子を対象として解析を行った。大腸菌のKイオン取り込み欠損株を用いた相補性試験の結果、解析したすべてのチャンネルとトランスポーターがKイオン取り込み活性を持つことが明らかになった。さらに、Kイオン取り込みはセシウムイオン、カルシウムイオンなどの陽イオンに影響を受けることが示唆された。また、発現解析の結果、解析したすべての遺伝子がスギ樹体内の複数部位で発現していることが分かった。雄花では、1個のトランスポーター遺伝子は分化が進むにつれて発現量が増加したのに対して、その他の遺伝子は成熟雄花よりも分化中雄花で発現量が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数個のスギのKイオン膜輸送体遺伝子について、Kイオン輸送機能や樹体内での発現パターンが明らかになり、これまで詳細な情報が極めて少なかった針葉樹のKイオン膜輸送機構について新規の知見が多く得られた。スギのKイオン膜輸送体遺伝子の特性に関するさらに詳細な研究、Kイオン膜輸送体遺伝子の発現制御によるスギ雄花(花粉)形成抑制、スギの分子育種など、今後の学問的・実用的研究に幅広い波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Characterization of channel and transporter genes involved in membrane transport of potassium (K) ion in sugi (*Cryptomeria japonica*) was conducted. Complementation assays using an *Escherichia coli* mutant deficient in K-ion uptake function demonstrated that all channels and transporters examined in this study have a function in K-ion uptake. Further assays indicated that K-ion uptake mediated by these channels and transporters is influenced by other cations, such as cesium and calcium ions. Expression analysis showed that all genes analyzed in this study were expressed in multiple parts of sugi trees. In male strobili, the expression of one transporter gene increased as the developmental stage proceeded. Conversely, the other genes were expressed higher in developing male strobili than in mature male strobili.

研究分野：森林科学

キーワード：スギ カリウム チャンネル トランスポーター 膜輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

樹木を含む植物において、カリウムイオン (K^+) は細胞内に最も多く存在する陽イオンであり、細胞の成長・増殖、気孔の開閉、花の形成、耐塩性、木部 (木材) 形成など、成長・生理に関する様々な過程で重要な役割を果たしている (Wind et al. Plant Biol 2004; Wang et al. Int J Mol Sci 2013)。これらの過程における K^+ の働きは、細胞の生体膜 (細胞膜、液胞膜など) を横切る K^+ の選択的輸送 (膜輸送) と密接に連動している。そして、この K^+ 膜輸送は膜中に存在する膜輸送体 (チャネル、トランスポーターと呼ばれる膜タンパク質) が担っている (図 1)。従って、 K^+ 膜輸送の機構を分子レベルで解明することは、樹木の成長・生理の仕組みを詳細に理解する上で不可欠である。

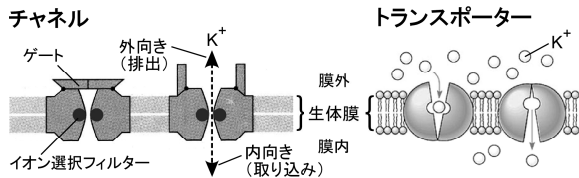


図1. チャネルとトランスポーターの模式図
チャネル: ゲートが開閉することにより、特定のイオンを通過させる
トランスポーター: 分子内の結合部位を介して特定のイオンを通過させる

植物の K^+ 膜輸送に関する研究は、国内外を問わずモデル植物 (シロイヌナズナ、イネ) を中心に草本植物で盛んに行われてきた。 K^+ 膜輸送体をコードする遺伝子が数多く単離され、それらの機能的詳細や生理過程への関わりが明らかにされてきた (Very et al. Annu Rev Plant Biol 2003; Ashley et al. J Exp Bot 2006; Szczerba et al. J Plant Physiol 2009)。一方、樹木の K^+ 膜輸送に関する知見は草本植物と比べて極端に少なく、針葉樹ではほぼ皆無であった。

このような状況の中、代表者らはスギから K^+ トランスポーター遺伝子 (*CjKUP1*) を単離し、その解析を行ってきた。そして、*CjKUP1* は生殖器官、特に花粉形成中の雄花で強く発現し、この遺伝子がコードするトランスポーターは K^+ 取り込み機能を持つことを明らかにした (Hosoo et al. Trees 2014)。スギは日本の最も主要な林業樹種である一方で、大量に花粉を飛散させて花粉症を引き起こし、近年深刻な問題となっている。スギの K^+ 膜輸送についてさらに研究を進めその機構を解明することは、成長や雄花・花粉形成の機構について新規の知見を得ることにつながるものであり、この樹種の育種や花粉症対策の観点からも重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、針葉樹における K^+ 膜輸送の機構を分子レベルで解明し、それに基づいて成長・生理に関する様々な過程への K^+ 膜輸送の関連性について明らかにすることである。そのため、代表者らが *CjKUP1* に続いてスギから単離した K^+ チャネル遺伝子・ K^+ トランスポーター遺伝子を対象として、これらの様々な特性を明らかにすることを目指して研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、スギの K^+ チャネル遺伝子 2 個 (*CjTPK1*、*CKT1*) と K^+ トランスポーター遺伝子 4 個 (*CjKUP2*、*CjKUP3*、*CjKUP4*、*CjKEA1*) について、 K^+ 輸送機能やスギ樹体内での発現特性の解析を行った。*CjKUP4* と *CjKEA1* については、新たな K^+ トランスポーター遺伝子として単離から行い、その後解析を行った。

(1) 試料採取・total RNA 抽出

スギのポット苗木 (3 年生) または約 50 年生のスギ成木から、様々な部位の試料を採取した。苗木からは、肥大成長が盛んな時期 (6~8 月) に当年生の針葉、内樹皮、分化中木部、根を採取した。成木からは、8 月から翌年 2 月まで、1~4 週間隔で各分化段階 (花粉母細胞期~花粉飛散期) の雄花を採取した。花粉飛散期 (受粉期) には、雌花も採取した。そして、採取した試料から CTAB 法 (Chang et al. Plant Mol Biol Rep 1993) により total RNA を抽出した。

(2) 新たな K^+ トランスポーター遺伝子の単離

米国国立生物工学情報センターの BLAST 検索や森林総合研究所の ForestGEN データベース (Tsumura et al. Theor Appl Genet 1997; Ujino-Ihara et al. Plant Mol Biol 2000; Plant Biol 2003; Plant Mol Biol 2005; Futamura et al. Tree Physiol 2006; BMC Genomics 2008; Yoshida et al. Tree Physiol 2007) を用いて、既知の K^+ トランスポーターと相同性を有するスギの塩基配列を見出した。そして、見出した塩基配列をもとに、RACE 法と RT-PCR 法を用いて目的の K^+ トランスポーター遺伝子 (*CjKUP4*、*CjKEA1*) に相当する cDNA を単離した。

(3) 機能解析

大腸菌 K^+ 取り込み能欠損株 (LB2003 株) を用いた相補性試験により、 K^+ 取り込み機能の解析を行った。LB2003 株は全ての K^+ 取り込み系 (Trk, Kup, Kdp) が欠損しており、低濃度 (15mM 以下) の K^+ 環境下では生育できない変異株である。各対象遺伝子を大腸菌発現用ベクター pPAB404 に組み込み、このベクターで LB2003 株を形質転換した。これにより、各対象遺伝子がコードするチャネルまたはトランスポーターを LB2003 株中で発現させた。そして、低濃度の K^+ (KCl) を含む固形培地に形質転換した LB2003 株を播種し、生育能力を検証した。

さらに、各 K⁺チャネル・トランスポーターの K⁺取り込み機能に対する K⁺以外の陽イオンの影響を調べた。種々のイオン塩 (NaCl、CsCl など) を添加した低濃度 K⁺液体培地に形質転換した LB2003 株を播種し、振とう培養した。同時に、イオン塩を添加していない低濃度 K⁺液体培地でも形質転換した LB2003 株を培養し、対照とした。そして、培養中に一定間隔で 600nm の光学密度 (OD₆₀₀) を測定し、各陽イオンによる生育への影響を検証した。

(4)発現解析

3 (1)で抽出した total RNA から、逆転写キットを用いて cDNA を合成した。合成した cDNA、各対象遺伝子をそれぞれ特異的に検出するプライマー、そして市販の試薬を用いて、リアルタイム PCR 反応液を調製し、リアルタイム PCR 装置で反応を行った。そして、各部位における各対象遺伝子の発現量を測定し、部位間における発現の違い、雄花分化過程における発現量の変動など、スギ樹体内での発現特性について調べた。

4. 研究成果

(1)機能解析

スギの K⁺チャネル (CjTPK1、CKT1) と K⁺トランスポーター (CjKUP2~4、CjKEA1) をそれぞれ発現させた LB2003 株は、全て低濃度 K⁺培地で生育できるようになった (図 2)。このことから、本研究で解析したスギの K⁺チャネル・トランスポーターは LB2003 株の K⁺取り込み能欠損を相補する、すなわち K⁺取り込み機能を持つことが明らかになった。

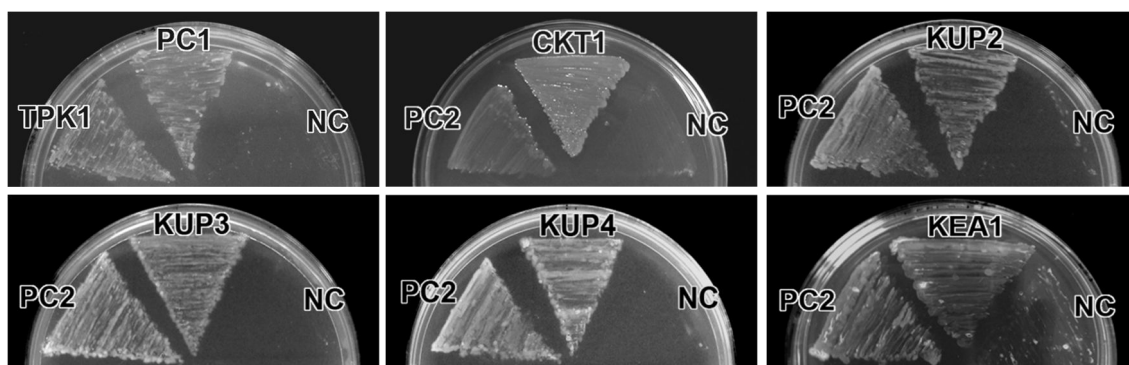


図 2. スギの K⁺チャネル (TPK1 : CjTPK1、CKT1 : CKT1) または K⁺トランスポーター (KUP2 : CjKUP2、KUP3 : CjKUP3、KUP4 : CjKUP4、KEA1 : CjKEA1) を発現させた大腸菌 K⁺取り込み能欠損株 (LB2003 株) の低濃度 (2.2 ~ 5mM) K⁺培地における生育
PC1、PC2 : シロイヌナズナの KAT1 チャネル、タバコの NtTPK1 チャネルをそれぞれ発現させた LB2003 株 (陽性対照)、NC : pPAB404 空ベクターを保持した LB2003 株 (陰性対照)

CKT1、CjKUP2、CjKUP3 をそれぞれ発現させた LB2003 株の低濃度 K⁺液体培地における生育は、ナトリウム (Na⁺)、セシウム (Cs⁺)、カルシウム (Ca²⁺)、アンモニウム (NH₄⁺) の各陽イオンの添加によって阻害が見られた (表 1)。このことから、CKT1、CjKUP2、CjKUP3 による K⁺取り込みは Na⁺、Cs⁺、Ca²⁺、NH₄⁺ に影響を受けると考えられる。CjKUP4 または CjKEA1 を発現させた LB2003 株については、Cs⁺ と Ca²⁺ の添加によって生育が阻害され、CjKUP4 と CjKEA1 による K⁺取り込みはこれらの陽イオンに影響を受けることが示唆された。

表 1. CKT1、CjKUP2、CjKUP3 をそれぞれ発現させた LB2003 株の生育に対する K⁺以外の陽イオンの影響

添加した陽イオン (イオン塩)	添加濃度 (mM)	OD ₆₀₀ (%)		
		CKT1	CjKUP2	CjKUP3
無添加	0	100.0 ± 3.4	100.0 ± 9.5	100.0 ± 12.8
Na ⁺ (NaCl)	5	83.3 ± 4.2**	51.7 ± 15.8**	90.1 ± 4.6**
	10	55.6 ± 8.0**	44.2 ± 6.6**	59.0 ± 6.8**
Cs ⁺ (CsCl)	5	67.6 ± 9.0**	32.4 ± 15.6**	13.7 ± 1.1**
	10	53.8 ± 18.9**	16.0 ± 3.5**	6.1 ± 2.1**
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	5	76.8 ± 15.4**	13.0 ± 4.6**	37.4 ± 1.1**
	10	32.2 ± 10.5**	8.5 ± 2.6**	23.0 ± 6.0**
NH ₄ ⁺ (NH ₄ Cl)	5	71.6 ± 11.7**	58.4 ± 16.8**	70.1 ± 6.0**
	10	40.0 ± 5.6**	32.1 ± 12.7**	29.7 ± 3.6**

培養開始時の OD₆₀₀ は 0.05 とし、無添加の OD₆₀₀ が 1.5 に達した時点で比較した。

OD₆₀₀ の値は無添加に対する割合で表した (平均値 ± 標準偏差、n = 6 ~ 18)。

**は無添加に対する有意差を示す (P < 0.01、Dunnett 検定)。

(2)発現解析

スギの雄花分化過程における各対象遺伝子の発現量の変動を図3に示す。*CjTPK1*、*CKT1*、*CjKUP3*、*CjKEA1*の発現量は、減数分裂期と小胞子が四分子から分離した直後の時期に高くなり、その後減少した。中でも、*CKT1*と*CjKUP3*の発現量は変動が大きかった。*CjKUP4*の発現量は、大きな変動はなかったものの、分化中の方が成熟期よりも高かった。一方、*CjKUP2*は分化が進むにつれて発現量が上昇し、成熟期での発現量が最も高かった。これらの結果から、スギの雄花では*CjKUP2*は主に成熟期の、その他のK⁺チャンネル・トランスポーター、特に*CKT1*と*CjKUP3*は主に分化中のK⁺膜輸送に関わっていると考えられる。

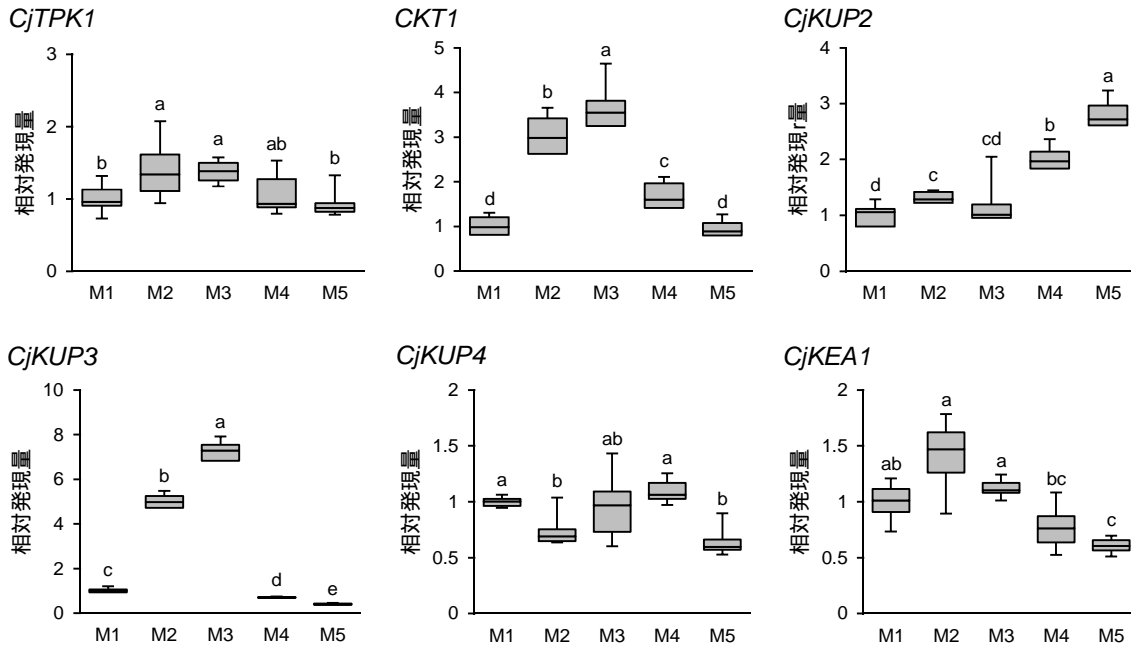


図3. スギの雄花分化過程における各K⁺チャンネル遺伝子・K⁺トランスポーター遺伝子の発現量の変動

箱の中央のバーは中央値、箱の上下はそれぞれ第三四分位点、第一四分位点、ひげは最大値と最小値を示す (n = 12 ~ 18)。

各遺伝子の発現量は、アクチン遺伝子を内部標準とした相対発現量として算出した。

異なるアルファベットは分化段階間での有意差 (P < 0.01,)を示す。

M1: 花粉細胞期 (9月上旬) M2: 減数分裂期 (9月下旬) M3: 小胞子分離直後 (10月上旬)

M4: 小胞子一核期 (11月上旬) M5: 成熟期 (1月下旬)

本研究では、解析を行ったどの遺伝子も全ての試料で発現が確認された。このことから、これらの遺伝子はスギ樹体内の複数の部位でK⁺膜輸送に関与していることが分かった。*CjTPK1*は分化中木部で発現量が高く、*CKT1*は針葉や減数分裂期・小胞子分離期の雄花で発現量が高かった。*CjKUP2*の発現量は成熟雄花で他の部位よりも高く、*CjKUP3*、*CjKUP4*、*CjKEA1*の発現量は減数分裂期・小胞子分離期の雄花で他の部位よりも高かった。分化中木部では、*CjTPK1*と*CjKUP3*の発現量は晩材形成期よりも早材形成期の方が高かった。一方、*CjKUP2*の発現量は晩材形成期の方が早材形成期と比べて高かった。また、*CjKUP4*の発現量は早材形成期と晩材形成期の間で大きな差は見られなかった。以上の結果から、スギの分化中木部では時期によってK⁺膜輸送を担う主要な輸送体が異なる可能性が示された。

(3)その他

*CjTPK1*のcDNAを鋳型としてcRNAの合成を行い、スギのK⁺膜輸送体遺伝子に相当するcDNAからのcRNA合成について、手法を確立した。しかし、電気生理学的手法によるK⁺輸送機能の解析までには至らなかった。

RACE法により、新たなスギのK⁺トランスポーター候補遺伝子 (*Cj6570*)を単離した。配列解析を行った結果、*Cj6570*がコードするタンパク質は既知のKUP/HAK/KT系トランスポーターと同源性を有することが明らかになった。さらに、KUP/HAK/KT系トランスポーターに特徴的な構造を全て持つと推定された。

(4)まとめと今後の展望

複数個のスギのK⁺膜輸送体遺伝子について、これらがコードするK⁺膜輸送体がK⁺取り込み機能を持ち、K⁺取り込み機能がいくつかの陽イオンに影響を受けることを明らかにした。針葉樹のK⁺膜輸送体の機能についての知見は、これまでスギの*CjKUP1*に関するもののみであった

が、本研究により新規の知見を多く得ることができた。本研究の成果をもとに、より定量的な解析を行うことにより、これらの K⁺膜輸送体の機能的詳細が明らかになるものと期待される。

複数個のスギの K⁺膜輸送体遺伝子について、雄花の分化過程における発現量の変動、分化中木部での時期による発現量の違いなどのスギ樹体内での発現特性に関する新規の知見を得た。組織・細胞レベルでの発現解析、より細かい発現の季節変動の解析など、さらに研究を進めることにより、肥大成長（木材形成）、雄花・花粉形成などの成長・生理過程と K⁺膜輸送の関係のより詳細な解明につながるものと期待される。

モデル植物のシロイヌナズナは、K⁺チャンネル遺伝子と K⁺トランスポーター遺伝子を合わせて 30 個以上の K⁺膜輸送体遺伝子を保持している。スギから単離され、解析が行われた K⁺膜輸送体遺伝子の数は未だ少なく、スギ以外の針葉樹では K⁺膜輸送体遺伝子に関する研究はほとんど行われていない。スギをはじめとする針葉樹からさらに K⁺膜輸送体遺伝子の単離を進め、その特性を明らかにしていくことが必要である。

将来的には、本研究で得られた K⁺膜輸送に関する遺伝子レベルでの成果をさらに発展させて、分子育種を利用した成長、材質などの形質向上による各用途に適した森林・木質資源の開発といった応用的・実用的研究への展開も期待できる。また、K⁺膜輸送体遺伝子の発現制御によるスギ雄花（花粉）形成抑制、花粉症問題の軽減につながる可能性も考えられる。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計7件)

Yoshihiro Hosoo, Tatsuya Ishikawa, Hirokazu Nishiwaki, Molecular cloning and analysis of a gene encoding a KUP/HAK/KT potassium uptake transporter CjKUP4 in *Cryptomeria japonica*, International Symposium on Forest Tree Molecular Biology and Biotechnology, 2018

Yoshihiro Hosoo, Hirokazu Nishiwaki, Molecular cloning and analysis of a gene encoding a KUP/HAK/KT potassium uptake transporter CjKUP4 in *Cryptomeria japonica*, 19th International Botanical Congress, 2017

石川達也、西脇宏一、細尾佳宏、スギにおける新規カリウムトランスポーター遺伝子 *CjKUP4* の単離および解析、第 128 回日本森林学会大会、2017

Yoshihiro Hosoo, Hirokazu Nishiwaki, Molecular cloning and analysis of a novel gene encoding the potassium uptake transporter CjKUP2 in sugi (*Cryptomeria japonica*), Plant Biology Europe 2016 Congress, 2016

細尾佳宏、西脇宏一、スギの Shaker 型カリウムチャンネルをコードする遺伝子の解析、第 127 回日本森林学会大会、2016

小林潤、細尾佳宏、スギ由来 KEA 系トランスポーター遺伝子の単離と解析、信州大学農学部バイオサイエンス若手研究会第 5 回シンポジウム、2015

Yoshihiro Hosoo, Yukiya Kimura, Hirokazu Nishiwaki, Molecular cloning and analysis of a gene encoding two-pore potassium uptake channel from *Cryptomeria japonica*, Tree Biotechnology Conference 2015, 2015

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし