

植物のイオン輸送系の構造と機能に関する研究

魚住信之（名古屋大学 生物機能開発利用研究センター）

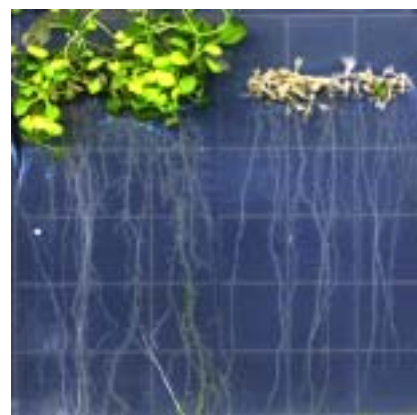
uozumi@agr.nagoya-u.ac.jp

植物細胞の恒常性維持と塩や浸透圧などの外界ストレスへの適応反応の中心的役割を担う K^+ チャネル・ Na^+ トランスポーターの分子機構と生理的役割を解析するとともに、植物、動物や細菌の膜輸送体の新規機能解析系の構築と膜輸送体の生体膜への組み込み機構と原理、生物の種を越えた共通性の知見を見いだした。

植物の塩感受性に関する Na^+ 輸送体の発見

地球規模ですすむ耕地の砂漠化の要因は塩類の集積である。植物にとって Na^+ は必須栄養元素ではなく、植物は Na^+ に高い感受性(塩害)を示す。植物の疎水性の生体膜を横切って Na^+ が通る道があることは確認されていたがその実体は不明であった^{1,2)}。1994年に小麦から Na^+ と K^+ の両イオンを輸送する新規の HKT 系トランスポーター遺伝子(HKT1)が単離された。大腸菌や酵母のこのホモログ輸送体は K^+ 取込み系として機能していることから、植物の HKT1 も K^+ 輸送体とされていた。2000年に私たちはシロイヌナズナから HKT1 ホモログ遺伝子(AtHKT1)を単離した。AtHKT1 の K^+ 及び Na^+ 輸送活性を調べたところ、意外なことに AtHKT1 は小麦 HKT1 のような K^+ 輸送活性はなく、小麦 HKT1 よりも強い Na^+ 輸送活性を検出した³⁾。

AtHKT1 が植物においても Na^+ 輸送体として機能していることが以下のように明らかとなった。一般に Na^+ は植物に毒性を示し植物の必須栄養元素ではない。AtHKT1 遺伝子はシロイヌナズナでは1コピーであることから遺伝子型と表現型が1対1に対応し AtHKT1 遺伝子の破壊株(ノックアウト株)の解析結果の解釈が比較的容易である。野生株が生育可能な高濃度の Na^+ 添加培地において、AtHKT1 遺伝子破壊株の地上部(葉や茎)は塩害を受け培養経過とともに枯れた。このとき、地下部(根)の成長阻害は認められなかった。この破壊株の篩管中の Na^+ 濃度は野生株と比較して低いことが分かった。以上の実験結果から、AtHKT1 は地上部の篩管に Na^+ を積み下ろす輸送体として機能し、本輸送体は植物の塩感受性(または塩耐性)に関わる輸送体であることが明らかとなった。他の研究者からも、AtHKT1 の変異が植物の塩害の抑制に働く Na^+ 排出系 Na^+/H^+ アンチポーターの調節因子の変異を緩和することが報告され、AtHKT1 が Na^+ の植物内循環に関与しているという私たちの結果が裏づけられた。植物の Na^+ 吸収と Na^+ の循環系輸送体の実体は全く不明であったが、AtHKT1 は Na^+ 循環系の一部を担う輸送体として機能していることが明らかとなった。以上の結果は、HKT 系輸送体は細菌、酵母、植物において塩ストレスおよび浸透圧ストレスへの適応に重要な輸送体であることを示している。



野生株

AtHKT1遺伝子
突然変異株

図1 AtHKT1 トランスポーターの遺伝子を破壊した植物は高塩濃度(NaCl 75mM)の培地では地上部が枯れる。AtHKT1 は植物の Na^+ 輸送と塩感受性に関するトランスポーターである。

イオン輸送体のトポロジーの決定とイオン選択性決定部位

イオン輸送体の機能やイオン選択性を探る上で、輸送体の膜貫通構造(トポロジー)とイオン選択性部位の決定は重要である。私たちは植物のK⁺輸送体が大腸菌の細胞膜(内膜)で正規のコンフォメーションを形成し機能発現することを見出した。さらに、大腸菌に発現して決定した膜蛋白質のトポロジーは、動物細胞の小胞体膜と動物培養細胞で決定した結果と一致した^{4,5)}。このことは、大腸菌発現系は本輸送体にとどまらずその他の真核細胞由来の膜蛋白質の解析に応用可能な迅速かつ簡便な手法の一つであることを示している。大腸菌発現系は他のイオン輸送体解析に他の研究者によって利用されることとなった。また、真核細胞由来の膜蛋白質が原核細胞の生体膜で発現することは、原核細胞と真核細胞の垣根は従来から思われているよりも低いことを示唆している。

私たちは、植物に発現している3種類のK⁺輸送体であるK⁺チャンネル、HKT系トランスポーター、KUP系トランスポーターの膜貫通構造を決定する計画であり、前者2つを既に決定した。その結果、K⁺チャンネルとHKT系トランスポーターの構造は類似であることが以下の様に明らかとなった。HKT輸送体のトポロジーに関して当時は、8回膜貫通構造と10回膜貫通構造の異なるモデルが2グループの研究者から提案されていた。私たちは、大腸菌、*in vitro*、動物培養細胞の膜蛋白質発現系を用いて、AtHKT1は8回の膜貫通構造を有することを明らかにした。このHKT系トランスポーターの構造はK⁺チャンネルのイオン透過孔の構造であるMembrane-Pore-Membrane(MPM)モチーフが4回重複した秩序のある構造であることがわかった⁶⁾。

決定した膜構造はイオン選択性残基の同定に有効な情報を与える。私たちはK⁺輸送活性のある小麦HKT1輸送体とK⁺輸送活性のないシロイヌナズナAtHKT1輸送体のイオン選択性に関与するアミノ酸を探った。小麦HKT1輸送体のイオン透過孔には特徴的なGlyが4つ存在するが、K⁺輸送活性のないAtHKT1は最もN末端領域のGlyがSerに置換されている。このSerをGlyに置換すると、K⁺輸送活性を示すようになった。先の結果に示したようにK⁺チャンネルとK⁺トランスポーターのイオン選択孔は、4つのMPMモチーフが会合した構造で形成されている。この1分子のMPMにはK⁺の選択に必須のGlyが存在し、4つのMPMのGlyが四方から取り囲んでK⁺選択性透過孔を形成することが明らかとなった。このことはHKT系トランスポーターとK⁺チャンネルはアミノ酸レベルの相同性は低いが、立体構造上は共通性が高く祖先が同じであることを示す。ポストゲノムシーケンシング時代の課題の一つは蛋白質の構造と機能である。この得られた結果はHKT系輸送体とK⁺チャンネルの骨格構造の進化的保存性を示している⁷⁾。

TaHKT1	76	YIDMLFLSTSALITVS	G	LS	93
AtHKT1	53	DFDLFFTSVSAITVS	S	MS	70
EcHKT1	80	DLDLFFTSVSAITVS	S	MS	97
OeHKT1	73	YIDMLFLSTSALITLS	S	LI	90
OeHKT2	73	YIDMLFLSTSAMITVS	G	LS	90
ScTrk1	77	YIDTLFLAAGAVITQG	G	LN	93
VaKtrB	55	ITDALFTATSISVT	G	LG	72
Kv	429	IPDAFWAVVIMITV	G	YG	446

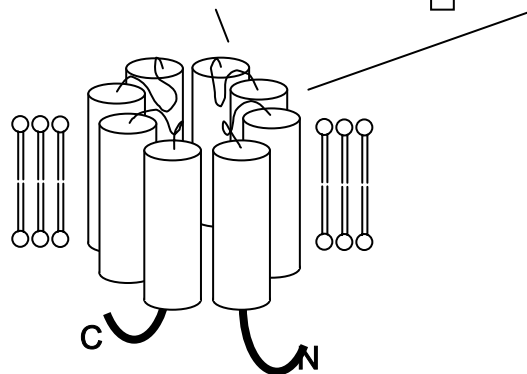


図2 HKT系トランスポーターのNa⁺/K⁺の選択に重要なアミノ酸。第1番目の選択孔中のGly/SerがK⁺の選択性に関与することが分かった。

K⁺チャネルについてもイオン選択性に影響を与えるアミノ酸を解析した。K⁺チャネル(KAT1)のNH₄⁺やRb⁺の透過度がK⁺より10倍大きくなるアミノ酸変異を見だし、イオン透過性には影響を与えないでイオン選択性を改変することが可能であることを示した。また、植物のK⁺チャネルは動物のそれと比較してNa⁺に対するK⁺の選択性が極めて高い。これは、植物において高濃度Na⁺は、そのイオン毒性に加えて必須イオンのK⁺の取込み阻害を引き起こすため、動物のK⁺チャネルより厳密なNa⁺/K⁺選択性が植物のK⁺チャネルは備わっていると考えられている。植物のK⁺チャネルにはイオン選択孔付近によく保存されているThr(K⁺チャネルのKAT1ではThr²⁹⁰)があり、このアミノ酸はNa⁺の排斥に必須であることを明らかにした。近年の技術の進歩とともに蓄積されつつあるX線解析による立体構造の知見を利用することで、今後はさらに計画的なイオン輸送系の変更が可能と思われる⁸⁾。

新規な膜貫通構造の形成機構

微生物・動物・植物の膜電位に応答してイオン選択孔が開閉するNa⁺、Ca²⁺、K⁺チャネルは基本的に同じ膜貫通構造(イオン透過孔、膜電位センサー)を形成している。イオン選択孔は2つの膜貫通セグメントの間に疎水性ループ構造が存在し、そのループがイオン選択を決定している。また、膜電位センサーは親水性膜貫通セグメントで形成されている。一般に、膜蛋白質の膜貫通セグメントは疎水性で、その疎水性を利用して生体膜に挿入される。しかし、イオンチャネルには疎水性が高いにもかかわらず膜貫通構造を形成しないイオン透過孔や親水性膜貫通セグメントが存在するため、それらがどのようにして形成されるのかについて注目されていた。我々は、イオン選択孔と膜電位センサーの膜への挿入機構の解明を目的に、*in vitro* 翻訳系・膜挿入系(ウサギ網状赤血球溶血液・イヌの膀胱小胞体膜)を用いて、放線菌・動物・植物由来のK⁺チャネル(以上3種類)の膜貫通セグメントの生体膜への組み込み過程を解析した。植物・動物・放線菌由来の区別なくK⁺チャネルのイオン選択孔の膜形成の結果は同様であった。疎水性の高いループは、膜貫通セグメントを形成する性質はなく、膜構造形成過程において一旦小胞体内腔に露出した後、最終的に膜に半分埋まった構造をとることが分かった⁹⁾。膜電位センサーを形成する2つの膜貫通セグメントは、N末領域から順番に生体膜に挿入されるのではなく、2つの膜貫通セグメントが相互作用をして同時に生体膜に挿入されることが分かった。従来から知られている様式とは異なる、新規の膜貫通セグメントの膜形成様式の存在を示した^{10,11)}。

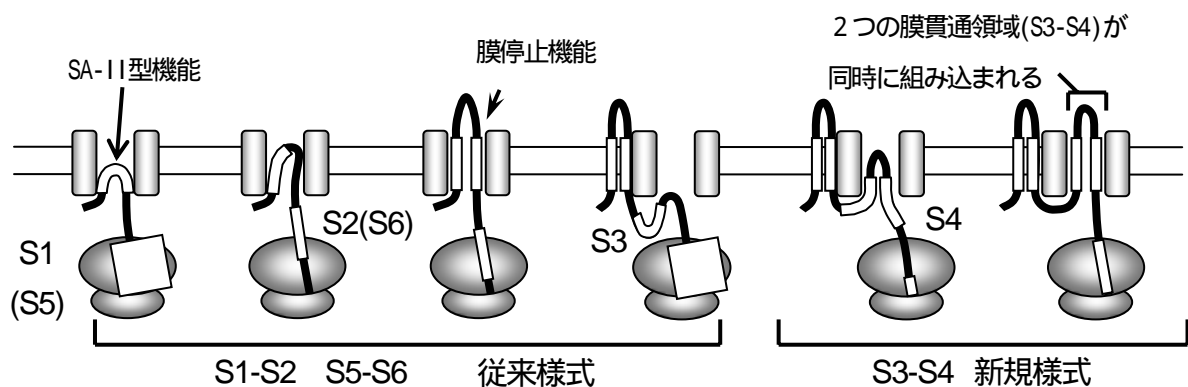


図3 膜蛋白質の生体膜(小胞体膜)への挿入様式の解析。S4のリボゾームにおいてS3を待って、S3はS4と相互作用して小胞膜に挿入されることを見出した。従来から知られている挿入過程とは異なる様式(S1-S2やS5-S6)で、後ろの膜貫通部位が前の膜貫通部位の挿入を助ける新規に発見された組み込み様式である。

謝辞

本研究を共にすすめ、ご協力をいただいた大学院生、研究者および共同研究者に深く感謝いたします。本推薦にご尽力いただきました坂神洋次先生（名古屋大学教授）に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 水谷昭文、佐藤陽子、松田信行、加藤靖浩、魚住信之 (2003) カリウムイオン輸送系と生理的役割。細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 秀潤社 **18**, 40-47
- 2) 佐藤陽子、水谷昭文、魚住信之 (2003) K⁺イオン輸送系の植物生長と塩感受性への役割。蛋白質核酸酵素増刊号 共立出版
- 3) 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 homologue mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.*, **122**, 1249-1259.
- 4) Uozumi, N., Nakamura, T., Schroeder, J. I. and Muto, S. (1998) Determination of transmembrane topology of an inward rectifying potassium channel from *Arabidopsis thaliana* based on functional expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95** 9773-9778.
- 5) Uozumi, N., (2001) *E. coli* as an expression system for K⁺ transport systems from plants. *Am. J. Physiol.* **281**, C733-C739.
- 6) 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.
- 7) Maser, 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. (2002) 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.
- 8) Uozumi, N., Gassmann, W., Cao. Y., and Schroeder, J. I. (1995) Identification of strong modifications in cation selectivity in an *Arabidopsis* inward rectifying potassium channel by mutation selection in yeast. *J. Biol. Chem.* **270**. 24276-24281.
- 9) Umigai, N., Sato, Y., Mizutani, A., Utsumi, T., Sakaguchi, M., and Uozumi, N. (2003) Topogenesis of two transmembrane type K⁺ channels, Kir 2.1 and KcsA. *J. Biol. Chem.*, **278**, 40373-40384.
- 10) 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.
- 11) Sato, Y., Sakaguchi, M., Goshima, S., Nakamura, T., and Uozumi, N. (2003) Molecular dissection of the contribution of negatively and positively charged residues in S2, S3, and S4 to the final membrane topology of the voltage sensor in the K⁺ channel, KAT1. *J. Biol. Chem.*, **278**, 13227-13234.

Study on Structure and Function of Plant Ion Transport Proteins

Nobuyuki Uozumi (Bioscience and Biotechnology Center, Nagoya University)

uozumi@agr.nagoya-u.ac.jp