

## 第1章 耐塩性植物の分子育種

### 1.1 従来の研究経過

#### 1.1.1 植物における適合溶質の生成

植物が高浸透圧条件に曝されると、適合溶質と呼ばれるアミノ酸類や糖類の生成レベルを上げて細胞内の浸透圧を調節することが知られており(1,2)、適合溶質生合成系を遺伝子工学的に強化することで植物の浸透圧耐性を向上させた例が報告されている(3)。我々は、大阪大の高野(現名誉教授)らによってタイの塩土から単離された好塩性微生物 *Halomonas elongata* の適合溶質であるエクトインの利用を考えた。この微生物は細胞内にエクトインを蓄積することで21%(3.6 M)の食塩を含む培地でも生育できる(4)。エクトインはリジン、スレオニン生合成経路の中間代謝物質であるアスパラギン酸- $\beta$ -セミアルデヒドから3段階の酵素反応で合成される(5)。それぞれの酵素をコードする遺伝子をバイナリープラスミドに直列に連結し、タバコ培養細胞 BY2 へ導入した(6)。得られた形質転換 BY2 細胞中にエクトインの蓄積が確認され、蓄積量に応じて細胞の高浸透圧ショックストレス抵抗性が向上した。この研究は、複数遺伝子(この場合は構造遺伝子3個とマーカー遺伝子2個を含めて5遺伝子)の多重導入によって目的代謝系を導入する植物代謝工学としての意味も大きい。現在、タバコ植物体においてエクトイン、および、細胞内浸透圧の調節物質であるプロリンを複合的に高蓄積させる系の開発を進めている。

#### 1.1.2 ナトリウム排出ポンプ

一方、 $\text{Na}^+$  の毒性に対する抵抗性を高めるためには、高塩濃度環境下で  $\text{Na}^+$  の細胞内流入を阻止するか細胞質ゾルの  $\text{Na}^+$  を細胞外か液胞へ排出する能力を強化しなければならない。植物における  $\text{Na}^+$  排出の分子機構は明らかにされていないが、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では  $\text{Na}^+$  排出ポンプ ( $\text{Na-ATPase}$ ) をコードする *ENA1* 遺伝子が単離されている(7)。そこで、*ENA1* を CaMV35Sp に連結し、BY2 細胞へ導入した。得られたトランスジェニック細胞を、普通の細胞が増殖できない 120 mM LiCl を含む培地 ( $\text{Li}^+$  は  $\text{Na}^+$  より低濃度で毒性を示すアナログで浸透圧の影響を抑えるために使用) で培養したところ、*ENA1* を発現している細胞は増殖できた(8)。抗体を用いた実験によって組換え Ena1 タンパク質が BY2 細胞の細胞膜に局在していることが確認でき、おそらく酵母の  $\text{Na}^+$  ポンプによって細胞の  $\text{Na}^+$  排出能が高まったと考えられる。

#### 1.1.3 共輸送体分子

$\text{Na}^+$  が植物の生育に及ぼす悪影響は、細胞内に入った  $\text{Na}^+$  が主要代謝系の酵素反応を阻

害することに加えて高濃度  $\text{Na}^+$  が  $\text{K}^+$  の取り込みを阻害することも知られている。多量必須元素であるカリウムを摂取できないことは植物にとって致命的である。Rubio と Schroeder ら (Univ. of California, San Diego) によるコムギ (*Triticum aestivum*) を用いた研究で、HKT1 と呼ばれる  $\text{K}^+$   $\text{Na}^+$  共輸送体タンパク質が高親和性の  $\text{K}^+$  摂取に機能しており、この  $\text{K}^+$  摂取能が高濃度の  $\text{Na}^+$  によって阻害されることが明らかになった(9)。さらに、アミノ酸置換によって  $\text{Na}^+$  選択性が低下した変異型 HKT1 分子をパン酵母に導入すると耐塩性が向上することが報告された(10)。これらの結果に刺激された我々は、イネ (*Oryza sativa*) から HKT1 遺伝子を単離した(11)。イネを選んだ理由は主要な穀物であることに加えてイネにはいくつかの耐塩性品種が存在することである。「耐塩性品種は  $\text{Na}^+$  に強い HKT1 分子を持っているかもしれない」と考えた。遺伝子クローニングの結果、通常品種である Nipponbare (japonica) から TaHKT1 に相同な OsHKT1 が1種類単離されたのに対し、耐塩性品種の Pokkali (indica) は OsHKT1 とは別に OsHKT2 を合わせ持っていた。それぞれの遺伝子機能を知るために、高親和性  $\text{K}^+$  摂取能が欠損した突然変異酵母 (CY162) (12)、 $\text{Na}^+$  排出ポンプが欠損した  $\text{Na}^+$  高感受性酵母 (G19) (13) を宿主とした解析を行った。その結果、OsHKT1 は CY162 株の  $\text{K}^+$  摂取能変異を相補できないのに対し、OsHKT2 は同変異を相補した。これは、OsHKT2 だけが高親和性  $\text{K}^+$  輸送活性を持っていることを示唆している。G19 株を宿主とした実験で両分子ともに  $\text{Na}^+$  輸送活性があることが確認でき、OsHKT1 分子は  $\text{Na}^+$  輸送体 ( $\text{K}^+$  輸送活性は検出限界以下)、OsHKT2 分子は  $\text{K}^+$   $\text{Na}^+$  共輸送体であると考えられる。両者のイオン輸送特性は、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学実験でも同じ結果が得られている。 $\text{K}^+$  輸送を行うタンパク質は、P ループと呼ばれる種を越えて保存されたドメインを持っていることが知られており、中でも特に高度に保存されたグリシン残基が  $\text{K}^+$  選択性に重要であると言われている(14)。イネの各分子を見ると、 $\text{K}^+$  輸送活性を示す OsHKT2 では P ループ内のグリシンが保存されていたが、 $\text{K}^+$  輸送能が検出できない OsHKT1 ではセリンに置換されていた。名古屋大の魚住らがシロイヌナズナからすでに単離していた AtHKT1 も  $\text{K}^+$  輸送能が検出限界以下で同じグリシンがセリンに置換されていた(15)。試しに OsHKT1 のセリンをグリシンに置き換えた変異型分子を作ってみたところ、見事に  $\text{K}^+$  輸送活性が認められた(16)。耐塩性イネの Pokkali は長い進化の過程で異なるイオン輸送特性を示す2つの HKT 分子を持ったと考えられるが、アミノ酸置換によってイオン選択性を変えられることは耐塩性育種にとって大きなメリットである。高親和性  $\text{K}^+$  輸送能が高濃度の  $\text{Na}^+$  によって阻害されないような HKT 分子ができれば、耐塩性植物作製の有力なパーツとなる。

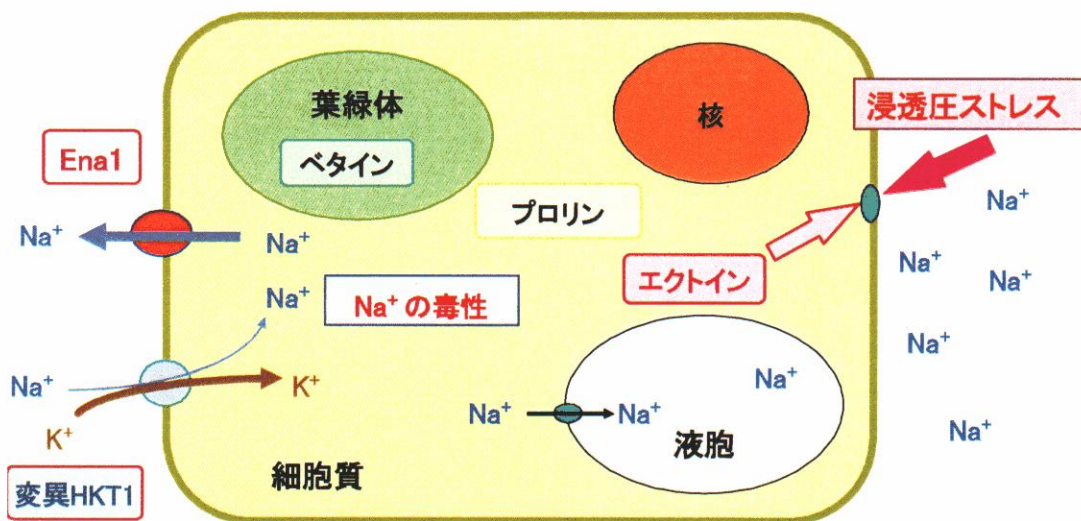


図. 耐塩性植物作製の戦略

- (1) 適合溶質の蓄積、(2)  $\text{Na}^+$  イオン進入阻止、
- (3)  $\text{K}^+$  イオンの積極的取り込み、(4) 液胞への  $\text{Na}^+$  イオンの隔離

## 引用文献

1. Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., and Bohnert, H.J.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 463-499 (2000).
2. 吉田和哉、堀江智明、仲山英樹: 植物分子生理学入門. 横田明穂 編, 学会出版センター, pp199-208 (1999).
3. Bohnert, H.J. and Jensen, R.G.: *Trends in Biotechnol.*, **14**, 89-97 (1996).
4. Ono, H., Okuda, M., Tongpim, S., Imai, K., Shinmyo, A., Sakuda, S., Kaneko, Y., Murooka, Y., Takano, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 362-368 (1988).
5. Ono, H., Sawada, K., Khunajakr, N., Tao, T., Yamamoto, M., Hiramoto, M., Shinmyo, A., Takano, M., Murooka, Y.: *J. Bacteriol.*, **181**: 91-99 (1999).
6. Nakayama, H., Yoshida, K., Ono, H., Murooka, Y., and Shinmyo, A.: *Plant Physiol.* **122**, 1239-1247 (2000).
7. Haro, R, Sainz, L., Rubio, F., and Rodríguez-Navarro, A.: *FEBS Lett.*, **291**, 189-191 (1991).
8. 仲山英樹、吉田和哉、新名惇彦: 日本生物工学会大会要旨集, p112 (2000).
9. Rubio, F., Gassmann, W., and Schroeder, J.I.: *Science*, **270**, 1660-1663 (1995).
10. Rubio, F., Schwarz, M., Gassmann, W., and Schroeder, J.I.: *J. Biol. Chem.*, **274**, 6839-6847 (1999).
11. Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S. and Shinmyo, A.: *Plant J.*, **27**, 129-138 (2001).
12. Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V., Lucas, W.J., and Gaber, R.F.: *Proc. Acad. Sci. USA*, **89**, 3736-3740 (1992).
13. Quintero, F.J., Garcíadeblas, B., and Rodríguez-Navarro, A.: *Plant Cell*, **8**, 529-537 (1996).
14. Maser, P., Schroeder, J.I., Hosoo, Y., and Uozumi, N.: *Plant Physiol. supplement*, 153 (2000).
15. Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.P., Nakamura, T., and Schroeder, J.I.: *Plant Physiol.* **122**, 1249-1259 (2000).

## 1.2 本研究の成果

### 1.2.1 K<sup>+</sup> 輸送体分子、KUP の解析

上で紹介した HKT 以外に KUP と呼ばれる K<sup>+</sup> 輸送体分子も耐塩性植物育種に重要なイオン輸送体であるので、イネの KUP 遺伝子および遺伝子産物について詳細に解析を行った。

【目的】K<sup>+</sup> は植物の 3 大必須元素の 1 つとして細胞内に最も高濃度に蓄積する陽イオンであり、膜電位の維持や浸透圧の調節に働いている。近年の研究において、植物の耐塩性には細胞内の K<sup>+</sup> 濃度を適正に維持する K<sup>+</sup> 恒常性が重要であることが明らかになっている。我々は、イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) の K<sup>+</sup> 輸送に関わっていると考えられる HKT および HAK 分子の機能解析を行っている。HAK 遺伝子は、シロイヌナズナのゲノム上には少なくとも 25 コピー、イネのゲノム上には少なくとも 17 コピー存在しており、さまざまな器官で発現していることから、植物における主要な K<sup>+</sup> 輸送体遺伝子であると考えられている。昨年度大会において、イネから 2 種の HAK 遺伝子 (*OsHAK2*, *OsHAK5*) を単離し、発現様式と大腸菌を宿主としたイオン輸送能の検定結果を報告した。今回は、植物細胞における *OsHAK* 遺伝子の機能解析を行った結果を報告する。

【方法・結果】*OsHAK2*、および *OsHAK5* 各 cDNA をバイナリーベクター pMSH1 の CaMV 35S プロモーターの支配下に連結して、それぞれアグロバクテリウム感染法によってタバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum*, BY2) に導入した。形質転換細胞における導入遺伝子の発現は、RT-PCR 法で確認した。得られた形質転換体を用いて低 K<sup>+</sup> 培地 (0.1 mM K<sup>+</sup>) における生育試験を行ったところ、*OsHAK2* 導入 BY2 と *OsHAK5* 導入 BY2 は共に低 K<sup>+</sup> 培地において顕著な生育促進が観察された。次に、細胞内局在性を調べるために、OsHAK と EGFP の融合タンパク質をコードする遺伝子を CaMV 35S プロモーターの支配下に連結して、タマネギ表皮細胞にパーティクルボンバードメント法により一過的に導入した。その結果、OsHAK5-EGFP を導入した表皮細胞の細胞膜に沿って GFP の蛍光シグナルが観察された。これらの結果から、*OsHAK5* 発現細胞においては細胞膜に局在生成された OsHAK5 タンパク質によって培地からの K<sup>+</sup> 摂取能が向上し、細胞増殖速度が上昇したことが予想される。現在、*OsHAK2* の局在性解析と *OsHAK* 導入 BY2 の K<sup>+</sup> の取り込み速度の測定を行っている。

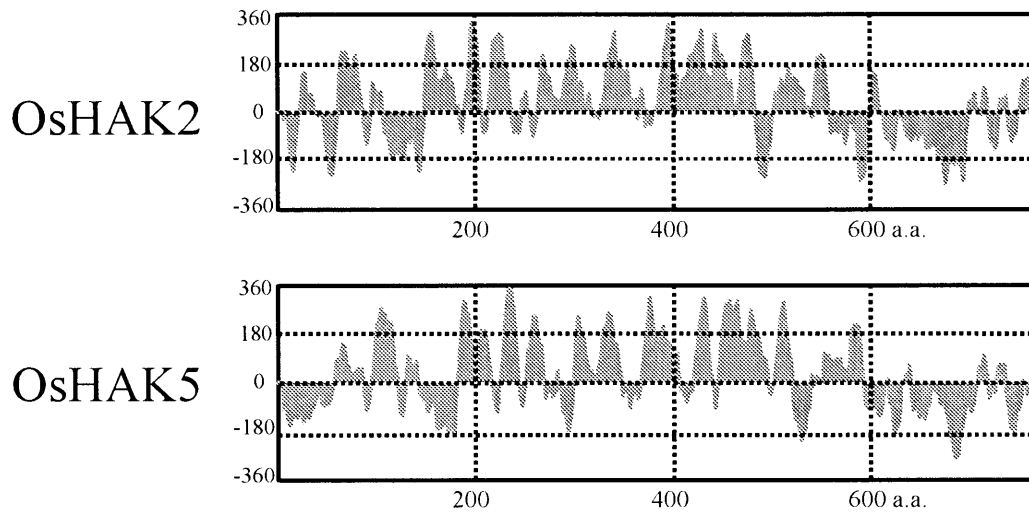
本研究の成果は以下の図表で説明する。

OsHAK4	-----	
OsHAK2	-----MDAEG-VGGADQLPWRQHRYRNLALLAYQSPGVVYGD	36
OsHAK5	MTEPLHTSSNGGAERGFNAAFSEKTLQTTTLRQLRFDLSLHMEAGKIPGGQSHTAKVGWATTLHLAFQSIGVVYGD	75
** * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
OsHAK4	-----KYICIALNADDHGEGGTFAMYSLLCQHANIGI	32
OsHAK2	LSTSPLYVYKSTFSGRLRRYQDRQTVFGVLSLIFWTFLLIPLKRYVTIVLSADDNGEGGFALYSLCRHAKLSF	111
OsHAK5	MGTSPLYVFSSTFTN--GIKDTNDILGVMSLIITYVLLPLIKYCFIVLRANDNGDGGTFALYSLISRYARISL	147
* : *		
OsHAK4	LPSKKIYTEEBENLISNQ--PVVAGRPGLRRFIESSIIARRLLLTAILGMCMLIGDGILTPAISVLSAIDGLRG	105
OsHAK2	LPNQQSADBELSTYYRNGFTSRHGSPLWLRPFMEKHKNARTVLLLIVLCGASMMIGDGILTPAISVLSMSGLKV	186
OsHAK5	IPNQQAEDAMVSHYKLESNSNRVKRAHWIKKEMENSPNFKIILFLVTLATSMVIGDGLVTPCISVLSAVGGIKK	222
. : . : *		
OsHAK4	PPFSVKPAVEGLSAAI LVGLFLLQKYGTSKVSFMFSPIMAATFATPVGIVSYIWRYYPGIFKAMSPHYIVRFF	180
OsHAK2	RATGLHDSRVLLSCIVLVGLFALQHRGTQKVAFMFAPIVVWLFCIGGLYNIHWNPRIYQALSPIYYIVKFF	261
OsHAK5	SAKSLTQQQIAGIAIALLIVLFLVQRFQTKVGSFPGIILTWFIPIAGTGVVYVNLFRKHTGVLKAFNPKYIVDYF	297
. . * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
OsHAK4	MTNQTRGWQLLGGIVLCITGAEAMFADLGHFSEKRSIQIAFMSSIYPSLVLTAYAGQTAAYLINNVDDFSDGFYKFFV	255
OsHAK2	RTTGKDWIALGGIILSMTGCEAMFADLGHFTSASVRLAFITIIYPCLLIQYMGQAFLSKNILDMPGTFYDSIP	336
OsHAK5	BRNGKQGWISLGGVILCITGTEAMFADLGHFNRAIQIGFSVLLPVSLLAYIQAAYLRIYPEHVADTFYKISIP	372
* : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
OsHAK4	RPVVWPMFIATLAAIVASQSLISATFSVIKQSVLDYFPRVVKVHTSKDKEREVYSPENNYMLMLLVCVGLIRF	330
OsHAK2	GPIFWPVFVATLAAVVGSAVISATFSIVKQCHSLGCFPRVVKVHTSRWYIYQIYIPBINWMLMVLCVAVTVAF	411
OsHAK5	DPLYWPTFVVAATAIIASQAMISGAFIIAQSQLGCFPRVVIHTSTKFKHGQVYIPBINYVLMVLCVAVTAIF	447
: * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
OsHAK4	RERKDIGNAFGVVIVLMLITLITLVLMLIIGTHVVLVALYLVPFLLLEATYVSACVTKILRGGWVFAVSV	405
OsHAK2	RDITLIGNAVGACMTVMFVTTFMLALIMIFVWQKNIIIFALSPFLPGSVVVVLSLSSLMKVTQGGWVPLVLALI	486
OsHAK5	QTTDRIGNAYGIAVVFVMTITLTLVLVMMIWKTSLLWIALFPVIFGGABLIYLSAFYKFTQGGYLPVFS	522
: * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
OsHAK4	LAAVMFGWYGRQKTEYEAANKVTLERLGEGLLSPGLRRVPGLCFFYSNRQDGGWLTPLVAHYIRNMRSLHEVT	480
OsHAK2	FMSVMYIWHYGTRKKYQYDLQNKVSMRYILSLGPSLDVVRVPGIGLIYTELVGT--VPNIFTHFTNLPAFHEVL	559
OsHAK5	LMFIMATWHYVHVERYKYELRNKVSNNYVAELAVKQNLARLPGIGFLYSELVQ--IPPILPHLVEKVP	595
* : : : : : . . . : * : * : * * * : * : * : * : *		
OsHAK4	VFLTLRLLVAKVDGKDRVQAVRRRGPAG--VYGCTIQYGYADA-----IDFEBDDISG---	532
OsHAK2	VFLCVKSVVPVYVS-PDERYLVRIGRIPRAYRMYRCIVRYGYKDVQRDDNFENMLVMNIGKIFIMMRAEDPASS	633
OsHAK5	VIIISKYLPISKIE-TKERFLFRYVEPKYRVRFCVVRVYGYNDRKVEDPAEFESLVNIENLQFIERESLSYQS	669
: : : * . :		
OsHAK4	-----QVVGALRERVVVDE-----	546
OsHAK2	YDTANEGRMAVITSSDDYDSPAIVRDSNDLADSMTRSTKESLSLQSSYEQESPNSRVRVRFELP	708
OsHAK5	LEGSISKEIGGVTDTP-----TSEVQDAMSSRNNSDQHTTEPRNG-----	708
* : : *		
OsHAK4	---EEGERVEAARAAGVVHVRGKMRFFHVGDTRLFDRVLLGF-YELLHGACRSALPALGIPLQQRVVEIGMLYKA	616
OsHAK2	QQVKDELLALVEAKHTGVTYVMGHVYIKARKNSSPFKRFAIDVGYSLRKNCRGPSVTLHIPIHISLIEVGMAYQV	783
OsHAK5	--CMDEIQSIHKEMGNVHLLGETNVVABPNADPLKKIIVDYVYNP	781

**Fig. 1. Alignment of the deduced amino acid sequences of OsHAK2, OsHAK4 (AF129485) and OsHAK5.**

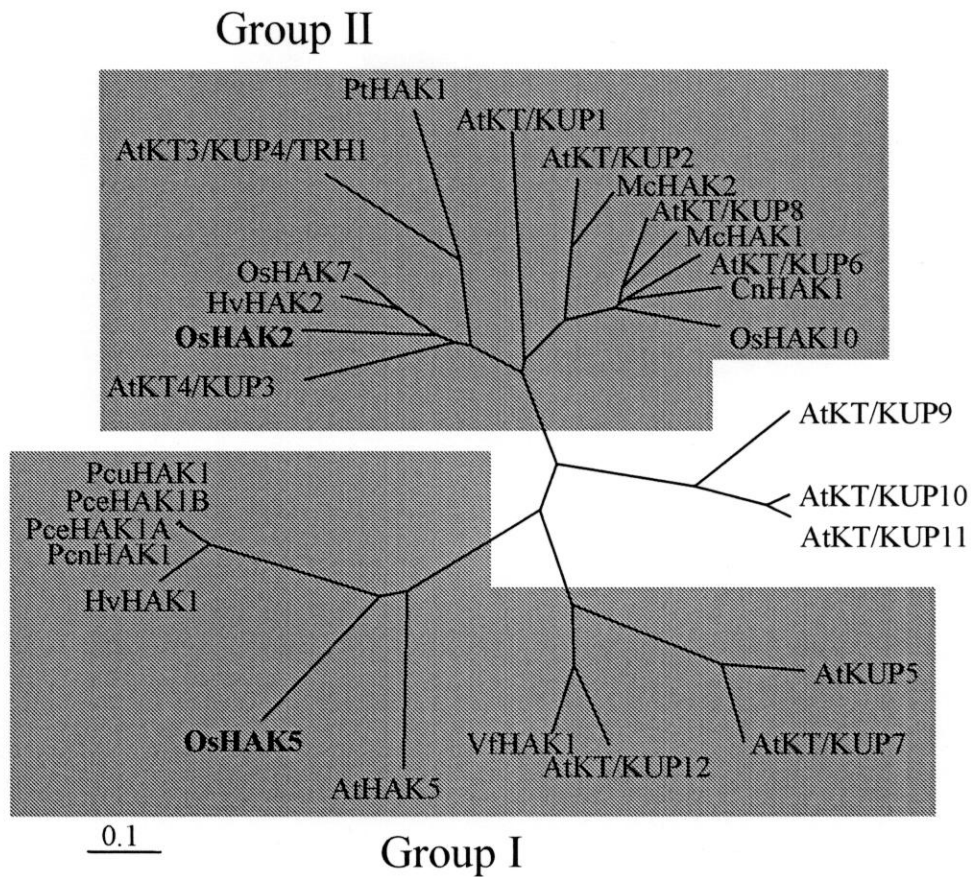
Asterisks indicate conserved amino acid residues.

イネ、日本晴れ、から取得した OsHAK2, 4, 5 の塩基配列から予測されるアミノ酸配列。OsHAK 4は5'末端が不完全である。OsHAK2とOsHAK5の相同性は38%であり、機能がある程度異なることも予想される。



**Fig. 2. Hydropathy plot of OsHAK2 and OsHAK5 (Kyte and Doolittle, 1982).**  
Hydrophobic amino acid have positive values

OsHAK2とOsHAK5のハイドロパシープロットから、12回の膜貫通領域があると推定され、典型的な膜タンパク質であると思われる。これはイオン透過性機能に必須の要件である。

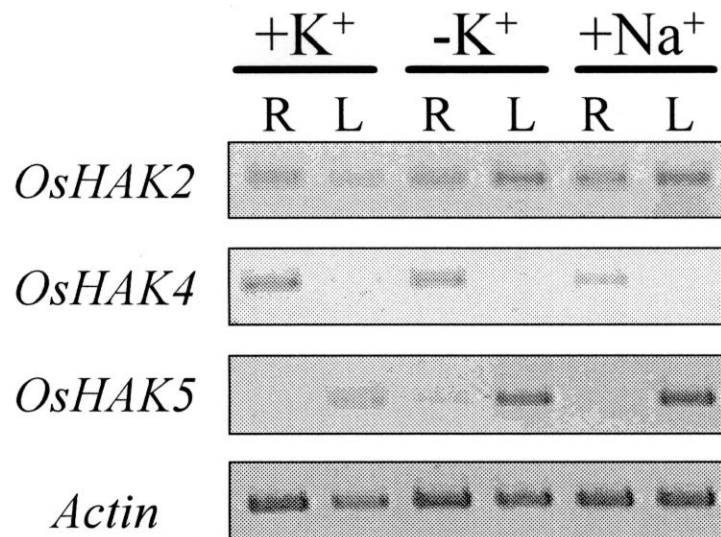


**Fig. 3. Phylogenetic tree of plant HAK/KT/KUP transporters. Only full-length cDNAs were used.**

Programs used were ClustalX (Thompson et al., 1997) for alignments and Treeview (Page, 1996) for graphical output.

HAK タンパク質は大きく2つのグループに分けられる。今回単離した OsHAK2 はグループ II に、OsHAK5 はグループ I に分類され、それぞれの機能の比較検討は重要課題である。

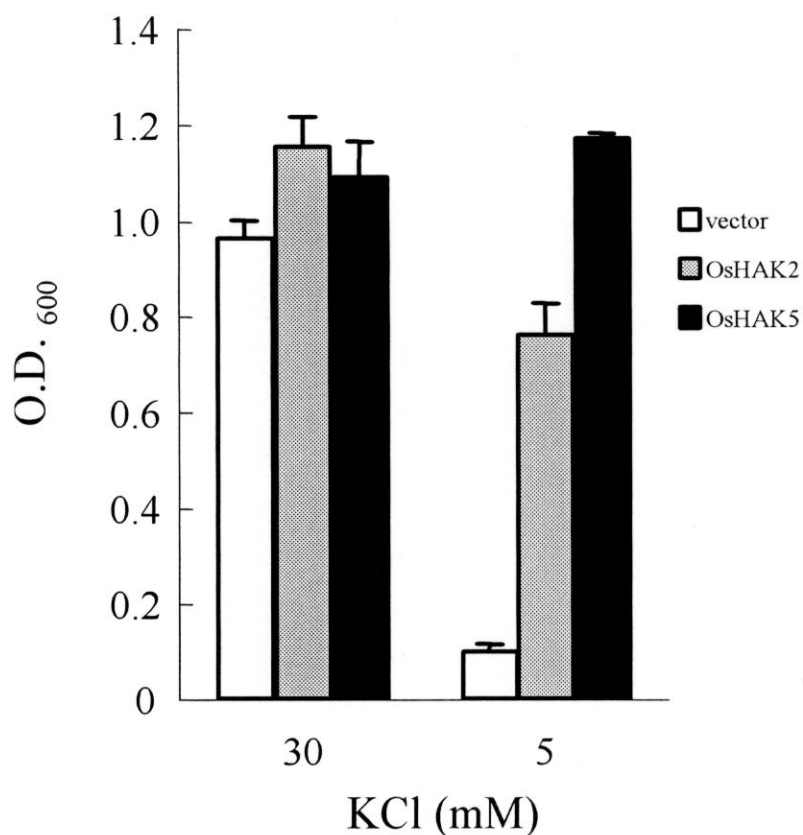




**Fig. 4. Effects of NaCl treatment and K<sup>+</sup> starvation on the organ-specific expression of *OsHAK* genes.**

Quantification of transcripts amounts by RT-PCR. Template cDNAs were obtained from roots (R) and leaves (L) of 10-d-old plants adapted to nutrition solutions of control (+K<sup>+</sup>), 0 mM K<sup>+</sup> (-K<sup>+</sup>) and 100 mM NaCl (+Na<sup>+</sup>) for 24 h. Transcripts were amplified in the linear range of amplification with 28 cycles for *OsHAKs* and 23 cycles for actin. Actin was amplified as a loading control.

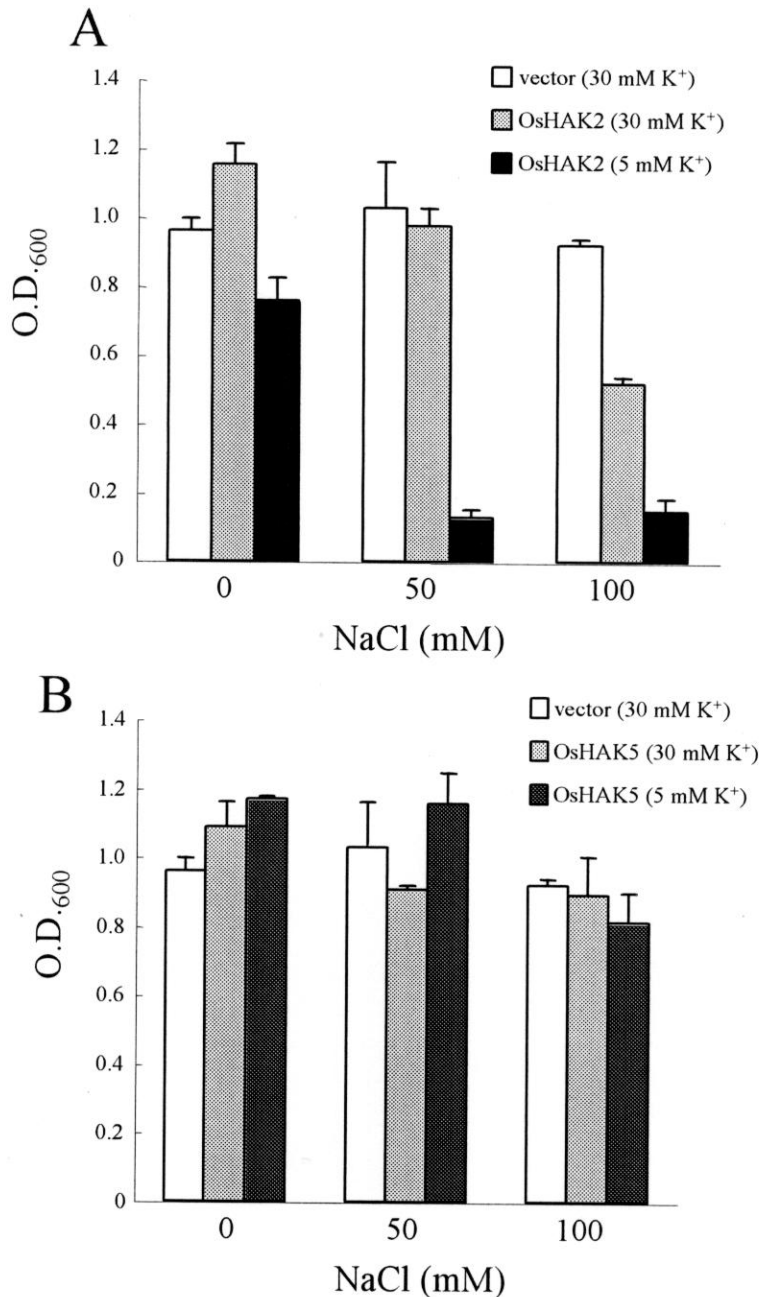
*OsHAK2, OsHAK4, OsHAK5* について、RT-PCR により発現解析を行った。それぞれの遺伝子に器官特異性やイオン誘導性が見られ、イオン輸送活性との関連が示唆された。



**Fig. 5. Complementation of the K<sup>+</sup>-uptake-deficient *E. coli* by *OsHAK2* and *OsHAK5*.**

The *E. coli* LB2003 mutant is defective in K<sup>+</sup> uptake and was transformed with plasmids containing *OsHAK5*, *OsHAK2* or empty vector. Growth of cells expressing *OsHAK2*, *OsHAK5* and empty vector in synthetic medium containing 30 mM K<sup>+</sup> and 5 mM K<sup>+</sup>. Saturated overnight cultures were washed and added to synthetic medium to a starting density of O.D.<sub>600</sub> = 0.05. Optical density was measured 8 h later.

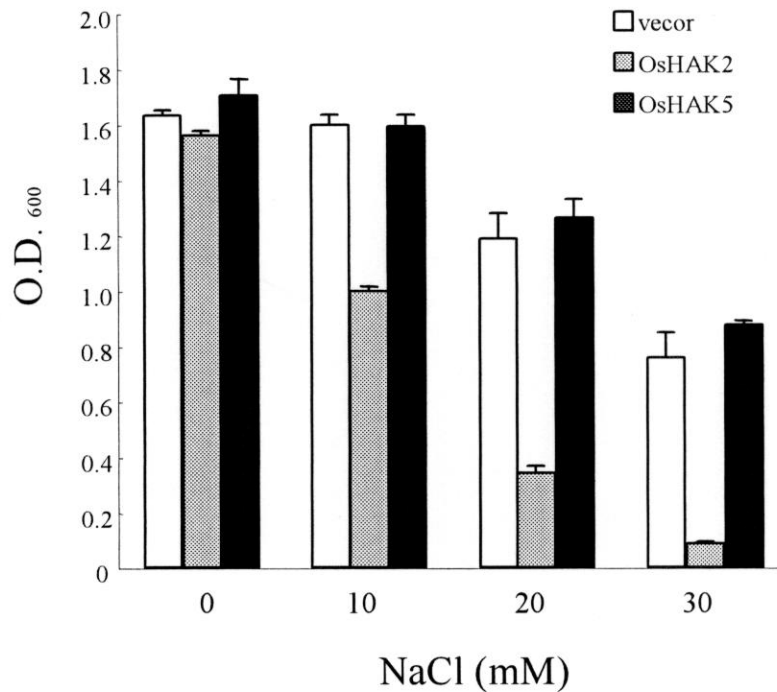
K<sup>+</sup>輸送体欠損大腸菌(LB2003 株)を宿主として、相補性試験による *OsHAK2* と *OsHAK5* の K<sup>+</sup>輸送能検定を行った。ベクターコントロールでは生育できない 5 mM KCl の条件において *OsHAK2* および *OsHAK5* 導入株は生育したことから、*OsHAK2* と *OsHAK5* は K<sup>+</sup>輸送活性を有することが示唆された。



**Fig. 6. Effect of NaCl on complementation of LB2003 cells by *OsHAK2* and *OsHAK5*.**

A and B, Growth of LB2003 cells expressing *OsHAK2* (A), *OsHAK5* (B) or empty vector in synthetic medium containing indicated concentrations of K<sup>+</sup> and NaCl. Saturated overnight cultures were washed and added to synthetic medium to a starting density of O.D.<sub>600</sub> = 0.05. Optical density was measured 8 h later.

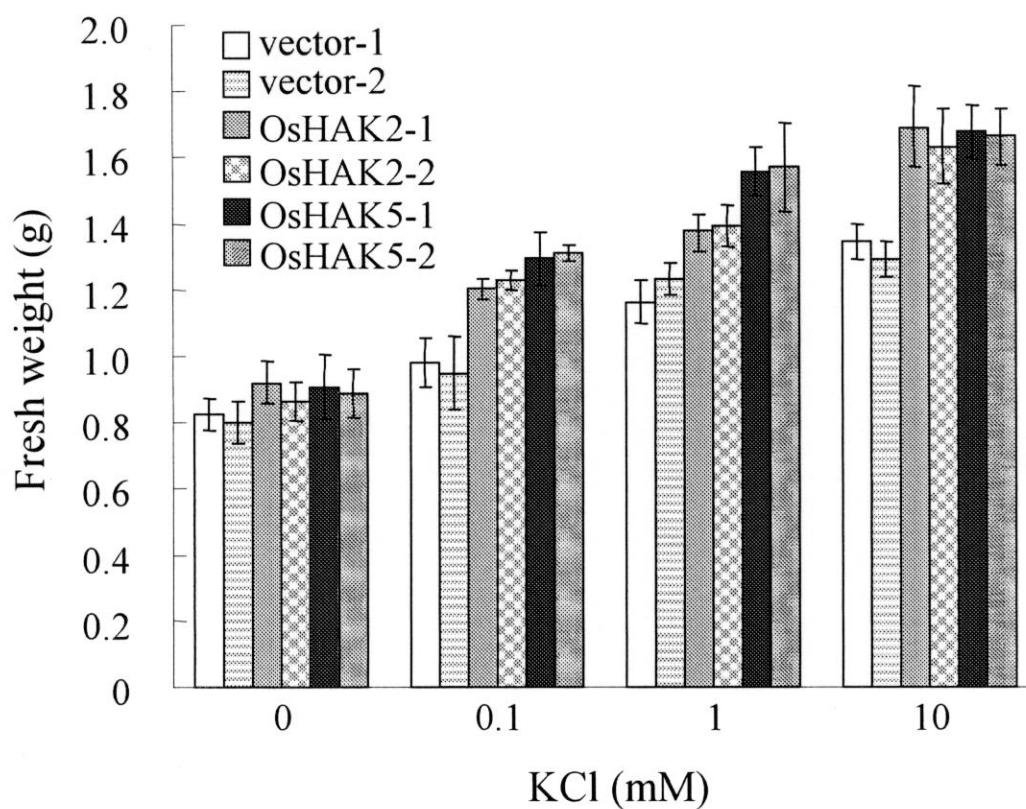
K<sup>+</sup>輸送体欠損大腸菌(LB2003 株)を宿主として、NaCl 添加による K<sup>+</sup>輸送能の阻害実験を行った。*OsHAK5* 導入株は NaCl 添加による生育の遅延が認められないことから、*OsHAK5* の K<sup>+</sup>輸送能は Na<sup>+</sup>による阻害を受けないことが示唆された(B)。一方、*OsHAK2* 導入株は 50 mM の NaCl 添加による生育の遅延が認められたことから、*OsHAK2* の K<sup>+</sup>輸送能は Na<sup>+</sup>による阻害を受けることが示唆された (A)。



**Fig. 7. Growth inhibition of salt sensitive *E. coli* by *OsHAK2* and *OsHAK5*.**

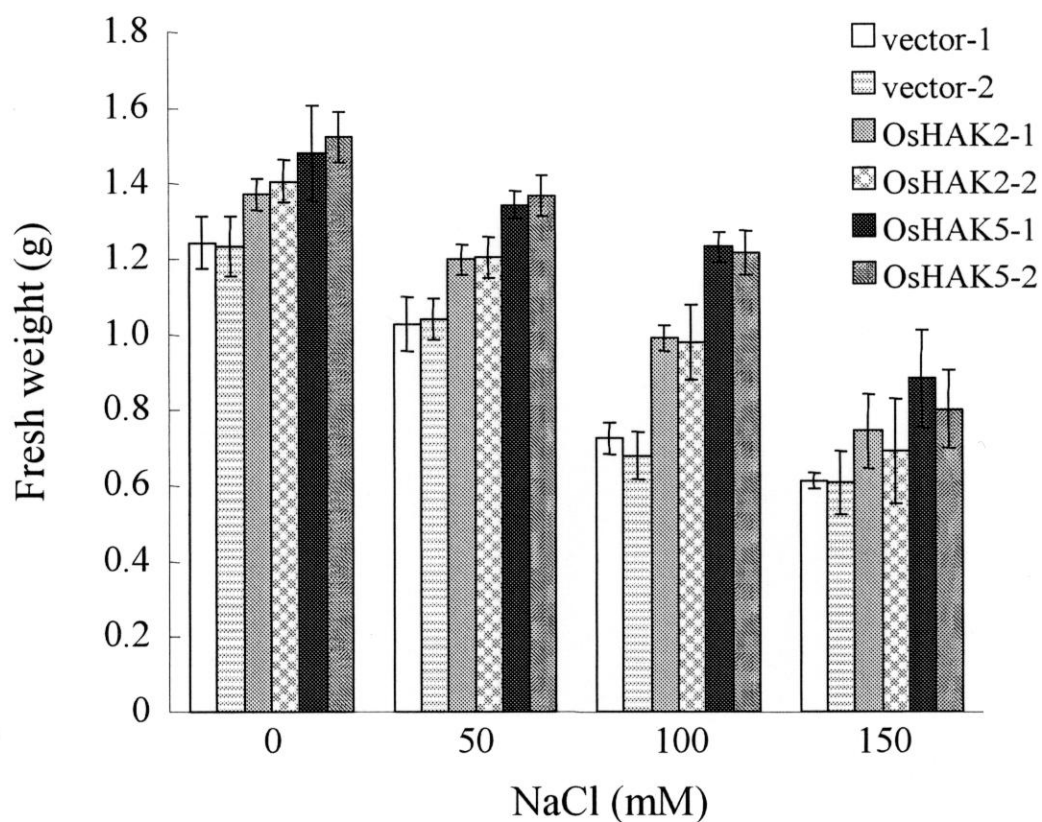
The *E. coli* KNabc is a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter-deficient mutant and was transformed with plasmids containing *OsHAK2*, *OsHAK5* or empty vector. Growth inhibition of KNabc cells expressing *OsHAK2*, *OsHAK5* and empty vector in liquid medium containing indicated concentrations of NaCl. Saturated overnight cultures were added to liquid medium to a starting density of O.D.600 = 0.05. Optical density was measured 8 h later.

Na<sup>+</sup>排出ポンプ欠損大腸菌(KNabc 株)を宿主として、生育を指標とした Na<sup>+</sup>輸送能の検定を行った。*OsHAK5* 導入株は、ベクターコントロールと比べて生育に有意な差はないことから、*OsHAK5* は Na<sup>+</sup>輸送能を有していないことが示唆された。一方、*OsHAK2* 導入株は NaCl 添加による生育の遅延が認められたことから、*OsHAK2* は Na<sup>+</sup>輸送能を有することが示唆された。



**Fig. 8. Growth of transgenic tobacco BY2 cells expressing *OsHAK* genes on the media with various KCl concentrations.**

*OsHAK2* および *OsHAK5* cDNA をタバコ培養細胞 BY2 にそれぞれ導入し、植物細胞における *OsHAK* タンパク質の機能検定を行った。*OsHAK2* および *OsHAK5* 導入株は 0.1 mM  $K^+$  濃度の培地においてベクターコントロールより良好な生育を示したことから、*OsHAK2* および *OsHAK5* は BY2 細胞において高親和性の  $K^+$  輸送活性を有することが分かった。



**Fig. 9. Salt-stress tolerance of transgenic tobacco BY2 cells expressing *OsHAK* genes.**

*OsHAK2* および *OsHAK5* 導入 BY2 の耐塩性を検定した。*OsHAK2* および *OsHAK5* 導入株は、NaCl 添加培地においてベクターコントロールより良好な生育を示したことから、*OsHAK2* および *OsHAK5* は BY2 細胞に耐塩性を付与することが示された。

### 1. 2. 2 酵母の塩抵抗性制御遺伝子 *HAL3* のタバコホモログ遺伝子の機能解析

酵母の塩ストレス下における $\text{Na}^+$ 排出は、主に $\text{Na}^+$ 排出ポンプ(ATPase)であるEna1により行われており、その遺伝子(*ENA1*)の発現は2種の脱リン酸化酵素、PP2B、Ppz1、によってそれぞれ正と負に制御されている。さらに、Hal3タンパク質はPpz1を負に制御している。したがって、*HAL3*遺伝子の高発現は*ENA1*遺伝子の発現を促し、結果的に耐塩性を向上させる。植物では $\text{Na}^+$ 排出ポンプの存在は不明であるが、シロイヌナズナのゲノムデータベースに*HAL3*ホモログ遺伝子の部分配列が見出された。そこで本研究では、タバコから*HAL3*ホモログ遺伝子(*NtHAL3*)を単離し、その塩ストレス抵抗性に関する機能の解明を目的とした。

*AtHAL3*の部分配列をプローブに用いたスクリーニングの結果、タバコから3種のホモログ遺伝子(*NtHAL3a,b,c*)を単離した。ノザン解析及びRT-PCR解析より、3種の*NtHAL3*遺伝子は根、茎、葉、茎頂、花器官およびストレス( $\text{NaCl}$ ,  $\text{K}^+$ )の有無に関わらず構成的に発現していた。酵母の*hal3*欠失変異株を作製し、相補性試験を行った結果、Li( $\text{Na}^+$ のアナログ)感受性を弱く相補し、*NtHAL3*タンパク質が耐塩性に関与することが示唆されたため、3種の*NtHAL3*の全長cDNAをカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流に連結し、タバコ培養細胞(BY2)に導入した。*NtHAL3a*高発現BY2は $\text{NaCl}$ 、LiClおよびソルビトール(浸透圧ストレス)ストレスに対する抵抗性が向上し、一方、*NtHAL3c*高発現BY2は $\text{NaCl}$ およびソルビトールストレスに対する抵抗性のみが向上した。*NtHAL3b*高発現BY2は得られなかった。*NtHAL3a*および*NtHAL3c*の高発現BY2細胞内の陽イオン( $\text{Na}^+$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{K}^+$ )含量は野生型細胞と大差なかった。次にアミノ酸含量の測定の結果、*NtHAL3a*高発現BY2ではプロリンの割合が対照細胞よりも約4倍高かった。

これまでに、*AtHAL3a*タンパク質が補酵素A合成系のFPC-DC活性を有することが報告された。そこで、大腸菌のFPC-DC遺伝子(*dfp*)の温度感受性変異を用いて相補性試験を行ったところ、*NtHAL3a,b,c*全てが*dfp*変異を相補した。以上の結果から、*NtHAL3a*の高発現によって上昇したFPC-DC活性が補酵素A合成を増加させ、さらに、その下流にあるプロリン等のアミノ酸量が増加したという作用モデルが考えられた。しかし、プロリンを含むアミノ酸の蓄積量では、*NtHAL3a*および*NtHAL3c*高発現BY2で見られた浸透圧ストレスに対する耐性を説明するのは難しい。一方、*NtHAL3a*および*NtHAL3c*高発現BY2の細胞内浸透圧は対照細胞の約1.5倍であり、*NtHAL3a*および*NtHAL3c*高発現細胞中では未同定の浸透圧調節物質が蓄積していることが示唆された。つまり、*NtHAL3a*および*NtHAL3c*高発現により細胞内の浸透圧が高くなることが高浸透圧ストレス耐性の向上に寄与したと判断される。以上の結果から、*NtHAL3a*は $\text{NaCl}$ 、LiCl(≒ $\text{Na}^+$ 毒性)およびソルビトール(高浸透圧ストレス)に対して耐性を付

与する、耐塩性植物の分子育種に役立つ遺伝子であると結論した。そこで、NtHAL3a 高蓄積形質転換タバコ植物体を作製したところ、100 mM NaCl ストレスに対する耐性の向上が認められた。

本研究内容の詳細は、Yonamine, I., Yoshida, K., Kido, K., Nakagawa, A., Nakayama, H., and Shinmyo, A. (2004). Overexpression of NtHAL3 genes confers increased levels of proline biosynthesis and the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cells. *J Exp Bot* 55, 387-395、に記載されているので、その内容を以下に添付する。