

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻
平成 13 年度博士課程 進学
氏 名 高橋 竜一
指導教員名 高野 哲夫

論文題目 ヨシのイオン輸送体と耐塩性機構に関する研究

現在地球上では不適切な灌漑による塩類集積や家畜の過放牧、干ばつなどによって、急速な農地の劣化（沙漠化）が進んでいる。その一方で世界の人口は増加の一途をたどっており、今後も食糧生産の維持、さらには生産量の増加が求められている。したがって不良環境地域でも生育可能な作物の作出は急務となっており、そのためにも植物の耐塩性機構を明らかにすることが重要である。

ヨシ (*Phragmites australis* Trinius) は日本では主として河川や湖沼の沿岸のような淡水湿地に自生している野生植物であるが、海岸や河口などの汽水域でも生育し、海外では半乾燥塩類集積地などの様々な環境条件において分布が認められている。塩類集積地に自生しているヨシは強い耐塩性を示すのに対して、河川敷に自生しているヨシは塩感受性であり、同じ種でありながら耐塩性に大きな違いがあることが調べられている。またヨシは塩類集積地に自生しているものの、塩生植物ではなく中生植物に分類されており、特定の器官を発達させたり、適合溶質を蓄積して細胞内浸透圧を調節するのではなく、ナトリウムを植物体内に浸入させないことで耐塩性を示していると考えられている。

そのため耐塩性のヨシを塩感受性のヨシと比較することは中生植物の耐塩性機構を明らかにする上で有効であると考え、中国の半乾燥塩類集積地（南皮、塩池）および日本の鬼怒川河川敷（宇都宮）から採集したヨシを用いて以下の実験を行った。

1, 耐塩性のヨシと塩感受性のヨシのイオン含量

各地域から採集したヨシの耐塩性には明らかな差があり、水耕栽培では南皮のヨシは 150mM の NaCl 存在下でも生育阻害を示さなかったのに対して、宇都宮のヨシは 150mM の NaCl 存在下では 3 日で枯死し、50mM の NaCl 存在下でも 10 日間のストレス処理後には明らかな生育阻害が観察された。

各地域のヨシを NaCl ストレス条件下で生育させ、1、3、5、10 日後の植物体内のイオン含量を調べたところ、カリウム含量は宇都宮のヨシではすべての器官でコントロールよりも低下していたのに対し、南皮のヨシでは根、地下茎、稈でコントロールよりも増加しており、葉でもコントロールとほぼ同じ値を示した。

ナトリウム含量は宇都宮のヨシの地上部で劇的に増加しており、葉では 10 日後にはコントロールの 4 倍以上にまで増加していた。一方南皮のヨシでは根でのみ増加が認められ、地上部では 5 日目まではナトリウム含量が増加していたが、10 日後にはコントロールと同程度となった。

ストレス解除後の水耕液中のナトリウム含量を測定し、ヨシの根からのナトリウムの排出量を調べたところ、宇都宮のヨシではわずかに検出されたのに対して南皮のヨシではストレス解除直後から増加し、72 時間後には宇都宮の約 5 倍の値を示した。

以上の結果から、耐塩性のヨシには塩ストレス条件下でも効果的にカリウムを吸収する機能があるほか、ナトリウムが浸入しても地上部への輸送をブロックするか、地上部に輸送されたナトリウムを根に送り返し、根から排出する機構が備わっていることが考えられた。

2, HAK トランスポーターの機能解析

植物にはチャネルやトランスポーターなどのさまざまなカリウム吸収機構が存在しているが、これらのカリウム吸収経路がナトリウムの流入経路の一つとして考えられている。ナトリウムストレス条件下では主に High-affinity 型のカリウムトランスポーターがカリウム吸収の機能を果たしていると考えられていることから、トランスポーターの Na^+ に対する K^+ の選択性の高さが植物体内での K^+ - Na^+ バランスを決定する上でも重要な役割を果たしていると考えられた。そこで様々な生物種に広く存在する HAK タイプのカリウムトランスポーター (High Affinity K^+ Transporter) 遺伝子を各地域のヨ

シから単離し、各トランスポーターの機能の差と耐塩性との関連について調べた。

HAK は植物ゲノムに多コピー存在していることが確認されており、ヨシでも 6~7 コピー存在していると考えられている。本研究では 4 種類の *HAK* 遺伝子 (*PhaHAK2*、*PhaHAK3*、*PhaHAK4*、*PhaHAK5*) を単離した。このうち *PhaHAK2*、*PhaHAK3*、*PhaHAK4* は三地域のヨシから単離できたが、*PhaHAK5* は宇都宮のヨシからのみ単離できた。植物体における *PhaHAK5* の発現を調べたところ、根、地上部ともに宇都宮のヨシでのみ認められ、耐塩性のヨシではいずれの条件においても遺伝子発現が認められなかった。

カリウムトランスポーターおよびナトリウムポンプを欠失した酵母で *PhaHAK* を発現させて機能を比較したところ、宇都宮のヨシから単離した遺伝子 (*PhaHAK2-u*、*PhaHAK3-u*、*PhaHAK5-u*) を導入した酵母ではナトリウム存在下でカリウム吸収量が減少し、ナトリウム吸収量も多かった。そのため、ナトリウム存在下ではいずれも K^+/Na^+ 比が大幅に減少し、100mM の条件下ではコントロールとほぼ同程度の値を示した。一方耐塩性のヨシから単離した *PhaHAK2-n* や *PhaHAK3-e* を導入した酵母ではカリウム吸収量はほとんど減少せず高い値を維持しており、ナトリウム吸収量も *PhaHAK2-u* や *PhaHAK3-u* を導入した酵母と比べて少なかったため、 K^+/Na^+ 比は *PhaHAK2-u* 発現株や *PhaHAK3-u* 発現株よりも高い値を示した。

以上の結果から、耐塩性のヨシではナトリウム存在下でも選択性の高いトランスポーターを介してカリウム吸収を維持しているのに対し、宇都宮のヨシではカリウム吸収が阻害され、*HAK* がナトリウムの流入経路として働いてしまうため、細胞内の K^+ - Na^+ バランスが崩れ、塩感受性の要因の一つとなっていると考えられた。

3. HKT トランスポーターの機能解析

植物には *HAK* とは異なるカリウムトランスポーター *HKT* (High-affinity K⁺ Transporter) が存在している。

各地域のヨシから *HKT* 遺伝子を単離したところ、南皮 (*PhaHKT1-n*) と塩池 (*PhaHKT1-e*) は他の植物の *HKT* と高い相同性を示したが、宇都宮 (*PhaHKT1-u*) は 3'末端側に 2 カ所、ゲノムのイントロンに相当するインサクションが存在しており、終止コドンが生じていたため、他の *HKT* よりも 141 アミノ酸短いタンパクをコードすることが予想された。

酵母を用いて機能解析を行ったところ、*PhaHKT1-u* 発現株はカリウム吸収を示さず、ナトリウム存在下では生育できなかった。*PhaHKT1-u* の 3'領域を *PhaHKT1-n* と組み替えたキメラ DNA を作製して同様に機能解析を行ったところ、酵母の耐塩性は部分的に回復し、カリウム吸収も認められたことから、*PhaHKT1-u* で欠失していると推測さ

れる部位は *PhaHKT1* のイオン吸収において重要な役割を果たしていることが考えられた。

近年 *Arabidopsis* の *AtHKT1* を使った研究の結果から、*HKT* はナトリウムを導管からくみ出し、篩管を通して地下部に再転流する、または根から地上部へのナトリウムの転流を制御する役割を果たしていることが示唆されている。宇都宮のヨシのゲノムには *HKT* が 1 コピー存在すると考えられることから、宇都宮のヨシでは *PhaHKT1* の機能が欠失しているために植物体内に浸入したナトリウムの移動を制御することができず、植物体内の K^+ - Na^+ バランスが崩れた可能性がある。

4. ヨシの耐塩性とナトリウムの排出

細胞質内のナトリウム含量を低く保つためには、細胞内にナトリウムを浸入させないのと同時に、一度浸入したナトリウムを排出することも有効である。植物においては、細胞からのナトリウム排出に関与している遺伝子として細胞膜型の Na^+/H^+ アンチポーター (*NHA*; Na^+/H^+ Antiporter) があげられている。そこで、ヨシから細胞膜型の Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子 (*PhaNHA1*) を単離し、その機能を比較した。

PhaNHA1 の発現量は、根、地上部ともにナトリウムストレス条件下では宇都宮のヨシと耐塩性のヨシで同程度検出され、違いは認められなかった。しかし細胞膜型および液胞膜型の Na^+/H^+ アンチポーターおよびナトリウムポンプを欠失した酵母に *PhaNHA1* を導入して機能を調べたところ、25mM、100mM の NaCl 存在下では南皮の *PhaNHA1-n* 発現株は宇都宮の *PhaNHA1-u* 発現株と比較してそれぞれ 42.7%、36.0% のナトリウムを含み、より多くのナトリウムを排出していると考えられた。

以上のことから、耐塩性のヨシにはより高いナトリウム排出機能をもったアンチポーターが存在し、細胞に浸入したナトリウムを排出していることが考えられた。

本研究で解析した遺伝子のうち、大部分は耐塩性、塩感受性のヨシに共通して存在していたが、両者で数アミノ酸の変異が認められ、それがイオンの選択性の変化につながったと考えられる。また塩感受性のヨシではトランスポーター機能を欠失した *PhaHKT1* や、ナトリウムの流入経路として働いている可能性のある *PhaHAK5* のように、特徴的なトランスポーターをコードする遺伝子も見出された。

以上のように、本研究では耐塩性と塩感受性のヨシの NaCl ストレス条件下での体内イオン含量の違いをもとに、カリウム吸収やナトリウムの移動、排出に関連することが示唆されているいくつかの遺伝子の機能比較を行うことで、ヨシの耐塩性機構への関与を明らかにしたものである。