

別紙 1

【論文内容の要旨】

申請者氏名 堀 江 智 明

【研究題目】 イネの K^+ , Na^+ 輸送における *HKT* 遺伝子の機能解析

【要 旨】

高塩濃度環境は、多くの植物の生育や作物の生産性に重大な影響を及ぼす。塩ストレスは浸透圧ストレスと Na^+ イオン毒性に大別できる。耐塩性植物の分子育種の研究は前者に集中しており、植物細胞内への Na^+ の流入の分子機構の解析は少ない。本論文では、細胞内の K^+/Na^+ イオン恒常性に重要な役割を果たしているコムギの高親和性 K^+/Na^+ シンporterである *TaHKT1* 遺伝子のホモログをイネから単離し、機能を解析した。

1) *TaHKT1* 遺伝子と相同性を示す cDNA を、イネの通常品種、日本晴から 1 種類 (Ni-*OsHKT1*)、耐塩性品種、ポッカリから 2 種類 (Po-*OsHKT1*, Po-*OsHKT2*) 単離した。両品種ともこれ以外の *HKT* 遺伝子はないと思われた。3 遺伝子はいずれも 530 アミノ酸残基をコードしており、両品種由来の *OsHKT1* タンパク質の推定アミノ酸配列は 100% 一致した。*OsHKT1* と *OsHKT2* のアミノ酸配列の相同性 91% であった。いずれも疎水プロットは類似しており膜タンパク質である可能性が強く示唆された。

2) *OsHKT1* と *OsHKT2* 遺伝子の発現は両品種の根において、低 K^+ イオン濃度で誘導され、30 mM の K^+ または Na^+ イオンにより抑制された。根における *in situ* ハイブリダイゼーションにより、*OsHKT* は表皮細胞および中心柱で発現していた。

3) 酵母の K^+ 輸送体欠損株の低 K^+ 培地における増殖を、*OsHKT2* 遺伝子は相補したが、*OsHKT1* は相補できなかった。一方、塩感受性酵母を用いた生育阻害試験の結果、両 *OsHKT* 遺伝子発現株は、 Na^+ に対する感受性が高まり、両 *OsHKT* タンパク質が低親和性 Na^+ 輸送能を持つことが示唆された。

4) アフリカツメガエル卵細胞を用いた電圧固定実験により、*OsHKT1* は Na^+ 特異的輸送体、*OsHKT2* は K^+/Na^+ 共輸送体であることが分かった。

5) *OsHKT1* と *OsHKT2* では N 末端から 88 番目のアミノ酸残基がそれぞれ Ser と Gly であった。部位特異的変異によりこれらを入れ替えると両タンパク質のイオン輸送特性が逆転した。さらに S88G *OsHKT1* 遺伝子を発現する酵母は耐塩性が向上し、*OsHKT1* の低親和性 Na^+ 輸送活性が著しく減少した結果であると推定された。

6) 両 *OsHKT* の N 末端から 363 番目の Asn を Ser に置換すると酵母の K^+ 輸送活性には影響せず、 Na^+ 輸送活性を減少させた。G88S, N363S *OsHKT1* 二重変異遺伝子を導入した酵母は海水の塩濃度より高い 600mM NaCl で増殖が可能になった。

以上、耐塩性イネのポッカリから得られた 2 種類の K^+/Na^+ 輸送体遺伝子の構造と機能を違いを明らかにし、植物の耐塩性向上に大きく寄与する可能性が高い変異体の作成に成功した。

【論文審査結果の要旨】

進行しつつある塩土の緑化や、限界に達している水資源問題の解決するために豊富にある海水を灌漑用水に利用するには、植物に塩ストレス耐性を付与することが最低限必要である。塩ストレスは浸透圧ストレスと Na^+ イオン毒性に大別され、耐塩性植物の分子育種には両者に耐性を与えなければならないが、現在の研究は前者に集中している。本論文では、細胞の Na^+ イオン毒性を緩和するのに重要な、細胞内の K^+/Na^+ イオン恒常性に役割を果たしている K^+/Na^+ シンポーター遺伝子をイネから単離し、機能の解析と機能の改変について述べている。

1) コムギの K^+/Na^+ シンポーター遺伝子、*TaHKT1* と同源性を示す cDNA を、イネの通常品種、日本晴から 1 種類 (Ni-*OsHKT1*)、耐塩性品種、ポッカリから 2 種類 (Po-*OsHKT1*, Po-*OsHKT2*) 単離している。3 遺伝子はいずれも 530 アミノ酸残基から成るタンパク質をコードしており、両品種由来の *OsHKT1* タンパク質の推定アミノ酸配列は同じであり、ポッカリには *OsHKT1* に加えて *OsHKT2* が存在することを明らかにしている。*OsHKT1*、*OsHKT2* 共に、膜タンパク質であると推定している。

2) *OsHKT1* と *OsHKT2* 遺伝子はイネの根において、低 K^+ イオン濃度で発現が誘導され、30 mM 以上の K^+ または Na^+ イオンにより抑制されること、*in situ* ハイブリダイゼーションにより、根の表皮細胞および中心柱で発現することを示している。

3) 低濃度の K^+ 培地では増殖できない酵母の K^+ 輸送体欠損株に、*OsHKT2* 遺伝子を導入すると増殖可能となるが、*OsHKT* 遺伝子の導入では増殖できなかった。このことから少なくとも、*OsHKT2* は高親和性 K^+ 輸送能を持つことを明らかにした。一方、 Na^+ イオン排出能を欠失した塩感受性酵母に、*OsHKT1* または *OsHKT2* 遺伝子を導入すると、いずれも高濃度の NaCl 培地での増殖が阻害されることから、両 *OsHKT* タンパク質が低親和性 Na^+ 輸送能を持つことを示唆している。

4) アフリカツメガエルの卵細胞に *in vitro* で転写させた *OsHKT1* または *OsHKT2* mRNA を導入しタンパク質を作らせ、電気生理学的解析を行った結果、*OsHKT1* は Na^+ 特異的輸送体であり、 K^+ を輸送しないこと、*OsHKT2* は K^+/Na^+ 共輸送体であると結論しているが、これは 3) の結果とも一致する。

5) N 末端から 88 番目のアミノ酸残基は *OsHKT1* では Ser、*OsHKT2* では Gly であり、これをを入れ替えた S88G*OsHKT1* は K^+ を輸送し、逆に G88S*OsHKT2* は K^+ を輸送できなくなり、両者の性質が逆転するという興味ある結果を得ている。

6) 両 *OsHKT* の N 末端から 363 番目の Asn を Ser に置換した遺伝子を導入したすると酵母では Na^+ 輸送活性が著しく減少すること、G88S, N363S *OsHKT1* 二重変異遺伝子は塩感受性酵母の増殖を 600mM NaCl でも可能になるという貴重な結果を得ている。

以上、本論文は、イネの 2 種類の K^+/Na^+ 輸送体遺伝子の構造と機能を違いを明らかにし、海水の塩濃度より高い 600mM NaCl でも生育可能な酵母を創成したことは、耐塩性植物の育種に大きく貢献する成果である。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）学位論文として価値あるものと認めた。