

研究紹介

タバコ培養細胞の 塩ストレス適応機構における 原形質膜カリウムチャンネルの役割

村田 芳行

(生物機能・遺伝資源開発学講座)

A Role of Plasma Membrane K⁺ Channels in Salt Adaptation of Tobacco Suspension Cells

Yoshiyuki Murata

(Department of Biological Function
and Genetic Resources Science)

The fluorescent probe method was applied to determine the membrane potential of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow) cells that were either unadapted (NaCl-unadapted cells) or adapted to 50 mM NaCl (Na50-adapted cells). There were no differences in the behavior of the membrane potential between the NaCl-unadapted cells and the Na50-adapted cells.

The patch-clamp technique was used to study and compare the characteristics of cation channels in the plasma membrane of NaCl-unadapted cells, Na50-adapted and Na100-adapted cells. The steady-state amplitude of the outward whole-cell currents decreased in the following order: NaCl-unadapted cells > Na50-adapted cells > Na100-adapted cells. There were no significant differences between the NaCl-unadapted cells and the Na50-adapted cells in terms of the K⁺/Na⁺ selectivity of these channels. These observations suggest that adaptation to salinity results in reduced permeability of the K⁺ channels to both K⁺ and Na⁺.

The effects of Ca²⁺ on the properties of the

K⁺ channels in the plasma membrane were investigated using the patch-clamp technique. The outward rectifying whole-cell currents were reduced with increasing extracellular Ca²⁺ and were independent of intracellular Ca²⁺. The K⁺/Na⁺ selectivity were independent of Ca²⁺ concentration. These observations suggest that extracellular Ca²⁺ is an important factor in the regulation of ion permeability.

The characteristics of Ca²⁺ binding on the plasma membrane were investigated by the micro-electrophoresis technique. Comparison of the amount of Ca²⁺ bound in the presence of 30 mM NaCl with that in the presence of 30 mM KCl indicated that Na⁺ reduced the amount of Ca²⁺ bound to the plasma membrane of the NaCl-unadapted cells, but did not reduce the amount of Ca²⁺ bound to the plasma membrane of the Na50-adapted cells. These results suggest that adaptation to salt stress results in increased resistance to the displacement of membrane-associated Ca²⁺ by Na⁺.

Key words : ion channel, salt stress, patch clamp, calcium, *Nicotiana tabacum*

はじめに

一般に、高等植物は塩に弱く、土壌の塩の集積によって生育が困難になり、枯死に至る。しかし、塩に強い、あるいは、塩を好む高等植物も存在している。これらの植物の耐塩性あるいは塩ストレス適応機構の解明は、塩ストレス適応植物または耐塩性植物の作出のための基礎的知見を与える。

高等植物にとって塩ストレスは、ナトリウムによる代謝阻害を意味する《イオンストレス》と、水分の吸収に関わる《浸透圧ストレス》とに大別される。これまでの研究によって、塩ストレスの主たる原因は、《イオンストレス》であることが知られるようになった。また、塩生植物も含め高等植物は塩に強い酵素を持たないため、細胞質中の高いカリウムイオ

Received October 4, 1994

ンとナトリウムイオンとの比(K^+/Na^+)の維持が塩ストレス適応機構および耐塩性機構に深く関わっていることも明らかにされつつある。しかし、細胞質中の高 K^+/Na^+ 比の維持についての機構、とりわけ、 K^+ や Na^+ の主な流入の経路と考えられる原形質膜のイオンチャンネルの役割については、ほとんど明らかにされていない。また、塩ストレスの初期の段階で Na^+ によって原形質膜表面の Ca^{2+} が置換されることや細胞外の Ca^{2+} の減少によって K^+ の流出が起きること、細胞外の Ca^{2+} によって塩ストレスが軽減されることなど、 Ca^{2+} が塩ストレスの初期の段階で重要な働きをしていることが示唆されている。しかし、その Ca^{2+} の制御機構についても、詳細は明らかにされていない。

本研究では、高等植物の細胞レベルでの研究に適しているタバコ培養細胞(BY-2)を材料として、また、電気生理学的手法(パッチクランプ法、細胞電気泳動法、本研究で確立した蛍光プローブによる定量的膜電位測定法)を用いて、高等植物の塩ストレス適応機構における原形質膜の K^+ チャンネルの役割の解明、塩ストレス適応機構における細胞内外および表面の Ca^{2+} の役割の解明を行なった。

I. 膜電位

1. シアニン蛍光色素プローブを用いた膜電位測定法¹⁾

膜電位は、高等植物においても膜のイオン輸送過程に関する重要な情報を与えるパラメーターの一つである。そこで、高等植物プロトプラスト系に適用可能な膜電位測定法として Hoffman らのシアニン色素(diS-C₃-(5))を用いる蛍光プローブ法に注目し、本法を定量的膜電位測定法として確立することを試みた。

本法は、比較的大きな蛍光応答を示すことから、これまでの種々の細胞系に適用されてきた。これらの適用例では、蛍光応答と膜電位変化との間に直線関係を仮定して、膜電位(変化)が評価されてきた。しかし、この仮定の妥当性の根拠については、理論的にも実験的にも何も与えられていない。そこで、Sims らによって示唆された本色素の膜電位応答機構に基づいて蛍光応答を膜電位と結びつける理論式を導出し、この理論式が成立するための前提条件および蛍光応答がこの理論式に従っているかどうかを実験的に検証する方法を明らかにした。ムラサキ培養

細胞(MA株)およびタバコ培養細胞のプロトプラストを用いてこの理論が成立していることを実験的に検証し、本法が定量的膜電位測定法として植物プロトプラスト系に適用可能であることを明らかにした。また、従来経験的に行なわれてきた測定に至適条件の設定にも明確な指針を与えた。

2. 塩ストレス適応および非適応細胞の膜電位

先に確立した蛍光色素(diS-C₃-(5))を用いた膜電位測定法を用いて、塩を含まないLS改変培地で継代培養した塩ストレスに適応していない細胞(非適応細胞)と50 mMのNaClを含んだLS改変培地で継代培養した塩ストレスに適応した細胞(Na50適応細胞)から酵素法によって単離したプロトプラストの膜電位変化を測定し、比較検討を行なった。細胞外のKCl濃度の変化に対して非適応細胞もNa50適応細胞も同様の膜電位の脱分極変化を示し、また、膜電位の脱分極変化の細胞外のNaCl濃度依存性においても両細胞間で有意な差がなかった。この結果より、タバコ培養細胞は、塩ストレス適応過程において原形質膜のイオン選択性に変化がない可能性が示唆された。

II. タバコ培養細胞原形質膜の K^+ チャンネル²⁻³⁾

高等植物の塩ストレスの原因と考えられる Na^+ の流入の経路と考えられる原形質膜の K^+ チャンネルの同定をパッチクランプ法を用いて行なった。このパッチクランプ法は、細胞全体の電氣的透過性および1つのチャンネルタンパクの挙動を測定する手法である。100 mM KCl シンメトリー条件下で、タバコ培養細胞(非適応細胞)の原形質膜をホールセルモードで脱分極側の電位に固定したとき、大きな外向き電流が流れ、過分極側の電位では、ほとんど電流が流れないという外向き整流性を持った電流が観測された。この外向きホールセル電流は、シグモイド型のタイムコースに従って活性化し、1秒以内に定常値に達した。

この外向きホールセル電流は、 K^+ チャンネルブロッカーであるテトラエチルアンモニウムイオン(TEA⁺)によって大部分阻害され、アニオンチャンネルブロッカーである Zn^{2+} によって一部阻害された。また、100 mM グルタミン酸カリウム(KGlu) シンメトリー条件下でのホールセル電流は、KCl シンメトリー条件下の電流値に近い値であった。さらに、100 mM CsCl シンメトリー条件下でホールセル電流は、KCl

シンメトリー条件下に比べ大きく減少し、TEA⁺添加後のKCl条件下のホールセル電流に近い値であった。また、ホールセル電流の逆転電位は、Cl⁻の平衡電位よりもK⁺の平衡電位に近い値であった。これらの結果より、ホールセル電流の大部分は、K⁺チャンネルを通るK⁺イオンによる電流であり、タバコ培養細胞の原形質膜は、Cl⁻に比べK⁺の選択性がかなり高いことが示された。

100 mM NaCl シンメトリー条件下で測定を行ない、Na⁺の透過性について調べた。この場合も外向きのホールセル電流は、KCl シンメトリー条件の場合と同様なシグモイド型のタイムコースに従って活性化するが、その定常電流値は、KCl シンメトリー条件下に比べてかなり小さくなった。また、この電流は、K⁺チャンネルブロッカーであるTEA⁺によって阻害されることが示された。これらの結果より、Na⁺イオンもまた、このK⁺チャンネルを介して外界と原形質内との間を移動し得ることが示された。

さらに、原形質膜のイオンチャンネルの挙動をアウトサイドアウトパッチで調べた。タバコ培養細胞には、100 mM KCl 及び K₂Glu シンメトリー条件下で電位に依存しない20 pS のコンダクタンスを持ち、TEA⁺で阻害され、脱分極方向で活性化するK⁺チャンネルが存在した。チャンネルの開頻度は脱分極方向で電位と共に増加し、過分極方向においてほとんど0になる電位依存性を示した。ホールセル電流の電位依存性は、チャンネルの開頻度とシングルチャンネルコンダクタンスとによって説明できることが示された。

III. 原形質膜イオンチャンネルの塩ストレス適応

1. イオン透過性²⁻⁴⁾

原形質膜イオンチャンネルは、塩ストレス環境における細胞内へのNa⁺の流入や細胞外へのK⁺の流出を抑制する上で重要な役割を果たしていると考えられる。塩ストレス適応細胞および非適応細胞の原形質膜のK⁺とNa⁺の透過性をホールセルパッチクランプ法を用いて測定し、比較検討を行なった。

Na50適応細胞は、非適応細胞に比べホールセル電流が減少し、また、Na50適応細胞に比べ、100 mM のNaClを含むLS 改変培地で継代培養した塩ストレス適応細胞 (Na100適応細胞) のホールセル電流は、さらに減少した。タバコ培養細胞は、塩ストレス適

応過程において原形質膜のイオン透過性を減少させ、その減少の程度は、塩ストレスレベルが高くなるに従って増加することが示された。この原形質膜のイオン透過性の減少は、塩ストレス環境下での原形質からのK⁺の流出を抑えることと、原形質へのNa⁺の流入を抑えることに有利に作用すると考えられる。特に、脱分極側の電位における著しいホールセル電流の減少は、脱分極後の再分極過程におけるK⁺の流出を抑えることにかなり有利に働いていると考えられる。

次に、原形質膜のイオン透過性についてシングルチャンネルレベルで調べた。原形質膜のK⁺チャンネルの開状態でのシングルチャンネルコンダクタンスについて、適応細胞と非適応細胞との間で有意な差は、認められなかった。塩ストレス適応の結果もたらされた原形質膜のK⁺とNa⁺の透過性の減少は、K⁺チャンネルの開頻度の減少、または、原形質膜のカリウムチャンネル数の減少によるものであることが示された。

2. イオン選択性^{2,4)}

塩ストレス適応機構において原形質内へのNa⁺の流入を減少させるためのもう一つの機構としてイオン (K⁺, Na⁺) 透過におけるNa⁺に対する原形質膜の選択性の減少が考えられる。そこで、原形質膜のイオン選択性についてパッチクランプ法によって調べた。ダブルパルス法を用いて求めた逆転電位からゴールドマン式を用いてK⁺に対するNa⁺の透過係数 (P) を算出し、適応細胞と非適応細胞で比較検討を行なった。その結果、非適応細胞、Na50適応細胞ともにほぼ同じ逆転電位、-69 mV が得られ、イオン選択性を表わす透過係数の比 (P_{Na^+}/P_{K^+}) に有意差がなかった。この結果は、塩ストレス適応過程においてタバコ培養細胞の原形質膜のイオン選択性に变化がないことを示しており、1-2の蛍光色素による膜電位測定の結果とも一致した。また、コムギの耐塩性種と非耐塩性種との間にも原形質膜のカチオンの選択性に差がないという報告もあり、原形質膜のイオン (K⁺, Na⁺) 選択性は、塩ストレス機構及び耐塩性機構において重要ではないことが示された。

IV. 原形質膜のイオン透過性および選択性に及ぼすCa²⁺イオンの効果

Ca²⁺イオンは、塩ストレスの軽減やK⁺の流出の抑制

などに深く関与していることがこれまでに示されている。ここでは、原形質膜の K^+ と Na^+ イオン透過性及び選択性に及ぼす Ca^{2+} の効果についてパッチクランプ法を用いて調べた。適応細胞および非適応細胞において原形質膜のイオン透過性は、細胞外 Ca^{2+} の濃度の増加(0.1~10.0 mM)に伴い減少したが、イオン選択性は変化しなかった。また、細胞内の Ca^{2+} の濃度の増加(0~4 μ M)は、原形質膜の透過性を変化させなかった。これらの結果より、細胞外の Ca^{2+} がタバコ培養細胞の原形質膜のイオン透過性の制御に大きく寄与しているが、イオン選択性には関与していないことが示された。また、この透過性の変化は、 K^+ チャンネルのコンダクタンスの変化ではなく、開頻度の変化によるものであることが明らかになった。

V. 原形質膜表面の Ca^{2+} イオンの結合挙動

原形質膜表面に結合した Ca^{2+} イオンは、塩ストレス適応機構において原形質膜の安定性や K^+ の透過性の制御など重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、原形質膜表面の Ca^{2+} の結合挙動について細胞電気泳動法を用いて調べた。細胞電気泳動法は、メディアウム中に懸濁した細胞(本研究ではプロトプラスト)に直流電場をかけ、細胞の泳動度を求める方法である。そして、この泳動度より細胞のゼータ電位を求め、さらに、表面電荷密度を求め、この表面電荷密度の変化量より Ca^{2+} の結合量を見積った。非適応細胞では、細胞外に Na^+ があると、 Ca^{2+} の結合量が減少するのに対し、 Na^{50} 適応細胞では、逆に結合量が増加した。このことより、原形質膜表面に結合した Ca^{2+} が塩ストレス適応機構に深く関与していることが示唆された。

おわりに

以上の結果をまとめると次のようになる。

1. 高等植物プロトプラスト系に適用可能な蛍光色素(diS-C₃-5)を用いた膜電位測定法を確立した。
2. タバコ培養細胞原形質膜の K^+ チャンネルを初めて同定し、塩ストレスにおける Na^+ の細胞内への流入が原形質膜の K^+ チャンネルを介して起きることを明らかにした。
3. タバコ培養細胞の塩ストレス適応過程において、原形質膜の K^+ と Na^+ の透過性は減少するが、 Na^+ に

対する K^+ の選択性は変化しないことを明らかにした。タバコ培養細胞は、原形質膜のカチオンの透過性を減少させることで、 K^+ の細胞外への流出と Na^+ の原形質内への流入を抑え、塩ストレスに適応していることを明らかにした。

4. 塩ストレス適応過程における原形質膜の透過性の減少は、 K^+ チャンネルのコンダクタンスの減少ではなく、開頻度の減少または K^+ チャンネル数の減少によるものであることを明らかにした。

5. 細胞外 Ca^{2+} が原形質膜のイオン透過性を減少させることと、この減少がチャンネルのコンダクタンスの減少ではなく、開頻度の減少によるものであることを明らかにした。また、塩ストレス適応細胞の原形質膜表面に結合した Ca^{2+} は、非適応細胞とは異なり、細胞外の Na^+ によって解離せず、逆にその結合量が増加することを明らかにした。細胞外(原形質膜上)の Ca^{2+} が塩ストレス適応機構において重要な因子になることを見いだした。

今後も、高等植物の耐塩性および塩ストレス適応機構について研究する予定であり、特に、4.の結果における開頻度とチャンネル数の問題、5.の結果における Ca^{2+} の制御機構の問題を解決したいと考えている。

文 献

- 1) Kakutani, T., R. Nonaka, Y. Murata, I. Obi and M. Senda: The fluorescent probe method using cyanine dye to determine the membrane potential in cells. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **28**, 221-223 (1992)
- 2) Murata, Y., I. Obi, M. Yoshihashi, T. Ikeda and T. Kakutani: Ion channels in the plasma membrane of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow) suspension cells adapted and unadapted to salt stress. XV International Botanical Congress 423, (1993) (Abstract)
- 3) Murata, Y., I. Obi, M. Yoshihashi, M. Noguchi and T. Kakutani: Reduced permeability to K^+ and Na^+ ions of K^+ channels in the plasma membrane of tobacco cells in suspension after adaptation to 50 mM NaCl. *Plant Cell Physiol.* **35**, 87-92 (1994)
- 4) Murata, Y., I. Obi, M. Yoshihashi, T. Ikeda and T. Kakutani: Salt adaptation of K^+ channels in the plasma membrane of tobacco cells in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* **35**, 637-644 (1994)