

*Mesembryanthemum crystallinum* (ice plant) に  
おけるカリウムチャンネルをコードする  
PCR産物のクローニング

且原真木・Hans J. BOHNERT\*

Cloning of PCR-Products Encoding Potassium Channel Proteins  
from *Mesembryanthemum crystallinum*

Maki KATSUHARA and Hans J. BOHNERT

Gene fragments of potassium channels were cloned from *Mesembryanthemum crystallinum* by using RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction). The two fragments were isolated independently and showed high similarity with each other. About 80% identity was found between the two fragments and potassium-channel genes of *Arabidopsis*. Southern hybridization indicated that the potassium channel gene may be a single copy gene or that a small gene family of potassium channels exists.

**Key words:** *Mesembryanthemum crystallinum*, Potassium channel,  
RT-PCR

緒 言

*Mesembryanthemum crystallinum* は耐乾性、耐塩性の極めて高い南アフリカ原産の植物で500 mM NaCl 程度までの塩ストレスに適応可能である。生育途中に塩ストレスを受けると光合成の様式をC3型からCAM型に変化させることで知られている (Cushman *et al.* 1990)。塩ストレスへの適応過程では光合成様式の変化のみならず、浸透圧調節もおこなわれる。過剰のナトリウムイオンは葉や茎の bladder cell から排出され、これが NaCl の結晶となって細かい氷の粒のように見えるため、通称 ice plant と呼ばれている。bladder cell 以外の細胞、とくに細胞質においては糖アルコールとカリウムイオンによって浸透圧調節がおこ

---

Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 710, Japan  
平成7年1月11日受理 (Received January 11, 1995)

\* Department of Biochemistry, University of Arizona, USA

なわれていると考えられている。塩ストレス下では過剰のナトリウムイオンがカリウムイオンの輸送に拮抗的に働くため、浸透圧調節に必要なカリウムイオンの吸収を確保するにはカリウム輸送系も塩ストレス環境へ適応しているはずであるが、ice plantにおけるカリウム輸送系の研究はこれまでほとんど進んでいなかった。

植物のカリウム輸送系については、低親和性、高親和性の2種類の輸送系の存在が生理学的研究から示唆されていたが、最近低親和性輸送系（カリウムチャンネル）の遺伝子がシロイヌナズナから2種類単離された（*AKTI*, Sentenac *et al.* 1992 および *KATI*, Anderson *et al.* 1992）。この両者のcDNA塩基配列はよく似ているが、同一遺伝子座の対立遺伝子ではなく独立した二つの遺伝子と考えられている。高親和性輸送系（カリウムトランスポーター）の遺伝子（*HKTI*）についてもコムギから報告されている（Schachtman *et al.* 1994）。本研究ではPCR法（polymerase chain reaction）を用いてice plantのカリウム輸送系遺伝子の同定を試みた結果、シロイヌナズナのカリウムチャンネルと相同性のある遺伝子断片を得ることができたので、報告する。

この研究を実施する機会をお与え下さり、原稿を校閲して下さった河崎利夫博士に感謝いたします。また本論文について多くの適切な助言をくださった、中島進博士、坂本亘博士、村田稔博士に感謝いたします。

### 材料および方法

水耕法で6週間生育させた *Mesembryanthemum* の根からRNAを調製した（生育中に塩ストレスは与えていない）。cDNAの合成にはトータルRNAを鋳型とし、poly(dT)プライマーとreverse transcriptaseを用い（GeneAmp RNA PCR Kit, Perkin Elmer Cetus, CT, USA）、このcDNAからPCR法によってカリウムチャンネル遺伝子断片を増幅した（RT-PCR）。PCRに用いたプライマーは *AKTI*, *KATI* および動物細胞のカリウムチャンネルのうちShakerとよばれる遺伝子ファミリー（Jan and Jan 1990）に共通して保存されている領域に対してデザインした。上流プライマーは次の2種類である。

(DK-1') 5'-TGGAATTCTA (T/C) TGG (A/T) (G/C) NATNACNAC-3'

(V-2) 5'-GGGAATTTCGGNTA (T/C) GGNGA (T/C) (T/A/C) TNCA-3'

下流プライマーは次の2種類を用いた。

(DK-4') 5'-AAGGATCCNGTNGGNGC (T/C) TT (G/T) TT (T/C) TG-3'

(R-1200) 5'-GGAAGCTTATCTTCTTTTGGTGGGAAATACTCAGC-3'

アニーリング温度52°C、サイクル数50回で得られたPCR産物は制限酵素で消化、フェノール抽出、エタノール沈澱後、pBluescriptベクターを用いてクローニングした。塩基配列は2本鎖プラスミドDNAからdideoxy法を用いて決定した。ゲノミックDNAはCTAB法（Doyle and Doyle 1990）によって調製した後、制限酵素で一晩消化し、さらに4時間酵素を追加して完全に消化した。アガロースゲル電気泳動後、ナイロンメンブレンにアルカリ法で転写したDNAと、ランダムプライマー法によって<sup>32</sup>Pでラベルした遺伝子断片（PCR産物をクローン化したもの）をハイブリダイズさせた。

	1		*	*	*	50
M91406		<u>GYG</u>	<u>DFHPVNIREM</u>	<u>ICDIFYMLFN</u>	<u>LGLTAYLIGN</u>	
M91412		<u>YWS</u>	<u>ITTLTTTGYG</u>	<u>DLHPVNIREM</u>	<u>IFDIFYMLFN</u>	<u>LGLTTYLIGN</u>
AKT1	<u>MRYVTSMYWS</u>	<u>ITTLTTVGYG</u>	<u>DLHPVNTKEM</u>	<u>IFDIFYMLFN</u>	<u>LGLTAYLIGN</u>	
KAT1	<u>NRYVTALYWS</u>	<u>ITTLTTTGYG</u>	<u>DFHAENPREM</u>	<u>LFDIFFMMFN</u>	<u>LGLTAYLIGN</u>	
	51					100
M91406	<u>MTNLVVHGTS</u>	<u>RTRRFRDTIQ</u>	<u>AASSFGLRNR</u>	<u>LPVRLQDQML</u>	<u>AHLCLKYRTD</u>	
M91412	<u>MTNLVVHGTS</u>	<u>RTRRFRDTIQ</u>	<u>AASSFGLRNR</u>	<u>LPVRLQDQML</u>	<u>AHLCLKYRTD</u>	
AKT1	<u>MTNLVVHGTS</u>	<u>RTRNFRDTIQ</u>	<u>AASNFAHRNH</u>	<u>LPPRLQDQML</u>	<u>AHLCLKYRTD</u>	
KAT1	<u>MTNLVVHWTS</u>	<u>RTRTFRDSVR</u>	<u>AASEFASRNQ</u>	<u>LPHDIQDQML</u>	<u>SHICLKFKT</u>	
	101	*				150
M91406	<u>SEGLQQQEV</u>	<u>DSLPKAIKSS</u>	<u>ISHYLFYSLL</u>	<u>DKVYLFHGVS</u>	<u>NDLLFQLVSE</u>	
M91412	<u>SEGLQQQGV</u>	<u>DSLPKAIKSS</u>	<u>ISHYLFYSLL</u>	<u>DKVYLFHGVS</u>	<u>NDLLFQLVSE</u>	
AKT1	<u>SEGLQQQETL</u>	<u>DALPKAIRSS</u>	<u>ISHFLFYSLM</u>	<u>DKVYLFHGVS</u>	<u>NDLLFQLVSE</u>	
KAT1	<u>.EGLKQQETL</u>	<u>NNLPKAIRSS</u>	<u>IANYLFFPIV</u>	<u>HNIYLFQGV</u>	<u>RNFLFQLVSD</u>	
	151			180		
M91406	<u>MKAEYFPPKE</u>	<u>D</u>				
M91412	<u>MKAEYFPPKE</u>	<u>DVILQNKAPT</u>				
AKT1	<u>MKAEYFPPKE</u>	<u>DVILQNEAPT</u>	<u>DFYILVNGTA</u>			
KAT1	<u>IDAEYFPPKE</u>	<u>DIILQNEAPT</u>	<u>DLYILVSGAV</u>			

Fig. 1. Comparison of potassium channels. Partial amino acids sequences were deduced from two fragments (M91406 and M91412) isolated from *Mesembryanthemum*, and *AKT1* and *KAT1* reported from *Arabidopsis*. Underlined sequences represent the regions corresponding to primers used for the PCR reaction. Marked (\*) amino acids are non-identical amino acids between M91406 and M91412. Dots in the sequence of *KAT1* show the gap used for the alignment.

### 結果および考察

プライマーとして V-2 と R-1200 を用いた結果 432bp の長さの PCR 産物を得た。クローニング後、このクローン (M91406) の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を比べてところ、シロイヌナズナの *AKT1* および *KAT1* とに高い相同性 (それぞれ 88%, 68% のアミノ酸が共通) を示した (図 1)。今回 PCR で用いた上流, 下流の両プライマーで増幅した領域はカリウムチャンネルとして最もよく保存されている領域, すなわち *AKT1*, *KAT1*, Shaker ファミリーを通じて相同性が高く, H5 および putative cyclic nucleotide binding 領域として知られている領域に挟まれた領域である。今後 ice plant のカリウムチャンネル遺伝子の全長 (シロイヌナズナのカリウムチャンネルでは 3 kb 弱) が明らかになれば, 全長ではもっと相同性の低い領域もあるかも知れない。プライマーとして DK-1' と DK-4' を用いたところ, 長さ 489bp の PCR 産物が得られた (クローン名 M91412)。このクローンも *AKT1*, *KAT1* と高い相同性を示した (それぞれ 88%, 67% のアミノ酸が共通)。

2 つのクローン, M91406 と M91412 とは互いに別々のプライマーを用いて PCR をおこなった結果得られたクローンであるが, 両者はその重なっている領域においては 144 個のアミノ酸のうちわずか 4 つのアミノ酸が異なるだけで, 極めて似たものであることがわかった (図 1)。塩基配列で比べても, 432 個の内 10 塩基が違っているだけであった。この両者は, PCR による増幅過程での間違い (Taq polymerase の塩基の読み間違い) の可能性を含め, 同一遺伝子の変異を示しているのか, あるいは異なった遺伝子なのかは, 今後明らかにすべき課題

である。得られた遺伝子（断片）は ice plant におけるカリウムチャンネル遺伝子の断片であると考えられる。理由として次の2点が挙げられる、1) 高い相同性を示した *KATI* が機能的にはカリウムチャンネル遺伝子であることが証明されている (Schachtman *et al.* 1992), 2) 今回用いた方法 (RT-PCR 法) から、得られた遺伝子は mRNA として発現していること、従ってシュード（偽）遺伝子ではないといえる。

今回得られた M91406 と M91412 は先に述べたように極めて相同性が高いので、予備的におこなったサザンハイブリダイゼーションの結果は、両者とも全く同じパターンを示した（図は省略）。M91412 をプローブとしてハイブリダイゼーションを 65°C (フォルムアミドなし) でおこない、洗浄を非常に緩やかな条件 (33°C) でおこなった結果、図 2 に示すように一本の強いバンドともう一本の弱いバンドが見られた。この結果は今回得られたクローンはシングルコピーであること、またこのクローンと相同性のある別の遺伝子、おそらくカリウムチャンネル遺伝子のファミリーが存在することを示唆している。



Fig. 2. Southern hybridization probing with M91412 fragment. Genomic DNA was digested with *Xba*I (A) and *Eco*RI (double digestion, B).

植物のカリウムチャンネルは発現量が極めて少なく細胞一個あたり数十から数百個のチャンネルタンパク質しか発現されていないと考えられている。このためタンパク質レベルで生化学的に同定する試みは未成功である。1992年にカリウム輸送能欠損酵母株を相補するという方法でシロイヌナズナからはじめてその遺伝子が得られた。シロイヌナズナの情報をもとに今回初めて RT-PCR 法をカリウムチャンネル遺伝子に適用したが、当初従来の PCR で用いられるサイクル数30から35回という条件では、該当する PCR 産物は得られなかった。発現量が微少であることは、mRNA の量も少なく従って cDNA 量も少ないために増幅が十分おこなわれなかった可能性が考えられたため、サイクル数を50回にしたところ、今回報告した

クローンを得ることができた。今回得られたクローンをもとに、次のようなことを今後おこなっていく必要がある。(1) カリウムチャンネル遺伝子の全長を決定する。このためには、a) 今回得られたクローンをプローブとして cDNA ライブラリーを検索する、b) クローンの 3'および 5'側配列の PCR 法による決定 (RACE 法, Innis *et al.* 1990) などが考えられる。

(2) 得られた遺伝子 (全長) が機能的にカリウムチャンネル遺伝子であることを示す。このためには *KATI* でおこなわれたように、目的の遺伝子から RNA を人工合成し, *Xenopus* (アフリカツメガエル) の卵に微量注入した後、卵で発現されてくるカリウムチャンネル活性を電気生理学的に検出すればよい。(3) ストレス条件や植物の加齢によってカリウムチャンネル遺伝子の発現がどのように調節されるか調べる。(4) 組織および細胞内での発現様式を *in situ* ハイブリダイゼーションで明らかにする。

### 摘 要

耐塩性, 耐乾性の極めて高い *Mesembryanthemum crystallinum* から PCR 法を用いてカリウムチャンネル遺伝子断片を得た。2つのクローンが独立に得られたが、互いによく似ていて、シロイヌナズナのカリウムチャンネルとは67から88%の相同性を示した。サザンハイブリダイゼーションの結果から、今回得られた遺伝子はシングルコピーであり、またカリウムチャンネル遺伝子ファミリーが存在する可能性が示唆された。

**キーワード:** *Mesembryanthemum crystallinum*, カリウムチャンネル, RT-PCR

### 引 用 文 献

- Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian L. V., Lucas, W. J. and Gaber, R. F. 1992. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 3736-3740.
- Cushman, J. C., Michalowski, C. B. and Bohnert, H. J. 1990. Developmental control of Crassulacean acid metabolism inducibility by salt stress in the common ice plant. Plant Physiol. 94: 1137-1142.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 551-558.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. 1990. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego, USA
- Jan, L. Y. and Jan, Y. N. 1990. A superfamily of ion channels. Nature 345: 672.
- Schachtman, D. P., Schroeder, J. I., Lucas, W. J., Anderson, J. A. and Gaber, R. F. 1992. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis KATI* cDNA. Science 258: 1654-1658.
- Schachtman, D. P. and Schroeder, J. I. 1994. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. Nature 370: 655-658.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.-M., Gaymard, F. and Grignon, C. 1992. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. Science 256: 663-665.