

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15237

研究課題名(和文)GS2がアンモニア毒性を引き起こすメカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism for GS2-dependent ammonium sensitivity in Arabidopsis thaliana

研究代表者

蜂谷 卓士 (HACHIYA, TAKUSHI)

島根大学・学術研究院農生命科学系・助教

研究者番号：80709311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アンモニア耐性株であるプラスチド型グルタミン合成酵素欠損株(*gs2*株)の解析により、アンモニア毒性の原因解明を目指した。硝酸イオン条件と比較してアンモニウムストレス条件の野生株では、酸消費反応であるグルタミン酸合成よりも酸生成反応であるグルタミン合成が促進されたが、*gs2*株ではこれらの応答が緩和された。硝酸イオン条件と比較してアンモニウムストレス条件の野生株では、酸ストレス遺伝子発現応答及び組織酸性度が増加したが、*gs2*株ではこれらの応答が緩和された。また、外液pHの上昇によって野生株のアンモニア毒性が緩和された。以上から、酸ストレスがアンモニア毒性の原因の一つであると結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のラボ及びフィールドでの解析から、21世紀後半に予測される高CO₂環境において、C3型光合成を行う作物の硝酸態窒素の利用効率が大きく低下することが明らかになった。僅か1%の窒素利用効率の低下によって、世界で年間11億ドルものコストが増加するという試算もある。作物種の多くが好硝酸性のC3型であることから、主要作物の好アンモニア化は分子育種上重要な課題である。本研究は、アンモニア毒性の主要メカニズムを明らかにしただけでなく、作物の好アンモニア化に向けた分子ターゲットも提示することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to elucidate mechanism for ammonium toxicity with focus on an ammonium sensitivity gene GS2 that was captured by my positive screen. I have found that (1) proton-producing GS2 reaction overflowed proton-consuming GOGAT capacity in wild-type grown under ammonium than under nitrate, which was attenuated in *gs2* mutant, (2) expression of acidic stress-responsive genes was stimulated and tissue acidity was increased in ammonium-grown wild-type, which was suppressed in ammonium-grown *gs2* mutant, (3) an elevation of medium pH by applying alkaline ammonia alleviated ammonium toxicity in ammonium-grown wild-type. These suggest that acidic stress is a primary cause of ammonium toxicity.

研究分野：植物栄養分子生理学

キーワード：アンモニア毒性 アンモニウム毒性 グルタミン合成酵素 酸ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のラボ及びフィールドでの解析から、21世紀後半に予測される高CO₂環境下では、C3型光合成を行う作物の硝酸イオンの利用効率が顕著に低下することがわかった (José et al. 2017 J Exp Bot)。このためアンモニウムイオン栽培が注目されているが、C3型作物種の多くが高濃度のアンモニウムイオン栽培下で生育不良を示す。この現象はアンモニア (アンモニウム) 毒性として広く知られるが、チャールズ・ダーウィンによる発見以来、その主要な原因は未解明である。

2. 研究の目的

研究代表者はシロイヌナズナを用いて大規模なスクリーニングを実施し、アンモニア毒性の原因を克服したと考えられる複数のアンモニア耐性株を単離した。本研究では、これらの中でも比較的強い耐性を示したプラスチド型グルタミン合成酵素欠損株 (*gs2*) に着目し、この株のアンモニア耐性メカニズムを詳細に解析することによってアンモニア毒性の原因を解明するとともに、作物の好アンモニウム化を進める上でのヒントを得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 野生株と *gs2* 欠損変異株のトランスクリプトーム解析

アンモニアストレス条件で処理した野生株と *gs2* 欠損変異株の地上部をサンプリングした。サンプルから RNA を抽出・精製し、RNA のクオリティーをチェックした後、規定プロトコールにしたがって GeneChip Arabidopsis Genome ATH1 Array (Affymetrix) 解析を実施した。

(2) 野生株と *gs2* 欠損変異株における酸ストレス応答遺伝子のリアルタイム PCR 解析

硝酸イオン条件またはアンモニアストレス条件で処理した野生株と *gs2* 欠損変異株の地上部をサンプリングした。サンプルから RNA を抽出・精製し、逆転写後、リアルタイム PCR 解析を実施した。

(3) 野生株と *gs2* 欠損変異株のアミノ酸・アンモニア分析

硝酸イオン条件またはアンモニアストレス条件で処理した野生株と *gs2* 欠損変異株の地上部をサンプリングした。サンプルからアミノ酸を抽出・精製後、CE-MS によってアミノ酸濃度を測定した (埼玉大学の川合真紀教授との共同研究)。サンプルからアンモニアを抽出・精製後、分光法によりアンモニア濃度を測定した。

(4) 野生株と *gs2* 欠損変異株の酸性度及びプロトン排出量の解析

硝酸イオン条件またはアンモニアストレス条件で処理した野生株と *gs2* 欠損変異株の地上部をサンプリングした。サンプルの純水抽出液のプロトン濃度及び培地中へのプロトン排出量を測定した。さらに、各株の葉肉プロトプラストからのプロトン排出量も定性的に評価した。

(5) 野生株と *gs2* 欠損変異株の葉緑体構造の電子顕微鏡観察

硝酸イオン条件またはアンモニアストレス条件で処理した野生株と *gs2* 欠損変異株の葉の葉緑体構造を TEM 観察した (理化学研究所の豊岡公德上級研究員との共同研究)。

(6) 野生株のアポプラスト pH の解析

アポプラスト局在型 pH プローブ蛍光タンパク質 PM-Apo と共焦点レーザー顕微鏡を用いて、硝酸イオン条件またはアンモニアストレス条件で処理した野生株葉の表皮細胞のアポプラスト pH を評価した。

(7) アンモニア毒性及び組織酸性度への外液 pH の効果

硝酸イオン条件 (pH 5.7) とアンモニアストレス条件 (pH 5.7)、アンモニア水を用いて pH を上昇させた硝酸イオン条件 (pH 6.7) とアンモニアストレス条件 (pH 6.7) で野生株を栽培し、地上部の成長と純水抽出液のプロトン濃度を解析した。

(8) *GS2* と硝酸トランスセプター *NRT1.1* の遺伝解析

GS2 ともう一つのアンモニア感受性遺伝子である *NRT1.1* の二重破壊株を作成し、アンモニア耐性を解析した。

4. 研究成果

(1) 野生株と *gs2* 欠損変異株のトランスクリプトーム解析 (図 1)

野生株と比較して *gs2* 変異株ではアンモニアストレス応答遺伝子群と酸ストレス応答遺伝子群の発現応答が統計的に有意に低下した。

(2) 野生株と *gs2* 欠損変異株における酸ストレス応答遺伝子のリアルタイム PCR 解析 (図 2)

代表的なアンモニアストレス誘導遺伝子及び酸ストレス誘導遺伝子の発現が、硝酸イオン条件の野生株地上部で低く、アンモニアストレス条件で高かった。*gs2* 欠損株ではアンモニアストレスによる発現誘導が強く抑制された。

図1

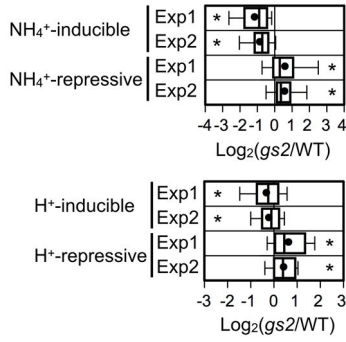
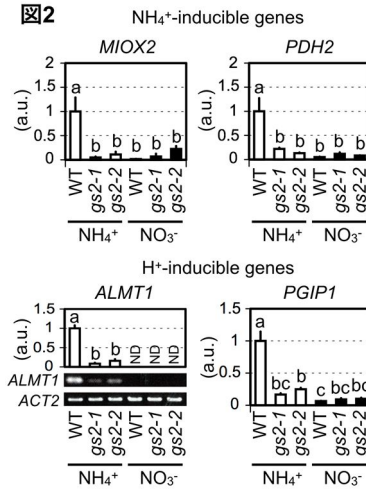


図2



(3) 野生株と *gs2* 欠損変異株のアミノ酸分析 (図3)

アミノ酸とアンモニアとともに硝酸イオン条件の野生株地上部で低く、アンモニアストレス条件で高かった。アンモニアストレス条件において、野生株と比較して *gs2* 変異株ではアンモニアがさらに蓄積したのに対して、アミノ酸レベルは低下した。また、グルタミンのグルタミン酸に対する比も、硝酸イオン条件の野生株地上部で低く、アンモニアストレス条件で高かった。*gs2* 変異株ではアンモニアストレスによるグルタミンのグルタミン酸に対する比の増加が緩和された。

アンモニアストレス条件では酸生成反応である *GS2* によるグルタミン合成が、酸消費反応であるグルタミン酸合成よりも促進されること示唆された。また、*gs2* 変異株では、アンモニアが蓄積したにもかかわらずアンモニア耐性を示したことから、アンモニアの蓄積よりも *GS2* によるアンモニア同化反応が毒性に寄与すると考えられる。

(4) 野生株と *gs2* 欠損変異株の酸性度及びプロトン排出量の解析 (図4)

地上部の酸性度と地上部からのプロトン排出速度ともに硝酸イオン条件の野生株地上部で低く、アンモニアストレス条件で高かった。*gs2* 変異株ではこれらのアンモニアストレスによる増加が緩和された。葉肉プロトプラストからのプロトン排出量も同様の傾向を示した。アンモニアストレス下では *GS2* による酸生成が促進されることがわかった。

(5) 野生株と *gs2* 欠損変異株の葉緑体構造の電子顕微鏡観察 (図5)

野生株葉緑体の膜構造は、硝酸条件とアンモニアストレス条件の間でほとんど違いが観察されなかった。

図3

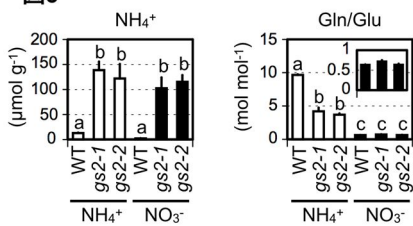


図4

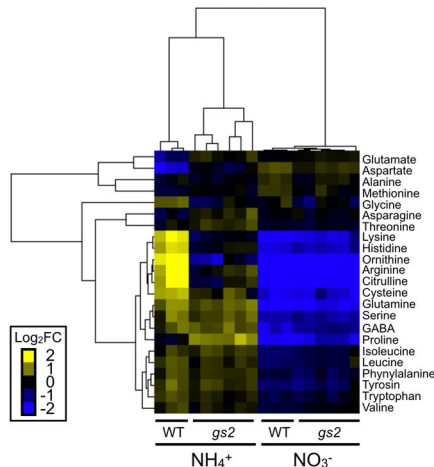
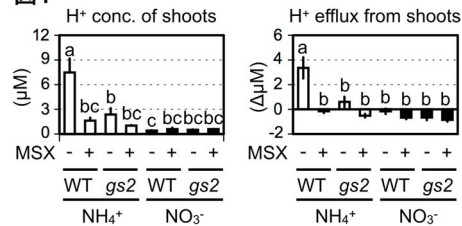
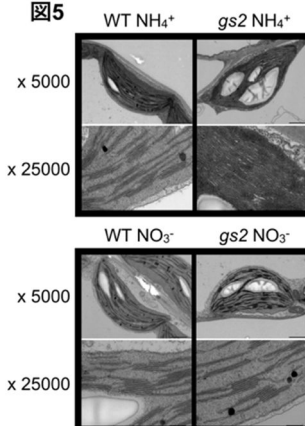


図5



(6) 野生株のアポプラスト pH の解析 (図6)

硝酸イオン条件と比較してアンモニア条件の表皮細胞のアポプラストでは、統計的に有意にアポプラスト領域の pH が低下した。

(7) アンモニア毒性及び組織酸性度への外液 pH の効果 (図7)

外液 pH の上昇によりアンモニア毒性による成長抑制が軽減されるとともに、組織の酸性度も低下した。酸ストレスがアンモニア毒性に寄与することが示唆された。

(8) GS2 と硝酸トランスセプター *NRT1.1* の遺伝解析 (図8)

GS2 と *NRT1.1* の二重破壊株は、いずれの単独破壊株と比べても統計的に有意にアンモニア耐性が向上した。*GS2* と *NRT1.1* は独立のメカニズムによりアンモニア感受性を増加させることが示唆された。

図6

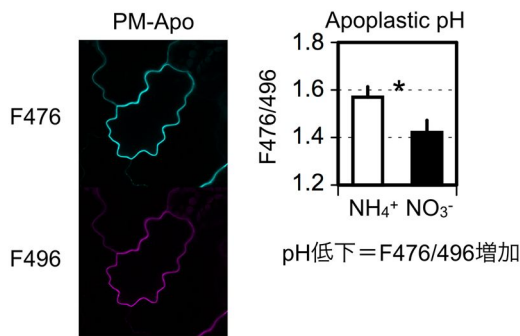


図7

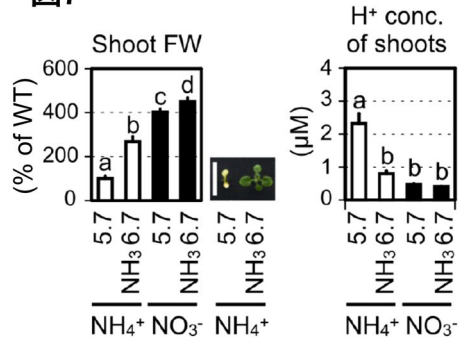
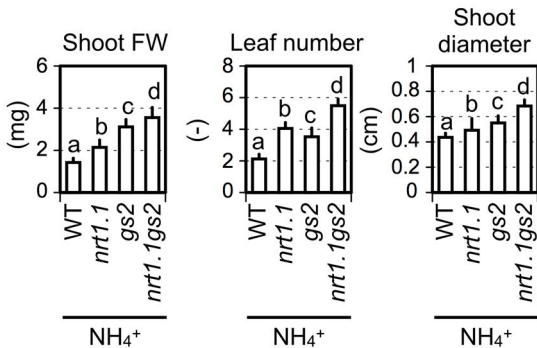


図8



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

Okamoto Y., Suzuki T., Sugiura D., Kiba T., Sakakibara H., Hachiya T. Shoot nitrate underlies a perception of nitrogen satiety to trigger local and systemic signaling cascades in *Arabidopsis thaliana*, *Soil Science and Plant Nutrition*, 査読有, vol. 65, 2019, pp. 56-64

DOI: 10.1080/00380768.2018.1537643

Hachiya T., Okamoto Y. Simple spectroscopic determination of nitrate, nitrite, and ammonium in *Arabidopsis thaliana*, *Bio-protocol*, 査読有, vol. 7, 2017, pp. e2280

DOI: 10.21769/BioProtoc.2280

Hachiya T., Sakakibara H. Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants, *Journal of Experimental Botany*, 査読有, vol. 68, 2017, pp. 2501-2512

DOI: 10.1093/jxb/erw449

[学会発表] (計6件)

蜂谷卓土、植物の窒素充足応答 (招待講演) 日本植物学会、2018年

Hachiya, T. Plant responses to internal nitrogen satiety (Invited talk), Mistral Montpellier 2018, 2018

Okamoto, Y., Kojima, M., Takebayashi, Y., Sugiura, D., Suzuki, T., Sakakibara, H., Hachiya, T. Genome-wide analysis of gene expression regulated by internal nitrate in *Arabidopsis thaliana* (Poster presentation), Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017年

蜂谷卓土、岡本悠希、稲葉ジュン、木羽隆敏、宮城敦子、川合真紀、河野優、矢守航、若崎

眞由美、佐藤繭子、豊岡公德、榊原均、GS2による過剰なアンモニア同化がアンモニア毒性の原因である(口頭発表) 日本土壌肥料学会、2017年
岡本悠希、鈴木孝征、榊原均、蜂谷卓士、体内の硝酸イオンと同化窒素を一方または両方欠乏させた植物における遺伝子発現応答の解析(ポスター発表、**ポスター賞受賞**) 日本土壌肥料学会、2017年、
蜂谷卓士、アンモニア耐性株に学んだアンモニアが植物に毒性を示すメカニズム(招待講演) 第3回植物の栄養研究会、2017年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
島根大学総合科学研究支援センター遺伝子機能解析部門
<https://shimane-u.org/staffs.htm>
リサーチマップ
<https://researchmap.jp/takushi/?lang=japanese>
名古屋大学最先端情報分子・植物最適行動統御ユニット
<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~ck/b1/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。