

平成23年 3月30日現在

研究種目： 基盤研究（A）
 研究期間： 2007 ～ 2009
 課題番号： 19208007
 研究課題名（和文） イネのアンモニア同化と窒素リサイクル機構の解明による窒素利用効率の向上

研究課題名（英文） Improvement of nitrogen-use-efficiency based on molecular mechanisms of ammonium assimilation and nitrogen recycling system in rice

研究代表者

山谷 知行 (YAMAYA TOMOYUKI)
 東北大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号： 30144778

研究成果の概要（和文）： イネのゲノム解析の完了によって新規に発見されたサイトゾル型グルタミン合成酵素 GS1;3 やグルタミン酸合成酵素 NADH-GOGAT2 に焦点を当て、窒素利用効率に関わる統合的な分子基盤を構築した。遺伝子破壊変異体を活用するとともに、窒素利用効率の制御に関わる新規遺伝子の探索を行った。その結果、GS1;3 は種子発芽の過程で、また NADH-GOGAT2 は老化に伴う窒素転流で機能している事が示唆された。また、窒素欠乏に伴う根の伸長と窒素吸収の促進に関わる新規遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）： Two new enzymes, GS1;3 and NADH-GOGAT, related to the primary assimilation of ammonium ions in rice discovered after the complete sequencing of genome were focused to understand their functions. Reverse genetics approaches successfully showed that GS1;3 is important during the seed germination, while NADH-GOGAT2 is functioning during nitrogen remobilization during leaf senescence. A new gene related to the nitrogen use efficiency was identified with the forward genetics and it contributed the increase in root-elongation as well as nitrogen uptake in rice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
2008年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
総計	30,400,000	9,120,000	39,520,000

研究分野： 植物分子生理学

科研費の分科・細目： 農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード： イネ、アンモニア同化、窒素リサイクル機構、窒素利用効率、遺伝子破壊、サイトゾル型グルタミン合成酵素、NADH-グルタミン酸合成酵素

1. 研究開始当初の背景

イネはアンモニウムイオンを無機態窒素源として吸収し、サイトゾル型グルタミン合成酵素 (GS1) と NADH グルタミン酸合成

酵素 (NADH-GOGAT) の触媒を受けてグルタミンに有機化された後、グルタミン酸に変換されて多くの生合成反応に利用されることが判明していた。また、穂に蓄積する窒素

の約 80%は老化器官からの転流によることもわかっていた。さらに、外来の窒素環境に応答し、特に低窒素条件下では根の伸長を促進することで窒素吸収を増加するものと考えられていた。しかし、アンモニウムイオンの有機化に関わる GS1 は 3 分子種、NADH-GOGAT は 2 分子種の遺伝子があることがゲノム解析の完了から判明したが、窒素利用やその制御機構の詳細は不明であった。一方、イネでは分子遺伝学的なアプローチを可能とする材料が入手かのものであり、本研究では分子遺伝学や分子生理学の研究手法を駆使して、特に新規に発見された GS1;3 と NADH-GOGAT2 の機能解析を目指した。同時に、窒素利用効率の向上に関わる新規遺伝子の単離も目指した。

2. 研究の目的

(1) イネのアンモニア同化と窒素リサイクル機構の解明を目指し、特に新規に発見された GS1;3 と NADH-GOGAT2 に着目し、それぞれの機能を逆遺伝学や分子生理学的に解明し、窒素利用の分子基盤を構築することを目的とした。

(2) 窒素環境、特に低窒素条件下に応答してイネ根の伸長が促進されることに着目し、順遺伝学的なアプローチにより遺伝子の単離を目指し、窒素利用効率の向上に向けた分子基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イネの窒素利用機構の解明に当たり、アンモニウムイオンの初期同化に関わる 3 種の GS1 と 2 種の NADH-GOGAT 遺伝子破壊変異体を、レトロトランスポゾン *Tos17* が染色体にランダムに挿入されたミュータントパネルからスクリーニングした。それぞれの遺伝子が破壊されていることを確認後、関連する遺伝子の発現状況を定量 PCR で測定するとともに、水田で収穫期まで栽培し、変異体それぞれの表現型を詳細に解析した。GS1;3 の遺伝子破壊変異体に関しては、発芽過程にも着目した。

(2) 低窒素に応答して根の伸長を促進する原因遺伝子の単離にあたり、QTL 解析や染色体部分置換系統群 (CSSL) を用いた。単離された遺伝子の機能は、酵母を用いて証明した。

4. 研究成果

(1) 既報の GS1;1 以外に、GS1;2 や GS1;3、NADH-GOGAT1 と NADH-GOGAT2 の遺伝子破壊変異体をそれぞれ獲得した。野生株では、GS1;1 遺伝子は主に葉身で、GS1;2 遺伝子はアンモニウムイオンを供給した根の表層二層 (表皮・外皮細胞) で、GS1;3 は種子特異的に、また NADH-GOGAT1 遺伝子は

GS1;2 遺伝子同様に根の表層 2 層並びに成長中のシンク器官で、NADH-GOGAT2 遺伝子は成熟葉身と葉鞘で、それぞれ発現していることが判明し、アイズタイムそれぞれが窒素利用機構において機能分担していることが推定された。これらの成果を、2007 年に招待論文として *J Exp Bot* に公表した。また、これらの遺伝子破壊変異体を水田で栽培した結果、表現型に大きな差が認められ、遺伝子発現の特異性と表現型の詳細な解析から、GS1;2 は根におけるアンモニウムイオンの同化で、GS1;3 は発芽過程で、NADH-GOGAT1 は根における同化とシンク器官における転流窒素のリサイクルで、また NADH-GOGAT2 は老化器官からの窒素転流の過程で、それぞれ機能することが強く示唆される結果を得た。NADH-GOGAT1 に関する結果は、*Amino Acids* 誌に 2010 年 3 月に on line で公表した。

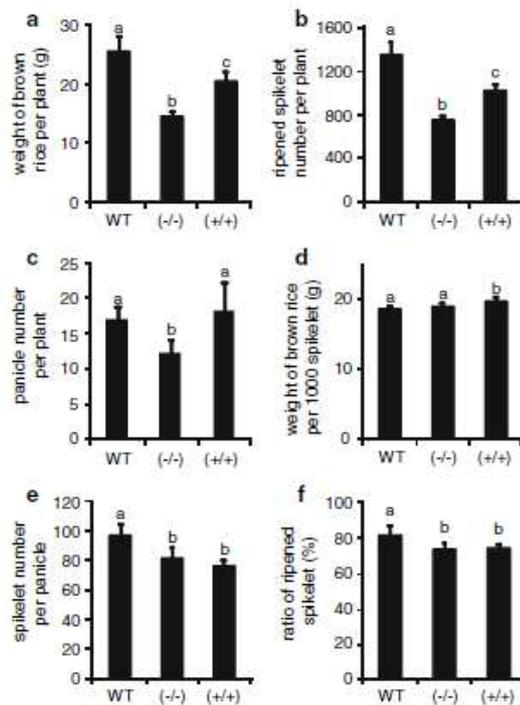


図 1. 水田で栽培した NADH-GOGAT1 遺伝子破壊変異体の収量構成要素の比較
a 一株あたりの籾重、b 一株あたりの登熟穎果数、c 一株あたりの穂数、d 千粒重、e 一穂あたりの穎果数、f 登熟歩合

WT: 野生株、-/-: 遺伝子破壊変異体、+/-: null (Tos17 脱落個体)

(**Amino Acids* (2010) 39: 1003-1012 から転用記載した)

また、既に取得済みの GS1;1 遺伝子破壊変異体に関しては、メタボローム解析による代謝産物の網羅的解析を進めた。

(2) 低窒素に応答して根の伸長を促進する遺伝子を単離した結果、この遺伝子は新規の転写制御因子をコードしていることが判明した。低窒素応答が鈍い日本型イネではこの遺伝子は転写・翻訳されているが、低窒素応答機能の高いインド型品種のカサラスでは、この遺伝子に停止コドンが出現する変異が認められ、この転写制御因子は翻訳されていないことが確認できた。つまり、負の制御を行う因子であると考えられた。転写制御因子であることは、酵母を用いたツーハイブリッド解析により確認した。この遺伝子は、窒素の吸収促進に寄与していることも判明し、また多くの品種を用いて低窒素に応答して根の伸長を促進する品種を探索した結果、数品種のインド型イネが見いだされ、いずれもこの転写制御因子に変異が入っていることが確認された。このように大きな成果が得られ、遺伝子単離の過程の結果までを、**Theoretical Applied Genetics** 誌に 2010 年 3 月に受理され、公表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Obara, M., Tamura, W., Ebitani, T., Yano, M., Sato, T. and Yamaya, T. Fine-mapping of *qRL6.1*, a major QTL for root length of rice seedlings grown under a wide range of NH_4^+ concentration in hydroponic conditions. *Theoretical Applied Genetics*, 121: 535-547 (2010) 査読有
2. Tamura, W., Hidaka, Y., Tabuchi, M., Kojima, S., Hayakawa, T., Sato, T., Obara, M., Kojima, M., Sakakibara, H. and Yamaya, T. Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants. *Amino Acids*, 39: 1003-1012 (2010) 査読有
3. Takahashi, H., Takahara, K., Hashida, S., Hirabayashi, T., Fujimori, T., Kawai-Yamada, M., Yamaya, T., Yanagisawa, S. and Uchimiya, H., Pleiotropic modulation of carbon and nitrogen metabolism in Arabidopsis plants overexpressing *NAD kinase 2* gene. *Plant Physiol*, 151: 100-113 (2009) 査読有
4. Kudo, T., Kawai, A., Yamaya, T. and Hayakawa, T., Cellular distribution of ACT domain repeat protein 9, a nuclear localizing protein, in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiol. Plant.* 133: 167-179 (2008) 査読有

5. Sugawara, H., Ueda, N., Kojima, M., Makita, N., Yamaya, T. and Sakakibara, H., Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 2734-2739 (2008) 査読有
6. Suzuki, Y., Ohkubo, M., Hatakeyama, H., Ohashi, K., Yoshizawa, R., Kojima, S., Hayakawa, T., Yamaya, T., Mae, T. and Makino, A. Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with "sense" *rbcS* gene. *Plant Cell Physiol.* 48: 626-637 (2007) 査読有
7. Tabuchi, M., Abiko, T. and Yamaya, T., Assimilation of ammonium-ions and re-utilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 58: 2319-2327 (2007) 査読有

[学会発表] (計 49 件)

1. 山谷知行、イネの窒素飢餓ストレス、日本土壤肥料学会2009年度京都大会シンポジウム「植物のミネラルストレス応答」、2009年9月15-17日、京都 (招待講演)
2. Yamaya, T., Function of glutamine synthetase and glutamate synthase in rice plants. 11th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, 2009年8月3-7日、Vienna, Austria (招待講演)
3. Yamaya, T., Molecular mechanisms for plant biomass production - rice as a model plant. UCR Tech Horizon 2008 Conference, 2008年5月13-14日、UC Riverside, CA, USA (招待講演)
4. Obara, M. and Yamaya, T., Genetic and physiological approach of nitrogen utilization toward improving environmental adaptation of rice. Workshop on Development of Environmentally-friendly Water-saving Technologies for Rice, 2008年7月18日、Tsukuba, Japan (招待講演)
5. Yamaya, T., Assimilation of ammonium ions and re-utilization of nitrogen in rice. Nitrogen2007 - An International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, 2007年7月27-31日、Lancaster University, UK (招待講演)

〔図書〕（計 4 件）

1. Kojima, K., von Wiren, N. and Yamaya, T., Research Signpost 社, India, Ammonia absorption and assimilation in plants, In: "Nitrogen Assimilation in Plants", 2010, pp. 51-66 (total 378 pages)
2. 山谷知行、文永堂出版、アンモニウムイオンの吸収、アンモニアトランの同化、「植物栄養学 第2版」間藤徹、馬建鋒、藤原徹 編、2010年、pp. 70-71 及び pp. 77-82
3. 山谷知行、朝倉書店、b 窒素代謝、「植物の百科事典」、2009、16 ページ（全 552 ページ）
4. 山谷知行、朝倉書店、1.2 物質代謝、「植物の百科事典」、2009、13-14 ページ（全 552 ページ）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

報道関連情報

1. 山谷知行、東北大学の世紀ー世界をリードするイネの研究、2009年6月29日、東日本放送

アウトリーチ活動

1. 山谷知行、植物の基盤研究から食料自給率を考える。文部科学省政策会議先端科学技術調査会「植物科学研究が切り拓く未来ーグリーンイノベーションに向けて」、衆議院第1議員会館民主党A会議室、2010年3月4日

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/cellbio/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山谷 知行 (YAMAYA TOMOYUKI)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：30144778

(2) 研究分担者

佐藤 雅志 (SATO TADASHI)
東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号：40134043
2007-2008年

(3) 連携研究者

佐藤 雅志 (SATO TADASHI)
東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号：40134043
2009年