

平成21年 5月11日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19580065
 研究課題名（和文） オオムギ葉における低親和性硝酸イオントランスポーターの機能解明
 研究課題名（英文） Functional analysis of low-affinity nitrate transporter in barley leaves.

研究代表者
 末吉 邦（SueyoShi Kuni）
 新潟大学・自然科学系・准教授
 研究者番号：10216278

研究成果の概要：植物の無機窒素源である硝酸イオンは、根で吸収され、道管を介して葉に送られる。硝酸イオンの葉細胞内への輸送は、低親和性硝酸イオントランスポーター(NRT1)が関与すると予測されるが、その証拠はない。本研究では、オオムギで同定された NRT1 (HvNRT1) の機能解明を目的として研究を行い、①HvNRT1 遺伝子は、地上部・地下部の両方で構成的に発現していること、②HvNRT1 は細胞膜に発現していること、③HvNRT1 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞は、低親和性硝酸イオン輸送活性を持つこと、を明らかにした。これらのことは、オオムギの葉細胞への硝酸イオン輸送に HvNRT1 が関与している可能性を示している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

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：無機栄養、硝酸イオン、トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

植物は、主要な無機窒素源として土壌中の硝酸イオンを吸収し、亜硝酸イオン、アンモニアへと逐次還元したのち、有機態窒素に同化している。硝酸イオンは、根の細胞内に吸収されると、一部は根内で還元・同化されるが、大部分は導管を介して葉に運ばれる。葉に到達した硝酸イオンは、再び細胞内に取り込まれ、同じく還元・同化を受ける。これらの硝酸イオンの輸送過程には複数種の硝酸イオントランスポーター(NRT)が関与してい

ると考えられる。従って、NRT を介した硝酸イオンの輸送過程を理解することは、植物の窒素栄養生理を理解する上で重要である。

国内外における古くからの生理学的研究により、NRT は基質親和性の違う 2 種に機能的に分類されてきた。一つは高濃度域 (0.5mM 以上) の硝酸イオンを輸送する低親和性輸送系 (LATS) で、もう一つは低濃度域 (0.5mM 以下) での硝酸イオンの輸送に関係する高親和性輸送系 (HATS) である。90 年代に入って、米

英仏などを中心に、NRT をコードする遺伝子がさまざまな植物種で同定され、NRT の分子生物学的研究が加速した。*NRT* 遺伝子に T-DNA が挿入されたシロイヌナズナ変異株や *NRT* mRNA を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の解析から、一部の NRT については硝酸イオン輸送体であることが明確にされた。現在では、LATS をコードする遺伝子は *NRT1*、HATS をコードする遺伝子は *NRT2* と呼ばれている。NRT 1 および NRT2 はいずれもファミリーを形成しており、例えばシロイヌナズナでは NRT1 は 4 つ (AtNRT1.1~AtNRT1.4)、NRT2 は 7 つ (AtNRT2.1~AtNRT2.7) のメンバーが同定されている。NRT1 のうち、最も機能解析が進んでいるのは、シロイヌナズナの AtNRT1.1 である。NRT1 に関するこれまでの研究は、根における外界からの硝酸イオン吸収に関する機能解明が中心であり、葉における硝酸イオンの再吸収に対する NRT の役割についてはほとんど明らかになっていない。多くの植物にとって、葉は無機窒素同化が行われる主要な器官であり、葉における硝酸イオンの吸収の仕組みを明らかにすることはきわめて重要な課題である。オオムギにおいて、導管液中の硝酸イオン濃度は、常に数 mM~数 10 mM の高濃度範囲にあることから、研究代表者は、植物の葉における硝酸イオンの再吸収においては LATS が重要で、ここで機能する分子実体を明らかにする必要があると着想した。

2. 研究の目的

オオムギは、硝酸イオンの吸収、体内輸送に関する生理学的研究に古くからよく用いられており、最も多くのデータが蓄積されている植物種である。しかし、それらの生理的データを分子レベルで裏付けることのできるデータは少ない。モデル植物であるシロイヌナズナは、硝酸イオン輸送に関する遺伝子およびタンパク質の機能解析には強力な材料であるが、硝酸イオン輸送の生理は、シロイヌナズナとオオムギとは大きく異なり、植物種ごとに詳細な分子レベルの解析が求められる。研究代表者は、オオムギ葉における硝酸イオンの吸収機構を分子レベルで説明するために、この過程で機能する NRT 分子を明らかにする必要があると考えた。研究代表者は、オオムギ *NRT1* (*HvNRT1*) 遺伝子をすでに同定した。HvNRT1 とシロイヌナズナ AtNRT1.1 とのアミノ酸配列上での相対性は、

35%以下と低く、両者は機能的には異なることが予想された。一方、イネ OsNRT1.1 およびコムギ TaNRT1.1 との相対性は、それぞれ 75%と 90%以上と高い。これらの NRT1 は、イネ科植物における硝酸イオン輸送について重要な役割を持つと予想されるが、解析が進んでいないのが現状である。

そこで、本研究は、植物における NRT1 の役割解明のため、オオムギから *NRT1* 遺伝子を単離し、この遺伝子の分子的機能解析を行うことを目的とした。本研究では、(1) *HvNRT1* の硝酸イオンに対する発現応答や組織別の発現量の調査、(2) *GFP* との融合遺伝子を利用した HvNRT1 の細胞内局在性の観察、(3) アフリカツメガエル卵母細胞を用いた NRT1 の機能解析、を行なった。

3. 研究の方法

(1) 植物の生育

オオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv. Kawahonami) 種子を水で湿らせたろ紙で包み、グロースキャビネット内 (25°C) で発芽させた。3 日目に無窒素培養液の入ったバットに種子を移植し、連続光下で栽培した。無窒素培養液は毎日交換した。7 日目に無窒素培養液に硝酸塩を 1 mM になるように加え、一定時間後に根および葉を採取した。なお、無窒素培養液の組成は以下のとおりである。

0.1mM	CaCl ₂
1.0mM	MgSO ₄
0.2mM	KH ₂ PO ₄
2.5×10 ⁻² mM	Fe-EDTA・Na ₂
1.0×10 ⁻² mM	H ₃ BO ₃
5.0×10 ⁻⁴ mM	MnSO ₄
2.0×10 ⁻⁴ mM	CuSO ₄
5.0×10 ⁻⁴ mM	ZnSO ₄
1.0×10 ⁻⁵ mM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄

(2) RT-PCR 法による *HvNRT1* の発現解析

採取した根および葉よりグアニジン法により全 RNA を調製した。この全 RNA を鋳型とし、Oligo(dT)プライマーを用いて逆転写酵素 (Super script II) により 1st strand cDNA を合成した。続いて、cDNA を鋳型とし、*HvNRT1* 用プライマー (5' -GCATCCCTGACCTTGA-

TT-3' /5' -AACTTCTTTTCCAGATAAAAGC-3')、
 おび Actin 用プライマー (5' -CTGTAGG-
 AAATGGCTGACGG-3' /5' -TCGGATCACCTGACCCA
 T-3')で PCR を行った。それぞれの PCR 産物
 の濃度が飽和せず Actin 濃度が揃うようにテ
 ンプレート cDNA 量を調整した。PCR 反応の条
 件は、熱変性：94°C、30s、アニーリング：
 60°C、30s、伸長：72°C、30s とした。サイ
 クル数は、*HvNRT1* を 25 サイクル、*Actin* を
 22 サイクルとした。

(3) *HvNRT1* の細胞内局在性の解析

HvNRT1-GFP 融合遺伝子のコンストラクト
 を構築するため、島根大学 総合科学研究
 支援センター 遺伝子機能解析分野中川強
 教授から分譲して頂いた pGWB5 をベクターと
 して用いた。クローニングサイトへの *HvNRT1*
 open reading frame の組み込みは、Gateway
 システム (Invitrogen) を利用した。

NRT1-GFP 融合遺伝子発現用プラズミドを、
 パーティクルガン (BioRad) によってタマネ
 ギ表皮細胞へ導入し、16 時間後に顕微鏡によ
 り蛍光を観察した。

(4) アフリカツメガエル卵母細胞を用いた *HvNRT1* の硝酸イオン吸収活性測定

HvNRT1 が硝酸イオンを輸送する活性を持
 つかを調べるため、アフリカツメガエル
 (*Xenopus laevis*) 卵母細胞の機能発現系を用
 いて、*HvNRT1* の機能解析を行なった。

台湾国立中央研究院分子生物学研究所、
 Yi-Fang Tsay 博士から分譲していただいた
 pGEM-HE ベクターに、*HvNRT1* 遺伝子の ORF を
 移し変え、発現コンストラクトを構築した。
 このコンストラクトを鋳型に、mMESSAGE
 mMACHINE Kit (Ambion) を用いて、*HvNRT1*
 mRNA (cRNA) を人工的に合成した。一方、ア
 フリカツメガエルから卵母細胞を調製し、MBS
 培養液の入ったテラサキプレートに一個づ
 つ移し入れた。実体顕微鏡下で、マイクロ
 インジェクター (Funakoshi) を用いて卵母細胞
 1 個に対し、*HvNRT1*cRNA を 1ng ずつイン
 ジェクションした。

一晚静置した卵母細胞を吸収培地 (-NO₃⁻)
 (500μl/10 oocyte) に移し、90 分、17°C で
 インキュベートし、次いで、吸収培地 (+NO₃⁻)
 に交換し、3 時間、17°C でインキュベートし、
 卵母細胞に硝酸を吸収させた。その後、卵母
 細胞を超純水で数回洗浄し、超純水と共に

(200μl/10 oocyte) ホモジナイズした。ホ
 モゲネートを遠心した後の上清をシリンジ
 フィルターに通し、キャピラリー電気泳動装
 置 (Agilent) で硝酸イオン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① *HvNRT1* の発現解析

HvNRT1 遺伝子の増幅に対する特異性が高い
 と思われる 5' 非翻訳領域でプライマーを設
 計し、半定量的 RT-PCR を行なった。その結
 果、*HvNRT1* mRNA は、根部・地上部共に発現
 していた (図 1)。また、硝酸イオンの濃度条
 件を変化させても *HvNRT1* mRNA 蓄積量に影響
 はみられず、*HvNRT1* は、構成的に発現して
 いることが示された。これより、*HvNRT1* は構
 成的低親和性輸送系 (cLATS) をコードしてい
 ることが示唆された。また、サザンブロット
 解析からは、複数の類似遺伝子の存在が示唆
 されている。オオムギにおいては、*HvNRT1* に
 加え、複数の *NRT1* により硝酸イオンの獲得
 がなされていると思われる。

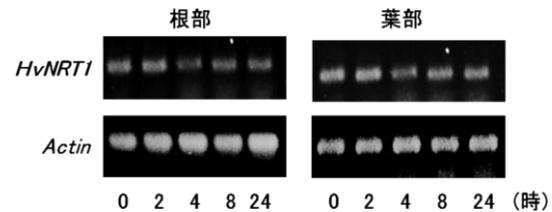


図 1. 硝酸イオンに対する *HvNRT1* 遺伝子の発現応答

② *HvNRT1* の細胞内局在性の解析

HvNRT1-GFP 融合遺伝子のパーティクルガン
 による遺伝子導入法により、タマネギ表皮細
 胞における *HvNRT1*-GFP の一過性発現を解析
 した (図 2)。NRT1-GFP タンパク質が発する蛍
 光は、タマネギ表皮細胞の細胞膜においての
 み観察された。一方、GFP 単独で発現させた
 細胞では、細胞全体にシグナルが観察された。
 この結果から、*HvNRT1* は細胞膜に発現して
 いるタンパク質であることが示された。

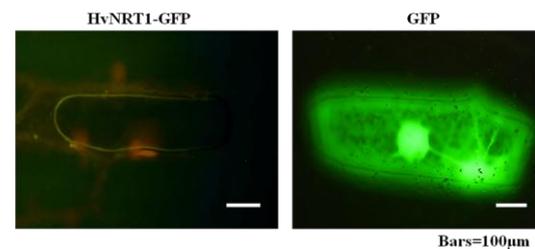


図 2. タマネギ表皮細胞における *HvNRT1* の細胞内局在

③ アフリカツメガエル卵母細胞を用いた HvNRT1 の機能解析

アフリカツメガエル卵母細胞に *HvNRT1*cRNA をインジェクションし、HvNRT1 を発現させた後、0.2mM および 10mM 硝酸イオンの吸収活性を測定した。実験の結果、*HvNRT1*cRNA をインジェクトした卵母細胞の硝酸吸収量は、0.2mM 硝酸イオンとインキュベートした場合においては、Water インジェクトした卵母細胞と変わりなかった(図 3)。一方、10mM 硝酸イオンとインキュベートした場合においては、Water インジェクトした卵母細胞より約 2 倍の硝酸吸収量がみられた(図 4)。よって HvNRT1 は硝酸イオンに対する低親和性輸送活性を持つことが初めて明らかとなった。

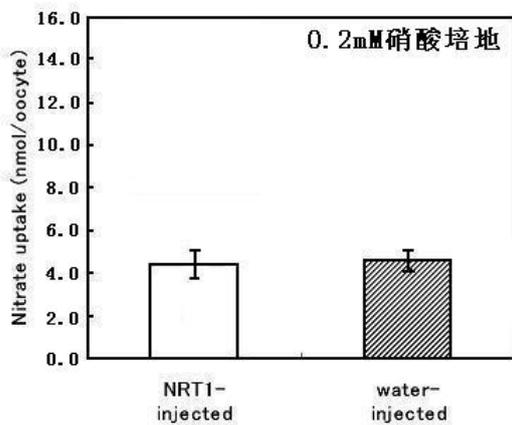


図 3. HvNRT1 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞における硝酸吸収量(低濃度領域)

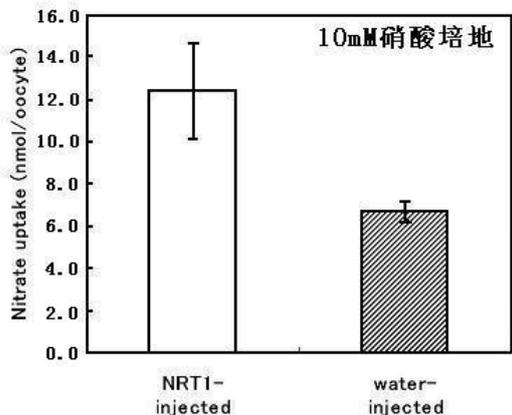


図 4. HvNRT1 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞における硝酸吸収量(高濃度領域)

(2) 得られた成果の国内外における位置づけ
本研究により、未だ機能が不明であった HvNRT1 が葉における硝酸イオン吸収に機能していることが示唆された。畑土壌で生育する、すなわち硝酸イオンを吸収利用するイネ科植物の NRT1 に関する研究は国内外になく、本研究の成果は先駆的である。

(3) 今後の展望

HvNRT1 が葉における硝酸イオン吸収に関わっていることを確定する上で、HvNRT1 の葉組織内局在性を明らかにすることが重要である。葉に到達した硝酸イオンは、最終的には葉肉細胞で還元・同化される。導管から積みおろされた硝酸イオンは、木部柔細胞で吸収されてシンプラスト経由で葉肉細胞へ移動するのか、アポプラスト経由だけで葉肉細胞まで移動するのかという重要な課題が、HvNRT1 の発現部位から明らかになれば学術上の大きなインパクトとなる。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 小野大輔・石川伸二・大竹憲邦・大山卓爾・末吉邦 : オオムギ低親和性硝酸トランスポーターの機能解析、日本土壤肥料学会 2007 年度大会、2007 年 8 月 22 日、東京農業大学

(2) 小林啓輔・小野大輔・前野貢・大山卓爾・末吉邦 : オオムギ低親和性硝酸トランスポーターの機能解析、日本土壤肥料学会関東支部大会、2008 年 11 月 29 日、新潟大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末吉 邦 (Sueyohi Kuni)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号 : 10216278

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし