

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21688006

研究課題名（和文）植物のアンモニウム態窒素栄養と根の形態に関する研究

研究課題名（英文）Ammonium nutrient dependent root development in plant

研究代表者

小島 創一 (KOJIMA SOICHI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30462683

研究成果の概要（和文）：植物の根は、アンモニウムを見つけると、枝分かれすることで表面積を増やすことで、栄養を効率的に取り込むことが分かった。また、アンモニウムによる根の枝分かれは、環境中のごく低濃度のアンモニウムを体内へ取り込むタンパク質によって引き起こされることが分かった。今後、より詳しく調べていくことで、植物が窒素肥料を効率的に利用する仕組みを改善できるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Localized ammonium supply to Arabidopsis root increased root branching. The response was highly dependent on high-affinity ammonium transporter located at plasma membrane. This new knowledge may lead to improve nitrogen use efficiency in plant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
総計	17,700,000	5,310,000	23,010,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：窒素代謝・輸送担体・形態形成

## 1. 研究開始当初の背景

現代社会において、植物のバイオマス生産を増大させる試みは、多収量で安価な農作物を市場に安定的に供給する点のみならず、近年中に枯渇する化石燃料の代替エネルギーとしてバイオ燃料を供給する点でも重要である。

植物のバイオマス増産にはいくつかの鍵因子があるが、窒素栄養の効率的な利用は最

も重要な因子の一つである。植物が利用できる土壌中の窒素栄養の主要な分子形態は、硝酸やアンモニウムといった無機態であり、自然界にはごく低濃度のみ存在し、農作地では必ず施肥により補われる。植物はこの限られた窒素栄養を環境から植物細胞内へ効率的に輸送し、アミノ酸へ同化することで生命活動を営む。

植物は移動することができないため、種子

として大地へ着地し生育を開始した段階から、環境中の窒素栄養量に合わせてその形態を変化させる。根の窒素供給に対する形態的な応答機構は、全身応答と局所応答がある (Drew et al., 1975)。全身応答とは、環境中の窒素栄養が少ないときに地上部の生育を抑制して、根を長く伸ばすことで窒素栄養の確保を図ることであり、局所応答とは、一本の長い根の一部分にのみ窒素栄養を供給されたときに、窒素栄養を供給された部位で二次根を形成して窒素栄養の確保を図ることである。

現代農業では、窒素栄養は被覆コートした遅効性肥料として植物に与えられるため、農作地の窒素栄養は土壤中に不均一に分布する。農作地で植物が窒素栄養を感知して窒素栄養の方向へ二次根を発達させることは、植物が効率的に窒素栄養を利用していく上できわめて重要な農業的形質である。

## 2. 研究の目的

植物は栄養を土壌から効率的に取り込むために土壌中に根を展開する。本研究では、我々は植物の窒素栄養の中でも、とりわけアンモニウムの輸送と利用機構について、植物のアンモニウム輸送と根の成長機構の関わりについて明らかにすることを目標とした。この目標を達成するために、三つの目的を設定した。

### (1) 植物のアンモニウム利用効率を決定する因子を明らかにする

シロイヌナズナは世界中に分布し、それぞれの土地の気候や土壌環境に適応して遺伝学的に固定された多様な環境型を持つ実験植物である。我々はシロイヌナズナの二つの環境型、北米産と西欧産のアンモニウムに対する応答性を調査した結果、二つの環境型のアンモニウムに対する根の形態形成がまったく異なり、バイオマスも異なることを発見した。そこで、シロイヌナズナの多様な環境型について、アンモニウム濃度に応答した根の形態変化およびアンモニウムの利用効率を解析し、環境型間の遺伝的差異を比較することで、アンモニウムに対する全身的な応答を規定する分子実体を明らかにすることを目的とした。

### (2) アンモニウムに応じた側根の形成機構について明らかにする

低濃度の硝酸を植物根に局所的に供給すると側根の形成を促進することはよく知られていた (Drew et al., 1975)。近年、硝酸による側根の形成は高親和型硝酸トランス

ポーター (NRT) に依存的で、NRT は硝酸を輸送する担体であるのみならず、根の表層細胞群で環境中の硝酸濃度を検知するセンサーであることが明らかとされた (Remans et al., 2006)。アンモニウムは硝酸とは異なり側根の形成を誘導しない (Zhang et al., 1998) ものとされてきたが、我々は培地成分や培養条件を検討し、シロイヌナズナ根に対する局所的なアンモニウムの供給により側根の成長が正に制御されていることを発見した。

硝酸と同様に、アンモニウムによる側根の形成が、高親和型輸送によって制御されているかについては、まったく未解明の研究領域である。我々は、高親和型アンモニウム輸送担体 (AMT) のみならず代謝酵素にも着目し、細胞質でアンモニウムをグルタミンへ同化する細胞質型グルタミン合成酵素 (GS1) の多重欠損変異体を用いて、アンモニウム態窒素栄養による側根形成の制御機構の解明を目的とした。

### (3) 植物ホルモンの情報伝達系とアンモニウム栄養の利用について明らかにする

AMT の機能について高親和型アンモニウム輸送に限定せずに、環境中のアンモニウムを検知して、細胞内部へ情報を伝達するセンサーと考えることも可能である。大腸菌のアンモニウムトランスポーター *amtB* と炭素-窒素のバランスを検知するシグナルタンパク質である PII が相互作用することが知られている (Coutts et al. 2002)。我々は、酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングを行い、AMT 相互作用タンパク質として AIP1 を同定した。AIP1 は植物ホルモンのシグナル伝達機構において中心的な役割を担うタンパク質である。

我々は、AIP1 によるシグナル伝達のみならず、AIP1 タンパク質が AMT 活性の翻訳後調節に関わる可能性を明確にするために、AIP1 欠損変異体における窒素の輸送と代謝の変化を生理学的に解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物のアンモニウム利用効率を決定する因子

① 二つの環境型 (北米産と西欧産) を交配させることで作成された recombinant inbred lines (RILs) のうち、約 100 系統の種子を用意した。これらの系統群を用いて、アンモニウムを含有しない培地を対照とし、アンモニウムを含有する培地で生育させた側根と主根の長さを評価した。遺伝学的な連鎖解析を行い、アンモニウム栄養によって根の形態を変化させる QTL を同定するための解析を行

った。

② シロイヌナズナの多様な環境型のアンモニウム栄養に対する利用効率を検定するために、様々な窒素濃度の培地で生育を比較した。具体的には、窒素栄養を除いた基本培地に 0.01 から 10 mM のアンモニウムまたは硝酸を添加した培地で環境型群を栽培し、環境型間のアンモニウム栄養に対する利用効率を検証した。

③ 我々は、AMT1 と GS1 が複合体を形成することで、過剰なアンモニウムをアミノ酸へ変換する反応を迅速に行うのではないかと推測した。この仮説を検証するために、GS1 と AMT1 が相互作用するか、GS1 が欠損することで AMT の活性がどのように変化するか調査した。

(2) アンモニウムに応じた側根の形成機構

① シロイヌナズナに 6 種類ある AMT アイソザイムの欠損変異体および多重変異体 (Yuan et al., 2007) と 5 種類ある GS1 について欠損変異体を単離し、交配させることで多重変異体を作成した。

② AMT および GS1 の欠損変異体について、segmented agar plate (Zhang et al., 1998) を用いて、根に局所的に 0.01 から 10 mM のアンモニウムを供給し、側根の形成個数および側根の伸長速度について画像解析ソフトを用いて評価した。

(3) 植物ホルモンの情報伝達系とアンモニウム栄養の利用

① AIP1 欠損変異体について、様々な濃度のアンモニウムを含有する培地で生育させ、アンモニウムの利用効率やアンモニウムの輸送速度、およびアンモニウムの供給に応答した根の形態を研究した。

② 様々な窒素栄養条件で栽培した根より二層分配法を用いて細胞膜画分を調製し、新規に調製した抗 AIP1 抗体を用いたウエスタン解析を行い、AIP1 が細胞膜に局在する可能性を検証することに取り組んだ。また、ポリヒスチジンや myc などの付加配列と AIP1 または AMT を融合タンパク質として発現する形質転換植物を作成して、AMT タンパク質と免疫共沈降実験を行い植物体内における AMT-AIP1 の相互作用を検証することに取り

組んだ。この実験と同時に、スプリットユビキチン法による相互作用の検証も行った。

#### 4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの遺伝的多様性を比較することで、植物のアンモニウム利用効率を規定する因子を分子遺伝学的に同定することが可能であることを示した。

① アンモニウムの供給により根の形態が異なる環境型間の遺伝交配により作製された recombinant inbred line を用いて、QTL 解析を行ったところ、アンモニウムの供給により根の形態を変化させるという形質を担う QTL が染色体上に三か所検出された。

② 世界の様々な場所から取り寄せたシロイヌナズナの環境型間をアンモニウム濃度の異なる培地で生育させたところ、アンモニウム利用効率の高い環境型と低い環境型に大別されることが判明した。

③ 酵母スプリットユビキチン法により、根で高く発現する GS1 と AMT1 分子種がどのような組み合わせで相互作用するか調査したところ、GS1 分子種と AMT1 分子種が確かに相互作用し、その相互作用は特定の分子種間で異なることを発見した。さらに、重窒素標識したアンモニウムの輸送キネティクスを測定したところ、T-DNA の挿入により特定の GS1 分子種の機能を欠損するシロイヌナズナの高親和型アンモニウム輸送のキャパシティが小さくなることを発見した。以上のことから、GS1 と AMT1 が物理的に相互作用することで、アンモニウムを効率的に代謝している可能性が示唆された。

(2) 植物の根系の発達は、植物の栄養状態や、植物が利用できる環境中の栄養状態に強く依存している。硝酸を根へ供給すると側根の伸長が促進されることは既に知られていたが、我々はシロイヌナズナの根へ局所的にアンモニウムを供給すると、側根の数や高次根の枝分かれが促進されることを見いだした。局所的なアンモニウムの供給による側根数の増加や、高次根の枝分かれの促進は、安定同位体標識窒素の蓄積には関連が見られなかったことから、この現象は、植物根の栄養状態の変化による応答ではなくて、根によるアンモニウムの検知によって引き起こされていると考察した。

① 多くの植物で AMT1 も GS1 も多重遺伝子族 (アイソザイム) を構成している。植物は、これらの酵素学的に性質の異なるアイソザイムを、時期・組織特異的に配置することで、様々な環境へ適応している。我々は、アイソザイム間の機能分担を明確にすることで、植物の窒素利用効率を決定する因子を明確に出来ると考えて、GS1 の変異体の単離を行った。その結果、根で発現する GS1 の変異体を全て単離することができた。一部、未完成の組み合わせがあるものの、ほぼすべての多重変異体を作成した。

② アンモニウムによる根の枝分かれの促進効果は、アンモニウムトランスポーター (AMT) を四重に欠損する変異体 (*qko; amt1;1, amt1;2, amt1;3, amt2;1*) では、ほとんど見られなくなり、AMT1;3 を欠損する変異体でも、野生型と比較して有意に減少した。また、AMT1;3 を *qko* や *amt1;3* へ相補した系統では、アンモニウム依存的な側根の枝分かれが回復したが、AMT1;1 では相補することができなかった。以上の結果から、シロイヌナズナ根は、AMT1;3 によってアンモニウムを検知し、根を枝分かれさせることが明らかとなった。これらのことから、植物の根が AMT を介して、環境中のアンモニウムを検知し、根の生育を変化させることが分かった。植物の根が栄養を検知して、効率的に栄養を吸収する機構を明らかにするための分子的な基盤を構築した。

### (3) 植物ホルモンの情報伝達系とアンモニウム栄養の利用

① シロイヌナズナ根へ局所的にアンモニウムを供給すると、高次根の形成が促進されるが、AIP1 の欠損変異体では、局所的アンモニウム供給による高次根の形成の効果が抑制されていることが判明した。この結果は、AIP1 がアンモニウムの検知と、それに引き続く根圏の発達に寄与することを示唆した。また、AIP1 の欠失は、植物個体全体の生育を不全にすること、およびアンモニウムの利用効率が低下することを明らかとした。

② GAL4 酵母 two-hybrid 法により単離したアンモニウム輸送担体 (AMT) 相互作用タンパク質 (AIP1; ammonium transporter interacting protein 1) について、スプリットユビキチン法を新しく用いて、AMT の部分断片ではなく、AMT の全長と AIP1 の相互作用が酵母の細胞膜上で引き起こされることを証明した。また、AMT のアイソザイムと AIP1 の相互作用の序列

を決定したところ、AMT アイソザイムのうち、窒素欠乏状態で高く誘導され、アンモニウム輸送容量の大きい AMT に対して強く相互作用することが判明した。この結果は、AIP1 がアンモニウム輸送の制御に関与する可能性を示唆している。東日本大震災の影響で、超低温フリーザー内の植物試料を消失した結果、植物体における相互作用を検証することができなかった。

### 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 3 件)

1. Lima J, Kojima S, Takahashi H and von Wirén N, Ammonium triggers lateral root branching in Arabidopsis in an AMT1;3-dependent manner, 査読有, Plant Cell, 22, 2011, 3621-3633
2. Tamura W, Kojima S, Toyokawa A, Watanabe H, Tabuchi-Kobayashi M, Hayakawa T and Yamaya T, Disruption of a novel NADH-glutamate synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice, Frontiers in Plant Science, 査読有, 2, 2011, 10.3389/fpls.2011.00057 (DOI)
3. 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, 査読有, Amino Acids, 39, 2010, 1003-1012

[学会発表] (計 3 件)

1. 小島創一、佐々木和浩、大岩優貴、松岡香矢、早川俊彦、佐藤雅志、山谷知行、シロイヌナズナ根のアンモニウム栄養に対する応答の分子遺伝学的な解析、日本土壤肥料学会 2010 年度札幌大会、2010 年 9 月 7 日-9 日、北海道大学
2. Lima J, Kojima S, Takahashi H and von Wirén N, Localized ammonium supply increases lateral root branching, Nitrogen2010, 1st International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, 2010 年 7 月 26 日-30 日、犬山国際センター
3. Kojima S, Oiwa Y, Schüssler D, Yoshida K, Matsuoka K, Hayakawa T, Yamaya T, von Wirén N, Interplay between ammonium transport and auxin signaling, Nitrogen2010, 1st International Symposium on the

Nitrogen Nutrition of Plants、2010  
年7月26日-30日、犬山国際センター

〔図書〕(計1件)

1. Soichi Kojima, Toshihiko Hayakawa,  
Nicolaus von Wirén, Tomoyuki Yamaya、  
Nitrogen Assimilation in Plants、  
Research Signpost、2010、56-61 (全  
378 ページ)

〔その他〕

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

小島 創一 (KOJIMA SOICHI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30462683