

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25年5月24日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21780235

研究課題名（和文）植物の栄養素吸収と水吸収の相互作用に関する研究

研究課題名（英文） Mechanism of the interaction of nutrient and water uptake in plants

研究代表者

石川 淳子 (ISHIKAWA JUNKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産基盤研究領域・主任研究員

研究者番号：40343959

研究成果の概要（和文）：植物の栄養素吸収と水分吸収は相互作用することが知られているが、その作用機作の詳細は不明である。前者が後者に及ぼす影響として、本研究ではイネを材料に用い、水耕液の窒素濃度に応じて根の水透過性が変化すること、それにはアクアポリンという水を通す膜タンパク質の発現量の変化が密接に関わることを明らかにした。一方、後者が前者に及ぼす影響として、水分吸収が著しく制限される場合には窒素吸収も抑制されるが、マイルドな水ストレス下では抑制されないことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Uptake of nutrients and water affect to each other, however, the mechanism involved is not fully understood. In this work, we clarified that nitrogen availability changed root hydraulic conductivity of rice plants through changes in the gene expression levels of aquaporins which facilitate root water uptake. We also demonstrated that severe water stress caused decrease in the nitrogen uptake, while, mild water stress didn't.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	0	0	0
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：栄養素吸収、水分吸収、イネ、アクアポリン、窒素輸送体

1. 研究開始当初の背景

植物の栄養素吸収と水分吸収は異なるシステムによって行われているため、それぞれの機能について個別に解析されることが多い。しかし近年、両者が互いに密接な相関関係を持ち植物に影響を及ぼすことが明らかにされつつある。例えば、根の周囲の栄養条件が変化することにより吸水量も変化する

ことが複数の植物で報告されている。コムギでは5日間の窒素飢餓処理で根の水透過性（単位根あたりの水の通りやすさ）が4分の1以下に、また7日間のリン酸飢餓処理で3割程度まで低下する。しかし、飢餓状態の後に窒素あるいはリン酸を添加すると、1日以内に水透過性が回復する。これは、植物の水透過性が栄養条件によって可逆的に調節さ

れることを示している。この現象の重要なポイントは、根の周囲の栄養素濃度の変化に応じて単位根あたりの水透過性が変化する、すなわち栄養条件の変化に応じた植物体のバイオマス量の増減とは独立して、直接的に根の水透過性が制御されるという点にある。おそらく根の周囲の栄養条件の変化に応じて根の吸水機能に「質」的な変化が起こっているものと考えられる。しかし、この作用機作についてはまだ不明な点が多い。一方、土壌の乾燥など水ストレス条件が栄養素吸収に及ぼす影響についても、詳細な解析や関与するメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、栄養素吸収と水分吸収の相互作用を定量的に評価するとともに、そのメカニズム解明を目指して研究を行う。具体的には、根の周囲の栄養条件の変化が吸水量に与える影響の定量化を目指す。またその逆の反応、すなわち水ストレス条件の変化が栄養素吸収に与える影響も定量化する。さらにこの相互作用に関わるメカニズムを明らかにするために、水の吸収に関わるアクアポリンや栄養素の吸収に関わる窒素輸送体といった生体分子に着目してその遺伝子発現量の動きを探る。これらの結果から、根の周囲の栄養条件や水ストレス条件の変化に伴い、根でどのような「質」的な変化が起こっているのかを具体的に明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 根の周囲の窒素濃度の変化が根の吸水機能に及ぼす影響

①植物材料と栽培方法

イネ（あきたこまち）を水耕栽培し、水耕液の窒素濃度の変化による根の吸水機能の変化を解析した。種子を3日間暗黒下で催芽し（これを3-day-oldとする）、15-day-oldまで窒素濃度20あるいは10ppm(0.714あるいは0.357mM NH_4NO_3)の水耕液（その他の栄養素の組成については発表論文②を参照）を用いて、人工気象室（明期25°C/暗期20°C、明期12時間、光強度450 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ 、相対湿度75%）で栽培した。

②窒素処理

15-day-oldの明期開始時から、窒素濃度0.2ppmを含む水耕液に移して低窒素処理を行った。対照区は窒素濃度20あるいは10ppmのままとした。この処理を48~72時間行った後、一部のイネについては窒素濃度20あるいは10ppmの水耕液に移して窒素再添加処理を行った。残りのイネは窒素濃度0.2ppmの水耕液のままとした。この処理を48時間行った。水耕液は毎日交換し、また温度影響を受けないように、全ての窒素処理は恒温槽

を用いて25°Cの一定地温で制御した。

③split root 実験

13-day-oldの植物体の根を半分に分け、それぞれを450mLの水耕液につけて、さらに3日間栽培した。16-day-oldの明期開始時から、根の片側を窒素濃度0.2ppmの水耕液で2日間、その後10ppmの水耕液で2日間処理を行った。もう片側の根は10ppmで2日間、その後0.2ppmで2日処理間を行った。対照区については、両側の根ともに10ppmの水耕液で4日間栽培した。水耕液は毎日交換した。

④根の形態

根を1000dpiの解像度でスキャナーに読み取り、WinRhizo (ver. 2007d)を用いて根の表面積を求めた。表面積測定後の根は80°Cのオーブンで3日以上乾燥させ、乾物重を測定した。同時に地上部の乾物重も測定した。

⑤根の水透過性

根の水透過性はosmotic hydraulic conductivityとして測定した（詳細は発表論文②参照）。測定は温度の影響を受けないように、水耕液を25°Cに保って行った。

⑥根の遺伝子発現解析

アクアポリン、窒素輸送体の各遺伝子発現量は、リアルタイムPCR法によって定量した（詳細は発表論文②参照）。

(2) 根の周囲の水ストレス条件の変動が窒素吸収に与える影響

①植物材料と栽培方法

(1)-①に同じ。ただし、17-day-oldまで栽培し、水耕液の窒素濃度は10ppm(0.357mM NH_4NO_3)とした。

②水ストレス処理

18-day-oldの明期開始時から、水耕液に-0.2MPa、-1.0MPaあるいは-1.5MPaとなるようにマンニトールを添加して24時間処理を行った。対照区にはマンニトールを添加しない水耕液を用いた。温度影響を受けないように、処理は恒温槽を用いて25°Cの一定地温で制御した。

③窒素吸収量の測定

窒素吸収量は水耕液中の NO_3^- と NH_4^+ 含量の減少から求めた。これらの濃度はF-kit（硝酸）、F-kit（アンモニア）を用いて測定した。

④根の遺伝子発現解析

(1)-⑥に同じ。

4. 研究成果

(1) 根の周囲の窒素濃度の変化が根の吸水機

能に及ぼす影響

①根の形態に及ぼす影響

合計 106 時間の窒素処理後、対照区と処理区の葉齢にはほぼ差がなかったが、根の表面積は低窒素区で対照区より増加した。同様に、低窒素区では根の分配率（乾物重全体に占める根の割合）が対照区に比べ有意に増加した。以上の結果は過去に他の植物でも報告されている知見と一致した。低窒素処理による根量の増加は、窒素制限下で限られた窒素を得るための植物の形態的な適応戦略と考えられる。

②根の水透過性に及ぼす影響

イネの根の水透過性は日周変動する（詳細については発表論文②を参照）ため、図 1 のように低窒素及びその後の窒素再添加の全処理区において、根の水透過性は日周変動を示した。

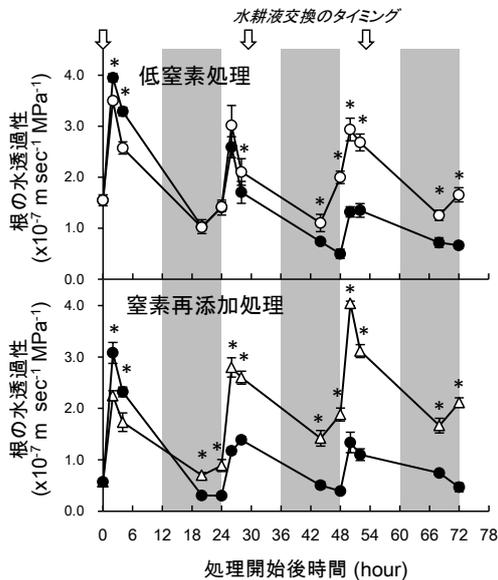


図1 低窒素処理及びその後の窒素再添加処理による根の水透過性の変化

図1上 ○: 対照区(10ppm)、●: 低窒素区(0.2ppm)。
 図1下 ●低窒素48時間処理後に引き続き低窒素処理区、△: 低窒素48時間処理後に窒素再添加(20ppm)処理区。
 エラーバーは標準偏差(n=5)を示す。*は5%水準で有意であることを示す。グレーの範囲は人工気象室の夜間の時間帯を示す。矢印は水耕液を交換したタイミングを示す。

低窒素処理の場合、低窒素区の根の水透過性は処理開始 28 時間後以降、対照区より有意に低下し、日周変動の振幅が次第に小さくなった（図 1 上）。一方、低窒素処理 48 時間後に窒素再添加処理を行った場合、再添加区の根の水透過性は、引き続き低窒素処理を行ったイネに比べて有意に増加し、20 時間後以降、日周変動の振幅も次第に大きくなった（図 1 下）。窒素飢餓による根の水透過性低下と再添加後の回復は、コムギ、ミヤコグサ等の植物で報告されている結果と一致した。

低窒素処理とその後の再添加処理のどちらにおいても、処理開始直後に、全ての処理区で根の水透過性の一時的な増加が見られた（図 1）。これは水耕液を交換した効果によるものと考えられる。交換前の水耕液に比べて、交換後の水耕液は相対的に栄養成分が多いために、一時的に水透過性が上昇すると推察される。トウモロコシ、トマト、ヒマワリ等の植物では、窒素飢餓後の窒素再添加により、1 時間以内に根の水透過性が増加することが明らかにされている。この現象には、アクアポリンの量ではなく、活性レベル（アクアポリンゲートの開閉あるいは細胞膜への局在）での調節が関わっている可能性が指摘されている。水耕液交換がイネの水透過性を一時的に上昇させる現象についても、同様のメカニズムがはたしているのかどうか今後の検討が必要である。

③根の遺伝子発現に及ぼす影響

イネの根のアクアポリン遺伝子発現量は日周変動する（詳細については発表論文②を参照）。図 2, 3（いずれも左側）に示すように、根からの吸水に最も貢献すると考えられる 2 種類の細胞膜型アクアポリン *OsPIP2;1* と *OsPIP2;5* の遺伝子発現量は、低窒素及びその後の窒素再添加の全処理区において日周変動を示した。

低窒素区のアクアポリン遺伝子発現量は、処理開始 20~24 時間後以降、対照区より低下し、日周変動の振幅が次第に小さくなった（図 2 左）。このアクアポリン遺伝子発現量の低下は水透過性の低下（図 1 上）よりやや早く始まっているが、両者は似たパターンを示したことから、アクアポリン遺伝子発現量の低下が根の水透過性低下に密接に関わっていることが示唆された。一方、窒素の輸送に関わるアンモニア輸送体 *OsAMT1;3* 及び硝酸輸送体 *OsNRT2;3* の遺伝子発現量は、低窒素処理開始 2~4 時間後にすみやかに、かつ強く誘導され、その後も高発現量を維持した（図 2 右）。

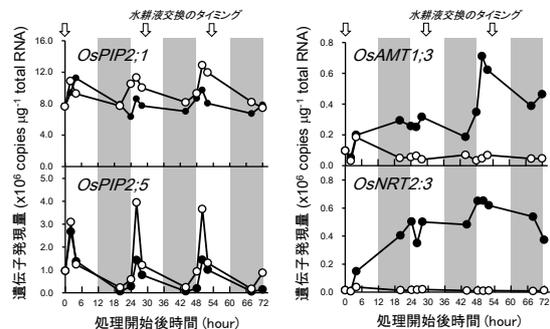


図2 低窒素処理による根の遺伝子発現量の変化

○: 対照区(10ppm)、●: 低窒素区(0.2ppm)。グレーの範囲は人工気象室の夜間の時間帯を示す。矢印は水耕液を交換したタイミングを示す。

低窒素処理後の窒素再添加処理時には、窒素輸送体遺伝子発現量は、2 時間後からすみやかに減少し、低窒素処理前のレベルに戻った (図 3 右)。一方、アクアポリン遺伝子発現量の増加はそれよりも遅れ、処理開始 20 ~ 24 時間後以降、低窒素区より増加し始め、日周変動の振幅も次第に大きくなった (図 3 左)。処理開始数時間後の発現量は変化せず、24 時間後以降に増加するという結果は、トウモロコシやトマトでの報告と一致した。アクアポリン遺伝子発現量の増加は水透過性の回復 (図 1 下) と似たパターンを示したことから、アクアポリン遺伝子発現量の増加が根の水透過性回復に密接に関わっている可能性が示唆された。

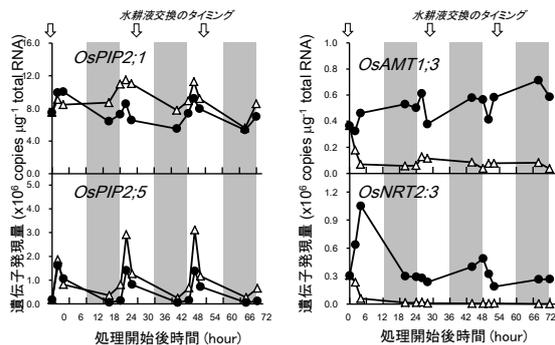


図3 低窒素処理及後の窒素再添加処理による根の遺伝子発現量の変化

●: 低窒素 (0.2ppm) 48時間処理後に引き続き低窒素処理区、△: 低窒素48時間処理後に窒素再添加(20ppm)処理区。グレーの範囲は人工気象室の夜間の時間帯を示す。矢印は水耕液を交換したタイミングを示す。

④根の周囲の窒素濃度の変化自体が遺伝子発現に及ぼす影響

Split root 実験において、窒素輸送体遺伝子は、低窒素処理側の根のみで発現誘導されたのに対し (図 4 右)、アクアポリン遺伝子発現量は低窒素処理側でも対照区側でもほとんど変化しなかった (図 4 左)。このことから、窒素輸送体は根が接している外液の窒素濃度の変化により直接遺伝子発現が制御されるのに対し、アクアポリン遺伝子発現は窒素濃度自体には応答しないことが明らかとなった。窒素濃度に対するアクアポリン遺伝子発現量の応答が窒素輸送体等と比べて遅い (図 2, 3) ことから、アクアポリン遺伝子発現は根の周囲の窒素濃度に直接応答するのではなく、イネ体内の窒素栄養状態により制御されているのではないかと考えられる。Split root 実験では、片側の根が低窒素条件にさらされていても、反対側の窒素濃度の高い溶液側の根から十分な窒素を取り込むことができるので、イネ体内の窒素栄養状態は悪くならず、その結果としてアクアポリン遺伝子発現量は低下しないものと推察される。一方、根全体を低窒素条件下にお

いた場合には、窒素輸送体等の遺伝子発現制御が優先して行われる一方で、窒素栄養状態の悪化に伴い徐々にアクアポリン遺伝子発現が抑制されると考えられる (図 2)。窒素再添加処理により窒素栄養状態が良くなると、アクアポリン遺伝子発現が再び誘導されると考えられる (図 3)。

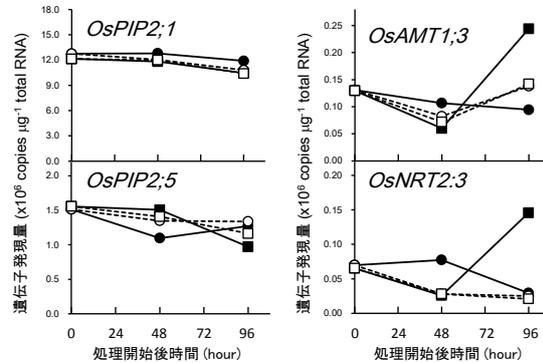


図4. Split root実験における遺伝子発現量の変化
根を半分に分け、それぞれ異なる窒素濃度で処理した。○: 対照区の根の片側 (10ppmを4日間)、□: 対照区の根の反対側 (10ppmを4日間)、●: 窒素処理区の片側 (低窒素0.2ppmを2日間→10ppmを2日間)、■: 窒素処理区の反対側 (10ppmを2日間→0.2ppmを2日間)。

(2) 根の周囲の水ストレス条件の変動が窒素吸収に与える影響

①激しい水ストレスの場合

-1MPa の激しい水ストレスを 24 時間与えた場合、窒素源である NO_3^- 及び NH_4^+ 吸収量はそれぞれ対照区より 62%及び 73%低下した。根の表面積は 15%程度しか低下しなかったことから、単位根あたりの窒素吸収量が大きく低下したと考えられる。また-1.5MPa の水ストレスを 24 時間与えた場合には、硝酸輸送体遺伝子 *OsNRT2;1* 及びアンモニア輸送体 *OsAMT1;3* の発現量はそれぞれ対照区の 7.5%及び 61%まで低下した。激しい水ストレス条件下における単位根あたりの窒素吸収量の低下には、窒素輸送体遺伝子発現量の低下が密接に関わっているのではないかと考えられる。

②ゆるやかな水ストレスの場合

-0.2MPa のゆるやかな水ストレスを与えた場合、 NO_3^- と NH_4^+ の吸収量は対照区 (0MPa マンニトール処理) と大差なかった (図 5)。根の表面積にも大きな変化は見られなかったことから、単位根あたりの窒素吸収量に変化はないと考えられる。また、硝酸やアンモニア輸送体等の遺伝子発現量は、処理開始 4 時間後に一過的に対照区より減少したものの、24 時間後までに大きな変化は見られなかった (図 6)。なお、対照区・処理区に関わらず系時的な変化が見られるのは、日周変動あるいは水耕液の窒素成分の減少に伴う発現誘導ではないかと考えられる。以上の結果から、-0.2MPa 程度のゆるやかな水ストレス時

には、窒素吸収はほとんど影響を受けないことが明らかとなった。水ストレス時における窒素吸収の変化については、24時間以上処理した場合について、また水ストレス処理の程度をさらに幅広く取って詳細に検討を進める必要がある。

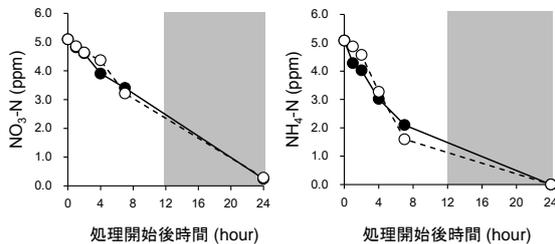


図5. マイルドな水ストレス(-0.2MPa)時における窒素吸収量の変化

処理開始時にNO₃-N (5.0ppm) + NH₄-N (5.0ppm)の水耕液を与え、その後の各窒素成分の残存濃度を測定した。○: 対照区 (0MPa)、●: 処理区(-0.2MPa)。グレーの範囲は人工気象室の夜間の時間帯を示す。

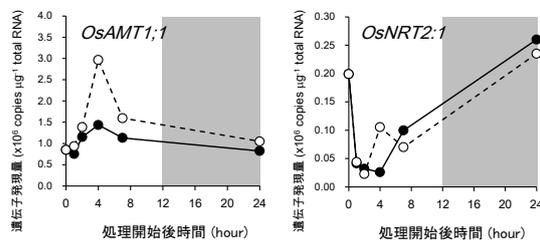


図6. マイルドな水ストレス(-0.2MPa)時における窒素輸送体遺伝子発現量の変化

○: 対照区 (0MPa)、●: 処理区(-0.2MPa)。グレーの範囲は人工気象室の夜間の時間帯を示す。

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2件)

① 石川 (櫻井) 淳子、村井 (羽田野) 麻理 (2012) イネが環境に応じて水分量を調節するしくみ。化学と生物。50: 402-403 (査読なし)

http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/kasei_contents/vol50_6_2012.html

② Junko Sakurai-Ishikawa, Mari Murai-Hatano, Hidehiro Hayashi, Arifa Ahamed, Keiko Fukushi, Tadashi Matsumoto, Yoshichika Kitagawa (2011) Transpiration from shoots triggers diurnal changes in root aquaporin expressions. Plant, Cell & Environment. 34: 1150-1163 (査読あり) DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02313.x

[学会発表] (計3件)

① Junko Ishikawa-Sakurai, Hidehiro Hayashi, Mari Murai-Hatano. Adaptation of rice roots to nitrogen: adjustment of

morphology and water uptake through changes in aquaporin expressions. International Workshop on Plant Membrane Biology 2013. 2013年3月26日~3月31日、倉敷市芸文館

② 櫻井 (石川) 淳子、林秀洋、アハメードアリファ、村井 (羽田野) 麻理、水耕液の窒素濃度がイネの根の水透過性及びアクアポリン遺伝子発現に及ぼす影響、日本作物学会第229回講演会、2010年3月30-31日、宇都宮大学

③ 櫻井 (石川) 淳子、村井 (羽田野) 麻理、林秀洋、アハメードアリファ、福士敬子、松本直、北川良親、イネの根のアクアポリン遺伝子発現量の日周変動は地上部からの蒸散要求により引き起こされる、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18-21日、熊本大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 淳子 (ISHIKAWA JUNKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産基盤研究領域・主任研究員

研究者番号: 40343959

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

村井 麻理 (MURAI MARI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産基盤研究領域・主任研究員

研究者番号: 00343971