

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580090

研究課題名(和文) イネ根におけるアンモニウム態窒素過剰摂取抑制の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying avoidance of excess ammonium uptake into roots in rice

研究代表者

早川 俊彦 (Hayakawa, Toshihiko)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60261492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)： 窒素栄養は、植物の多量要求性栄養素であり、その生育や生産性を支配する。水田栽培のイネは、外来窒素源として主にアンモニウムを吸収・利用するが、高濃度アンモニウム供給は、多くの陸上植物に有害である。高濃度アンモニウム供給下の植物根では、高親和性アンモニウム吸収が負に制御されるが、この詳細な分子機構は不明であった。本研究結果として、高濃度アンモニウム供給下のイネ根において、タンパク質キナーゼOsACTPK1が、体内の利用可能な炭素骨格量に応じて、原形質膜のアンモニウム輸送関連タンパク質の輸送活性の制御に関わることが示唆された。この知見は、植物根の過剰アンモニウム摂取回避機構の理解の端緒となる。

研究成果の概要(英文)： Nitrogen is an essential macronutrient required in quantity for plant growth and productivity. Rice grown in flooded paddy fields chiefly takes up and uses an inorganic form of soil ammonium as an external nitrogen source; however, a sole supply of ammonium at high concentration frequently causes toxic effects to many terrestrial plants. Down-modulation of the high-affinity transport system for ammonium uptake into plant roots in response to an increasing ammonium supply is important for preventing ammonium-toxicity in plants. In this study, a protein kinase OsACTPK1 was suggested to be involved in negative modulation of ammonium transport activity of plasma membrane proteins associated with ammonium uptake in rice roots in response to an ascending external ammonium and possibly to internal carbon availability. This finding will provide a cue for better understanding of molecular mechanisms for preventing excess ammonium uptake into roots.

研究分野：植物分子栄養学

キーワード：遺伝子 シグナル伝達 植物 生理学 発現制御 植物代謝調節

1. 研究開始当初の背景

植物にとって、窒素は、生育や生産性を支配する多量要求性栄養素である。嫌気的な水田で栽培されるイネは、主に過敏反応性のアンモニウムを吸収・利用する。高濃度アンモニウム供給は、種々の植物に障害を引き起こすが(引用文献①)、好アンモニウム性イネでも根の伸長が抑制される(引用文献②)。イネの根細胞の原形質膜のアンモニウム輸送では、低濃度と高濃度のアンモニウム供給下で高親和性と低親和性の吸収系(HATSとLATS)が各々主に機能する(引用文献③、④)。アンモニウム輸送担体1(AMT1)はHATSを構成し、イネ根では3分子種のAMT1(*OsAMT1;1*-*OsAMT1;3*)が発現する(引用文献⑤)。特に、高濃度アンモニウム供給下の植物根では、高親和性アンモニウム吸収が負に制御されるが、この詳細な分子機構は不明であった。

申請者は、外来アンモニウム供給充分条件下のイネ幼植物根で著しく発現する遺伝子をトランスクリプトーム検索し、アミノ酸等の低分子代謝中間体を結合して酵素活性を制御するACTドメインを有するセリン/スレオニン/チロシン二重特異性タンパク質キナーゼ様遺伝子(*OsACTPK1*)を見出した。申請者は、レトロトランスポゾン*Tos17*挿入*OsACTPK1*遺伝子破壊イネと*OsACTPK1*遺伝子非破壊分離系統イネ(対照系統)を獲得し、さらに解析を進めた。その結果、*OsACTPK1*遺伝子破壊イネ幼植物では、対照系統と比較して、アンモニウム供給充分条件下で、根の成長阻害及びアンモニウムと遊離アミノ酸の蓄積量の顕著な増加が認められ、地上部生育量・窒素集積量が増加した。また、外来アンモニウム供給充分条件下で栽培した*OsACTPK1*遺伝子破壊イネ幼植物と対照系統幼植物の根の重窒素標識アンモニウム($^{15}\text{NH}_4^+$)吸収速度解析を行ったところ、*OsACTPK1*遺伝子破壊イネ幼植物根では、 $^{15}\text{NH}_4^+$ 吸収速度は、対照系統の約2倍に増加し、これは、HATSの V_{\max} 値が低下していないことに起因した。この結果は、*OsACTPK1*が、外来アンモニウム充分条件下において、イネ幼植物根のアンモニウム吸収を負に制御し得る因子である可能性を示唆した。

2. 研究の目的

本研究では、*OsACTPK1*に着目して、イネ根のアンモニウム過剰摂取抑制の分子機構を解明することを目的とした。

具体的には、以下の解析を行うこととした。

- (1) *OsACTPK1*のタンパク質リン酸化機能解析と機能制御エフェクター分子の探索
- (2) *OsACTPK1*とイネアンモニウム輸送関連タンパク質群との機能的関連性の解析
- (3) 外来アンモニウム供給充分・過剰条件下のイネ幼植物根における*OsACTPK1*の組織・細胞内分布の解析
- (4) 正常*OsACTPK1*遺伝子を*OsACTPK1*遺伝子破壊イネに導入した形質転換体の作出と

機能相補試験

3. 研究の方法

(1) *OsACTPK1*のタンパク質リン酸化機能解析と機能制御エフェクター分子の探索:

大腸菌内発現組換え(*rOsACTPK1*とACTドメイン欠失(Δ ACT-) *rOsACTPK1*の各精製標品の *in vitro*での自己及び人工被リン酸化タンパク質基質(ミエリン塩基性タンパク質MBP)に対するリン酸化活性を反応速度論的に解析した。また、そのリン酸化活性に及ぼす添加アミノ酸等の影響を定量的・反応速度論的に解析し、リン酸化機能を制御するアミノ酸等の低分子代謝中間体を探索した。リン酸化アミノ酸抗体を用いたウエスタンブロット解析により、*rOsACTPK1*リン酸化活性のセリン/スレオニン/チロシン二重特異性を検討した。

(2) *OsACTPK1*とイネアンモニウム輸送関連タンパク質群との機能的関連性の解析:

膜タンパク質との相互作用解析が可能なスプリットユビキチン型酵母Two-hybrid法により、*OsACTPK1*とアンモニウム輸送関連タンパク質群の相互作用を解析した。*rOsACTPK1*の各アンモニウム輸送関連タンパク質群に対するリン酸化修飾の有無を解析した。また、アンモニウム輸送担体欠損酵母株内にて、*OsACTPK1*とアンモニウム輸送関連タンパク質群を単独または共発現させて、アンモニウムを単独の窒素源とした場合の生育やアンモニウム吸収速度の比較解析を試みた。

(3) 外来アンモニウム供給充分・過剰条件下のイネ幼植物根における*OsACTPK1*の組織・細胞内分布の解析:

粒子銃法を用いた*OsACTPK1*遺伝子自己プロモーター-*OsACTPK1*cDNA-緑色蛍光タンパク質遺伝子(*GFP*)キメラ遺伝子のイネ培養細胞内一過発現系での共焦点レーザー顕微鏡解析で、*OsACTPK1*の細胞内存在場所を同定した。また、アグロバクテリウム法により、同自己プロモーター-*OsACTPK1*cDNA- β -グルクロニダーゼ遺伝子(*GUS*)キメラ遺伝子を導入したイネ形質転換体を作成し、*OsACTPK1*遺伝子発現のアンモニウム応答性と組織・器官特異性を検討した。

(4) 正常*OsACTPK1*遺伝子を*OsACTPK1*遺伝子破壊イネに導入した形質転換体の作出と機能相補試験:

自己プロモーター制御下の*OsACTPK1*cDNA-*GFP*キメラ遺伝子をアグロバクテリウム法により*OsACTPK1*遺伝子破壊イネに導入し、形質転換体を選抜した。導入遺伝子ホモ固定後代での、生育・全窒素量・全炭素量・遊離アミノ酸含量・アンモニウム含量及び根の重窒素標識アンモニウム吸収速度を解析して、機能相補試験を行うことを計画した。

4. 研究成果

(1) OsACTPK1 のタンパク質リン酸化機能と機能制御エフェクター分子の探索

rOsACTPK1 と DeltaACT-rOsACTPK1 の大腸菌内大量発現系と高度精製系を構築した。in vitro 自己リン酸化後の抗リン酸化アミノ酸抗体を用いたウエスタンブロット解析から、rOsACTPK1 は、Mn²⁺依存性セリン/スレオニン/チロシンタンパク質キナーゼであることが判明した。in vitro リン酸化後の Phos-tag アクリルアミドゲル電気泳動法解析により、rOsACTPK1 と DeltaACT-rOsACTPK1 の各精製標品の MBP に対するリン酸化活性を確認した。さらに、in vitro では、rOsACTPK1 のタンパク質リン酸化活性は、アミノ酸の添加では影響されないが、アンモニウム初期同化系への炭素骨格供給に関わる TCA サイクル由来の有機酸の添加で有意に阻害されることが判明した。一方、DeltaACT-rOsACTPK1 のタンパク質リン酸化活性も同様な有機酸で阻害されたため、ACT ドメインは有機酸による活性阻害には関与しないことが判明した。また、特に阻害効果の高かったクエン酸は非競争阻害を示し、その *K_i* 値から、植物細胞内サイトゾルの推定クエン酸濃度(引用文献⑥、⑦)で OsACTPK1 のリン酸化活性阻害が顕著に生ずることが示唆された。

(2) OsACTPK1 とイネアンモニウム輸送関連タンパク質群との機能的関連性

スプリットユビキチン型酵母 Two-hybrid 解析で、OsACTPK1 がイネ根のアンモニウム輸送に関わる原形質膜タンパク質と相互作用することが示唆された。さらに、in vitro で、rOsACTPK1 が、上記原形質膜タンパク質群をリン酸化することと、このリン酸化が、アンモニウムイオン初期同化系への炭素骨格供給に関わる有機酸で阻害されることが判明した。一方、内在性アンモニウム輸送体欠損酵母株は、アンモニウムを単独の窒素源として供給した場合、生育しないが、上記のアンモニウム輸送関連タンパク質を発現させると生育できた。また、OsACTPK1 とアンモニウム輸送関連タンパク質群を共発現させた同酵母変異株は、アンモニウム輸送関連タンパク質を単独発現した同酵母変異株と比較して、アンモニウムを単独窒素源供給した場合に生育が阻害された。今後、OsACTPK1 とアンモニウム輸送関連タンパク質群を単独または共発現させた同酵母変異株におけるアンモニウム吸収の比較解析を行う予定である。

(3) OsACTPK1 遺伝子発現の窒素特異的応答性、根における組織・細胞特異性及びその翻訳産物の細胞内存在場所

OsACTPK1 転写産物の根での発現は、充足濃度アンモニウム供給に特異的に応答し、硝酸イオン供給などでの応答は低いことが判明した。また、自己プロモーター-OsACTPK1

cDNA-GFP キメラ遺伝子を粒子銃法にて一過的にイネ培養細胞に導入後、充足濃度アンモニウム処理し、共焦点レーザー顕微鏡観察した結果では、OsACTPK1-GFP 融合タンパク質は主にサイトゾルに局在した。このことは、OsACTPK1 タンパク質が、原形質膜にアクセス可能なサイトゾルに主に蓄積することを示す。自己プロモーター-OsACTPK1 cDNA-GUS キメラ遺伝子導入イネ日本晴 T1 世代の解析では、OsACTPK1 遺伝子のプロモーター活性は、高濃度アンモニウムイオン供給に特異的に応答して根のほぼ全ての細胞群で発現した。この結果は、上記の被リン酸化原形質膜アンモニウム輸送関連タンパク質が根のどの細胞で発現・蓄積しても、OsACTPK1 の被リン酸化修飾制御が可能であることを示唆する。

(4) 正常 OsACTPK1 遺伝子を OsACTPK1 遺伝子破壊イネに導入した形質転換体の作出と機能相補試験

機能相補試験のため、自己プロモーター-OsACTPK1 cDNA-GFP キメラ遺伝子を OsACTPK1 遺伝子破壊イネに導入後、T1 後代を得た。現在、導入遺伝子がホモ固定された後代を選抜中であり、機能相補試験完遂には至らなかった。

以上から、高濃度アンモニウム供給に応答して、サイトゾル局在型タンパク質キナーゼ OsACTPK1 がイネ根で発現蓄積し、OsACTPK1 が、原形質膜のアンモニウム輸送関連タンパク質の輸送活性の、利用可能な体内炭素骨格量に応じたリン酸化活性制御に関わることが示唆された。本研究の成果として、タンパク質キナーゼを介した外来アンモニウム濃度情報と体内炭素骨格利用性情報のクロストークによる効率的なアンモニウム吸収の動的制御系の存在が新規に示唆された。この知見は、植物根の過剰アンモニウム摂取回避の分子機構の理解の端緒となるとともに、イネにおける窒素利用の効率化と生育・生産性向上の重要な分子基盤となると思われる。

<引用文献>

- ① Britto, D.T., Kronzucker, H.J., NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review, J. Plant Physiol., 159 巻、2002、567-584
- ② Hirano T., Satoh Y., Ohki A., Takada R., Arai T., Michiyama H., Inhibition of ammonium assimilation restores elongation of seminal rice roots repressed by high levels of exogenous ammonium, Physiol. Plant., 134 巻、2008、183-190
- ③ Wang, M.Y., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., Glass, A.D.M., Ammonium uptake by rice roots. I. Fluxes and subcellular distribution of ¹⁵NH₄⁺, Plant Physiol., 103 巻、1993、1249-1258

- ④ Wang, M. Y.、Siddiqi, M. Y.、Ruth, T. J.、Glass, A. D. M.、Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma, *Plant Physiol.*、103 卷、1993、1259-1267
- ⑤ Kumar, A.、Silim, S. N.、Okamoto, M.、Siddiqi, M. Y.、Glass, A. D. M.、Differential expression of three members of the *AMT1* gene family encoding putative high-affinity NH_4^+ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies *indica*, *Plant Cell Environ.*、26 卷、2003、907-914
- ⑥ Farré E. M.、Tiessen A.、Roessner U.、Geigenberger P.、Trethewey R. N.、Willmitzer L.、Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato using a nonaqueous fractionation method, *Plant Physiol.*、127 卷、2001、685-700
- ⑦ Farre, E. M.、Fernie, A. R.、Willmitzer, L.、Analysis of subcellular metabolite levels of potato tubers (*Solanum tuberosum*) displaying alterations in cellular or extracellular sucrose metabolism, *Metabolomics*、4 卷、2008、161-170

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 大橋 美和、石山 敬貴、小島 創一、小西 範幸、中野 健太郎、菅野 圭一、早川 俊彦、山谷 知行、Asparagine synthetase1, but not asparagine synthetase2, is responsible for the biosynthesis of asparagine following the supply of ammonium to rice roots, *Plant Cell Physiol.*、査読有、56 卷、2015、769-778、DOI: 10.1093/pcp/pcv005
- ② 舟山 和宏、小島 創一、田淵 真由美、澤 勇己、中山 洋佑、早川 俊彦、山谷 知行、Cytosolic glutamine synthetase1;2 is responsible for the primary assimilation of ammonium in rice roots, *Plant Cell Physiol.*、査読有、54 卷、2013、934-943、DOI: 10.1093/pcp/pct046

[学会発表] (計 4 件)

- ① 早川 俊彦、山谷 知行、Down-regulation of ammonium uptake into plant roots under high concentration of external ammonium, Mineral transport and sensing in plants, 日本土壤肥料学会 2014 年度東京大会シンポジウム(招待講演)、2014 年 9

月 11 日、「東京農工大学 (東京都・府中市)」

- ② 大橋 美和、石山 敬貴、小島 創一、早川 俊彦、山谷 知行、イネの根における AS 分子種の生理的な役割と制御機構の解明、日本土壤肥料学会 2014 年度東京大会、2014 年 9 月 9 日、「東京農工大学 (東京都・府中市)」
- ③ 早川 俊彦、山谷 知行、植物の三大栄養素(N-P-K)の感知と利用の新理解、イネ根におけるアンモニウム態窒素吸収の負の制御の新理解、第 55 回日本植物生理学会年会シンポジウム(招待講演)、2014 年 3 月 18 日、「富山大学五福キャンパス (富山県富山市)」
- ④ 早川 俊彦、小原 実広、谷合 彰子、澤 勇己、石澤 仁、小島 創一、山谷 知行、Rice novel protein kinase involved in regulation of ammonium uptake into roots under high concentration of external ammonium、2nd International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants、2013 年 11 月 18 日-11 月 22 日、「Puerto Varas (チリ)」

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻植物機能科学講座植物細胞生化学分野ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 俊彦 (HAYAKAWA, Toshihiko)

東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 60261492

(2) 研究分担者

無し。

(3) 連携研究者

無し。