

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21114003

研究課題名(和文)窒素制限条件下の光合成機能と生産性に与える高CO₂環境の影響の解明研究課題名(英文)Effects of high CO₂ on photosynthesis and plant productivity under nitrogen-limited conditions

研究代表者

小俣 達男(Omata, Tatsuo)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：50175270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 103,000,000円、(間接経費) 30,900,000円

研究成果の概要(和文)：硝酸イオンの吸収に欠陥をもつシロイヌナズナ変異株を利用することにより、野外で一般的な「恒常的窒素不足状態」を実験室内に再現し、高CO₂環境への応答を調べた結果、窒素供給量が少ない場合にシロイヌナズナは高CO₂条件によって窒素欠乏様の症状を呈するが、主要代謝産物の恒常性は保たれることが明らかになった。また、窒素同化能力が特に低く、窒素に対して感受性を示すモウセンゴケを用いた解析から、窒素過剰による障害が高CO₂条件により緩和されることを示した。さらに窒素過剰による障害の一因が亜硝酸イオンの蓄積であることを示して、この関連から葉緑体包膜上の新規亜硝酸イオン輸送体を同定した。

研究成果の概要(英文)：Using a nitrate-transport-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*, effect of high CO₂ on plant growth under limited nitrogen supply was examined. During growth under high CO₂ but not under low CO₂, the mutant seedlings developed well-known symptoms of nitrogen-starved plants, including decreased shoot/root ratio and accumulation of anthocyanin, but the plant also showed increased chlorophyll content, which was contradictory to the known effect of nitrogen-depletion. A high-CO₂-responsive change specific to the mutant was not observed in the levels of the major metabolites; Similar CO₂ responses were observed in WT and the mutant. Elevated CO₂ thus causes nitrogen limitation in the seedlings grown with a constantly limited supply of nitrogen, but the chlorophyll content and the root biomass of the plant increase to enhance the activities of both photosynthesis and nitrogen uptake, while maintaining normal metabolism and response to high CO₂.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：植物 環境 二酸化炭素 生産性 光合成

1. 研究開始当初の背景

(1)大気中の CO₂ 濃度の上昇が指摘されて以降、CO₂ 濃度を 350~370ppm から 700~1000ppm へと上昇させた場合の植物への影響が、様々な材料と方法、条件のもとで調べられ、多くの場合に高 CO₂ 環境による成長促進効果が報告されていた。しかし、それらの研究のほとんどは、最大窒素同化能力が高い植物を材料として良好な窒素栄養条件下において行われたもの、すなわち換言すれば「施肥された耕作地における農作物の応答」を念頭に行われたものであり、恒常的に窒素不足気味の自然界の植物の高 CO₂ 応答は不明であった。

(2)CO₂ 濃度の上昇を引き起こす化石燃料の燃焼は、大気中の N₂ の酸化によって NO_x も生成させる。NO_x は地上に降下して硝酸イオンとなって植物の窒素源となるが、その影響は、湿原のように元々の窒素濃度がきわめて低い貧栄養環境では顕著なものとなり得る。貧栄養環境に生育する植物には、窒素が増えると生育阻害を受ける植物が多く含まれているが、このような植物群の窒素感受性の原因や、高 CO₂ かつ高窒素条件への応答についての知見は皆無であった。

2. 研究の目的

(1)大気中の CO₂ 濃度の上昇が地球全体に及ぼす影響を予測するためには、耕作地だけでなく自然界の植物に対する高 CO₂ 濃度条件の影響を解析する必要がある。そのためには、窒素の供給が恒常的に制限された状態での植物の高 CO₂ 応答を解析する必要があるが、そのような実験系を構築することは容易でない。本研究では、このような解析を実験室でのモデル実験によって行うための実験系を樹立し、基礎的な知見を収集することを第1の目的とした。

(2)貧栄養環境に適応して窒素感受性を示す野生植物群は生育が遅く、一般の研究に用いられているモデル植物や作物として利用されている植物と異なり、潜在的な窒素同化能力が低いものと推定される。これらの植物の窒素同化経路の制限因子と、窒素感受性の機構を明らかにし、それらへの高 CO₂ 環境の影響を解明することにより、貧栄養環境における植物群の遷移の方向と速度を予測するための基礎情報を収集することを第2の目的とした。

3. 研究の方法

(1)遺伝学的・生理学的・生化学的知見が集積されているシロイヌナズナは、窒素同化能力が高いだけでなく、硝酸イオンを蓄積、貯蔵する能力に優れているため、恒常的な窒素制限条件を実現するのは難しい。本研究では根で硝酸イオンの吸収に関わっている輸送体群のうち3種を欠損したシロイヌナズナ変異株(以下 NRT2-TKO 株と表記する)を材料

として用いることにより、培地中に十分な硝酸イオンが存在していても窒素の吸収速度が、一定かつ低レベルに保たれる条件を設定し、その条件下で高 CO₂ 濃度の影響を解析した。

(2)予備的研究により、貧栄養湿地に自生するモウセンゴケ属植物が窒素施肥に対して感受性で生育が著しく阻害されること、東海地方に自生するモウセンゴケ属植物3種は互いに近縁関係にありながら、窒素感受性が異なることが示唆されたので、これら3種を主材料として窒素感受性の原因と高 CO₂ 濃度環境への応答を調べた。

4. 研究成果

(1)シロイヌナズナの NRT2-TKO 株を 15 mM の硝酸イオン存在下で栽培することによって実現した「恒常的な窒素不足状態」で高 CO₂ 環境への応答を調べた結果、NRT2-TKO 株は低 CO₂ 環境(280 ppm)では野生株と同様に生育したが、高 CO₂ 環境(780 ppm)では野生株では見られない Shoot/Root 比の低下や細胞内の硝酸イオン含量の著しい低下、アントシアニンの顕著な蓄積等の既知の窒素欠乏の症状が顕在化した。ただし、シュートバイオマスが減少しないことや植物体当りのクロロフィル総量が増加することなど、既知の窒素欠乏応答と相反する応答も見られた。トランスクリプトームの変化も既知の窒素欠乏応答とは大きく異なっていたことから、NRT2-TKO 株において高 CO₂ 環境で顕在化した窒素欠乏の症状は、一般的な窒素枯渇への応答とは異なり、制限された窒素を高 CO₂ 環境への適応のために優先的に使用した結果であると結論した。

(2)高 CO₂ 条件によって NRT2-TKO 株に誘起された窒素欠乏様の状態の特徴を明らかにするため、野生株と NRT2-TKO 株の地上部の代謝物レベルを CE-TOF/MS を用いて網羅的に解析し、アミノ酸や TCA 回路の有機酸等の 130 個の主要代謝物について分散分析を行った結果、CO₂ 条件、窒素源としてアンモニアの有無、株の違い(野生株か NRT2-TKO 株か)及びこれらの要因の相互作用に反応して 97 個の代謝物量が有意に変化することがわかった。階層的クラスタ解析により、これらの代謝物は主に CO₂ 環境やアンモニアの有無に対する応答性の違いに起因する 7 つのクラスタに分類されたが、窒素欠乏を顕在化した NRT2-TKO 株で特徴的に変化する代謝物は 1 つしかなかった。このことから、植物の代謝は、恒常的に窒素が不足した環境に対しては強固に維持されるが、高 CO₂ やアンモニアの存在のような富栄養環境に対して大きな応答を示すことが示された。

(3)メタボローム解析により、野生株であるか NRT2-TKO 株であるかにかかわらず、窒素

と炭素のバランスの変化が尿素回路の代謝産物量に特異的な影響を及ぼすことを見だし、高 CO₂ または低窒素条件下でアルギニンからプロレシンへの合成が促進されることを明らかにした。プロレシンは植物の生長促進やストレス応答等の生理作用を示すポリアミンの一種であるので、今回の結果は、窒素と炭素のバランスの変化に適応するために尿素回路が活性化されることを示唆するものである。

(4) トウカイコモウセンゴケ (*Drosera tokaiensis*; 以下 *Dt* と略) は、モウセンゴケ (*D. rotundifolia*; 以下 *Dr* と略) とコモウセンゴケ (*D. spathulata*; 以下 *Ds* と略) の交雑起源種である。自生地の土壌水の分析により、*Dr* は硝酸イオン濃度が 3 μM 未満の貧栄養環境、*Ds* は 3~30 μM の中栄養環境に生育するのに対し、*Dt* は 0~150 μM という幅広い栄養環境に生育していることが判明した。これら 3 種はすべて高濃度の硝酸イオンにより傷害を受けたが、5mM KNO₃ 培地での生育 12 週目の平均生存率を比較したところ、*Dr*、*Ds*、*Dt* でそれぞれ 22%、51%、57% で、*Dr* と *Dt* の間に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。これに対し、5mM KCl 培地や 1 mM の KNO₃、NH₄⁺、あるいはソルビトールを含む培地では 3 種共 93~100% の平均生存率を示したことから、*Dt* が *Dr* と比較して高濃度の硝酸イオンに耐える優越性質を有しており、それが自然分布の決定要因となっていることが示唆された。この結果から、今後も NO_x の降下により富栄養化が進行した場合には、*Dr* の分布域が縮小することが予測された。

(5) 5mM KNO₃ 培地での生育障害の原因を探るため、葉内の硝酸イオン、亜硝酸イオン濃度を測定したところ、28 日目までの測定では、*Dr* も *Dt* も葉内の硝酸イオン濃度はきわめて低かったが (0.5 μmol/gFW 未満)、亜硝酸イオンの蓄積に顕著な差がみられた。すなわち、*Dt* では蓄積量が徐々に増加して 28 日目に 3.5 nmol/gFW に達したのに対し、*Dr* では 15 日目には 15 nmol/gFW を越え、28 日目には 19 nmol/gFW に達した。この間、*Dr* では 15 日目には葉の赤色化と枯死が始まり、最終的な枯死数も *Dt* や *Ds* より多かった。さらに、減圧法で *Dt* に亜硝酸溶液を浸潤させると 5mM KNO₃ 培地の *Dr* と同様の枯死が観察されたことから、富栄養条件下で細胞内に亜硝酸イオンを蓄積することが *Dr* の高い硝酸イオン感受性の原因と推定した。

(6) *Dt* を材料として硝酸還元酵素 (NR)、亜硝酸還元酵素 (NiR) の活性とタンパク質の検出を試みたが、いずれも検出限界値以下で、モウセンゴケ属の硝酸同化能力がきわめて低いことが示された。PCR により NR 遺伝子 (*nia*) の転写産物を分析したところ、*nia* の転写は 3 種ともモデル植物の場合と同様に基質であ

る硝酸イオンにより誘導された。モデル植物ではアンモニアが *nia* の転写を抑制するが、モウセンゴケ属 3 種では、*Dt* でのみアンモニアによる *nia* の抑制が見られ、*Ds*、*Dr* では反対にアンモニアが *nia* の発現を促進した。CO₂ 同化酵素である Rubisco の遺伝子 (*rbcL*) の発現は *Dt*、*Ds* では *nia* と同調的に増減したが、*Dr* では変化が見られなかった。これらの結果から、高窒素条件下での遺伝子発現調節が C/N 比の調整に最適化されていないことが、*Dr* における NO₂ の蓄積を引き起こした原因であると推定した。

(7) モウセンゴケ属 3 種に対する高 CO₂ 条件 (780 ppm) の影響を調べたところ、低窒素条件下では、*Dr* と *Dt* では葉齢の高い口ゼツタ葉の枯死が促進された。一方、高硝酸条件 (5 mM NO₃⁻) で観察される高窒素感受性は高 CO₂ により緩和され、*Dr*、*Dt* の生存率は上昇し、およそ 20 日程度生存期間が延長した。この時、葉齢の高い口ゼツタ葉の枯死も抑制された。以上の結果から、モウセンゴケ属 *Dr*、*Dt* においては、低窒素条件下では高 CO₂ 濃度による老化の促進と成長抑制が見られるが、高窒素条件下ではこれらが高 CO₂ 濃度より緩和されることが示された。

(8) モウセンゴケ属植物での研究から、細胞内の亜硝酸イオン濃度の調節が、高窒素条件下での生存に重要であることが示唆されたので、NR と NiR の活性のバランスに加えて亜硝酸イオン濃度を左右する因子として重要な「細胞質から葉緑体内への亜硝酸イオンの輸送過程」についてシロイヌナズナを用いて解析した結果、従来提唱されていたタンパク質とは異なる「HPP ファミリー」に属する新規輸送体 NITR2 が主要な役割を担っていることを見いだした。

(9) 本研究および同じ新学術領域研究に属する早川らの研究の結果、窒素感受性の植物だけでなく、窒素同化能力が高いシロイヌナズナやイネにおいても、窒素過剰への適切な対処が重要な生理的意義をもつことがわかってきたので、高濃度のアンモニア存在下で良好に生育する「好窒素生物」であるラン藻 *Synechococcus elongatus* のアンモニアへの応答を再解析し、ラン藻が P_{II} タンパク質を介する複数の経路によってアンモニアの毒性を緩和しており、その機能が失われると窒素 (特にアンモニア) に対して超感受性になることを見いだした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)(すべて査読あり)

Maeda, S., Konishi, M., Yanagisawa, S., Omata, T. (2014) Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in

cyanobacteria and chloroplasts. Plant and Cell Physiology, in press.

Nishimura, T., Yamaguchi, O., Takatani, N., Maeda, S., Omata, T. (2014) In vitro and in vivo analyses of the role of carboxysomal α -type carbonic anhydrase of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in carboxylation of ribulose-1,5-bisphosphate. Photosynthesis Research, in press
DOI:10.1007/s11120-014-9986-7

Takatani, N., Ito, T., Kiba, T., Mori, M., Miyamoto, T., Maeda, S., Omata, T. (2014) Effects of high CO₂ on growth and metabolism of Arabidopsis seedlings during growth with a constantly limited supply of nitrogen. Plant and Cell Physiology 55:281-292
DOI: 10.1093/pcp/pct186

Chang, Y., Takatani, N., Aichi, M., Maeda, S., Omata, T. (2013) Examination of the effects of P_{II} deficiency and the toxicity of PipX on growth characteristics of the P_{II}-less mutant of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Plant and Cell Physiology 54:1504-1514
DOI:10.1093/pcp/pct092

愛知真木子, 味岡ゆい, 上野薫, 寺井久慈, 南基泰 (2013) 東海丘陵要素植物群の無機窒素栄養に対する種特異性. 湿地研究 3: 3-14.

Tanaka, H., Kitamura, M., Nakano, Y., Katayama, M., Takahashi, Y., Kondo, T., Manabe, K., Omata, T., Kutsuna, S. (2012) CmpR is important for circadian phasing and cell growth. Plant and Cell Physiology 53:1561-1569.
DOI:10.1093/pcp/pcs095

Ohashi, Y., Shi, W., Takatani, N., Aichi, M., Maeda, S., Watanabe, S., Yoshikawa, H., Omata, T. (2011) Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. Journal of Experimental Botany 62:1411-1424.
DOI:10.1093/jxb/erq427

Imamura, S., Terashita, M., Ohnuma, M., Maruyama, S., Minoda, A., Weber, A.P., Inouye, T., Sekine, Y., Fujita, Y., Omata, T., Tanaka, K. (2010) Nitrate assimilatory genes and their transcriptional regulation in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: genetic evidence for nitrite reduction by a sulfite reductase-like

enzyme. Plant and Cell Physiology 51:707-717.
DOI:10.1093/pcp/pcq043

〔学会発表〕(計 38 件)

前田真一、小俣達男、ラン藻と高等植物葉緑体の亜硝酸イオン取り込み活性の分析、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 20 日、富山

高谷信之、伊藤卓朗、木羽隆敏、宮本哲郎、森万里恵、前田真一、小俣達男、恒常的窒素制限条件下のシロイヌナズナの代謝系の高 CO₂ 応答から見てきた植物の窒素適応、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 20 日、富山

兼松璃々子、豊田歩、上坂一馬、上野薫、小俣達男、南基泰、愛知真木子、モウセンゴケ属植物 3 種の NO₃ 耐性の差異を決定する要因の解析日本植物学会、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日、富山

小俣達男、高谷信之、Chang Yajun、上坂一馬、前田真一、井原邦夫、木羽隆敏、伊藤卓朗、兼松璃々子、愛知真木子、光合成生物の窒素過剰に対する応答の新理解、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日、富山

上坂一馬、Chang Yajun、高谷信之、前田真一、愛知真木子、井原邦夫、小俣達男、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 の P_{II} 欠損株から生じたアンモニア耐性疑似復帰変異株の解析、ラン藻の分子生物学 2013、2013 年 11 月 22 日、木更津

Omata, T., Chang, Y., Takatani, N., Uesaka, K., Ihara, K., Maeda, S., Aichi, M., Effects of P_{II} deficiency and the toxicity of PipX on growth of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*, 2nd International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, 2013 年 11 月 19 日, Puerto Varas, Chile

Takatani, N., Mori, M., Miyamoto, T., Kiga, T., Maeda, S., Omata, T., Effects of CO₂ enrichment on the growth and metabolism of *Arabidopsis thaliana* under the constantly nitrogen-limited conditions, 2nd International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, 2013 年 11 月 19 日, Puerto Varas, Chile

高谷信之、宮本哲郎、森万里恵、木羽隆敏、前田真一、小俣達男、恒常的窒素不足状態のシロイヌナズナの高 CO₂ 環境下での窒素利用、日本植物学会第 77 回大会、2013 年 9 月 15 日、札幌

兼松璃々子、豊田歩、上野薫、小俣達男、南基泰、愛知真木子、モウセンゴケ属植物 3 種の高窒素条件下で起こる細胞死は NO_2 により誘導される、日本植物学会第 77 回大会、2013 年 9 月 14 日、札幌

兼松璃々子、上野雄貴、豊田歩、上野薫、小俣達男、南基泰、愛知真木子、食虫植物トウカイモウセンゴケ NH_4^+ により NR 遺伝子の発現が抑制される、第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 23 日、岡山

Chang Yajun、高谷信之、愛知真木子、前田真一、小俣達男、Effects of P_{11} deficiency on growth of *Synechococcus elongatus* PCC 7942、第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 23 日、岡山

宮本哲郎、高谷信之、森万里恵、木羽隆敏、前田真一、小俣達男、高 CO_2 環境における恒常的窒素制限状態のシロイヌナズナの代謝、第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21 日、岡山

兼松璃々子、後藤孝文、豊田歩、森島志依名、小俣達男、南基泰、愛知真木子、食虫植物トウカイモウセンゴケとその両親種における富栄養条件下での枯死要因は NO_2^- か、日本植物学会第 76 回大会、2012 年 9 月 16 日、姫路

高谷信之、森万里江、宮本哲郎、木羽隆敏、前田真一、小俣達男、恒常的窒素制限状態のシロイヌナズナにおいて高 CO_2 環境で顕在化する窒素欠乏の症状、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 17 日、京都

兼松璃々子、後藤孝文、豊田歩、森島志依名、上野薫、小俣達男、南基泰、愛知真木子、交雑起源種トウカイコモウセンゴケとその両親種における富栄養条件下での生育阻害要因について、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 17 日、京都

宮本哲郎、高谷信之、森万里江、木羽隆敏、前田真一、小俣達男、恒常的窒素不足状態の植物の代謝系に及ぼす高 CO_2 環境の影響、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都

森万里江、高谷信之、宮本哲郎、木羽隆敏、前田真一、小俣達男、恒常的窒素不足条件下における植物の生育に対する高 CO_2 環境の影響、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都

高谷信之、森万里江、宮本哲郎、木羽隆敏、前田真一、小俣達男、定常的窒素不足状態のシロイヌナズナの生育に対する高 CO_2 環境の影響、日本植物学会第 75 回大会、2011 年 9

月 18 日、東京

兼松璃々子、豊田歩、森島志依名、井原邦夫、上坂一馬、上野薫、小俣達男、南基泰、愛知真木子、交雑起源種トウカイコモウセンゴケとその両親種の硝酸同化系遺伝子の解析、日本植物学会第 75 回大会、2011 年 9 月 17 日、東京

高谷信之、森万里江、木場隆敏、前田真一、小俣達男、定常的窒素不足状態に曝されたシロイヌナズナの生育に対する高 CO_2 環境の影響、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 20 日、仙台

①豊田歩、上坂一馬、上野薫、南基泰、小俣達男、井原邦夫、小田原卓郎、那須守、米村惣太郎、横田樹広、愛知真木子、東海丘陵要素トウカイコモウセンゴケとその両親種の硝酸同化系遺伝子の解析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 20 日、仙台

②高谷信之、森万里江、木場隆敏、前田真一、小俣達男、定常的窒素不足条件下での植物の生育に対する高 CO_2 環境の影響、日本植物学会第 74 回大会、2010 年 9 月 11 日、春日井

③豊田歩、市橋泰範、近藤香苗、吉村久、中辰元、上野薫、南基泰、小俣達男、小田原卓郎、那須守、米村惣太郎、横田樹広、愛知真木子、東海丘陵要素トウカイコモウセンゴケの窒素応答性は母親種であるコモウセンゴケに類似している、日本植物学会第 74 回大会、2010 年 9 月 11 日、春日井

④豊田歩、小俣達男、愛知真木子 他計 13 名、東海丘陵要素植物トウカイコモウセンゴケとその両親種における窒素感受性の違いについて、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 21 日、熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小俣 達男 (OMATA, Tatsuo)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：5 0 1 7 5 2 7 0

(2) 研究分担者

愛知 真木子 (AICHI, Makiko)
中部大学・応用生物学部・講師
研究者番号：0 0 3 4 0 2 0 8

(3) 連携研究者

前田 真一 (MAEDA, Shin-ichi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：7 0 3 3 5 0 1 6