

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22119003

研究課題名（和文）窒素飢餓環境に対するイネの生存戦略

研究課題名（英文）Strategies for survival and growth of rice plants in response to nitrogen starved conditions

研究代表者

山谷 知行 (Yamaya, Tomoyuki)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30144778

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 57,300,000 円

研究成果の概要（和文）：イネは、窒素飢餓環境では茎数や種子数を減らして完熟種子を稔らせる応答を示すが、その分子機構は明らかではなかった。本研究では、外界のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>の検知機構、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の同化・再利用機構、代謝バランス、穂への物質転流モデリングから、分子機構の解明を試みた。その結果、根におけるNH<sub>4</sub><sup>+</sup>の初期同化や分げつの伸長に関わる要因や、種子数の決定に関わる窒素代謝要因を、逆遺伝学的に明らかにした。代謝バランスの崩壊が大きく影響していることを見だし、また蔗糖転流の数理モデルを構築できた。これらの成果を、多くの国際学術誌の公表できた。

研究成果の概要（英文）：Under nitrogen starved conditions, rice plants reduce their active tiller number in vegetative stage and their spikelet number in reproductive stage. However, molecular mechanisms in these responses are largely not known. We have carried out 1) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-signal perception, 2) assimilation and remobilization of nitrogen, 3) metabolic balance between C and N, and 4) modeling of spikelet-ripening to understand molecular mechanisms of response. We obtained clear results, using reverse genetics approaches together with localization works, that glutamine synthetase (GS)1;2 was important in both the primary assimilation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and outgrowth of axillary tiller buds, whereas GS1;1 is important in remobilization of N from senescing organs. NADH-glutamate synthase2 was tightly related to the determination of panicle number. These mutants showed metabolic disorder, indicating that N metabolism is important in normal growth and development of rice. Those results were published in several journals.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：イネ 窒素飢餓 生存戦略 環境突破力 同化代謝バランス

## 1. 研究開始当初の背景

植物の生育や作物の生産性を決定する大きな要因の一つに、窒素同化や窒素利用機能があげられる。窒素の吸収量と作物の生産量の間には正の相関があることが知られており、窒素飢餓状態では収量が大きく減少することは周知の事実である。イネの場合、経験的に栄養成長期における窒素欠乏は分けつ数(穂数)の減少を、また生殖成長期での窒素欠乏は一穂当たりの粒数の減少を引き起こすことが知られているが、その分子機構は全く解明されていなかった。幼植物期では、地上部の成長を止め、根の成長を促進(表面積の拡大)することも知られていた。このような表現型を示すのは、窒素代謝とともに炭素代謝等が協調的に動いていることを示す。しかし、代謝間バランスの維持に関する分子機構も不明であった。2004年にイネのゲノム解析が完了し、窒素の初期同化や窒素転流に関わるグルタミン合成酵素(GS)やグルタミン酸合成酵素(GOGAT)の重要性は当初から認識されていた。この窒素初期同化や老化器官からの窒素転流とシンク器官における転流窒素の再利用に関わる分子として、サイトゾル型GS(GS1)とNADH-GOGATが重要であることもわかりつつあった。しかし、多くの植物ではGS1やGOGATは小遺伝子族を形成する複数の分子種が存在しており、イネでは3種のGS1(GS1;1、GS1;2、GS1;3)と2種のNADH-GOGAT(NADH-GOGAT1と2)がある。分子遺伝学的な研究はこれまではなく、それぞれの分子種の生理機能の多くは明らかではなかった。イネ以外の植物でも多少の研究はなされていたが、限定的な成果しか得られておらず、これら分子種の生理機能や機能分担に関する知見は乏しい状況であった。

一方、還元的な水田で生育するイネは、還元が最も進んだアンモニウムイオンを無機態窒素源として利用する特徴をもつ。また、収穫期のイネの穂を構成する窒素の約80%は、老化器官から転流してきた窒素で占められていることもわかっていた。篩管を介して転流する窒素形態はグルタミンとアスパラギンが主要であり、アスパラギンはグルタミンから生合成されることから、老化器官ではグルタミンの合成がまず必要である。GS1;1がこの窒素転流で、またNADH-GOGAT1も転流と根における初期同化に重要な働きをもつ成果は部分的に得られていたが、すべての分子種の機能解析がなされてはいない状況であった。

## 2. 研究の目的

上記のような背景をもとに、本研究ではイネを主な材料に用いて、(1)外界のアンモニウムイオンの過不足を検知する機構、(2)アンモニウムイオンを同化・再利用する機構、(3)炭素や他の代謝バランスを図る機構の解明とともに、(4)イネ穂への物質転流のモデリン

グを行い、他のイネ科作物への応用を視野に入れた数理モデルの構築を目的とした。これらの研究遂行により、イネの窒素飢餓環境に対する突破力の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) アンモニウムイオンの過不足の検知

微生物におけるグルタミン情報伝達系を参考に、アミノ酸結合ドメインとプロテインキナーゼドメインを有するACTPK1に着目し、この遺伝子破壊変異体の獲得とアンモニウムイオンの吸収動力学、さらにACTPK1が制御する可能性があるタンパク質の解析を、主に酵母を用いて行った。

### (2) アンモニウムイオンの同化と転流機構

逆遺伝学的手法を基本として、GS1;1、GS1;2、GS1;3、NADH-GOGAT1、それにNADH-GOGAT2の5種類の遺伝子にレトロトランスポゾン*Tos17*が挿入された遺伝子破壊変異体をイネミュータントパネル(<https://tos.nias.affrc.go.jp/index.html.ja>)で検索同定し、供試した。野生型と変異体のイネは、幼植物を材料とした場合は水耕法で、また収穫期まで育成する場合は水田で栽培を行った。GSそれぞれの欠損変異体に、自己プロモーターにcDNAを連結した遺伝子を遺伝子組換え手法で導入し、相補系統を作成した。水田での実験は、複数年での栽培により、遺伝子破壊の表現型に及ぼす影響を確認した。それぞれの遺伝子産物の発現解析は、主にリアルタイムPCRで行うとともに、発現場所の特定は、必要に応じてin situハイブリダイゼーション法や、免疫組織科学的な手法も用いた。また、遊離アミノ酸はアミノ酸分析装置を、全窒素はElemental Analyzerを用いた。

### (3) 代謝バランスを図る機構の解明

窒素と炭素の代謝バランスに関しては、システムズ生物学的な視点から、*OsGS1;1*の地上部あるいは*OsGS1;2*遺伝子破壊変異体の3-4葉期の基部とその相補系統を用いて、メタボロームやトランスクリプトーム解析を進めた。この解析には、研究分担者である理化学研究所環境資源科学研究センター(現在は筑波大学)の草野都博士の協力を得た。また、分けつ数制御に関連すると思われる新規植物ホルモンのストリゴラクトンは、この分野の専門家である東北大学大学院生命科学研究所の山口信次郎教授の協力を得て、*OsGS1;2*遺伝子破壊変異体の根を供試して解析した。植物ホルモンの網羅的な解析は、理化学研究所環境資源科学研究センターの榎原均博士の協力を得た。

### (4) イネ穂への物質転流のモデリング

数理モデルの専門家である北海道大学の佐竹教授との共同研究で、老化器官からのショ糖と窒素化合物の転流のモデリングを行った。走査型電子顕微鏡を用いて、穂軸や枝

梗の篩管径や分岐数を部位別に計測した。

#### 4. 研究成果

##### (1) アンモニウムイオンの過不足の検知

イネの *OsACTPK1* 欠損変異体を用いてアンモニウムイオン吸収の動力学を解析した結果、変異体では吸収量の大幅な増加が認められた。この結果は、過剰なアンモニウムイオン吸収を負に制御することを示す。また、*ACTPK1* にはタンパク質リン酸化活性があり、この活性は TCA サイクルの有機酸であるクエン酸や 2-オキソグルタル酸により阻害された。また、*OsACTPK1* プロモーター::*GFP* の発現は、アンモニウム輸送担体の *OsAMT1;2* や *OsGS1;2* と同様に根の表層細胞で蓄積が観察され、酵母を用いた系では、*ACTPK1* と *AMT1;2* や *AMT1;3* と相互に結合することが示された。一方で、アンモニウムイオンやその同化産物であるグルタミン情報の検知に関わる成果はまだ得られておらず、研究計画に対する直接的な成果は得られなかった。

##### (2) アンモニウムイオンの同化と転流機構

イネにおける3分子種の *GS1* アイソザイム (*GS1;1*、*GS1;2*、*GS1;3*) と2分子種の *NADH-GOGAT* (*NADH-GOGAT1* と2) の遺伝子破壊系統を、それぞれ1ライン以上同定した。*GS1;2* 遺伝子破壊変異体は、収穫時における穂数の減少をもたらすことが判明した。*GS1;2* は、根でアンモニウムイオン依存的に発現することなどもあわせ、根におけるアンモニウムの初期同化に機能しているものと考えられた。この成果をまとめ、国際学術誌に報告した(論文)。この変異体では幼植物でも分げつ数の減少が認められ、腋芽形成はできているものの、その後の伸長が阻害されていることを明らかにした。この伸長抑制は、デンプン粒蓄積など C/N バランスの崩壊に由来することが判明した。*GS1;2* 変異体で認められた分げつ数の減少には、内在性のストリゴラクトン含量とは関連ないことが示唆され、リン酸欠乏で高濃度に蓄積するストリゴラクトンによる分げつ伸長阻害とは異なる機構であることが判明した。また、野生株では *GS1;2* mRNA が腋芽大維管束や接合維管束組織で蓄積していることが新たに判明し、変異体ではこの部位でのリグニン合成が抑制されている結果も得た。*GS1;2* 変異体に *GS1;2* cDNA を自己プロモーターの制御下で導入した相補系統では、分げつ数や *GS1;2* mRNA の発現、さらにリグニンの沈着が回復し、野生型のような表現型に戻ることが判明した。この新規な *GS1;2* の機能について成果をとりまとめ、国際学術誌に公表した(論文)。

*NADH-GOGAT1* 遺伝子欠損変異体では、*GS1;2* 欠損変異体と同様に分げつ数の減少が観察された。空間的・時間的な発現解析の結果をあわせると、*NADH-GOGAT1* は根におけ

るアンモニウムイオンの初期同化に関わっているものと推定された。*NADH-GOGAT2* 遺伝子破壊変異体では、収穫時の一穂あたりの粒数が減少していることが判明した。この遺伝子は、成熟葉身の大維管束組織の篩部伴細胞や篩部柔細胞で主に発現しており、生殖成長期における老化葉身から、篩管を介した窒素転流に関与しているものと思われた。この研究成果をまとめ、公表した。

*GS1;3* 遺伝子は穎果特異的な発現を示し、この遺伝子破壊によって、発芽期間の遅延や登熟期の葉身の老化の遅延が認められた。しかし、まだ最終的な機能の推定はできておらず、研究を継続する予定である。

根におけるアンモニウムイオンの初期同化には *GS1;2* と *NADH-GOGAT1* が機能しており、また老化器官からの窒素転流には *GS1;1* と *NADH-GOGAT2* が機能することを明確にできた。老化器官からの転流の際、葉身タンパク質の多くが集積している葉緑体タンパク質の分解に、オートファジー機構が関わることも示すことができ、共同研究の成果として国際学術誌に公表した。同時に、*GS1* や *NADH-GOGAT* のアイソエンザイム間では、それぞれ独立した機能を果たしており、他のアイソエンザイムでは機能相補できないという結論も得た。窒素代謝の整理が進み、他の主要作物の手本となるような成果を得ることができた。これらの成果を踏まえ、総説を国際学術誌に公表した(論文)。双子葉植物のモデルであるシロイヌナズナの *NADH-GOGAT* との機能も比較検討を行った。

また、これまでに根や導管液・篩管液に多量に含まれていることがわかっていたアスパラギン (*Asn*) の代謝も検討した。イネには二種類のアスパラギン合成酵素 (*AS*) 遺伝子があることが判明し、逆遺伝学的な解析と遺伝子発現の空端的・時間的な解析から、根においては、*AS1* が *Asn* の合成を担っていることを示し、その成果を国際学術誌に公表した(論文)。

##### (3) 代謝バランスを図る機構の解明

*GS1;1* 遺伝子破壊変異体を供試して、メタボロームとトランスクリプトーム解析を行った。この変異体では糖含量の増加とアミノ酸や有機酸含量の低下、さらに二次代謝物質の蓄積が観察され、おおきく代謝バランスが崩れていた。代謝物相関解析を行った結果、変異体では新たなネットワークが形成されていることが判明した。これらの解析から、*GS1;1* は代謝ネットワークの協調性に極めて重要な位置を占めていることが判明し、その成果をまとめ、公表した(論文)。 *GS1;1* 変異体を用いたシステムズ生物学的解析から、変異体では根における光合成器官の発達が認められ、炭素代謝を司る転写因子が活性化されていることも判明した。現在、この成果をまとめ、公表予定である。*GS1;2* 遺伝子破壊変異体の基部を用いた解析では、リグニン

の減少やデンプン粒蓄積を伴い、大きく C/N バランスが崩れていることが判明した。また、植物ホルモンの網羅的な解析から、サイトカイン前駆体の低下と、イソペンテニル転移酵素 4 の発現が低下していることが判明し、腋芽の伸長にサイトカインが関わっている結果も得られた。現在、これらの結果をまとめ、成果報告を準備している。

#### (4) イネ穂への物質転流のモデリング

穂の枝梗維管束組織の篩管サイズを、走査型電子顕微鏡で解析を進めた。また、老化器官からの N の転流量を、重窒素で標識したアンモニウムイオンを用いてパルスチェース解析を進めている。窒素転流のモデル化に先立ち、ショ糖の転流の数理モデルを構築し、その成果を国際学術誌に公表した。ゲノムや分子生理学的な解析が遅れている同じイネ科のコムギやオオムギ等に、このモデルを応用できることが期待される。

・東日本大震災を研究期間内にはさんだ成果であり、研究環境の復旧に長時間を要したが、研究はほぼ順調に進んだものと思われる。

### 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 11 件)

Ohashi, M., Ishiyama, K., Kojima, S., Nakano, K., Kanno, K., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (2015) Asparagine synthetase1, but not asparagine synthetase2, is responsible for the biosynthesis of asparagine following the supply of ammonium to rice roots. *Plant Cell Physiology* 56: 769-778 査読有  
doi: 10.1093/pcp/pcv005

Ohashi, M., Ishiyama, K., Kusano, M., Fukushima, A., Kojima, S., Hanada, A., Kanno, K., Hayakawa, T., Seto, Y., Kyoizuka, J., Yamaguchi, S. and Yamaya, T. (2015) Lack of cytosolic glutamine synthetase1;2 in vascular tissues of axillary buds caused severe reduction in their outgrowth and disorder of metabolic balance in rice seedlings. *Plant Journal* 81: 347-356 査読有  
doi: 10.1111/tpj.12731

Yamaya, T. and Kusano M. (2014) Evidences supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH-glutamate synthases in rice. *Journal of Experimental Botany* 65: 5519-5525 査読有  
doi: 10.1093/jxb/eru103

Funayama, K., Kojima, S., Tabuchi-Kobayashi, M., Sawa, Y., Nakayama, Y., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (2013) Cytosolic glutamine synthetase1;2 is responsible for the primary assimilation of

ammonium in rice roots. *Plant and Cell Physiology* 54: 934-943 (selected a highlight paper) 査読有

doi: 10.1093/pcp/pct046

Kusano, M., Tabuchi, M., Fukushima, A., Funayama, K., Diaz, C., Kobayashi, M., Hayashi, N., Tsuchiya N. Y., Takahashi, H., Kamata, A., Yamaya, T.<sup>S</sup>, and Saito, K.<sup>S</sup> (2011) Metabolomics data reveal a crucial role of cytosolic glutamine synthetase 1;1 in coordinating metabolic balance in rice. *Plant Journal* 66: 456-466 (<sup>S</sup>corresponding author) 査読有

doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04506.x

〔学会発表〕(計 19 件)

大橋美和、石山敬貴、草野都、福島敦史、小島美紀子、小島創一、早川俊彦、榊原均、山谷知行(2015) Stimulation of axillary buds elongation by metabolite and cytokinin in rice. 第 56 回日本植物生理学会年会(3 月 16-18 日、東京農業大学)

大橋美和、石山敬貴、小島創一、早川俊彦、山谷知行(2014) 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。日本土壌肥料学会 2014 年度東京大会(9 月 9-11 日、東京農工大)

佐竹暁子、関元秀、Francois Feugier、池田真由子、北野英己、Xian-Jun Song、芦苺基行、中村巴瑠花、石山敬貴、山谷知行(2014) イネ維管束ネットワーク上のショ糖転流と顆粒成長モデル。第 55 回日本植物生理学会年会シンポジウム「環境変動に対する植物の生存成長戦略:総合研究の新展開」(3 月 20 日、富山大学)(招待講演)

Yamaya, T. (2013) Distinct function of GS1 and NADH-GOGAT isoenzymes in rice, Second International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, Puerto Varas, Chile, Nov. 18-22 (招待講演)

Kusano, M., Fukushima, A., Funayama, K., Tabuchi-Kobayashi, M., Nishizawa, T., Kobayashi, M., Wakazaki, M., Sato, M., Toyooka, K., Osanai-Kondo, K., Utsumi, Y., Seki, M., Kojima, S., Yamaya, T., Saito, K. (2013) The study of two cytosolic glutamine synthetase isoforms of rice using reverse genetic, metabolite and transcript profiling approaches and microscopic analysis. Second International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, Puerto Varas, Chile, Nov. 18-22 (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

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

#### 新聞報道

2015年4月2日 読売新聞 28面  
第52回読売農学賞受賞者7人の業績  
「イネの栄養 窒素の働き」

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山谷 知行 (YAMAYA, TOMOYUKI)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号： 30144778

##### (2)研究分担者

草野 都 (KUSANO, MIYAKO)  
筑波大学・生命環境系・教授  
研究者番号： 60415148

##### (3)連携研究者

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

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