

## 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：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22248005

研究課題名(和文) イネの窒素同化と窒素利用機構におけるグルタミン代謝関連酵素機能の完全解明

研究課題名(英文) Characteristics of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH-glutamate synthase in ammonium assimilation and nitrogen utilization rice

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) 34,800,000円、(間接経費) 10,440,000円

研究成果の概要(和文)：イネの成育や生産性にきわめて重要な窒素同化と老化過程における窒素の再利用機構に着目し、その分子機構の詳細を明らかにする目的で研究を進めた。3種のサイトゾル型グルタミン合成酵素(GS1;1, GS1;2, GS1;3)と2種のNADHグルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT1と2)の機能解析を進め、以下の結論に達した。根におけるアンモニウムイオンの初期同化は、GS1;2とNADH-GOGAT1が主に担うこと、老化に伴う窒素転流における再利用の過程では、GS1;1とNADH-GOGAT2が主に担う。GS1;3は、穎果特異的な発現を示した。

研究成果の概要(英文)：Reverse genetics and spatial expression of genes encoding the three isoenzymes of cytosolic glutamine synthetase (GS1;1, GS1;2, and GS1;3) and two NADH-glutamate synthases (NADH-GOGAT1 and NADH-GOGAT2) were characterized in rice. OsGS1;2 and OsNADH-GOGAT1 are important in the primary assimilation of ammonium taken up by rice roots. On the other hand, GS1;1 and NADH-GOGAT2 could be important in remobilization of nitrogen during natural senescence. Metabolite profiling data showed a crucial role of GS1;1 in coordinating metabolic balance in rice. Expression of OsGS1;3 was spikelet-specific, indicating that it is probably important in grain ripening and/or germination. Thus, these isoenzymes seem to possess distinct and non-overlapping functions and none was able to compensate for the individual function of another.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：イネ 窒素利用 グルタミン代謝 逆遺伝学 メタボローム

## 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。シロイヌナズナやイネ等のゲノム解析が完了し、この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。しかし、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、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きた。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、本研究ではイネにおける GS1;1、GS1;2、GS1;3、NADH-GOGAT1、それに NADH-GOGAT2 を対象に、全ての分子種の生理機能を解明することを目的とした。あわせて、窒素と炭素の代謝バランスの解析もめざし、イネにおける窒素同化と窒素利用における分子機構の全容解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

逆遺伝学的手法を基本として、標的とした 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ニュートラントパネルで検索同定し、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。水田での実験は、複数年での栽培により、遺伝子破壊の影響を

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。

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、専門家である理化学研究所環境資源科学研究センター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科の山口信次郎教授の協力を得て解析した。

## 4. 研究成果

・イネにおける 3 種の GS1 (GS1;1, GS1;2, GS1;3) と 2 種の NADH-GOGAT (NADH-GOGAT1 と 2) の遺伝子破壊システムを、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しことが判明した。幼植物でも分け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。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、報告した。(論文 3)

・GS1;2 変異体で認められた分けつ数の減少には、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け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 をオウソプロモーターの制御下で導入した相補系統では、分けつ数や 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。現在、この新規な GS1;2 の機能について成果をとりまとめており、公表を予定している。

・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、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。(論文 5)

・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4)

・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;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。

・以上、遺伝子破壊変異体で得られた成果を総説にまとめ、公表した(論文1)。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。同時に、これらの小遺伝子族間では、それぞれ独立した機能を果たしており、それぞれの機能相補はできないという結論も得た。窒素代謝の整理がかなりでき、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。双子葉植物のモデルであるシロイヌナズナの NADH-GOGAT の機能も比較検討を行った。(論文2)

・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 5 件)

1. 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* (in press) 査読有
2. Konishi, N., Ishiyama, K., Matsuoka, K., Maru, I., Hayakawa, T., Yamaya, T. and Kojima, S. (2014) NADH-dependent glutamate synthase plays a crucial role in assimilating ammonium in Arabidopsis root. *Physiologia Plantarum* (in press) 査読有
3. Funayama, K.<sup>S</sup>, Kojima, S.<sup>S</sup>, 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(6): 934-943. (selected a highlight paper) 査読有
4. Kusano, M.\*<sup>S</sup>, Tabuchi, M.\*<sup>S</sup>, 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

5. Tamura, W., Kojima, S., Toyokawa, A., Watanabe, H., Tabuchi-Kobayashi, M., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (2011) Disruption of a novel NADH-glutamate synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice. *Frontiers in Plant Science* 2:57, doi: 10.3389/fpls.2011.00057 (on line journal) 査読有

[学会発表](計 19 件)

1. 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ヨ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)
2. 早川俊彦, 山谷知行 (2014) 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「植物の三大栄養素(N-P-K)の感知と利用の新理解」(3月18日、富山大学)(招待講演)
3. 小西範幸, 石山敬貴, 丸郁美, 松岡香矢, 早川俊彦, 山谷知行, 小島創一 (2014) シロイヌナズナは 2 つの低親和型グルタミン合成酵素を使い分けて根でアンモニウムを同化する。第 55 回日本植物生理学会年会(富山大学、3月18-20日)
4. Ohashi, M., Ishiyama, K., Hanada, A., Kojima, S., Hayakawa, T., Seto, Y., Yamaguchi, Y., Yamaya, T. (2014) Strigolactone-independent reduction of tiller number in rice mutant lacking *cytosolic glutamine synthetase1;2* or *NADH-glutamate synthase1*. 第 55 回日本植物生理学会年会(富山大学、3月18-20日)
5. Kusano, M., Fukushima, A., Funayama, K., Tabuchi-Kobayashi, M., Nishizawa, T., Kobayashi, M., Wakazaki, M., Sato, M., Toyooka, M., Osanai-Kondo, K., Utsumi, Y., Seki, S., Kojima, S., Saito, S., Yamaya, T. (2014) The proper use of glutamine produced by cytosolic GS1;1 is critical for metabolic and organelle homeostasis in rice. 第 55 回日本植物生理学会年会(富山大学、3月18-20日)
6. 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)
7. Kusano, M., Fukushima, A., Funayama, K., Tabuchi-Kobayashi, M., Nishizawa, T., Kobayashi, M., Waakazaki, 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)
  8. Hayakawa, T., Obara, M., Taniai, A., Sawa, Y., Ishizawa, J., Kojima, S., Yamaya, T. (2013) Rice novel protein kinase involved in regulation of ammonium uptake into roots under high concentration of external ammonium. Second International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, Puerto Varas, Chile, (Nov. 18-22)
  9. 小西範幸、早川俊彦、山谷知行、小島創一 (2013) シロイヌナズナサイトゾル型グルタミン合成酵素は根でアンモニウムによって誘導されアンモニウムを同化する。日本農芸化学会 2013 年度大会(東北大学、3月25日-27日)
  10. 小西範幸、松岡香矢、丸郁美、早川俊彦、山谷知行、小島創一 (2013) シロイヌナズナ NADH グルタミン酸合成酵素の根におけるアンモニウム同化の重要性。第 54 回日本植物生理学会年会(岡山大学、3月21-23日)
  11. 松岡香矢、佐々木和弘、大岩優喜、丸郁美、早川俊彦、佐藤雅志、山谷知行、小島創一 (2013) シロイヌナズナ環境型におけるアンモニウム栄養利用の遺伝的な差異。第 54 回日本植物生理学会年会(岡山大学、3月21-23日)
  12. Funayama, K., Tabuchi-Kobayashi, M., Sawa, Y., Kojima, S., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (2012) Evidence to support a function of glutamine synthetase1;2 in the primary assimilation of ammonium ions in rice roots. 第 53 回日本植物生理学会年会(京都産業大学、3月16-18日)
  13. 谷合彰子、澤勇己、小原実広、吉成晃、小島創一、山谷知行、早川俊彦 (2012) イネ根における新規プロテインキナーゼ (OsACTPK1) のアンモニウム吸収抑制への関与。第 53 回日本植物生理学会年会(京都産業大学、3月16-18日)
  14. 松岡香矢、大岩優喜、早川俊彦、山谷知行、小島創一 (2012) 酵母スプリットユビキチン法によるアンモニウム輸送担体と細胞質型グルタミン合成酵素の相互作用の解析。第 53 回日本植物生理学会年会(京都産業大学、3月16-18日)
  15. Funayama, K., Tabuchi-Kobayashi, M., Yawa, Y., Kojima, S., Hayakawa, T., Yamaya, T. (2011) Reduction of the primary assimilation of ammonium ions and panicle number in rice mutants lacking cytosolic glutamine synthetase1;2. International Symposium "Strategies of Plants against Global Environmental Change", (poster, Dec. 8-10, Kurashiki, Okayama, Japan)
  16. Tanaka-Matsuoka, T., Oiwa, Y., Hayakawa, T., Yamaya, T., Kojima, S. (2011) Interplay between ammonium transporter and glutamine synthetase in Arabidopsis. International Symposium "Strategies of Plants against Global Environmental Change", (poster, Dec. 8-10, Kurashiki, Okayama, Japan)
  17. Obara, M., Fukuta, Y., Sato, T., Yano, M., Yamaya, T. (2011) Identification and characterization of *qRL6.1*, a major QTL for root length of seedlings hydroponically grown in rice. The 7<sup>th</sup> Asian Crop Science Association Conference, (Sept. 28), Bogor, Indonesia
  18. 小原実広、福田善通、早川俊彦、山谷知行 (2011) *Oryza glaberrima* の挿入置換系統群を用いた、イネ根長の QTL 検出と検証、日本土壌肥料学会 2011 年度つくば大会、(8月9日、エポカルつくば)
  19. 丸山明子、井上恵理、高橋晶子、斉藤和季、山谷知行、高橋秀樹 (2011) 硫酸イオントランスポーター-SULTR2;1 の根における硫黄欠乏応答における 3'非転写領域の役割。日本土壌肥料学会 2011 年度つくば大会(8月8-19日)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 0 件)
- 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>

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

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：