

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450073

研究課題名(和文)シロイヌナズナ環境型間の比較による高アンモニウム環境への適応機構の解明

研究課題名(英文)The study of ammonium assimilation in Arabidopsis ecotypes

研究代表者

小島 創一 (Kojima, Soichi)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：30462683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの環境型をアンモニウム培地で生育させた時の新鮮重量は窒素欠乏条件における主根の長さとは逆相関を示した。この事実は、窒素欠乏条件の時に根を幅広く展開する形質は、過剰なアンモニウムの害を回避する際に不利となることを示唆した。
シロイヌナズナの根が発現する、四種類のGS1アイソザイム(GS1;1, GS1;2, GS1;3, GS1;4)のうち、アンモニウムを主たる栄養源として生育するためには、GS1;2が重要であることが逆遺伝学的な解析からわかった。AMTの遺伝子発現を抑制するグルタミンの合成はGS1;2が行う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The biomass of the Arabidopsis ecotypes grown in ammonium medium was found to negatively correlate with the root length of the ecotypes grown in nitrogen deficient condition. This suggests the disadvantage of the developing root in excess ammonium. Arabidopsis expresses four GLN1 genes in a root. The reverse genetic study revealed the essential role of GLN1;2 in ammonium assimilation, and in the synthesis of glutamine which represses the expression of ammonium transporter.

研究分野：植物栄養学

キーワード：アンモニウム シロイヌナズナ グルタミン合成酵素 アンモニウムトランスポーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

窒素は、植物が最も多量に必要とする元素の1つである。現代社会は、化石燃料を大量に消費しながら、無機態窒素を化学肥料として、食糧を生産してきた。植物の窒素利用効率を改善すれば、窒素肥料の合成原料である化石燃料を節約し、環境負荷を低減できる。

窒素肥料は、植物体内でアンモニウムが有機化されることで、初めて植物の育成に用いられる。この重要性にもかかわらず、植物のアンモニウム利用の重要性は過小に評価されてきた (Britto 2000)。なぜならば、畑土壌へアンモニウム態の窒素肥料を施肥しても、硝化細菌によって、アンモニウムが硝化され、土壌から流出することで、アンモニウム濃度は硝酸濃度よりも低く、さらに、多くの植物種の育成が、アンモニウムの過剰な供給で阻害されるからである。しかし、アンモニウムの利用効率が高い植物種も存在する。例えば、シロイヌナズナは、世界の各地に自生し、その土地の環境に適応した環境型を形成した。したがって、シロイヌナズナの環境型間の窒素栄養利用は、遺伝学的な多様性がある (Chardon 2010, Ikram 2011)。また、水田で育成するイネは、アンモニウムを主要な窒素源として育成し、高アンモニウム環境に適応している。

植物のアンモニウム利用効率は、輸送機構と代謝機構が決定する。低濃度のアンモニウムは、高親和型アンモニウム輸送機構 (HATS) が行い、HATS の分子実体はアンモニウムトランスポーター (AMT) である。高濃度のアンモニウムは、低親和型アンモニウム輸送機構 (LATS) が行い、その分子実体は不明である。アンモニウムは、グルタミン合成酵素 (GS) とグルタミン酸合成酵素 (GOGAT) が同化する。特に細胞質型 GS (GS1) は、植物の生産性の鍵遺伝子である (Yamaya 2002)。

本研究は、シロイヌナズナの高アンモニウム環境に対する適応機構を解明し、アンモニウムが硝化されるよりも素早く、植物体内へ輸送・代謝されることで、植物の根におけるアンモニウム利用を向上させるための基盤的な研究である。

申請者は、シロイヌナズナとイネにおける窒素栄養の輸送と代謝についての基礎的な研究を行ってきた。低濃度のアンモニウム (Loque 2006, Yuan 2007, Yuan 2009, Lima 2010) および尿素 (Kojima 2006, Kojima 2007) を効率的に輸送する機構の研究、およびアンモニウムが代謝される機構の研究 (Tamura 2010, Tamura 2011, Funayama 2013) である。

これらの研究成果を踏まえ、畑で育つ植物のアンモニウム環境に対する適応性が、水田で育成するイネのように高まれば、窒素利用効率の向上に寄与できるとの着想を得た。また、アンモニウムの輸送と代謝が協

調による効率的なアンモニウム利用機構の着想を得た。

2. 研究の目的

(1) シロイヌナズナの環境型間でアンモニウムの利用効率の差異を考察する

北米産の Columbia (Col) は、アンモニウム供給で育成が阻害されるが、欧州産の Landsberg (Ler) は、アンモニウム環境に適応を示した。Ler の LATS の容量は、Col のそれよりも二倍高かった。また、アンモニウムの供給で、Ler は主根伸長を抑制し、側根を発達させるが、Col は主根伸長が脱抑制されることがわかった。シロイヌナズナの環境型はアンモニウム栄養に対する適応機構に遺伝的な多様性を有している可能性が示唆された。

そこで、本研究は、根の形態と LATS 容量について、シロイヌナズナの環境型間で比較することを目的とした。

(2) シロイヌナズナの根で発現する GS1 アイソザイム間の植物体内における酵素学的な性質を解明して、機能的な役割の分担を明確にする

シロイヌナズナの根は、四種類の GS1 アイソザイム (GS1;1, GS1;2, GS1;3, GS1;4) を発現する。これらのアイソザイム群は、それぞれの細胞特異的な発現場所や、大腸菌で発現させた場合の酵素学的な性質は解明 (Ishiyama 2004) されているが、それぞれのアイソザイム群の植物体内における酵素学的な性質は不明であり、窒素栄養の利用に関する機能的な役割の分担は未解明である。本研究は、GS1 の多重変異体を人工交配で作出し、GS1 アイソザイムの根におけるアンモニウム利用の機能分担を明らかにすることを目的とした。

(3) アンモニウムトランスポーターとグルタミン合成酵素の協調関係の解析

植物の根で、アンモニウムの輸送と代謝が協調することで、迅速なアンモニウムの同化が行われる必然性がある。なぜならば、アンモニウムは、高濃度に蓄積すると細胞毒性を引き起こすからである。

本研究は、GS1 分子種と AMT1 分子種の相互作用を植物で証明し、AMT 活性の GS1 分子種に対する依存性を明確にする。

3. 研究の方法

(1) 様々な環境型の LATS 容量の評価

様々な環境型のシロイヌナズナを人工気象器内で六週間水耕栽培し、重窒素標識した塩化アンモニウムを単位時間与えて、根を収穫した。根を乾燥粉末試料として、超精密天秤で秤量し、安定同位体比質量分析装置で窒素量と同位体比を解析した。そして、単位時間および単位重量あたりのアンモニウム蓄積量を定量した (Loque 2006)。

(2)シロイヌナズナの根で発現するGS1を多重に欠損する変異体を人工交配で作成
アイソザイム間の機能分担を考察する際には、多重変異体の利用が有効である (Yuan 2007)。高等植物のGS1の変異体は、イネ (Tabuchi 2005)、トウモロコシ (Martin 2006)、シロイヌナズナ (Lothier 2010)で行われているが、根におけるアンモニウム同化の機能分担に着目した解析例は一つもない。また多重変異体の報告もトウモロコシの報告 (Martin 2006)が一つあるのみである。

T-DNAが挿入されることで、GS1のアイソザイムが欠損した変異体として、*gs1;1*, *gs1;2*, *gs1;3*, *gs1;4*を単離した。この単変異体を人工交配して、多重変異体を作成した。

(3)GS1の多重変異体の多様な窒素環境における水耕栽培を用いた生育の評価
様々な濃度のアンモニウムを主たる窒素栄養として水耕栽培を六週間行なった。植物を地上部と地下部に分けて収穫し、乾燥後に重量を測定した。元素分析装置で全窒素と全炭素量を測定した。液体クロマトグラフィーでアミノ酸濃度を定量した (Tamura 2010, Funayama 2013)。その後、アンモニウムの体内利用および獲得について、Good 2004の計算方法に準拠して変異体のアンモニウム利用を明らかにした。

(4)GS1の欠損変異体におけるアンモニウム輸送速度の評価

GS1変異体におけるアンモニウム輸送を評価した。GS1のT-DNA挿入変異体 (*gs1;1*, *gs1;2*, *gs1;3*, *gs1;4*)と野生型を人工気象器内で六週間水耕栽培し、重窒素標識した塩化アンモニウムの輸送速度を安定同位対比質量分析装置で定量し、野生型の輸送速度と変異体の輸送速度を比較解析した。

4. 研究成果

(1)シロイヌナズナの環境型をアンモニウム培地で生育させた時の新鮮重量は窒素欠乏条件における主根の長さとの逆相関を示したシロイヌナズナの環境型を窒素欠乏培地とアンモニウム培地で生育させた。これらの植物の新鮮重量、全体の根の長さ、主根の長さ、側根の長さ、側根の数を測定した。また窒素欠乏条件における0.2 mMと2 mMの重窒素標識アンモニウムの輸送速度を求めた。

これらの測定データについて、相関係数を求めたところ、アンモニウム培地における新鮮重量は、窒素欠乏条件における根全体の長さとの統計的に有意な逆相関を示した。この事実は、窒素欠乏条件の時に根を幅広く展開する形質は、過剰なアンモニウムの害を回避する際に不利となることを示唆し

た。また、2 mMのアンモニウムを輸送する速度はアンモニウム培地における主根の長さとの逆相関を示した。主根を短くして、側根を発達させることで根の先端の数を多くして栄養輸送を活発にする可能性を考察したが、側根の数や側根の長さは根におけるアンモニウムの吸収能力と統計的に有意な相関が見られなかった。主根の先端は栄養を活発に輸送することが知られているので、環境型間で主根の先端の機能が異なる可能性が示唆された。

(2)シロイヌナズナの根は酵素的な機能の異なるGS1アイソザイムを根に分配することで、環境中の多様な濃度のアンモニウムを同化する

シロイヌナズナの根が発現する、四種類のGS1アイソザイム (GS1;1, GS1;2, GS1;3, GS1;4)のうち、GS1;2とGS1;3について最初に解析を行った。これらのGS1の組換えタンパク質はアンモニウムに対する基質親和性が低いことから、高濃度のアンモニウムの同化に寄与すると予測した。逆遺伝学的な解析から、アンモニウムを主たる栄養源として生育するためには、GS1;2が重要であることがわかった。GS1;3はアンモニウムを供給しても発現量があまり変化せず、その局在は内鞘細胞に限定されていた。GS1;3の機能はGS1;2によって同化されずに根の中心部に濃縮されたアンモニウムが導管へ積み込まれる前にアンモニウムをグルタミンに変換する可能性が示唆された。酵素的には似た性質を有している二つのGS1を別々の細胞に局在することで、アンモニウムを同化することが明らかとなった。次に、アンモニウムに対する基質親和性が高いGS1;1とGS1;4に着目して解析を行った。GS1;1を欠損させても、GS1;4を欠損させても、低濃度のアンモニウムにおけるシロイヌナズナの生育には影響がほとんどなかった。しかし、GS1;2やGS1;3が欠損する遺伝背景からGS1;1を欠損させると、シロイヌナズナの生育が不良となったことから、低濃度のアンモニウムはGS1;1, GS1;2, GS1;3が重複しながら同化することが明らかとなった。

(3)グルタミン合成酵素の変異体におけるアンモニウムの輸送の変化

GS1の変異体におけるアンモニウムの輸送を評価した。根で発現するGS1のうち、アンモニウムの輸送に関与すると考えられるGS1はGS1;1とGS1;2である。これらのGS1は植物の窒素条件によって根の表層細胞群で発現する。

GS1;2が欠損するとアンモニウムの吸収は増加する傾向が認められた。AMTの遺伝子発現はGS1が合成するグルタミンによって減少することが知られている。AMTの遺伝

子発現を抑制するグルタミンの合成は GS1;2 が行う可能性が示唆された。GS1;2 の欠損とは対照的に、GS1;1 の欠損はアンモニウムの輸送を減少させた。GS1;2 と GS1;1 によるアンモニウム輸送の制御は正反対であることがわかった。

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6件)

Saito, M., Konishi, N., Kanno, K., Yamaya, T., and Kojima, S. (2017). Transcriptional repressor IAA17 is involved in nitrogen use by modulating cytosolic glutamine synthetase *GLN1;2* in Arabidopsis roots. *Soil Science and Plant Nutrition*. 査読有り in press.

Ohashi, M., Ishiyama, K., Kojima, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Yamaya, T., and Hayakawa, T. (2017). Lack of cytosolic glutamine synthetase1;2 activity reduces nitrogen-dependent biosynthesis of cytokinin required for axillary bud outgrowth in rice seedlings. *Plant and Cell Physiology*. 査読有り in press.
DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx022>

Yabuki, Y., Ohashi, M., Imagawa, F., Ishiyama, K., Beier, M.P., Konishi, N., Umetsu-Ohashi, T., Hayakawa, T., Yamaya, T., and Kojima, S. (2017). A temporal and spatial contribution of asparaginase to asparagine catabolism during development of rice grains. *Rice* 査読有り 10, 1-10.
DOI: 10.1186/s12284-017-0143-8

Konishi, N., Ishiyama, K., Beier, M.P., Inoue, E., Kanno, K., Yamaya, T., Takahashi, H., and Kojima, S. (2017). Contribution of two glutamine synthetase isozymes to ammonium assimilation in Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany* 査読有り 68, 613-625.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erw454>

大橋美和、小島創一、早川俊彦 (2016) コメの生産性を規定するアンモニウム同化系酵素の新規な役割イネにおける窒素代謝に依存した分けつの成

長制御、*化学と生物*、査読なし、54, 867-868

Kojima, S., Konishi, N., Beier, M.P., Ishiyama, K., Maru, I., Hayakawa, T., and Yamaya, T. (2014). NADH-dependent glutamate synthase participated in ammonium assimilation in Arabidopsis root. *Plant Signaling & Behavior* 査読有り 9, e29402. DOI: 10.4161/psb.29402

[学会発表] (計13件)

大橋美和、石山敬貴、小島創一、小西範幸、宮尾光恵、山谷知行、早川俊彦、サイトゾル型グルタミン合成酵素 1;2 を欠損したイネ変異体の分けつの減少はアスパラギンよりもグルタミンの利用可能量の減少に起因する、第58回日本植物生理学会年会、2017年03月16日~2017年03月18日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

小西範幸、石山敬貴、菅野圭一、小島創一、シロイヌナズナ根のアンモニウム同化におけるグルタミン合成酵素アイソザイムの機能分担、第58回日本植物生理学会年会、2017年03月16日~2017年03月18日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

小西範幸、石山敬貴、菅野圭一、早川俊彦、山谷知行、小島創一、シロイヌナズナの根におけるアンモニウムの初期同化、第45回根研究集会、2016年09月30日~2016年10月01日、岡山大学資源植物研究所(岡山県倉敷市)

小西範幸、石山敬貴、菅野圭一、小島創一、シロイヌナズナ根のサイトゾル型グルタミン合成酵素アイソザイムの機能解析、第2回植物の栄養研究会、2016年09月02日~2016年09月03日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

齋藤雅英、小西範幸、菅野圭一、小島創一、シロイヌナズナの窒素栄養利用におけるオーキシン情報伝達の役割の解明、第57回日本植物生理学会年会、2016年03月18日~2016年03月20日、岩手大学(岩手県盛岡市)

小西範幸、石山敬貴、山谷知行、小島創一、シロイヌナズナのサイトゾル型グルタミン合成酵素 *GLN1;2* に依存的なアンモニウムの同化、第57回日本植物生理学会年会、2016年03月18日~2016年03月20日、岩手大学(岩手県盛岡市)

Takayuki Fujita, Kazuhiro Sasaki, Keiichi Kanno, Tomoyuki Yamaya and Soichi Kojima, High-affinity urea transporter DUR3 is involved in rice productivity under nitrogen deficient condition, 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 03 月 18 日 ~ 2016 年 03 月 20 日、岩手大学(岩手県盛岡市)

Miwa Ohashi, Keiki Ishiyama, Miyako Kusano, Atsushi Fukushima, Soichi Kojima, Tomoyuki Yamaya, Toshihiko Hayakawa, Lack of cytosolic glutamine synthetase1;2 reduced the availability of glutamine and sucrose for axillary bud outgrowth in the rice seedling, 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 03 月 18 日 ~ 2016 年 03 月 20 日、岩手大学(岩手県盛岡市)

Miwa Ohashi, Keiki Ishiyama, Miyako Kusano, Atsushi Fukushima, Mikiko Kojima, Soichi Kojima, Toshihiko Hayakawa, Hitoshi Sakakibara, Tomoyuki Yamaya, Stimulation of axillary buds elongation by metabolite and cytokinin in rice, 第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 03 月 16 日 ~ 2015 年 03 月 18 日、東京農業大学(東京都世田谷区)

小西範幸、石山敬貴、丸山葵、齋藤雅英、丸郁美、早川俊彦、山谷知行、小島創一、シロイヌナズナ根で発現する遺伝子群のアンモニウム応答に必要な領域の特定、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 03 月 16 日 ~ 2015 年 03 月 18 日、東京農業大学(東京都世田谷区)

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、日本土壌肥料学会 2014 年度東京大会、2014 年 09 月 09 日 ~ 2014 年 09 月 11 日、東京農工大学(東京都府中市)

藤田貴之、石山敬貴、早川俊彦、山谷知行、小島創一、高親和型尿素輸送担体が破壊されたイネの収量の解析、第 32 回日本植物細胞分子生物学会大会、2014 年 08 月 21 日 ~ 2014 年 08 月 22 日、いわて県民情報交流センター(岩手県盛岡市)

藤田貴之、石塚和、石山敬貴、早川俊彦、山谷知行、山口淳二、小島創一、イネ高親和型アンモニウムトランスポーター1;3 の逆遺伝学的な解析、土壌肥料学会東北支部会、2014 年 07 月 07 日 ~ 2014 年 07 月 08 日 東北大学(宮城県仙台市)

〔図書〕(計 1 件)

リンカーン・テイツ、エドゥアルド・ザイガー、西谷和彦、島崎研一郎、小島創一、講談社サイエンティフィック、植物生理学・発生学第 6 版、(2017)、全 832 ページ (351-375)

〔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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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
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

(4) 研究協力者

石山 敬貴 (ISHIYAMA, Keiki)
東北大学・大学院農学研究科・研究支援者

榎本 郁美 (ENOMOTO, Ikumi)
東北大学・大学院農学研究科・研究支援者

菅野 圭一 (KANNO, Keiichi)
東北大学・大学院農学研究科・研究支援者

小西 範幸 (KONISHI, Noriyuki)
東北大学・大学院農学研究科・大学院生

大橋 美和 (OHASHI, Miwa)
東北大学・大学院農学研究科・大学院生

Marcel Pascal, Beier
東北大学・大学院農学研究科・大学院生

中山 洋佑 (NAKAYAMA, Yosuke)
東北大学・大学院農学研究科・大学院生

藤田 貴之 (FUJITA, Takayuki)
東北大学・大学院農学研究科・大学院生

安田 貴則 (YASUDA, Takanori)
東北大学・大学院農学研究科・大学院生

齋藤 雅英 (SAITO, Masahide)
東北大学・大学院農学研究科・大学院生

矢吹 有唯 (YABUKI, Yui)
東北大学・大学院農学研究科・学部生

丸山 葵 (MARUYAMA, Aoi)
東北大学・大学院農学研究科・学部生