

# イネおよびヨシの高親和性硝酸輸送システムに関わる 遺伝子の構造と発現

荒木良一  
環境動態学専攻

一般的に、限られた窒素源を効率的に利用し高い生産性を示す植物が重要であると考えられる。それは、限りある畑に投入されている肥料も限りある資源の一部であるためである。そのため、植物の窒素同化能力は大きな意味での環境科学とも密接に関わっている。

本研究では植物の生育に重要な窒素源のひとつである硝酸と硝酸同化の第1段階であるイネ科植物の根の表皮細胞における硝酸吸収メカニズムに注目し、イネ (*Oryza sativa*) とヨシ (*Phragmites australis*) の硝酸吸収メカニズムの解析を植物生理学および分子生物学レベルで行なった。本博士論文は4章から構成されており、概要は以下の通りである。

第1章では硝酸濃度に依存して働く低親和性輸送システムおよび高親和性輸送システムを支配する遺伝子 *NRT1* および *NRT2* の現在までの研究の流れについて概説した。また、近年明らかにされつつある *NRT2* の機能活性を制御すると考えられる *NAR2* についてもふれ、本研究で注目すべき部分を明らかにした。

第2章ではイネのゲノムデータベースからイネの *NRT2* および *NAR2* (それぞれ *OsNRT2* および *OsNAR2*) を単離し、それらの配列から推測される4つの *OsNRT2* (*OsNRT2.1* - *OsNRT2.4*) および2つの *OsNAR2* (*OsNAR2.1* と *OsNAR2.2*) の基礎的データを *in silico* 解析により取得した。その結果、*OsNRT2.1* と *OsNRT2.2* はORFの配列が同一であるが、5'および3'UTRが異なる遺伝子であることを明らかにした。さらに、各々の遺伝子の5'UTRにおいて転写制御機構に関わるTATAボックスあるいはGATAモチーフの配置の違いを明らかにし、それら遺伝子間の転写制御の違いを予測した。また、さまざまな生物種の *NRT2* のアミノ酸配列を元にして系統樹を作成した結果、*OsNRT2*s が単子葉植物の *NRT2* グループに含まれるものと、シロイヌナズナの *AtNRT2.7* が含まれる単に進化系統的に分類できないグループに含まれた。このような *OsNRT2* ファミリーの構成は、すでにシロイヌナズナで報告されていたものと同様であった (図1)。

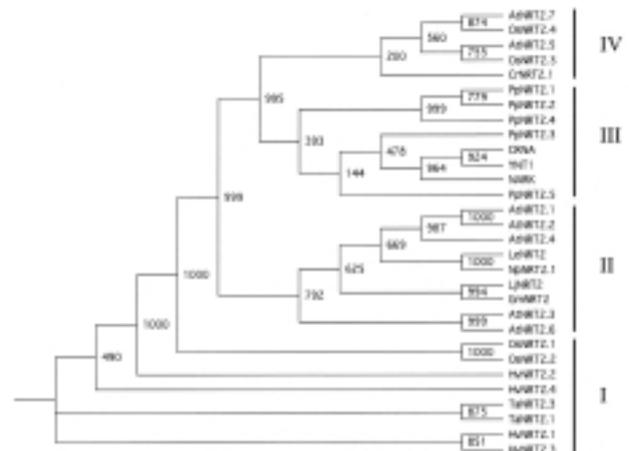


図1. 生物の *NRT2* の系統樹。 *NRT2*s の推定アミノ酸配列を ClustalW と Tree View を用いて系統樹解析を行った。系統樹上のそれぞれ数字はその分岐の確からしさを表しており、1000 が最も確からしい (bootstrap = 1000 replicates)。I は単子葉植物、II は双子葉植物、III はコケや酵母を含む下等生物、IV は上記のように進化系統的に分かれなかったそれぞれの *NRT2* のグループを示す。

第3章では、前章で抽出・特定した4つの *OsNRT2* と2つの *OsNAR2* の機能を明らかにするため、硝酸誘導時における硝酸吸収とそれらの遺伝子の発現パターンを、硝酸処理前に窒素飢餓前処理またはアンモニア前処理 (それぞれ積極的誘導条件または抑制的誘導条件) を行なった幼植物体を用いて経時的に解析した (図2 と 図3)。積極的誘導条件では、*OsNRT2.1*、*OsNRT2.2*、*OsNRT2.4* と *OsNAR2.1*

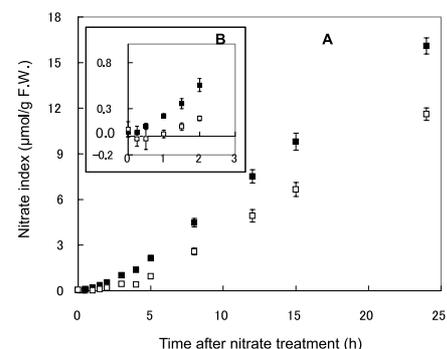


図2. 経時的な硝酸吸収量の増加 (AとB)。幼植物体を  $500 \mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  で前処理を行なった処理区 (■) と行なっていない処理区 (□) を設け、その後  $200 \mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  溶液で24時間処理を行ない経時的に硝酸吸収量を測定した。Aは硝酸処理後24時間の経時的な増加を示し、Bは0から2時間の増加を示している。それぞれ6反復行なった。

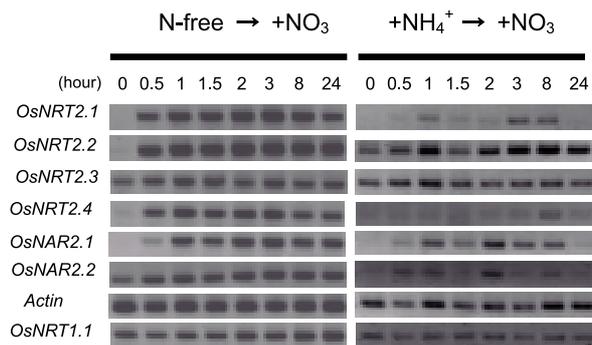


図3. 硝酸誘導処理直後からの根における*OsNRT2s*と*OsNAR2s*の発現パターン。処理区は図2と同様に設定し、硝酸誘導処理後の任意の時間で発現解析を行なった。*Actin*は内部標準遺伝子。

の発現および硝酸吸収は硝酸処理後ほぼ同じ時間から誘導され、上記遺伝子の硝酸吸収への関与が示唆された。しかし、抑制的誘導条件の幼植物体では、*OsNRT2.1*および*OsNAR2.1*の発現と硝酸吸収は遅れて誘導され、*OsNRT2.2*は硝酸処理開始前から発現していた。異なる二つの前処理条件でも*OsNRT2.1*および*OsNAR2.1*は硝酸吸収とともに誘導されていたので、両遺伝子が根における硝酸吸収に重要な役割を果たしていることを結論した。

また、積極的誘導条件における幼植物体の*OsNRT2.1*および*OsNRT2.2*の発現量は、抑制的誘導条件時と比較して劇的に増加していた。しかし、それぞれの同時刻の*OsNAR2.1*の発現量は上記両遺伝子とは異なり、両前処理区間で劇的な発現量の差異が認められなかった。一方、積極的誘導条件または抑制的誘導条件時の硝酸吸収量の増加速度には大差がなく、*NRT2*の発現量と根における硝酸吸収の活性には正の相関が認められないことを示唆した。以上の結果から、過剰に硝酸誘導された*OsNRT2.1*および*OsNRT2.2*は転写後あるいは翻訳後調節を受けていること、さらに他の植物で報告されているように、*OsNRT2.1*の活性化に*OsNAR2.1*が関与することを示唆した。今後は、タンパク質レベルでの研究が必要であろう。

第4章では、琵琶湖周辺の水際に生息するヨシの硝酸吸収能力に注目し、ヨシの硝酸吸収速度の評価と*NRT2*の単離を行なった。ヨシ集団内で硝酸吸収能力の指標となる $K_m$ と $V_{max}$ の差異を認め、硝酸誘導後の $K_m$ と $V_{max}$ の差異が大きい2つのヨシクローン株(W-6およびW-8)を選抜した(図4)。両ヨシクローンについて分子生物学的手法を用いて研究した結果、両クローンの*NRT2*は硝酸誘導時に異なる発現パターンを示すことおよび両クローン間の*NRT2*

のアミノ酸残基が3つ異なっていることを明らかにした。以上の結果を総合し、自然集団のヨシの硝酸吸収能力には遺伝的差異があり、硝酸吸収能力の高いヨシを選抜・育種することが可能であると結論した。

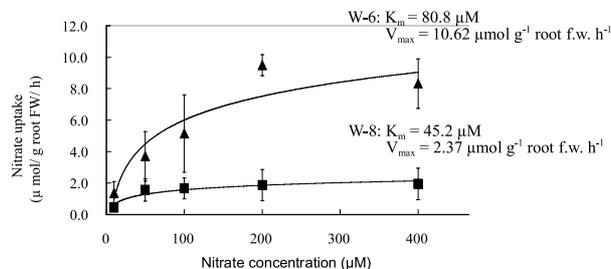


図4. ヨシ小植物体の硝酸吸収の遺伝的差異。クローンW-6は○で、クローンW-8は□で示す。

本博士研究論文は未解明であったイネおよびヨシの硝酸吸収に関与する遺伝子を明らかにしたものである。イネでは*OsNRT2.1*および*OsNAR2.1*に焦点を絞り、根における硝酸の吸収効率を高めて窒素源の利用効率を高める育種戦略の可能性を示した。ヨシでは*NRT2*を単離し、ヨシの硝酸除去能力を人為的に向上させる可能性を明示した。

本研究成果を応用すれば、冒頭の部分で述べた植物とは相対する形質を持つ窒素源を多量に吸収するだけの「燃費の悪い」植物が育種されるかもしれない。しかし、硝酸吸収量に見合った硝酸同化能力を付与すれば、硝酸利用効率をさらに高めた植物の育種も期待される。一方、限られた窒素源を最大限に活用することや過剰な窒素源をある系から効率的に取り除くために、相反する形質を持つ植物を必要に応じて使い分ける「環境科学的アプローチ」も考えられる。