

オオカナダモのシュートにおける高親和性硝酸吸収

高柳 周

環境動態学専攻

沈水植物は一次生産者としての役割だけではなく、栄養塩類の競合による植物プランクトンの増殖抑制機能、魚貝類や底生動物に生息場や産卵場を提供する機能、水底堆積物の巻き上がり防止機能などを有し、水圏生態系の健全性の維持に大きく貢献している。これらの機能の中で最も重要な養分吸収に関しては、沈水植物の生長に必要な栄養元素、ことにリンや窒素について、それらの主な吸収部位は根であると考えられてきた (Barko et al. 1991)。最近になって、富栄養化した小川において、沈水植物の根を切除したものと切除しなかったものを栽培したところ、両者の植物体全体の相対成長率に有意な差は無く、組織中のリンや窒素の濃度にも差が無かったという実験結果が報告されている (Madsen and Cedergreen 2002)。また、富栄養化した浅い湖では、コカナダモ (*Eloдея nuttallii*) が優占種の時だけではなく、根が無い沈水植物のマツモ (*Ceratophyllum demersum*) が優占種の時でも湖水中の無機窒素濃度が大幅に低下し、それが植物プランクトンの繁殖抑制を引き起こしている (van Donk et al. 1993)。以上のような事実から沈水植物の栄養塩類吸収の場として、近年はシュートの役割が重要視されるようになってきた。沈水植物の根だけでなくシュートからの養分吸収、ことに無機窒素の形態の中で最もよく見られる硝酸イオン (以下、硝酸) の吸収は沈水植物自体の生長だけでなく、水圏生態系における無機窒素の動態に重要な働きをしていると考えられるため、その詳細なメカニズムや役割を理解することが重要である。本論文では、沈水植物の硝酸吸収メカニズムを解明するために、淡水生沈水植物の中でも最もよく実験材料として使われてきたオオカナダモ (*Egeria densa*) を主な実験材料に選び、生態系においてこの植物の硝酸吸収で重要な役割を果たしていると考えられる高親和性硝酸トランスポーター (NRT2) に注目して研究を行った。

第1章では、沈水植物の養分吸収がシュートと根のどちらで行われているのか、その吸収メカニズムはどこまで解明されているのかについて、現在までの知見をまとめた。最も研究が進んでいるリン酸イオン (以下、リン酸) の吸収と本研究で注目した硝酸を含む無機窒素の吸収、およびそれら以外のイオンの吸収について精査した。その結果、沈水植物の

硝酸吸収は陸生植物のものとは異なり、硝酸とプロトンが1:1の比で共輸送されるなど、ユニークなメカニズムで行われていることが電気生理学的手法によって明らかにされていた。しかしながら、リン酸や無機窒素の吸収については分子生物学的解析はほとんど行われておらず、オオカナダモにおいてリン酸トランスポーターが単離され、その発現パターンが報告されている (Ohta et al. 2005) だけであり、栄養イオン吸収のメカニズムには不明な点が多く残されていた。そのため、これらのイオンの吸収について分子レベルでの研究が必要なことを明らかにした。

第2章では、二酸化炭素 (CO₂) 分配システムを工夫したオオカナダモの栽培システムを開発し (図1)、この栽培システムを用いてオオカナダモの生育に及ぼす硝酸濃度 (20、200、2,000 および 20,000 μM) の影響と、根の有無が生育に及ぼす影響について調査した。陸生植物では高親和性輸送システム (High-Affinity Transport System: HATS) が硝酸吸収に関与する 200 μM 以下の低濃度の硝酸濃度条件下で、2,000 μM の場合と同様にオオカナダモの小植物体が生長したことから、オオカナダモは硝酸吸収のための HATS を有していることが示唆された。また、根の有無で生長に有意な差が見られなかったことから、オオカナダモは根だけでなくシュートからも硝酸を吸収できることが示唆された。

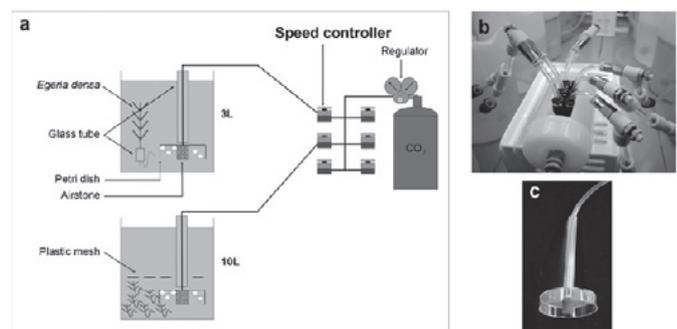


図1 CO₂ 分配システム
CO₂ 分配システムの概略図 (a)、スピードコントローラー (b)、CO₂ 放出部 (c)。

第3章では、オオカナダモから高親和性硝酸トランスポーターをコードする NRT2 (*EdNRT2*) を単離した。この遺伝子はオオカナダモのゲノム上に

1つしか存在しなかった。親株から切り出した小植物体において *EdNRT2* の発現パターンを調査した。その結果、この遺伝子の転写は硝酸によってシュートと根の両方で誘導されたが、亜硝酸、アンモニウムおよびナトリウムではシュートと根の両方で誘導されなかった。さらにシュートと根を分画し、それぞれの器官の *EdNRT2* の発現パターンと、¹⁵N-硝酸 (200 μM) の吸収を調べたところ、*EdNRT2* は硝酸で処理した器官でのみ発現が誘導された (表 1)。¹⁵N の大部分は ¹⁵N-硝酸で処理した器官でのみ検出され、シュートは根と同等以上の硝酸吸収能力を有していた (表 2)。以上の結果は、シュートと根は共に *EdNRT2* を用いて同じメカニズムで硝酸を吸収していることを示している。また、短時間 (6 時間以内) の硝酸処理では、吸収した ¹⁵N-硝酸の器官間の転流がほとんど生じず、さらに一方の器官の硝酸吸収量がもう一方の器官の硝酸吸収量に影響を及ぼさなかったため、両器官は独立的に硝酸を吸収していることが明らかになった。また、今回実験で使用したオオカナダモ小植物体の根に対するシュートのバイオマスの比は 1.2 ~ 2.9 であるが (表 2)、トチカガミ科のカナダモ (*Eloдея canadensis*) を含む淡水生沈水植物を野外で長期間栽培した場合、根に対するシュートのバイオマスの比は 5.9 ~ 23.0 になる (Madsen and Cedergreen 2002)。そのため、水圏生態系ではオオカナダモの硝酸吸収にはシュートの貢献度がより高くなることが示唆された。

表 1 オオカナダモのシュートと根を分画した場合の *EdNRT2* の転写産物量

Nitrate exposed organ	The level of <i>EdNRT2</i> transcripts	
	Shoot	Root
No	0.07 ± 0.04a (1.00)	0.11 ± 0.06a (1.00)
Shoot	0.85 ± 0.20b (12.14)	0.11 ± 0.05a (1.00)
Root	0.08 ± 0.03a (1.14)	0.65 ± 0.28b (5.91)
Shoot and root	0.69 ± 0.27b (9.86)	0.66 ± 0.32b (6.00)

小植物体を 2 分画容器に組み込んでシュートと根を分画し、400 μM の硫酸カルシウム溶液で 38 時間前処理した後にシュートのみ、根のみ、および両器官に 200 μM 硝酸カリウムと 400 μM 硫酸カルシウムからなる溶液、あるいは 400 μM 硫酸カルシウム溶液で 3 時間処理した。それぞれ 3 反復 (1 反復は 3 個体の小植物体で行った) した。内部標準遺伝子には *Actin* を使用し、値は平均値 ± 標準偏差で表した。Tukey の多重検定法により異なるアルファベット間に 5% 水準で有意差があることを示す。

第 4 章では、オオカナダモのシュートにおける硝酸吸収を他種と比較するにあたって、湛水条件下で伸長するイネ (*Oryza sativa*) の子葉鞘に注目した。水中で発芽させて得た子葉鞘とその対照器官として水耕栽培したイネ幼植物体の根を供試した。両器官の硝酸吸収を ¹⁵N をトレーサーとして調査するとともに、高親和性硝酸トランスポーター遺伝子 (*OsNRT2.1 ~ 2.4*) と、それらに協調的に発現する遺伝子 (*OsNAR2.1* と *2.2*) について、両器官で硝酸処理に対する経時的な発現パターンを調べた。その結果、イネの子葉鞘は幼植物体の根よりも劣るが高親和性の硝酸吸収を行うこと、根において高親和性の硝酸吸収で重要な役割を果たしている *OsNRT2.1* の転写が硝酸によって子葉鞘でも強く誘導されることが明らかになった (図 2)。オオカナダモの場合と同様にイネの子葉鞘も幼植物体の根と同一の遺伝子 (*OsNRT2.1*) を用いて硝酸を吸収していることが明らかになった。

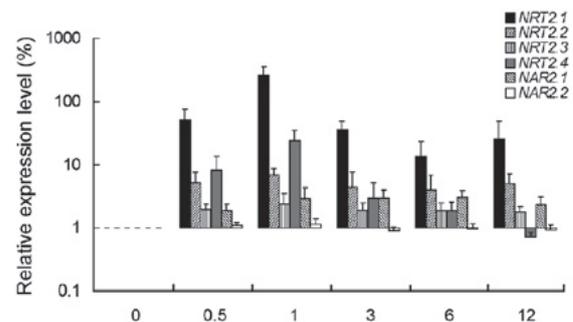


図 2 イネ子葉鞘における硝酸処理開始後の *OsNRT2s* と *OsNAR2s* の発現パターン
子葉鞘を 400 μM 硫酸カルシウム溶液で 24 時間前処理した後に、200 μM 硝酸カリウムと 400 μM 硫酸カルシウムからなる溶液で 0 ~ 12 時間処理した。それぞれ 3 反復 (1 反復は 30 個体の子葉鞘で行った) した。内部標準遺伝子には *Actin* を使用し、各々の遺伝子は処理開始時の発現量を 1 として表現した。エラーバーは標準偏差を表す。

以上のように本研究では、淡水生沈水植物の中でも最もよく実験材料として使われてきたオオカナダモを実験材料に選び、その栽培システムを開発した。それを用いてオオカナダモのシュートは根と同等以上の硝酸吸収能力を有し、根と同じ高親和性硝酸トランスポーター遺伝子 (*NRT2*) が発現して硝酸を吸収していることを明らかにした。さらに硝酸吸収についてシュートと根の相互作用が無いことを示した。

現在のところ、野外の沈水植物の生育環境下では

表2 オオカナダモのシュートと根を分画した場合のバイオマスと ¹⁵N 吸収

¹⁵ N-nitrate exposed organ	Fresh weight (mg/organ)		Dry weight (mg/organ)		atom% ¹⁵ N in dry organ		¹⁵ N content in organ (nmol/mg DW)	
	Shoot	Root	Shoot	Root	Shoot	Root	Shoot	Root
No	87.6 ± 23.0	41.8 ± 6.0	10.4 ± 2.9	3.6 ± 0.3	0.37 ± 0.00a	0.37 ± 0.00a	9.6 ± 0.9c	5.9 ± 0.3c
Shoot	62.2 ± 14.4	46.0 ± 4.3	7.4 ± 2.3	4.0 ± 0.2	2.48 ± 0.31b	0.37 ± 0.00a	59.4 ± 4.7d	5.8 ± 0.4c
Root	47.0 ± 7.0	50.0 ± 3.4	5.1 ± 0.9	4.3 ± 0.2	0.44 ± 0.02a	2.21 ± 0.45b	10.8 ± 0.9c	33.6 ± 7.4e
Shoot and root	68.1 ± 14.3	45.3 ± 19.0	7.6 ± 2.1	3.8 ± 1.7	2.56 ± 0.22b	2.49 ± 0.47b	71.1 ± 3.0d	39.8 ± 7.6e

前処理までは表1と同様に行った後に、シュートのみ、根のみ、および両器官に 200 μM ¹⁵N-硝酸カリウム (98.2 atom% ¹⁵N) と 400 μM 硫酸カルシウムからなる溶液、あるいは 400 μM 硫酸カルシウム溶液で 6 時間処理した。それぞれ 3 反復 (1 反復は 3 個体の小植物体で行った) し、値は平均値 ± 標準偏差で表した。Tukey の多重検定法により、異なるアルファベット間に 5%水準で有意差があることを示す。

水底堆積物の無機窒素、特にアンモニウム濃度が水柱のものに比べて圧倒的に高い場合が多いため、沈水植物の主な無機窒素の吸収部位は根であるという考えが支配的である (Barko et al. 1991)。しかしながら、最近ではシュートからの無機窒素吸収の重要性を示唆する研究例も多い (van Donk et al. 1993; Madsen and Cedergreen 2002)。本研究の成果と、沈水植物のシュートのバイオマスが野外では根よりもはるかに大きくなること (Madsen and Cedergreen 2002) より、野外ではオオカナダモはシュートから必要とする硝酸の多くを吸収していると考えるのが妥当である。

海水生沈水植物にはシュート周辺の無機窒素の有無によって根の無機窒素の吸収速度が影響される種や、反対に根周辺の無機窒素の有無によってシュートの無機窒素の吸収速度が影響される種があり、海水生沈水植物では無機窒素の吸収においてシュートと根の相互作用があると報告されている (Thursby and Harlin 1982; 1984)。しかしながら、本研究では、オオカナダモの硝酸吸収において、遺伝子レベルでも硝酸吸収量でも両器官間の相互作用が確認されなかった。オオカナダモの硝酸吸収に関しては根とシュートの相互作用が無いことから、根の周辺の無機窒素量に影響されずに、生長に必要な硝酸の多くをシュートから吸収していると考えられる。

このようにオオカナダモではシュートからの硝酸吸収の重要性が明らかになった。今後は水圏生態系の栄養塩類の動態をより深く理解するために、沈水植物の硝酸以外の栄養塩類の吸収についても研究を進めることが必要である。

本研究はオオカナダモの硝酸吸収と同様に、イネでも子葉鞘と根は同じ NRT2 を用いて硝酸を吸収していることを明らかにした。この事実は単子葉植物のシュートの相似器官は沈水条件下で硝酸を吸収

することが可能であり、その吸収メカニズムは根と同じであることを示している。沈水植物のシュートにおける硝酸以外の栄養イオンの吸収を研究する際にも全ゲノム情報が公開されているイネの子葉鞘はモデル器官として利用できると考えられる。また、本研究のオオカナダモとイネから得られた結果を総合すると、単子葉植物では高親和性の硝酸吸収において重要な働きをするタイプの *NRT2* の発現は器官特異的ではなく、周辺の硝酸濃度のような環境要因によって制御されていると考えられる。今後、硝酸以外の環境要因、特に沈水条件下で生じることが予測される低酸素条件や、それと関連する培養液中の酸素濃度と硝酸濃度の組み合わせが *NRT2* の発現に及ぼす影響についても明らかにする必要がある。

本研究で開発した栽培システムや実験手法はオオカナダモだけに限定されるものではなく、オオカナダモ以外の沈水植物の栽培方法の確立や生育調査、イオン吸収能力の評価や分子レベルの研究などにも貢献する。さらに水質改善に沈水植物のイオン吸収能力を活用する際にも本研究の成果は役立つものである。

引用文献

- Barko JW, Gunnison D, Carpenter SR (1991) Sediment interactions with submersed macrophyte growth and community dynamics. *Aquat Bot* 41:41-65
- Madsen TV, Cedergreen N (2002) Sources of nutrients to rooted submerged macrophytes growing in a nutrient-rich stream. *Freshw Biol* 47:283-291
- Ohta N, Mitsuhashi N, Iida S, Kosuge K, Mimura T (2005) Molecular analysis of phosphate transport in *Egeria densa*. *J Plant Res* 118, Suppl:138
- Thursby GB, Harlin MM (1982) Leaf-root interaction in the uptake of ammonia by *Zostera marina*. *Mar Biol* 72:109-112
- Thursby GB, Harlin MM (1984) Interaction of leaves and roots of *Ruppia maritima* in the uptake of

phosphate, ammonia and nitrate. *Mar Biol* 83:61-67
van Donk E, Gulati RD, Iedema A, Meulemans JT (1993)
Macrophyte-related shifts in the nitrogen and
phosphorus contents of the different trophic levels
in a biomanipulated shallow lake. *Hydrobiologia*
251:19-26