

ルーピンクラスター根の窒素欠乏環境における機能の解明

東北大学大学院 農学研究科

小島 創一

現代社会が解決しなければならない大きな環境問題の一つは、環境の富栄養化による生態系の破壊と水質の汚染である。富栄養化は植物が利用できなかった肥料の流出によって引き起こされる。農作物は窒素やリンなどの肥料を三割程度しか吸収することができず、肥料の利用効率は改善の余地がある。申請者の小島と和崎は植物の窒素とリンの効率的な利用について、それぞれ研究を展開してきた。

本研究では、マメ科植物の一つであるルーピンに焦点をあてる。ルーピンはドイツ語でWolfsbohne (オオカミのマメ) と呼ばれ、その土壌からの栄養収奪力の強さをオオカミに例えられてきた。申請者はルーピンの強靱な環境適応能力機構を理解することで、農作物の窒素・リンの獲得機構を改善するための指針を得られるのではないかと考えた。ルーピンは窒素やリンの欠乏過程でクラスター根 (特徴的な房状の根) を形成する。近年、クラスター根が有機酸を放出して土壌中のリンを可溶化することで、土壌のリンの移動性が改善されてルーピンのリン獲得効率が高くなる機構が解明された。しかし、クラスター根の窒素欠乏における機能は未解明である。

本研究は、これらの経緯を踏まえて下記の点を明らかにしたい。

1. クラスター根の形成によって窒素輸送能力がどれくらい向上するか？
2. クラスター根の形成によって土壌の無機態・有機態窒素の移動性が変化するか？

これらの研究を通じてルーピンの窒素欠乏への適応機構について解明を目指す。

実験方法

ルーピンのアンモニウム輸送担体 (AMT) 遺伝子の単離

シロイヌナズナのアンモニウム輸送担体 (AMT) のアミノ酸配列に対して相同性を示す遺伝子についてルーピングゲノムデータベースを検索したところ、ルーピングゲノムは、7 遺伝子の AMT をコードしている可能性が示唆された。これらの AMT 遺伝子族は二つのグループに分類可能であった。高等植物で独自に進化し、根における高親和型アンモニウム輸送を中心的に担う AMT1 と AMT2 である。ルーピングゲノムは AMT1 を 4 遺伝子 (Lalb_Ch03g0036901, Lalb_Ch21g0314161, Lalb_Ch20g0113501, Lalb_Ch05g0215581)、AMT2 を 3 遺伝子 (Lalb_Ch19g0124341, Lalb_Ch01g0023211, Lalb_Ch07g0184111) コードしていた。そこで、下記に示すオリゴ DNA を用いて、ルーピンの葉及び根から調製した cDNA を鋳型として PCR を行い遺伝子クローニングを行った。La05g0215581_penF 5' - CAC CAT GGA GGC TTC ATG GGA AGA AAG TG - 3', La05g0215581_penRstp 5' - TTA TGA TTG GTC TTC CCG GAT ACG C - 3', La21g0314161_penF 5' - CAC CAT GGC AGC ATC ACT AAC ATG TTC CAT C - 3', La21g0314161_penRstp 5' - TCA AGC TAC TTC AGA AGA ATG TGT CCT TG - 3', La01g0023211_penF 5' - CAC CAT GGC TAC TCC AAC AGC ATA TCT TCC - 3', La01g0023211_penRstp 5' - TTA TAA ATT CAT GGT CAG ACC TCT AGC ACC - 3', La07g0184111_penF 5' - CAC CAT GGC TTC TCC TCC ATT ACC GAT AG - 3', La07g0184111_penRstp 5' - CTA TAC CAC TTG AGT GGC ACT ACC AC - 3', La19g0124341_penF 5' - CAC CAT GGC TAC TCC CAC AGC ATA CC - 3', La19g0124341_

penRstp 5' - TCA TAA ATT TAT GGT CAC ACC TCT AGC ACC - 3', La03g0036901_penF 5' - CAC CAT GTC CCT TCC AGT TTG CTC - 3', La03g0036901_penRstp 5' - TTA TGT GGT GGG AGT GGA AG - 3', La20g0113501_penF 5' - CAC CAT GGC GGC ATA TAC ATG CTC - 3', La20g0113501_penRstp 5' - CTA TGC AGC CCC AAA TTC AG - 3'。PCRによって増幅した断片は pENTR/D TOPO (Invitrogen 社) ベクターにクローニングし、適宜合成した内部プライマーと m13 プライマーを用いて塩基配列を解読した。塩基配列の解読は AZENTA 社のシーケンス解析サービスを利用した。

ルーピンの尿素輸送担体 (DUR3) 遺伝子の単離

シロイヌナズナの尿素輸送担体 (DUR3) のアミノ酸配列に対して相同性を示す遺伝子についてルーピンゲノムデータベースを検索したところ、ルーピンゲノムは、1 遺伝子の DUR3(La05g0215361) をコードしている可能性が示唆された。そこで、下記に示すオリゴ DNA を用いて、ルーピンの葉及び根から調製した cDNA を鋳型として PCR を行い遺伝子クローニングを行った。La05g0215361_penF 5' - CAC CAT GTC TTC TGT TTT ACA TTG - 3', La05g0215361_penRstp 5' - TTA TGC ATG AAG AGA ATA AGC - 3'。PCR 後は AMT と同様にクローニングしてシーケンスを行なった。

ルーピンの cDNA の調製

水耕栽培したルーピンの組織を 2 ml 容チューブに収穫し、液体窒素で冷却しながら破碎した。その後、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN、東京、日本) を用いて、添付のプロトコルに従って total RNA を抽出した。抽出後の total RNA の一部を PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ、滋賀、日本) を用いて、逆転写し cDNA プールを作成した。

ルーピンの水耕栽培

広島大学和崎淳博士から分譲していただいたルーピンの種子を濾紙で筒状に巻き、1,000 mL 容積のビーカーに設置して給水して培養器内で発芽させた。栽培条件と水耕液の組成はシロイヌナズナの栽培条件を参考にして行なった (Konishi et al. 2017)。播種後一週間の種子をモルトプレンで包み穴を開けたアクリル板に固定した。アクリル板を 0.7 L 容積のプラスチックコンテナに設置して、一週間に一度の頻度で水耕液を更新して植物を生育させた。

窒素元素の定量

栽培を終えて採取した植物は 70 度に加温した恒温器で一週間程度乾燥させた。乾燥した試料の重量を測定し、全量をマルチビーズショッカー (安井機器) で粉碎した。乾燥粉末試料を精密天秤で秤量して錫箔に封入して閃光燃焼したのちにヘリウムガスをキャリアとしてガスクロマトグラフィーを行い、既知濃度の試料を標準物質として窒素含量を定量した。窒素利用効率は Good et al. 2004 を参考にして、窒素量あたりの乾燥重量を測定して評価した。

ルーピンの根におけるアンモニウムと尿素輸送の安定同位体によるトレース

播種後一週間後から二週間水耕栽培した植物を二つの窒素処理区に分けた。水耕液から窒素栄養を除いた処理区と窒素栄養を与える処理区を設定して、さらに二週間培養した。こうして作成した植物に重窒素で標識されたアンモニウムと尿素をそれぞれ6分間または10分間与えた。標識後の植物の根は1 mM 硫酸カルシウムで洗浄した。植物を地上部と根に分けて採取した。採取した植物は窒素定量と同様に処理して乾燥粉末試料を錫箔に秤量して安定同位体比質量分析装置に供試して窒素の同位体比を測定した。単位時間・単位乾燥重量あたりに根の細胞内へ輸送されたアンモニウム (Loque et al. 2006) と尿素 (Kojima et al. 2007) の量を算出した。

ルーピンとトウモロコシの混合栽培

播種一週間後のルーピンと播種三日間後のトウモロコシを植木鉢に移植した。植木鉢には発酵済のナタネ油粕を有機肥料として、赤玉土に混合した土壌を入れた。トウモロコシのみを植えた区、トウモロコシとルーピンを植えた区、ルーピンのみを植えた区の三区を設けた。給水しながら二ヶ月程度生育させた。二ヶ月後にトウモロコシの重量をルーピンがある場合とない場合に分けて測定して比較した。

実験結果及び考察

ルーピン AMT 遺伝子のクローニング

ルーピン AMT1 として 3 遺伝子 (Lalb_Ch03g0036901, Lalb_Ch20g0113501, Lalb_Ch05g0215581)、AMT2 を 3 遺伝子 (Lalb_Ch19g0124341, Lalb_Ch01g0023211, Lalb_Ch07g0184111) クローニングすることに成功した。Lalb_Ch21g0314161 はクローニングすることはできなかった。Lalb_Ch21g0314161 は PCR 反応で増幅されないことが原因でクローニングすることができなかった。本研究では、cDNA は地上部と根に由来している。Lalb_Ch21g0314161 はこれらの器官では、ほとんど発現していない AMT1 であることが予想された。他の AMT 遺伝子は Invitrogen 社の Gateway システムの適応が可能な pENTR/D にクローニングできたので、今後は Gateway 法を用いてさまざまな発現ベクターへ組み替えが可能となった。酵母の発現ベクターへ断片を移して機能証明を行ったり、植物の遺伝子組み換えベクターへ断片を移して植物体内における AMT 活性の機能証明を行ったりすることが可能となった。今後の研究を発展させるための重要な遺伝子資源を獲得することができた。

ルーピン DUR3 遺伝子のクローニング

ルーピン DUR3 として La05g0215361 をクローニングすることに成功した。AMT の場合と同様に、今後は Gateway 法を用いてさまざまな発現ベクターへ組み替えが可能となった。これまでに DUR3 はシロイヌナズナ、イネ、トウモロコシなどからクローニングされている。これらの植物種は全て DUR3 を一遺伝子のみコードしていた。ルーピンのゲノムの場合も DUR3 は一遺伝子のみコードされていた。今後の研究を発展させるた

めの重要な遺伝子資源を獲得することができた。

低窒素環境ではルーピンは窒素利用効率が向上した

ルーピンのバイオマスは窒素がある条件とない条件で有意な差が見られなかった (Fig. 1a)。窒素定量の結果から、窒素がある条件では窒素がない条件よりも個体あたりで二倍程度の窒素が蓄積していることがわかった (Fig. 1b)。窒素利用効率を算出したところ、窒素がない条件の方が窒素がある条件よりも高い窒素利用効率を示した (Fig. 1c)。本研究では、窒素処理区の設定から三日後に観察した。しかし、窒素欠乏の兆候がはっきりと現れなかったため、窒素処理を二週間程度継続した。イネやシロイヌナズナなどのモデル植物は三日間の処理で窒素欠乏の兆候を明確に観察することが可能である。ルーピンは窒素欠乏処理二週間を経過しても乾燥重量が有意に低下しないので、窒素欠乏環境に適応性が高いことがわかった。

低窒素環境ではルーピンはアンモニウム輸送と尿素輸送が向上した

アンモニウムと尿素を窒素源として与えて、ルーピンの根における窒素の輸送速度を窒素がない条件の植物と窒素がある条件の植物で比較した (Fig. 2)。窒素の欠乏は、アンモニウムと尿素の輸送速度をともに増加させた (Fig. 2)。アンモニウムと尿素を比較したところ、窒素のあるなしに関わらず、アンモニウムの方が尿素よりもよく吸収されることがわかった (Fig. 2)。短時間に地上部に輸送されるアンモニウムと尿素の量は極めて少量であることがわかった (Fig. 2)。イネやシロイヌナズナ (Loque et al. 2006) などのモデル植物と比較して、ルーピンの根が単位時間あたりに輸送する窒素の量は、7分の1程度と極端に少ないことがわかった。オオカミのマメと異名をとるルーピンの根は、窒素の吸収能力がイネやシロイヌナズナよりも高いのではないかと予測したが、実際はあまり栄養を輸送しないことがわかった。ルーピンの窒素欠乏環境における適応性の高さは、窒素の獲得能力の高さに依存するのではなく、窒素のリサイクル能力の高さに依存している可能性が示された。

ルーピンの共存はトウモロコシの有機肥料の利用を劇的に改善しなかった

ルーピンがリン欠乏条件になると根から有機酸を放出してリンを可溶化する (Wasaki et al. 2008)。可溶化されたリンはルーピンのリン利用を改善するのみならず、他の植物にも利用可能なリンを提供する。ルーピンの混作は低リン環境におけるトウモロコシのリン利用を向上させることが知られていた (Dissanayaka et al. 2015)。本研究では、ルーピンを混作することで、有機肥料である菜種油粕が利用されやすい窒素へ変換されて、トウモロコシの生育が良くなる可能性を模索した。しかし、有意差はつかなかったものの、ルーピンが存在することで、トウモロコシのバイオマスは減少する傾向があり (Fig. 3)、残念ながらルーピンの存在が、必ずしも有機肥料の利用されやすさを改善するわけではなさそうであることがわかった。ルーピンがあることでトウモロコシのバイオマスが減少する傾向を示すのは、ルーピンが自身の成長のために菜種油粕由来の有機肥料を使用してしまう、栄養の利用が競合するからだと予想した。この減少がトウモロコシの子実の生産性をどれくらい低下させるか、本研究のポット栽培では結論づけることができなかった。混作

のアイデアと農業生産を結びつけられるように、今後はポット栽培ではなくて圃場試験を行なっていく予定である。

要約

1. ルーピンのアンモニウムトランスポーターと尿素トランスポーターの遺伝子をクローニングした。
2. ルーピンが低窒素環境に高適応を示す要因として、窒素栄養の獲得能力に着目するだけでなく、窒素栄養のリサイクル能力に着目しなければならないことがわかった。
3. ルーピンの混作はトウモロコシの菜種油粕の利用を向上させることはなかった。

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に、心から厚く御礼申し上げます。

文献

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*, 68, 613-625.

Good, A.G., Shrawat, A.K. and Muench, D.G. (2004) Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science*, 9, 597-605.

Loque, D., Yuan, L., Kojima, S., Gojon, A., Wirth, J., Gazzarrini, S., Ishiyama, K., Takahashi, H. and von Wieren, N. (2006) Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *Plant J.*, 48, 522-534.

Kojima, S., Bohner, A., Gassert, B., Yuan, L. and von Wieren, N. (2007) AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *Plant J.*, 52, 30-40.

Wasaki, J., Kojima, S., Maruyama, H., Haase, S., Osaki, M. and Kandeler, E. (2008) Localization

of acid phosphatase activities in the roots of white lupin plants grown under phosphorus-deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54, 95-102.

Dissanayaka, D.M.S.B., Maruyama, H., Masuda, G. and Wasaki, J. (2015) Interspecific facilitation of P acquisition in intercropping of maize with white lupin in two contrasting soils as influenced by different rates and forms of P supply. *Plant and Soil*, 390, 223-236.

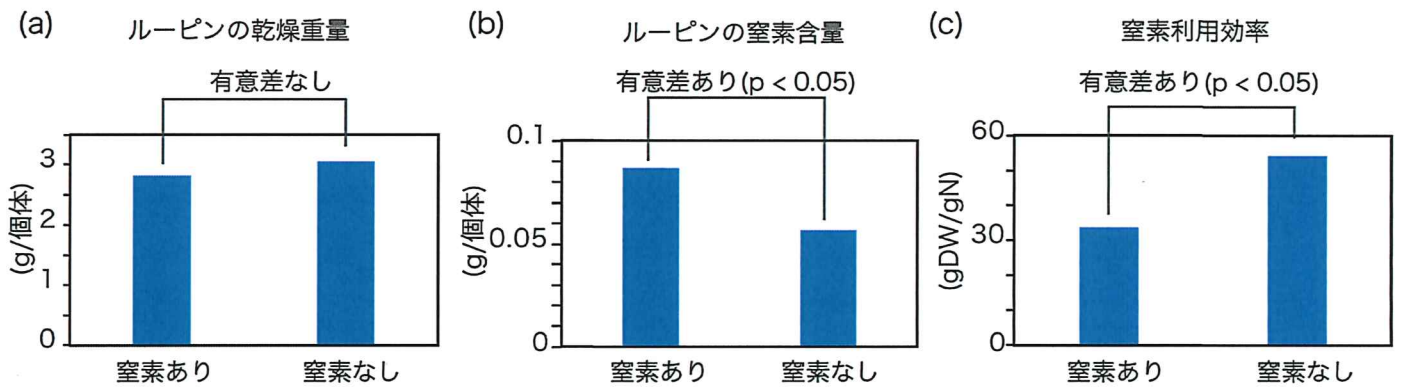


Figure 1 水耕栽培によって低窒素処理したルーピンのバイオマス
 水耕栽培によって低窒素処理したルーピンと標準窒素処理したルーピンの乾燥重量 (a)、窒素含量 (b)、窒素利用効率 (c)。

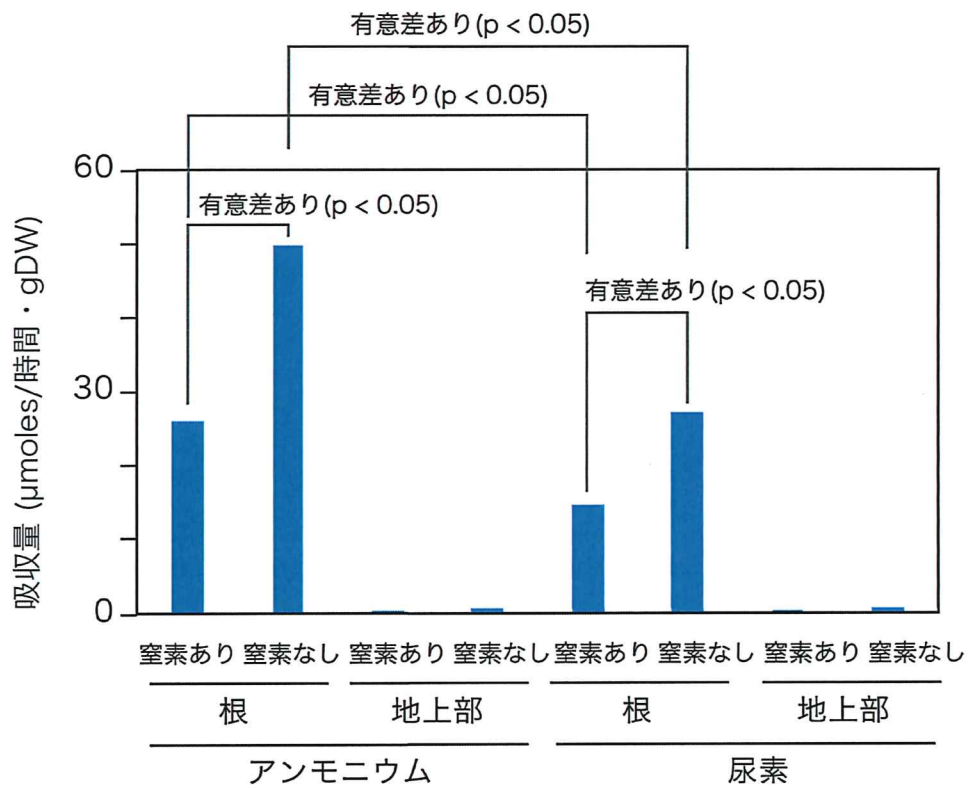


Figure 2 水耕栽培によって低窒素処理したルーピンの根におけるアンモニウムと尿素の輸送
 水耕栽培で生育させたルーピンの根に安定同位体で標識したアンモニウムまたは尿素を与え、単位時間と単位重量あたりに器官が輸送した窒素を定量した

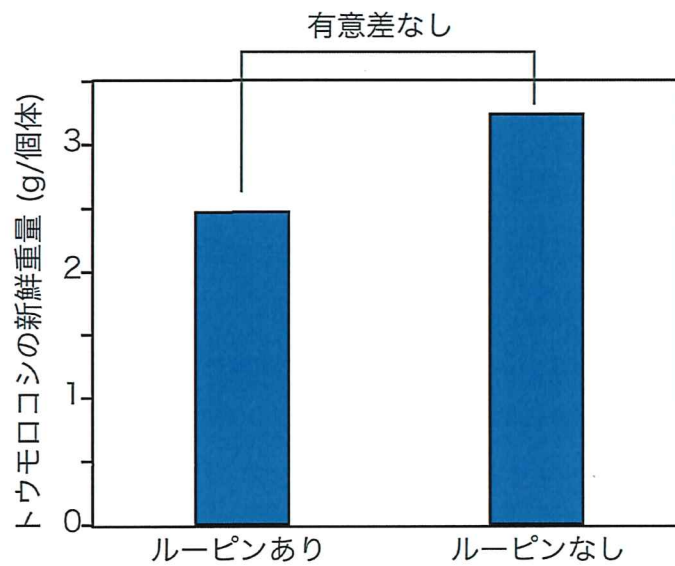


Figure 3 ループンと混作したトウモロコシのバイオマス
菜種油粕を窒素肥料として施肥した赤玉土にループンとトウモロコシを植えて二ヶ月間生育させた。トウモロコシのバイオマスを測定して、ループンと混作した場合と混作しなかった条件の比較を行った。