

## Functional Analysis of Ammonium Transporter in Rice

(イネにおけるアンモニウムトランスポーターの機能解析)

## 学位論文内容の要旨

窒素はアミノ酸生成上の必須元素であることから、生物にとって必要不可欠な栄養素である。植物は窒素源を無機イオンの状態から摂取・代謝が可能であり、その主な形態には硝酸態イオンとアンモニウム態イオンが挙げられる。一般に植物は、硝酸イオンを主たる無機窒素源として利用する。しかしながら、硝酸イオンの代謝には光合成で獲得したエネルギーの消費を伴う還元反応を必要とするが、アンモニウムイオンは直接利用可能である。一方、アンモニウムイオンは毒性を示すことから植物体内に多量に蓄積することが出来ず、植物にとってアンモニウムイオンの存在は生命維持上、“諸刃の剣”とも言える。生体内に蓄積困難なアンモニウムイオンの制御には、細胞内への取り込み機構が唯一無二の手段である。アンモニウムイオンの取り込みには、それを基質として特異的に能動的な輸送を行う輸送担体(トランスポーター)が担い、それらはアンモニウムトランスポーター (ammonium transporter: AMT) と呼ばれている。本研究では、生育環境からアンモニウムイオンを優先的に利用しているとされるイネを材料とし、AMT 遺伝子族の作用・機能の解明を目的として以下の解析を行った。

1. *OsAMT1* 遺伝子群の単離

イネ (*Oryza sativa* L.) の *AMT1* 遺伝子 (*OsAMT1*) に着目し単離を試みた。イネゲノム中から、*AMT1* 遺伝子族に属するすべての遺伝子群、*OsAMT1;1*、*OsAMT1;2* および *OsAMT1;3* らの3つの遺伝子を単離した。これら *AMT1* 遺伝子群をそれぞれ酵母の AMT 欠損変異株に導入した相補性実験から、実際に *OsAMT1;1*、*OsAMT1;2* および *OsAMT1;3* らはすべて、アンモニウムイオンの細胞内輸送活性を有していることを明らかとした。

2. *OsAMT1* 遺伝子群の発現様式の解析

*OsAMT1* 遺伝子群の器官別発現性および窒素栄養依存的発現性について検討した。*OsAMT1;1* は茎葉部および根のいずれでも発現し、添加する無機窒素源の種類による顕著な発現量の変動は認められない構成的な発現様式を示した。また、*OsAMT1;2* は茎葉部では一切発現は認められず根で特異的に発現し、その発現はアンモニウムイオンの添加により誘導された。タイムコース実験からこの誘導はアンモニウムイオン処理後 30 分からの顕著な発現が認められた。またアンモニウムイオンの濃度応答性を検討した実験結果から、 $3\mu\text{M}$  から応答を示すことが明らかとなった。さらに、*OsAMT1;3* は根で特異的に発現し、窒素無添加で最も強い発現を示し、アンモニウムイオンの添加によって発現が抑制されることが明らかとなった。この発現特性は、硝酸イオンの添加においても同様の現象が見られた。

### 3. *OsAMT1* 遺伝子群の発現制御機構の解析

*OsAMT1* 遺伝子群のアンモニウムイオンに対する発現応答は、処理後2時間でピークに達し、それ以降は応答が減少し処理後8時間ではほぼ完全に発現応答が喪失していた。一方、根内の窒素源の蓄積を検討した結果、処理後2時間から8時間後まではアンモニア含量は変動せず一定量で存在していたが、グルタミン含量の変動は *OsAMT1* 遺伝子群のアンモニウムイオンに対する発現応答と連動している傾向を見出した。このことから、*OsAMT1* 遺伝子群の発現制御は、基質であるアンモニウムイオンではなく、むしろその代謝産物であるグルタミンが重要であることを推測した。これを証明するため、グルタミン合成酵素の阻害剤 (methionine sulfoximine: MSX) を用いた検討を行った。その結果、*OsAMT1* 遺伝子群の発現は、1) アンモニウムイオンと MSX の同時添加では応答を示さなかったこと、2) グルタミンの添加がアンモニウムイオンの添加と同様な応答を示したこと、3) 前述の条件下での根内のグルタミン含量が発現応答と完全に一致したこと、などから *OsAMT1* 遺伝子群の発現制御は根内のグルタミン含量によって制御を受けることが明らかとなった。

一般に植物の窒素吸収機構は、内生グルタミンによって負に制御されることが知られているが、イネでは *OsAMT1;2* の様に正に制御されるといった新規な窒素吸収機構を備えていることを見出した。イネは主要な窒素源として有害なアンモニウムイオンを主に取り込むため、すみやかにグルタミンに代謝する必要がある。すなわちイネでは細胞内に蓄積できないアンモニウムイオンではなく、無害なグルタミンを指標とした N ステータス認識機構が存在しているものと考えられた。また、*OsAMT1;1*、*OsAMT1;2* および *OsAMT1;3* らは、アミノ酸配列が高い相同性を示すにも関わらず、それぞれ互いに異なる発現様式を示していた。植物は生命活動を行う上でこれらの *AMT1* を使い分ける必要があるものと推測した。これは外的な窒素栄養環境の変動と内的窒素栄養状態が密接に関連し、その仲介を成す *OsAMT1* の生理的意義に基づくものと考えられる。土壤環境中にアンモニウムイオンが豊富に存在している状態では、構成的に発現する *OsAMT1;1* が土壤中のアンモニウムイオンを根内に取り込み、窒素同化経路によりグルタミンに代謝される。合成されたグルタミンにより、新たに *OsAMT1;2* の発現が誘導され、これによって“加速的に”アンモニウムイオンを取り込んでいるものと推測される。このことから、*OsAMT1;2* は高濃度のアンモニウムイオンを輸送する“低親和性のトランスポーター”であることが考えられた。また土壤環境中にアンモニウムイオンが少ない状態では、植物体内のグルタミン量も欠乏する。このような条件下では *OsAMT1;3* の発現が最大となることから、*OsAMT1;3* は低濃度のアンモニウムイオンを輸送する“高親和性のトランスポーター”であることが考えられた。

### 4. *OsAMT1* 遺伝子の過剰発現体の解析

*OsAMT1* 遺伝子が過剰に発現した形質転換イネを作成し、その検討を行った。*OsAMT1;2* 過剰発現型形質転換イネでは、アンモニウムイオンの取り込み量が顕著に増大していた。しかしながら、*OsAMT1;2* 過剰発現型形質転換イネは、植物体内へのアンモニウムイオンの過剰な蓄積による根および茎葉部の生長阻害効果が認められた。この結果は、*OsAMT1* 遺伝子群の発現制御が外的および内的窒素栄養環境の変動とその適応に密接な関連があり、厳密な制御機構の必要性を強く支持したものであった。一方、適度な発現増大を示す形質転換イネを選抜することにより、アンモニウムイオンを効率的に取り込めるイネが作出できる。このことから肥料の投与を減らした、すなわち低窒素処理条件下においても高い生産効率を維持できるイネの作出といった応用も可能であることを示唆した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 口 淳 二  
副 査 教 授 加 藤 敦 之  
副 査 助 教 授 池 田 亮  
副 査 教 授 大 崎 満 (大学院農学研究科)

学 位 論 文 題 名

## Functional Analysis of Ammonium Transporter in Rice

(イネにおけるアンモニウムトランスポーターの機能解析)

窒素はアミノ酸生成上の必須元素であることから、生物にとって必要不可欠な栄養素である。植物は窒素源を無機イオンの状態から摂取・代謝が可能であり、その主な形態には硝酸態イオンとアンモニウム態イオンが挙げられる。一般に植物は、硝酸イオンを主たる無機窒素源として利用する。しかしながら、硝酸イオンの代謝には光合成で獲得したエネルギーの消費を伴う還元反応を必要とするが、アンモニウムイオンは直接利用可能である。一方、アンモニウムイオンは毒性を示すことから植物体内に多量に蓄積することが出来ず、植物にとってアンモニウムイオンの存在は生命維持上、“諸刃の剣”とも言える。生体内に蓄積困難なアンモニウムイオンの制御には、細胞内への取り込み機構が唯一無二の手段である。アンモニウムイオンの取り込みには、それを基質として特異的に能動的な輸送を行う輸送担体(トランスポーター)が担い、それらはアンモニウムトランスポーター(ammonium transporter: AMT)と呼ばれている。そこで、AMT 遺伝子族の作用・機能の解明を目的として、生育環境からアンモニウムイオンを優先的に利用しているとされるイネを材料とし、本研究を遂行した。

イネ(*Oryza sativa* L.)のゲノム中から、AMT1 遺伝子族に属するすべての遺伝子群、OsAMT1;1, OsAMT1;2 および OsAMT1;3 らの3つの遺伝子を単離した。酵母の AMT 欠損変異株を用いた相補性実験から、実際に OsAMT1;1, OsAMT1;2 および OsAMT1;3 らはすべて、アンモニウムイオンの細胞内輸送活性を有していることを明らかとした。

OsAMT1 遺伝子群の器官別発現性および窒素栄養依存的発現性について解析した。その結果、OsAMT1;1 は茎葉部および根のいずれでも発現し、添加する無機窒素源の種類による顕著な発現量の変動は認められない構成的な発現様式を示した。OsAMT1;2 は茎葉部では一切発現は認められず根で特異的に発現し、その発現はアンモニウムイオンの添加により誘導された。OsAMT1;3 は根で特異的に発現し、窒素無添加で最も強い発現を示し、アンモニウムイオンの添加によって発現が抑制された。またこの発現特性は、硝酸イオンの添加においても同様の現象が認められた。

OsAMT1 遺伝子群の発現応答と実際のアンモニウムイオン取り込みとの関連について解析を進めた結果、OsAMT1 遺伝子群の発現応答は、内生グルタミン含量の変動と連動している傾向を見出した。このことから、OsAMT1 遺伝子群の発現制御は、基質であるアンモニウムイ

オンではなく、むしろその代謝産物であるグルタミンが重要であると推測した。これを証明するため、グルタミン合成酵素の阻害剤 (methionine sulfoximine: MSX) を用いた検討を行った。その結果、1) *OsAMT1* 遺伝子群の発現は、アンモニウムイオンと MSX の同時添加では応答を示さなかったこと、2) またその発現はグルタミンの添加がアンモニウムイオンの添加と同様な応答を示したこと、3) 前述の条件下での根内のグルタミン含量が発現応答と完全に一致したこと、などが明らかとなった。これらの結果から、*OsAMT1* 遺伝子群の発現制御は、内生のグルタミン含量によって制御を受けていることを明らかとした。

一般に植物の窒素吸収機構は、内生グルタミンによって負に制御されることが知られているが、イネでは正に制御されるといった新規な窒素吸収機構を備えていることを見出した。イネは主要な窒素源として有害なアンモニウムイオンを主に取り込むため、速やかにグルタミンに代謝する必要があり、その結果、無害な内生グルタミンを指標とした N ステータス認識機構が存在しているものと考えられた。また、*OsAMT1* 遺伝子群は、それぞれ互いに異なる発現様式を示していた。これは外的な窒素栄養環境の変動と内的窒素栄養状態が密接に関連し、その仲介を成す *OsAMT1* の生理的意義に基づくものと考えられる。土壤環境中にアンモニウムイオンが豊富に存在している状態では、構成的に発現する *OsAMT1;1* が土壤中のアンモニウムイオンを根内に取り込み、取り込まれたアンモニウムイオンは窒素同化経路によりグルタミンに代謝される。さらに合成されたグルタミンにより、新たに *OsAMT1;2* の発現が誘導される。このことから、*OsAMT1;2* は高濃度のアンモニウムイオンを輸送する“低親和性のトランスポーター”であることが考えられた。また土壤環境中にアンモニウムイオンが少ない状態では、植物体内のグルタミン量も欠乏する。この様な条件下では *OsAMT1;3* の発現が最大となることから、*OsAMT1;3* は低濃度のアンモニウムイオンを輸送する“高親和性のトランスポーター”であることが考えられた。

これを要するに、著者は *OsAMT1* 遺伝子族の単離とその機能および制御機構の解明に成功した。これは、植物科学の基礎研究として多大な貢献をただけではなく、応用研究としても発展する可能性も秘めている。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認める。