

2010 年札幌大会
シンポジウムの概要

植物の必須元素の栄養生理*

牧野 周¹・末吉 邦²・鈴木雄二¹・河地有木³・俵谷圭太郎⁴・大津直子⁵・中西啓仁⁶・藤原 徹⁶

キーワード 窒素, リン酸, 硫黄, 鉄, ホウ素, 輸送, 栄養生理

はじめに

第4部門では、シンポジウムの企画で植物栄養学研究の成果や進展議論をはかることを目的に、主要必須元素研究の現在、過去、未来について、テーマに即した話題提供者7名を選出し、議論した。ここに話題提供者の発表内容要旨についてまとめる。次回のつくば大会では、「植物栄養学と作物の生産性」「肥料と植物栄養」「有機農業における作物品質」などをテーマに他部門との共催も視野に行う予定である。

1. 植物の無機窒素輸送系と硝酸還元

窒素は、植物が根から吸収する必須元素の中で最も多量に必要とされ、その供給量は作物の収量や質に大きく影響する。多くの植物は、硝酸イオンとアンモニウムイオンの両方を窒素源として利用できる。通気された土壌においては、アンモニウムイオンは土壌微生物の作用により速やかに硝酸イオンへと酸化される。従って、植物が利用する窒素は、畑土壌では主に硝酸イオンであり、水田土壌など還元的环境ではアンモニウムイオンである。

硝酸イオンは、硝酸イオントランスポーター (NRT) により能動的に根の細胞内に取り込まれ、細胞質の硝酸還元酵素 (NR) と葉緑体 (プラスチド) の亜硝酸還元酵素

(NiR) により亜硝酸イオン、アンモニウムイオンへと逐次還元される。アンモニウムイオンはグルタミン合成酵素 (GS) によってグルタミンのアミド基に取り込まれる。

硝酸イオンの吸収と還元系に関しては、筆者がこの分野に足を踏み入れた1980年代の半ばは硝酸イオンの吸収生理とNRの生化学的研究が活発に展開されていた。ちょうど、国内外において、ホウレンソウ、タバコ、オオムギ、トウモロコシ、カボチャからのNRの高度精製法が次々と確立された頃でもあった。NRは、極めて不安定で、プロテアーゼによる分解も受けやすいこともあり、精製法の確立には何年も費やされたという。NRが高度に精製されたことでNRの特異抗体が作成され、これがcDNAライブラリーからのNRcDNAの単離に役に立った。NRcDNAは、1986年にオオムギとカボチャで部分断片が単離され、その直後にシロイヌナズナで全長が単離された。それ以降、様々な植物種においてNR遺伝子が単離され、90年代にはNR遺伝子の発現制御機構の研究が一気に加速した。一方、NRの活性制御に関しては、後述するように全く新しい翻訳後制御モデルが提案された。

80年代までになされた膨大な生理的研究により、硝酸イオンの吸収機構は詳しく分かっていった。すなわち、硝酸イオンは、基質親和性の異なる2つの膜輸送系によってプロトンとの共輸送で細胞内に取り込まれる。低親和性輸送系 (LATS) は、高濃度域 (>0.5 mM) の硝酸イオン輸送に役割をもち、一方、高親和性輸送系 (HATS) は、低濃度領域での硝酸イオン輸送に重要である。これら機能的に定義されたLATSおよびHATSを担う分子は、現在ではそれぞれNRT1とNRT2と呼ばれるタンパク質であることが分かっている。1993年、まずNRT1をコードする遺伝子が、塩素酸イオン (ClO_3^-) 耐性のシロイヌナズナ変異株において同定され、やや遅れてオオムギからNRT2をコードする遺伝子が同定された。NRT1およびNRT2は、それぞれファミリーを形成しており、シロイヌナズナには候補も含め53のNRT1メンバーが存在する。シロイヌナズナのNRT1のうち、AtNRT1.1からAtNRT1.8までは解析が進められ、硝酸イオンの根での吸収 (AtNRT1.1, AtNRT1.2)、導管への積み込み (AtNRT1.5)、導管からの積みおろし (AtNRT1.8)、シンク葉から篩管への積み込み (AtNRT1.7)、など多様な機能が推定されている。

Amane MAKINO, Kuni SUEYOSHI, Naoki KAWACHI, Keitarou TAWARAYA, Naoko OHKAMA-OHTSU, Hiromi NAKANISHI and Toru FUJIWARA: Nutritional physiology of essential elements in higher plants

* 本資料は2010年9月に開催された日本土壌肥科学会札幌大会における植物栄養部門 (第4部門) 主催シンポジウムの趣旨および講演内容を要約した。

¹ 東北大学大学院農学研究科 (981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1)

² 新潟大学農学部 (950-2181 新潟市西区五十嵐2-8050)

³ 日本原子力研究開発機構 (370-1291 高崎市綿貫町1233)

⁴ 山形大学農学部 (997-8555 鶴岡市若菜町1-23)

⁵ 東京農工大学農学部 (183-0054 府中市幸町3-5-8)

⁶ 東京大学大学院農学生命科学研究科 (113-8657 文京区弥生1-1-1)

2010年12月7日受付・2010年12月20日受理

日本土壌肥科学雑誌 第82巻 第2号 p.152~159 (2011)

作物でも NRT1 の解析がある程度なされており、例えばオオムギでは、硝酸イオン輸送活性をもつ HvNRT1 が同定され、根と葉で構成的に発現していることが明らかとなった。

NRT2 はシロイヌナズナで 7 つのメンバーが同定され、そのうち AtNRT2.1 と AtNRT2.1 が根における硝酸イオンの吸収に関わる。最近、HATS は、NRT2 と新規タンパク質の NAR2 で構成される 2 成分輸送系であることが分かったが、NAR2 の役割はまだ解明されていない。オオムギの HvNRT2 と HvNAR2 は、*in vitro* で結合することが確かめられ、根の同じ細胞群の細胞膜上に存在していることが分かった。

シロイヌナズナにおけるその他の硝酸イオン輸送系に関しては、液胞への蓄積にはアニオンチャネル (AtCLCa) が、根圏への排出には NAX1 がそれぞれ関与するという報告がある。しかし、植物個体全体を見ると、硝酸イオン輸送に関わる分子はその他にも多数存在が予測される。それらの実体解明へ向けた努力が今後必要である。特に、農業上重要な作物における研究が重要である。

NR は、硝酸同化系の律速酵素と考えられてきたため、この酵素の制御機構については膨大な研究がある。実際、NR の mRNA 蓄積量や活性は内的・外的な要因で大きく変動する。特に顕著に影響する因子は硝酸イオンと光である。

硝酸イオンは、NR 遺伝子の転写を活性化し、結果として NR 活性を誘導する。硝酸イオンは、他にも NRT, NiR, GS, 炭素同化系酵素など多くの酵素の誘導因子でもある。硝酸イオンのシグナリング機構については、NRT1.1 のセンサーとしての役割、転写因子 NLP7 やリン酸化酵素 CIPK のシグナル伝達への関与、NiR 遺伝子プロモータ領域の硝酸イオン応答性シスエレメントの同定など、いくつか重要な報告がなされている。

NR 活性の制御機構に関しては 90 年代にインパクトあるモデルが出された。すなわち、植物が暗所におかれると NR は直ちにリン酸化され、続いて 14-3-3 タンパク質がリン酸化 NR に結合して、NR は低活性の状態になるというものである。植物を明所に戻すと、NR は脱リン酸化され、同時に 14-3-3 がはずれ再活性化される。この制御モデルの生理的意義は、NiR へ電子を渡す還元型フェレドキシンが暗所で減少したときに、毒性の強い亜硝酸イオンの蓄積を回避することにあると考えられている。このモデルは様々な植物の NR に当てはまるようだが、*in vivo* で NR の制御にどの程度寄与しているのかという点ではさらに研究が必要である。しかし、残念なことに NR タンパク質を直接対象にしたこのような研究は現在ほとんど行われていない。

2010 年 7 月には、犬山市で第 1 回国際植物窒素栄養シンポジウムが開催され活発に議論が交わされ、時期を同じくして、主に国内で行われた植物の窒素栄養研究をまとめた書籍 (Nitrogen Assimilation in Plants) も出版された。

いずれにも、多くの日本土壌肥料学会の会員が関わった。

(末吉 邦)

2. Rubisco のターンオーバーと窒素栄養

1) はじめに

Rubisco は C3 植物の葉において最大の窒素の投資先であるとともに、強光および現在の大気 CO₂ 分圧下の光合成速度を律速する因子である (Makino *et al.*, 1988)。このため、葉の一生を通じた Rubisco 量の変動は、植物にとって窒素経済および炭素経済の両面から重要な意味を持つ。Rubisco 量は葉の展開にともない増加し、完全展開時にほぼ最大となり、以降の老化過程において徐々に減少するが、このような Rubisco 量の変動は、そのタンパク質ターンオーバーの大きなバランス変化から説明される。例えば、これまでにイネにおいて、Rubisco の生合成は葉の展開の過程において活発であるが完全展開後には多くはなされないこと、また、Rubisco の分解は完全展開前から開始され老化過程において生合成を上回るようになることが明らかにされている。さらに、Rubisco の生合成量の変動は主に Rubisco 遺伝子の mRNA 量の変動に起因している (Suzuki *et al.*, 2001)。そこで、イネ葉における Rubisco のターンオーバーに窒素栄養供給量が及ぼす影響、および、遺伝子組換えによる Rubisco 量の特異的増加が葉内窒素分配および Rubisco ターンオーバーに及ぼす影響について報告する。

2) 窒素栄養の量がイネ葉における Rubisco ターンオーバーに及ぼす影響

Rubisco 小サブユニット遺伝子 *RBCS* はイネにおいて 5 分子種からなる multigene family を形成し、そのうち 4 分子種が葉身において主に発現している (Suzuki *et al.*, 2009b)。窒素栄養供給量の増加により完全展開葉身の Rubisco 量が増加することが知られているが、同時に展開中の葉身における *RBCS* や Rubisco 大サブユニット遺伝子 *RBCL* の mRNA 量にも増加が認められた (Suzuki *et al.*, 2007)。さらに、Rubisco のタンパク質の量と mRNA 量との間には高い正の相関関係が認められた。これらのことは、窒素栄養の供給量の増加により、Rubisco 遺伝子の mRNA が増加することが、Rubisco タンパク質の量的増加の主要因であることを示唆している。しかし、Rubisco の mRNA 量とタンパク質生合成量の変動は常に一致しているとは限らない。例えば、葉の展開中にイネ個体への窒素栄養供給量を増加させたところ、Rubisco の生合成量と mRNA 量がともに増加したものの、その後の減少は Rubisco の生合成量の方がすみやかであった (Imai *et al.*, 2005)。また、Rubisco 生合成量の変動はむしろ葉への窒素流入量とよく一致していた。さらに、同様の結果が老化葉身においても認められた (Imai *et al.*, 2008)。これらのことは、イネ葉の一生を通じて、Rubisco の遺伝子発現の過程において窒素流入量に応じた転写後の調節がなされていることを示唆している。

3) 遺伝子組換えによる Rubisco 量の特異的増加がイネの葉内窒素分配および Rubisco ターンオーバーに及ぼす影響

イネにおいて *RBCS* 遺伝子を過剰発現したところ、展開中の葉における Rubisco の生合成量が野生型と比べ増加し、最上位完全展開葉の Rubisco の量および窒素分配が増加した (Suzuki *et al.*, 2007). しかし、Rubisco 量は葉の完全展開直後の老化初期には野生型と同じレベルにまで減少し、葉内窒素分配も野生型と同様になった (Suzuki *et al.*, 2009a). このときの Rubisco 生合成量に形質転換体と野生型との間で大きな差はなかったため、Rubisco タンパク質の分解レベルでの量的調節がなされたと考えられた。形質転換体の最上位完全展開葉では、葉内窒素分配の変化により光合成の反応間でのアンバランスのためか、増加した分の Rubisco が活性化されていなかったが、この余剰分の Rubisco が分解されたと思われる。Rubisco 量を遺伝子組換えにより特異的に減少させた *RBCS* アンチセンスイネでは、葉の老化に伴う Rubisco 量の減少が Rubisco タンパク質の分解抑制のために遅くなることが示唆されている。Rubisco 量を特異的に増加させたイネでみられた現象は、これとはちょうど逆のものである。これらのことは、Rubisco タンパク質の量は、光合成における窒素利用の状況に応じ、分解レベルでの量的調節を受けることを強く示唆するものである。

4) おわりに

以上、イネにおいて、個体への窒素栄養供給量や、遺伝子組換えによる Rubisco 量の特異的増加による葉内窒素分配の変化が Rubisco ターンオーバーに及ぼす影響についてみてきた。今後は、これらにおいて Rubisco の遺伝子発現のどの段階がキーとなっているのかを、タンパク質分解のレベルも含め、その詳細を明らかにする必要があると考えている。(鈴木雄二)

3. 植物の元素動態イメージング解析で見えてくる栄養生理

近年の放射線計測技術を基盤としたイメージング手法は、農学、工学、医学、生物学などの研究分野において大きな発展をもたらしてきた。特に、生体内元素の動態を放射性トレーサで可視化する、いわゆる“RI イメージング”は現在最もホットな研究テーマの一つだと言える。この RI イメージング技術は、とりわけ植物栄養学においても大きなアドバンテージをもたらすと考える。本稿では、主に我々が開発してきた RI イメージング技術と最近の研究内容を紹介するとともに、元素動態イメージングで見えてくる植物の栄養生理解析研究のあるべき姿を考察する。

1) ポジトロンイメージング技術による栄養動態の可視化

ポジトロンイメージング技術 (Positron-emitting Tracer Imaging System; PETIS) とは、植物が生きたままの状態 で体内物質の元素動態をイメージングし、栄養や

環境汚染物質の輸送機構を解明することなどを目的として開発されてきた研究手法なのである。元素ごとの代表的なイメージング研究例を以下にまとめた。

葉に ^{14}C で標識した二酸化炭素を吸入させることで、 ^{14}C が葉に固定される様子に引き続き、 ^{14}C で標識された光合成産物が篩管を通して根や成長点に到達する炭素動態を PETIS は撮像できる。本手法の長所は炭素の固定のみならず転流における動態も同時画像として捉えられる点にある。これまでに、数多くの植物種を用いて、非侵襲的かつ定量的なシンク・ソース間の炭素栄養動態のイメージングが実施されている。こうした動画データから得られた固定や移行の速度などの定量値は、作物の生産性や品質に直結した栽培条件の評価を可能となっている (Suwa *et al.*, 2008; Kikuchi *et al.*, 2008). さらに、トマト果実など立体的な構造を持つシンク器官への炭素栄養の蓄積を 3 次元撮像するため、新たなイメージング手法の適用を試みている。

^{13}N 標識窒素ガスを用いたダイズ根粒の窒素固定のイメージングや、 ^{13}N 標識硝酸または ^{13}N 標識アンモニアを経根吸収させた窒素輸送のイメージングが PETIS を用いて行われてきた。 ^{13}N トレーサの短い半減期を活用した、同一植物個体への連続 RI 投与イメージング実験技術を開発し、アカクロパーの根に寄生したオロバンキが窒素栄養を収奪する割合の定量にも成功している (Kawachi *et al.*, 2008; 総説: Fujimaki *et al.*, 2010).

植物における重金属の輸送の特長や相違点は、各元素動態を PETIS と RI (^{62}Zn または ^{65}Zn , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{107}Cd) を用いてイメージングすることで明らかになる。近年研究を行ったイネにおけるカドミウムの元素動態データから、節での強い集積と導管から篩管への乗り換え、地上部での導管流に比べ遅い上方への移行速度、各器官への到達時間等が明らかになった (Tsukamoto *et al.*, 2009; Fujimaki *et al.*, 2010).

2) 定量性～数理モデルを用いた栄養生理の定量解析
トレーサの動画から植物の栄養生理の状態やメカニズムを推定するには、数理的栄養動態モデルを用いた定量解析が必須となる。実際にイメージングから得られる動画のみを用いた生理の推定は、様々な誤差要因に起因したミスリーディングを誘発する可能性が高い。放射線計測技術を基盤としたイメージング手法の長所は高い感度と定量性にあり、考慮すべき誤差要因が少ないため数理モデル解析による栄養生理の定量に適している。例えば我々のグループでは、コンパートメントモデルを用いた葉における光合成の炭素動態解析法を開発し、炭素固定に加えて炭素栄養の送り出し率の定量を可能にした (Kawachi *et al.*, 2006). このようなモデル解析というステップを経ることで、はじめて本稿のタイトルにある「植物の元素動態イメージング解析で栄養生理が見えてくる」と言える。

3) 次世代の RI イメージング技術開発

これまで述べてきた PETIS 等のイメージング装置では、

一回のイメージングにつき計測対象元素は一種類に限られるため、例えば複数の元素が同一環境下・同一個体内において相互作用する動態を同時にイメージングすることは困難ある。そこで我々は、最先端の半導体放射線検出器を導入し、複数の RI 核種が放出するガンマ線エネルギーを区別しつつ、同時に画像化するコンプトンカメラの開発を行っている (Takeda *et al.*, 2009)。これによって、いわば「複数元素同時イメージング」が実現する。組織から個体レベル、秒から日レベルでの多元素の分布状態の経時変化を、一個体から非侵襲的に画像として得る、という究極的な研究手法の構築を目指している。

4) 植物研究におけるイメージング技術とは

生きた植物体内における元素の動画像というものは、言葉以上の説得力を持つことが少なくない。植物 RI イメージング研究の粋は、多様な生育条件や遺伝的条件に対する元素動態の応答を可視化することにより、輸送メカニズムの解明や最適栽培条件の探求をおこなうことにある。よって、医療分野などでのイメージング技術と、植物研究でのイメージング技術との大きな違いは、非接触性と厳密な撮像環境の構築となる。接触による植物個体へのストレスは元素動態に大きな変化をもたらす。同様に、温度・湿度・光量等も実験対象の元素動態を大きく左右する。これらの環境条件を完全に制御した上で、研究目的の条件のみを変化させることができるイメージング実験環境の構築こそが、植物の栄養生理を解明するための必須項目であると考えられる。(河地有木)

4. リン酸欠乏の根の浸出物

1) はじめに

植物は地上部で固定した炭素および根から吸収した養分をもとに様々な化合物を合成している。代謝産物の一部は根に転流し、さらにその一部は浸出物として根圏に放出されている。根の浸出物は不可給態養分の獲得や根圏微生物との相互作用において重要な働きをしている。

マメ科およびアブラナ科の一部の植物はリン酸欠乏下で根から有機酸を放出し、難溶性無機リン酸化合物からリン酸を溶出させる。また、草本植物と木本植物の一部はリン酸欠乏下で根から酸性ホスファターゼを放出し、有機態リン酸化合物を加水分解する。しかし、これ以外の根の浸出物についてはほとんど明らかにされていない。

ここでは、(1) メタボローム解析のための根の浸出物の調整方法、(2) リン酸欠乏下のイネの根の浸出物の代謝産物プロファイリング、(3) リン酸欠乏下のダイズの根の浸出物の代謝産物プロファイリングに関して我々が行っている研究を紹介する。

2) 根の浸出物のメタボローム解析

これまで、根の浸出物に含まれる特定の代謝産物を液体クロマトグラフィー (LC) やガスクロマトグラフィー (GC) により測定 (ターゲット分析) してきた。このため、代謝系全体における個々の代謝産物の変化や代謝経路間の

統合的な解析が困難であった。さらに多くの代謝産物を測定するためには多大な時間と労力を必要としていた。近年、メタボローム (代謝物総体) 解析により植物の代謝産物を網羅的に測定 (ノンターゲット分析) することが可能になった。

イネ (*Oryza sativa*) またはダイズ (*Glycine max*) を $0\sim 8\text{ mg P L}^{-1}$ の濃度の水耕培養液で人工気象器またはガラス室で $1\sim 15$ 日間育成させた。根の浸出物は、根を脱塩水及び 5 mM 塩化カルシウム溶液中に暗所及び明所で 12 時間浸漬し凍結乾燥することによって得た。一方地上部及び根の抽出物は、凍結した植物体をメタノールで抽出することによって得た。それぞれに含まれる代謝産物をキャピラリー電気泳動/飛行時間型質量分析装置 (CE-TOF MS) で測定した。また、地上部リン含有率と地上部乾物重を測定した。12 時間中に脱塩水及び 5 mM 塩化カルシウム溶液中に検出された代謝産物数に差はなかった。また暗所及び明所で脱塩水中に検出された代謝産物数に差がなかった。一方 5 mM 塩化カルシウム溶液を用いた場合、CE-TOF MS の前に高濃度のカルシウムを除去する必要があった。従って CE-TOF MS による測定には暗所で脱塩水を用いて根の浸出物を回収することとした。

3) リン酸欠乏のイネの根の浸出物

低リン濃度の培養液で育成したイネの地上部リン濃度および地上部乾物重は、高リン濃度の培養液で育成したものより低かった。また、代謝産物プロファイリングの結果、根の抽出物および根の浸出物から 82 および 49 種の化合物が同定された。この内、低リン濃度の培養液で育成したイネの根の浸出物から検出された 80 % 以上の代謝産物が、高リン濃度の培養液で育成したイネより高い濃度を示すことが明らかになった。一方、根の抽出物においては、検出された代謝産物のおよそ 20 % が低リン濃度の培養液で育成したイネで高リン濃度の培養液で育成したイネより高濃度に蓄積していた。

4) リン酸欠乏のダイズの根の浸出物

低リン濃度の培養液で育成したダイズの地上部リン含有率は、移植後 5 日目以降で高リン濃度のものより低かった。ダイズの地上部で 123 種、根部で 146 種、根の浸出物で 111 種の代謝産物が検出された。これらは有機酸、アミノ酸、リン含有化合物に分けられ、低リン濃度の培養液で濃度が変化した。根の浸出物では低リン濃度の培養液で移植後 1 日目からリン含有化合物の濃度の低下が見られた。移植後 5 日目では 2 種のアミノ酸と 4 種の有機酸を含む 8 種が上昇し、8 種のリン含有化合物が低下した。移植後 10 日目では 1 種の有機酸が上昇し、3 種の有機酸と 6 種類のリン含有化合物を含む 10 種が低下した。移植後 15 日目では 94 種の既知代謝産物が検出され、4 種のアミノ酸と 2 種の有機酸を含む 14 種が低下し、5 種のアミノ酸と 2 種の有機酸を含む 10 種が上昇した。

これらの結果はイネ及びダイズはリン酸欠乏に応答して多くの代謝産物を根から根圏に浸出させていることを示唆し

ている。

なお、本研究の成果は理化学研究所植物科学研究センターの齊藤和季博士と及川彰博士ならびに北海道農業研究センターの信濃卓郎博士との共同研究によって得られたものである。(俵谷圭太郎)

5. 硫黄代謝制御機構と硫黄化合物の生理作用

高等植物において硫黄は主に根から硫酸として吸収され、還元されてシステインに取り込まれてから、様々な有機化合物に代謝される。その一つがグルタチオンである。グルタチオンは γ -Glu-Cys-Gly からなるトリペプチドであり、マメ科植物では Gly が β -Ala に置換されたホモグルタチオンが同様の機能を持つ。グルタチオンは有機態硫黄の貯蔵形態であり、硫黄代謝の調節物質でもあるため植物栄養学上重要であるが、その他にも細胞の酸化還元調節、重金属や除草剤の解毒など様々な機能を持つ。本シンポジウムでは、硫黄化合物グルタチオンに焦点をあて、その代謝と生理作用について最近の知見を中心に報告した。

グルタチオンの合成を阻害すると一日で80%以上濃度が減少することから、グルタチオンの代謝回転は速いことが分かっている。グルタチオンの代謝分解経路は近年まで分かっていなかったが、 γ -Glutamyl Cyclotransferase と Oxoprolinase による一連の反応により分解されることが最近示唆された。この代謝分解はシステインの供給源となっているだけでなく、Glu も供給しているようである (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2008)。

グルタチオンは細胞の酸化還元状態を調節するが、タンパク質の中には酸化還元変化に伴いシステイン残基における S-S 結合が変化したり、グルタチオン化されたりして活性が変化するものがある。動物においては細胞周期を調節する転写因子の DNA 結合活性が、酸化還元状態によって変化することが知られている。グルタチオン濃度が減少したシロイヌナズナ *rml1* 変異株の根では細胞分裂ができず、細胞周期の G1 から S 期への移行やサイクリン遺伝子の発現にグルタチオンが必要であることが示されており (Vernoux *et al.*, 2000)、植物においても動物のようなグルタチオンによる細胞周期の調節機構が存在する可能性がある。

タンパク質のグルタチオン化は、酸化型グルタチオン又は、酸化型と還元型グルタチオンの存在下で進行する。タンパク質のグルタチオン化は可逆反応であり、グルタチオン化されたシステイン残基は主にグルタレドキシンによって還元される。グルタチオン化は、酸化ストレスによる不可逆なタンパク質の不活性化を防ぐ機構と考えられるが、酵素活性を調節する役割を果たしている場合もある。グルタチオン化される植物のタンパク質としてはチオレドキシン f が知られており、グルタチオン化されるとカルビンサイクルの酵素を活性化する能力が抑制される (Michelet *et al.*, 2005)。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase や Triose-phosphate isomerase 等そのほかのカルビンサ

イクルの酵素も酸化ストレス下においてグルタチオン化されることにより不活性化される (Gao *et al.*, 2009)。カルビンサイクルは還元力を消費するので、それを抑えて還元力を酸化ストレス解毒に用いるための機構と考えられる。2009年の時点で、シロイヌナズナにおいては76個のタンパク質がグルタチオン化されることが示唆されており (Gao *et al.*, 2009)、様々な生理過程がグルタチオン化により制御されていると考えられる。

またグルタチオンはグルタレドキシンを介して[鉄-硫黄]クラスターの生成や、[鉄-硫黄]クラスターをタンパクの活性中心に運ぶ役割を果たすことも示されている (Bandyopadhyay *et al.*, 2008)。植物にの[鉄-硫黄]タンパクとしては、葉緑体のフェレドキシンや亜硝酸還元酵素、ミトコンドリアの酸化的リン酸化複合体など、代謝の中心となる酵素がある。グルタチオンは、これら[鉄-硫黄]タンパクが司る生理過程にも関与している。

このようにグルタチオンは、植物の生育、分化、ストレス応答等、様々な生理過程に関与しているため、食糧としてのよりよい植物生産を考える上で重要な要素である。

(大津直子)

6. Fe 栄養の分子生理

1) はじめに

鉄はさまざまな生体反応に必須の元素であり、植物においてはクロロフィルの合成に必須であるため、鉄欠乏は農作物の収量や品質の低下に直結する。植物における鉄のホメオスタシス制御を理解することは、穀物生産向上のためだけでなく、ヒトの栄養にとっても非常に重要である。土壌からの2つの鉄の獲得機構が明らかにされ (図1)、それらに関わるトランスポーター、そして鉄欠乏に応答する転写因子などが同定されてきた (板井・西澤, 2010; Kobayashi *et al.*, 2010)。ここでは、新たに単離した3つのトランスポーターを中心にイネの鉄吸収と体内移行、オルガネラへの鉄の移行について紹介する。

2) PEZ トランスポーター

Strategy-I 植物では、鉄欠乏時にはカフェ酸などのフェノール性酸の根からの分泌が増加する。そしてその放出さ

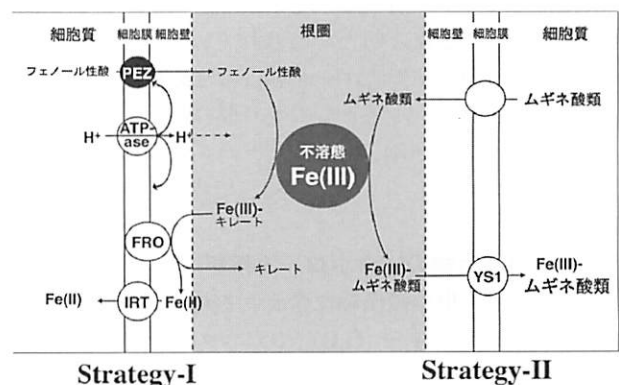


図1 物の鉄獲得機構 Strategy-I と Strategy-II

れたフェノール性酸が土壌中の三価鉄をキレート化して可溶化し、その後三価鉄還元酵素により二価鉄に還元されたのち、植物に吸収されることが明らかにされている。フェノール性酸の放出のトランスポーター遺伝子は明らかにされていない。フェノール性酸の一種であるプロトカテキ酸 (PCA) の放出に関わるイネ欠損体 *pez1* (PCA efflux zero 1) を得た。導管液と根洗液を LC/MS で解析したところ、野生型で見られる PCA のピークが *pez1* では見られなかった。PEZ1 は細胞膜に局在し、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた解析でも PCA の輸送活性を示した。PCA には三価鉄キレート能、三価鉄還元能があることが知られている。*pez1* 欠損体では鉄が根に蓄積し、導管液中の鉄濃度が減少していた。PCA の放出トランスポーターの単離は、初めての報告である。

3) OsNRAMP1 トランスポーター

イネのゲノムには7つの *NRAMP* 遺伝子が存在し、そのうち *OsNRAMP1* のみが鉄欠乏によって発現が大きく誘導される。*OsNRAMP1* は鉄だけでなくカドミウムも輸送し、細胞内へのカドミウム吸収にも関与していると考えられる。また、根での発現量がカドミウム低蓄積品種よりも高蓄積品種で多かったことから、*OsNRAMP1* の発現量の違いがイネの地上部におけるカドミウム蓄積量に影響がある可能性もある。*OsNRAMP1* 発現抑制イネは野生型イネとほぼ同様の生育特性を示したが、*OsNRAMP1* 過剰発現イネは野生型イネに比べて根、茎葉ともに伸長が抑制された。*OsNRAMP1* 過剰発現イネの根で鉄含量が野生型イネよりも高かった。また、1 μ M カドミウム1週間処理条件下で、*OsNRAMP1* 過剰発現イネでは根、葉ともに野生型イネよりもカドミウム含量が高かった。

4) MIT トランスポーター

植物細胞内への鉄の取り込みには IRT1, NRAMP1, YS1 (YSL) トランスポーターが機能しており、葉緑体、液胞への鉄の輸送にはそれぞれ PIC1, VIT1 が機能している (図2)。しかし、鉄の要求量が高いミトコンドリアへの鉄輸送トランスポーターは未同定であった。*mit-1* 変異

体イネは、地上部に鉄を高蓄積するにもかかわらず鉄欠乏症状を示す。*mit-1* 変異体は、ミトコンドリアトランスポーターをコードすると予測された遺伝子 (*MIT*) に T-DNA が挿入されており、*MIT* は酵母のミトコンドリアへの鉄の輸送能の欠損を相補した。ホモで *MIT* を欠損するイネは致死となった。*MIT* のノックダウン変異体 (*mit-2*) では、生育阻害とともに根や地上部での鉄の高蓄積が見られた。*MIT* はイネの生育に必須のミトコンドリアの鉄トランスポーターであり、初めての報告である。

(中西啓仁・石丸泰寛・Khurram Bashir・西澤直子)

7. ホウ素栄養の分子生理の温故知新

ホウ素が植物の必須元素であることが発見されたのは1923年とされている。私が学生として熊沢喜久雄先生の植物栄養学の講義を拝聴した1985年頃は、ホウ素は植物にのみ必須な元素であること、ホウ素を欠如すると根の伸びが急速に悪くなることなどを教わった。それから20年以上経過し、ホウ素についての分子レベルの理解がされてきた。細胞壁のペクチンと結合していることが、京都大学の間藤先生のグループや農林水産省の石井博士、松永博士のグループなどによって示された。ホウ素の輸送に関する輸送体については、北海道大学の内藤先生の高濃度のホウ素要求性シロイヌナズナ変異株の発見を契機に、私の研究グループで多くの学生さんや博士研究員の努力によって輸送体が複数同定され、それらがホウ素栄養に応じて巧みに制御を受けていること、細胞内で特徴的な局在をしていることなどが明らかにされた (Takano *et al.*, 2008 for review)。BOR1 は生物界で初めてのホウ素トランスポーターで、その蓄積制御、細胞内局在、発現制御は巧妙に制御されている。ホウ素吸収を担う NIP5;1 も、発現や局在が巧みに制御されている。イネやオオムギ、コムギについてもホウ素輸送体の報告がなされている。また、ホウ素輸送体を用いて、ホウ素欠乏耐性やホウ素過剰耐性植物を作出することができるようにもなった。さらには、シロイヌナズナの変異株の解析から、ホウ素過剰耐性に必須な遺伝子も見つかっている。植物はホウ素を何らかの方法で感知し、状況に応じて輸送体の発現を変化させる等の応答をして生育を維持していることが明らかになった。

その一方で、「分子の時代」以前の知見や現象は必ずしも理解されている訳でもない。「分子の時代」には分子でわかりそうな研究をする傾向が強まり、現象の面白さや不思議さだけでは研究を維持しにくい状況にあることもあってか、理解されていない現象は多く残されている。例えば、河内宏博士は大学院時代にトウモロコシの根の伸張がホウ素欠乏にさらすと短時間に止まること、細胞内小器官に異常が見られることなどを報告している (Kochi and Kumazawa, 1975, 1975, 1976) が、今になってもなぜ根の伸張が短時間に止められるのか、細胞内小器官の異常が何を意味しているのか理解されていない。他にも、ホウ素はどうして細胞壁の特定の糖鎖の特定の糖に結合することが

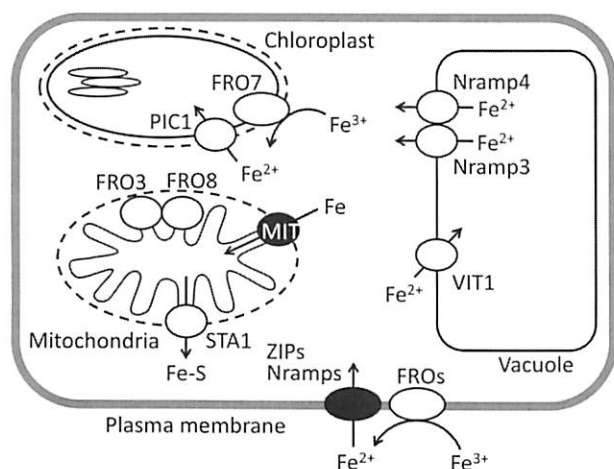


図2 植物細胞内での細胞内小器官への鉄の移行

できるのか、ペクチンの架橋がどうして細胞伸長に必要なのか、植物はどのようにして、どの部分のホウ素を感知しているのか、感知の仕組みは何なのか、そもそもなぜ進化の過程でホウ素が必須元素として選ばれたのか、等等、理解されていない問題点を数え上げればきりが無い。近年の知見の蓄積や研究手法の進展に伴って、過去に記述されつつもこれまで研究の対象とされてこなかった多くの興味深い現象について、改めて研究対象として研究を行うことで、これまでと違った次元の理解が得られるのではないかと考えている。

もう一つの「温故知新」として農業への貢献について考えてみたい。植物栄養学は歴史的には現場の問題を解決するためにあったが、日本ではコメ余りになるなかで、増産の意義が軽視され、かつ応用としての植物や土壌の栄養診断が一段落する中で、植物栄養学は研究の方向転換を迫られ基礎研究に向かって行ったと思われる。それに伴って、植物栄養学が本来基盤とすべき応用に本当に役立つ成果が出にくくなった。「役立つ」ことより「面白い」ことを重視するようになった。植物の栄養研究はこの十数年で急速に発展し、「分子レベル」の知見が増え、理解も深まっている。その一方で、「分子レベル」の研究が、実際の現場に役立つには至っていない。この20年の間に、世界の人口は1.5-2倍になっている。私は小学校では世界の人口は37億人と教わったと記憶しているが、現在の人口は68億人とされている。人口の増加は食糧をはじめとする植物生産に対する圧力（期待）となり、栄養研究のニーズはますます高まっている。

分子の理解が進み、多くの作物のゲノムが解析されるようになった今こそ、応用を目指した研究がより必要になっていると感じている。基礎研究は新規な一般性を目指し、応用研究は新規性よりも問題解決型で個別対応であるという本質的なギャップがあり、真の応用研究は個人や一研究室では難しい側面もあるものの、植物栄養学に社会として寄せられる期待は応用に重点がある訳であり、期待に答えられる研究を如何に推進していくことができるかが問われていると思っている。栄養は全ての生物に必要なものである。植物栄養学は植物を理解する基本であり、植物の示す多くの現象は栄養を獲得し生育・生存するためであるとも言える。蓄積しつつある幅広い知見と新しい技術を応用して、社会の要請に応える研究を目指すことが大切であると考えている。

(藤原 徹)

文 献

- Bandyopadhyay, S., Gam, F., Molina-Navarr, M.M. *et al.* 2008. Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J.* **27**, 1122-1133.
- Fujimaki S., Suzui N., Ishioka N. S., Kawachi N., Ito S., Chino M., and Nakamura S. 2010. Tracing cadmium from culture to spikelet: non-invasive imaging and quantitative characterization of absorption, transport and accumulation of cadmium in an intact rice plant. *Plant Physiology*, **152**, 1796-1806.
- Fujimaki S., Ishii S., and Ishioka N. S., 2010. Non-invasive imaging and analyses of transport of nitrogen nutrition in intact plants using a positron-emitting tracer imaging system (PETIS). *In* Ohyama T., and Sueyoshi K. (eds.) *Nitrogen Assimilation in Plants*, p. 119-132.
- Gao, X-H., Bedhomme, M., Michelet, M. *et al.* 2009. Glutathionylation in Photosynthetic Organisms. *Adv. Bot. Res.* **52**, 363-403.
- Imai K., Suzuki Y., Makino A., and Mae T. 2005. Effects of nitrogen nutrition on the relationships between the levels of *rbcS* and *rbcL* mRNAs and the amount of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesized in the eighth leaves of rice from emergence through senescence. *Plant Cell Environ.* **28**, 1589-1600.
- Imai K., Suzuki Y., Mae T., and Makino A. 2008. Changes in the synthesis of Rubisco in rice leaves in relation to senescence and N influx. *Ann. Bot.* **101**, 135-144.
- Kawachi N., Sakamoto K., Ishii S., Fujimaki S., Suzui N., Ishioka N. S., Matsuhashi S. 2006. Kinetic analysis of carbon-11-labeled carbon dioxide for studying photosynthesis in a leaf using positron emitting tracer imaging system. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, **53**, 2991-2997.
- Kawachi N., Fujimaki S., Sakamoto K., Ishioka N. S., Matsuhashi S., and Sekimoto H. 2008. Analysis of NO₃ interception of the parasitic angiosperm *Orobancha* spp. using a positron-emitting tracer imaging system and ¹³NO₃⁻. *Soil Science and Plant Nutrition*, **54**, 408-416.
- Kikuchi K., Ishii S., Fujimaki S., Suzui N., Matsuhashi S., Honda I., Shishido Y., and Kawachi N. 2008. Real-time analysis of photoassimilate translocation in intact eggplant fruit using ¹¹CO₂ and a positron-emitting tracer Imaging system. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **77**, 199-205.
- Kobayashi, T., Nakanishi, H., and Nishizawa, N.K. 2010. Recent insights into iron homeostasis and their application in graminaceous crops. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, **86**, 900-913.
- Kochi, H., and Kumazawa, K. 1975. Anatomical Responses of Root Tips to Boron Deficiency. I Effects of boron deficiency on elongation of root tips and their morphological characteristics. *Soil Sci. Plant Nutr.* **21** 21-28.
- Kochi, H., and Kumazawa, K. 1975. Anatomical Responses of Root Tips to Boron Deficiency. II Effects of boron deficiency on the cellular growth and development in root tips. *Soil Sci. Plant Nutr.* **21** 137-150.
- Kochi, H., and Kumazawa, K. 1976. Anatomical Responses of Root Tips to Boron Deficiency. III Effects of boron deficiency on sub-cellular structure of root tips, particularly on morphology of cell wall and its related organelles. *Soil Sci. Plant Nutr.* **22** 53-71.
- Makino A., Mae T., and Ohira K. 1988. Differences between wheat and rice in the enzyme properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and their relationship to photosynthetic gas exchange. *Planta* **174**, 30-38.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Marchand, C., *et al.* 2005. Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 16478-16483.
- Ohkama-Ohtsu, N., Oikawa, A., Zhao, P., Xiang, C., Saito, K., and Oliver, D. J. 2008. A γ -glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **148**, 1603-1613.
- Suwa, R., Fujimaki, S., Suzui, N., Kawachi, N., Ishii, S., Sakamoto,

- K., Nguyen, N. T., Saneoka, H., Mohapatra, P. K., Moghaieb, R. E., Matsuhashi, S., and Fujita, K. 2008. Use of positron-emitting tracer imaging system for measuring the effect of salinity on temporal and spatial distribution of ^{11}C tracer and coupling between source and sink organs. *Plant Science*, **175**, 210–216.
- Suzuki Y., Makino A., and Mae T. 2001. Changes in the turnover of Rubisco and levels of mRNAs of *rbcL* and *rbcS* in rice leaves from emergence to senescence. *Plant Cell Environ.*, **24**, 1353–1360.
- Suzuki, Y., Ohkubo, M., Hatakeyama, H., Ohashi, K., Yoshizawa, R., Kojima, S., Hayakawa, T., Yamaya, T., Mae, T., and Makino, A. 2007. Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with the 'sense' *rbcS* gene. *Plant Cell Physiol*, **48**, 626–637.
- Suzuki, Y., Miyamoto, T., Yoshizawa, R., Mae, T., and Makino, A. 2009a. Rubisco content and photosynthesis of leaves at different positions in transgenic rice with an overexpression of *RBCS*. *Plant Cell Environ.*, **32**, 417–427.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, K., Yoshizawa, R., Mae, T., and Makino, A. 2009b. Differences in expression of the *RBCS* multigene family and Rubisco protein content in various rice plant tissues at different growth stages. *Plant Cell Physiol*, **50**, 1851–1855.
- Takano, J., Miwa, K., and Fujiwara, T. 2008. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in Plant Science*, **13**, 451–457.
- Takeda, S., Aono, H., Okuyama, S., Ishikawa, S., Odaka, H., Watanabe, S., Kokubun, M., Takahashi, T., Nakazawa, K., Tajima, H., and Kawachi, N. 2009. Experimental results of the gamma-ray imaging capability with a Si/CdTe semiconductor Compton camera. *IEEE Transaction on Nuclear Science*, **56**, 783–790.
- Tsukamoto, T., Nakanishi, H., Uchida, H., Watanabe, S., Matsuhashi, S., Mori, S., and Nishizawa, N. K. 2009. ^{52}Fe translocation in barley as monitored by a positron-emitting tracer imaging system (PETIS): evidence for the direct translocation of Fe from roots to young leaves via phloem. *Plant Cell Physiol*, **50**, 48–57.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A. *et al.* (2000) The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell*, **12**, 97–110.
- 板井玲子・西澤直子 2010. トランスポーター研究が土壌・肥料・植物栄養学にもたらすインパクト. 2. 鉄栄養研究の進展と石灰質アルカリ土壌耐性植物の作出. 土肥誌, **81**, 403–409.