

## 根における養分吸収に関係する突然変異体

長谷川 博

滋賀県立大学 環境科学部

### 1 はじめに

高等植物の突然変異体を用いた植物生理学、植物発生学などの基礎研究ははじめ突然変異育種の基礎研究という観点から行われていた。現在では突然変異体の利用は分子生物学手法の進歩とともに植物機能の解析を行う重要な手段として広く行われるようになってきている。ことにこの10年間の発展はめざましいものがあり、Plant Cell や Plant Journal といった現代の植物科学研究をリードする雑誌には毎号のように突然変異体を用いた研究報告が掲載されている。植物の栄養イオン、ことに硝酸イオンの代謝についても多くの突然変異体が獲得され、貴重な研究成果が得られている。ここでは根における栄養イオンや重金属の吸収に関わる突然変異体の話題について筆者の研究経過を中心として紹介したい。

### 2 硝酸イオン吸収欠失突然変異体

塩素酸イオンは硝酸イオン（以下、硝酸と略記）のアナログであり、硝酸と同様に吸収され、硝酸還元酵素（NR）により還元され亜塩素酸になる。亜塩素酸は植物の細胞毒であり、植物は亜塩素酸の存在下では葉にクローレートバーン(Kleinhofs et al., 1978)と呼ばれる特徴的な褐変現象が生じて枯死に至る。根からの硝酸吸収がなければ、あるいはNR活性がなければ塩素酸の存在下でも植物は生存可能であり、これらの植物体は塩素酸抵抗性を示すはずである。シロイヌナズナの塩素酸抵抗性突然変異体が Oostindier-Braaksma and Feenstra (1972) により報告されたが、そのうちの1個体B1の塩素酸抵抗性は硝酸吸収の低下に起因すると当初から考えられた。1970年代には植物の根におけるイオン吸収について Epstein (1966) が提唱した dual pattern の存在が広く認められるようになり、根の表皮細胞の膜にはある種のタンパク質がトランスポーターとして機能していることが推測されるようになった。硝酸トランスポーターの探索のためにB1突然変異体の重要性が認識され、同突然変異体は高濃度の硝酸吸収トランスポーター (high affinity-low

capacity phase) が欠失していることが明らかにされた(Doddeema and Telkamp, 1979)。しかしながら、B1突然変異体は硝酸だけでなく、カリウム(イオン)その他のイオン吸収も低下していることが明らかになった(Scholten and Feenstra, 1986)ことから、硝酸に特異的なトランスポーターとは結びつかない突然変異体と考えられ、いったんは硝酸吸収研究の場面から退くことになった。

英国のローザムステッド試験場の生化学部では突然変異体を用いて植物のアミノ酸代謝と硝酸還元の研究に成果を挙げていたが、硝酸吸収機構の解明についても硝酸吸収欠失突然変異体を選抜することから研究をはじめた。この研究は1986年に出されたOECDの肥料と農薬による水系汚染対策に対する勧告(OECD, 1986)に呼応するものでもあり、まず作物の硝酸トランスポーター遺伝子を同定、クローニングし、最終的には施肥量をできるだけ少なくしてかつ安定な生産が可能な作物の育成を目標としたものであった。この理由から、ローザムステッドのグループ(Wallsgrove et al., 1989)はまず high affinity の硝酸吸収が欠失した突然変異体の獲得を目指した。硝酸吸収が欠失した突然変異体を選抜するためには、塩素酸抵抗性個体を選ぶ、個体ごとに吸収量をチェックする、および窒素欠乏症を示す個体を選抜するという3方法が考えられている(長谷川, 1990)。1 mM以下のイオン濃度で機能すると考えられている high affinity の吸収欠失突然変異体を選抜するためには、1 mM以上の塩素酸濃度で抵抗性突然変異体を選抜しなければならない塩素酸抵抗性を指標とすることは適切でないと考えられた。そこで、後者の2方法を採用してオオムギのアザイド処理後代のM2種子を用いて、突然変異体のスクリーニングが行われた。個体ごとの突然変異選抜法は硝酸フリーで育てたM2個体を適当なステージに硝酸イオンを含む小さな容器に個体ごと移し、一定時間後に溶液の硝酸濃度を測定して濃度が低下していない溶液の個体を選抜する方法である。窒素欠乏症を示す個体の選抜は硝酸を窒素源とする溶液でM2個体

を育て、淡緑色の個体を選ぶ方法である。この方法は葉緑素欠失突然変異のひとつである *viridis* との区別がつきにくい、オオムギでは窒素不足の症状を示す個体では葉の基部にアントシアニンの沈着が見られたことから、この反応も選抜指標とした。その結果、約9万のM2個体から総計60の硝酸吸収が欠失した個体を得られた。硝酸吸収の低下した個体の多くは生育不良あるいは不稔であり、さらにM3において突然変異形質を示さないものもあり、結局2個体のみが硝酸吸収欠失突然変異体であると認められた(Wallsgrove et al., 1989)。しかしながら、これら2個体の後代は突然変異形質を示す個体から正常な硝酸吸収を示す個体が翌代に分離し、固定した突然変異系統が得られなかった。このため、得られた突然変異体の後代を用いた突然変異形質の生化学、分子生物学的特性は調査されていない。

筆者はローザムステッド試験場の硝酸吸収欠失突然変異体の研究プロジェクトに参加する機会があり、1年間当地に滞在した。帰国後はイネを材料として high affinity の硝酸吸収欠失突然変異体のスクリーニングを再開した。好アンモニア性植物であるイネなら、硝酸代謝系に重大な欠損のある突然変異体が生じてもアンモニア条件で育てると生存可能であると考えたためである。イネでは硝酸フリーの条件で育てたM2幼植物から明確な窒素不足の症状を示す個体を区別できなかった。したがって、すべて個体別に硝酸吸収が欠失あるいは極めて低い個体を選抜する方法により、約35,000のガンマ線あるいはアジ化ナトリウム処理後代のM2個体から、低硝酸吸収突然変異体3個体を得ることができた。これらの突然変異体の後代においては、硝酸だけでなくカリウム吸収が低下していること、NR活性は正常範囲内であること、弱いセシウム耐性が認めれることなどが明らかになっている(Hasegawa, 1996)。3突然変異体のうち2個については生育不良を伴っているため、トランスポーター遺伝子を含むDNAの大きな欠失によるものか、あるいは代謝に関する重大な異常のある変異が生じ、そのために硝酸吸収能が低下したものと考えられている。突然変異体の分子生物学に基づく解析は今後の検討課題として残されている。

カリフォルニア大学サンディエゴ校のCrawfordらはシロイヌナズナの塩素酸抵抗性遺伝子と硝酸吸収遺伝子、硝酸還元酵素遺伝子との同一性を明らかにする実験を行った。Crawfordらは gene tagging 法という新しい突

然変異誘発法を用いてB1突然変異体の塩素酸抵抗性を示す遺伝子(*CHL1*)に突然変異を誘発した。得られた塩素酸抵抗性突然変異体の分子生物学的解析から、*CHL1*が low affinity の硝酸トランスポーターをコードしていることを確かめ、そのDNAのシーケンシングを明らかにしている(Tsay et al., 1993)。一方、ローザムステッドの硝酸吸収研究グループは硝酸イオン用の微小電極を用いた細胞内の硝酸濃度測定に関する成果をあげたあと(Miller and Zhen, 1991)、*Aspergillus* で明らかになった硝酸吸収トランスポーター遺伝子(Unkles et al. 1991)のDNAをプローブとしてオオムギの high affinity 硝酸トランスポーター遺伝子の探索を行った。その結果、高等植物において最初の high affinity の硝酸トランスポーター遺伝子のクローニングに成功した(Trueman et al., 1996)。現在では同様の遺伝子が *Nicotiana plumbaginifolia* (Quesada et al., 1997)、*Arabidopsis* (Zhuo et al., 1999)、ダイズ(Ranamalie Amarasinghe et al., 1998)、イネ(Tanaka et al., 1997)などで明らかになっている。なお、硝酸トランスポーター遺伝子の記号についで統一がなされ、low affinity のトランスポーター遺伝子を *Nrt1*、high affinity のトランスポーター遺伝子を *Nrt2* と記すことになっている。

硝酸吸収遺伝子の最も重要な特徴は high affinity, low affinity の遺伝子とも根に特異的に発現することである(Tsay et al., 1993, Trueman et al., 1996)。*CHL1* 遺伝子のmRNAを抽出して *Xenopus* の卵母細胞に注入すると、本来は硝酸吸収能をもたない細胞が硝酸吸収能を示すことが認められている(Tsay et al., 1993)。従来、植物の硝酸吸収能を表す場合には単位生体重あたりで評価をする例が多かったが、今後は根における硝酸トランスポーター遺伝子の発現量やトランスポータータンパク質の量あたりの吸収量で評価できるはずである。なお、*CHL1* 遺伝子が硝酸トランスポーターをコードしているかどうかについては若干の議論の余地があるようである。このことから、オオムギその他で見いだされた high affinity の硝酸トランスポーター遺伝子については、「*Aspergillus* の硝酸トランスポーター遺伝子とホモログである遺伝子」などという慎重な表現がされていることが多い。硝酸トランスポーターの分子生物学については詳細な解説記事が発表されたので、それを参考にさせていただきたい(小俣, 2000)。

なお、アンモニア吸収も細胞膜のアンモニウムトランスポーターを介して行われていることが明らかにされたが  $\text{NH}_4^+$  がカリウムチャンネルを通ること、アンモニア分子として拡散により細胞質内へ取り込まれることも知られている (Ninnemann et al., 1994).

### 3 セシウム抵抗性

植物の根におけるイオン吸収のメカニズムを解明するには、イオントランスポーターの同定とその機能を明らかにするだけでなく、イオントランスポーターを働かせる要因についても究明しなければならない。根の細胞膜に存在する  $\text{H}^+$ -ATPase はプロトンポンプとして細胞質の pH 調節を司っているが、 $\text{H}^+$ -ATPase が作用する場合に生じるエネルギーや細胞膜の内と外に生じる電位差が多くのイオン吸収に関与している。根の細胞膜において  $\text{H}^+$ -ATPase は複数の種類が存在しており、そのため  $\text{H}^+$ -ATPase の作用とイオン吸収能の関係が複雑なものとなっている。 $\text{H}^+$ -ATPase に関わる突然変異体があれば、イオン吸収の調節機構の解明もさらに進むと考えられる。

セシウムはカリウムのアナログイオンとして挙動するが、カリウムとは拮抗的に作用し、しかも低濃度で影響を及ぼす植物の細胞毒である (Sheahan et al., 1993)。シロイヌナズナでセシウム抵抗性突然変異体が獲得されている。これらの突然変異体の一部は単一の劣性突然変異遺伝子に支配されていることのほか、カリウムのアナログであるルビジウムの吸収 ( $^{86}\text{Rb}$  の取込み量として測定) が低下しているだけでなく、 $^{32}\text{P}$  の取込み量も減少することが認められている (Sheahan et al., 1993)。得られた突然変異体の 1 系統 *csi52* についてはその後、high affinity と low affinity の両方のカリウム吸収能が低下すること、パッチクランプ法により突然変異体と野生型の根の表皮の細胞膜電位に差異があることが明らかになった。これらの事実から、*csi52* はカリウム吸収システムの調節に関わる遺伝子の突然変異であると考えられている (Maathuis and Sanders, 1996)。*csi52* が  $\text{H}^+$ -ATPase 遺伝子の突然変異体なのかどうか、結論はまだ出ていないようである。

筆者はイネの低硝酸吸収突然変異体が弱いセシウム抵抗性を示したことから、セシウム抵抗性突然変異体にも興味をもち、イネのガンマ線照射後代の M2 種子を用いてセシウム抵抗性突然変異体のスクリーニングを行った (長谷川, 1999)。20  $\mu\text{M}$  の塩化セシウム溶液で播種時よ

り幼植物を育成し、同濃度で生育可能な個体を選抜した。その結果 10,800 の M2 個体のなかから 7 個のセシウム抵抗性突然変異体を選抜することができた。現在、突然変異体の後代系統を用いて突然変異形質の特性を調査中である。得られた突然変異系統は 1 価カチオン吸収に関していくつかの特徴をもつことが明らかになっている。たとえば、20  $\mu\text{M}$  の塩化セシウムからのセシウム吸収能力には突然変異系統間で差異が見られるが、同濃度の硝酸セシウム溶液からはすべての系統がセシウムを良く吸収する。このような事実は細胞膜のイオン輸送機構に何らかの変異が生じていることを示唆している。塩素イオンと硝酸イオンの差異がカチオンであるセシウムイオンの吸収に影響しているのであろう。また、突然変異遺伝子同定するために、突然変異系統の根に特異的に発現する遺伝子、あるいは欠失している遺伝子をディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて探索しているところである (長谷川ら, 2000)。

### 4 イオン吸収突然変異体の今後

イオン吸収欠失突然変異体を用いてトランスポーター遺伝子を同定する試みは硝酸トランスポーターの場合は初期の目標を達成することはできなかったが、吸収に関与する突然変異体は今後も植物の膜生理学にとって重要な役割を果たすはずである。ことにトランスポーター遺伝子の発現に関してはまだ不明な点が多いので、吸収欠失だけでなく吸収に関連した多様な種類の突然変異体は今後は必要となろう。2 価以上のイオン吸収や重金属の吸収に関してはいまだ不明な点が多いので、これらの解明にも突然変異体の利用が考えられる。

筆者は 1998 年夏にデンマークで行われた 6th International Symposium on Genetics and Molecular Biology of Plant Nutrition に参加し、イネのセシウム抵抗性の遺伝変異に関する発表 (Hasegawa and Okumoto, 1999) を行ったが、その際にセシウム抵抗性・感受性とセシウム吸収の関係についていくつかの質問を受けた。得られたイネのセシウム抵抗性突然変異系統のなかには塩化セシウム溶液からのセシウム吸収が低いものもあり、抵抗性は吸収能が低い個体の、感受性は吸収能が高い個体の選抜指標になる可能性もある。また、カドミウムなどの有害重金属の吸収に関しても、吸収に係る突然変異体は吸収機構や毒性の解明という基礎研究だけでなく、実用上大きな価値をもっている。すなわち、重金属吸収に関して吸収能の

高い変異体は有害物質の除去に、吸収能がない変異体は汚染土壌でも安全な作物生産を可能にするであろう。カドミウムについてはすでに感受性突然変異体がシロイヌナズナで獲得されており、同突然変異体はグルタチオンの欠失と関係していることが報告されている(Howden and Cobbett, 1991, Howden et al., 1995)。このように、重金属吸収に関わる突然変異体は近年注目されてるファイトレメディエーションにとって非常に重要な役割をはたすと思われる。植物のセシウム吸収に関心が高いのもチェルノブイリ原子力発電所の事故による放射能汚染の除去に植物を利用する試みが注目されていることと関係している(Broadley and Willey, 1997)。

## 引用文献

- Broadley, M.R., Willey, N.J. 1997. Differences in root uptake of radiocaesium by 30 plant taxa. *Environ. Pollut.* 97: 11-15.
- Doddema, H., Telkamp, G.P. 1979. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. II. Kinetics. *Physiol. Plant.* 45: 332-338.
- Epstein, E. 1966. Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. *Nature* 212: 1324-1327.
- 長谷川博 1990. 高等植物における硝酸吸収欠失突然変異体の3選抜方法の比較・検討. *近畿作物・育種研究* 35: 40-45.
- Hasegawa, H. 1996. Selection for mutants with low nitrate uptake ability in rice (*Oryza sativa*). *Physiol. Plant.* 96: 199-204.
- 長谷川博 1999. 作物のイオントランスポーター遺伝子の同定とその制御. 平成10年度 科学研究補助金 基盤研究(C)(2)報告書. pp. 38.
- Hasegawa, H., Okumoto, Y. 1999. Genetic variability in cesium resistance in rice (*Oryza sativa* L.). In Gissel-Nielsen, G., Jensen, A. eds., *Plant Nutrition- Molecular Biology and Genetics. Proc. 6th Int'l Sympo. Genet. Mol. Biol. Plant Nutr.*: 333-339.
- 長谷川博, 田村佳子, 竹村壘, 荒木良一, 奥本裕 2000. セシウム抵抗性イネ突然変異体の特性. *育種学研究* 2 (別冊1): 印刷中.
- Howden, R., Andersen, C.R., Goldsbrough, P.B., Cobbett, C.S. 1995. A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 107: 1067-1073.
- Kleinhofs, A., Warner, R.L., Muehrbauer, F.J., Nilan, R.A. 1978. Induction and selection of specific gene mutations in *Hordeum* and *Pisum*. *Mutat. Res.* 51: 29-35.
- Maathuis, F.J.M., Sanders, D. 1996. Characterization of *csi52*, a  $Cs^+$  resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* altered in  $K^+$  transport. *Plant J.* 10: 579-589.
- Miller, A.J., Zhen, R.-G. 1991. Measurement of intracellular nitrate concentrations in *Chara* using nitrate-selective microelectrodes. *Planta* 184: 47-52.
- Ninnemann, O., Jauniaux, J.-C., Frommer, W.B. 1994. Identification of a high affinity  $NH_4^+$  transporter from plants. *EMBO J.* 13: 3464-3471.
- OECD 1986. Water pollution by fertilizers and pesticides. OECD, Paris, pp.144.
- 小俣達男 2000. 硝酸イオン/亜硝酸イオンの能動輸送とその制御. 硝酸イオンの輸送・同化のバイオテクノロジー-I. *化学と生物* 38: 196-203.
- Oostindier-Braaksma, F.J., Feenstra, W.J. 1973. Isolation and characterization of chlorate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mutat. Res.* 19: 175-185.
- Quesada, A., Krapp, A., Trueman, L.J., Daniel-Vedele, F., Fernandez, E., Forde, B.G., Caboche, M. 1997. PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologues to the high affinity nitrate transporters of the *crnA* family. *Plant Mol. Biol.* 34: 265-274.
- Ranamalie Amarasinghe, B.H.R., de Bruxelles, G.L., Braddon, M., Onyeocha, I., Forde, B.G. Udvardi, M.K. 1998. Regulation of *GmNRT2* expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta* 206: 44-52.
- Scholten, H.J., Feenstra, W.J. 1986. Uptake of chlorate and other ions in seedlings of the nitrate-uptake mutant B1 of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 66: 265-269.
- Sheahan, J.J., Ribeiro-Neto, L., Sussman, M.R. 1993. Cesium insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 3: 647-656.
- Tanaka, T., Hasegawa, H., Nagao, Y., Komura, K., Ohkawa, Y. and Ida, S. 1997. Molecular cloning of rice homologue of high-affinity nitrate transporter. *Abst. 5th Int'l Congr. Plant Mol. Biol.*
- Tsay, Y.-F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., Crawford, N.M. 1993. The herbicide sensi-

- tivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72: 705-713.
- Unkles, S.E., Hawker, K.L., Grieve, C., Campbell, E.I., Montague, P., Kinghorn, J.R. 1991. *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 204-208.
- Wallsgrave, R.M., Hasegawa, H., Kendall, A.C., Turner, J.C. 1989. The genetics of nitrate uptake in higher plant. In Wray, J.L., Kinghorn, J.R. eds., *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*. Oxford Sci. Publ., Oxford, UK. pp.15-24.
- Zhou, D., Okamoto, M., Vidmar, J.J., Glass, A.D.M. 1999. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2;1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 17: 563-568.