

細胞膜プロトンポンプの過剰発現は養分吸収と光合成を同時に促進することでイネの収量を増加させる

名古屋大学
トランスフォーマティブ生命分子研究所
名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
木下 俊則

はじめに

植物は、根から窒素などの養分を吸収すると同時に、葉の気孔を開き、二酸化炭素を取り込んで光合成を行い、成長している。本研究では、イネの養分吸収と気孔開口について解析を行い、細胞膜プロトンポンプと呼ばれる酵素が共通して重要な役割を果たすことが明らかとなった。そこで、細胞膜プロトンポンプの過剰発現イネの詳細な解析を行ったところ、野生株と比べ、根での養分吸収、気孔開口、光合成活性が20%以上増加し、水耕栽培において地上部バイオマスが20%以上増加した。また、3ヶ所の異なる野外の隔離水田圃場における収量評価試験において、過剰発現イネでは、収量が野生株より30%以上増加することが明らかとなった。さらに、野外の隔離水田圃場において窒素の施肥量を変える実験を行ったところ、過剰発現イネでは窒素の施肥量を半分に減らしても、通常量の野生株より収量が12~24%多いことが明らかとなった(Zhang *et al.* 2021)。本研究の成果は、根における養分吸収と気孔開口を同時に高める画期的な技術の確立であり、今後、様々な実用作物での応用や、食糧増産や環境問題に大きく関わる二酸化炭素や窒素肥料の削減への貢献が期待される。

植物は、根において窒素、リンやカリウムなどの無機養分を吸収する

と同時に、葉の気孔から二酸化炭素を取り込み、光合成を行うことで成長している(図-1, Marschner 2012)。植物における唯一の二酸化炭素取り込み口となっているのが、植物の表面に存在する気孔と呼ばれる孔(あな)である。気孔は一对の孔辺細胞により構成され、太陽光下で開口して光合成に必要な二酸化炭素の取り込みを促進し、同時に葉から蒸散を行って根から水や無機養分の取り込みを促す(Shimazaki *et al.* 2007)。これまでの研究により、光による気孔開口においては、孔辺細胞に発現する青色光受容体フォトピンが

光シグナルを受容し、細胞内シグナル伝達を経て細胞膜に存在する細胞膜H⁺-ATPase(プロトンポンプ)をリン酸化により活性化することで、細胞の内側から外へのプロトンの能動輸送を誘導し、細胞膜の過分極を引き起こす。次にこの過分極に応答して孔辺細胞の細胞膜に存在する電位依存性内向き整流K⁺チャンネルが開き、K⁺が取り込まれ、浸透圧の上昇により水が取り込まれて孔辺細胞の体積が増加し、気孔が開く、という一連のプロセ

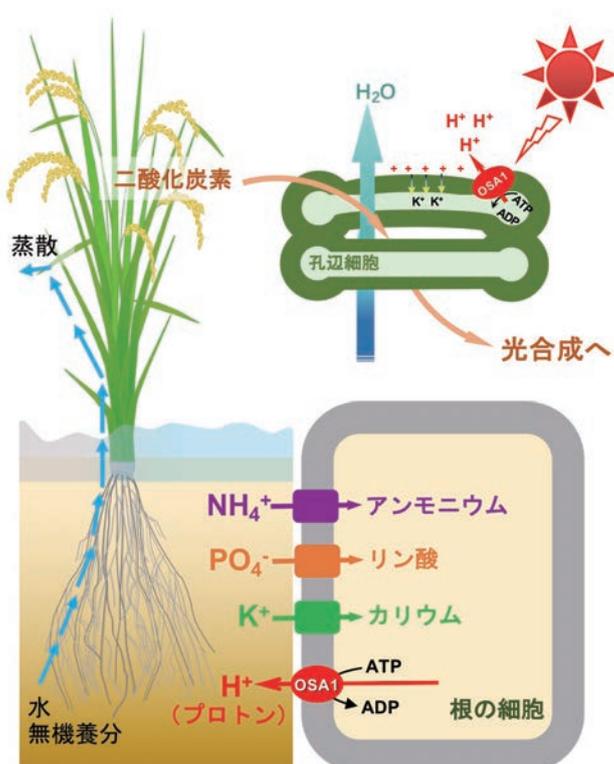


図-1 イネの気孔の開口と根における養分吸収
気孔は太陽光によって開口し、光合成に必要な二酸化炭素の取り込み、蒸散を行う。根では、土壌中の窒素源となるアンモニウム、リン酸、カリウムなどの必須無機養分を吸収する。両過程において、細胞膜プロトンポンプ(OSA1)が重要な働きをしていることが明らかとなってきた。

スを経ることが明らかとなっている(Inoue and Kinoshita 2017)。その中でも細胞膜プロトンポンプはシロイヌナズナやイネの気孔開口において必須の働きを担っていることが明らかとなっている(Yamauchi *et al.* 2016; Toda *et al.* 2016)。また、シロイヌナズナにおいて、孔辺細胞の細胞膜プロトンポンプの発現量を増やすことで、光による気孔開口が促進され、光合成活性が上昇し、地上部のバイオマスが増加することが示されている(Wang

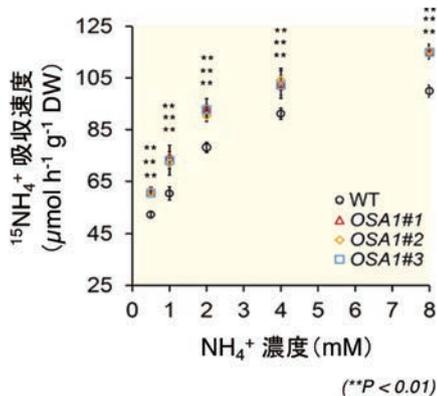


図-2 イネのプロトンポンプ過剰発現株における気孔開口促進と光合成活性の増加

水耕栽培4週目の野生株 (WT) とプロトンポンプ過剰発現イネ (*OSA1#1-#3*) の根における $^{15}\text{NH}_4^+$ の取込み速度。測定では、0.5-8 mM $^{15}\text{NH}_4^+$ と5分間インキュベートを行った。

et al. 2014a)。

細胞膜プロトンポンプは、約950個のアミノ酸からなる単一サブユニットの酵素で10回の膜貫通領域を持つ。維管束植物では一般に10遺伝子ほどからなる遺伝子ファミリーを形成する(シロイヌナズナにおいて11遺伝子、イネにおいて10遺伝子)。細胞膜プロトンポンプは、ATPの加水分解エネルギーを利用して能動的に細胞の内側から外側へプロトンの輸送を行うことで細胞膜を介したプロトンの電気化学勾配を形成し、細胞の恒常性の維持や様々な二次輸送体と共役した物質輸送に関わる。主な活性調節機構としては、C末端から2番目のスレオニンのリン酸化とリン酸化部位への14-3-3タンパク質の結合により活性化されることが知られている(Wang *et al.* 2014b; Falhof *et al.* 2016; Ding *et al.* 2021)。根における養分吸収においても、細胞膜プロトンポンプにより形成される細胞膜を介したプロトンの電気化学勾配を利用して、窒素源である硝酸や、カリウム、リン酸などが二次輸送体を介して取り込まれることが知られている(Palmgren 2001)。イネでは、窒素源としてアンモニウム

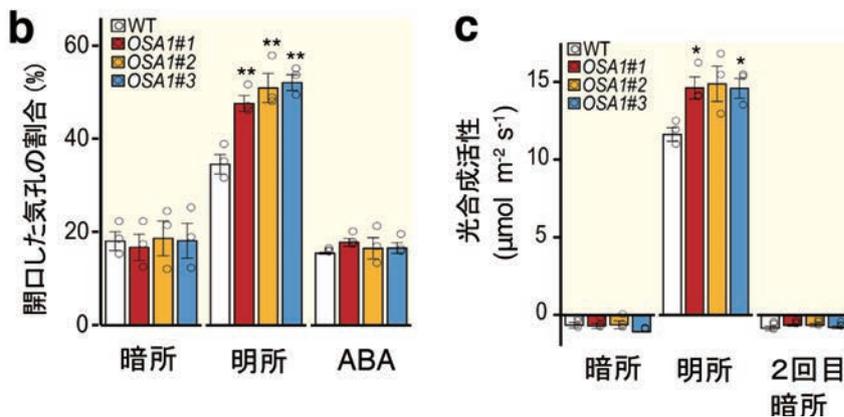
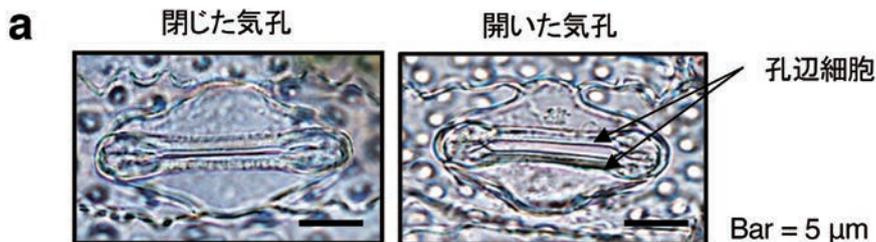


図-3 イネのプロトンポンプ過剰発現株における気孔開口促進と光合成活性の増加 (a) イネ野生株の閉じた状態と開いた状態の気孔の写真。(b) 光に依存した気孔開口(明所)と植物ホルモン・アブシジン酸による開口阻害(ABA)。(c) 光照射下での光合成活性(明所)。WT: 野生株, *OSA1#1-#3*: プロトンポンプ過剰発現イネ

を利用することが知られているが、近年の研究により、イネの根におけるアンモニウム取り込みも細胞膜プロトンポンプ活性に依存していることが明らかとなった(図-1, Zhang *et al.* 2021)。

植物の成長において、必須元素である窒素と炭素のバランスが重要であることが知られている(Coruzzi and Zhou 2001; Ariz *et al.* 2013)。よって、イネの根や孔辺細胞において細胞膜プロトンポンプを増やすことができれば、根からの養分吸収が高まると同時に、気孔開口が促進され、光合成による炭素固定量が高まり、窒素と炭素もバランスよく増加することが考えられた。そこで本研究では、イネの細胞膜プロトンポンプの主要なアイソフォームの一つである *OSA1* の発現量を増加させた過剰発現イネを作成し、表現型の解析を行った。イネの細胞膜プロトンポンプの過剰発現に

用いるプロモーターとしては、CaMV 35Sプロモーターを利用した。その結果、プロトンポンプ過剰発現イネでは、*OSA1* mRNAの発現レベルで根において7倍程度、葉において5倍程度、タンパク質レベルで根と葉において1.5倍程度に増加していた。次にプロトンポンプ過剰発現イネ3系統を用いて、根における安定同位体アンモニウム ($^{15}\text{NH}_4^+$) の吸収速度を測定したところ、0.5 mM ~ 8 mMの濃度範囲において20%以上取込み速度が上昇していることが明らかとなった(図-2)。この結果は、低親和性と高親和性の両方の輸送体におけるアンモニウム取り込みに細胞膜プロトンポンプが関与していることを示している。

次に、プロトンポンプ過剰発現イネにおける光による気孔開口反応と光合成について解析を行った。その結果、プロトンポンプ過剰発現イネでは、光照射下において開口した気孔の割合

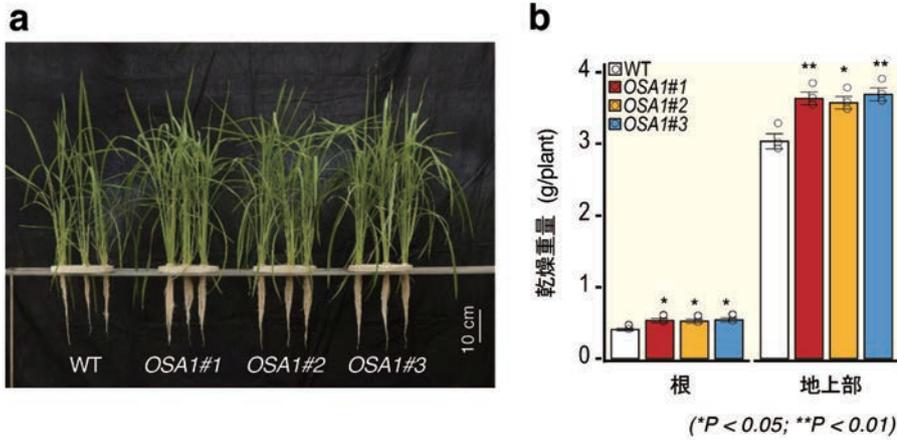


図-4 イネのプロトンポンプ過剰発現株における成長の促進
 (a) 水耕栽培4週目の野生株 (WT) とプロトンポンプ過剰発現イネ (OSA1#1-#3) の写真。(b) (a) の植物の乾燥重量の比較。野生株と比較して、プロトンポンプ過剰発現イネでは18-33%増加していた。

が25%以上増加していた。また、光合成蒸散測定装置を用いて気孔コンダクタンスと光合成活性を測定したところ、光照射下において、プロトンポンプ過剰発現イネの気孔コンダクタンスは野生株のほぼ倍程度に増加していた。さらに光合成活性(二酸化炭素固定量)は、野生株よりも26~28%増加していた(図-3)。

そこで、水耕栽培におけるプロトンポンプ過剰発現イネのバイオマスの測定を行った。その結果、4週齢のイネにおいて、プロトンポンプ過剰発現イネは野生株と比較して、根と地上部において、乾燥重量で18~33%バイオマスが増加していることがわかった(図-4)。以上の結果より、プロトンポンプ過剰発現イネは、期待通り、窒素と炭素の取り込み量が増加しており、水耕栽培条件においてバイオマスも増加していることが明らかとなった。

これまでの結果は実験室内での結果であり、野外の厳しい環境条件においても本技術の効果がみられるかどうかは不明である。そこで、実際のイネの野外の栽培環境での生育を調べるため、南京農業大学のYiyong Zhu教授との共同研究により、2年にわたって、中国の3ヶ所の異なった隔離水

田圃場(2016年南京南部, 2017年南京北部, 2017年鳳陽)における収量評価試験を行った。その結果、すべての隔離圃場において、野生株と比較してプロトンポンプ過剰発現イネでは、収量が27~39%(平均33%)

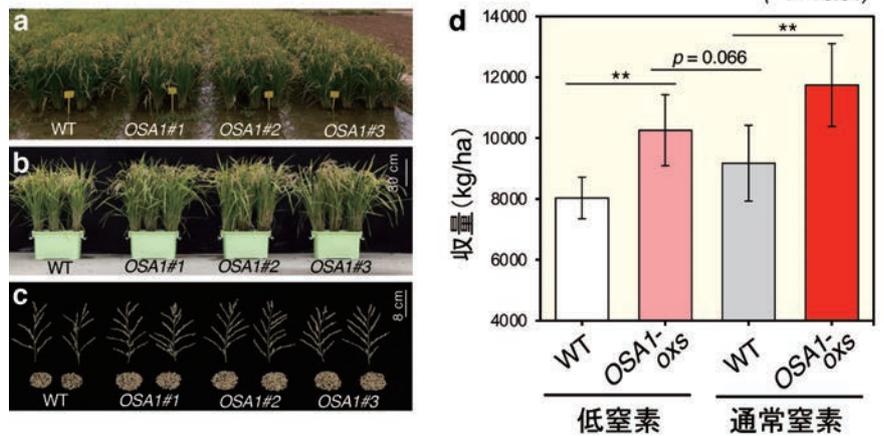


図-5 イネのプロトンポンプ過剰発現株の野外隔離水田圃場における収量評価試験
 田植え後約100日目の圃場(a)と容器に移し替えたイネ(b)の写真。(c)代表的な植物の稲穂(上)と種もみ(下)の写真。(d)収量の比較。野生株と比較して、プロトンポンプ過剰発現イネでは27-39%(平均33%)増加していた。興味深いことに、プロトンポンプ過剰発現イネでは、施肥する窒素量を半分に減らしても(低窒素)、通常の窒素量の野生株よりもイネ収量が多いことが明らかとなった。WT: 野生株, OSA1#1-#3: プロトンポンプ過剰発現イネ

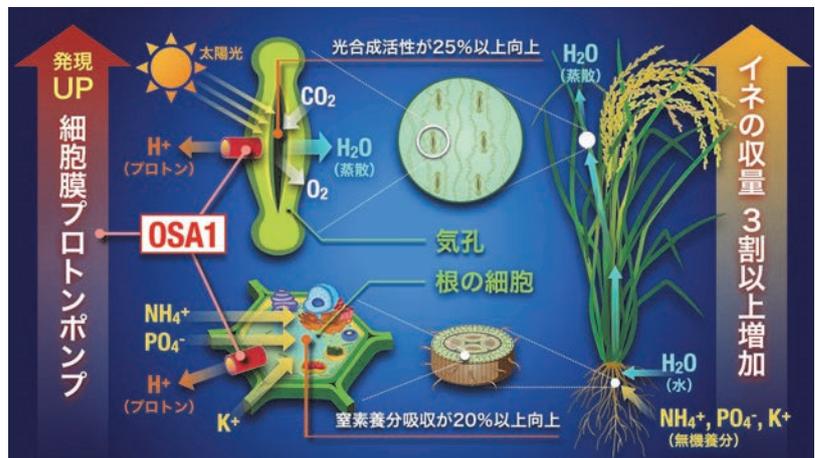


図-6 イネのプロトンポンプ過剰発現株における収量増加のグラフィカル・アブストラクト
 イネの細胞膜プロトンポンプ (OSA1) の発現量を植物体全体で増やすことで、光合成活性が25%以上向上し、根における窒素養分吸収が20%以上向上し、最終的にイネの収量が3割以上増加した。名古屋大学・高橋一誠による作図。

増加することが明らかとなった(図-5)。次に、窒素利用効率を調べたところ、プロトンポンプ過剰発現イネでは野生株よりも46%高いことが明らかとなった。この結果は、窒素肥料が少ない状況でもプロトンポンプ過剰発現イネは効率よく窒素を利用できることを示している。そこで、窒素の施肥量を通常条件と半分に減らした条件で隔離水田圃場において栽培実験を行ったところ、プロトンポンプ過剰発現イネは半分の窒素量でも、通常量の野生株よりも12~24%収量が多いことが明らかとなった(図-5, Zhang *et al.* 2021)。

本研究により、イネの1つの遺伝子である細胞膜プロトンポンプ(*OSA1*)の発現量を増加させるだけで、根における無機養分吸収量を高め、同時に気孔の開口を大きくし、植物の二酸化炭素吸収量とバイオマスを増加させることが世界で初めて可能となった(図-6)。また、3ヶ所の隔離水田圃場においてもイネの収量が30%以上増加すること、さらに、窒素の施肥量を半分に減らしても、通常の窒素量の野生株よりもイネ収量が多いことから、世界的な問題となっている急速な人口増加による食糧危機や、耕作地からの窒素流出による環境汚染の解決に貢献することが期待される。

根における無機養分取り込みや気孔開口の分子機構は、植物を通じて共通していることが知られていることから、本研究グループでは、この技術を用いた植物を「ポンプ植物」と名付けた。今後、様々な有用植物での適用を進めていきたい。現在は、遺伝子組換え技術により細胞膜プロトンポンプの過剰発現を行っているが、今後、ゲノム編集技術や化合物など、遺伝子組換え技術に頼らない方法での「ポンプ植物」の開発を進めることにより、社会での実用化がより促進されると期待される。

引用文献

- Ariz, I. *et al.* 2013. Changes in the C/N balance caused by increasing external ammonium concentrations are driven by carbon and energy availabilities during ammonium nutrition in pea plants: the key roles of asparagine synthetase and anaplerotic enzymes. *Physiol. Plant.* 148, 522-537.
- Coruzzi, G. M. and L. Zhou 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging "matrix effects". *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 247-253.
- Ding, M. *et al.* 2021. Molecular basis of plasma membrane H⁺-ATPase function and potential application in the agricultural production. *Plant Physiol. Biochem.* 168, 10-16.
- Inoue, S. and T. Kinoshita 2017. Blue light regulation of stomatal opening and

the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 174, 531-538.

Falhof, J. *et al.* 2016. Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Mol. Plant* 9, 323-337.

Marschner, P. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (Elsevier, 2012).

Palmgren, M.G. 2001. Plant plasma membrane H⁺-ATPase: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 817-854.

Shimazaki, K. *et al.* 2007. Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 219-247.

Toda, Y. *et al.* 2016. *Oryza sativa* H⁺-ATPase (OSA) is involved in the regulation of dumbbell-shaped guard cells of rice. *Plant Cell Physiol.* 57, 1220-1230.

Yamauchi, S. *et al.* 2016. Plasma membrane H⁺-ATPase (AHA1) plays a major role in *Arabidopsis thaliana* for stomatal opening in response to blue light. *Plant Physiol.* 171, 2731-2743.

Wang, Y. *et al.* 2014a. Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 533-538.

Wang, Y. *et al.* 2014b. Multiple roles of the plasma membrane H⁺-ATPase and its regulation. *Enzymes* 35, 191-211.

Zhang, M. *et al.* 2021. Plasma membrane H⁺-ATPase overexpression increases rice yield via simultaneous enhancement of nutrient uptake and photosynthesis. *Nature Communications*, 12, 735.