

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580088

研究課題名(和文)チャの硝酸吸収同化関連遺伝子のクローニングとその発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Cloning and characterization of nitrate absorption- and assimilation-related genes in tea plant

研究代表者

森田 明雄(Morita, Akio)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20324337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：チャの硝酸還元酵素(CsNR)、亜硝酸還元酵素(CsNiR)と硝酸トランスポーター遺伝子(CsNRT)の単離を試み、それぞれ1つ、1つおよび5つの全長配列獲得に成功した。これら遺伝子の各窒素栄養条件下における転写量は、硝酸濃度の上昇に伴い増加し、アンモニア濃度の増加に伴い減少する傾向が見られた。また、チャの硝酸吸収同化活性がアンモニアに比べ低いことが分かった。以上の結果から、チャの硝酸吸収・同化活性が低い原因は、転写調節過程と地上部への硝酸輸送が制限されていることに起因することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we isolated one of nitrate reductase (NR), one of nitrite reductase (NiR) and five nitrate transporter (CsNRT) genes from tea plant. The transcript levels of these genes in tea plant cultivated under different nitrogen nutrient conditions were increased with increasing nitrate concentration and decreased with increasing ammonia concentration. In addition, it was found that nitrate absorption activity of tea is lower than ammonia. These results suggested that the causes of low nitrate absorption and assimilation activity in tea plant might be due to the transcriptional processes and the nitrate transport into shoots is limited.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 植物栄養学・土壌学

キーワード：チャ 硝酸還元酵素 硝酸トランスポーター 硝酸同化

1. 研究開始当初の背景

茶の品質は遊離アミノ酸含量が高いほど良いと評価され、高い価格で取引される。一方、チャは好アンモニア性植物で窒素過剰害に強い特性を有し、チャ葉中の遊離アミノ酸含量は窒素施用量とともに高くなる傾向を示す。このため、茶園ではチャ葉中の遊離アミノ酸含量を高めることを目的に、硫酸アンモニウム肥料を中心に多量の窒素肥料が施用されてきた。茶園土壌に過剰に施されたアンモニア態窒素は、速やかに硝酸態窒素となり、降雨とともに溶脱し、地下水や湖沼の汚染源となることが懸念されてきた。また、一部地域では、茶園からの硝酸態窒素が周辺の湖沼に流入し、硝酸濃度の上昇、pHの低下をもたらし、多量の魚が死んだことが報道され、大きな社会問題を引き起こした。さらに、地下水の硝酸態窒素濃度が環境基準に採択されたことを契機に、全国の茶産地では、茶園由来の硝酸負荷量の低減に取り組み、肥効調節型肥料や硝酸化成抑制剤入り肥料の使用など肥培管理体系が見直しされ、徐々に窒素施肥量を削減してきた。しかし、窒素施肥量が少なくなるにしたがい茶の品質低下を訴える産地が増えており、茶園での窒素肥料削減への取り組みが停滞することが懸念されていた。

好アンモニア性植物であるチャは、アンモニア態窒素に比べて硝酸態窒素の吸収が非常に遅いことが知られている。このため、茶園での窒素吸収利用効率を向上させ、品質や生産性を維持しながら硝酸による環境負荷を解決する最も有効な方法の一つは、チャの硝酸吸収同化活性を高めると考えられる。しかし、チャの硝酸吸収同化に関する研究としては、チャの葉の硝酸還元酵素 (NR) 活性がミカンの約 1/10 と非常に低いという報告があるのみで、申請者が研究を行うまで他にはなかった。この原因としては、品質と生産性に強く影響するアンモニアの吸収同化に研究が集中したことと、植物の硝酸栄養研究で不可欠であった NR 活性の測定法が、チャの場合粗酵素液を用いた測定法が確立できず、煩雑な測定誤差が大きいリーフディスク法しかなかったことが挙げられる。申請者らは、1990年代後半からチャの硝酸吸収同化の研究を開始し、チャの茎を切除すると根の硝酸吸収が促進され、チャの硝酸吸収が根からの吸収だけでなく、地上部への移行が抑制されていることを示した。つまり、硝酸輸送を行っている硝酸トランスポーター (NRT) が非常に重要な役割を果たしていると考えられた。また、遮光処理によりチャ葉中の硝酸とシュウ酸含量が増加することも明らかとなり、チャの NR 活性が光条件により強く影響を受けていることも確認している。このように、チャの硝酸吸収同化過程では、他の植物種と同様に、NR や亜硝酸還元酵素 (NiR) に加え NRT が非常に重要な役割を担っていることと、光環境が重要であることが明らかと

なった。

2. 研究の目的

茶園では、品質向上と生産安定を目的に、窒素が多量に施用され、一部地域では余剰の窒素が硝酸の形態で地下水等に溶脱し、環境汚染源となっている。一方、チャの硝酸吸収速度はアンモニアより遅く、硝酸還元酵素活性はミカンの 1/10 程度と低い。このため、チャの硝酸吸収同化活性の向上が硝酸溶脱の低減に不可欠である。しかし、チャの硝酸吸収同化過程についての遺伝子レベルでの研究は全く行われていない。そこで、本研究では、チャの窒素利用効率の向上を目的に、チャの硝酸吸収と同化に關与する NRT と硝酸還元酵素 NR および亜硝酸還元酵素 NiR の遺伝子発現制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *CsNR*, *CsNiR* および *CsNRT* のクローニング

チャ (*Camellia sinensis* L. cv. やぶきた) 一年生挿し木苗の葉と根から total RNA を抽出し、Degenerate PCR および RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法によりチャの NR (*CsNR*), NiR (*CsNiR*) および NRT (*CsNRTs*) の単離を行った。具体的には、シロイヌナズナ、ホウレンソウ、タバコ、ダイズ、モモ、ボダイジュ、シラカバ等の NR, NiR または NRT s アミノ酸配列より Degenerate Primer を設計し、PCR 法によりチャの根と葉から *CsNR*, *CsNiR* および *CsNRT* 遺伝子の homologue 断片を得た。次に、得られた断片配列を塩基配列解析を行い、3' または 5' RACE PCR を行い、完全長配列を明らかにした。

(2) *CsNR* および *CsNiR* のゲノム配列の解析
'やぶきた' を対象に、(1) で全長単離した塩基配列をもとに Primer を作製し、ゲノム配列を鋳型とした PCR を行い、*CsNR* と *CsNiR* ゲノム配列の解析を行った。

(3) *CsNR* およびタンパク質構造の解析

静岡県茶業研究センター内の圃場で栽培されたツバキ属チャ節 17 品種と同属サザンカ節 4 品種を対象に、*CsNR* のシークエンス解析を行った。(1) で単離した全長配列をもとに Primer を作製し、上記の品種から total RNA を抽出後、各 NR 塩基配列の解析を行った。さらに、単離した *CsNR* について、シロイヌナズナの NR (*AtNR*) のアミノ酸配列と比較するとともに、コンピューターを用いて予測した *CsNR* 構造を酵母の NR (YNR) 構造をモリブデンコファクター (MoCo) ドメインを中心に比較した。

(4) 光条件または窒素栄養条件が *CsNR*, *CsNiR* および *CsNRTs* 発現に及ぼす影響

光条件に対する *CsNR* および *CsNiR* 転写量の栄枯湯を調査するため、静岡県茶業研究セ

ンター内の圃場で栽培されたチャ品種の *CsNR* および *CsNiR* 転写量を 2 時間おきに測定した。また、窒素栄養環境に対する *CsNR*, *CsNiR* および *CsNRTs* の発現特性を調査するため、チャ標準水耕培養液の窒素濃度を 0 (-N), 40 (N40 系) および 120 mg L⁻¹ (N120 系) に調節し、N40 と N120 系については NO₃-N : NH₄-N 比を 100:0, 50:50 または 0:100 とした計 7 処理区で、'やぶきた' 1 年生挿し木苗を約 6 週間栽培し、生育量、葉色値、全窒素および全炭素含量、NO₃⁻ 含量、遊離アミノ酸含量および *CsNR*, *CsNiR* および *CsNRTs* 転写量を測定した。

4. 研究成果

(1) *CsNR*, *CsNiR* および *CsNRT* のクローニング

CsNR, *CsNiR* および *CsNRT* について Degenerate PCR および RACE PCR により全長配列の単離を試みた結果、*CsNR* と *CsNiR* についてはそれぞれ 1 つずつのオーソログを、*CsNRTs* に関してはシロイヌナズナで単離されている *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2*, *AtNRT1.5*, *AtNRT2.1* および *AtNRT2.2* のオーソログと思われる 5 つの *CsNRTs* (*CsNRT1.1*, *CsNRT1.2*, *CsNRT1.5*, *CsNRT2.1* および *CsNRT2.2*) *CsNRT1.1*, *CsNRT1.2* および *CsNRT1.5* の全長配列獲得に成功した。

(2) *CsNR* および *CsNiR* のゲノム配列の解析

CsNR ゲノム配列の解析を行ったところ、これまでにゲノム配列が報告されているいくつかの植物種と同様に、4 つのエキソンと 3 つのイントロンから構成されていた。また、解析の結果、*CsNR* は約 16 kbp, *CsNiR* は約 9 kbp であることがわかった。

(3) *CsNR* およびタンパク質構造の解析

単離した *CsNR* について、*AtNR* の硝酸同化に関わる保存性の高い 21 個のアミノ酸配列を比較したところ、FAD 結合に関わるセリンが *CsNR* ではスレオニンであった以外に違いは見られなかった。また、やぶきた *NR* の mRNA 配列のコンピューターによるタンパク質構造を YNR との比較による構造解析を行ったところ、活性部位などに変化は見られず、タンパク質の構造自体の変異がチャの *NR* 活性の低い原因である可能性は低いと考えられた。さらに、ツバキ属 21 品種間の *NR* 配列を比較したところ、チャ節とサザンカ節では各節特異的な配列パターンが見られたが、チャ節の中では、品種間で特異的な配列の差異はなかった。これらのことから、チャの低い硝酸同化活性の原因が *CsNR* 構造にある可能性は低いと考えられた。

(4) 光条件または窒素栄養条件が *CsNR*, *CsNiR* および *CsNRTs* 発現に及ぼす影響

NO₃-N を唯一の窒素源としてチャを栽培すると、NH₄-N を含む条件下で栽培した場合と

比べ、新葉と根における NO₃⁻ 含量の有意な増加がみられたが、新芽の生育量、新葉と成葉の葉色値、新葉と根の全窒素含量および遊離アミノ酸含量が低下した。これらのことから、チャの NO₃⁻ 吸収同化活性が NH₄⁺ に比べ低いことが確かめられた。

やぶきた新芽について、*CsNR* と *CsNiR* 転写量の日長変動を調査した結果、これら遺伝子の光強度による発現変動への影響は低いと考えられた。また、各窒素栄養条件下における *CsNR* 転写量は、硝酸濃度の上昇に伴い増加し、アンモニア濃度の増加に伴い減少する傾向が見られ、チャにおいても窒素栄養に应答した *NR* の転写調節が行われていることが示唆された。また、チャ 13 品種における新葉の *NR* 転写量は、'はつもみじ' や 'べにひかり' といった一部のアッサム系品種において中国種とは異なる傾向が見られた。

一方、植物全体における NO₃⁻ 存在量の約 90% が根に集中していたが、その NO₃⁻ 蓄積量はホウレンソウの 1/10 以下であった。さらに、*CsNRT1.1*, *CsNRT1.2* 並びに *CsNRT2.1* は葉と根の両方で発現がみられたが、*CsNRT1.5* と *CsNRT2.2* は根でのみ発現していた。また、*CsNRT1.1*, *CsNRT1.2* および *CsNRT1.5* は構造的な発現を示したが、根における発現レベルは他の *CsNRTs* よりも低かった。同様に、*CsNRT2.1* および *CsNRT2.2* は -N 区と NO₃-N を唯一の窒素源とした処理区で発現量が増加し、NH₄⁺ を培地に含む処理区で減少した。また、シロイヌナズナと比較してもチャの NO₃⁻ 含量は最も低く、*CsNRTs* 転写量は *AtNRTs* 転写量よりも著しく低かった。

以上の結果から、チャの硝酸吸収・同化活性が低い原因は、転写調節過程にあり地上部への硝酸輸送が制限されていることに起因することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Ryosuke Take, Takuya Baba, Akio Morita, Takashi Ikka, Cloning and Characterization of Inorganic Nitrogen Transporter of Tea Plant (*Camellia sinensis* L.), Proceedings of 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science, 査読無, 2014, PR-P-35

Takuya Baba, Ryosuke Take, Hideyuki Katai, Yasutaka Suzuki, Akio Morita, Takashi Ikka, Isolation and Characterization of Nitrate Reductase in Tea Plant (*Camellia sinensis* L.), Proceedings of 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science, 査読無, 2014, PR-P-49

〔学会発表〕(計10件)

Ryosuke Take, Takuya Baba, Akio Morita, Takashi Ikka, Cloning and Characterization of Inorganic Nitrogen Transporter of Tea Plant (*Camellia sinensis* L.), The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science, Nov. 7, 2013, Granship Shizuoka

Takuya Baba, Ryosuke Take, Hideyuki Katai, Yasutaka Suzuki, Akio Morita, Takashi Ikka, Isolation and Characterization of Nitrate Reductase in Tea Plant (*Camellia sinensis* L.), The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science, Nov. 7, 2013, Granship Shizuoka

馬場拓也, 片井秀幸, 鈴木康孝, 一家崇志, 森田明雄, チャ品種間における硝酸還元酵素遺伝子の発現特性, 2013年10月13日, 日本育種学会, 鹿児島大学

武亮介, 一家崇志, 森田明雄, チャの無機態窒素トランスポーターの単離とその発現特性の解析, 2013年9月12日, 日本土壌肥料学会, 名古屋大学

馬場拓也, 一家崇志, 森田明雄, チャの硝酸同化系酵素の発現特性の解析, 2013年9月12日, 日本土壌肥料学会, 名古屋大学

馬場拓也, 一家崇志, 森田明雄, チャの硝酸同化系酵素遺伝子の単離とその発現特性の解析, 2012年9月5日, 日本土壌肥料学会, 鳥取大学

武亮介, 一家崇志, 森田明雄, チャの無機態窒素トランスポーターの単離とその発現特性, 2012年9月5日, 日本土壌肥料学会, 鳥取大学

馬場拓也, 武亮介, 森田明雄, 一家崇志, チャの硝酸還元酵素遺伝子の単離とその発現特性の解析, 2012年3月17日, 第13回静岡ライフサイエンスシンポジウム, 静岡県立大学

武亮介, 馬場拓也, 森田明雄, 一家崇志, チャの無機態窒素トランスポーターの単離とその発現特性, 2012年3月17日, 第13回静岡ライフサイエンスシンポジウム, 静岡県立大学

一家崇志, 深谷輝美, 森田明雄, 窒素栄養条件がチャ培養細胞の硝酸還元酵素遺伝子転写量に及ぼす影響, 2011年8月9日, 日本土壌肥料学会, つくば国際会議場

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 明雄 (MORITA, Akio)

静岡大学農学研究科・教授

研究者番号: 20324337

(2) 研究分担者

一家 崇志 (IKKA, Takashi)

静岡大学農学研究科・助教

研究者番号: 90580647

(3) 連携研究者

なし