

知識天地

如何為植物調配五星級的營養特餐：談植物對於硝酸鹽（Nitrate）的吸收

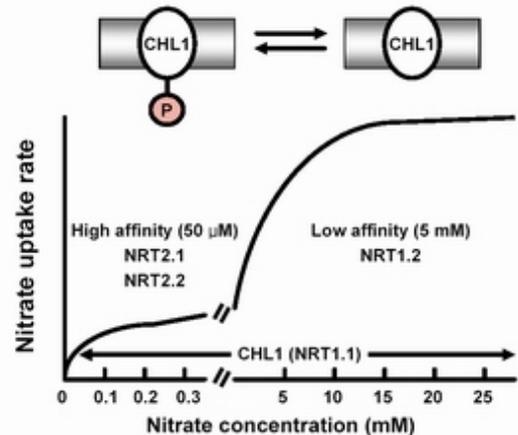
許博凱、蔡宜芳（分子生物研究所博士生、副研究員）

植物主要的氮源－硝酸鹽

氮是構成胺基酸與核酸的元素之一，是生物所需的必要元素。雖然，在大氣中氮氣佔了約五分之四，但是氮氣必須藉由「固氮作用（Nitrogen fixation）」轉變為銨鹽（Ammonium）或硝酸鹽（Nitrate），才能被植物吸收利用。植物本身沒有「固氮」的能力，只有少數的細菌及藍綠藻有「固氮」的能力。少數植物如豆科植物能夠與具固氮能力的根瘤菌共生，藉此來獲得氮源。對異營性的動物而言，不但無法利用大氣中的氮氣，也沒有辦法利用土壤中的無機氮源，只能仰賴植物將無機氮轉變為有機氮，動物再藉由攝食植物的方式來攝取氮源。農業學家的一個夢想是讓大多數的經濟作物具有與固氮菌共生的能力，如此一來我們不用耗費經濟資源來施肥就有農產收穫。但在夢想實現之前，對大部分的植物而言，氮的來源主要還是來自於土壤中的硝酸鹽，之後植物藉由同化作用將之轉變為氨基酸。在土壤中的硝酸鹽含量變化劇烈，一般以尿素（Urea）當氮肥施加，任何形式的無機氮肥會在幾天之內被土壤中的細菌轉化成硝酸鹽，但是帶負電的硝酸鹽無法附著於同樣是帶負電的土壤粒子上而加以長期留存，所以沒有被植物吸收的硝酸鹽很容易因為雨水沖刷而流失、而造成環境的汙染。作物不施肥長不大，但過度施氮肥，會讓蔬果累積大量的硝酸鹽而危害人體的健康。因此，如何顧及生態、經濟效益及人體健康有效地施加氮肥是一個很重要的農業課題。我們利用模式植物阿拉伯芥來研究植物是用什麼機制吸收硝酸鹽，以及植物是如何因應外界的環境變化來調控對於硝酸鹽的吸收，期望這樣的瞭解有助於我們為植物設計一套 5 星級的營養特餐。

利用低親和性和高親和性兩種吸收系統來應對環境的改變

硝酸根是帶有負電荷的離子，理論上沒有辦法藉由擴散作用的方式通過細胞膜，必須藉由主動運輸的方式。確實，植物對於硝酸鹽的吸收，必須藉由氫離子幫浦（H⁺-ATPase）所造成氫離子濃度差異，將硝酸鹽由細胞外運送到細胞內。如果利用抑制劑抑制氫離子幫浦，也會抑制植物對於硝酸鹽的吸收。生理學的研究發現植物主要具有兩種硝酸鹽吸收的系統，當外界硝酸鹽濃度高時（>0.5mM），能夠利用低親和性硝酸鹽轉運系統做吸收；相反的，當外界硝酸鹽濃度低（<0.2mM）時，則利用高親和性硝酸鹽轉運系統。低親和性硝酸鹽轉運系統的吸收速率高；相反的，高親和性硝酸鹽轉運系統的吸收速率低。這樣的機制使得植物能夠因應外界硝酸鹽濃度個改變，有效的吸收硝酸鹽。



利用遺傳學結合分子生物學，使得我們有機會能窺探植物吸收硝酸鹽的分子機制。氯酸鹽（Chlorate）是與硝酸鹽有類似結構的相似物，同樣會被硝酸鹽轉運系統所吸收，並經由硝酸鹽還原酶轉變為亞氯酸鹽（Chlorite）而對植物造成毒性。因此，氯酸鹽能夠作為篩選硝酸鹽轉運系統和硝酸鹽同化作用是否發生突變的工具。篩選阿拉伯芥能夠抵抗氯酸鹽毒性的突變株時發現，*chl1* 這個突變株的硝酸鹽吸收發生了缺失。當 *CHL1* (*AtNRT1.1*) 這個基因被選殖出來，發現其蛋白質表現於細胞膜上，是氫離子和硝酸鹽的共同轉運蛋白（Co-Transporter），能在根部負責硝酸鹽的低親和性吸收，這是植物中第一個被報導的硝酸鹽轉運蛋白。其後，另一個同源蛋白 *AtNRT1.2* 也被發現是參與低親和性硝酸鹽吸收。除此之外，*CHL1* 的相似基因也在水稻和煙草中被找到，並且證明了具有低親和性硝酸鹽轉運的功能，顯示這樣的機制普遍存在於植物中。

另一方面，在植物當中還存在著另外一群硝酸鹽轉運蛋白 NRT2。NRT2 這群轉運蛋白最早是在真菌及綠藻中利用遺傳的方法找到，之後再利用真菌及綠藻 NRT2 的高度保留性區域，在阿拉伯芥中找到兩個相似基因 *AtNRT2.1* 和 *AtNRT2.2*，並且發現這兩個基因的突變株在高親和性硝酸鹽的吸收有缺失。同樣的，在大麥、煙草及大豆當中，

也都發現了 NRT2 的相似基因。綜合以上的發現，高親和性和低親和性的硝酸鹽吸收一直被認為是由不同基因（不同的轉運蛋白）所負責。

特殊的 CHL1 (AtNRT1:1) 雙親和性及 AtNRT1 同源蛋白的受質專一性

當我們研究阿拉伯芥 *chl1* 突變株對硝酸鹽的吸收時發現一個有趣的現象，那就是 *chl1* 突變株除了在低親和性硝酸鹽吸收以外，在高親和性的硝酸鹽吸收也有缺失。利用非洲爪蟾的卵作為蛋白質表現系統，證明了 CHL1 除了在低親和性的範圍能吸收硝酸鹽以外 ($K_m \approx 4\text{mM}$)，在高親和性的範圍也能吸收硝酸鹽 ($K_m \approx 50 \mu\text{M}$)，顯示 CHL1 是一個具有雙親和性的硝酸鹽轉運蛋白。這樣的發現打破了「高低親和性的硝酸鹽吸收是由不同的硝酸鹽轉運蛋白所負責」的想法。進一步的，我們更證明了 CHL1 能因應環境中硝酸鹽的濃度做高低親和性的切換，而這樣的切換是藉由氨基酸序列第 101 個位置的羥丁氨酸 (Threonine) 的磷酸化所調控。當外界硝酸鹽濃度低時，T101 會磷酸化，使 CHL1 具有高親和性硝酸鹽吸收的活性；相反的，當外界硝酸鹽濃度高時，T101 會去磷酸化，使 CHL1 具有低親和性硝酸鹽吸收的活性，這樣的機制使得植物能夠快速的因應外界硝酸鹽濃度的變化而改變硝酸鹽的吸收方式。

當阿拉伯芥基因體定序完成後，發現阿拉伯芥一共有 53 個 CHL1 的同源蛋白 (AtNRT1 family)。為何小小的一株阿拉伯芥需要這麼多 CHL1 同源蛋白？除了之前提到 CHL1 和 AtNRT1:2 是負責硝酸鹽的吸收，我們發現 AtNRT1:5 表現在根的周鞘 (Pericycle)，其功能是將硝酸鹽裝載到木質部，使硝酸鹽能夠被運送到地上部。AtNRT1:4 表現在葉柄細胞的前液泡 (Prevacuole) 膜上，其功能在於將硝酸鹽儲存到液泡當中。AtNRT1:4 的研究顯示葉柄在調控硝酸鹽的分佈上扮演一個管制站的角色，而確實有農夫利用葉柄的硝酸鹽含量來監測作物對氮肥的需求。儲存在葉片液泡中的硝酸鹽，當葉片老化或不再需要時，可被轉送到其他葉片特別是嫩葉，AtNRT1:7 就是負責這項「宅配」工作。在另一方面，一般認為植物是利用有機氮源來供應胚胎的發育，但是根據我們對 AtNRT1:6 的研究發現硝酸鹽會影響非常早期的胚胎發育，而且硝酸鹽對胚胎發育的影響力會因土壤中氮源多寡而改變。

另外，阿拉伯芥的 53 個 CHL1 的同源蛋白中有一些被證實為雙肽轉運蛋白而被另外命名為 AtPTRs。在大麥，種子萌芽時胚乳的儲存蛋白會被水解成雙肽或胺基酸，而 PTR 負責此時雙肽的輸送。近來，我們更發現有兩個 CHL1 的同源基因具有麩胱甘肽 (Glutathione, GSH) 的吸收能力，當這兩個基因發生突變時，會影響阿拉伯芥對於重金屬鎘 (Cd) 的抗性。由此可知，不同的 AtNRT1 同源蛋白能夠運送不同的受質，因此我們很難單純的藉由蛋白質序列來預測其受質，其他的同源蛋白有更多我們未知的生理功能值得我們去探討。

硝酸鹽作為環境中的訊息

植物並不像動物一般能夠移動，只能藉由調節生理的機制來因應環境的改變。研究發現，硝酸鹽能夠作為一個訊息誘導阿拉伯芥側根的生長，有利於植物探索土壤中硝酸鹽較多的區域。另一方面，硝酸鹽也能誘導硝酸鹽轉運蛋白基因 (*CHL1*、*AtNRT2:1* 及 *AtNRT2:2*) 和硝酸鹽同化作用酵素 (*NIA1*、*NIA2* 及 *NIR*) 的基因表現，有利於植物能在有硝酸鹽的環境中迅速吸收及利用硝酸鹽。我們更發現，這些基因受硝酸鹽誘導的幅度與硝酸鹽濃度有關，當外界硝酸鹽的濃度越高，受誘導的幅度越大，顯示植物能感受硝酸鹽的多寡。而我們有興趣的是硝酸鹽透過什麼訊息傳遞途徑來誘導這些基因的表現。藉由 DNA 生物晶片監測受硝酸鹽誘導時及 *chl1* 突變株中基因的表現，我們找到了一個蛋白質激酶 CBL-interacting Protein Kinase 8 (*CIPK8*) 會在 15 分鐘內受到硝酸鹽的誘導，並且其誘導幅度會受硝酸鹽濃度的影響。在 *cipk8* 突變株中，受硝酸鹽誘導的基因如 *CHL1*、*NIA1* 及 *NIA2* 等受誘導的程度都下降了，顯示 *CIPK8* 參與了硝酸鹽誘導的訊息傳遞，可能扮演著擴大硝酸鹽訊息的角色，使植物能快速反應外界硝酸鹽的狀況。

未來展望

氮肥的添加，雖然能夠增加農作物的產量，可是使用過量的氮肥卻反而會造成土壤及水源的污染。另一方面，蔬菜累積過量的硝酸鹽，可能會造成食用者的有致癌的危機。隨著對於硝酸鹽吸收及硝酸鹽訊息傳遞機制有更多的瞭解，我們期待未來能調控植物對於硝酸鹽的吸收，使得植物能夠在有限的硝酸鹽環境中更有效率地吸收及應用硝酸鹽。