

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21114005

研究課題名(和文)植物ホルモンを介した炭素・窒素栄養バランス情報の伝達システムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of carbon/nitrogen balance signal transduction system via plant hormones

研究代表者

榊原 均(SAKAKIBARA, HITOSHI)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：20242852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 86,100,000円、(間接経費) 25,830,000円

研究成果の概要(和文)：高CO<sub>2</sub>により引き起こされる植物の成長促進において、トランスゼアチン型サイトカイニンの生合成亢進が要因の1つであることを明らかにするとともに、その原因となる遺伝子と制御機構を明らかにした。サイトカイニン作用の調節には、量的なものに加え、側鎖修飾による質的な調節機構があることを明らかにした。窒素栄養に応答したサイトカイニン生合成調節は、外環境(硝酸イオン)と内環境(グルタミン代謝)の複数の因子によって制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that enhanced production of trans-zeatin is a key factor to facilitate the shoot growth in response to high CO<sub>2</sub> condition. IPT3 and CYP735A2 are regulated by CO<sub>2</sub> concentration mediated by sugars produced from photosynthesis. We have demonstrated that the physiological function of tZ is distinct from that of iP, and the trans-hydroxylation of cytokinin controls shoot growth in Arabidopsis.

We have shown that plants have multiple modes of regulation of de novo cytokinin synthesis in response to nitrogen status: Arabidopsis mainly uses nitrate-specific response system that regulates IPT3, and rice employs multiple IPT genes for nitrogen-dependent cytokinin synthesis, and glutamine metabolism is the signal for the regulation. In both cases, these regulations would be important for root-to-shoot supply of tZ via xylem for regulation of shoot growth.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：光合成 二酸化炭素 植物ホルモン 窒素栄養 遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

植物は土壤中から吸収した無機栄養と大気中の CO<sub>2</sub> から、光エネルギーを利用して生命活動に必要な全ての生体構成分子を作り出す。また、その生育環境に最も都合のよい形態形成を行い、バランスのとれた植物個体を構築している。これは代謝システム調節(「中身」)と形態形成(「器」)の相互制御により成立しているが、その相互制御のためのシグナル分子として植物ホルモンが関与していると考えられる。つまり、CO<sub>2</sub> と窒素の供給バランスによる植物ホルモン生合成・情報伝達の制御機構を明らかにすることは、「植物がいかんして高 CO<sub>2</sub> 環境および C/N 環境変化に応答しているか？」を解明するための重要課題である。

植物ホルモンは外環境変化に対する形態的、代謝的応答のためのシグナル分子として重要な役割を担っている。これまでの研究から、サイトカニン(CK)は窒素栄養供給量によりその生合成が調節され、局所シグナルおよび器官間情報伝達シグナルとして光合成機能、シンク・ソースバランスを制御していることが明らかにされている。ただし、高 CO<sub>2</sub> 環境下や C/N 栄養バランス比による植物ホルモン全体の代謝調節や情報伝達の制御、それに関わる遺伝子についての理解は進んでいなかった。

### 2. 研究の目的

本研究ではシロイヌナズナとイネを用いて、高 CO<sub>2</sub> 環境や C/N 栄養バランス変動への応答機構における植物ホルモンの役割とその制御メカニズムを明らかにする。具体的には、以下に挙げる 2 つに焦点を絞り研究を進める。

(1) 高 CO<sub>2</sub> 条件での植物の成長応答に関わる遺伝子を同定し、その機能と制御機構を明らかにする。

(2) CO<sub>2</sub> 濃度が一定のときの窒素栄養変動に対する主要植物ホルモン、特にサイトカニンの代謝制御様式とその制御機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ生育環境中の CO<sub>2</sub> 濃度を 280 ppm から 780 ppm に変化させた時に起こる、植物の成長変化と主要ホルモンの内生量の変化を調べる。有意に変化が認められた植物ホルモンについて、その内生量変化の原因となる遺伝子を同定するとともに、その発現制御の仕組みについて明らかにする。

(2) イネの無機窒素栄養に反応した主要植物ホルモンの内生量変化を定量解析する。有意に変化が認められたホルモンについて、その生合成に関わる遺伝子の制御様式を明らかにする。研究が先行するシロイヌナズナでの知見と統合し、その制御機構の普遍性と多様性について明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) 高 CO<sub>2</sub> 条件への成長応答に関わる遺伝子同定と機能解析

シロイヌナズナの生育において、CO<sub>2</sub> 濃度を 280 から 780 ppm に上昇させると地上部器官の成長促進がみられた。その過程におけるホルモン内生量の変化について、サイトカニン、オーキシン、アブシジン酸、ジベレリンに着目し、定量解析を行ったところ、サイトカニンのみ、その内生量に有意な増加がみられた。また、その増加が成長促進(地上部の新鮮重増加)に先んじて起こっていたことから(図1)、サイトカニンと成長促進の関係に着目し、さらに解析を進めた。

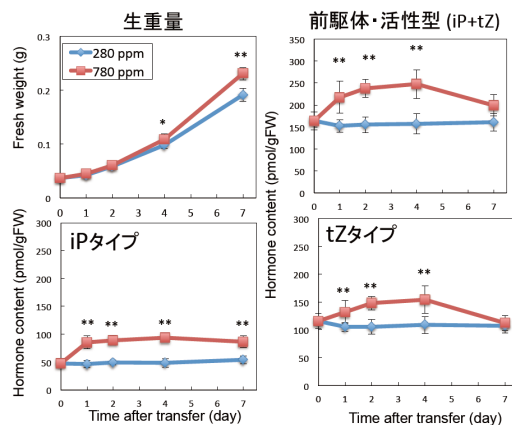


図1 高 CO<sub>2</sub> 処理による地上部生重量とサイトカニン内生量(iPタイプ、tZタイプ)の経時的変化

サイトカニンの生合成に関わる遺伝子である、IPTとCYP735Aの遺伝子機能欠損変異体(それぞれ*ipt357*, *cyp735a1a2*)を用いて、高 CO<sub>2</sub> 処理による成長応答を調べたところ、*ipt357* および *cyp735a1a2* では、成長促進が有意に抑えられるとともに(図2)、tZ型サイトカニン内生量増加もみられなくなった。以上のことは、高 CO<sub>2</sub> 条件への形態的応答のシグナルの1つとして、IPTとCYP735Aを介したtZの合成が関わっていることを強く示唆している。

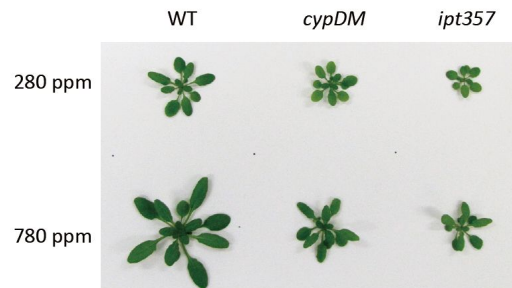


図2 サイトカニン生合成変異体における高 CO<sub>2</sub> による成長促進の抑制 WT:野生型, *cypDM*: *cyp735a1a2*

地上部の成長制御への tZ の役割を深く理解するために、CYP735A 遺伝子の機能解析と、*cyp735a1a2* 二重変異体の表現型解析をさらに進めた。その結果、CYP735A 遺伝子は根で

主に発現するが、*cyp735a1a2*では茎頂分裂組織のサイズや花茎の径が小さくなるのに対し、根の成長にはほとんど影響が出ないことを明らかにした。また、野生型と*cyp735a1a2*との接ぎ木実験から、地下部から地上部に輸送される tZ 型サイトカイニンが地上部の成長をコントロールしていることを明らかにした。*cyp735a1a2*ではサイトカイニンの内生総量には違いがないことから、サイトカイニン作用の調節には、従来の理解である量的な調節に加え、側鎖修飾による質的な調節機構が存在することを明らかにした。

*IPT*遺伝子ファミリーと *CYP735A1*, *A2*の中で、高 CO<sub>2</sub> に応答し発現が変化するものを調べたところ、*IPT3* 遺伝子と *CYP735A2* 遺伝子の発現が有意に上昇していた。これらの遺伝子発現は、糖処理でも発現が増加したが、光合成電子伝達系の阻害剤処理でその上昇が強く抑えられた。以上の結果から、CO<sub>2</sub>濃度変化に対する tZ 型サイトカイニンの生合成調節は *IPT3*と *CYP735A2*によって主に行なわれており、その発現誘導は光合成由来の糖に依存していることが示唆された。*CYP735A2*は根で発現する遺伝子であることから、CO<sub>2</sub>濃度上昇による光合成産物の地上部から根への糖転流上昇が、根での tZ 合成を活性化させていると考えられた。

## (2) イネのサイトカイニン生合成酵素遺伝子の解析

イネの幼苗をもちいて、窒素栄養に対する植物ホルモン内生量の変動の解析したところ、サイトカイニンの内生量が窒素栄養に応答して増加した。シロイヌナズナでは硝酸イオン投与でのみサイトカイニン内生量の増加がみられるが、イネでは硝酸イオンのみならず、アンモニウム投与でも増加した。サイトカイニンの生合成に関わる *IPT* 遺伝子ファミリーの発現様式を調べたところ、*OsIPT4*, *5*, *7*, *8*が発現誘導を受けた。さらに阻害剤などを用いて検討した結果、見かけ上硝酸イオンやアンモニアで起こる発現誘導は、グルタミンもしくはその下流の代謝産物がシグナルとして働いていることが明らかとなった。

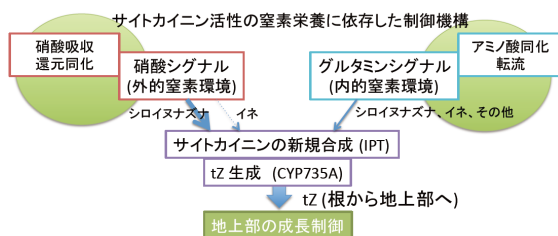


図2 サイトカイニン活性の窒素栄養に応答した2つの制御機構

シロイヌナズナの窒素応答型 *IPT* (*IPT3*)は硝酸特異的な応答をされると考えられてきたが、イネで見いだされたグルタミン代謝シグナルによる制御も保存されていることが明らかになった。一方、イネでは硝酸特異的

な応答は全く見られなかった。以上の結果は、窒素栄養に応答したサイトカイニン生合成調節は、外環境(硝酸イオン)と内環境(グルタミン代謝)の複数の因子によって制御されており、その植物種によって両制御の占めるウェイトが異なることを示している(図3)。

## 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 15件)

Ko, D., Kang, J., Kiba, T., Park, J., Kojima, M., Do, J., Kim, K.Y., Kwon, M., Endler, A., Song, W.Y., Martinoia, E., Sakakibara, H. and Lee, Y. (2014) Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of National Academy of Science U.S.A.* 111: 7150-7155 (2014). [査読有]

DOI: 10.1073/pnas.1321519111

Hachiya, T. Sugiura, D., Kojima, M., Sato, S., Yanagisawa, S., Sakakibara, H., Terashima, I., and Noguchi, K. (2014) High CO<sub>2</sub> triggers preferential root growth of *Arabidopsis thaliana* via two distinct systems under low pH and low N stresses. *Plant and Cell Physiology* 55: 269-280. [査読有]

DOI: 10.1093/pcp/pcu001

Kamada-Nobusada, T., Makita, N., Kojima, M. and Sakakibara, H. (2013) Nitrogen-dependent regulation of *de novo* cytokinin biosynthesis in rice: the role of glutamine metabolism as an additional signal. *Plant and Cell Physiology* 54: 1881-1893. [査読有]

DOI: 10.1093/pcp/pct127

Kiba, T., Takei, K., Kojima, M. and Sakakibara, H. (2013) Side-chain modification of cytokinins control shoot growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 27: 452-461. [査読有]

DOI: 10.1016/j.devcel.2013.10.004

Kudo, T., Akiyama, K., Kojima, M., Makita, N., Sakurai, T. and Sakakibara H. (2013) UniVIO: A multiple omics database with hormone and transcriptome data from rice. *Plant and Cell Physiology* 54: e9. [査読有]

DOI: 10.1093/pcp/pct003

Tokunaga, H., Kojima, M., Kuroha, T., Ishida, T., Sugimoto, K., Kiba, T. and Sakakibara, H. (2012) Arabidopsis lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the

LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant Journal* 69: 355-365. [査読有]  
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04795.x  
Kiba, T., Feria-Bourrellier, A.-B., Lafouge, F., Lezhneva, L., Boutet-Mercey, S., Orsel, M., Bréhaut, V., Miller, A., Daniel-Vedele, F., Sakakibara, H. and Krapp, A. (2012) The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell* 24: 245-258. [査読有]  
DOI: 10.1105/tpc.111.092221  
Sakamoto, H., Sakata, K., Kusumi, K., Kojima, M., Sakakibara, H. and Iba, K. (2012) Interaction between a plasma membrane-localized ankyrin-repeat protein ITN1 and a nuclear protein RTV1. *Biochemistry Biophysics Research Communication* 423: 392-397. [査読有]  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.05.136  
Kudo, T., Makita, N., Kojima, M., Tokunaga, H. and Sakakibara, H. (2012) Cytokinin activity of *cis*-zeatin and phenotypic alterations induced by over-expression of putative *cis*-zeatin-*O*-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiology* 160: 319-331. [査読有]  
DOI: 10.1104/pp.112.196733  
Hakata, M., Kuroda, M., Miyashita, T., Yamaguchi, T., Kojima, M., Sakakibara, H., Mitsui, T. and Yamakawa, H. (2012) Suppression of  $\alpha$ -amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature. *Plant Biotechnology Journal* 10: 1110-1117. [査読有]  
DOI: 10.1111/j.1467-7652.2012.00741.x  
Kiba, T., Kudo, T., Kojima, M. and Sakakibara, H. (2011) Hormonal control of nitrogen acquisition: Roles of auxin, abscisic acid and cytokinin. *Journal of Experimental Botany* 62: 1399-1409. [査読有]  
DOI: 10.1093/jxb/erq410  
Bishopp, A., Lehesranta, S., Vatén, A., Help, H., El-Showk, S., Scheres, B., Helariutta, K., Mähönen, A. P., Sakakibara, H. and Helariutta, Y. (2011) Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Current Biology* 21: 927-932. [査読有]

DOI: 10.1016/j.cub.2011.04.049  
Monda, K., Negi, J., Iio, A., Kusumi, K., Kojima, M., Hashimoto, M., Sakakibara, H. and Iba, K. (2011) Environmental regulation of stomatal response in the *Arabidopsis* Cvi-0 ecotype. *Planta* 234: 555-563. [査読有]  
DOI: 10.1007/s00425-011-1424-x  
Lomin, S. N., Yonekura-Sakakibara, K., Romanov, G. A. and Sakakibara, H. (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *Journal of Experimental Botany* 62: 5149-5159. [査読有]  
DOI: 10.1093/jxb/err220  
Kudo, T., Kiba, T. and Sakakibara, H. (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinin. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 53-60. [査読有]  
DOI: 10.1111/j.1744-7909.2010.00898.x

[学会発表](計 10件)

榎原均 窒素栄養に応答したサイトカイニン生合成調節機構は複数存在する。第55回日本植物生理学会年会シンポジウム, 2014/3/18, 富山大学。

Sakakibara, H. Dual regulation of *de novo* cytokinin biosynthesis in response to nitrogen nutrition: the role of glutamine metabolism as an additional signal. Nitrogen 2013, 2013/11/19, Puerto Varas, Chile.

Sakakibara, H. Regulation of plant growth and development via fine control of cytokinin activity. 21th International Conference on Plant Growth Substances, 2013/6/21, Shanghai, China.

Sakakibara, H. Dual regulation of *de novo* cytokinin biosynthesis in response to nitrogen nutrition. 21th International Conference on Plant Growth Substances, 2013/6/19, Shanghai, China.

Sakakibara, H. Regulation of plant development via fine control of cytokinin activity. 10th International Congress on Plant Molecular Biology, 2012/10/23, Jeju, Korea.

Sakakibara, H. How the LOG-dependent cytokinin activation is important for plant growth and development? 3rd International symposium "Intracellular Signaling And Bioactive Molecules Design"

(National Academy of Science of Ukraine), 2012/9/18, Lviv, Ukraine.  
Sakakibara, H. Structural variation of cytokinin and its biological importance. International Symposium on Plant Productivity, 2010/10/26, Peterborough, Canada.

榊原均 高CO<sub>2</sub>環境への馴化過程における植物ホルモンの役割. 第84回日本生化学会大会シンポジウム, 2011/9/21, 京都.

Sakakibara, H. Nitrogen-dependent regulation of cytokinin metabolism. Nitrogen 2010, 2010/7/28, Inuyama, Japan.

Sakakibara, H. Regulation of cytokinin action in plants: Biological importance of side-chain variation. 20th International Conference on Plant Growth Substances, 2010/6/28, Taragona, Spain.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.csrs.riken.jp/jp/labs/ppsrg/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榊原 均 (SAKAKIBARA HITOSHI)  
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学  
研究センター・グループディレクター  
研究者番号: 20242852

### (2) 研究分担者

木羽 隆敏 (KIBA TAKATOSHI)  
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学  
研究センター・研究員  
研究者番号: 20532097

### (3) 連携研究者

信定 知江 (KAMADA-NOBUSADA TOMOE)  
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学  
研究センター・研究員  
研究者番号: 90390690

### (4) 研究協力者

小嶋美紀子 (KOJIMA MIKIKO)  
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学  
研究センター・技師