

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14674

研究課題名(和文) イネの葉維管束組織におけるグルタミン酸合成統御を介したイネ白葉枯病防御の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of rice defense against the bacterial leaf blight disease via control of glutamate synthesis in the leaf vasculature

研究代表者

早川 俊彦 (HAYAKAWA, Toshihiko)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60261492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：窒素栄養は、植物の多量必須栄養素であり、その生育や生産性を支配する。イネにおいて、グルタミン応答的遺伝子発現を介したグルタミン酸合成制御は窒素利用に重要である。また、グルタミン酸合成は、イネ白葉枯病の発症とも密接に係わることが示唆されている。

本研究結果として、微生物グルタミンセンサーのグルタミン結合ACTドメインに相同なドメインを有するイネACT-domain repeat protein 9 (OsACR9)が、イネにおけるグルタミン酸合成関連酵素遺伝子のグルタミン応答的発現に係わること及び窒素・炭素代謝に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nitrogen nutrition is an essential macronutrient required in quantity for plant growth and productivity. The regulation of glutamate biosynthesis via glutamine-responsive gene expression is important for nitrogen use in rice. It has also been suggested that glutamate biosynthesis in rice may be linked to the pathogenesis of the bacterial leaf blight disease. Results of this study suggested that the ACT-domain repeat protein 9 (OsACR9), which is composed of domains having homology with the glutamine-binding ACT domains of bacterial glutamine sensors, is associated with glutamine-responsive gene expression of the enzyme related to glutamate biosynthesis and important for nitrogen and carbon metabolisms in rice.

研究分野：植物分子栄養学

キーワード：遺伝子 植物 生理学 病理学 発現制御

1. 研究開始当初の背景

イネは、日本・東アジアの基幹穀物である。水田栽培イネの生育・生産性は、根から導管を介して地上部に輸送される NH_4^+ 同化由来窒素と老化器官から篩管を介して若い葉・穎果へ輸送される転流窒素の利用性に大きく依存する。グルタミンは、この輸送窒素の主体である。我々は、若い葉身・穎果の維管束柔細胞群での移入グルタミンの主要アミノ酸のグルタミン酸への変換を、グルタミン応答的に発現する NADH-グルタミン酸合成酵素 1 (NADH-GOGAT1) が担うことを示した(引用文献)。さらに、イネのグルタミン情報感知因子候補としての、微生物グルタミンセンサー (GlnD) のグルタミン結合ドメインに相同なドメイン (ACT ドメイン) を有する ACT-domain repeat protein 9 (*OsACR9*) が、NADH-GOGAT1 発現維管束細胞の核に主に局在することを示した(引用文献)。また、*OsACR9* 相互作用因子候補として、シロイヌナズナの開花制御(引用文献)や生物的(病原菌)・非生物的(低温・乾燥)ストレス適応制御(引用文献)に関わる転写活性化因子 Vascular Plant One-Zinc Finger1/2 (*VOZ1* と *VOZ2*) のイネホモログ *OsVOZ2* を単離した。一方、イネ白葉枯病は、深刻なイネ生産阻害要因であり、葉水孔・傷口侵入した同病菌 (*Xoo: Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) が導管で増殖し、葉枯れと稔実阻害を発症する。*Xoo* 菌は、III 型分泌装置により、エフェクタータンパク質を宿主細胞に注入し、防御応答阻害する。同菌のイネ葉病害誘導には、エフェクター *XopN* と *OsVOZ2* の相互作用(引用文献)や維管束組織グルタミン酸濃度が重要であり(引用文献)、イネ葉維管束グルタミン酸生合成統御系とイネ白葉枯病の密接な関係が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、イネの生育・生産性に重要な葉維管束組織グルタミン酸生合成統御系でのグルタミン情報感知候補 *OsACR9* とその相互作用候補かつイネ白葉枯病の発症に関わる転写因子 *OsVOZ2* の個別・連携機能を解明し、イネ白葉枯病防御に関わる窒素代謝調節モデルの提案を目指した。

3. 研究の方法

(1) 植物細胞内での *OsACR9* と *OsVOZ2* の相互作用解析:

タバコ葉での一過的共発現後の蛍光タンパク質再構成 (BiFC) 法・共沈降法解析により、*OsACR9* と *OsVOZ2* の植物細胞内での相互作用を解析した。蛍光タンパク質の観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (正立型 C1 plus, Nikon Instech Co. Ltd.) を用いた。

(2) 植物細胞内での *OsVOZ2* の細胞内動態と消長の解析:

タバコ葉における一過的発現系での蛍光

タンパク質標識 *OsVOZ2* の光褪色後蛍光回復 (FRAP) 法解析により、サイトゾル・核間移行と核内分解の検討を試みた。

(3) *OsACR9* と *OsVOZ2* の各遺伝子の破壊イネの探索:

内在性レトロトランスポゾン *Tos17* 挿入遺伝子破壊イネ (日本晴) 三次元選抜遺伝子ライブラリー [農業生物資源研究所 (NIAS) の宮尾安藝雄博士と廣近洋彦博士から分譲] を用いて、上記遺伝子破壊イネを探索した。

(4) *OsACR9* 発現抑制イネにおけるグルタミン応答性の窒素代謝系・関連炭素代謝系酵素群遺伝子の発現と窒素利用機能・バイオマス生産の解析:

構成的に高発現させるトウモロコシユビキチン 1 (*Ubi1*) プロモーターの制御下、RNA 干渉 (RNAi) のトリガーとして *OsACR9* cDNA のストップコドンを含む特異的 3' -非翻訳領域配列が二本鎖を形成するヘアピン型 RNA をイネに発現させるキメラ遺伝子をアグロバクテリア法でイネ (日本晴) に導入した。*OsACR9* 発現抑制効果の高い組換えイネ後代系統を、分けつ未抽出葉における、RNAi 遺伝子発現の判定量的 RT-PCR 解析と *OsACR9* タンパク質の特異抗体を用いたウエスタンブロット解析にて選抜した。これら自家交配後代と日本晴の根や葉身を解析試料とした。

窒素渇渇処理後に、高濃度グルタミンを短時間供与した幼植物の根における、NADH-GOGAT1 遺伝子を含めたグルタミン応答性遺伝子群の発現を定量的 RT-PCR 解析した。

播種後より、単独の窒素源として至適濃度のグルタミンを含む水耕液で長期間栽培した幼植物の根と地上部の長さ、乾燥重、全窒素量及び全炭素量を測定した。全窒素・全炭素量測定には、元素分析装置 (FLASH2000, ThermoFisher Scientific) を用いた。

4. 研究成果

本研究では、イネ葉維管束組織グルタミン酸生合成統御系でのグルタミン情報感知候補 *OsACR9* とその相互作用候補因子かつイネ白葉枯病の発症に関わる *OsVOZ2* の個別・連携機能解析を主に行った。

(1) 植物細胞内での *OsACR9* と *OsVOZ2* (*OsVOZ2;1* と *OsVOZ2;2*) の相互作用解析

構成的発現性のカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター制御下で *OsACR9*-緑色蛍光タンパク質 (sGFP) と *OsVOZ2*-赤色蛍光タンパク質 (mRFP) のキメラタンパク質遺伝子を、粒子銃法にてタバコ葉に導入し、一過的に発現させる実験系を構築した。タバコ葉で一過的発現蓄積させた *OsACR9*-sGFP と *OsVOZ2;2*-mRFP は、サイトゾルと核に共局在した。

タバコ葉での一過的導入発現系を用いた BiFC 解析では、CaMV35S プロモーター制御下

の OsACR9-N 末端側分割緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 融合タンパク質遺伝子と OsVOZ2;2-C 末端側分割 EGFP 融合タンパク質遺伝子を共発現させた場合のみ、微弱な再構成 EGFP 蛍光が観察された。これより、植物細胞内での OsACR9 と OsVOZ2;2 の相互作用が確認された。

アグロバクテリア浸潤法により、タバコ葉で OsACR9-His タグと OsVOZ2;2-FLAG タグの組換えタンパク質の遺伝子を CaMV 35S プロモーター制御下で一過的に個別・共導入発現する実験系を構築した。各組換えタンパク質を単独で発現させた葉の抽出物中には、各組換えタンパク質の推定分子量に相当するポリペプチドが特異的に検出された。しかし、OsACR9-His と OsVOZ2;2-FLAG を共発現させた共沈降法解析では、各融合タンパク質の推定分子量よりも低分子のポリペプチドが特異的に検出された。シロイヌナズナでは、VOZ のサイトゾルから核内への速やかな移行とプロテアソーム系による分解が生ずるので (引用文献 と)、OsACR9 と OsVOZ2;2 も相互作用後に分解されている可能性が考えられた。

(2) 植物細胞内での OsVOZ2 の細胞内動態と消長の解析

上記のように CaMV35S プロモーター制御下 OsVOZ2-mRFP キメラタンパク質遺伝子を、粒子銃法にてタバコ葉に導入し、一過的に発現させる実験系を構築したが、FRAP 法による植物細胞内での OsVOZ2 の細胞内動態と消長の解析にはいたらなかった。

(3) OsACR9 と OsVOZ2 の各遺伝子破壊イネの探索

OsACR9 と OsVOZ2 の遺伝子破壊イネ候補の Tos17 挿入変異体を、三次元ライブラリースクリーニングしたが、変異体は検索できなかった。

(4) OsACR9 発現抑制イネにおけるグルタミン応答性の窒素代謝系・関連炭素代謝系酵素群遺伝子の発現と窒素利用機能・バイオマス生産の解析

構成的強発現性 *Ubi1* プロモーター制御下の OsACR9 の RNAi 法遺伝子を導入した形質転換イネ自家交配後代 (T2) において、分けつ未抽出葉での RNAi 遺伝子発現と顕著な OsACR9 タンパク質減少が認められた独立 2 系統を選抜した。

NH₄⁺ 供与されたイネでは、根で、サイトゾル型グルタミン合成酵素 1;2 (GS1;2) と NADH-GOGAT1 の共役酵素反応で、吸収 NH₄⁺ がグルタミンやグルタミン酸に初期同化され (引用文献 と)、これらの同化アミノ酸が、導管を通じて、地上部へと長距離輸送される。そこで、まず、RNAi 法による OsACR9 発現抑制イネ系統の自家交配 T3 世代の幼植物の根において、OsACR9 のグルタミン情報伝達系とグルタミン酸生合成系への関連性を検討し

た。

NH₄⁺ またはグルタミンを短期供与した OsACR9 発現抑制イネ幼植物の根では、グルタミン応答的に発現し、かつ、NH₄⁺ 初期同化系の NADH-GOGAT1 反応への炭素骨格基質の供給に重要な酵素遺伝子の発現量が、野生型よりも著減した。OsACR9 発現抑制は、NH₄⁺ 供与下のグルタミン応答性 NADH-GOGAT1 遺伝子発現には、影響を与えなかった。この結果は、イネにおいて、グルタミン情報伝達系が分岐している可能性を示唆した。

さらに、至適濃度のグルタミンを単独の窒素源として、長期供与した OsACR9 発現抑制イネ幼植物では、野生型と比較して、植物体の生長が阻害された。また、OsACR9 発現抑制イネ幼植物では、乾燥重と窒素・炭素含量が、根で著減し、地上部でも減少傾向を示した。

これらの結果は、イネの幼植物根において、OsACR9 が、NH₄⁺ 初期同化へ炭素骨格基質を供給する酵素のグルタミン応答的遺伝子発現制御を介してグルタミン酸生合成に関与しえることを示し、かつ、窒素・炭素代謝に重要であることを示唆した。今後、OsACR9 発現抑制イネ系統を用いて、若い未成熟葉身維管束での転流グルタミンを基質および情報伝達因子としたグルタミン酸生合成制御に関する解析を行う予定である。また、OsVOZ2 が制御する可能性のあるイネグルタミン応答性遺伝子も広範に探索する必要があると考える。

< 引用文献 >

Tamura, W., Hidaka, Y., Tabuchi, M., Kojima, S., Hayakawa, T., Sato, T., Obara, M., Kojima, M., Sakakibara, H., Yamaya, T., Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants, *Amino Acids*, 39 巻, 2010, 1003-1012

Kudo, K., Kawai, A., Yamaya, T., Hayakawa, T., Cellular distribution of ACT domain repeat protein 9, a nuclear localizing protein, in rice (*Oryza sativa*), *Physiol. Plant.*, 133 巻, 2008, 167-179

Yasui, Y., Mukougawa, K., Uemoto, M., Yokofuji, A., Suzuri, R., Nishitani, A., Kohchi, T., The phytochrome-interacting vascular plant one-zinc finger1 and VOZ2 redundantly regulate flowering in Arabidopsis, *Plant Cell*, 24 巻, 2012, 3248-3263

Nakai, Y., Nakahira, Y., Sumida, H., Takebayashi, K., Nagasawa, Y., Yamasaki, K., Akiyama, M., Ohme-Takagi, M., Fujiwara, S., Shiina, T., Mitsuda, N., Fukusaki, E., Kubo, Y., Sato, M.H.,

Vascular plant one-zinc-finger protein 1/2 transcription factors regulate abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis, *Plant J.*, 73 巻、2013、761-775

Cheong, H., Kim, C.Y., Jeon, J.S., Lee, B.M., Sun Moon, J., Hwang, I., *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* type III effector XopN targets OsVQZ2 and a putative thiamine synthase as a virulence factor in rice, *PLoS One*, 8 巻、2013、e73346、DOI: 10.1371/journal.pone.0073346

Pandey, A., Ray, S.K., Sonti, R.V., Rajeshwari, R., *gltB/D* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are virulence deficient, *Curr. Microbiol.* 68 巻、2014、105-112

Funayama, K., Kojima, S., Tabuchi-Kobayashi, M., Sawa, Y., Nakayama, Y., Hayakawa, T., Yamaya, T., Cytosolic glutamine synthetase1;2 is responsible for the primary assimilation of ammonium in rice roots, *Plant Cell Physiol.*, 54 巻、2013、934-943

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5件)

大橋美和、石山敬貴、小島創一、小嶋美紀子、榊原均、山谷知行、早川俊彦、Lack of cytosolic glutamine synthetase1;2 activity reduces nitrogen-dependent biosynthesis of cytokinin required for axillary bud outgrowth in rice seedlings, *Plant and Cell Physiology*, 査読有、印刷中、2017、DOI: 10.1093/pcp/pcx022

矢吹有唯、大橋美和、今川富美、石山敬貴、Marcel Pascal Beier、小西範幸、梅津(大橋)俊子、早川俊彦、山谷知行、小島一、A temporal and spatial contribution of asparaginase to asparagine catabolism during development of rice grains, *RICE*, 査読有、10 巻、2017、1-10、DOI: 10.1186/s12284-017-0143-8

大橋美和、小島創一、早川俊彦、コメの生産性を規定するアンモニウム同化系酵素の新規な役割。イネにおける窒素代謝に依存した分けつの成長制御、化学と生物、査読有、54 巻、2016、867-868、URL: <https://katosei.jsbba.or.jp/index.php?aid=696>

高野順平、Kuo-Chen Yeh、河内美樹、早川俊彦、小山博之、時澤睦朋、小林佑理子、神谷岳洋、三輪京子、「Mineral transport and sensing in plants」, 4. 高濃度アンモニウム供給下の植物の根におけるアンモニウム吸収の負の制御、日本土壤肥料学雑誌、査読有、86 巻、2015、152-158、URL: http://ci.nii.ac.jp/vol_issue/nels/AN00195767/ISS0000515089_ja.html

大橋美和、石山敬貴、小島創一、小西範幸、中野健太郎、菅野圭一、早川俊彦、山谷知行、Asparagine synthetase1, but not asparagine synthetase2, is responsible for the biosynthesis of asparagine following the supply of ammonium to rice roots, *Plant and Cell Physiology*, 査読有、56 巻、2015、769-778、DOI: 10.1093/pcp/pcv005

[学会発表](計6件)

大橋美和、石山敬貴、小島創一、小西範幸、宮尾光恵、山谷知行、早川俊彦、サイトゾル型グルタミン合成酵素 1;2 を欠損したイネ変異体の分けつの減少はアスパラギンよりもグルタミンの利用可能量の減少に起因する、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 17 日、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

Marcel Pascal Beier、山中剛、富田成美、江崎正隆、早川俊彦、The protein kinase ACTPK1 down-modulates the high-affinity ammonium uptake of rice roots under high ammonium supply、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 17 日、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

小西範幸、石山敬貴、菅野圭一、早川俊彦、山谷知行、小島創一、シロイヌナズナの根におけるアンモニウムの初期同化、第 45 回根研究集会、2016 年 9 月 30 日~2016 年 10 月 1 日、岡山大学(岡山県・倉敷市)

Marcel Pascal Beier、石澤仁、吉田喜紀、小島創一、早川俊彦、OsACTPK1 down-modulates the high-affinity NH₄⁺ uptake of rice roots under high NH₄⁺ supply、第 2 回植物の栄養研究会、2016 年 9 月 2 日~2016 年 9 月 3 日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

大橋美和、石山敬貴、草野都、福島敦史、小島創一、花田篤志、早川俊彦、瀬戸義哉、経塚淳子、山口信次郎、山谷知行、Severe reduction in the axillary bud outgrowth via metabolic disorder in seedlings of the rice mutant lacking cytosolic glutamine synthetase1;2、The Third

International Symposium on the Nitrogen
Nutrition of Plants (Nitrogen 2016)、
2016年8月24日、Montpellier (フラン
ス)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院農学研究科応用生命科学専
攻植物機能科学講座植物細胞生化学分野ホ
ームページ

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/cellbio/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 俊彦 (HAYAKAWA, Toshihiko)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：60261492

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

高橋 英樹 (TAKAHASHI, Hideki)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：20197164

小山 博之 (KOYAMA, Hiroyuki)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：90234921