

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07691

研究課題名(和文) 葉の窒素代謝ネットワークの転写後制御の解明とその応用

研究課題名(英文) Toward the understanding of the post-transcriptional regulation in leaf nitrogen assimilation

研究代表者

高林 厚史 (Takabayashi, Atsushi)

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：90546417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではACR11を介した植物の窒素同化経路の制御機構の解明を目指し研究を行った。ACR11欠損変異株を異なる生育条件で比較したところ、生育遅延の程度は異なるものの、欠損株特有の遊離アミノ酸プロファイルは比較的安定して観察された。このことから、生育遅延の表現型は二次的なものであると考えられた。次に、ACR11欠損株とASN2、AspAT3、GDH1/2との多重欠損株を調べた結果、ASN2は欠損株でGlnからAsnへの転換に寄与していた。一方、ACR11とGS/GOGAT以外の酵素との直接相互作用は見られなかった。現在はACR11が葉緑体からのアミノ酸輸送に関与する可能性について検証している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、植物の窒素同化経路のACR11を介した制御について研究した。複数のアプローチを用いた検証を行ったものの、GS/GOGAT以外の酵素とACR11との直接の相互作用を示すことはできなかった。そのため現在では、ACR11がGS/GOGAT以外の酵素を直接制御している可能性は低いと考えている。一方で、いくつかの実験結果から、ACR11はGS/GOGATサイクルを制御しているだけでなく、葉緑体から細胞質へのアミノ酸輸送に関与しているとの仮説にたどり着いた。現在はその検証を行っている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the regulatory mechanism of the nitrogen assimilation pathway via ACR11 in plants. First, the free amino acid profile specific to ACR11-deficient mutants was relatively stable even under different growing conditions. Since this difference cannot be explained only by the fact that ACR11 can regulate the enzymatic activity of GS and GOGAT, we generated double or triple mutants of ASN2, AspAT3, and GDH1/2 with ACR11 and examined their amino acid profiles, but found no significant changes. In addition, no direct interaction between ACR11 and enzymes other than GS/GOGAT was observed. Currently, we are testing the possibility of its involvement in amino acid transport from chloroplasts.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物の窒素同化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物にとって窒素は主要な栄養素であり、その代謝反応は合成・消費・貯蔵の各経路のバランスを保ちながら厳密に制御されている。しかし、その制御機構の全容は未解明である。

申請者は、新規な窒素代謝の制御因子である「ACR11」を見出した。これまでの研究から、ACR11は、1) 葉の窒素濃度の変化に応じて、葉の窒素同化(合成)を司る Fd-GOGAT の蓄積量を制御すること、さらに、2) アルギニン代謝経路(貯蔵)の制御も行うことが明らかになってきた。

2. 研究の目的

ACR11 はグルタミン酸合成酵素である GS、およびグルタミン酸合成酵素である GOGAT に結合し、量や活性を制御することが明らかになっていた。しかし、*acr11* 欠損変異株の遊離アミノ酸プロファイルを測定したところ、アルギニンの蓄積量が顕著に多いなど、それだけでは説明できないプロファイルが得られた。そのため、ACR11 は GS/GOGAT サイクル以外の窒素代謝経路も制御しているのではないかと考えた。

そこで、本研究では、ACR11 による未解明の植物の窒素代謝制御の全容を明らかにするため、その生理学的な意義の解明と分子レベルでの制御機構の解明を研究目的とした。

3. 研究の方法

本研究では初の研究計画を常に修正しながら進める必要があった。これは、既知の知見を基にした仮説に基づく実験を行った結果、葉緑体内のアミノ酸代謝経路の制御機構についての未解明な点が予想以上に多く、予想と大きく異なる結果が得られることが多かったことが主な理由である。結果的には以下のような手法で研究を進めることとなった。

3-1. ACR11 と相互作用するタンパク質の探索

ACR11 と相互作用するタンパク質を調べるため、ACR11 に FLAG タグを付与した植物体から葉緑体を単離し、浸透圧ショックで破裂させた後、Anti-FLAG カラムで精製した。そして、精製産物は Blue-Native-PAGE で分離し、質量分析を用いて ACR11 との相互作用因子を探索した。

3-2. *acr11* 欠損変異株と他のアミノ酸代謝遺伝子欠損変異株との多重変異株の作成

ACR11 が他のアミノ酸代謝経路を制御する可能性を検証するため、GDH1/GDH2、AspAT3、Asn2 との多重変異株を作成し、遊離アミノ酸プロファイルを調べた。

3-3. *acr11* 欠損変異株の遊離アミノ酸プロファイルの変動

acr11 欠損変異株に特有の遊離アミノ酸プロファイルの安定性を調べるため、日周サイクルや培地組成を変えた際の遊離アミノ酸プロファイルを調べた。

3-4. *acr11* 欠損変異株とアミノ酸輸送体の二重変異株の作成とトレーサー実験(進行中)

ACR11 がアミノ酸輸送を制御している可能性を検証するため、葉緑体のアミノ酸輸送体の欠損変異株との二重変異株を作成している。また *acr11* 欠損変異株における窒素代謝経路が野生株とどのように異なるかを調べるため、窒素の安定同位体を用いたトレーサー実験を準備中である。

4. 研究成果

4-1. ACR11 と相互作用するタンパク質の探索の結果

ACR11-FLAG 複合体を精製し、ウエスタン解析を行ったところ、ACR11-Fd-GOGAT 複合体が major form であることが明らかになった (図 1)。また、ACR11 の 2 量体と単量体が検出された。ACR11 の 2 量体は ACR11 との homodimer に加えて、ACR12 質量との heterodimer 結果を含む可能性が示唆された。なお、質量分析の結果、Fd-GOGAT や ACR12 に加えて、アルギニン代謝経路の律速段階を司る酵素である NAGK が検出されたが、非特異的な結合である可能性が否定できなかった。

また、agroinfiltration を用いた Co-IP 実験においても、ACR11 と NAGK の相互作用は確認できなかった。さらに、NAGK の活性測定系に ACR11 を加えても、その効果は認められなかった。これらのことから、アルギニン代謝経路に ACR11 が直接関与しているかどうかは結論づけられなかった。

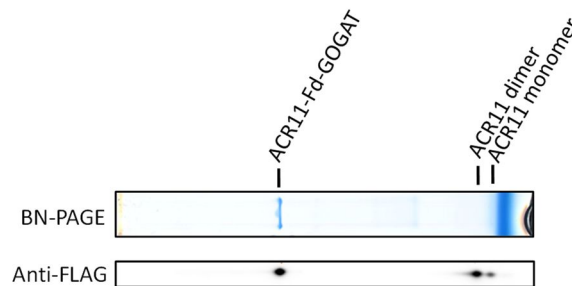


Fig.1 ACR11-FLAG複合体の精製と検出
ACR11複合体をAnti-FLAG抗体カラムで精製し、BN-PAGEで分離した。
Anti-FLAG抗体を用いたウエスタン解析から、ACR11はFd-GOGATとの
複合体に加え、二量体と単量体を形成することが明らかになった。

4-2. *acr11* 欠損変異株と他のアミノ酸代謝遺伝子欠損変異株との多重変異株の解析結果

acr11 × *asn2* 二重変異株では顕著に、Gln 量が増加し Asn 量が減少していた。この結果は、*acr11* 変異株において ASN2 が Gln から Asn への転換に機能していることを示しており、この酵素活性が *acr11* において Gln が高蓄積しない一因であると考えられた。しかし、*acr11* 変異株のバックグラウンドにおける ASN2 の欠損は Asp, Glu, Arg+Thr, Ala などのアミノ酸の蓄積にはほとんど影響しておらず、*acr11* 変異株の特徴的なアミノ酸プロファイルへの寄与は限定的であった。また、*acr11* × *aspat3* 二重変異株及び *acr11* × *gdh1/gdh2* 三重変異株のアミノ酸プロファイルはほぼ *acr11* と変わらなかった。これらの結果から、ACR11 の不在による AS や AspAT、GDH の活性化が *acr11* 変異株の特徴的なアミノ酸プロファイルの主要な要因ではないと考えている。現在は、ACR11 がアミノ酸輸送に関与している可能性を検証するため、3-4 の研究を進めている。

4-3. *acr11* 欠損変異株の遊離アミノ酸プロファイルの変動

連続光条件と長日条件で野生株だけでなく *acr11* 変異株の遊離アミノ酸プロファイルに大きな差は見られなかった。また、水耕栽培、寒天培地、土壌での比較においても、*acr11* 変異株のアミノ酸プロファイルの特徴は観測された。一方で、*acr11* 変異株の生育遅延に関しては栽培環境によってその程度が大きく変化したことから、生育遅延はアミノ酸プロファイルの変化と環境との相互作用による二次的な影響ではないかと考えられた。これらの実験結果を踏まえて現在は水耕栽培を利用した 3-4 のトレーサー実験の準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokono M, Takabayashi A, Kishimoto J, Fujita T, Iwai M, Murakami A, Akimoto S, Tanaka A.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 The PSI-PSII megacomplex in green plants.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcz026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Umetani I, Kunugi M, Yokono M, Takabayashi A, Tanaka A.	4. 巻 136
2. 論文標題 Evidence of the supercomplex organization of photosystem II and light-harvesting complexes in Nannochloropsis granulata.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Photosynth. Res.	6. 最初と最後の頁 49, 61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11120-017-0438-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yokono M, Umetani I, Takabayashi A, Akimoto S, Tanaka A.	4. 巻 139
2. 論文標題 Regulation of excitation energy in Nannochloropsis photosystem II	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photosynth. Res.	6. 最初と最後の頁 155, 161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11120-018-0510-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato Yukako, Yokono Makio, Akimoto Seiji, Takabayashi Atsushi, Tanaka Ayumi, Tanaka Ryouichi	4. 巻 58
2. 論文標題 Deficiency of the Stroma-Lamellar Protein LIL8/PSB33 Affects Energy Transfer Around PSI in Arabidopsis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2026 ~ 2039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcx124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高林厚史
2. 発表標題 ブルーネイティブ電気泳動を用いた光合成生物タンパク質複合体の網羅的解析
3. 学会等名 第68回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生物適応研究室 http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/plantadapt/
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----