

令和 2 年 5 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07705

研究課題名(和文)植物の窒素栄養恒常性維持の分子メカニズム

研究課題名(英文)The molecular mechanism underlying nitrogen homeostasis in plants

研究代表者

木羽 隆敏(Kiba, Takatoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：20532097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物が生命活動を安定的に維持するためには、外環境と体内の窒素栄養状態に応じて個体の窒素栄養恒常性を保つことが極めて重要である。窒素栄養恒常性は、窒素充足応答と窒素欠乏応答のバランスにより維持されるが、本研究では窒素欠乏応答の側面からアプローチし、これら2つの応答のバランス制御を司る転写因子群NIGT1sを同定した。またNIGT1sは窒素応答とリン応答を統御するハブ因子として働き、窒素-リン栄養バランスの最適化に関与することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、古くから研究されてきた植物の窒素栄養応答の仕組みについて新たな分子メカニズムを明らかにした。また植物が複数の栄養応答を統御するメカニズムも解明しており、学術的意義は大きいと考える。近年窒素やリン肥料の過剰な使用が、コスト高を招いているだけでなく深刻な環境問題をも引き起こしており、世界的に低インプット型持続的農業への移行が求められている。本研究成果は、野生種植物の高効率栄養獲得と利用のメカニズムの一端を明らかにしたものであり、低インプット型持続的農業に適した優良栽培作物創出につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Nitrogen homeostasis is crucial for plants to survive under fluctuating nutrient environments. It is maintained through the coordination of nitrogen-starvation and nitrogen-sufficiency responses. In this study, we identified a group of transcription factors, named NIGT1s, as a balancing factor between nitrogen-starvation and nitrogen-sufficiency responses. In addition, we revealed that NIGT1s act as a hub for integrating nitrogen and phosphorus signals to optimize nitrogen-phosphorus nutritional balance.

研究分野：植物栄養学

キーワード：窒素栄養 恒常性 窒素欠乏 転写制御

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

窒素栄養は、植物の成長・生産性を規定する最も重要な栄養の1つである。植物が利用できる土壌中の窒素源の量は、施肥、降雨、微生物などの作用により容易に激変する。したがって、植物がその生命活動を安定的に維持するためには、外環境の変動に応答しつつ、体内の窒素栄養バランスを取り、個体の窒素栄養恒常性を保つことが極めて重要となる。窒素栄養恒常性を保つための応答は、窒素が十分にあるときの「窒素充足(硝酸イオン応) 応答」と窒素が欠乏したときの「窒素欠乏応答」に大別される。これらの応答は、窒素栄養の吸収及び窒素同化系の制御だけでなく、他の栄養素とのバランスを保つためにほかの代謝系を制御したり、窒素栄養を転流したり、地上部と地下部のバイオマス比を変化させたりするなど、代謝から形態に及ぶドラステックなものである。しかしこれらの応答に関するこれまでの研究は、生理学・生態学的側面からのものが多く、分子メカニズムの理解はほとんど進んでいなかった。

我々は植物の窒素欠乏応答の制御分子メカニズムの研究を行い、窒素欠乏応答マーカー遺伝子の同定、さらに、このマーカー遺伝子の発現制御を司る転写因子群(シロイヌナズナ GARP 型転写因子群 NIGT1s)の同定に成功した。また NIGT1s が、窒素栄養恒常性制御に関わることを示唆する予備的知見を得ていた。

### 2. 研究の目的

本研究では NIGT1s の詳細な機能解析を以下3つの観点で行うことにより、窒素栄養恒常性維持分子メカニズムの解明を目指した。

- (1) NIGT1s による窒素欠乏応答制御
- (2) NIGT1s による窒素充足(硝酸イオン) 応答制御
- (3) NIGT1s による窒素とリン栄養応答統御

### 3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナには4つの NIGT1 遺伝子(NIGT1.1-1.4)が存在する。これらの発現パターン(組織・応答)を明らかにするため、それぞれのプロモーター:GUS/GFP 導入形質転換植物を作出した。また RT-qPCR 検出用のプライマーを設計した。これらを用いて様々な窒素条件で栽培した植物における NIGT1s の発現パターンを解析した。

4つの NIGT1 遺伝子のあいだで機能重複が考えられるため、最大4重変異体(nigtQ)を作出した。また NIGT1 過剰発現体と NIGT1-VP 過剰発現体も作出した。NIGT1-VP は、転写抑制因子である NIGT1 に強力な転写活性化ドメイン VP16 をタンデムに2つ融合することにより、転写活性化型に改変した人工転写因子である。これらにおいてトランスクリプトームや生理応答を解析することにより、NIGT1s の標的遺伝子と窒素欠乏応答関連の表現型(窒素不足応答性遺伝子発現、全窒素含量、硝酸イオン含量、アミノ酸含量、硝酸イオン吸収スピード)の解析を行った。

(2) 上記の解析より、NIGT1s は窒素充足(硝酸イオン) 応答制御に関わることを示唆されたため、過剰発現体と多重変異体の硝酸イオン応答に関する表現型(硝酸イオン誘導性遺伝子発現、硝酸イオン含量、硝酸イオン吸収スピード)を解析した。

(3) 上記の解析より、NIGT1s はリン欠乏応答制御に関わることを示唆されたため、過剰発現体と多重変異体のリン欠乏応答に関する表現型(リン欠乏応答性遺伝子発現、リン酸吸収能、リン酸蓄積量)を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 様々な窒素条件で栽培した植物を用いて、RT-qPCR 解析とプロモーター活性の解析を行い、NIGT1s は窒素充足条件において植物体全体で広く発現する遺伝子であることがわかった。また NIGT1s は硝酸シグナル応答のマスターレギュレーターである NLP 転写因子により直接発現誘導されることも明らかにした。NIGT1s は窒素充足条件や硝酸イオン補填条件において、植物体全体で機能することが示唆された。

NIGT1 過剰発現体、NIGT1-VP 過剰発現体、nigtQ のトランスクリプトームデータを組み合わせることにより、NIGT1s の標的遺伝子を根において419、地上部で310同定した(図1)。これらの遺伝子についてジーンオンロジー解析を行ったところ、「栄養欠乏」「栄養恒常性」「窒素」

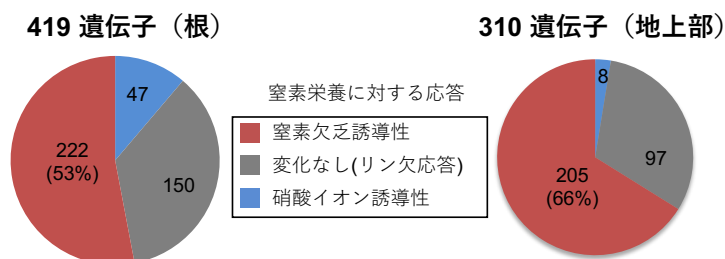


図1. NIGT1のダイレクトターゲット遺伝子の窒素栄養に対する応答による分類

など窒素欠乏応答関連のものが有意に濃縮されていた。またこれらの遺伝子を、その発現の窒素栄養に対する応答で分類したところ、窒素欠乏誘導性遺伝子が半分以上を占めていた（図1）。またその中には窒素欠乏応答に関わる既知の遺伝子が多く含まれていたことから、NIGT1sの主要な役割は窒素欠乏応答の抑制であることが示唆された。一方、NIGT1sの標的遺伝子の中には、硝酸イオン誘導性遺伝子やリン栄養欠乏応答遺伝子も有意に含まれていることから、硝酸イオン応答とリン栄養欠乏応答への関与も示唆された。

NIGT1sの窒素欠乏応答制御における役割について知見を得るため、NIGT1過剰発現体と *nigtQ* における窒素関連の生理的パラメーター解析を行った。NIGT1過剰発現体では全窒素含量、硝酸イオン含量、アミノ酸含量、硝酸イオン吸収スピードが低下していた。一方 *nigtQ* においては、これら全てのパラメーターの上昇が観察されたことから、NIGT1sは窒素栄養レベルを負に制御する働きがあることが示唆された。

以上の結果から、図2のようなNIGT1sによる窒素欠乏応答制御モデルを提唱した（Kiba et al. 2018）。NIGT1sは窒素充足条件において発現し、窒素欠乏誘導性遺伝子の発現を抑制することにより窒素欠乏応答を抑制する。一方窒素欠乏条件では発現せず、窒素欠乏応答の抑制が解除されるというモデルである。窒素充足条件において、使い切れないほどの窒素の吸収や貯蓄を抑制することによりエネルギーの浪費を防ぐためのメカニズムであると考えられる。

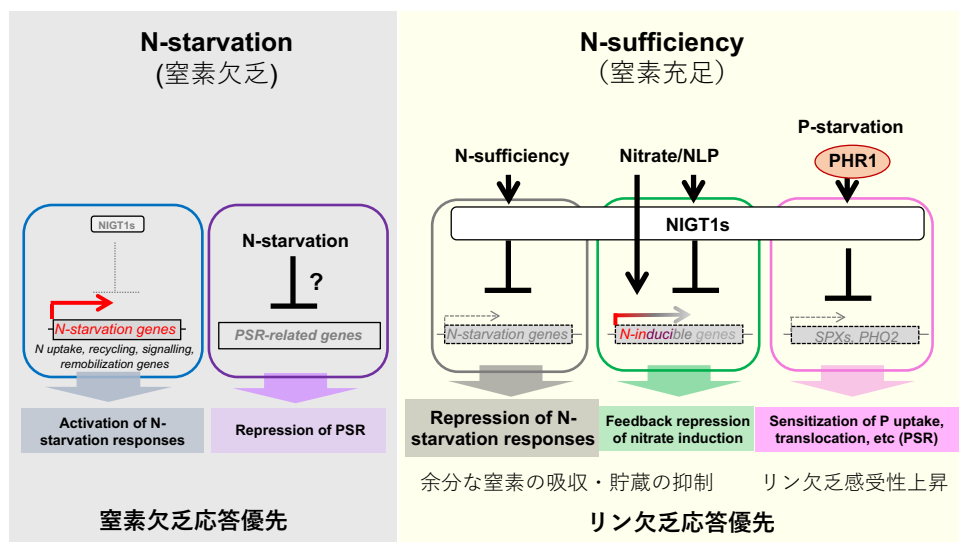


図2. NIGT1sによる窒素恒常性制御と窒素-リンバランス制御モデル

(2) NIGT1sの標的遺伝子リストの中に、硝酸イオン誘導性遺伝子が有意に含まれていたことから、硝酸イオン応答へのNIGT1sの関与が示唆された。*NIGT1s*過剰発現体と多重変異体において、硝酸イオン応答性遺伝子の発現プロファイルを詳細に調べた結果、NIGT1sは硝酸イオン応答性遺伝子の発現を（自身の発現も）直接負に制御することが明らかになった。*NIGT1s*は硝酸シグナル応答のマスターレギュレーターであるNLP転写因子により直接発現誘導されることから、NIGT1sは硝酸イオン応答のフィードバック抑制因子として働くことが示唆された（図2; Maeda et al. 2018）。この場合も、NIGT1sは過剰な窒素の吸収や貯蓄を抑制する働きを担っているといえよう。

(3) リン欠乏応答制御へのNIGT1sの関与が示唆されたため、NIGT1過剰発現体と多重変異体においてリン欠乏応答に関する表現型を解析した。その結果、NIGT1sはリン欠乏応答制御の負の制御因子（SPX、PHO2）の発現を抑制することにより、リン欠乏応答の感受性を上昇させる働きがあることがわかった。また *NIGT1s* の発現は、リン欠乏応答のマスターレギュレーターPHR1により直接制御され、リン欠乏条件において発現誘導されることを見出した。これらの結果は、NIGT1sが窒素充足条件において、特にリン欠乏だと強く発現し、窒素応答を抑制すると同時に、リン欠乏応答の感受性を上昇させる働きをもつことを示唆する（図2; Kiba et al. 2018; Maeda et al. 2018; Ueda et al. 2020）。窒素充足条件においては、リン欠乏に対する応答を優先する仕組みだと考えられる。

本研究において、NIGT1sは窒素充足条件において余剰な窒素の吸収や貯蓄を抑制する一方、リン欠乏応答の感受性を上昇させる働きをもつことを明らかにした。これらの成果は、植物の窒素/リン栄養状態に応じた窒素恒常性維持と窒素-リン栄養バランスの最適化の新たなメカニズムを提唱するものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Ueda, Y., Kiba, T., and Yanagisawa, S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Nitrate inducible NIGT1 proteins modulate phosphate uptake and starvation signaling via transcriptional regulation of SPX genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kiba, T., Takebayashi, Y., Kojima, M., and Sakakibara, H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Sugar-induced de novo cytokinin biosynthesis contributes to Arabidopsis growth under elevated CO <sub>2</sub>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44185-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida et al.	4. 巻 29
2. 論文標題 Genome sequence of <i>Striga asiatica</i> provides insight into the evolution of plant parasitism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3041-3052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.07.086	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 Toda, E., Koiso, N., Takebayashi, A., Ichikawa, M., Kiba, T., Osakabe, K., Osakabe, Y., Sakakibara, H., Kato, N., and Okamoto, T.	4. 巻 5
2. 論文標題 An efficient DNA- and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 363-368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-019-0386-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Y., Suzuki T., Sugiura D., Kiba T., Sakakibara H., Hachiya T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Shoot nitrate underlies a perception of nitrogen satiety to trigger local and systemic signaling cascades in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 56-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2018.1537643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Perez-Alonso M.M., Guerrero-Galan, C., Scholz, S.S., Kiba, T., Sakakibara, H., Ludwig-Muller, J., Krapp, A., Oelmuller, R., Vicente-Carbajosa, J., Pollmann, S.	4. 巻 54
2. 論文標題 Harnessing symbiotic plant-fungus interactions to unleash hidden forces from extreme plant ecosystems.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 137-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/eraa040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kiba, T., Inaba, J., Kudo, T., Ueda, N., Konishi, M., Mitsuda, N, Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Ohme-Takagi, M., Matsui, M., Yano, K., Yanagisawa, S., and Sakakibara, H.	4. 巻 30
2. 論文標題 Repression of nitrogen-starvation responses by members of the <i>Arabidopsis</i> GARP-type transcription factor NIGT1/HRS1 subfamily.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Cell	6. 最初と最後の頁 925-945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1105/tpc.17.00810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiba, T.	4. 巻 59
2. 論文標題 International Symposium on Long-Distance Signaling in Plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1697-1699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xu, Y., Prunet, N., Gan, E.-S., Wang, Y., Stewart, D., Wellmer, F., Huang, J., Yamaguchi, N., Tatsumi, Y., Kojima, M., Kiba, T., Sakakibara, H., Jack, T. P., Meyerowitz, E. M., and Ito, T.	4. 巻 37
2. 論文標題 SUPERMAN regulates floral whorl boundaries through control of auxin biosynthesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 e97499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.201797499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamaguchi, N., Huang, J., Tatsumi, Y., Abe, M., Sugano, S. S., Kojima, M., Takebayashi, Y., Kiba, T., Yokoyama, R., Nishitani, K., Sakakibara, H., and Ito, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Chromatin-mediated feed-forward auxin biosynthesis in floral meristem determinacy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Commun.	6. 最初と最後の頁 5290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07763-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toda, E., Koiso, N., Takebayashi, A., Ichikawa, M., Kiba, T., Osakabe, K., Osakabe, Y., Sakakibara, H., Kato, N. and Okamoto, T.	4. 巻 5
2. 論文標題 An efficient DNA- and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 363-368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-019-0386-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 -

1. 著者名 Maeda Yoshie, Konishi Mineko, Kiba Takatoshi, Sakuraba Yasuhito, Sawaki Naoya, Kurai Tomohiro, Ueda Yoshiaki, Sakakibara Hitoshi, Yanagisawa Shuichi	4. 巻 9
2. 論文標題 A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1038/s41467-018-03832-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Osugi Asami, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Ueda Nanae, Kiba Takatoshi, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Systemic transport of trans-zeatin and its precursor have differing roles in Arabidopsis shoots	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 17112 ~ 17112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/nplants.2017.112	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 -

1. 著者名 Spallek Thomas, Melnyk Charles W., Wakatake Takanori, Zhang Jing, Sakamoto Yuki, Kiba Takatoshi, Yoshida Satoko, Matsunaga Sachihiko, Sakakibara Hitoshi, Shirasu Ken	4. 巻 114
2. 論文標題 Interspecies hormonal control of host root morphology by parasitic plants	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 5283 ~ 5288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1073/pnas.1619078114	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 Pudasaini Ashutosh, Shim Jae Sung, Song Young Hun, Shi Hua, Kiba Takatoshi, Somers David E, Imaizumi Takato, Zoltowski Brian D	4. 巻 6
2. 論文標題 Kinetics of the LOV domain of ZEITLUPE determine its circadian function in Arabidopsis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.7554/eLife.21646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Takatoshi Kiba
2. 発表標題 Nitrogen starvation responses in plants
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Life Sciences and Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takatoshi Kiba, Hitoshi Sakakibara
2. 発表標題 A mechanism for xylem loading of cytokinin mediated by ABCG14
3. 学会等名 The International Plant Growth Substances Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takatoshi Kiba, Hitoshi Sakakibara
2. 発表標題 Metabolomic and Transcriptomic Analysis of Metabolic Pathways Regulated by Nitrogen Starvation Response Regulator AtNIGT1s
3. 学会等名 The 4th International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦上拓也、木羽隆敏、榊原均
2. 発表標題 Screening for the novel cytokinin transporter
3. 学会等名 Frontiers in plant environmental response research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本祐典、木羽隆敏、榊原均
2. 発表標題 Mechanism of ABCG14-mediated root-to-shoot cytokinin transport
3. 学会等名 Frontiers in plant environmental response research (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 木羽隆敏
2. 発表標題 窒素飢餓応答制御とリン飢餓応答制御のクロストーク
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takatoshi Kiba
2. 発表標題 Regulation of nitrogen acquisition under low availability and beyond
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takatoshi Kiba
2. 発表標題 Nitrogen starvation responses in Arabidopsis: transcriptional and metabolic regulations
3. 学会等名 Japan-Taiwan Plant Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田佳明, 木羽隆敏, 柳澤修一
2. 発表標題 シロイヌナズナにおいてNIGT1転写因子群は窒素条件依存的にリンシグナルを正に調節する
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸田絵梨香, 古磯成美, Tety Maryenti, 竹林有理佳, 市川雅子, 木羽隆敏, 刑部敬史, 刑部祐里子, 榊原均, 加藤紀夫, 岡本龍史
2. 発表標題 イネ受精卵を用いたDNAおよび選抜マーカーフリーなゲノム編集技術の確立と他作物種への応用
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神谷麻友、稲葉ジュン、竹林裕美子、小嶋美紀子、木羽隆敏、榊原均
2. 発表標題 Mechanism of ABCG14-mediated root-to-shoot cytokinin transport
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takatoshi Kiba
2. 発表標題 Regulation of nitrogen acquisition under low availability
3. 学会等名 Bilateral Closure Symposium of GDR1 Integrative Plant Biology Network Program (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takatoshi Kiba
2. 発表標題 Structural Variations of Long-Distance Translocated Cytokinins Control the Specificity of the Action in Shoot Growth and Development
3. 学会等名 XIX International Botanical Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学生命農学研究科植物情報分子研究室  
<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~ck/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----