

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570041
 研究課題名（和文） 植物の同化的硝酸還元と密接に関わる活性窒素ストレスの実態解明とその代謝制御
 研究課題名（英文） Dissecting the real nature of reactive nitrogen stress in plants possibly derived from assimilatory nitrate reduction and its metabolic regulation
 研究代表者
 坂本 敦（SAKAMOTO ATSUSHI）
 広島大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号：60270477

研究成果の概要：窒素同化（硝酸同化）は、光合成（炭酸同化）と並び独立栄養を営む植物に必須の代謝であるが、その過程で不可避免的に亜硝酸を生じる。亜硝酸は旧くから植物生理学や作物学において細胞毒と認識されてきたが、その毒性の本質や作用機序は未だ詳らかでない。亜硝酸の同化や細胞内輸送に欠陥がある変異体植物の解析から、硝酸同化の代謝中間体である亜硝酸から派生する活性窒素が、その毒性発現に関与する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：代謝性、一酸化窒素、ストレス傷害、亜硝酸毒性、亜硝酸還元、亜硝酸輸送、活性窒素、シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

植物が行う同化的硝酸還元（硝酸同化）は、核酸やタンパク質をはじめとして窒素原子を含む生体分子の生合成に先立つ必須の代謝プロセスである。無機窒素同化の主経路である硝酸同化のおもな場は緑葉であり、根から運ばれた硝酸（ NO_3^- ）は細胞質で亜硝酸（ NO_2^- ）に還元されたのちに葉緑体内に輸送され、そこでさらにアミノ酸の生合成基質であるアンモニアにまで還元される。

硝酸同化は植物の独立栄養性を支える最重要代謝の一つであるが、その代謝中間体である亜硝酸は旧くから細胞毒として知られている。一般に亜硝酸は植物の生理や分化・生長に対して阻害的に働き、作物生産量を低下させるため、その毒性の本質や作用機序の解明は、植物生理学や作物学における重要課題である。しかし、これまでのところ、これらの点について満足な植物生理学および植物生化学的説明はなされていない。

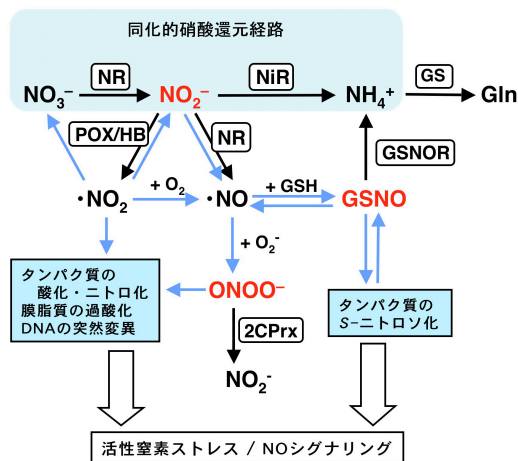


図1 同化的硝酸還元に関連した活性窒素の生成と消去の代謝モデル

他方、動植物において亜硝酸は、普遍的なシグナル伝達因子である一酸化窒素 (NO) の主要な生成基質の一つであることが近年明らかにされている。NO の普遍的生理調節機能の解明が進展するにつれ、その正負両面の作用を媒介する活性窒素分子種の生理的重要性が指摘されている。NO が付加したチオール基を有する S-ニトロソ化合物や二酸化窒素ラジカル ($\cdot\text{NO}_2$)、過酸化亜硝酸 (ONOO^-) など、生体内で生じた NO に由来する活性窒素種が有する高い反応性と分子修飾能は、これらの分子種が NO シグナリングに関与するだけでなく、その生成濃度や細胞の生理状態、組織・器官がおかれた環境条件などに応じて普遍的に細胞毒性をもたらすことを示している (活性窒素ストレス)。したがって、活性酸素と並び生物にとって「諸刃の剣」である活性窒素に対する代謝機能は、NO シグナル伝達系の制御のみならず、活性窒素ストレスに対する細胞防御や生理機能の保護の観点からも極めて重要と考えられる。

本研究課題に先立ち研究代表者は、植物における活性窒素代謝関連タンパク質を世界に先駆けて複数同定し、その研究成果をもとに、同化的硝酸還元とクロストークする活性窒素の生成と消去の植物代謝モデルを提示した (図1)。このモデルでは、同化的硝酸還元の代謝中間体である亜硝酸を基軸として、NO やその他の高反応性の活性窒素種が派生する。そこで、これらの活性分子種が有するストレス作用が、未だ詳らかにされていない亜硝酸毒性に密接に関係している可能性を鑑み、本研究課題に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、植物が行う硝酸同化の代謝中間体として不可避免的に生じる亜硝酸が NO の生成基質でもある点に着目し、亜硝酸の毒性発現メカニズムをその細胞内蓄積に端を発する活性窒素の生成と関連づけて解明することを目的とした。具体的には、亜硝酸をその生成の場である細胞質、或いは還元のある葉緑体においてそれぞれ蓄積する形質転換植物を作出し、その比較生化学的および比較分子生理学的解析から、亜硝酸毒性の本質に迫ることを目指した。

3. 研究の方法

亜硝酸を細胞質或いは葉緑体においてそれぞれ蓄積する形質転換植物として、葉緑体への亜硝酸輸送能または葉緑体における亜硝酸同化能に欠陥を生じた形質転換シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) を用いた。即ち、葉緑体包膜に結合する亜硝酸トランスポーター (Nitr) と葉緑体ストロマに局在する亜硝酸還元酵素 (NiR) の各遺伝子について (それぞれ *AtNitr*, *AtNiR*)、T-DNA 挿入突然変異株を種子ストックセンターから入手した。また、*AtNiR* については突然変異剤処理により得られた変異株の中から TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) 法によりミスセンス変異株の選抜を行うとともに、RNA 干渉法を用いてその発現抑制株を作出した。これらの形質転換株・突然変異株について、変異表現型の解析 (NiR 活性、亜硝酸蓄積量)、亜硝酸応答 (生長量)、活性窒素生成量 (S-ニトロソ化合物含量) などを比較調査した。

4. 研究成果

(1) まず、NiR の遺伝子機能破壊により、亜硝酸をその還元のある葉緑体に蓄積する形質転換シロイヌナズナの作出と同定を行った。当初は T-DNA 挿入突然変異株を利用する予定であったが、取得した形質転換ライン (SALK_046068) では T-DNA が *AtNiR* の 3' 非翻訳領域に挿入されており、NiR の発現レベルにはほとんど影響を与えていないことが判明した。このライン以外に入手可能な当該遺伝子のタグラインは存在しなかったため、TILLING 法によるミスセンス変異の同定と、RNA 干渉による発現抑制の二つの異なる戦略により、NiR 活性の低下に起因する高度亜硝酸蓄積変異株の単離を試みた。その結果、前者の方法により、NiR の酸化還元センターである 4Fe-4S クラスター結合領域近傍等にミスセンス変異を有する3つの異なる点突然変異体を同定した (D257N, L309F,

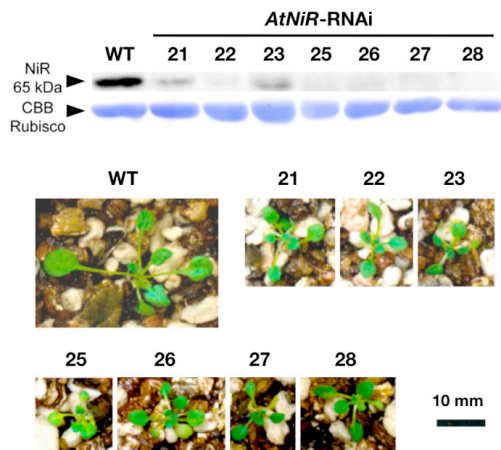


図2 *AtNiR* の発現抑制株に見られる亜硝酸毒性による生育障害

F362S)。しかし、何れの変異株も野生株と比較してタンパク質レベルでは有意な差はなく、また亜硝酸還元活性は低いものでも野生株の60%程度を保持していた。一方、RNA干渉法では様々なレベルでNiRタンパク質量を減少させた形質転換体を複数作出できた(図2)。これらの中には亜硝酸を高度に蓄積する株が存在した。

Nitrの遺伝子機能破壊株については、T-DNAの挿入により亜硝酸を蓄積することがすでに報告されている形質転換株を入手し(SALK_076121, SALK_076219)、解析に用いた。

(2) *AtNitr* または *AtNiR* の機能不全により、亜硝酸をその生成の場(細胞質)または還元代謝の場(葉緑体)でそれぞれ蓄積する2系統のシロイヌナズナ形質転換ラインを用い、それらの亜硝酸応答の比較生理学的解析を行った。野生株および2系統の形質転換ラインについて亜硝酸を含む栄養条件下での生育を比較したところ、*AtNiR* の機能抑制株(タンパク質レベルで野生株の30%以下)でより顕著な亜硝酸障害が発生する傾向が観察された(図2)。したがって、亜硝酸の蓄積は細胞質よりも葉緑体において顕著に毒性を発揮する可能性が示された。また、これらの形質転換体ではRNA干渉の程度に応じて葉組織の亜硝酸レベルが上昇するとともに、活性窒素生成のマーカであるS-ニトロソ化合物レベルも同時に増大していることを示唆する結果を得た。これらの観察結果は、葉緑体が活性窒素の主要な細胞内発生部位の一つであることを示す報告例とよく一致することから、亜硝酸から派生する活性窒素がその毒性発現に関与する可能性が示唆された。

(3) 亜硝酸の細胞内輸送は、その細胞内蓄積や毒性発現、NOなどの活性窒素種の生成などと密接に関係すると考えられる。そこでその細胞生物学的知見を得るために、Nitrの細胞内局在解析を進めた。*AtNitr* 遺伝子には5'末端の長さが異なる二つの転写産物の存在が示唆されたため、それぞれに対応するオープンリーディングフレームに緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を融合した発現ベクターを構築し、シロイヌナズナ葉でその一過発現を試みた。また、各融合遺伝子を導入した形質転換植物も作出した。これらについてGFP蛍光観察を行った結果、シロイヌナズナには葉緑体包膜のみならず、原形質膜にもターゲティングするNitrアイソフォームが存在することが示唆された。原形質膜における亜硝酸膜輸送系の存在意義は詳らかではないが、亜硝酸を細胞外に排出することでその毒性発現を防ぐこと、また植物組織におけるNO生成部位の一つであるアポプラストにその基質となる亜硝酸を供給する機能を担うことなどが推定される。

(4) 本研究は、研究代表者が提唱する同化的硝酸還元から分岐する活性窒素生成消去の代謝モデルに基づき、亜硝酸毒性がそれ自体に由来するというよりも、むしろ亜硝酸から派生する活性窒素のストレス作用に起因するという独自の考えのもとに着手された。本研究により、永らく植物生理学や作物学において認識されながら未だその作用機序について一定の見解が得られていない亜硝酸毒性について、同化的硝酸還元経路から派生する活性窒素が関与する可能性を示すことができた。今後は、葉緑体機能に対する亜硝酸毒性(活性窒素ストレス)の作用部位の詳細な解析を行う必要がある。また、亜硝酸毒性の本質が亜硝酸から派生する活性窒素のストレス作用であるならば、その毒性に対する防御機構として活性窒素代謝が機能しているはずなので、その遺伝学および生理学的検証を行うことも必要である。

シグナル伝達作用の解明が先行するなかで、NOや類縁活性窒素種のストレス因子としての実態解明は、その植物生理作用の包括的理解や、植物NOバイオロジーの推進において必要不可欠である。したがって、本研究はこれらの観点からも重要な基礎知見を提供するものである。また、応用的視点から本研究の成果は、亜硝酸毒性の抑制や硝酸同化の効率化を標的とした作物分子育種にその基本原理を提供することで、作物生産や硝酸態窒素汚染などの今世紀の植物科学に課せられた食糧や環境を巡る喫緊な課題の解決に向けて貢献するものと期待される。

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)

- ① Komei Kondo, Keizo Yamada, Ayami Nakagawa, Misa Takahashi, Hiromichi Morikawa and Atsushi Sakamoto. Molecular characterization of atmospheric NO₂-responsive germin-like proteins in azalea leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **377**: 857-861 (2008), 査読有, 機関リポジトリ公開アドレス: <http://ir.lib.hiroshima-u.ac.jp/00025972>
 - ② Suaad E. H. Adam, Jun Shigeto, Atsushi Sakamoto, Misa Takahashi and Hiromichi Morikawa. Atmospheric nitrogen dioxide at ambient levels stimulates growth and development of horticultural plants. *Botany* **86**: 213-217 (2008), 査読有
 - ③ Babiker M. A. Abdel-Banat, Suaad E. H. Adam, Misa Takahashi, Atsushi Sakamoto, Hirofumi Shoun and Hiromichi Morikawa. A fungal cytochrome P-450nor confers denitrifying ability to tobacco BY-2 cells. *Biotechnology* **7**: 250-257 (2008), 査読有
 - ④ Ayami Nakagawa, Saori Sakamoto, Misa Takahashi, Hiromichi Morikawa and Atsushi Sakamoto. The RNAi-mediated silencing of xanthine dehydrogenase impairs growth and fertility and accelerates leaf senescence in transgenic Arabidopsis plants. *Plant and Cell Physiology* **48**: 1484-1495 (2007), 査読有, 機関リポジトリ公開アドレス: <http://ir.lib.hiroshima-u.ac.jp/00021456>
 - ⑤ Misa Takahashi, Toshiyuki Matsubara, Atsushi Sakamoto and Hiromichi Morikawa. Uptake, assimilation and novel metabolism of nitrogen dioxide in plants. In: *Phytoremediation: Methods and Reviews (Methods in Biotechnology Volume 23)*: Neil Willey, ed.), pp. 109-118. Humana Press, Totowa, NJ, USA (2007), 査読無
- 〔学会発表〕(計 12 件)
ただし、演題に付した*印はポスター発表を示す。
- ① 西村 崇, 宮木洋一, 高橋美佐, 森川弘道, 島田裕士, 泉 俊輔, 坂本 敦. シュウ酸酸化活性を有するツツジ GLP を過剰発現するタバコ培養細胞の重金属感受性*. 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 21-23 日, 名古屋.
 - ② 渡邊俊介, 中川彩美, 島田裕士, 坂本 敦. 乾燥ストレス適応におけるシロイヌナズナ・キサントニン脱水素酵素の機能解析*. 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 21-23 日, 名古屋.
 - ③ 高橋美佐, 柏原俊一, 古橋孝将, 塚谷裕一, 坂本 敦, 森川弘道. 大気中窒素酸化物の植物バイタリゼーション遺伝子の解析. 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 21 日, 名古屋.
 - ④ 高橋美佐, Sueli Kohama, 重藤 潤, 長谷純宏, 田中 淳, 坂本 敦, 森川弘道. イオンビーム法で得たイタビ変異体における二酸化窒素の吸収と代謝*. 第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 20-22 日, 札幌.
 - ⑤ 高橋美佐, 重藤 潤, 浅田浩二, 坂本 敦, 森川弘道. PSII 酸素発生中心のストレス損傷の分子の実体について. 第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 22 日, 札幌.
 - ⑥ 中川彩美, 高橋美佐, 坂本 敦. プリン異化代謝の植物生理学的重要性. 第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 21 日, 札幌.
 - ⑦ 坂本 敦. 植物における活性窒素代謝. 第 49 回日本植物生理学会年会シンポジウム「植物科学における一酸化窒素 (NO) 研究の現状と未来」, 2008 年 3 月 20 日, 札幌 (招待講演).
 - ⑧ 西村 崇, 中川彩美, 高橋美佐, 森川弘道, 坂本 敦. Germin-like protein を過剰発現するタバコ培養細胞のシュウ酸含量とカドミウム感受性. 第 25 回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム, 2007 年 8 月 9 日, 千葉.
 - ⑨ 高橋美佐, 重藤 潤, 浅田浩二, 坂本 敦, 森川弘道. 外在性 NO_x による PSII 表在タンパク質の選択的優先的ニトロ化と酸素発生への影響. 第 25 回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム, 2007 年 8 月 9 日, 千葉.
 - ⑩ Suaad E. H. Adam, Misa Takahashi, Takamasa Furuhashi, Jun Shigeto, Atsushi Sakamoto and Hiromichi Morikawa. Plant vitalization effect of atmospheric nitrogen oxides: cross-species generality and organ specificity. 第 25 回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム, 2007 年 8 月 9 日, 千葉.
 - ⑪ 高橋美佐, Sueli Kohama, 重藤 潤, 坂本 敦, 長谷純宏, 田中 淳, 森川弘道. イオンビーム育種による高い二酸化窒素浄化能を持つイタビ植物の育成. 第 25 回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム, 2007 年 8 月 9 日, 千葉.

- ⑫ 中川彩美, 高橋美佐, 森川弘道, 坂本 敦,
植物の生理・成長におけるプリン異化代謝
の重要性, 第 25 回日本植物細胞分子生物
学会千葉大会・シンポジウム, 2007 年 8
月 8 日, 千葉.

[その他]

ホームページ

[http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/mpb/
index.html](http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/mpb/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 敦 (SAKAMOTO ATSUSHI)
広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 60270477

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者