

平成 21 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19870031

研究課題名（和文）エネルギー代謝補酵素による炭素及び窒素代謝制御の分子機構の解明

研究課題名（英文）Regulation mechanism of carbon and nitrogen metabolism by nicotinamide nucleotides

研究代表者

高橋 秀行（TAKAHASHI HIDEYUKI）

財団法人岩手生物工学研究センター・細胞工学研究部・主任研究員

研究者番号：00455247

研究成果の概要：エネルギー代謝補酵素（NAD(P)(H)）は、生物の様々な代謝過程を制御する重要な補酵素である。本研究では、炭素及び窒素代謝に注目し、NAD(P)(H)による代謝制御機構の解明を試みた。初めに、葉緑体内で NADP を合成する葉緑体局在型 NAD リン酸化酵素（NADK2）を高発現させ、NADP 量を増加させた形質転換体を解析した。代謝解析の結果、高発現体ではカルビンサイクルに属する代謝物がルビスコ活性と共に増加していた。さらに、グルタミンとグルタミン酸の蓄積量及び合成速度が増加しており、窒素代謝も促進されていることが明らかになった。また十分な窒素条件下では、野生型よりも良い生長が観察された。本高発現体では総 NAD(P)(H)量と酸化還元比は変化していないことから、NADP の絶対量が植物代謝の制御に重要であることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,310,000	393,000	1,703,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,640,000	393,000	3,033,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物生理・分子

キーワード：栄養学、植物代謝、炭素固定、窒素同化、バイオマス

## 1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素や硝酸イオン等の無機化合物の吸収と同化は、植物生長のエネルギー源としてだけでなく、植物の生産性や品質に大きく影響する因子であり、その利用効率の向上は、食品工業と農林水産業の振興には必須の課題である。さらに、二酸化炭素削減やエネルギーの安定供給への貢献が期待されている植物バイオマス研究においても、高生

産性植物の創出が求められている。一方で、炭素同化と窒素同化の包括的な制御機構については、未だ不明な点が多い。近年発展した代謝解析技術で代謝変動を精査することにより、炭素及び窒素同化効率を高める新たな理論の構築が可能である。

申請者は、NAD 代謝を改変した形質転換体の解析を通じて、エネルギー代謝補酵素（NAD(P)(H)）の変動による代謝調節につい

での研究を推進してきた。NAD 合成経路には NAD 合成酵素 (NADS)、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼ (NMNAT)、NAD リン酸化酵素 (NADK) の 3 種類の鍵酵素が存在しており、主にこれらの酵素が NAD(P)(H)量の調節を担っている。これまでの成果として、1) NAD(P)(H)の上昇がイネに耐病性を付与すること (Hayashi et al., 2005. PNAS)、2) シロイヌナズナの NADK2 が正常な光合成を行うために必須の酵素であること (Takahashi et al., 2006. Plant Cell Physiol.) さらに 3) 葉緑体局在型 NADK (NADK2) 高発現体の予備的な解析から、二酸化炭素の取り込み効率が上昇し、アミノ酸量も増加することを確認している。上記の研究で観察された現象から、NAD(P)(H)は炭素及び窒素同化の調節因子と考えられたが、その作用機序は殆ど不明であり、現在までに証明に至る報告例は全く無い。

## 2. 研究の目的

本研究では、逆遺伝学的手法及び様々な代謝解析技術を駆使して、NAD(P)(H)による炭素代謝及び窒素代謝の制御機構を詳細に明らかにする。得られた知見は、植物体の物質生産能力を上昇させるのみならず、向上した同化効率を利用し、大気中の二酸化炭素の削減や、過剰窒素が原因である地下水系の汚染や湖沼の富栄養化の解決にも応用可能である。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料の作成

NAD(P)(H)による制御を正確に把握するには、遺伝工学的手法で合成酵素の発現量を改変し、NAD(P)(H)量を変化させた植物体を解析することが必要である。本研究では、シロイヌナズナを用いて、NADS、NMNAT、NADK2 遺伝子の発現量を改変し、NAD(P)(H)量の異なる植物体のシリーズを作成する。選抜作業後、キャピラリー電気泳動質量分析装置 (CE/MS) を使用して NAD(P)(H)量を確認し、変動の見られた形質転換体を解析に用いる。また、同一系統内であっても、NAD(P)(H)が異なるものは積極的に利用する。

### (2) 形質転換体の炭素及び窒素同化能力の解析

それぞれの形質転換体の炭素同化能及び窒素同化能を評価することで、NAD(P)(H)による炭素及び窒素代謝の制御機構を明らかにする。

CE/MS によるカルビン回路に属する代謝物の定量、リアルタイム PCR によるカルビン回路の酵素遺伝子の発現解析を行い、それぞれの個体の炭素同化能を評価し、NAD(P)(H)

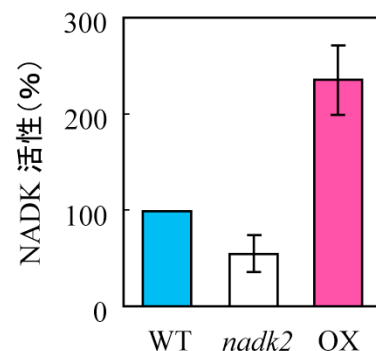
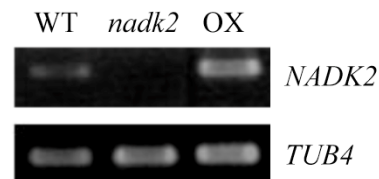
との関係を明らかにする。また、CE/MS によるアミノ酸量の測定、イオンクロマトグラフィーによる  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NH}_4^+$  の測定、リアルタイム PCR による窒素同化遺伝子の発現解析を行い、NAD(P)(H)と窒素同化能の制御機構を解明する。

## 4. 研究成果

### (1) NADK2 高発現体の作成

CaMV35S プロモーターの制御下で NADK2 遺伝子を高発現させた形質転換体 (NADK2-OX) を作成した。RT-PCR の結果から、欠損変異体 (*nadk2*) ではシグナルは検出されず、NADK2-OX では NADK2 の mRNA レベルが野生型 (WT) よりも増加していることが確認された。また、NADK 活性は *nadk2* では WT の約 50% まで減少していたのに対して、NADK2-OX では 2 倍以上の活性増加が見られた。それぞれの個体で表現型を観察すると、*nadk2* では激しい表現型が見られたのに対して、NADK2-OX は葉のサイズ、鞘のサイズ及び数、抽だい時期には殆ど変化は見られなかった。

図 1 NADK2 の発現、NADK 活性及びクロロフィル量の比較



### (2) NAD(P)(H)量の測定

NAD(P)(H)量を調べた結果、NAD と NADH は *nadk2* では増加し、NADK2-OX では減少していた。一方、NADP 量は *nadk2* では減少し、NADK2-OX では増加した。すなわち、*nadk2* では葉の NADP 合成が阻害された結果、NAD

及び NADH が蓄積したと考えられる。逆に、NADK2-OX では NADP 合成が促進された結果、NAD と NADH が減少したと予想される。ここで、これらの植物体では、総補酵素量とレドックス (NAD(P)H/NAD(P)比) には有意な変動は見られなかった。これらの結果から、作成した形質転換体は、レドックスではなく NADP による代謝制御を調べるのに適した植物体であることが示された (表 1)。

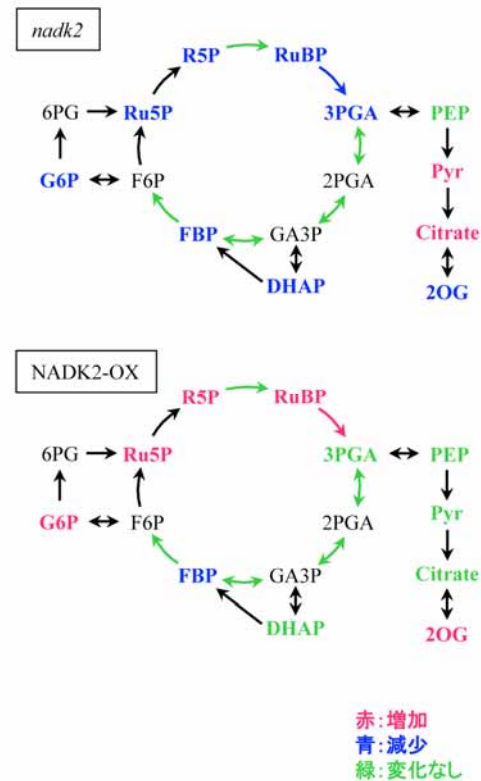
表 1 NAD(P)H量の比較

	代謝物量 (WT%)		
	WT	<i>nadk2</i>	OX
NAD	100	147.7	93.1
NADH	100	132.2	70.6
NADP	100	42.7	139.2
NADPH	100	ND	139.5
Total	100	113.1	103.9
Redox	100	83.3	83.3

### (3) NADP 量変化によるカルビンサイクルへの影響

過去の報告から、*NADK2* の欠損によってキサンチン蓄積の影響で光合成能が減少することがわかっている。そこで高発現体の光合成電子伝達を調査したが、有意な変化は検出されなかった。しかし、二酸化炭素の取り込みを調査すると、*NADK2-OX* で取り込み量の増加が確認された。そこで、二酸化炭素取り込みの主経路であるカルビンサイクルの酵素群の活性を調査した。ホスホグリセリン酸キナーゼ、NADP 依存性グルセルアルデヒド脱水素酵素、アルドラーゼ、フルクトースビスホスファターゼ、ホスホリブリン酸キナーゼには活性に変動は見られなかったが、ルビスコ活性が初期活性、最大活性ともに *nadk2* では減少、*NADK2-OX* では増加していることが明らかになった (図 3)。さらに CE/MS を用いて代謝物量を調べた。*nadk2* では、カルビンサイクルに属する代謝物の殆どが減少していた。さらに下流の代謝物であるホスホエノールピルビン酸 (PEP)、ピルビン酸 (Pyr)、クエン酸 (Citrate)、2 オキソグルタル酸 (2OG) を調査すると、Pyr と Citrate が増加し、2OG が減少した。一方 *NADK2-OX* では、グルコース 6 リン酸 (G6P)、リボース 5 リン酸 (R5P)、リブローース 5 リン酸 (Ru5P)、リブローースビスリン酸 (RuBP) が増加していた。これらの代謝物は *nadk2* では減少しており、NADP 量と比例して変動していることが示唆された (図 3)。以上の結果から、NADP は炭素代謝を制御している可能性が示された。

図 3 NADP のカルビンサイクルへの影響

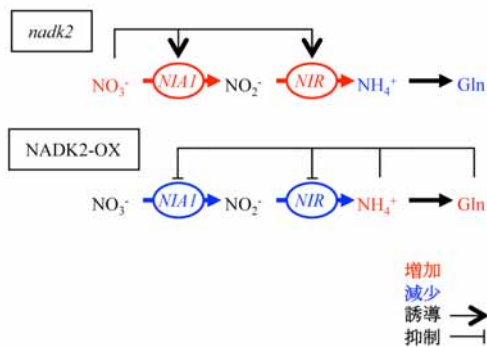


### (4) NADP 量変化による窒素代謝への影響

炭素化合物の代謝解析の結果、2OG は NADP 量と比例して変動していた。2OG は GS/GOGAT 経路におけるアミノ酸合成の際に、炭素骨格として利用される重要物質であり、窒素代謝のマーカーとも言える。そこで、*nadk2* 及び *NADK2-OX* のアミノ酸量を定量した。その結果、幾つかのアミノ酸に変動が見られたが、特にグルタミン酸ファミリーのアミノ酸群が NADP 量と並行して変動することが明らかになった。グルタミンとグルタミン酸は硝酸還元によって得られた  $\text{NH}_4^+$  を用いて GS/GOGAT 経路で合成される。そこで GS/GOGAT 経路の酵素遺伝子発現を調査したが、アミノ酸量の変化を証明する結果は得られなかった。しかし、硝酸還元に関わる酵素遺伝子と  $\text{NO}_3^-$  と  $\text{NH}_4^+$  では変化が見られた。*nadk2* では  $\text{NO}_3^-$  の蓄積が観察された一方で  $\text{NH}_4^+$  が減少していた。この結果から、NADP 減少によって硝酸還元が阻害され、その結果としてグルタミンが減少したと推測された。*NADK2-OX* では  $\text{NO}_3^-$  と  $\text{NH}_4^+$  共に増加傾向にあった。興味深いことに、硝酸還元酵素をコードする *NIA1* と亜硝酸還元酵素をコードする *NIR* の発現は *nadk2* で増加し、*NADK2-OX* では減少していた。これらの発現は代謝物の蓄積による促進及び抑制であると推測されるが、現在のところ明らかではない。そこで、

鍵となると予想される硝酸還元酵素について、活性測定を行った。それぞれの植物体で比較したところ、優位差は見られなかった。その理由として、基質や補酵素を同量加えた条件では、活性に差は見られないと考えられた。すなわち、*in vivo* では硝酸還元レベルが異なると予想された。

図4 NADPの硝酸還元への影響と遺伝子発現調節の推測図

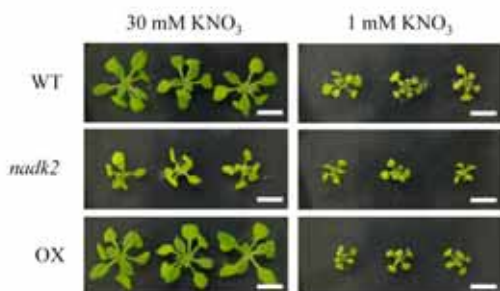


(6) NADPと硝酸還元との関与

植物体内の硝酸還元レベルがどうなっているかを推測するため、異なる硝酸条件下での生育を比較した。十分な硝酸条件(30 mM KNO<sub>3</sub>)と硝酸制限条件(1 mM KNO<sub>3</sub>)で *nadk2* と NADK2-OX を生育させたところ、1 mM KNO<sub>3</sub> では生育に殆ど差は見られなかったが、30 mM KNO<sub>3</sub> では NADK2-OX は WT よりも生育が良いことが示された(図5)。一方で *nadk2* では生育に殆ど影響が見られず、硝酸への依存度が低いことが示された。これらの結果から、NADPを増加させることで硝酸還元が促進され、その結果としてアミノ酸合成量が増加していることが推測された。

以上の結果から、NADPの変動によって、カルビンサイクル、硝酸還元、アミノ酸合成が変動することが示された。これらの結果はNADPが炭素及び窒素代謝を制御する可能性を示しており、今後の解析によってNADPによる制御機構が明らかになることが期待できる。

図5 硝酸の生育への影響の比較



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1件)

Hashida SN, Takahashi H, and Uchimiya H. The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Annals of botany*. 103, 819-824. 2009. 査読有

[学会発表](計3件)

高橋秀行、橋田慎之介、藤森玉輝、山田真紀、田茂井政宏、重岡成、柳澤修一、内宮博文

「NAD関連遺伝子によるC-N代謝促進」  
第49回日本植物生理学会年会

2008年3月21日

札幌コンベンションセンター

高橋秀行、林光紀、川合真紀、内宮博文

「複合的なストレス耐性を示すイネのプロテオームおよびメタボローム解析」

日本質量分析学会・第56回質量分析総合討論会  
2008年5月14日

つくば国際会議場エポカール

高橋秀行、高原健太郎、橋田慎之介、川合真紀、内宮博文

エネルギー代謝補酵素による植物代謝亢進

第50回日本植物生理学会年会

2009年3月21日

名古屋大学

[その他]

ホームページ

<http://www.ibrc.or.jp/HP-Data2007/03Labo/07MetaboEngin/Meta-Jap.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 秀行 (TAKAHASHI HIDEYUKI)

財団法人岩手生物工学研究センター・細胞工学研究部・主任研究員

研究者番号: 00455247

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし