

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月23日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380042

研究課題名（和文） イネ植物体内における利用可能な窒素の情報検知機構と情報伝達経路の分子統御系の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular regulation on sensing and signaling of available nitrogen in rice plants

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

研究成果の概要（和文）：植物体内での利用可能な窒素情報の検知・伝達機構は不明なままであった。本研究の成果として、イネにおける根でのアンモニウム同化機構及び生長過程の葉・登熟過程の穎果での転流窒素再利用機構上のグルタミン情報伝達系への OsACR9 の関連の可能性が示唆された。また、充足濃度以上の濃度の NH_4^+ 供給下のイネ幼植物根の NH_4^+ の吸収と同化の制御に、OsACTPK1 が関わることを示唆された。

研究成果の概要（英文）：Molecular mechanisms underlying the sensing and signaling of available nitrogen have been unclear in plants. In this study, two important findings were obtained as described below. OsACR9 may be assembled into the glutamine-signal transduction system on ammonium assimilation in roots and re-utilization of recycling nitrogen in young organs of rice plants. OsACTPK1 could be involved in the regulation of ammonium absorption and assimilation in roots of rice seedlings grown under sufficient or excess ammonium conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：植物分子栄養学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：植物代謝調節、遺伝子、シグナル伝達、発現制御、生理学

1. 研究開始当初の背景

イネは、主に還元状態の水田で栽培されるが、不足し易い基本栄養素である窒素の生存戦略的高効率吸収同化・転流利用機構を獲得している。すなわち、1) 主たる外来窒素の

アンモニウム (NH_4^+) の根での高効率吸収・同化機構と 2) 主にグルタミン (Gln) や Gln 由来のアスパラギン (Asn) としてのこの同化窒素の導管を介した地上部への転送と利用機構及び 3) 老化組織・器官の構成窒素を主に Gln

や Asn に変換後、この窒素を、篩管を介して成長中の葉身や穂に転送して再利用する窒素転流機構である。1) の機構では、 NH_4^+ 供給直後から、根の表層の表皮・外皮・厚膜組織細胞で高発現するアンモニウム輸送担体 1;2 (AMT1;2) とサイトゾル型グルタミン合成酵素 1;2 (GS1;2) 及び NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 1 (NADH-GOGAT1) が重要であり、Gln 含量が顕著に増加する。一方、2) と 3) の機構では、老化葉身維管束篩部の GS1;1 及び未熟な葉身や穎果の維管束木部・篩部の NADH-GOGAT1 が鍵酵素とされる。

植物体内での利用可能な窒素情報の検知・伝達機構は不明なままであった。しかし、イネの AMT1 や NADH-GOGAT1 の遺伝子発現は、Gln または Gln の代謝産物をシグナルとして制御されることが、本研究代表者の研究結果を含む一連の研究から示唆され、植物における Gln 情報伝達系の存在が提唱された。

2. 研究の目的

植物における窒素代謝系遺伝子発現や窒素代謝を制御する Gln 情報伝達系の分子実体や分子制御機構は不明なままであった。ここで、研究代表者らは、微生物 Gln センサー (GlnD) の Gln 結合ドメインと相同的なアミノ酸結合ドメイン (ACT ドメイン) を有する新規タンパク質の遺伝子群 (*OsACR1*, *OsACR5*-*OsACR9*) をイネより単離した。また、同様な ACT ドメインを有する新規タンパク質リン酸化酵素様タンパク質遺伝子群 (*OsACTPK1*-*OsACTPK6*) も単離した。

本研究では、主要モデル穀物イネにおける Gln シグナル検知因子候補としての *OsACR* 群や *OsACTPK* 群の機能と窒素代謝系遺伝子群発現制御や窒素代謝調節への関与を検証・整理し、特に窒素の吸収同化・転流利用機構での Gln 情報伝達系の階層的分子統御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イネの窒素の吸収同化・転流利用過程における細胞・組織・器官レベルでの *OsACR* と *OsACTPK* の mRNA・タンパク質群の発現・蓄積特性の解析

イネの NH_4^+ 処理根及び老化過程の葉・生長過程の葉・登熟過程の穎果における *OsACR* と *OsACTPK* の mRNA の発現特性をリアルタイム RT-PCR 法にて解析する。また、これらのタンパク質の蓄積特性を、特異抗体を用いたウェスタン法と免疫光学顕微鏡法により解析する。各タンパク質の細胞内存在場所は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質のタマネギ表皮細胞やイネ細胞での一過的発現系における共焦点レーザー顕微鏡解析により同定する。

(2) *OsACR* と *OsACTPK* のアミノ酸結合・相互作用解析による窒素シグナル選択性の検証

可溶性組換え (r) *OsACR* と可溶性 r*OsACTPK* の大腸菌内大量発現系と高度精製系を構築する。超高感度等温滴定型熱量測定装置 (ITC) を用いて、非固定の Gln や他のアミノ酸と各組換えタンパク質精製標品の分子間相互作用を定量解析し、結合強度や反応動力学的機作を解析する。また、r*OsACTPK* 精製標品のタンパク質リン酸化活性に対する窒素シグナル候補である Gln や他のアミノ酸の影響を解析する。

(3) *OsACR* の相互作用因子候補及び *OsACTPK* の相互作用・標的リン酸化タンパク質候補の探索

酵母 Two-hybrid 法を用いて、イネ cDNA ライブラリーより *OsACR* と *OsACTPK* の各々に相互作用するタンパク質候補を単離する。これらの候補タンパク質遺伝子のイネにおける発現を解析する。

(4) *OsACR* と *OsACTPK* の各遺伝子破壊イネまたは遺伝子発現抑制イネを用いた、*OsACR* と *OsACTPK* の生理機能の直接的な解析

各 *OsACR* と *OsACTPK* について内在性レトロトランスポゾン *Tos17* 挿入遺伝子破壊変異イネと RNA 干渉 (RNAi) 法による遺伝子発現抑制組換えイネを作出する。これらの遺伝子破壊・発現抑制イネにおいて、Gln 応答性遺伝子を含む NH_4^+ 同化・窒素転流機構の鍵タンパク質・酵素遺伝子及び関連炭素代謝系酵素群遺伝子の mRNA やタンパク質の発現変動を (1) と同様に解析する。また、これらの外的形態、成長、窒素・炭素含量、アミノ酸含量及びバイオマス等の表現形を準網羅的に調査する。さらに、炭素・窒素分析装置と安定同位体比質量分析装置 (MS) を用いた、重窒素標識アンモニウムイオン ($^{15}\text{NH}_4^+$) の吸収速度解析や誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) によるカチオン含量の解析も行う。イネ DNA アレイを用いたトランスクリプトーム解析も適用して、*OsACR* と *OsACTPK* が関与する情報伝達系の下流の因子群遺伝子や標的窒素代謝系遺伝子及び標的代謝系遺伝子の候補の広範な探索も試みる。

4. 研究成果

(1) *OsACR9* に関する研究成果

① イネにおける *OsACR9* の mRNA とタンパク質の発現蓄積特性

NH_4^+ 処理後のイネ根では、*OsACR9* mRNA は短時間で蓄積し、*OsACR9* タンパク質は表皮・外

皮・厚膜組織細胞群と維管束柔細胞群に主に分布した。イネ葉身では、*OsACR9* mRNA は葉鞘から未抽出の若い葉身に主に蓄積し、*OsACR9* タンパク質は維管束柔細胞とメストム鞘細胞に主に分布した。登熟初期の未熟玄米では、*OsACR9* タンパク質は主に背部大維管束柔細胞群と糊粉層細胞に分布した。*OsACR9* は、Gln 応答性遺伝子が発現する細胞群に分布する傾向を示した。また、GFP と *OsACR9* の融合タンパク質のイネ細胞での一過的発現解析では、*OsACR9* の核局在が示唆された。

② *OsACR9* の相互作用因子候補の探索

イネ未抽出葉身 cDNA ライブラリーを用いた酵母 two-hybrid 法により、*OsACR9* の相互作用因子として推定転写因子タンパク質を単離した。イネにおけるこの推定転写因子の mRNA の蓄積パターンは、概ね *OsACR9* mRNA の蓄積パターンと類似し、この推定転写因子は、イネ細胞の核内における *OsACR9* の相互作用因子候補として大きく期待された。

③ *OsACR9* 遺伝子発現抑制イネを用いた機能解析

RNAi 法により *OsACR9* 遺伝子発現抑制イネを作成した。また、イネ根の Gln 応答性遺伝子候補を、トランスクリプトーム解析により網羅的に選抜した。NH₄⁺ 供与した *OsACR9* 遺伝子発現抑制イネと野生型イネの根のトランスクリプトーム比較解析を行なった結果、*OsACR9* が遺伝子発現に関与する可能性のあるイネ根の Gln 応答性遺伝子候補を選抜できた。

④ *OsACR9* の Gln・他アミノ酸結合能解析

OsACR9 の Gln や他のアミノ酸との結合能を解析するために用いる可溶性 r*OsACR9* タンパク質高度精製標品の大量調製が、発現タンパク質の不溶化や凝集等により、困難を極めた。この r*OsACR9* を大量発現できる大腸菌内発現系を構築できたが、その精製系の構築や精製タンパク質を用いたアミノ酸結合能解析を行うには至らなかった。

以上より、本研究では、イネにおける根での NH₄⁺ 同化機構及び生長過程の葉・登熟過程の穎果での転流窒素再利用機構上の Gln 情報伝達系への *OsACR9* の関連の可能性が示唆された。

(2) *OsACTPK4* に関する研究成果

① イネにおける *OsACTPK4* の mRNA とタンパク質の発現蓄積特性

一過的な NH₄⁺ 供与後のイネ幼植物根では、*OsACTPK4* mRNA 蓄積量は、Gln 応答性の

OsNADH-GOGAT1 mRNA 蓄積量が最大となるに先立ち、短時間で最大となった。また、GFP と *OsACTPK4* の融合タンパク質のタマネギ表皮細胞とイネ根細胞での一過的発現解析より、*OsACTPK4* の核局在が示唆された。

② *OsACTPK4* のタンパク質リン酸化活性と Gln・他アミノ酸結合能の解析

可溶性 r*OsACTPK4* の大腸菌内大量発現系と精製系を構築した。r*OsACTPK4* 精製標品の Gln に対する結合能を、ITC にて解析したが、相互の結合に由来する熱量変化は観測されなかった。しかし、r*OsACTPK4* の Mn²⁺ 依存性自己リン酸化活性は確認でき、この自己リン酸化活性にはグルタミン酸 (Glu) とアスパラギン酸 (Asp) が正のエフェクター効果を示すことが判明した。

③ *OsACTPK4* 遺伝子破壊イネを用いた機能解析

Tos17 挿入 *OsACTPK4* 遺伝子破壊イネ系統と各系統から分離した *Tos17* 非挿入 *OsACTPK4* 遺伝子非破壊イネ系統 (対照系統) を獲得した。*OsACTPK4* 遺伝子破壊イネでは、*OsACTPK4* の mRNA とそのタンパク質の蓄積は認められなかった。*OsACTPK4* 遺伝子破壊系統と対照系統及び野生型イネを、様々な濃度の外来 NH₄⁺ 供給条件下で栽培して表現形を比較した。しかし、*OsACTPK4* 遺伝子破壊系統と対照系統または同遺伝子破壊系統と野生型イネの間に優位な表現形の差異は認められず、また、Gln 応答性遺伝子の発現にも差異は認められなかった。

以上から、*OsACTPK4* が、Gln 情報伝達系に関与する可能性は低いと考えられた。

(3) *OsACTPK1* に関する研究成果

① イネにおける *OsACTPK1* の mRNA とタンパク質の発現蓄積特性

外来 NH₄⁺ 供給不足・充足条件下のイネ幼植物での *OsACTPK* 族 mRNA の発現解析結果では、*OsACTPK1* mRNA が外来 NH₄⁺ 充足下のイネ根で他の *OsACTPK* 族 mRNA に比べ顕著に蓄積した。また、*OsACTPK1* と GFP との融合タンパク質のタマネギ表皮細胞とイネ細胞での一過的発現解析から、*OsACTPK1* のサイトゾル・核両局在が示唆された。

② *OsACTPK1* のタンパク質リン酸化活性とそのリン酸化活性に対するエフェクター分子の解析

可溶性 r*OsACTPK1* の大腸菌内大量発現系と精製系を構築した。r*OsACTPK1* 精製標品が Mn²⁺ 依存性の自己及び他タンパク質リン酸化活性を有すことを確認した。窒素情報や炭素/

窒素比情報の感知機能の観点から、リン酸化活性への遊離アミノ酸等の添加効果も解析した。

③ *OsACTPK1* 遺伝子破壊イネを用いた機能解析

*Tos17*挿入 *OsACTPK1* 遺伝子破壊イネ系統群と同様な遺伝背景の *OsACTPK1* 遺伝子に *Tos17* が挿入されていない分離系統群(対照系統)を単離した。*OsACTPK1* 遺伝子破壊系統の根では、*OsACTPK1* の mRNA とタンパク質共に蓄積が認められないが、外来 NH_4^+ 充足下の野生型イネと対照系統の根では、*OsACTPK1* の mRNA とタンパク質が蓄積することを確認した。

OsACTPK1 遺伝子破壊系統と対照系統を比較解析した結果、根の Gln 応答性遺伝子を含めた NH_4^+ 吸収・同化系遺伝子の発現に差異はなかった。しかし、低～充足濃度の外来 NH_4^+ 供給下で栽培した *OsACTPK1* 遺伝子破壊系統幼植物では、対照系統と比較して、 NH_4^+ 充足条件下で、根の伸長・乾物重減少と地上部の生育・乾物重増加及び根と地上部の全窒素・遊離アミノ酸含量の増加が認められ、根の NH_4^+ 蓄積量も増加した。さらに、 $^{15}\text{NH}_4^+$ 吸収速度解析より、*OsACTPK1* 遺伝子破壊系統の根では、対照系統と比較して、 NH_4^+ 吸収速度の増加が認められた。ICP-MS 解析結果では、外来 NH_4^+ 充足下の *OsACTPK1* 遺伝子破壊系統幼植物では、 NH_4^+ と競合的に吸収される K^+ の含量低下も認められた。また、外来 NH_4^+ 充足下の *OsACTPK1* 遺伝子破壊系統幼植物では、対照系統と比較して、根での NH_4^+ 初期同化を担うサイトゾル型 GS1 と NADH-GOGAT のタンパク質含量増加が確認された。外来 NH_4^+ 充足下の *OsACTPK1* 遺伝子破壊系統幼植物での全窒素含量と遊離アミノ酸含量の増加は、根の NH_4^+ 吸収量と GS1/NADH-GOGAT 含量の増加に起因すると考えられた。次に、充足～過剰濃度の NH_4^+ を供給した *OsACTPK1* 遺伝子破壊系統と対照系統の幼植物の表現形を比較した。*OsACTPK1* 遺伝子破壊系統では、対照系統と比較して、地上部と根の乾物重当たりの全窒素含量が増加したが、過剰 NH_4^+ 供給下で地上部の乾物重が顕著に減少した。

以上の結果から、 NH_4^+ 供給充足下のイネ幼植物根の NH_4^+ の吸収と同化の制御に、*OsACTPK1* が関わることが示唆された。また、*OsACTPK1* は、イネ幼植物根での NH_4^+ 過剰蓄積回避への関与の可能性も示唆された。

(4) 成果の位置づけと今後の展望

本研究の成果として、イネにおける根での NH_4^+ 同化機構及び生長過程の葉・登熟過程の穎果での転流窒素再利用機構上の Gln 情報伝達系への *OsACR9* の関連の可能性が示唆され、

今後 Gln 情報伝達系の階層的分子統御機作を解明する上での糸口が開かれた点で重要と考えられる。また、還元的・嫌氣的な灌水下の水田で栽培されるイネは、主に NH_4^+ を外来窒素源として吸収・利用するが、高濃度の NH_4^+ 供給は植物に障害を引き起こす。イネの NH_4^+ 耐性の分子機構の詳細は未だ不明である。本研究の成果として、充足濃度以上の濃度の NH_4^+ 供給下のイネ幼植物根の NH_4^+ の吸収と同化の制御に、*OsACTPK1* が関わることを示唆された。今後、イネにおける NH_4^+ 耐性の分子機構を解明する上での重要な知見が得られたと考えられる。

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 3 件)

- ① 田村亘, 小島創一, 豊川絢子, 渡邊英生, 田淵-小林真由美, 早川俊彦, 山谷知行, Disruption of a novel NADH-glutamate synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice, *Frontiers in Plant Science*, vol.2, 2011 年, 査読有り, DOI: 10.3389/fpls.2011.00057
- ② 田村亘, 日高佑典, 田淵真由美, 小島創一, 早川俊彦(5 番目), 他 5 名, Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants, *Amino Acids*, vol.39, pp.1003-1012, 2010 年, 査読有り, DOI: 10.1007/s00726-010-0531-5
- ③ 工藤徹, 河合亜希子, 山谷知行, 早川俊彦, Cellular distribution of ACT domain repeat protein 9, a nuclear localizing protein, in rice (*Oryza sativa* L.), *Physiol. Plant.*, vol.133, pp.167-179, 2008 年, 査読有り, DOI: 10.1111/j.1399-3054.2008.01051.x

[学会発表] (27 件)

- ① 谷合彰子, 澤勇己, 小原実広, 吉成晃, 小島創一, 山谷知行, 早川俊彦, イネ根における新規プロテインキナーゼ(*OsACTPK1*) のアンモニウム吸収制御への関与, 日本植物生理学会, 2012 年 3 月 18 日, 京都産業大学
- ② 谷合彰子, 澤勇己, 西濱夏海, 工藤徹, 小島創一, 山谷知行, 早川俊彦, イネにおけるグルタミン情報伝達系への関与が期待される新規 ACT ドメインプロテインキナーゼ様タンパク質 4 のリン酸化能解析, 日本土壌肥料学会, 2010 年 9 月 7 日, 北海道大学
- ③ 早川俊彦, 石田隆輔, 小林啓輔, 末吉邦, 工藤徹, 白戸陽子, 本郷貴胤, 小島創一, 山谷知行, Rice vacuolar membrane-localized

amino acid transporter, OsATA1;2, transports glutamine, 1st International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, 2010年7月28日, 犬山国際観光センター

- ④ 澤勇己, 西濱夏海, 小島創一, 山谷知行, 早川俊彦, イネ根におけるGlnセンサー候補 OsACTPK遺伝子族の発現特性とOsACTPK4遺伝子破壊イネの解析, 日本土壤肥料学会, 2009年9月15日, 京都大学
- ⑤ 河合亜希子, 工藤徹, 小島創一, 山谷知行, 早川俊彦, イネにおける ACT ドメインリピートタンパク質 9 (OsACR9) の制御下のグルタミン応答性遺伝子群候補と OsACR9 の相互作用因子候補の探索, 日本植物生理学会, 2009年3月21日, 名古屋大学
- ⑥ 工藤徹, 河合亜希子, 山谷知行, 早川俊彦, イネ根での OsACR9 を介した窒素情報感知と窒素応答性遺伝子の発現制御機構に関する解析, 日本土壤肥料学会, 2008年9月9日, 名古屋市立大学

[図書] (計1件)

- ① 小島創一, 早川俊彦, Nicolaus von Wirén, 山谷知行, Research Signpost 社, Ammonium absorption and assimilation in plants. In “Nitrogen assimilation in plants”, 2010年, pp. 51-66

[その他]

ホームページ等

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

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

無し。