

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02888

研究課題名（和文）植物における窒素飢餓応答の分子基盤

研究課題名（英文）Uncovering the molecular basis of nitrogen starvation responses

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） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、シロイヌナズナにおける窒素飢餓マーカーを指標にした新奇因子探索と窒素応答に関わる既知因子の再評価を通して、植物における窒素飢餓感知から出力に至る情報伝達の分子基盤を体系的に理解することを目指した。変異体スクリーニングおよびYeast one-hybridスクリーニングを行い、複数の新奇窒素飢餓応答制御因子候補の取得に成功した。また窒素応答制御に関わる既知因子について窒素飢餓応答制御系における位置付けや関与の程度を詳細に解析した結果、窒素飢餓応答制御においてLBD転写因子群がこれまでに考えられてきたよりも重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、植物の窒素飢餓応答制御機構の理解が大きく進んだ。近年窒素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、世界的に低投入持続型農業への移行が求められている。窒素飢餓応答機構の解明は、窒素飢餓耐性植物や窒素低要求性植物など、低投入型持続的農業に適した新たな優良品種の開発につながるため、社会的インパクトも大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to understand the molecular basis of the nitrogen starvation response regulation in plants, from perception to output, by exploring novel factors using nitrogen starvation markers in Arabidopsis and reevaluating known factors involved in nitrogen response regulation. Through mutant screening and yeast one-hybrid screening, we successfully identified multiple novel candidate regulators. Additionally, reevaluation of the known factors revealed that the NLP and LBD transcription factor families play a more significant role in controlling nitrogen starvation response than previously thought.

研究分野：植物栄養学

キーワード：窒素飢餓 窒素欠乏 窒素栄養 植物

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。しかし自然界では土壌中の窒素栄養量が植物の生育にとって十分ではないことが多い。したがって自然界で植物がその生命活動を安定的に維持するためには、外環境と個体内の窒素栄養情報を集約し、効率的に窒素栄養を獲得・利用することなどにより、比較的長期間に渡る窒素不足状態「窒素飢餓」に適応することが極めて重要である。このような環境に置かれた植物は、効率良く窒素を吸収・同化・転流するための応答だけでなく、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、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イックな応答を示すことが生理学・生態学的研究から明らかにされている^{1,2}。また窒素飢餓応答は窒素栄養が存在するときの応答(硝酸応答など)の単なる裏返しではなく、窒素不足に積極的に適応するためのものであることがわかっている^{3,4}。しかし硝酸応答メカニズム研究の大きな進展に対し、窒素飢餓応答に関しては制御因子が散発的に同定されているだけであり、体系的な理解には程遠い状況であった。

2. 研究の目的

我々の研究グループは窒素飢餓応答制御メカニズム解明を目指し、シロイヌナズナを用いて研究を行い、窒素飢餓特異的なマーカー遺伝子 *NRT2.4* と窒素飢餓応答性を決定する最小プロモーター領域 (*pNRT2.4*) を見いだした。そしてその領域を利用したスクリーニングにより、窒素飢餓応答のメジャーレギュレーターとして NIGT1 転写抑制因子群 (NIGT1s) を同定した³。NIGT1s は窒素充足時に窒素飢餓応答性遺伝子の発現を抑制する働きをもつ。しかし *nigt1* 多重変異体 (*nigtQ*) においても窒素飢餓応答性遺伝子の発現抑制は部分的にしか解除されないため、NIGT1s 以外の制御因子の関与が考えられた。また *NRT2.4* の発現制御に関与することが示唆されている既知因子は複数あったが (TGA1/4、CBL7、NLA、PHO2、BT1/2、LBDs、NLPs など)^{4,5}、それらの窒素飢餓応答制御における役割や関与の程度は不明であった。そこで本研究では、窒素飢餓マーカーを指標にした新奇因子探索および窒素応答制御に関わる既知因子の窒素飢餓応答制御系における位置付けや関与の程度の詳細な解析により、植物における窒素飢餓感知から出力に至る情報伝達の分子基盤を体系的に理解することを目指した。

3. 研究の方法

①窒素飢餓マーカーを指標にした新奇因子探索

pNRT2.4 を指標にして(a)変異体スクリーニングと(b) Yeast one-hybrid スクリーニングにより新奇因子の探索を行なった。

②既知因子の窒素飢餓応答制御系における位置付けや重要性の解析

窒素応答制御に関わる既知因子 CBL7、NLA、PHO2、BT1/2、LBDs、NLPs、TGA1/4、CEPR1/2、CEPDs について、変異体または過剰発現体を作成または入手し、窒素飢餓応答性遺伝子の発現解析により、窒素飢餓応答制御系における役割と重要性を評価した。また重要性が高いと評価されたものについて、制御系における位置付けを明らかにするため、*nigtQ* と組み合わせた多重変異体を作成・解析した。

4. 研究成果

①(a) 変異体スクリーニング

窒素飢餓マーカーライン (*pNRT2.4:GUS*) に EMS で変異を導入した M2 集団を確立し、窒素飢餓条件で栽培しているにもかかわらず窒素飢餓応答レポーターが活性化されない窒素飢餓応答抑圧変異体 (*snsr*) のスクリーニングを行った。10,000 系統相当の M2 種子について窒素飢餓応答レポーターを指標にした一次スクリーニング、根における内生の *NRT2.4* の発現を指標にした二次スクリーニングを経て、16 系統の変異体を単離した (図 1)。これらの変異体の多くは根の分岐 (側根) の減少を示した。側根形成と伸長の促進は形態的な窒素飢餓応答の代表的なものであるが、*NRT2.4* を含む複数の窒素飢餓応答性遺伝子は側根で強く発現するため、側根の減少と窒素飢餓応答性遺伝子発現の抑圧の因果関係は未だ不明である。この因果関係の解明と原因遺伝子の同定は今後の課題である。

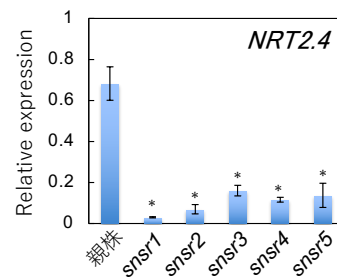


図1. 窒素飢餓応答抑圧変異体における内生の窒素飢餓マーカー遺伝子の発現
窒素飢餓応答抑圧変異体 (*snsr*) 16系統のうち代表的な5系統。親株は窒素飢餓マーカーライン (*pNRT2.4:GUS*) を示す。

① (b) Yeast one-hybrid スクリーニング

pNRT2.4 を bait、窒素飢餓条件で栽培したシロイヌナズナの根から抽出した全 RNA をもとに作製したライブラリーを prey として Yeast one-hybrid スクリーニングを行った。薬剤による一次スクリーニング、シークエンスとリトランスフォーメーションによる二次スクリーニング、シロイヌナズナ葉肉プロトプラスを用いたトランジェントアッセイによる三次スクリーニングを経て、*NRT2.4* promoter Interacting Protein 1(NIP1)と NIP2 を単離した。NIP1 と NIP2 について、T-DNA 挿入変異体とゲノム編集によるフレームシフト変異体を確立し解析したが、窒素飢餓応答に関して明確な表現型は観察されなかった。NIP1 と NIP2 は相同遺伝子あり、機能重複が考えられたため、二重変異体と過剰発現体の作出を行った。これらの材料が整い次第、窒素飢餓応答関連表現型の詳細な解析を行い NIPs の役割を明らかにする。

② 既知因子の窒素飢餓応答制御系における位置付けや重要性の解析

窒素応答制御に関わる既知因子の変異体等において、窒素飢餓条件と窒素充足条件における窒素飢餓応答性遺伝子の発現解析を行なった。具体的には、*cbl7*、*nla*、*pho2*、*bt1 bt2*、*lbd37 lbd38 lbd39 (lbdT)*、*nlp6 nlp7*、*tgal tga4*、*cepr1 cepr2*、*cepd1 cepd2 cepd2*、*CEPD2* 過剰発現体、*CEPDL2* 過剰発現体、転写抑制ドメインを付加することにより転写抑制型へと変換した *NLP6* を過剰発現する株を作製または入手し解析に供した。*cbl7*、*nla*、*pho2*、*bt1 bt2* および *tgal tga4* では、いずれの窒素栄養条件においても窒素飢餓応答性遺伝子の発現に大きな変化は見られなかった。その他の変異体等においては顕著な発現変化が観察され、*CEPRs* および *CEPDs* は窒素飢餓条件における窒素飢餓応答性遺伝子の正の制御に、*NLPs* および *LBDs* は窒素充足条件における窒素飢餓応答性遺伝子の負の制御に関わることが示唆された。

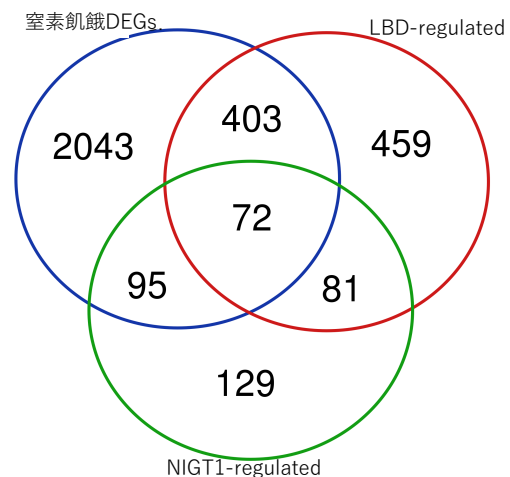


図2. NIGT1s制御遺伝子、LBDs制御遺伝子、窒素飢餓応答遺伝子のベン図

窒素飢餓応答性遺伝子の発現への影響が特に大きかった *LBDs* について、窒素飢餓応答制御系に

おける役割が明確になっている NIGT1s との比較解析を行なった。*nigtQ*、*lbdT* および *nigtQ lbdT* 変異体を用いてトランスクリプトーム解析を行い、LBDs と NIGT1s が制御する遺伝子の比較を行った (図 2)。LBDs が制御する遺伝子は 1015、NIGT1s が制御する遺伝子は 377 あり (IFCI>2, FDR<0.05)、それらのうち約 45%が窒素飢餓応答性遺伝子 (窒素飢餓 DEGs) であった。また NIGT1s が制御する遺伝子の約 40%は LBDs によっても制御されることもわかった。これらの結果から、LBDs が窒素飢餓応答のメジャーレギュレーターであること、NIGT1s と LBDs は部分的に重複した役割を持ちつつ独自の役割も果たすことが示唆された。*nigtQ*、*lbdT* および *nigtQ lbdT* 変異体の生育、硝酸イオン含量、クロロフィル含量、タンパク質含量、アミノ酸含量の結果も、トランスクリプトーム解析の結果を支持するものであった。

<引用文献>

1. Krouk G and Kiba T (2020) Nitrogen and Phosphorus interactions in plants: from agronomic to physiological and molecular insights. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 57, 104-109
2. 大久保, 松林, 木羽 (2022) 植物の低窒素環境における生存戦略, 化学と生物 60, 352-360.
3. Kiba T et al (2018) Repression of nitrogen-starvation responses by members of the Arabidopsis GARP-type transcription factor NIGT1/HRS1 subfamily. *Plant Cell*, 30, 925-945
4. Maeda, Konishi M, Kiba T et al. (2018) A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in Arabidopsis. *Nature Commun.*, 9, 1376.
5. Konishi M, Okitsu T, and Yanagisawa S. Nitrate-responsive NIN-like protein transcription factors perform unique and redundant roles in Arabidopsis. *J Exp Bot.*, 72, 5735-5750.

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 8件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Kiba Takatoshi, Mizutani Kahori, Nakahara Aimi, Takebayashi Yumiko, Kojima Mikiko, Hobo Tokunori, Osakabe Yuriko, Osakabe Keishi, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 192
2. 論文標題 The trans-zeatin-type side-chain modification of cytokinins controls rice growth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2457 ~ 2474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiad197	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 Scholz Sandra S., Barth Emanuel, Clement Gilles, Marmagne Anne, Ludwig-Muller Jutta, Sakakibara Hitoshi, Kiba Takatoshi, Vicente-Carbajosa Jesus, Pollmann Stephan, Krapp Anne, Oelmuller Ralf	4. 巻 24
2. 論文標題 The Root-Colonizing Endophyte Piriformospora indica Supports Nitrogen-Starved Arabidopsis thaliana Seedlings with Nitrogen Metabolites	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15372 ~ 15372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242015372	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 Toda Erika, Kiba Takatoshi, Kato Norio, Okamoto Takashi	4. 巻 135
2. 論文標題 Isolation of gametes and zygotes from Setaria viridis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 627 ~ 633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-022-01393-w	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 Yang Qianying, Zhang Jie, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Uragami Takuya, Kiba Takatoshi, Sakakibara Hitoshi, Lee Youngsook	4. 巻 13
2. 論文標題 ABCG11 modulates cytokinin responses in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.976267	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 Perez-Alonso M-M, Guerrero-Galan C., Ortega-Villaizan A.G., Ortiz-Garcia P., Scholz S.S., Ramos P., Sakakibara H., Kiba T., Ludwig-Muller J., Krapp A., Oelmuller, R. Vicente-Carbajosa J., and Pollmann S	4. 巻 45
2. 論文標題 The calcium sensor CBL7 is required fo Serendipita indica induced growth stimulation in Arabidopsis thaliana, controlling defense against the endophyte and K+ homeostasis in the symbiosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 3367 ~ 3382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14420	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 Kinoshita Satoru N, Suzuki Takamasa, Kiba Takatoshi, Sakakibara Hitoshi, Kinoshita Toshinori	4. 巻 64
2. 論文標題 Photosynthetic-Product Dependent Activation of Plasma Membrane H+-ATPase and Nitrate Uptake in Arabidopsis Leaves	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 191 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac157	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 大久保祐里, 松林嘉克, 木羽 隆敏	4. 巻 60
2. 論文標題 植物の低窒素環境における生存戦略	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 352 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.60.352	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 Hachiya Takushi, Inaba Jun, Wakazaki Mayumi, Sato Mayuko, Toyooka Kiminori, Miyagi Atsuko, Kawai-Yamada Maki, Sugiura Daisuke, Nakagawa Tsuyoshi, Kiba Takatoshi, Gojon Alain, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Excessive ammonium assimilation by plastidic glutamine synthetase causes ammonium toxicity in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25238-7	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 Sanagi Miho, Aoyama Shoki, Kubo Akio, Lu Yu, Sato Yasutake, Ito Shogo, Abe Mitsutomo, Mitsuda Nobutaka, Ohme-Takagi Masaru, Kiba Takatoshi, Nakagami Hirofumi, Rolland Filip, Yamaguchi Junji, Imaizumi Takato, Sato Takeo	4. 巻 118
2. 論文標題 Low nitrogen conditions accelerate flowering by modulating the phosphorylation state of FLOWERING BHLH 4 in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2022942118	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 木羽 隆敏、小西 美穂子、柳澤 修一	4. 巻 92
2. 論文標題 植物における窒素の輸送機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本土壌肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 76~91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20710/dojo.92.2_76	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 Ueda Yoshiaki, Nosaki Shohei, Sakuraba Yasuhito, Miyakawa Takuya, Kiba Takatoshi, Tanokura Masaru, Yanagisawa Shuichi	4. 巻 16
2. 論文標題 NIGT1 family proteins exhibit dual mode DNA recognition to regulate nutrient response-associated genes in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	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) 10.1371/journal.pgen.1009197	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 Mamidi Sujana, Healey Adam, Huang Pu, Grimwood Jane, Jenkins Jerry, Barry Kerrie, Sreedasyam Avinash, Shu Shengqiang, Lovell John T., Feldman Maximilian, Wu Jinxia, Yu Yunqing, Chen Cindy, Johnson Jenifer, Sakakibara Hitoshi, Kiba Takatoshi, Tetsuya Sakurai, Rachel Tavares, Dmitri A. Nusinow, Ivan Baxter, Jeremy Schmutz	4. 巻 38
2. 論文標題 A genome resource for green millet <i>Setaria viridis</i> enables discovery of agronomically valuable loci	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1203~1210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41587-020-0681-2	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 Ueda Yoshiaki, Kiba Takatoshi, Yanagisawa Shuichi	4. 巻 102
2. 論文標題 Nitrate inducible NIGT1 proteins modulate phosphate uptake and starvation signalling via transcriptional regulation of SPX genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 448 ~ 466
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 Takatoshi Kiba, Gabriel Krouk	4. 巻 57
2. 論文標題 Nitrogen and Phosphorus interactions in plants: from agronomic to physiological and molecular insights.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology	6. 最初と最後の頁 104-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbi.2020.07.002	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 Perez-Alonso M.M., Guerrero-Galan, C., Scholz, S.S., Kiba, T., Sakakibara, H., Ludwig-Muller, J., Krapp, A., Oelmuller, R., Vicente-Carbajosa, J., Polimann, 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

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takatoshi Kiba, Kahori Mizutani, Aimi Nakahara, Yumiko Takebayashi, Mikiko Kojima, Tokunori Hobo, Yuriko Osakabe, Keishi Osakabe, and Hitoshi Sakakibara
2. 発表標題 The trans-hydroxylation of cytokinin by CYP735A3 and CYP735A4 controls growth and development in rice
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 花, Fanny Bellegarde, 木羽 隆敏
2. 発表標題 窒素欠乏応答制御における NIGT1s と LBDs の役割
3. 学会等名 植物の栄養研究会第7回交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木羽隆敏
2. 発表標題 植物ホルモン・サイトカイニンによる植物成長制御 長距離輸送と側鎖修飾の仕組みと役割
3. 学会等名 第378回細胞工学研究会講演会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takatoshi Kiba, Kahori Mizutani, Yumiko Takebayashi, Mikiko Kojima, Tokunori Hobo, Hitoshi Sakakibara
2. 発表標題 The physiological role of trans-zeatin-type cytokinins in rice
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木羽隆敏、橋本祐典、小嶋美紀子、竹林裕美子、榊原均
2. 発表標題 ABCG14を介した根から地上部へのサイトカイニン長距離輸送のメカニズム
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木羽隆敏、工藤徹、矢野健太郎、加藤紀夫
2. 発表標題 Identification of cis-regulatory elements that confers high expression
3. 学会等名 第62回植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------