

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850034

研究課題名（和文）植物の新規窒素代謝制御機構の解明とその応用

研究課題名（英文）Toward the understanding and the application of an ACR11-dependent regulation mechanism of the plant's nitrogen metabolism

研究代表者

高林 厚史 (Takabayashi, Atsushi)

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：90546417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：窒素は植物の主要な栄養素であり、その利用効率の向上は持続可能な農業生産のために重要である。植物は体内の窒素量をモニターし、それに応答して様々な酵素の活性を調節していると考えられていたが、その機構の解明は十分ではなかった。私たちは、窒素代謝の新しい調節因子としてACR11タンパク質を見出した。さらなる研究により、ACR11は、窒素量に応答して、アンモニアや硝酸からアミノ酸を合成する経路の活性を制御していることが明らかになった。これらの結果は、植物の窒素代謝の調節機構を理解する上で重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：Nitrogen is one of the macronutrients of plants and improving the nitrogen use efficiency in plants is important for the sustainable agriculture system. It is thought that plant can monitor the cellular nitrogen status, which is required to response drastic changes of the nitrogen metabolic flows rapidly. However, the mechanism has not yet to be elucidated. Here, we found a chloroplastic ACR11 protein as a novel regulator of the plant's nitrogen metabolism. Our study revealed that ACR11 controlled the nitrogen assimilation via a direct interaction with Fd-GOGAT. Given two ACT domain in ACR11, ACR11 may act as a nitrogen sensor.

研究分野：植物生理学

キーワード：窒素代謝

## 1. 研究開始当初の背景

窒素は植物にとって重要な栄養素であり、その利用効率の向上は維持可能な農業システムのために重要である。

植物は土壌中の無機態窒素（硝酸及びアンモニア）を吸収する。吸収された無機態窒素はグルタミン合成酵素（GS）/グルタミン酸合成酵素（GOGAT）により、有機体窒素であるグルタミン酸を合成する。このグルタミン酸は最終的にタンパク質、核酸、クロロフィル、植物ホルモン、窒素含有二次代謝産物などの合成に用いられる。この反応は「窒素同化」と呼ばれる重要な反応である。

先行研究により、窒素同化は細胞内の窒素濃度に応答してタンパク質レベルで制御されているのではないかと示唆されていた。タンパク質レベルでの制御は転写レベルでの制御よりも早く応答できるため、時々刻々と変化する細胞内の状況に素早く応答し、迅速に代謝を制御するために重要である。しかし、その制御機構は明らかではなかった。

一方、申請者は、(Nmr1改め) ACR11 という機能未知な葉緑体タンパク質がフェレドキシン依存的なグルタミン酸合成酵素 (Fd-GOGAT) と結合し、巨大なタンパク質複合体を形成していることを見出した。ACR11 はアミノ酸結合能を持つ ACT ドメインを有しており、アミノ酸センサーとして機能し得ることから、ACR11 は窒素センサーとして機能し、Fd-GOGAT を制御しているのではないかと考えた。

*acr11* 欠損株は生育の遅延と葉のクロロシスを示した。これらの表現型は Fd-GOGAT の欠損株とよく似た表現型であることから、Fd-GOGAT の蓄積量を調べたところ、野生型の 1/4 程度にまで減少していた。また、それに伴ってアミノ酸プロファイルも野生型とは異なっていた。

これらの結果は、ACR11 が Fd-GOGAT を制御している可能性を強く示唆していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、1) ACR11 を介した窒素代謝制御の機構と生理的役割を明らかにし、2) その知見を応用した窒素の利用効率の高い植物の作出を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ACR11 を介した窒素代謝制御機構と生理的役割の解析

これまでの研究から、*acr11* 欠損株では、Fd-GOGAT の蓄積量が顕著に減少していることが明らかになっている。これは、ACR11 が Fd-GOGAT の安定性に重要な役割を担っていることを示している。一方で、ACR11 が Fd-GOGAT の蓄積量を制御していることを示すためには、ある条件では Fd-GOGAT 量を増やし、ある条件では Fd-GOGAT 量を減らす、というような現象を野生型で確認し、それが *acr11* 欠損株で失われていることを確

認する必要がある。具体的には、(Fd-GOGAT の生理的意義を考えると) 細胞内の無機態窒素濃度が高い時に、Fd-GOGAT 量を上昇させ、低い時に Fd-GOGAT 量を減少させるのではないかと考えた。

そこで本研究では、野生株と *acr11* 欠損株における Fd-GOGAT の蓄積量を細胞内の窒素濃度が大きく変動するような実験条件で比較した。

## (2) ACR11 の制御を受けない Fd-GOGAT を持つ組み換え植物体の作製と評価

Fd-GOGAT は従来から窒素の利用効率向上のターゲットの一つであり、その高発現株が作製されてきたが、窒素の利用効率の向上は見られていない。この理由は ACR11 による Fd-GOGAT の転写後制御にあると考えられる。そこで、本研究では、「ACR11 の制御を受けない Fd-GOGAT」を植物体に導入し、恒常的に GOGAT 活性が高い植物体を作成することで、窒素の利用効率の向上を試みる。

そのため、まず、シアノバクテリアの Fd-GOGAT をシロイヌナズナに導入し、その評価を行う。ACR11 による制御はシアノバクテリアには存在しないため、それら生物種の Fd-GOGAT は ACR11 の制御を受けず、恒常的に高い活性を持つと期待できる。

## 4. 研究成果

(1) ACR11 を介した窒素代謝制御機構と生理的役割の解析

まず、Fd-GOGAT の量や活性は日周変動することが知られている。そこで、野生株および *acr11* 欠損株における Fd-GOGAT の日周変動を調べた。その結果、野生株においては ACR11 および Fd-GOGAT の蓄積量は昼に多く、夜に低下することが明らかになった。これは先行研究とよく一致した結果である。一方、*acr11* 欠損株においてはこのような日周変動は全く見られず、昼も夜も Fd-GOGAT 量は変わらなかった。この結果は、ACR11 が Fd-GOGAT の日周変動に必須であることを示している。

次に、High CO<sub>2</sub> 条件で野生株と *acr11* 変異株を栽培した後、通常大気条件に移動し、Fd-GOGAT の蓄積量の変化を調べた。High CO<sub>2</sub> 条件では光呼吸経路の活性が抑制されるため、光呼吸によるアンモニアの生成が抑制される。その後、通常大気条件に移すことでアンモニアが大量に生成するため、もしも ACR11 が細胞内の窒素量に応答して Fd-GOGAT 量を増やすのであれば、通常大気条件に移した際に Fd-GOGAT 量が増えるはずである。

実際に、通常大気条件に野生株を移動した場合には、ACR11 タンパク質および、Fd-GOGAT タンパク質の蓄積量が顕著に上昇することが明らかになった。一方で、*acr11* 変異株においてはこの上昇は認められなかった。また、この時に、Fd-GOGAT の mRNA

量はほとんど変化していなかった。これらの結果は、光呼吸により生成されたアンモニア量に反応して、ACR11 が Fd-GOGAT 量を上昇させたことを示している。しかも、この上昇は転写レベルではなく、タンパク質レベルでの制御によるのもであった。この結果は、ACR11 による Fd-GOGAT の制御がタンパク質レベルで行われていることを示している。

さらに、野生株と *acr11* 欠損株を窒素飢餓条件に置いた後、窒素の再添加を行った際の ACR11 と Fd-GOGAT 量の変動を調べた。その結果、野生株においては窒素の再添加後 30 分以内に ACR11 タンパク質および Fd-GOGAT タンパク質の顕著な増加が認められた。また、それに伴ってグルタミン酸の増加も認められた。一方、*acr11* 欠損株においては窒素添加に伴う短時間での Fd-GOGAT タンパク質の増加は認められなかった。また、グルタミンの顕著な増加は認められたものの、グルタミン酸の増加は認められなかった。また、その時間内においては両植物体において、Fd-GOGAT 遺伝子の mRNA レベルでの発現上昇は認められなかった。これらの結果は、ACR11 がグルタミンの増加に伴って Fd-GOGAT タンパク質の蓄積量を増加させたことを強く示唆している。

なお、シロイヌナズナにおいては、Fd-GOGAT は *Glu1* 遺伝子および *Glu2* 遺伝子にコードされている。先行研究から葉においては *Glu1* 遺伝子が主要なアイソザイムであることが知られていたが、実際に qPCR で定量した結果、野生株および *acr11* 欠損変異株においても、*Glu1* 遺伝子の発現量が常に *Glu2* 遺伝子の発現量と比べて 5~10 倍高いことが明らかになった。同様に、野生株の葉緑体の質量分析の結果、*Glu1* 由来のユニークペプチドは数多く同定できたものの、*Glu2* 由来のペプチドは同定できなかった。すなわち、タンパク質レベルでも *Glu1* の方が葉では多く蓄積していることは間違いないと思われる。これらの結果から、ACR11 は少なくとも *Glu1* にコードされている Fd-GOGAT には結合していると考えている。

また、野生株と *acr11* 変異株のトランスクリプトームをマイクロアレイで比較した結果、硝酸トランスポーターの発現量に差を認めたが、全体としてその差は非常に小さかった。この結果は、野生株と *acr11* 変異株の表現型の差がタンパク質レベルにおける制御の差であることを示唆している。

ACR11 の ACT ドメインにどのアミノ酸が結合するのかを調べるため、免疫沈降で ACR11 を精製し、遊離アミノ酸の結合を調べたが、残念ながら遊離アミノ酸の結合は確認できなかった。おそらくは免疫沈降の作業過程で外れてしまったものと思われる。ただし、ACR11 の ACT ドメインは GluN のグルタミン結合ドメインと似ていること、そして *acr11* 欠損株の表現型から、おそらくはグルタミンが

結合するのだろうと考えている。

これらの結果から、ACR11 はおそらくはグルタミン量をモニターし、それに反応して、Fd-GOGAT 量を制御していることが明らかになった。これら知見は植物の窒素代謝制御の基盤的理解において、重要である。これら結果については 2016 年に論文として報告した (Takabayashi et al. 2016)。

(2) ACR11 の制御を受けない Fd-GOGAT を持つ組み換え植物体の作製と評価

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 株の Fd-GOGAT にシロイヌナズナの RubisCO の葉緑体移行シグナルを付け、35S プロモーターの制御下で *acr11* 変異株に導入し、形質転換を行った。Preliminary なデータでは、得られた形質転換体は弱光下では *acr11* よりも成長が良く野生型と同等以上の生育を示したが、通常の生育条件ではそのような生育の有意な差が認められなかった。この理由として、ACR11 は Fd-GOGAT の制御に機能しているだけでなく、他の窒素代謝の酵素の制御に関与している可能性が考えられる。実際に、最近、GS の活性制御に機能していることも報告された。すなわち、*acr11* 欠損株は Fd-GOGAT の量が少ないだけでなく、他のアミノ酸代謝経路の活性も異なっている、複合的な表現型を持つと思われる。実際に、*acr11* 欠損株のアミノ酸プロファイルは *fd-gogat* 欠損株のアミノ酸プロファイルとは異なっている。

そこで現在は、*fd-gogat* 変異株に先ほどの形質転換ベクターを導入している。

## 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9件)

Furukawa R, Kunugi M, Ihara K, Takabayashi A, Tanaka A (2017) Complete Chloroplast Genome Sequence of the Early-Divergent Green Alga *Palmophyllum crassum*. *Genome Announc.*, 5(10), (e01745-16), doi: 10.1128/genomeA.01745-16 (査読有)

Bai L, Fujishiro T, Huang G, Koch J, Takabayashi A, Yokono M, Tanaka A, Xu T, Hu X, Ermler U, Shima S (2017) Towards artificial methanogenesis: biosynthesis of the [Fe]-hydrogenase cofactor and characterization of the semisynthetic hydrogenase. *Faraday Discuss.* doi: 10.1039/C6FD00209A (査読有)

Takabayashi A, Takabayashi S, Takahashi K, Watanabe M, Uchida H,

Murakami A, Fujita T, Ikeuchi M, Tanaka A (2017) PCoM-DB Update: A Protein Co-Migration Database for Photosynthetic Organisms. *Plant Cell Physiol.*, 58(1), (e10), doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw219> (査読有)

Takabayashi A, Niwata A, Tanaka, A (2016) Direct interaction with ACR11 is necessary for post-transcriptional control of GLU1-encoded ferredoxin-dependent glutamate synthase in leaves. *Sci. Rep.*, 6, (29668), doi:10.1038/srep29668 (査読有)

Ishikawa N, Takabayashi A, Noguchi K, Tazoe Y, Yamamoto H, von Caemmerer S, Sato F, Endo T (2016) NDH-Mediated Cyclic Electron Flow Around Photosystem I is Crucial for C<sub>4</sub> Photosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, 57(10), (2020-2028), doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw127> (査読有)

Kunugi M, Satoh S, Ihara K, Shibata K, Yamagishi Y, Kogame K, Obokata J, Takabayashi A and Tanaka A (2016) Evolution of Green Plants Accompanied Changes in Light-Harvesting Systems. *Plant Cell Physiol.*, 57(6), (1231-1243), doi: 10.1093/pcp/pcw071. (査読有)

Maekawa S, Takabayashi A, Huarancca R T, Yamamoto H, Tanaka A, Sato T, Yamaguchi J (2015) Pale-green phenotype of *at13at16* double mutant leaves is caused by disruption of 5-aminolevulinic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *PLoS One*, 10, (e0117662) doi: 10.1371/journal.pone.0117662. (査読有)

Yokono M, Takabayashi A, Akimoto S, Tanaka A (2015) A megacomplex composed of both photosystem reaction centres in higher plants. *Nature Communications*, 6, (6675), doi: 10.1038/ncomms7675. (査読有)

Takahashi K, Takabayashi A, Tanaka A, Tanaka R (2014) Functional analysis of light-harvesting-like protein 3 (LIL3) and its light-harvesting

chlorophyll-binding motif in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 289, (987-999), doi: 10.1074/jbc.M113.525428 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

高林厚史ら (2016)「窒素代謝制御因子 ACR11 の生理的機能の解析」日本植物生理学会、2017年3月16日~18日、鹿児島大学群元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

庭田章宏ら (2016)「グルタミン酸合成を制御するタンパク質複合体の解析」日本植物生理学会、2016年3月18日~20日、岩手大学上田キャンパス(岩手県盛岡市)

高林厚史ら (2015)「Comprehensive detection of chloroplastic protein complexes revealed the novel regulator of nitrogen metabolisms」日本植物生理学会、2015年3月16日~18日、東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区)

〔図書〕(計2件)

杉浦 美羽, 伊藤 繁, 南後 守(編) 高林厚史 (共著)「光合成のエネルギー・物質変換 人工光合成を目指して」, 化学同人, 220-221, (2015)

北海道大学低温科学研究所(編) 高林厚史 (共著)「低温科学便覧」, 丸善出版, 347-353, (2015)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/plantad>

[apt/](#)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高林厚史 ( TAKABAYASHI ATSUSHI )

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：90546417

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )