

令和元年9月4日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07813

研究課題名(和文)植物の新しい正の成長調節因子二酸化窒素のセンシング遺伝子の特定と受容機構の理解

研究課題名(英文)Study on sensing genes of nitrogen dioxide as a new growth regulator for plants

研究代表者

高橋 美佐 (Takahashi, Misa)

広島大学・理学研究科・助教

研究者番号：10294513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：二酸化窒素は植物の光形態形成(光による胚軸伸長抑制等)、栄養成長(バイオマス蓄積)および生殖成長(花芽形成)を促進する植物の正の成長調節因子である。二酸化窒素シグナルを受容し、細胞内シグナルに変換するセンシング遺伝子の特定は該制御機構解明の最重要課題の一つであるが、該遺伝子の情報は皆無に等しい。本研究では二酸化窒素センシング遺伝子の特定と受容機構の理解をめざす。胚軸伸長を指標として、シロイヌナズナT-DNA挿入変異体から二酸化窒素非感受性株を選抜、二酸化窒素センシング遺伝子を特定した。更に、二酸化窒素は該二酸化窒素センシング遺伝子の制御下にある一連の遺伝子群の発現を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二酸化窒素のセンシング遺伝子が特定され、その受容機構の理解が進み、二酸化窒素による植物の正の成長調節メカニズムが理解されると、二酸化窒素は自然にどこにでもあるものであるが故に環境無負荷、省エネルギーしかも高収量の画期的農業生産技術の開拓が期待される。更に、本研究の成果は、植物の成長調節制御機構の植物生物学の基礎の深化や二酸化窒素ガスによる植物の成長調節制御に関する新規学術領域の創成も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Atmospheric nitrogen dioxide (NO₂) at ambient concentrations (10-50 ppb) is as a novel positive growth regulator for plants. NO₂ accelerates cell proliferation and cell enlargement to nearly double organ size and shoot biomass in a variety of species including Arabidopsis. NO₂ also accelerates flowering time. Furthermore, NO₂ suppresses hypocotyl elongation in Arabidopsis. However, information on the NO₂-sensing mechanisms is scarce. In this study, I screened known and unknown Arabidopsis mutants that lack NO₂-mediated suppression of hypocotyl elongation, and obtained mutants that lack sensing NO₂. I also investigated NO₂-mediated regulation of expression of the genes that are controlled by the NO₂-sensing gene. It is suggested that NO₂ downregulates those NO₂-sensitive genes that are under the control of the NO₂-sensing gene to suppress hypocotyl elongation.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：シロイヌナズナ 胚軸伸長 二酸化窒素 窒素酸化物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

二酸化窒素は、大気微量成分の一つである。地質学的研究によると、原始地球の大気は N_2 を含むが O_2 や二酸化窒素は含まず、大気中二酸化窒素の出現はいわゆる great oxidation event の後、陸上植物が現れる数十億年前とされる。二酸化窒素は植物の進化に重要な役割を果たしてきたはずであるが、この視点からの研究は皆無に等しい。これまでに植物を環境基準レベル(10~50 ppb)の二酸化窒素を含む空気中で栽培(>数週間)すると、炭素、窒素、無機元素の取込み、光合成、硝酸還元、アミノ酸合成等代謝が活性化され、器官がサイズアップし、バイオマス蓄積が顕著に増えることを本申請者は世界に先駆けて発見した(Takahashi et al., 2004)。これが本研究の端緒である。

一酸化窒素はヒトの血管拡張作用をもつが、植物ホルモンの一つであり、オーキシシン、ジベレリン、サリチル酸などのシグナル伝達系を介して花芽形成遅延など多様な生理現象に参与する(He et al. Science 305:1968, 2004; Grün et al. J Exp Bot 57:507, 2006; Santner and Estelle, Nature 459:1071, 2009)。二酸化窒素が関与するシグナル伝達系としてサリチル酸経路(Xu et al. Bull Environ Contam Toxicol 84:106, 2010)やジベレリン経路が示唆された。

一酸化窒素センサーとして、可溶性グアニル酸シクラーゼ(Durner et al. PNAS 95:10328, 1998)、S-ニトロソ化を受ける転写因子タンパク質(Terrile et al. Plant J, 70: 492, 2012)、N-end rule 経路の基質となる同タンパク質(Gibbs et al. Mol Cell 53:369, 2014)などが報告されている。しかし、一酸化窒素の多様な生理機能制御との因果関係は必ずしも明確ではない。二酸化窒素センサーに関しては生物界を問わず全く情報がない。二酸化窒素が水と不均化反応して生ずる硝酸イオンと亜硝酸イオンの濃度は低く(10 ppb 二酸化窒素の処理条件では、0.01 nM 程度)、イオンが細胞内へ取込まれる可能性は低い(Ramge et al. New Phytol 125:771, 1993)。また、この値は、硝酸イオンの高アフィニティー・トランスポーターの K_m 値(Ho et al. Cell 138:1184, 2009)や亜硝酸イオントランスポーターの K_m 値(Sugiura et al. Plant Cell Physiol 48: 1022, 2007)よりも3桁以上小さい。申請者らは、二酸化窒素ガス分子が細胞壁中でアスコルビン酸などと反応して溶け込み(化学吸収され)、亜硝酸(HNO_2)の自由拡散または亜硝酸イオントランスポーターによる亜硝酸イオン輸送により、植物細胞内に取込まれるとの新しい考えを報告した(Takahashi et al., 2019)。二酸化窒素の成長調節作用の理解には二酸化窒素センシング遺伝子の特定とその受容機構の理解が必須である。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに二酸化窒素は植物の光形態形成(光による胚軸伸長抑制等)、栄養成長(バイオマス蓄積)および生殖成長(花芽形成)を促進する植物の正の成長調節因子であることを明らかにしてきた。二酸化窒素シグナルを受容し、細胞内シグナルに変換するセンシング遺伝子は該制御において核心的役割を果たすはずである。しかし、該二酸化窒素シグナルセンシング遺伝子の情報は皆無に等しい。本研究では二酸化窒素センシング遺伝子の特定と受容機構の理解をめざすものである。

シロイヌナズナなどでは、光に応答して胚軸伸長が抑制される。これは形態形成応答(光形態形成)の一つである(Achard et al. Plant Physiol 143:1163, 2007)。二酸化窒素はこの光形態形成を促進する(二酸化窒素すると胚軸長は非処理区比で短くなる)。胚軸伸長を指標として研究した(実験期間が大幅に短縮され、また測定した個体から種子を得ることが出来る)。本研究は、まず二酸化窒素処理で胚軸が野生株(対照区)よりも長くなる、または二酸化窒素処理の有無で胚軸長に差が観られなくなる二酸化窒素感受性を欠質した二酸化窒素非感受性変異株を T-DNA 挿入株から選抜した。選抜した二酸化窒素非感受性株の中から、二酸化窒素によるバイオマス蓄積/花成促進形質を失った二酸化窒素センシング遺伝子変異株を絞り込み、該変異株から T-DNA 挿入遺伝子をクローニングし、相補解析などを経て二酸化窒素センシング遺伝子を特定した。さらに、遺伝子間相互作用解析、タンパク質解析を経て同遺伝子による二酸化窒素受容機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

植物材料

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. アクセッション Col-0 の野生型、シロイヌナズナ T-DNA 挿入株(Alonso et al. Science 301:653, 2003)(約 50,000 ライン)および胚軸伸長、光形態形成に参与する遺伝子の T-DNA 挿入株を用いた。

植物栽培方法

種子をパーライトとバーミキュライト(1:1, v/v)に播種、4日間、二酸化窒素を含まない空気中で栽培した後、50 ppb 二酸化窒素を含む空気中(+ NO_2 植物)または二酸化窒素を含まない空気中(- NO_2 植物)で栽培した。栽培は NO_x 濃度制御曝露チャンバー内で $22 \pm 0.3^\circ C$ 、相対湿度

70 ± 4%、人工照明下 70 μmol photons/m²/s の条件下で行った。

胚軸長の解析および二酸化窒素非感受性個体（株）の選抜

播種後 1 2 日目の実生を採取して、アセテートシートで挟んでスキャナーでスキャンした。得られた画像を ImageJ ソフトウェアで解析して胚軸長の長さのデータを得た。播種後 1 2 日目に二酸化窒素存在下で、野生株に比べて胚軸長が長い、または二酸化窒素有無で差が観られない二酸化窒素非感受性個体（株）を選抜した。選抜した個体は、人工気象器に移して自殖種子を採取した。

二酸化窒素センシング遺伝子の特定

二酸化窒素有無で胚軸長に差が観られない T-DNA 挿入変異体について、PCR および塩基配列解析により T-DNA 挿入位置を確認した。

定量的リアルタイム PCR 解析

シロイヌナズナ野生株の実生から抽出した RNA を鋳型に逆転写反応を行った後、リアルタイム PCR 解析を行った。

タンパク質の発現解析

二酸化窒素センシング遺伝子のタグ融合タンパク質を発現したシロイヌナズナ実生から粗タンパク質を抽出後、SDS-PAGE で分離、PVDF 膜にブロッティングした後、抗タグ抗体を用いてウェスタンブロットを行った。バンドの濃さを ImageJ ソフトウェアで解析して比較した。

4. 研究成果

二酸化窒素非感受性株の取得

明所、二酸化窒素存在下で胚軸が野生株より長くなる、または二酸化窒素有無で胚軸長に差が観られなくなる二酸化窒素非感受性株のスクリーニングを行った。播種後 12 日目に胚軸長を測定して二酸化窒素存在下で栽培した植物と非存在下で栽培した植物で胚軸長に差が観られない二酸化窒素非感受性個体（株）を選抜した（図 1）。二酸化窒素存在下、非存在下で胚軸長に差を示さない二酸化窒素非感受性個体（株）として合計 4 系統（胚軸伸長に関与する遺伝子変異系統など）の T-DNA 挿入変異体を得た。

二酸化窒素センシング遺伝子の制御下にある遺伝子群の発現解析

定量的 PCR 法を用いて、二酸化窒素存在下、二酸化窒素存在下で栽培した野生株シュートにおける遺伝子発現解析を行った。その結果、解析を行った 9 遺伝子のうち 6 遺伝子について二酸化窒素によって発現が抑制されていた。

二酸化窒素センシング遺伝子の発現解析

定量的 PCR 法を用いて、二酸化窒素存在下、二酸化窒素存在下で栽培した野生株シュートにおける遺伝子発現解析を行った。4 時間ごとに 2 4 時間解析を行ったところ、ほぼ全ての時間において二酸化窒素有無で発現量に差は観られなかった。タンパク質を抽出して、抗タグ抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、二酸化窒素有無で発現量に差は観られなかった。故に、該遺伝子は二酸化窒素に応答して、その発現レベルを変えるのではなく、該遺伝子の制御下にある遺伝子群の発現応答を制御して、胚軸伸長を制御していると考えられる。

二酸化窒素センシング遺伝子 T-DNA 挿入変異体のバイオマス解析

二酸化窒素によるバイオマス蓄積増加と該遺伝子の関連を明らかにするために、該遺伝子の T-DNA 変異体を二酸化窒素有無の条件下で栽培して、バイオマス蓄積について調査した。その結果、該遺伝子の変異体は二酸化窒素存在下、非存在下でバイオマス蓄積に差が観察されなかった。以上の結果より、該遺伝子は二酸化窒素の胚軸伸長抑制のみならず、バイオマス蓄積にも関与することが示された。以上、シロイヌナズナにおいて二酸化窒素は本研究で特定した二酸化窒素センシング遺伝子とその制御下にある一連の遺伝子群の発現を抑制制御することにより胚軸伸長、

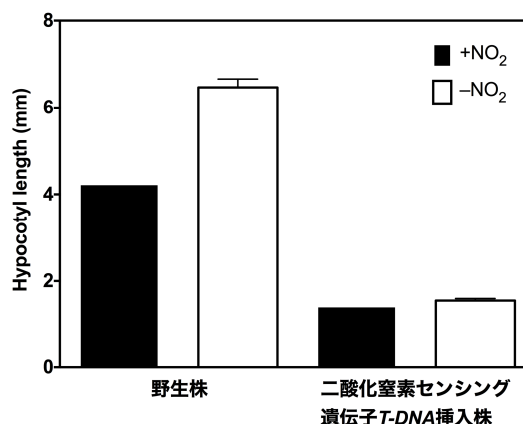


図 1. 野生株および変異体の胚軸伸長に対する二酸化窒素の効果。二酸化窒素センシング遺伝子変異体において NO₂ による胚軸伸長が消失した。各植物株を播種後 NO₂ 存在下または非存在下で 12 日間栽培した。

バイオマス蓄積を制御すると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

Misa Takahashi, Gen-Ichiro Arimura and Hiromichi Morikawa Dual nitrogen species involved in the foliar uptake of nitrogen dioxide in Arabidopsis thaliana. Plant Signaling & Behavior 査読有 14, 2019, e1582263.

Takahashi, M. and Morikawa, H. Nitrate, but not nitrite, derived from nitrogen dioxide accumulates in Arabidopsis leaves following exposure to ¹⁵N-labeled nitrogen dioxide. Plant Signaling & Behavior 査読有 14, 2019, 1559579.

Takahashi, M. and Morikawa, H. A novel role for PsbO1 in photosynthetic electron transport as suggested by its light-triggered selective nitration in Arabidopsis thaliana. Plant Signaling & Behavior 査読有 13, 2018, e1513298.

Takahashi, M., Shigeto, J., Sakamoto, A., and Morikawa, H. Selective nitration of PsbO1, PsbO2, and PsbP1 decreases PSII oxygen evolution and photochemical efficiency in intact leaves of Arabidopsis. Plant Signaling & Behavior 査読有 12, 2017, e1376157.

Takahashi, M., Shigeto, J., Sakamoto, A., and Morikawa, H. Selective nitration of PsbO1 inhibits oxygen evolution from isolated Arabidopsis thylakoid membranes. Plant Signaling & Behavior 査読有 12, 2017, e1304342.

Takahashi, M., Shigeto, J., Sakamoto, A., and Morikawa, H. Light-triggered selective nitration of PsbO1 in isolated Arabidopsis thylakoid membranes is inhibited by photosynthetic electron transport inhibitors. Plant Signaling & Behavior 査読有 11, 2016, e1263413.

Takahashi, M., Shigeto, J., Shibata, T., Sakamoto, A., and Morikawa, H. Differential abilities of nitrogen dioxide and nitrite to nitrate proteins in thylakoid membranes isolated from Arabidopsis leaves. Plant Signaling & Behavior 査読有 11, 2016, e1237329.

Takahashi, M., Shigeto, J., Izumi, S., Yoshizato, K. and Morikawa, H. Nitration is exclusive to defense-related PR-1, PR-3 and PR-5 proteins in tobacco leaves. Plant signaling & Behavior 査読有 11, 2016, e1197464.

Takahashi, M., Shigeto, J., Sakamoto, A., Izumi, S., Asada, K., and Morikawa, H. Dual selective nitration in Arabidopsis: Almost exclusive nitration of PsbO and PsbP, and highly susceptible nitration of four non-PSII proteins, including peroxiredoxin II E. Electrophoresis 査読有 36, 2015, 2569-2578.

Takahashi, M., Morikawa, H. Kinematic evidence that atmospheric nitrogen dioxide increases the rates of cell proliferation and enlargement to stimulate leaf expansion in Arabidopsis. Plant signaling & Behavior 査読有 10, 2015, e1022011.

〔学会発表〕(計2件)

高橋美佐、坂本 敦、森川弘道：二酸化窒素によるシロイヌナズナ胚軸伸長抑制には PIF4 が関与している 第 59 回日本植物生理学会年会 (2018 年)

高橋美佐、坂本 敦、森川弘道：PIF4 は二酸化窒素によるシロイヌナズナ胚軸伸長抑制に相反的である 第 58 回日本植物生理学会年会 (2017 年)

〔産業財産権〕

出願状況 (計4件)

名称：植物育成促進装置

発明者：藤峰智也、荒木敏成、碓真里耶、高橋美佐

権利者：特許出願人東京瓦斯株式会社、国立大学法人広島大学

種類：特許

番号：特願 2015-202018

出願年：2015 年

国内外の別：国内

名称：植物育成促進装置

発明者：藤峰智也、荒木敏成、碓真里耶、高橋美佐

権利者：特許出願人東京瓦斯株式会社、国立大学法人広島大学

種類：特許

番号：特願 2015-202019

出願年：2015 年

国内外の別：国内

名称：植物育成促進装置および植物栽培方法

発明者：藤峰智也、荒木敏成、碓真里耶、高橋美佐
権利者：特許出願人東京瓦斯株式会社、国立大学法人広島大学
種類：特許
番号：特願 2015-202016
出願年：2015 年
国内外の別： 国内
名称：植物育成促進装置および植物栽培方法
発明者：藤峰智也、荒木敏成、碓真里耶、高橋美佐
権利者：特許出願人東京瓦斯株式会社、国立大学法人広島大学
種類：特許
番号：特願 2015-202017
出願年：2015 年
国内外の別： 国内

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。