

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580098

研究課題名(和文) FNRとフェレドキシンアイソフォームによる窒素代謝と炭酸固定への電子伝達分配機構

研究課題名(英文) The mechanism of electron partitioning between carbon fixation and nitrogen assimilation via isoforms of FNR and ferredoxin

研究代表者

樋口 美栄子 (Higuchi, Mieko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：40443014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：光合成産物に由来する炭素代謝と窒素代謝への関与を解析するため、光合成電子伝達鎖の因子であるFNRとFdのアイソフォームの発現をシロイヌナズナとイネを用いて解析した。FNR1・FNR2・Fd1・Fd2の発現量は高二氧化碳濃度で低下し、Fd3・Fd4の発現量は増加していた。このことから高二氧化碳濃度ではFdのアイソフォーム量比により二酸化炭素固定への電子分配が行われる可能性が示唆された。またイネFNR2過剰発現体のみで窒素代謝に関与する遺伝子発現が増加していたことから、FNR1過剰発現体では光合成活性に障害がなく、FNR2では窒素代謝への電子分配が優先的に行われると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have investigated the gene expression profiles of Fd and FNR isoforms using Arabidopsis and rice plants. Gene expression profiles under elevated CO₂ condition demonstrated that expressions of FNR1, FNR2, Fd1 and Fd2 were decreased and Fd3 and Fd4 expressions were increased. This suggests that stoichiometry of Fd isoforms might be involved in electron partition to CO₂ fixation under elevated CO₂ condition. Gene expression profile using rice FNR1 and FNR2 overexpression plants revealed that expression of genes related to nitrogen metabolism were decreased only in FNR2 overexpression plants. This result suggests that electron might be preferentially transferred to nitrogen assimilation pathway in FNR2 overexpression plants whereas linear photosynthetic electron transport is not impaired in FNR1 overexpression plants.

研究分野：光合成

キーワード：炭酸固定 窒素代謝

1. 研究開始当初の背景

植物は光合成反応において、光エネルギーを利用して還元力と ATP を生産する。この還元力と ATP は様々な代謝経路において利用され、数多くの代謝産物を産み出している。なかでも光合成産物に由来する炭素代謝と窒素代謝は密接に関連しており、両者のバランスを保つ仕組みを持つことが知られている。

イネの有用遺伝子を迅速にかつ大量に探索する目的で、シロイヌナズナにおいてイネ完全長 cDNA を発現させた植物体が作出された。申請者はこの形質転換体ラインを用いて光合成に参与する遺伝子を探索し、光合成電子伝達鎖の構成因子であるフェレドキシン NADP+レダクターゼをコードする 2 コピーの遺伝子 (FNR1・FNR2) の機能解析を行った。FNR は光合成電子伝達鎖の構成因子であり、電子伝達の最終段階でフェレドキシンから電子を受け取り NADP+の還元を媒介する。また、フェレドキシンは FNR の他にも窒素代謝で働く亜硝酸還元酵素、グルタミン酸合成酵素、硫黄代謝で働く亜硫酸還元酵素、フェレドキシンチオレドキシン還元酵素にも電子を供与することが知られている。FNR 過剰発現体を用いた解析の結果、片方のアイソフォームの増加に伴い、もう片方のアイソフォームの量が減少することを発見した。さらに FNR1 が増加し FNR2 が減少すると NADP+への電子伝達が優先しておこり、逆に FNR2 が増加し FNR1 が減少すると窒素代謝への電子分配がすることを明らかにした。また、イネには 9 つのフェレドキシン様遺伝子が存在し、FNR 過剰発現体においていくつかのアイソフォームの発現量が増減することを発見した。

2. 研究の目的

本研究では、FNR1・FNR2 とフェレドキシンアイソフォームの発現様式や性質を解析することにより、窒素代謝と二酸化炭素固定への電子分配がどのように行われているのかについて明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ野生株の組織別・成育段階別から成る 16 条件(根、幼口ゼット葉、ロゼット葉、老化葉、茎生葉、茎、幼さや、さや、古さや、幼つぼみ、つぼみ、花、乾燥種子、吸水 24 時間種子、吸水 48 時間種子、カルス)から RNA を抽出した。

イネは、様々な組織・成育段階における 22 条件(葉身、葉鞘、節、節間、1 週間成育させた苗の種子根、1 週間成育させた苗の冠根、2 ヶ月成育させた冠根、乾燥種子、吸水種子、発芽種子、カルス、幼穂 (P2)、幼穂 (P3)、幼穂 (P4)、幼穂 (P5)、幼穂 (P6)、出穂 (S1)、出穂 (S2)、出穂 (S3)、出穂 (S4)、出穂 (S5))、カルスから RNA を抽出した。また、高二

化炭素濃度下と通常の二酸化炭素濃度においてシロイヌナズナを 2 週間まで生育させ、それぞれ 2 h, 6 h, 12 h, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d 2 つの二酸化炭素濃度下においた植物から RNA を抽出した。

イネについては、生育培地の硝酸アンモニウムの濃度をふり FNR1・FNR2 過剰発現体を生育させ、それぞれの植物体から RNA の抽出を行った。

4. 研究成果

イネの FNR1 と FNR2 は葉身・葉鞘で発現が高く、幼穂が発達する段階で発現が高くなっていき、開花後は徐々に発現が下がっていった。これらの組織での FNR1 と FNR2 の差は見られなかった。また異なる窒素濃度下でイネを生育させ、FNR1 と FNR2 の発現変化を観察した。その結果、アイソフォームの発現は窒素濃度依存性を示さず、両者とも同等な発現レベルを示した。次にフェレドキシンのアイソフォーム (Fd1・Fd2・Fd3・Fd4) の発現パターンを解析した結果、アイソフォームごとに発現量は異なるが、似たような発現パターンを示していた。

次に炭酸固定活性がより誘導される高二酸化炭素濃度で生育させたシロイヌナズナでの発現プロファイルについて経時変化(2 h, 6 h, 12 h, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d)の発現量を解析した。その結果、FNR1・FNR2 とともに高二酸化炭素濃度において若干発現量が低下しており、低下の度合いは LFNR1 において顕著であった。同様に Fd1・Fd2 についても若干の発現低下が観察された。一方、Fd3・Fd4 の発現は若干増加していた。メリステムにおける発現量も観察したところ、FNR2 が若干増加していた。また根で発現する RFNR についても高二酸化炭素濃度における発現を観察した結果、RFNR1・RFNR2 とともに若干増加していた。光合成関連遺伝子は高二酸化炭素条件では低下することが知られている。葉の FNR のアイソフォームは高二酸化炭素条件で減少していたが、フェレドキシンのアイソフォームには発現の違いが認められた。このことから、フェレドキシンアイソフォームなかでも Fd1 と Fd2 の量比により二酸化炭素固定への電子分配を制御している可能性が示唆された。

高二酸化炭素条件のフェレドキシンアイソフォームの発現パターンの違いにより、Fd1・Fd2 が光合成に参与し、Fd3・Fd4 がそれ以外への電子分配に参与する可能性が示唆された。そこでそれぞれのアイソフォームの共発現遺伝子について解析した。その結果、Fd1 は光化学系のサブユニットなどと共発現していた。Fd2 は同じく光化学系のサブユニットや集光タンパク質と共発現していた。Fd3 は二次代謝やペントースリン酸経路に関する遺伝子と共発現していた。また Fd3 は根の FNR のアイソフォームである RFNR1・RFNR とともに共発現していた。Fd4 と共発現している

遺伝子は機能未知のものが多く、また核局在のものも多く見受けられた。

フェレドキシンは窒素代謝と二酸化炭素固定の他に、光化学系Ⅰ循環的電子伝達・硫黄代謝にも電子分配を行うことが知られている。そこでこれらの FNR1・FNR2 過剰発現体 (FNR10E・FNR20E) におけるフェレドキシンの電子伝達に關与する遺伝子について発現量を解析した。窒素代謝に關与する硝酸レダクターゼは FNR10E では変化がなく、FNR20E で約 3 倍に増加していた。グルタミン合成酵素も同様な結果を示した。光化学系Ⅰ循環的電子伝達に關与する PGRL1 は野生型と同様であったが、PGR5 は FNR10E では変化が見られず、FNR20E で約 5 倍に増加していた。硫黄代謝に關与する亜硝酸レダクターゼは、両者において 0.6 倍の減少が見られた。フェレドキシン：チオレドキシン酸化還元酵素はほぼ野生型と変わらない発現を示した。FNR2 過剰発現体は窒素代謝への電子分配がより優先的に行われているため、硝酸レダクターゼやグルタミン合成酵素の発現が増加していると考えられる。一方、FNR10E では大きな遺伝子発現の変化が認められなかった。このことは、FNR10E は光合成活性に阻害が見られなかったためだと考えられる。

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 4 件)

1. Yoshizawa E, Kaizuka M, Yamagami A, Higuchi-Takeuchi M, Matsui M, Kakei Y, Shimada Y, Sakuta M, Osada H, Asami T, Nakano T. BPG3 is a novel chloroplast protein that involves the greening of leaves and related to brassinosteroid signaling. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;78(3):420-9. doi: 10.1080/09168451.2014.885831. (査読あり)
2. Okamoto M, Higuchi-Takeuchi M, Shimizu M, Shinozaki K, Hanada K. Substantial expression of novel small open reading frames in *Oryza sativa*. *Plant Signal Behav.* (2014) 9(2):e27848. (査読あり)
3. K*, Higuchi-Takeuchi M* (*Co-first author), Okamoto M, Yoshizumi T, Shimizu M, Nakaminami K, Nishi R, Ohashi C, Iida K, Tanaka M, Horii Y, Kawashima M, Matsui K, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M, and Matsui M. Small open reading frames associated with morphogenesis are hidden in plant genomes. *PNAS* (2013)

110(6):2395-2400. doi: 10.1073/pnas.1213958110. (査読あり)

4. Lyons R, Iwase A, Gänsewig T, Sherstnev A, Duc C, Barton GJ, Hanada K, Higuchi-Takeuchi M, Matsui M, Sugimoto K, Kazan K, Simpson GG, Shirasu K. The RNA-binding protein FPA regulates flg22-triggered defense responses and transcription factor activity by alternative polyadenylation. *Sci Rep.* (2013) 9:3:2866. doi: 10.1038/srep02866 (査読あり)

[学会発表](計 4 件)

1. Higuchi-Takeuchi M and Keiji Numata. Synthesis of polyhydroxyalkanoates by photosynthetic purple bacteria. 2015 年 12 月 15 日 - 20 日 The international chemical congress of PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015. ホノルル
2. Mieko Higuchi-Takeuchi and Keiji Numata. Investigation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) production in photosynthetic purple bacteria. 2015 年 7 月 5 日 - 8 日 7th international conference on Green and Sustainable Chemistry. 東京・一橋大学一橋講堂
3. 樋口(竹内)美栄子, 沼田圭司. ポリヒドロキシアルカン酸を生産する海洋性光合成細菌の同定. 2015 年 5 月 27 日 - 29 日 高分子学会 札幌・札幌コンベンションセンター
4. 樋口(竹内)美栄子, 沼田圭司. 海洋性光合成細菌によるポリヒドロキシアルカン酸の合成. 2015 年 3 月 16 日 - 18 日 植物生理学会 東京・東京農業大学

[図書](計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者
樋口 美栄子 (Higuchi
Mieko) 国立研究開発法人理化学研究
所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：40443014

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：