

令和元年5月30日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07045

研究課題名(和文)野生シロイヌナズナの大規模解析から探る気孔制御によるC/Nバランスの最適化機構

研究課題名(英文)The regulation mechanisms of carbon/nitrogen balance in *Arabidopsis thaliana* natural accessions

研究代表者

門田 慧奈 (MONDA, Keina)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：30782255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、植物の二酸化炭素応答と窒素応答のクロストーク機構の解明を目指し、野生シロイヌナズナの中から特徴的な二酸化炭素・窒素応答を示す系統を同定し、両応答に関する詳細解析を行った。これまでに野生シロイヌナズナ240系統について低窒素に対する成長応答解析を完了し、その中から見いだした低窒素条件において高成長を示す系統について窒素応答・二酸化炭素応答について解析を行った結果、この系統は低窒素条件で高い窒素同化や光合成能力を維持していることを明らかにした。さらにこの系統で見られた低窒素条件での高成長は植物体地上部を遮光すると起こらなくなることから、光がこの高成長の鍵を握っていると推測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、野生植物において窒素代謝バランスの変化が気孔の二酸化炭素応答性に与える影響について、実際的な知見を得た。さらに本研究で同定した特徴的な二酸化炭素・窒素応答を示すシロイヌナズナ系統は、低窒素条件で高い窒素同化や光合成能力を維持するなど、農業的に有益な優良アレルをもっている可能性が示された。現在は、この優良アレルの量的遺伝子座マッピング等による同定を開始しており、低窒素条件での生育に有利に働く優良アレルの染色体上の位置の推定を進めているところであるが、本研究から見出される新しいアレルは、環境適応能力を強化し、貧栄養環境での生産性を向上させた植物の作出に利用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The continued rise in atmospheric carbon dioxide (CO₂) is predicted to promote photosynthetic efficiency and plant growth; however, the actual increase in growth is not as dramatic as the rise in CO₂ because plants restrict CO₂ uptake from stomata under high CO₂ conditions. Moreover, the excess CO₂ uptake disturbs plant growth due to the carbon/nitrogen imbalance. In this study, I identified the *Arabidopsis* natural accession that exhibit both high uptake of CO₂ and nitrogen (thereby promoting their own growth under high CO₂ conditions) from 240 accessions. The major genes associated with the regulation mechanisms of carbon/nitrogen balance in the accession may contribute to the development of new breeds that improve productivity under high CO₂ conditions.

研究分野：植物生理学

キーワード：シロイヌナズナ 二酸化炭素 窒素 気孔

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

1. 研究開始当初の背景

植物の環境シグナルに対する応答の中でも、栄養応答は生存に直結する重要な反応である。植物を構成する主要元素である炭素と窒素は、タンパク質合成などの物質代謝に関与しており、植物の成長に大きな影響を与える。植物は炭素と窒素それぞれのシグナル伝達機構に加えて、細胞内の炭素および窒素代謝物の相対量比、すなわち炭素・窒素バランスを感知する仕組みを備えている。近年重大な問題となっている大気中二酸化炭素濃度の急激な上昇に対する植物の適応メカニズム理解のため、炭素・窒素バランス変化に対する植物の応答制御機構に注目が集まっている。これまでに私は炭素と窒素に対する植物の応答のうちの片方である炭素について、モデル植物であるシロイヌナズナの野生系統（エコタイプ）の二酸化炭素応答性を大規模に調査している。シロイヌナズナは北半球を中心に世界各地で生息している植物種であり、長い年月を経てそれぞれの生息地環境に適応した表現型を獲得してきた。これらエコタイプ集団を研究に用いることは、植物が実際の自然環境下で起こす複雑な応答メカニズムの解明のために有益である。本研究ではこのような研究を基盤にして、さらに窒素応答というファクターを加え、気孔における炭素・窒素応答のクロストーク機構の解析を行った。

2. 研究の目的

本研究では、急激な大気二酸化炭素濃度上昇に伴って重要度が高まることが予測されながらも、その実態解明が進んでいない二酸化炭素応答と窒素応答の関わりに焦点を当て、窒素代謝バランスの変化が植物気孔の二酸化炭素応答性に与える影響について、実際的な知見を得ることを目的とした。そのために実環境下において、ありのままの応答を観察できるシロイヌナズナエコタイプを用いた大規模解析を行い、系統の違いが生み出す応答バリエーションの中から特徴的な二酸化炭素・窒素応答性を示す系統を同定し、詳細解析を行った。

3. 研究の方法

まず、育成培地中の窒素濃度を変えたときの成長量を指標に、シロイヌナズナエコタイプ集団の窒素応答性の大規模解析を行い、各系統の窒素応答性の大きさをランク付けを行った。この解析の中で、特徴的な窒素応答性を示したエコタイプ（例えば、培地中の窒素濃度が減少しても成長に違いがないエコタイプなど）については、より詳しい窒素応答性解析に加え、二酸化炭素濃度変化時の気孔コンダクタンス・光合成速度の測定を行い、窒素応答と二酸化炭素応答の関連を調べた。さらに体内の炭素・窒素含有率やクロロフィル量の測定、マイクロアレイ・qRT-PCR による遺伝子発現解析を行い、二酸化炭素・窒素応答が生理学的または遺伝学的にどのような仕組みで制御されているか調査した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナエコタイプ集団の窒素応答性の大規模解析

これまでに計 240 系統のシロイヌナズナエコタイプ集団について、低窒素に対する成長応答解析を完了した。育成培地中の窒素濃度を通常育成培地（1/2 Murashige-Skoog 培地；窒素濃度 30 mM）の 1/2 にしたときの、植物の根および地上部の乾重量を指標にして、低窒素に対する植物の適応能力を調べたところ、系統間で大きな成長の差があることが分かった。具体的には、最も成長が悪い系統と最も成長が良い系統の間に、地上部では約 7.8 倍、根では約 9.3 倍の差があった。この解析の結果、E244 系統（独自の通し番号）を低窒素でも高成長を示す系統（低窒素適応能力の高い系統）として見いだした。

(2) 特徴的な窒素応答性を示す E244 系統の詳細な窒素応答解析および二酸化炭素応答解析

上述の大規模解析によって低窒素適応能力の高いシロイヌナズナエコタイプであることが見いだされた E244 系統について、その窒素応答性をさらに詳しく解析した。まず窒素条件の異なる培地（0.03 mM または 30 mM）で 10 日間、連続光下で生育させた根の主根長、側根の数、側根一本あたりの長さについて調べた。E244 は、窒素濃度 0.03 mM 条件において、主根の長さが標準系統である Col-0 に比べておよそ 50% 程度増加していたが、窒素濃度 30 mM 条件では大きな差は見られなかった。側根の数も同様の傾向が見られ、窒素濃度 0.03 mM 条件では 1 個体あたりに出現した側根の数が大きく増加していた。一方、側根一本あたりの長さは窒素条件に関わらず、E244 は Col-0 より側根が短い傾向だった。これらのことから、E244 は培地の栄養条件によって根の成長を抑制し、特に低窒素条件で主根と側根の成長を促進させることが明らかになった。同様の条件で地上部・根の乾重量を測定したところ、E244 は Col-0 に比べて乾重量が増加傾向にあり、特に窒素濃度 0.03 mM 条件において、E244 は Col-0 に比べて地上部がおおよそ 1.5 倍、根がおおよそ 3 倍程度の大きさになった。さらに地上部と根の乾重量比が、窒素濃度 0.03 mM 条件で大きく変化していた。以上より E244 系統が、低窒素条件において、Col-0 に比べて地上部・根ともに高成長を示すことが明らかになった。

次に二酸化炭素濃度を上昇させたときの気孔コンダクタンスを調べた。解析の結果、E244 は特に高二酸化炭素条件において Col-0 よりも気孔コンダクタンスが高いことが判明した。気孔コンダクタンスは、単位葉面積あたりで計算される値であるが、E244 は 1 個体あたりの葉面積の総和が Col-0 よりも大きいため、1 個体あたりの二酸化炭素取り込み量はさらに多いと考えられる。さらに、二酸化炭素濃度を上昇させたときの光合成速度を調べた。気孔コンダクタン

スの結果と同じく、E244 では特に高二酸化炭素条件において Col-0 よりも光合成速度が高くなっていた。これらの結果から、E244 は Col-0 に比べて二酸化炭素取り込み能力が高いことがわかった。このことが低窒素で高成長を示す理由のひとつだと考えられる。

(3) 特徴的な二酸化炭素・窒素応答性を示す E244 系統の詳細な生理学的・遺伝学的解析

ここまでの解析結果より、E244 では低窒素条件で高成長を示し、二酸化炭素取り込み能力も高いということ突き止めた。このような特徴的な二酸化炭素・窒素応答性を示す E244 の体内で起こっている生理的な変化を調べた。まず、地上部および根に含まれる炭素と窒素の割合を測定した。その結果、窒素含有率に比べて炭素含有率で変化が大きく、特に E244 は Col-0 に比べて地上部の乾燥重量あたりの炭素含有率の増加傾向が見られた。これは E244 では光合成能力が向上しているために、炭酸同化量が増加していることを指し示していると思われる。

次に、E244 の光合成能力の高さを調査する別の方法として、育成培地中の窒素濃度を変えたときの、地上部のクロロフィル含量を測定した。一般に植物は窒素が欠乏するとクロロフィル量が減少することが知られているが、Col-0 では窒素濃度 30 mM 条件に比べて、窒素濃度 0.03 mM 条件ではクロロフィル含量が少なくなっているのに対し、E244 では窒素濃度 0.03 mM 条件のときでもクロロフィル含量が多いことがわかった。この結果から、E244 が低窒素条件でもクロロフィル量が十分にあるため、光合成を活発に行えることが示された。

E244 で見られた低窒素における高成長と、光の関係をさらに調査した。窒素濃度 0.03 mM 条件で、光環境を地上部・根ともに光があたる状態、根を遮光し地上部のみに光があたる状態、地上部を遮光し、根のみに光があたる状態の 3 条件で生育し、根の成長を調べたところ、光環境が変わった事による成長の変化は見られたものの、根が遮光された場合では Col-0 に比べて E244 の方が主根長・側根数共に増加するのに対し、地上部が遮光された場合、主根長と側根数は Col-0 と同程度になった。このことから、E244 で見られた低窒素条件における根の高成長は、地上部が受ける光が影響していると考えられる。

また、E244 が低窒素条件で高成長を示す理由を遺伝子レベルで調査するため、遺伝子発現解析を行った。まず、マイクロアレイ解析によって、E244 の根における窒素応答関連遺伝子の発現量を Col-0 と比較した。硝酸輸送体の遺伝子は、窒素濃度 30 mM 条件においては概ね Col-0 と大きく発現量は変化しなかったが、窒素濃度 0.03 mM 条件では E244 の方が発現が高くなっていた。また硝酸還元酵素や硝酸代謝関連転写因子等の遺伝子の発現が、窒素濃度 0.03 mM 条件において Col-0 に比べて E244 で高くなっており、E244 は低窒素条件において高い窒素吸収・同化能力を持つ事が示唆された。

さらに、地上部・根における硝酸応答関連遺伝子 *NRT2.1*、*Nir1*、*NLP6* の発現を、qRT-PCR により定量した。どの遺伝子も、地上部においては Col-0 と E244 の発現量は同程度であったが、根において E244 は特徴的な発現変化を示した。高親和性の硝酸輸送体である *NRT2.1* では、窒素濃度 0.03 mM 条件で Col-0 よりもおおよそ 2 倍近い発現量を示す一方で、窒素濃度 30 mM 条件では Col-0 の 3 割程度まで発現が減少した。また亜硝酸還元酵素の *Nir1* はどちらの窒素条件でも Col-0 より 1.5 倍以上発現が高く、硝酸応答性の転写因子のひとつである *NLP6* は、窒素濃度 0.03 mM 条件において Col-0 よりも高発現していた。これらの結果からも、E244 の根では Col-0 よりも硝酸応答関連遺伝子が高発現しており、E244 は低窒素条件において高い窒素吸収・同化能力を持つ可能性が示された。

(4) 結論

以上のことより、シロイヌナズナエコタイプ E244 系統で見られた特徴的な二酸化炭素・窒素応答性には、高い光合成能力および窒素吸収・同化能力が関わっていることが示唆された。さらに地上部が受ける光がこの応答に関与している可能性が示された。今後、この形質をもたらす主動遺伝子を同定することで、植物の二酸化炭素・窒素応答クロストークに関するさらなる知見が得られると考えられる。また E244 は低窒素条件で高成長を示し、さらに光合成能力も高いという、農業的に有用な形質をもつことから、この主動遺伝子の同定によって、環境適応能力を強化し、貧栄養環境での生産性を向上させた植物の作出に利用できることが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Sakuraba Y, Kanno S, Mabuchi A, Monda K, Iba K, Yanagisawa S (2018) A phytochrome-B-mediated regulatory mechanism of phosphorus acquisition. *Nature Plants* 4 (12): 1089-1101. (査読有)

Takeuchi J, Mimura N, Okamoto M, Yajima S, Sue M, Akiyama T, Monda K, Iba K, Ohnishi T, Todoroki Y. (2018) Structure-based chemical design of abscisic acid antagonists that block PYL-PP2C receptor interactions. *ACS Chemical Biology* 13 (5): 1313-1321. (査読有)

Takahashi S, Monda K, Higaki T, Negi J, Hashimoto-Sugimoto M, Hasezawa S, Iba K. (2017) Differential effects of phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) and 3-kinase (PI3K) inhibitors on stomatal responses to environmental signals. *Front. Plant Sci.* 8: 677. (査読有)

〔学会発表〕(計 21件)

門田 慧奈, 東森 峻馬, 高橋 將, 祢宜 淳太郎, 馬淵 敦士, 寺島 一郎, 矢守 航, 射場 厚. クチクラ形成異常により表皮透過性が高まったシロイヌナズナ変異体 *ihc1* の光合成特性の解析. 第 60 回日本植物生理学会, 名古屋大学東山キャンパス, 2019 年 3 月 15-17 日.

馬淵 敦士, 門田 慧奈, 櫻庭 康仁, 祢宜 淳太郎, 柳澤 修一, 射場 厚. 窒素欠乏条件下で高成長を示すシロイヌナズナ野生系統の表現型解析. 第 60 回日本植物生理学会, 名古屋大学東山キャンパス, 2019 年 3 月 15-17 日.

櫻庭 康仁, 菅野 里美, 馬淵 敦士, 門田 慧奈, 射場 厚, 柳澤 修一. 地上部と地下部に存在するフィトクロムBのいずれもが赤色光シグナルによるリン酸獲得調節に関わる. 第60回日本植物生理学会, 名古屋大学東山キャンパス, 2019年3月15-17日.

馬淵 敦士, 門田 慧奈, 渡瀬 光瑠, 櫻庭 康仁, 祢宜 淳太郎, 柳澤 修一, 射場 厚. 低窒素条件下で高成長を示すシロイヌナズナ野生系統の N/CO₂ 応答性解析. 日本植物学会第 82 回大会, 広島国際会議場, 2018 年 9 月 14-16 日.

馬淵 敦士, 渡瀬 光瑠, 門田 慧奈, 櫻庭 康仁, 祢宜 淳太郎, 柳澤 修一, 射場 厚. シロイヌナズナ野生系統を用いた窒素応答性のゲノムワイド関連解析. 第 36 回日本植物細胞分子生物学会大会, 金沢商工会議所会館・石川県文教会館, 2018 年 8 月 26-28 日.

渡瀬 光瑠, 馬淵 敦士, 門田 慧奈, 櫻庭 康仁, 祢宜 淳太郎, 井内 聖, 柳澤 修一, 射場 厚. 日本独自のシロイヌナズナエコタイプにおける窒素応答の多様性解析. 第 36 回日本植物細胞分子生物学会大会, 金沢商工会議所会館・石川県文教会館, 2018 年 8 月 26-28 日.

門田 慧奈, 東森 峻馬, 祢宜 淳太郎, 馬淵 敦士, 檜垣 匠, 秋田 佳恵, 馳澤 盛一郎, 射場 厚. 光に対する気孔開閉応答性が低下したシロイヌナズナ変異体 *idr1* の解析. 日本動物学会九州支部 (第 71 回)、九州沖縄植物学会 (第 68 回)、日本生態学会九州地区会 (第 63 回) 三学会合同宮崎大会 2018, 宮崎大学木花キャンパス, 2018 年 5 月 26-27 日.

渡瀬 光瑠, 馬淵 敦士, 門田 慧奈, 祢宜 淳太郎, 井内 聖, 射場 厚. 日本独自の野生シロイヌナズナ集団を用いた窒素応答性の成長解析. 日本動物学会九州支部 (第 71 回)、九州沖縄植物学会 (第 68 回)、日本生態学会九州地区会 (第 63 回) 三学会合同宮崎大会 2018, 宮崎大学木花キャンパス, 2018 年 5 月 26-27 日.

馬淵 敦士, 門田 慧奈, 渡瀬 光瑠, 高橋 將, 櫻庭 康仁, 祢宜 淳太郎, 柳澤 修一, 射場 厚. シロイヌナズナエコタイプにおける窒素欠乏応答の多様性解析. 第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2018 年 3 月 28-30 日.

門田 慧奈. シロイヌナズナエコタイプにおける気孔の環境応答の多様性. 日本動物学会・九州沖縄植物学会・日本生態学会 合同福岡例会. 九州大学伊都キャンパス, 2017 年 12 月 16 日. (招待講演)

Saito S, Negi J, Monda K, Kojima M, Takebayashi Y, Sakakibara H, Iba K. A genetic screen for molecular components that modulates specifically in stomatal CO₂-signalling pathway. *Taiwan-Japan Plant Biology 2017*, Taipei, Taiwan, November 3-6, 2017. (国際大会)

Takahashi S, Monda K, Higaki T, Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Hasezawa S, Iba K. Screening of *Arabidopsis* mutants with low sensitivity to the phosphatidylinositol 4-kinase inhibitor, PAO, that decreases the dynamic PATROL1 movements in stomata. *Taiwan-Japan Plant Biology 2017*, Taipei, Taiwan, November 3-6, 2017. (国際大会)

Tohmori R, Monda K, Takahashi S, Negi J, Mabuchi A, Aikawa M, Kojima M, Takebayashi Y, Sakakibara H, Iba K. Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant, *ihc1*, having abnormalities in ABA-independent CO₂ signaling in guard cells. *Taiwan-Japan Plant Biology 2017*, Taipei, Taiwan, November 3-6, 2017. (国際大会)

Watase H, Mabuchi A, Monda K, Takahashi S, Sakuraba Y, Negi J, Yanagisawa S, Iba K. Identification of Novel N/CO₂-responsive Genes by GWAS in *Arabidopsis Thaliana*. *Taiwan-Japan Plant Biology 2017*, Taipei, Taiwan, November 3-6, 2017. (国際大会)

Monda K, Iba K. Environmental adaptation in stomatal size and aperture in *Arabidopsis* natural accessions. *5th International Symposium on Plant Signaling and Behavior*, Matsue, June 29, 2017. (招待講演・国際シンポジウム)

Monda K, Takahashi S, Negi J, Tohmori R, Mabuchi A, Kojima M, Takebayashi Y, Sakakibara H, Iba K. Isolation of *Arabidopsis* mutants with abnormalities in stomatal response to humidity, light, or CO₂. *The 28th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2017)*, St. Louis, USA, June 19-23, 2017. (国際大会)

Mabuchi A, Monda K, Takahashi S, Sakuraba Y, Negi J, Yanagisawa S, Iba K. Comparative analysis of distinct responses of *Arabidopsis* natural variations to N deficiency. *The 28th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2017)*, St. Louis, USA, June 19-23, 2017. (国際大会)

齋藤 早希子, 祢宜 淳太郎, 門田 慧奈, 小嶋 美紀子, 竹林 裕美子, 榊原 均, 射場 厚. CO₂シグナル伝達因子 HT1 の下流因子探索を目的とする変異体の単離と表現型解析. 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学郡元キャンパス, 2017年3月16-18日.

高橋 将, 門田 慧奈, 桧垣 匠, 橋本(杉本) 美海, 祢宜 淳太郎, 馳澤 盛一郎, 射場 厚. PI3 キナーゼ, PI4 キナーゼ阻害剤はそれぞれ異なる環境シグナルに対する気孔応答を阻害する. 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学郡元キャンパス, 2017年3月16-18日.

東森 峻馬, 門田 慧奈, 高橋 将, 祢宜 淳太郎, 馬淵 敦士, 相川 美里, 小嶋 美紀子, 竹林 裕美子, 榊原 均, 射場 厚. ABA と独立した気孔の環境シグナル伝達経路に異常をもつシロイヌナズナ変異体の単離. 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学郡元キャンパス, 2017 年 3 月 16-18 日.

- ②1 馬淵 敦士, 門田 慧奈, 高橋 将, 櫻庭 康仁, 祢宜 淳太郎, 柳澤 修一, 射場 厚. シロイヌナズナエコタイプ間でのCO₂/N 応答の比較解析. 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学郡元キャンパス, 2017年3月16-18日.

〔図書〕(計 1件)

高橋 将, 門田 慧奈, 祢宜 淳太郎, 射場 厚 (2017) サーマルイメージング法による気孔CO₂ 応答解析から見出された新たな植物環境応答機構. 光合成研究 第27巻第2号, 日本光合成学会, pp.84-93.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。