

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05926

研究課題名（和文）PIF4タンパク質制御による二酸化窒素センシング機構の解明

研究課題名（英文）Study on the sensing mechanism of nitrogen dioxide through PIF4 protein regulation

研究代表者

高橋 美佐（Takahashi, Misa）

広島大学・統合生命科学研究科（理）・助教

研究者番号：10294513

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：大気中二酸化窒素（10-50 ppb）はバイオマス蓄積の促進等栄養生長および花芽形成促進等生殖生長を正に制御する植物成長調節因子である。二酸化窒素のかかる調節機構の究明は植物生物学の基礎や新規学術領域の創成、また、環境無負荷、高収量の画期的農業生産技術の開拓の視点からも重要である。二酸化窒素のセンシング機構は、同調節分子機構の究明における必須不可欠の課題である。二酸化窒素不感受性は転写因子 PIF4 タンパク質量の減少 and/or 転写活性の低下に起因することを明らかにしており、本研究はその分子の実態を究明し、PIF4 タンパク質制御による二酸化窒素センシング機構の解明をめざす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、二酸化窒素センシングに関与するタンパク質遺伝子の特定とその機能の究明を目指すものであり、二酸化窒素の植物生理作用に関する新しい研究領域の創出に繋がる。また、二酸化窒素は自然にあるものであるが故に、省資源・省エネルギー、低コスト、無環境負荷の夢のような農業技術の開発が展望できる。

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. The investigation focuses on NO₂-mediated regulation of PIF4 protein activity and expression, suggesting that NO₂ downregulates PIF4 activity to suppress hypocotyl elongation. These findings contribute to our understanding of the positive growth effects of NO₂ on plants and shed light on the molecular mechanisms underlying NO₂-mediated plant growth regulation.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：二酸化窒素 シロイヌナズナ PIF4 胚軸伸長 環境応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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 N₂ を含むが O₂ 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考えられる。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。

植物を環境基準レベル (10~50 ppb) の二酸化窒素を含む空气中で栽培 (>数週間) すると、元素の取込み、代謝が活性化され、器官がサイズアップし、バイオマスが増えるなど植物が一般的に活性化され、上記濃度の二酸化窒素は正の植物成長調節因子であることを世界に先駆けて発見した。これが本研究の端緒である。

これまで、二酸化窒素の植物成長調節作用機構、特にその原因遺伝子について研究してきた。その中で、Phytochrome-interacting factor (PIF) 転写因子ファミリーに属する PIF4 タンパク質量の減少 and/or 質 (転写活性) の低下が二酸化窒素処理により特異的に誘導されることを新たに見出した。おそらく、PIF4 が二酸化窒素のターゲットタンパク質であり、二酸化窒素は PIF4 タンパク質が関与するセンシング機構で受容され、PIF4 タンパク質制御を介してクロロフィル合成活性化 光合成装置構成タンパク質の合成の活性化 植物成長促進を導くのではないかと考えている。

二酸化窒素センシングは、細胞内の二酸化窒素作用のターゲットタンパク質および該タンパク質と二酸化窒素の初期化学反応など初発反応を反映する過程であり、二酸化窒素作用機構における鍵となる最重要課題の一つである。

細胞内への二酸化窒素取り込み機構において、二酸化窒素の水溶解度は低く (Henry 定数 = $1.2 \times 10^{-2} \text{ Matm}^{-1}$)、50 ppb NO₂ 処理下では不均化反応で生成する硝酸イオンと亜硝酸イオン濃度 (10^{-11} M) は該トランスポーターの Km 値よりも 5 桁も小さく、これらイオンが細胞内へ取り込まれる量はわずかである (Ramge et al. *New Phytol* 125:771, 1993)。二酸化窒素はアポプラストに含まれるアスコルビン酸と反応して亜硝酸または亜硝酸イオンとして植物細胞内に取込まれる (reactive absorption メカニズム) [Ramge et al. *New Phytol* 125:771, 1993]。細胞内へ吸収された亜硝酸または亜硝酸イオンはヘモグロビンまたはペルオキシダーゼの働きで、二酸化窒素に一電子還元される。二酸化窒素は反応性の高い分子である。これまでに細胞内で二酸化窒素はタンパク質の翻訳後修飾 (ニトロ化) を誘導することを実証した。二酸化窒素のかかる高い反応性が二酸化窒素センシングにおいて何らかの役割を果たすのではないかと考えている。

2. 研究の目的

これまでに大気中に含まれる二酸化窒素 (10~50 ppb) はバイオマス蓄積の促進、栄養生長および花芽形成促進を正に制御する植物成長調節因子であることを明らかにした。二酸化窒素のかかる調節機構の究明は、植物生物学の基礎や新規学術領域の創成、また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の視点からも重要である。植物がどのように二酸化窒素を受容するか (センシング機構) は、同調節分子機構の解明における必須不可欠の課題である。これまでに、胚軸長を指標として胚軸伸長の二酸化窒素感受性欠失変異株を T-DNA 挿入ラインから選抜、解析し、同二酸化窒素不感受性株では転写因子 PIF4 タンパク質量の減少 and/or 転写活性が低下していると考えた。本研究はその分子の実態を究明し、PIF4 タンパク質制御による二酸化窒素センシング機構の解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) 二酸化窒素処理による PIF4 タンパク質および転写活性の解析

曝露チャンバー内で 50 ppb NO₂ 存在下 (+NO₂ 植物) および非存在下 (-NO₂ 植物) で、9 日間シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. アクセッション Col-0 の野生型) および PIF4::PIF4-Myc タンパク質を発現した形質転換体 (Yamashino et al. 2013) を栽培した。シロイヌナズナ植物体からタンパク質を抽出して、SDS-PAGE 後、メンブランに転写した。その後、抗 HA タグ抗体を用いたイムノブロット解析を行った。検出されたバンドは Image-J で定量して、+NO₂ 植物と -NO₂ 植物間で比較解析した。

9 日間栽培した植物について HA タグを用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を行った。PIF4 ターゲット遺伝子のプロモーター領域にデザインしたプライマーを用いて PCR 解析を行った。

(2) 二酸化窒素による PIF4 タンパク質修飾および PIF4 相互作用タンパク質の解析
PIF4pro::PIF4-HA/pif4 植物を二酸化窒素存在下で栽培した。タンパク質を抽出、抗 HA タグ抗体を用いてアフィニティ精製した後、SDS PAGE で分離、抗 HA タグ抗体および抗ニトロクロシン抗体を用いてウェスタンブロット解析した。
Myc タグ融合 PIF4 タンパク質をアフィニティ精製して質量分析により共精製されてきたタンパク質を特定して、二酸化窒素存在下で栽培した植物と対照区植物で比較解析した。

4. 研究成果

(1) PIF4 は bHLH 型転写因子で、ターゲット遺伝子の発現が二酸化窒素処理することによって、変動することを明らかにしている。二酸化窒素による PIF4 タンパク質量の減少または転写活性の低下について検証を行った。Myc タグ融合 PIF4 タンパク質を発現させた植物を二酸化窒素存在下で栽培して、ChIP 解析を行い、対照区 (-NO₂ 植物) と比較した。その結果、二酸化窒素存在下で栽培した植物では、PIF4 タンパク質はその制御下にある遺伝子プロモーター領域への結合が減少していることが示された。

二酸化窒素存在下で栽培した PIF4pro::PIF4-HA/pif4 植物タンパク質を SDS PAGE で分離、抗タグ抗体を用いてウェスタンブロット解析を行い、対照区植物と比較したところ、二酸化窒素は PIF4 タンパク質量に影響しないことが示された。以上の結果より、二酸化窒素処理により、PIF4 タンパク質の制御下にある遺伝子のプロモーター領域への PIF4 タンパク質の結合が阻害されることにより胚軸伸長が抑制されると考えられる (論文投稿中)。

(2) PIF4 タンパク質のプロモーター領域への結合の阻害の原因の一つに PIF4 タンパク質の修飾が考えられる。二酸化窒素はタンパク質のチロシン残基をニトロ化する。そこで、二酸化窒素存在下で栽培した PIF4pro::PIF4-HA/pif4 植物タンパク質をアフィニティ精製して、抗ニトロクロシン抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったが、バンドは検出されなかった。従って、PIF4 タンパク質のニトロ化は二酸化窒素による PIF4 活性抑制には関与しないと考えられる。

PIF4 は複合体を形成して機能することが知られている。従って、PIF4 タンパク質のプロモーター領域への結合阻害の原因として二酸化窒素による複合体形成阻害について解析を行った。Myc タグ融合 PIF4 タンパク質を発現した植物体を二酸化窒素存在下で栽培して、タンパク質を抽出して、アフィニティ精製して、回収されたタンパク質をデータ独立取得 (DIA) プロテオミクス解析して NO₂ 処理区 (+NO₂ 植物) および対照区 (-NO₂ 植物) についてタンパク質の同定と定量を行った。その結果、二酸化窒素存在下で栽培した植物において減少または増加するタンパク質を特定した。二酸化窒素存在下におけるこれらのタンパク質と PIF4 の相互作用について解析することで二酸化窒素センシング機能が解明されると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi Misa, Morikawa Hiromichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Nitrogen Dioxide at Ambient Concentrations Induces Nitration and Degradation of PYR/PYL/RCAR Receptors to Stimulate Plant Growth: A Hypothetical Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 198 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants8070198	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 Takahashi Misa, Arimura Gen-Ichiro, Morikawa Hiromichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Dual nitrogen species involved in foliar uptake of nitrogen dioxide in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 e1582263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2019.1582263	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 Takahashi Misa, Morikawa Hiromichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Nitrate, but not nitrite, derived from nitrogen dioxide accumulates in Arabidopsis leaves following exposure to ¹⁵ N-labeled nitrogen dioxide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1559579 ~ 1559579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2018.1559579	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 Takahashi Misa, Morikawa Hiromichi	4. 巻 13
2. 論文標題 A novel role for PsbO1 in photosynthetic electron transport as suggested by its light-triggered selective nitration in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 e1513298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2018.1513298	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 高橋美佐	4. 巻 9
2. 論文標題 1. 大気中二酸化窒素による植物成長促進	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Misa Takahashi, Atsushi Sakamoto and Hiromichi Morikawa
2. 発表標題 Atmospheric NO2 suppresses the transcriptional activity of PIF4 to suppress hypocotyl elongation in Arabidopsis
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 1. 高橋美佐、坂本 敦、森川弘道
2. 発表標題 Atmospheric nitrogen dioxide inhibits binding of PIF4 to the promoter region of auxin pathway genes to inhibit hypocotyl elongation in Arabidopsis
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋美佐、坂本 敦、森川弘道
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------