

## 自己評価報告書

平成 23 年 4 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~2011

課題番号：20380042

研究課題名 (和文) イネ植物体内における利用可能な窒素の情報検知機構と情報伝達経路の分子統御系の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of molecular regulation on sensing and signaling of available nitrogen in rice plants

研究代表者

早川 俊彦 (HAYAKAWA TOSHIHIKO)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：60261492

研究分野：植物分子栄養学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：植物代謝調節、遺伝子、シグナル伝達、発現制御

## 1. 研究計画の概要

植物体内での利用可能な窒素情報の検知・伝達機構は不明である。主要窒素代謝中間産物であり、かつ、植物の効率的窒素利用上重要な窒素転流機構の転送窒素形態の主体であるグルタミン(Gln)は、窒素シグナル候補分子とされ、植物における窒素代謝系遺伝子発現を制御するGln情報伝達系の存在が提唱された。本研究では、主要モデル穀物イネにおけるGlnシグナル検知因子候補としてのOsACR群やOsACTPK群の機能と窒素代謝系遺伝子群発現制御や窒素代謝調節への関与を検証・整理し、特に窒素の吸収同化・転流利用機構でのGln情報伝達系の階層的分子統御機作を解明する。

## 2. 研究の進捗状況

OsACR9, OsACTPK1 及び OsACTPK4 に関して研究を進めた。

## (1) アミノ酸結合能と窒素シグナル感知機能の解析及び相互作用因子の単離

組換え(r)上記タンパク質の大腸菌内発現系と精製系を構築し、アミノ酸固定アガロースクロマト解析やアミノ酸共存下の等温滴定型熱量測定解析により、これらのアミノ酸結合能を解析している。rOsACTPKのリン酸化活性解析の結果では、rOsACTPK4の自己リン酸化活性にGluとAspが正のエフェクター効果を示した。酵母two-Hybrid法により、OsACR9相互作用因子候補としてイネ推定転写因子を単離した。OsACTPKの標的リン酸化因子候補の単離も進めている。

## (2) イネ細胞内・組織・器官での発現解析

OsACR9は、イネのNH<sub>4</sub><sup>+</sup>処理後幼植物根、

未抽出葉身及び登熟初期玄米におけるGln応答性遺伝子発現細胞群に分布した。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>供与後のイネ幼植物根では、OsACTPK4 mRNAは極短時間で発現し、また、OsACTPK1 mRNAは、外来NH<sub>4</sub><sup>+</sup>充足下で顕著に蓄積した。GFP融合タンパク質のイネ細胞での一過的発現解析より、OsACR9とOsACTPK4の核局在及びOsACTPK1のサイトゾル・核両局在が示唆された。

## (3) 遺伝子破壊・発現抑制イネを用いた直接的機能検証

RNAi法によるOsACR9発現抑制イネと野生型イネの根のトランスクリプトーム解析より、OsACR9が発現調節に関わる可能性のあるGln応答性遺伝子候補を選抜した。Tos17挿入OsACTPK1破壊イネでは、対照系統と比較して、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>充足条件下で、根の伸長と乾物重の減少、地上部の生育と乾物重の増加、根と地上部の全窒素・遊離アミノ酸含量の増加、及び根のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>の吸収速度と蓄積量の増加が認められ、OsACTPK1が根のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>吸収制御に関わることが示唆された。

## 3. 現在までの達成度

## ④ 遅れている。

(理由)

OsACR9やOsACTPK1及びOsACTPK4のGlnや他アミノ酸との結合特性解析に用いるための上記タンパク質の可溶性組換えタンパク質高度精製標品の大量調製が、発現タンパク質の不溶化や凝集等により、困難を極めた。本研究で用いた酵母two-hybrid系でのスクリーニングには長期間を要し、OsACTPK1とOsACTPK4の標的リン酸化因子の単離には至

っていない。OsACTPK1 に関しては、抗体の特異性に問題があったためイネの細胞・組織分布を解析できなかった。*OsACR9* と *OsACTPK1* の過剰発現体イネは獲得していない。

#### 4. 今後の研究の推進方策

OsACTPK1 と *OsACR9* に関して研究を進める。

- (1) 大腸菌内大量発現系と高度精製系を改良し、アミノ酸固定アガロスクロマト解析やアミノ酸共存下の等温滴定型熱量測定解析に供するに足る rOsACR9 と rOsACTPK1 の調製に成功した。rOsACR9 と rOsACTPK1 の Gln 及び他アミノ酸に対する結合能を解析する。rOsACTPK1 のリン酸化活性に対する Gln や他アミノ酸のエフェクター効果も解析する。
- (2) OsACTPK1 はイネ根細胞の原形質膜の  $\text{NH}_4^+$  輸送に関わる膜タンパク質の輸送活性制御に直接・間接的に関わる可能性がある。膜タンパク質相互作用因子の探索に優れる split-ubiquitin 系酵母 two-hybrid 法にて、OsACTPK1 の相互作用・標的リン酸化タンパク質候補を単離する。また、OsACTPK1 とイネ原形質膜のアンモニウム輸送担体または単離相互作用因子候補の in vivo での相互作用を、イネ培養細胞における一過的共発現系での蛍光タンパク質再構成解析と免疫沈降法解析により検証する。OsACR9 と単離推定転写因子の相互作用も同様に検証する。各大腸菌内発現タンパク質精製標品を用いて、Gln や他のアミノ酸の共存下での OsACTPK1 によるイネアンモニウム輸送担体または相互作用因子へのリン酸化修飾の有無を検証する。アンモニウム輸送担体欠損酵母内で OsACTPK1 とイネアンモニウム輸送担体を共発現後、 $^{15}\text{NH}_4^+$  吸収の変化を解析する。
- (3) OsACTPK1 抗体は再度作成した。イネにおける OsACTPK1 の組織・細胞分布を免疫光学顕微鏡法により解析する。
- (4) *OsACTPK1-KO* イネについて、 $\text{NH}_4^+$  同化・窒素転流機構の鍵タンパク質・酵素群と関連炭素代謝系酵素群のタンパク質量・活性の変動を解析し、OsACTPK1 の機能を検討する。トランスクリプトーム解析にて、OsACTPK1 が発現調節する情報伝達系下流因子群や標的窒素代謝系・他代謝系の遺伝子候補を探索する。OsACR9 が発現調節に関わる可能性のある Gln 応答性遺伝子候補の発現変動を *OsACR9* 発現抑制イネと野生型イネ間で定量的に比較解析する。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 2 件)

1. 田村亘, 日高佑典, 田渕真由美, 小島創一, 早川俊彦 (5 番目), 他 5 名, Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants, *Amino Acids*, vol. 39, pp. 1003-1012, 2010 年, 査読有り
2. 工藤徹, 河合亜希子, 山谷知行, 早川俊彦, Cellular distribution of ACT domain repeat protein 9, a nuclear localizing protein, in rice (*Oryza sativa* L.), *Physiol. Plant.*, vol. 133, pp. 167-179, 2008 年, 査読有り

[学会発表] (計 23 件)

1. 谷合彰子, 澤勇己, 西濱夏海, 工藤徹, 小島創一, 山谷知行, 早川俊彦, イネにおけるグルタミン情報伝達系への関与が期待される新規 ACT ドメインプロテインキナーゼ様タンパク質 4 のリン酸化能解析, 日本土壤肥料学会, 2010 年 9 月 7 日, 北海道大学
2. 早川俊彦, 石田隆輔, 小林啓輔, 末吉邦, 工藤徹, 白戸陽子, 本郷貴胤, 小島創一, 山谷知行, Rice vacuolar membrane-localized amino acid transporter, OsATA1:2, transports glutamine, 1<sup>st</sup> International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, 2010 年 7 月 28 日, 犬山国際観光センター
3. 澤勇己, 西濱夏海, 小島創一, 山谷知行, 早川俊彦, イネ根における Gln センサー候補 OsACTPK 遺伝子族の発現特性と OsACTPK4 遺伝子破壊イネの解析, 日本土壤肥料学会, 2009 年 9 月 15 日, 京都大学
4. 河合亜希子, 工藤徹, 小島創一, 山谷知行, 早川俊彦, イネにおける ACT ドメインリピートタンパク質 9 (OsACR9) の制御下のグルタミン応答性遺伝子群候補と OsACR9 の相互作用因子候補の探索, 日本植物生理学会, 2009 年 3 月 21 日, 名古屋大学
5. 工藤徹, 河合亜希子, 山谷知行, 早川俊彦, イネ根での OsACR9 を介した窒素情報感知と窒素応答性遺伝子の発現制御機構に関する解析, 日本土壤肥料学会, 2008 年 9 月 9 日, 名古屋市立大学

[図書] (計 1 件)

1. 小島創一, 早川俊彦, Nicolaus von Wirén, 山谷知行, Research Signpost 社, Ammonium absorption and assimilation in plants. In “Nitrogen assimilation in plants”, 2010 年, pp. 51-66

[その他]

ホームページ

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/cellbio/index-j.html>