

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05771

研究課題名（和文）地上部の窒素栄養状態を根に伝達する長距離シグナルの解明

研究課題名（英文）Elucidation of long-distance signals that transmit nitrogen nutritional status from shoot to root

研究代表者

蜂谷 卓士（Hachiya, Takushi）

島根大学・学術研究院農生命科学系・助教

研究者番号：80709311

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）：本研究では、植物体地上部の窒素栄養状態を根に伝えるシグナルの解明を目指した。予備データから、シグナル候補としてリプレッサーXのmRNAとイソペンテニル型サイトカイニン（iP-CK）に着目した。本研究のために簡便かつ非破壊的に栄養操作できる移植実験系を構築し解析を進めた。しかしながら、リプレッサーXのmRNAとiP-CKがシグナルとして機能するエビデンスは得られなかった。一方、地上部に硝酸イオンが蓄積するとiP-CKのシグナルを介して地上部の成長と防御応答が促進されることや、根特異的にCKシグナルを低下させることによって地上部の成長が促進されること、などが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、地上部の硝酸イオンレベルの上昇にともなってイソペンテニル型サイトカイニンが合成されることがわかった。さらにイソペンテニル型サイトカイニンのシグナルを介して成長や防御応答が促進されることもわかった。これにより、植物が自身の窒素栄養状態に応じて成長や防御応答を制御する仕組みの一端がわかった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the signals that convey the nitrogen nutritional status from shoot to root in plants. Based on preliminary data, we focused on repressor X mRNA and isopentenyl cytokinin (iP-CK) as candidate signals. For this study, we constructed a simple and nondestructive nutritional manipulation transplantation system and proceeded with the analysis. As a result, no clear evidence was obtained that repressor X mRNA and iP-CK functioned as a signal. On the other hand, we found that the accumulation of nitrate ions in the shoot promoted shoot growth and defense responses mediated by iP-CK signaling, and that root-specific reduction of CK signaling promoted shoot growth.

研究分野：植物栄養生理学

キーワード：長距離シグナル 全身的応答 窒素充足 硝酸シグナル サイトカイニン 転写因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

窒素栄養の欠乏した植物は、根の成長と根の高親和性硝酸イオン輸送体の発現を促進することによって窒素吸収能力を高める。我々は、シロイヌナズナ地上部の硝酸イオン濃度の増加にともなって、根の成長と根の高親和性硝酸イオン輸送体の発現が抑制されることを見出した (Okamoto et al. 2019 Soil Sci Plant Nutr)。これにより、地上部の硝酸イオン濃度が、植物の窒素栄養状態 (腹の減り具合) の指標であることが示唆された。しかし、地上部の硝酸イオン濃度の情報をどのように根に伝達するかは未解明である。先行研究から、植物ホルモン、ペプチド、転写因子タンパク質、mRNA などが、地上部から根に篩管液中を移動することにより情報を伝達するシグナルであることが示唆されている (Thieme et al. 2015 Nat Plants; Fu et al. 2016 Curr Biol; Ohkubo et al. 2017 Nat Plants; Nishida et al. 2018 Nat Commun)。

### 2. 研究の目的

我々の予備的な解析から、植物ホルモンであるイソペンテニル型のサイトカイニンとリプレッサー X の mRNA が、地上部の窒素栄養状態を根に伝達する長距離シグナルである可能性が示唆された。本研究ではこれらの長距離シグナルとしての機能を解析することによって、植物体の全身的な窒素シグナル伝達経路の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

植物の窒素栄養応答の研究分野では、「根圏の窒素に対する応答」に比べて「植物体内の窒素に対する応答」の知見が極端に少ない。この理由は、窒素施肥の濃度や種類の操作実験が容易であるのに対して、植物体内で代謝されるさまざまな窒素化合物の濃度制御が難しいためである。我々は「植物体内に蓄積した硝酸イオンを消費できない」シロイヌナズナの硝酸還元酵素 (硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元する酵素) の破壊株と野生株を用いて、「根圏の窒素施肥濃度と植物体内の有機窒素濃度を一定に保ったまま、地上部の無機窒素 (硝酸イオン) 濃度のみを特異的に変化させる革新的な実験系」を構築している (Okamoto et al. 2019 Soil Sci Plant Nutr)。また、移植実験による栄養操作をより簡便かつ非破壊的に実施するためセロハンを用いた新たな移植実験系も構築した (Hachiya et al. 2021 Soil Sci Plant Nutr)。本研究ではシロイヌナズナの野生株、リプレッサー X の変異株・形質転換株、サイトカイニン関連の変異株・形質転換株をさまざまな組み合わせで接ぎ木した植物を上記の系で栽培し、次項の解析に用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) リプレッサー X の解析

長距離シグナル候補の一つであるリプレッサー X の mRNA について解析を進めた。まず、リプレッサー X の発現誘導にともなって、リプレッサー X の mRNA が地上部から根に移動し、根のターゲット遺伝子の発現を制御する可能性を検証した。タグ付きリプレッサー X のエストラジオール誘導型形質転換株の穂木をリプレッサー X の破壊株の台木に接いだ植物を作成し、Mock 処理とエストラジオール処理を施した後、根の mRNA レベルを解析した。その結果、エストラジオール処理した植物体の根では、タグ付きリプレッサー X の mRNA が検出され、リプレッサー X に制御されるマーカー遺伝子の発現が Mock 処理と比べて抑制された。次に、地上部の窒素栄養状態の充足によってリプレッサー X が発現誘導されたときに、リプレッサー X の mRNA が

地上部から根に移動する可能性を検証した。野生株とリプレッサーXの破壊株を相互接ぎ木し、高窒素処理を施した後、mRNAレベルを解析した。その結果、野生株を穂木、リプレッサーXの破壊株を台木とする植物の根において、リプレッサーXのmRNAは検出されなかった。以上の結果から、人為的な過剰発現と比べて、生理的に発現誘導されたリプレッサーXのmRNA量では、地上部から根に移動して機能するのに十分ではないことが示唆された。

## (2) イソペンテニル型サイトカイニンの解析

長距離シグナル候補の一つであるイソペンテニル型サイトカイニンについて解析を進めた。まず、野生株(WT)、サイトカイニン合成酵素欠損株(*ipt3*)、サイトカイニン合成酵素三重欠損株(*ipt357*)、硝酸還元酵素二重欠損株(NR-null)、硝酸還元酵素サイトカイニン合成酵素三重欠損株(*ipt3 NR-null*)をもちいて、WT/*ipt357*、*ipt3/ipt357*、NR-null/*ipt357*、*ipt3 NR-null/ipt357*(穂木/台木)の4種類の接ぎ木植物を作成した。次に、非破壊的栄養操作系をもちいて、これらの植物に硝酸イオンを蓄積させた後、窒素欠乏条件で栽培し、地上部と根を回収し、成長、窒素化合物濃度、サイトカイニン濃度、遺伝子発現などを解析した。その結果、WT/*ipt357*の地上部と比べNR-null/*ipt357*の地上部では、成長、硝酸イオン濃度、イソペンテニル型サイトカイニン濃度、IPT3遺伝子とサリチル酸合成・応答遺伝子の発現レベルがともに増加した。一方、*ipt3/ipt357*の地上部と比べ*ipt3 NR-null/ipt357*の地上部では、硝酸イオン濃度が増加したものの、成長、イソペンテニル型サイトカイニン濃度、サリチル酸合成・応答遺伝子の発現レベルは増加しなかった。このことから、地上部への硝酸イオンの蓄積にともなって地上部のイソペンテニル型サイトカイニンのシグナルが亢進することにより、地上部の成長と防御応答が促進されることが示唆された(論文投稿準備中)。一方、4種類の接ぎ木植物の間で葉の師管液中のサイトカイニン組成に大きな違いがなかった。WT/*ipt357*と*ipt3/ipt357*の根と比べ、NR-null/*ipt357*と*ipt3 NR-null/ipt357*の根では窒素欠乏誘導遺伝子の発現が抑制された。このことから、地上部への硝酸イオンの蓄積にともなって合成されるイソペンテニル型サイトカイニンは、地上部の窒素栄養状態を根に伝達する長距離シグナルではない可能性が示唆された。

次に根のサイトカイニンシグナルが地上部に与える影響を解析するために、WTを穂木、WTまたはサイトカイニン受容体二重欠損株(*ahk2,3*)を台木とした接ぎ木植物(WT/WTとWT/*ahk2,3*)を窒素十分条件で栽培し、成長、遺伝子発現、サイトカイニン濃度などを調べた。その結果、WT/WTと比べてWT/*ahk2,3*では、根におけるサイトカイニン合成酵素と分解酵素の遺伝子発現がそれぞれ誘導、抑制され、根と地上部におけるサイトカイニン濃度が増加するとともに、地上部の成長が促進された。根のサイトカイニンシグナルを制御することにより地上部の成長を制御できる可能性が示唆された(Monden et al. 2022 Plant Cell Physiol)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hachiya Takushi, Inaba Jun, Wakazaki Mayumi, Sato Mayuko, Toyooka Kiminori, Miyagi Atsuko, Kawai-Yamada Maki, Sugiura Daisuke, Nakagawa Tsuyoshi, Kiba Takatoshi, Gojon Alain, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Excessive ammonium assimilation by plastidic glutamine synthetase causes ammonium toxicity in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25238-7	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 該当する
1. 著者名 Shibasaki Kyohei, Takebayashi Arika, Makita Nobue, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Kawai Misato, Hachiya Takushi, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Nitrogen Nutrition Promotes Rhizome Bud Outgrowth via Regulation of Cytokinin Biosynthesis Genes and an <i>Oryza longistaminata</i> Ortholog of FINE CULM 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 670101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.670101	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 Monden Kota, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Suzuki Takamasa, Nakagawa Tsuyoshi, Sakakibara Hitoshi, Hachiya Takushi	4. 巻 63
2. 論文標題 Root-specific Reduction of Cytokinin Perception Enhances Shoot Growth in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 484 ~ 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac013	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 Hossain Md. Firose, Sultana Mst Montaz, Tanaka Ai, Dutta Amit Kumar, Hachiya Takushi, Nakagawa Tsuyoshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Expression analysis of plant intracellular Ras-group related leucine-rich repeat proteins (PIRLs) in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101241 ~ 101241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101241	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 該当する

1. 著者名 Kawai Misato, Tabata Ryo, Ohashi Miwa, Honda Haruno, Kamiya Takehiro, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Oishi Shunsuke, Okamoto Satoru, Hachiya Takushi, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 188
2. 論文標題 Regulation of ammonium acquisition and use in <i>Oryza longistaminata</i> ramets under nitrogen source heterogeneity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2364 ~ 2376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiac025	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 Hachiya Takushi, Oya Takahiro, Monden Kouta, Nagae Ami, Nakagawa Tsuyoshi	4. 巻 未定
2. 論文標題 A cellophane-supported Arabidopsis culture for seamless transfer between different media is useful for studying various nitrogen responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2021.1908094	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 Otsuka Kurataka, Mamiya Akihito, Konishi Mineko, Nozaki Mamoru, Kinoshita Atsuko, Tamaki Hiroaki, Arita Masaki, Saito Masato, Yamamoto Kayoko, Hachiya Takushi, Noguchi Ko, Ueda Takashi, Yagi Yusuke, Kobayashi Takehito, Nakamura Takahiro, Sato Yasushi, Hirayama Takashi, Sugiyama Munetaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Temperature-dependent fasciation mutants provide a link between mitochondrial RNA processing and lateral root morphogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.61611	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 Hossain Md. Firose, Dutta Amit Kumar, Suzuki Takamasa, Higashiyama Tetsuya, Miyamoto Chiharu, Ishiguro Sumie, Maruta Takanori, Muto Yuki, Nishimura Kohji, Ishida Hideki, Aboulela Mostafa, Hachiya Takushi, Nakagawa Tsuyoshi	4. 巻 257
2. 論文標題 Targeted expression of bgl23-D, a dominant-negative allele of ATCSLD5, affects cytokinesis of guard mother cells and exine formation of pollen in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00425-023-04097-0	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 該当する

1. 著者名 Monden Kota, Kamiya Takehiro, Sugiura Daisuke, Suzuki Takamasa, Nakagawa Tsuyoshi, Hachiya Takushi	4. 巻 621
2. 論文標題 Root-specific activation of plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase 1 enhances plant growth and shoot accumulation of nutrient elements under nutrient-poor conditions in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 39 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.06.097	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 Tabata Ryo, Kamiya Takehiro, Imoto Shunpei, Tamura Hana, Ikuta Kumiko, Tabata Michika, Hirayama Tasuku, Tsukagoshi Hironaka, Tanoi Keitaro, Suzuki Takamasa, Hachiya Takushi, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 63
2. 論文標題 Systemic Regulation of Iron Acquisition by <i>Arabidopsis</i> in Environments with Heterogeneous Iron Distributions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 842 ~ 854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac049	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 蜂谷卓士
2. 発表標題 硝酸還元と呼吸鎖の相互作用に関する解析
3. 学会等名 植物の栄養研究会 第 6 回交流会 2021年11月13日 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蜂谷卓士, 大屋卓博, 門田宏太, 永江杏実, 中川 強
2. 発表標題 A cellophane-supported <i>Arabidopsis</i> culture for seamless transfer between different media is useful for analyzing various nitrogen responses
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会 2021年9月14日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 門田宏太, 小嶋美紀子, 竹林裕美子, 鈴木孝征, 中川強, 榎原均, 蜂谷卓士
2. 発表標題 根特異的なサイトカイニン受容の低下が地上部のトランスゼアチン型サイトカイニンとバイオマスを増加させる
3. 学会等名 日本植物学会 第85回大会 2021年9月18日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蜂谷卓士
2. 発表標題 操作実験とオミクス解析による植物の栄養応答の研究
3. 学会等名 令和3年度生物資源科学部研究セミナー(第41回(招待講演))
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門田宏太, 鈴木孝征, 中川強, 蜂谷卓士
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける根特異的なサイトカイニンシグナルの欠損が地上部のトランスクリプトームに与える影響の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会年会(松江)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蜂谷卓士
2. 発表標題 局所的・全身的なサイトカイニンシグナルの同時制御による高成長性植物の開発
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会: シンポジウム(1S09e) 植物の長距離情報伝達による栄養獲得と成長の制御(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Md. Firose Hossain, Amit Kumar Dutta, Sumie Ishiguro, Takushi Hachiya, Tsuyoshi Nakagawa
2. 発表標題	Targeted expression of cDNA for bage123-D (bg123-D), a dominant negative mutation allele of ATCSLD5 (Arabidopsis thaliana Cellulose Synthase-Like D5), alters cytokinesis in stomata development, exine structure in pollen formation, and plant growth in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名	日本農芸化学会中四国支部第62回講演会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	門田宏太, 神谷岳洋, 杉浦大輔, 鈴木孝征, 中川 強, 蜂谷卓士
2. 発表標題	シロイヌナズナの根特異的なプロトン駆動力の増強による栄養塩吸収能力の強化
3. 学会等名	日本土壌肥料学会第68回大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	乙丸 大輔, 押井 夏海, 鈴木孝征, 中川 強, 蜂谷 卓士
2. 発表標題	シロイヌナズナにおける硝酸還元反応低下時の呼吸鎖末端酸化酵素AOXの生理機能の解析
3. 学会等名	日本植物学会 第86回大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	門田 宏太, 小嶋 美紀子, 竹林 裕美子, 鈴木 孝征, 中川 強, 榊原 均, 蜂谷 卓士
2. 発表標題	シロイヌナズナにおける地上部で合成されるイソペンテニルアデニン型サイトカイニンの新たな生理機能の解明
3. 学会等名	第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 門田宏太, 蜂谷卓士
2. 発表標題 地上部の硝酸イオン充足により合成されるイソペンテニルアデニン型サイトカイニンの新たな生理機能の解明
3. 学会等名 植物の栄養研究会 第7回研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 葛原大貴, 中川 強, 蜂谷卓士
2. 発表標題 Gatewayベクターにおけるネガティブコントロールコンストラクト作製システムの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第64回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 蜂谷卓士, 中川強, 榊原均
2. 発表標題 シロイヌナズナ硝酸トランスセプター NRT1.1/NPF6.3 の硝酸非依存的機能に関する包括的解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 門田宏太, 小嶋美紀子, 竹林裕美子, 鈴木孝征, 杉浦大輔, 中川強, 榊原 均, 蜂谷卓士
2. 発表標題 地上部で合成されるイソペンテニル アデニン型サイトカイニンの新たな 生理機能の解明
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------