

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21271

研究課題名（和文）エノコログサを用いた遺伝学的アプローチによる植物の窒素欠乏感知・応答機構の解明

研究課題名（英文）Nitrogen starvation response in a C4 model plant, *Setaria viridis*

研究代表者

木羽 隆敏（Kiba, Takatoshi）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：20532097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：自然環境でしばしば遭遇する窒素欠乏を、植物がどのように感知し応答するのかについて、その分子メカニズムの理解は進んでいない。その原因として、シロイヌナズナを用いた順遺伝学的アプローチが限界に近づいていることが挙げられる。そこで本研究では、C4単子葉植物であるエノコログサを、新たな順遺伝学的研究材料として開発することで、この問題解決に挑戦した。エノコログサA10.1系統のゲノム配列の高精度解読、598種のエコタイプのゲノム配列解析、変異体ライブラリーの作製、幼植物および成熟植物に窒素欠乏を引き起こさせる栽培条件の決定、窒素欠乏に対する生理的応答の基礎データ収集などを行ない、研究基盤の整備を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究がさらに進展し、多くの研究者がエノコログサを順遺伝学的研究に容易に利用できるようになれば、窒素欠乏感知・応答機構を含め植物に普遍的な生命現象についての理解だけでなく、C4植物に特徴的な生命現象の研究の方向性にも大きな変革をもたらすであろう。特筆すべきは、エノコログサが、トウモロコシなど、その大きさゆえに遺伝学的研究には様々な困難が伴う作物と同じC4植物であることである。エノコログサを用いれば、これまで不可能だった実験系も可能となり、C4光合成成立の仕組み、C4植物に特徴的な高い窒素利用効率や乾燥耐性を支えるメカニズム、C4草本雑草防除の研究にも大きな波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanisms of how plants sense and respond to nitrogen deficiency, which they often encounter in the natural environment, are not well understood. One reason for this is that the forward genetic approach using *Arabidopsis* is approaching its limits. In this study, we attempted to solve this problem by developing a new forward genetic research material, *Setaria viridis*, a C4 monocotyledonous plant. To this end, we produced a platinum-quality genome assembly and de novo assemblies for 598 wild accessions, created a mutant library, determined the cultivation conditions that induce nitrogen deficiency in juvenile and mature plants, and collected basic data on the physiological response of the plant to nitrogen deficiency.

研究分野：植物栄養学

キーワード：窒素欠乏応答 エノコログサ 窒素栄養

1. 研究開始当初の背景

窒素は植物の成長・生産性を規定する最も重要な栄養の1つであるが、土壌中の窒素栄養の量は植物の生育にとって十分ではないことが多い。そのため植物は代謝から形態に及ぶドラスティックな応答を示すことにより、窒素欠乏環境に適応して生き延びている。この適応メカニズム(窒素欠乏応答)の研究は、窒素肥料低投入の持続的農業に適した優良品種の開発につながると期待される。しかし窒素欠乏応答制御メカニズムの理解は未だ断片的であるばかりでなく、植物の窒素欠乏感知のメカニズムも全く不明であり、さらなる研究の推進が求められている。シロイヌナズナを用いた研究では昔から順遺伝学的アプローチが王道であるが、最近では成功例が少なくなっており、このアプローチは限界に近づいている可能性がある。遺伝子、シロイヌナズナ特有の代謝や情報伝達経路の冗長性がその原因として挙げられる。そこで本申請研究では、単子葉C₄植物であるエノコログサ(*Setaria viridis*)を新たな順遺伝学的研究材料として開発することで、この問題解決に挑戦した。

エノコログサはイネ科エノコログサ属の一年生草本で、トウモロコシと同じサブタイプのC₄光合成を行う。また実験室レベルで遺伝学の研究材料として扱いやすい特徴をすべて備えている (Brutnell et al. 2010)。さらにこの植物は窒素栄養環境に対する適応能力が高く、窒素栄養の競合により作物の成長や収量に影響を与える農地の雑草としても有名である (Douglas et al. 1985)。特に低窒素環境において高い競合能を発揮することから、エノコログサは高い窒素欠乏応答性を持つと考えられている (Cathcart 2004)。しかし、エノコログサの窒素欠乏応答について詳しく調べた報告は存在しなかった。

[Reference] Brutnell et al (2010) Plant Cell, 22, 2537-2544; Cathcart (2004) Weed Sci., 52, 1039-1049; Douglas et al (1985) Can. J. Plant Sci., 65, 669-690

2. 研究の目的

我々はエノコログサを順遺伝学的研究材料として用いるため、アメリカのグループと共同で、ゲノム解読、cDNA ライブラリー構築、重イオンビーム変異体系統の作出など、研究ツールの整備を進めてきた。本研究では、上記の研究ツールの整備を進めつつ、世界に先駆けてエノコログサを用いて窒素欠乏感知・応答制御メカニズムの順遺伝学的研究を行うためのパイプラインを構築・運用することを目指した。具体的には、(1)栽培条件の検討と基盤データの収集、(2)順遺伝学的解析の材料整備、(3)形質転換効率の向上を行なった。

3. 研究の方法

(1) エノコログサ A10.1 系統を様々な条件(窒素栄養、培地)で栽培し、幼植物および成熟植物において、生理的パラメーター(硝酸イオン含量、生重量、クロロフィル量)を測定した。このデータをもとに、根と地上部をサンプリングでき、かつ窒素欠乏を引き起こせる栽培条件の検討をおこなった。どの条件でも培養液には、Hoagland 培養液をベースにしたものを用いた。

決定した栽培条件において、生理的パラメーターの定量化を行うとともに、窒素欠乏に晒した幼植物から抽出した mRNA のトランスクリプトーム解析をおこなった。

(2) エノコログサ A10.1 系統の乾燥種子に重イオンビーム照射により変異を導入した(M1)

変異体スクリーニングに用いるため、M1 世代の植物を栽培し、M2 種子を得た。

(3) エノコログサの形質転換は、完熟種子の胚盤由来カルスに *A. tumefaciens* 感染させる方法で可能であるが、効率が数% (完熟種子あたり得られる形質転換個体) と低い点が問題であった。他の植物の情報をもとに、カルス誘導培地と再分化培地の組成を検討した。

4. 研究成果

(1) 栽培条件の検討と基盤データの収集

・ 幼植物に窒素欠乏を引き起こさせる栽培条件

幼植物に窒素欠乏を引き起こさせる栽培条件を検討するため、発芽後 2 日目の幼植物を、様々な濃度の硝酸イオンを含む寒天培地 (0.15、0.3、0.75、1.5、3、7.5、15 mM) で 5 日間栽培した。生理的パラメーターを観察した結果、硝酸イオン含量は培地の濃度に応じて変化するが、生重量とクロロフィル量に変化が見られるのは 0.3 mM 以下の場合のみであった。このことから、この栽培条件においては、0.3 mM 以下の濃度で栽培すれば、幼植物に窒素欠乏を引き起こせること、0.3 mM より大幅に高い濃度であれば窒素充足であることがわかった。

・ 成熟植物に窒素欠乏を引き起こさせる栽培条件

成熟植物に窒素欠乏を引き起こさせ、かつ根もサンプリングできる栽培条件を検討するため、担体として赤玉土、川砂、ロックウール、パーミキュライト、様々なサイズの珪砂を用いての栽培を行なった。また水耕栽培も行なった。その結果、4 号珪砂が植物の生長、培地交換 (窒素充足から窒素欠乏) と根のサンプリングがしやすさの観点から最適であった。様々な濃度の硝酸イオンを含む培地で栽培したところ、4 号珪砂で栽培した場合、硝酸イオン濃度は 7.5 mM 以上であれば窒素充足であると判断できるデータを得た。

・ エノコログサの窒素欠乏応答の定量化

幼植物において、様々な濃度で硝酸イオンを含む寒天培地 (0.15、0.3、5、15 mM) で栽培した場合と、15 mM 硝酸イオンを含む培地から無窒素培地に移した場合の、硝酸イオン含量、クロロフィル量、生重量、根の形態の経時的変化を定量化した。窒素欠乏に応答して、種子根の成長停止と特徴的な側根の発達が見出された。

15 mM 硝酸イオンを含む培地で栽培した成熟植物 (発芽後 17 日、4 葉齢) を、無窒素培地に移し、その後の硝酸イオン含量、クロロフィル量、生重量、地上部の形態の経時的変化を定量化した。窒素欠乏に応答して、出穂の促進と分げつ数の減少が見出された。また出穂の促進と分げつ数の減少は、短期間の窒素欠乏処理によっても引き起こされることも判明した。

・ 窒素欠乏に応答したトランスクリプトーム変化の解析

15 mM 硝酸イオンを含む培地から無窒素培地に移した幼植物の根と地上部を経時的にサンプリングし、mRNA を得た。それらの mRNA を、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit (Illumina) でライブラリー化し、Nextseq550 (シングルリード 81 bp) でシーケンスを行なった。シーケンスデータ解析のためにパイプラインを構築し、短期 / 長期の窒素欠乏に応じて発現変化する遺伝子を多数同定した。

・ ゲノムリソースの整備

A10.1 系統のゲノムおよび様々な条件で栽培した full-length cDNA 配列のシーケンスデータを次世代シーケンシングにより取得することにより、エノコログサ A10.1 系統

のゲノム配列の高精度解読と 598 種のエコタイプのゲノム配列解析を行った(Mamidi et al. 2020)。

(2) 順遺伝学的解析の材料整備

・変異体ライブラリー作製

理化学研究所仁科加速器科学研究センターの阿部チームリーダーの協力のもと、乾燥種子に様々な条件で重イオンビーム照射を行なった(25 から 400 Gy of $^{12}\text{C}^{6+}$ ions, 22.5 または 50 keV/ μm LET)。生存率と葉色変異体の出現頻度から、50 Gy、22.5 keV/ μm LET を最適な照射条件と判断し、その条件で照射した M1 種子を播種・栽培して M2 を約 5000 ラインまで増幅した。

・GWAS 解析

598 種のエコタイプのゲノム配列を入手し、解析パイプライン構築のための準備は整えた。

(1)において見出した、窒素欠乏に応答した花成促進および分けつ抑制を指標に GWAS 解析を行う予定であったが、新型コロナウイルス感染症に係る渡航制限等のため、これらエコタイプの入手ができず GWAS 解析は断念した。

(3) 形質転換効率の向上

完熟種子の胚盤由来カルスに *A. tumefaciens* 感染させる方法の報告は複数あるが、形質転換効率は高いとは言えない(数%)。カルス誘導と再分化の効率が悪いことが原因として考えられたため、カルスの増殖や再分化に促進的な働きをもつことが報告されている硝酸銀(10-100 μM)と硫酸銅(1-10 μM)を様々な濃度で加えた培地を用いて形質転換効率を調べた。その結果、カルス誘導培地に 2.5 μM 硫酸銅を、再分化培地に 2.5 μM 硫酸銅と 30 μM 硝酸銀を加えると、形質転換効率が 10%以上に上昇することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 6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 Sanagi Miho, Aoyama Shoki, Kubo Akio, Lu Yu, Sato Yasutake, Ito Shogo, Abe Mitsutomo, Mitsuda Nobutaka, Ohme-Takagi Masaru, Kiba Takatoshi, Nakagami Hirofumi, Rolland Filip, Yamaguchi Junji, Imaizumi Takato, Sato Takeo | 4. 巻 118 |
| 2. 論文標題 Low nitrogen conditions accelerate flowering by modulating the phosphorylation state of FLOWERING BHLH 4 in <i>Arabidopsis</i> | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 e2022942118 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2022942118 | 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 木羽 隆敏、小西 美穂子、柳澤 修一 | 4. 巻 92 |
| 2. 論文標題 植物における窒素の輸送機構 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 日本土壌肥科学雑誌 | 6. 最初と最後の頁 76～91 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20710/dojo.92.2_76 | 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 - |
| 1. 著者名 Mamidi Sujana, Healey Adam, Huang Pu, Grimwood Jane, Jenkins Jerry, Barry Kerrie, Sreedasyam Avinash, Shu Shengqiang, Lovell John T., Feldman Maximilian, Wu Jinxia, Yu Yunqing, Chen Cindy, Johnson Jennifer, Sakakibara Hitoshi, Kiba Takatoshi et al. | 4. 巻 38 |
| 2. 論文標題 A genome resource for green millet <i>Setaria viridis</i> enables discovery of agronomically valuable loci | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nature Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 1203～1210 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41587-020-0681-2 | 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 Ueda Yoshiaki, Nosaki Shohei, Sakuraba Yasuhito, Miyakawa Takuya, Kiba Takatoshi, Tanokura Masaru, Yanagisawa Shuichi | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 NIGT1 family proteins exhibit dual mode DNA recognition to regulate nutrient response associated genes in Arabidopsis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLOS Genetics | 6. 最初と最後の頁 1-27 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009197 | 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 Ueda Yoshiaki, Kiba Takatoshi, Yanagisawa Shuichi | 4. 巻 102 |
| 2. 論文標題 Nitrate inducible NIGT1 proteins modulate phosphate uptake and starvation signalling via transcriptional regulation of SPX genes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The Plant Journal | 6. 最初と最後の頁 448 ~ 466 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14637 | 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 Takatoshi Kiba, Gabriel Krouk | 4. 巻 57 |
| 2. 論文標題 Nitrogen and Phosphorus interactions in plants: from agronomic to physiological and molecular insights. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology | 6. 最初と最後の頁 104-109 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbi.2020.07.002 | 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 Perez-Alonso M.M., Guerrero-Galan, C., Scholz, S.S., Kiba, T., Sakakibara, H., Ludwig-Muller, J., Krapp, A., Oelmuller, R., Vicente-Carbajosa, J., Polimann, S. | 4. 巻 54 |
| 2. 論文標題 Harnessing symbiotic plant-fungus interactions to unleash hidden forces from extreme plant ecosystems. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany | 6. 最初と最後の頁 137-142 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/eraa040 | 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 |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 木羽隆敏 |
| 2. 発表標題 植物ホルモン・サイトカイニンによる植物成長制御-側鎖修飾と長距離輸送の仕組みと役割- |
| 3. 学会等名 第255回遺伝子機能解析部門セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takatoshi Kiba, Kahori Mizutani, Yumiko Takebayashi, Mikiko Kojima, Tokunori Hobo, Hitoshi Sakakibara |
| 2. 発表標題 The physiological role of trans-zeatin-type cytokinins in rice |
| 3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田畑亮, 井本駿平, 田村花, 神谷岳洋, 木羽隆敏, 榊原均 |
| 2. 発表標題 シロイヌナズナにおける器官間シグナル伝達を介した鉄吸収制御 |
| 3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 木下悟, 鈴木孝征, 木羽隆敏, 榊原均, 木下俊則 |
| 2. 発表標題 光合成依存的な細胞膜H ⁺ -ATPaseの活性化を介したシロイヌナズナ葉での硝酸取り込みの解析 |
| 3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木嵩弘, 橋本(杉本)美海, 森仁志, 木羽隆敏, 榊原均 |
| 2. 発表標題 Agrobacteriumサイトカイニン合成酵素Tmrの宿主細胞内プラスチドへの輸送経路の解析 |
| 3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 眞木美帆, 久保晃生, 佐藤靖武, Filip Rolland, 木羽隆敏, 高木純平, 今泉貴登, 山口淳二, 佐藤長緒 |
| 2. 発表標題 窒素栄養欠乏時の代謝と成長相転換制御に関わる転写因子の機能解析 |
| 3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 木羽隆敏, 橋本祐典, 小嶋美紀子, 竹林裕美子, 榊原均 |
| 2. 発表標題 ABCG14を介した根から地上部へのサイトカイニン長距離輸送のメカニズム |
| 3. 学会等名 日本植物学会第84回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 木羽隆敏, 工藤徹, 矢野健太郎, 加藤紀夫 |
| 2. 発表標題 Identification of cis-regulatory elements that confers high expression |
| 3. 学会等名 第62回植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|-------------------------------|-----------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 遺伝子の発現を高める方法 | 発明者 木羽隆敏、加藤紀夫、矢野 健太郎、工藤徹 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2021-134983 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

| |
|---|
| https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~ck/ |
|---|

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 |
|-------|--|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | Bellegarde Fanny (Bellegarde Fanny) (20867618) | 名古屋大学・生命農学研究科・特任助教 (13901) | |

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 | | |
|---------|--------------------------------------|---|------------------------------------|
| 米国 | Donald Danforth Plant Science Center | HudsonAlpha Institute for Biotechnology | Dep. Energy Joint Genome Institute |