

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380043

研究課題名(和文) 高等植物における硝酸応答型遺伝子発現の制御メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying nitrate-responsive gene expression in higher plants

研究代表者

柳澤 修一 (Yanagisawa, Shuichi)

東京大学・生物生産工学研究センター・准教授

研究者番号：20222359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：植物の主要な窒素源である硝酸態窒素は植物体内でシグナル伝達物質としても働き、硝酸同化関連酵素遺伝子を含む多様な遺伝子の発現を制御している。この硝酸応答型の遺伝子発現の分子機構を明らかにすることを目的として、本研究では、シロイヌナズナを用いて硝酸応答のための鍵転写因子としてNLP転写因子群を同定した。また、NLPは翻訳後制御によって活性化され、活性化されたNLPが硝酸応答性遺伝子の大多数の発現を担っていることを示した。さらに、重要作物であるトウモロコシにおいてもNLP転写因子群が硝酸応答のために類似の役割を担っている可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：In plants, nitrate is not only a major nitrogen source but also a signaling molecule that modulates the expression of a wide range of genes, including the genes that encode nitrate assimilation-related enzymes. To reveal molecular mechanisms underlying nitrate-responsive gene expression, we identified NLPs as key transcription factors controlling nitrate-responsive gene expression and nitrate-inducible plant responses in this study. We showed that the NLP transcription factors are post-translationally activated by nitrate and then promote transcription of most of nitrate-inducible genes in Arabidopsis. Furthermore, we also suggested that the NLP transcription factors play similar roles in nitrate responses in an important crop, maize.

研究分野：農学

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 硝酸応答 硝酸シグナル 遺伝子発現 転写因子 栄養代謝調節

1. 研究開始当初の背景

植物は、土壤中の無機態窒素を吸収し、同化して、アミノ酸、核酸、クロロフィルなどの生長に必須な窒素原子を含む有機化合物の生合成を行って生長しているため、同化窒素量は植物の生長量あるいは物質生産量の重要な決定因子の一つである。このことから、窒素同化システムの制御メカニズムの解明は、農学的に非常に重要な研究課題となっている。

窒素同化システムを制御する重要な要素は土壤中の硝酸態窒素の存在量である。陸上の酸化的な環境では、多くの植物にとって土壤中の硝酸態窒素が主要な窒素源となっており、植物細胞に吸収された硝酸イオンは、亜硝酸イオンを経てアンモニウムイオンへと還元され、アミノ酸に取り込まれる。このように硝酸イオンは窒素原子を含む有機化合物の生合成のための原料として利用される。一方で、これまでの様々な研究によって、硝酸イオンはシグナル伝達物質としても働き、硝酸同化関連酵素遺伝子を含む多様な遺伝子の発現を制御して、さまざまな植物の応答を引き起こしていることが示唆されている。硝酸イオンによって引き起こされる広範囲な遺伝子発現の変化は非常に重要性であることから、その発現制御の分子メカニズムに関する研究が世界的に盛んに行われてきている。実際、幾つかの転写因子と見られるタンパク質が硝酸シグナルの伝達と応答に関わっていることも示唆されている。しかしながら、硝酸イオンに反応して最初に引き起こされる遺伝子発現の変化を直接的に制御している転写因子は同定されておらず、硝酸応答型の遺伝子発現の制御メカニズムはほぼ未解明である。

2. 研究の目的

硝酸イオンに反応した遺伝子発現の制御機構の解明が遅れていることの大きな理由の一つとして、硝酸イオンに反応した遺伝子発現制御のために必要かつ十分な DNA 配列 (シス配列) が同定されていなかったことがあげられる。さまざまな研究グループがプロモーター解析を行ってきたが、硝酸応答に必要な十分な高等植物のシス配列は特定されていなかった。我々の研究グループでは、シロイヌナズナの硝酸還元酵素遺伝子 (*NIA1*) と亜硝酸還元酵素遺伝子 (*NIR1*) の遺伝子発現機構の解析を行い、硝酸応答に必要な十分なシス配列 (Nitrate-responsive *cis*-element; NRE) の同定に成功した。この成果に基づいて、本研究課題では、このシス配列に作用する転写因子を同定することにより、硝酸応答型の遺伝子発現の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *NIR1* プロモーター中に同定していた 42bp の NRE に塩基配列特異的に結合するシ

ロイヌナズナの DNA 結合タンパク質の cDNA のクローニングは酵母 One-hybrid 法を用いて行った。得られた cDNA クローンの産物の NRE 配列への特異的結合はゲル移動度シフト法によって検証した。

(2) クローン化した cDNA の産物の転写活性化因子としての活性の検証はシロイヌナズナのプロトプラストを用いた一過的発現系を用いて行った。

(3) クローン化した cDNA の産物の硝酸応答性の解析は、キメラ転写因子を作製することによって行った。

(4) クローン化した cDNA の産物の植物個体レベルでの機能解析は、転写抑制ドメインを付加することにより転写抑制因子へと変換したものを強発現している形質転換シロイヌナズナを作出することにより行った。

(5) 重要作物であるトウモロコシの相同遺伝子の産物が同様の活性を持つことの検証はトウモロコシのプロトプラストを用いた一過的発現系を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 硝酸応答の実体を担う転写因子の同定のために、*NIR1* プロモーター中の NRE 配列に結合する転写因子を酵母ワンハイブリッド法によるスクリーニングを行い、NIN/NLP ファミリーに属する遺伝子由来のシロイヌナズナ cDNA クローンを単離した。マメ科植物における根粒形成に必須な因子として NODULE INCEPTION (NIN) が最初に同定され、その後、NIN と構造上、非常に類似しているタンパク質はマメ科植物以外にも存在していることが判明して、これら機能未知のタンパク質は NIN 様タンパク質 (NIN-like protein, NLP) と呼ばれてきていた。今回、単離された cDNA は、シロイヌナズナには 9 つ存在している NLP (NLP1-9) のいずれかをコードしていた。また、9 つの NLP に対応する cDNA がほぼ全て得られたことから、NLP の大部分が NRE 結合タンパク質であることが示唆された。そこで、NLP が塩基配列特異的に NRE 配列に結合するかどうかを組換え NLP タンパク質を用いたゲル移動度シフトアッセイにより調べた。その結果、調べた全ての NLP は野生型の NRE 配列には結合するが、硝酸応答性を失った変異型 NRE 配列には結合しないことが確認された。これによって、NLP が NRE 配列に結合して硝酸誘導性の遺伝子発現を担っている転写因子である可能性が示唆された。

(2) NLP の転写因子としての機能解析をシロイヌナズナのプロトプラストを用いた一過的発現系によって行った。その結果、NLP は植物細胞内で NRE に塩基配列特異的に結合して転写を活性化する転写活性化因子であることが明らかとなった。さらに、VP16 転写活性化ドメインを融合させることにより転写促進因子としての活性を強化した NLP を発現している形質転換シロイヌナズ

ナを作出して、この形質転換体における硝酸誘導性遺伝子の発現を調べた。その結果も、NLP が植物体において NRE に結合して *NIR* を含むさまざまな硝酸誘導性遺伝子の転写活性化を行っていることを示唆した。

(3) NLPは硝酸シグナルを伝達する最初の転写因子であるならば、転写制御ではなく翻訳後調節によってNLP活性が硝酸シグナルの伝達に应答して誘導されると考えられた。そこで、硝酸シグナルの受信に関わるドメインの同定を試みた。まず、内在性のNLPの活性と区別して硝酸応答性を解析するアッセイ系として、主要なNLPの一つであるNLP6のDNA結合ドメインよりN末端側領域とバクテリアのDNA結合タンパク質 (LexA)との融合タンパク質 (NLP6(N)-LexA) を植物細胞内で恒常的に発現させるためのベクターを構築し、これをLexA結合配列の制御下で発現するGUSレポーター遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナに導入した。その結果、NLP6(N)-LexA は硝酸イオンを与えた場合にのみGUS遺伝子の転写を促進することが判明した。一方で、NLP6のDNA結合ドメインとVP16転写活性化ドメインの融合タンパク質 (NLP6-VP16) は硝酸処理とは無関係に恒常的に転写促進活性を示すことも明らかとなった。このような結果から、NLPはN末端側領域に存在する硝酸シグナル受信ドメインを介して翻訳後制御によって活性化され、活性化されたNLPがNRE配列を介して硝酸応答性遺伝子の発現を誘導するという硝酸応答型遺伝子発現の制御機構のモデルを示した (図1)。

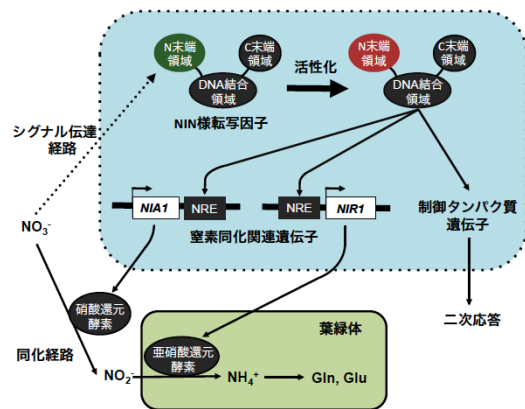


図1 .NLPによる硝酸応答性遺伝子の発現制御のモデル図 .

(4) NLPの個体レベルでの機能を明らかにするために、NLP6 に転写抑制因子の転写抑制ドメインを付加することによって転写抑制因子へと変換したものを恒常的に発現している形質転換シロイヌナズナを作出した。この形質転換体の DNA マイクロアレイ解析を行った結果、NLP活性の阻害によって硝酸処理によって誘導される大多数の遺伝子発現が抑制されていることが明らかとなり、NLP が硝酸応答型遺伝子発現のためのマ

スター制御因子として機能していることを示した。一方で、この形質転換シロイヌナズナは、硝酸還元酵素遺伝子の変異株と異なり、窒素源として硝酸イオンとアンモニウムイオンの両方が存在する場合においても、生育不良を示すことも明らかにした。この結果から、硝酸シグナルはNLPを介して硝酸同化経路だけでなく、他の硝酸応答も制御していることが示唆された (図1)。

(5) 農業的に極めて重要な作物であるトウモロコシにおいてもNLPが硝酸応答機構に関わっているかをトウモロコシのプロトプラストを用いた一過的発現系を用いて調べた。その結果、トウモロコシにはNLPホモログが複数個、存在しているが、これらはトウモロコシの亜硝酸還元酵素遺伝子プロモーター上に存在するNRE配列に結合して、この遺伝子プロモーターを活性化できることが確認された。このことから、NLPを介した硝酸応答機構は植物界に広く存在する分子機構であることが示唆された。

高等植物における硝酸態窒素に应答した遺伝子発現の分子機構を明らかにするために、硝酸応答型転写因子としてNLPを同定し、この転写因子が硝酸応答のためのマスター制御因子であることを突き止めた。この研究成果は、窒素応答機構の解明に向けた大きな一歩となると期待される。

5 . 主な発表論文等

(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 11 件)

1. Konishi, M. and Yanagisawa, S. (2013) An NLP-binding site in the 3' flanking region of the nitrate reductase gene confers nitrate-inducible expression in Arabidopsis. *Soil Science and Plant Nutrition*. 59: 612-620. 査読有 . (DOI:10.1080/00380768.2013.809602)
2. Suzuki, W., Konishi, M., and Yanagisawa, S. (2013) The evolutionary events necessary for the emergence of symbiotic nitrogen fixation in legumes may involve a loss of nitrate responsiveness of the NIN transcription factor. *Plant Signaling & Behavior* 8: e25975. 査読有 . (DOI :10.4161/psb.25975)
3. Konishi, M., and Yanagisawa, S. (2013) Arabidopsis NIN-like transcription factors play a central role in nitrate signalling. *Nature Communications* 4: 1617. 査読有 (doi: 10.1038/ncomms2621)
4. Yanagisawa, S. (2013) Characterization of a nitrate-inducible transcriptional repressor NIGT1 provides new insights into DNA recognition by the GARP family proteins. *Plant Signaling & Behavior* 8: e24447. 査読有 . (doi: 10.4161/psb.24447)

5. Sawaki, N., Tsujimoto, R., Shigyo, M., Konishi, M., Toki, S., Fujiwara, T., and Yanagisawa, S. (2013) A nitrate-inducible GARP family gene encodes an auto-repressible transcriptional repressor in rice. *Plant and Cell Physiology* 54: 506-517. 査読有 (doi:10.1093/pcp/pct007)
 6. Sugiyama, T., Ishida, T., Tabei, N., Shigyo, M., Konishi, M., Yoneyama, T., and Yanagisawa, S. (2012) Involvement of PpDof1 transcriptional repressor in the nutrient condition-dependent growth control of protonemal filaments in *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* 63: 3185-3197. 査読有. (doi: 10.1093/jxb/ers042)
 7. Hamamoto, K., Aki, T., Shigyo, M., Sato, S., Ishida, T., Yano, K., Yoneyama, T., and Yanagisawa, S. (2012) Proteomic characterization of the greening process in rice seedlings using the MS spectral intensity-based label free method. *Journal of Proteome Research* 11: 331-347. 査読有. (doi: 10.1021/pr200852q)
 8. Konishi, M., and Yanagisawa, S. (2011) The regulatory region controlling the nitrate-responsive expression of a nitrate reductase gene, *NIA1*, in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 52: 824-836. 査読有. (doi: 10.1093/pcp/pcr033)
 9. Konishi, M., and Yanagisawa, S. (2011) Roles of the transcriptional regulation mediated by the nitrate-responsive *cis*-element in higher plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411: 708-713. 査読有. (doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.008)
 10. Kato, Y., Konishi, M., Shigyo, M., Yoneyama, T., and Yanagisawa, S. (2010) Characterization of plant eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF6) genes: The essential role in embryogenesis and their differential expression in Arabidopsis and rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397: 673-678. 査読有. (doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06).
 11. Konishi, M., and Yanagisawa, S. (2010) Identification of the nitrate-responsive *cis*-element in the Arabidopsis *NIR1* promoter defines the presence of multiple *cis*-elements for nitrogen response. *The Plant Journal* 63: 269-282. 査読有. (doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04239.x)
- 〔学会発表〕(計 20 件)
1. 柳澤修一、小西美稲子、鈴木渉 (2014) 植物の硝酸応答機構研究の新展開、植物生理学会 2014 年度年会シンポジウム「植物の三大栄養素 (N-P-K) の感知と利用の新理解」, 3 月 18 日~3 月 20 日、(富山)
 2. 佐々木勇樹, 安田盛貴, 柳澤修一, 佐藤長緒, 山口淳二 (2014) C/N 栄養応答に関与する新規ユビキチンリガーゼ BT タンパク質の機能解析. 植物生理学会 2014 年度年会, 3 月 18 日~3 月 20 日、(富山)
 3. 吉岡希、小西美稲子、石田哲也、柳澤修二 (2014) 硝酸誘導型転写因子 NLP による BT タンパク質遺伝子の発現誘導. 植物生理学会 2014 年度年会, 3 月 18 日~3 月 20 日、(富山)
 4. 小西美稲子、鈴木渉、柳澤修一 (2014) 高等植物の硝酸応答を担う NLP 転写因子の機能ドメインの解析. 植物生理学会 2014 年度年会, 3 月 18 日~3 月 20 日、(富山)
 5. 石田哲也、柳澤修一 (2014) グルコース応答性遺伝子 *AtNuGAP1* 由来の核タンパク質の胚発生への関与. 植物生理学会 2014 年度年会, 3 月 18 日~3 月 20 日、(富山)
 6. 小西美稲子、鈴木渉、柳澤修一 (2013) NIN-like protein による硝酸誘導性遺伝子発現の制御. 日本土壌肥料学会 2013 年度名古屋大会, 9 月 11 日~9 月 13 日、(名古屋)
 7. 野口航、渡辺千尋、酒井英光、長谷川利拡、柳澤修一、寺島一郎 (2013) つくば FACE サイトのイネの葉の呼吸系の高 CO₂ 応答. 日本植物学会第 77 回大会, 9 月 13 日~9 月 15 日、(札幌)
 8. Konishi, M. and Yanagisawa, S. (2013) The central role of NLP transcription factors in nitrate-inducible gene expression. *The 24th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR)*, 6 月 24 日~6 月 28 日、(Sydney, Australia).
 9. Kuroha, T., Keisuke Nagai, K., Ayano, M., Yanagisawa, S., Ashikari, M. (2013) Transcriptional regulation of gibberellin biosynthesis by ethylene signaling in the growth response of submerged deepwater rice. *The 21st International Conference on Plant Growth Substances IPGSA2013*, 6 月 18 日~6 月 22 日、(Shanghai, China).
 10. Yanagisawa, S. (2013) Members of the nin-like protein family are transcription factors governing nitrate-inducible gene expression. *Nitrogen 2013 (2nd International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants)*, 11 月 18 日~11 月 22 日、(Puerto Varas, Chile).
 11. 小西美稲子、柳澤修一 (2013) NBP 転写因子による硝酸応答の制御. 第 54 回日本植物生理学会年会, 3 月 23 日、岡山.
 12. 小西美稲子、柳澤修一 (2012) 硝酸によるシロイヌナズナ硝酸還元酵素遺伝子

- NIA1 の発現誘導の分子機構 . 日本土壤肥料学会 2012 年度鳥取大会、9 月 4 日～9 月 6 日、鳥取 .
13. 柳澤修一(2012)イネ緑化過程の比較プロテオーム解析. 日本プロテオーム学会 2012 年大会、日本ヒトプロテオーム機構第 10 回大会シンポジウム "農学プロテオーム研究の最前線"、7 月 26 日、東京 .
 14. 柳澤修一(2012)植物転写因子を用いた植物機能の強化. 生物生産工学研究センターシンポジウム"植物機能のバイオテクノロジー"、11 月 5 日、東京
 15. 柳澤修一(2012)シロイヌナズナの窒素応答. 日本学術振興会産学協力第 160 委員会第 2 回研究会「植物栄養代謝バランスの多方面からの理解」3 月 2 日、(福岡)
 16. 小西美稲子、柳澤修一(2011)高等植物の硝酸応答機構. 日本植物学会第 75 回大会シンポジウム、9 月 17 日(東京)
 17. 小西美稲子、柳澤修一(2010)シロイヌナズナ硝酸還元酵素遺伝子 NIA1 の硝酸応答. 日本土壤肥料学会 2010 年度北海道大会、9 月 7 日～9 月 9 日、札幌 .
 18. Sato, S., and Yanagisawa, S. (2010) Metabolite profiling in primary metabolism based on capillary electrophoresis-mass spectrometry and anion exchange chromatography in plant extracts. 日本土壤肥料学会 2010 年度北海道大会、9 月 7 日～9 月 9 日、札幌 .
 19. Yanagisawa, S. (2010) Molecular mechanisms underlying nitrate-responsive transcription. *1st International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants*, 7 月 26 日～30 日、(Inuyama, Japan).
 20. Mimura, T., Hirai, M., and Yanagisawa, S. (2010) Metabolome researches in plant metabolic regulation. *21st International Conference on Arabidopsis Research*, Concurrent section "Systems biology and metabolism". 6 月 6 日～6 月 10 日、(Yokohama, Japan).

〔図書〕(計 1 件)

1. Ishida, T. Osakabe, Y., Yanagisawa, S. (2012) Transcription factors: improving abiotic stress tolerance in plants, in *Improving Stress Resistance to Abiotic Stress* (Narendra Tuteja, ed.), Wiley-Blackwell, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. (Germany), pp589-619.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

1. 窒素栄養の利用を制御する植物の仕組み
<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/tag/nin-like-transcription-factor/>
2. NIN様転写因子が植物の硝酸応答を司る
<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2013/20130321-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 修一 (YANAGISAWA, Shuichi)

東京大学・生物生産工学研究センター・
准教授

研究者番号： 20222359