

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780065

研究課題名(和文)新規bZIP型転写因子による窒素欠乏応答制御メカニズム

研究課題名(英文)Characterization of a set of novel bZIP transcription factors involved in nitrogen-starvation responses in plants

研究代表者

木羽 隆敏(KIBA, TAKATOSHI)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：20532097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：私は、シロイヌナズナにおいて窒素不足環境における効率の良い窒素栄養吸収を担う高親和性硝酸イオン輸送体遺伝子(AtNRT2.4)の発現を制御する転写因子の探索を行い、一群のGARP型転写因子を同定した。また、これらの転写因子は転写抑制因子として働き、窒素充足条件でAtNRT2.4の発現を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I identified a set of GARP transcription factors as regulators of a high-affinity nitrate transporter gene AtNRT2.4, which is crucial for optimal adaptation to nitrogen starvation. I demonstrated that the GARP transcription factors act as transcriptional repressors to suppress AtNRT2.4 expression in nitrogen-replete conditions.

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：植物分子生理学 窒素栄養 窒素欠乏 硝酸イオン輸送体 転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

近年窒素肥料の過剰使用がコスト高を招いているだけでなく、深刻な環境汚染をも引き起こしている。これらの問題に対応しつつ食料需要を満たすために、低窒素投入型の農業への移行が望まれている。低窒素投入型農業に適した作物には高い窒素利用効率求められるが、その技術開発のためには植物の窒素栄養応答メカニズムの深い理解が欠かせない。

私は植物の窒素栄養欠乏に対する応答に着目して研究を行ってきた。そしてシロイヌナズナ高親和性硝酸イオン輸送体 (*AtNRT2.4*) が窒素不足環境における効率の良い窒素栄養吸収に重要な役割を果たすことを明らかにした。同時に、高効率吸収には *AtNRT2.4* の発現制御が重要であることを見いだした。しかし、*AtNRT2.4* の発現制御の分子メカニズムは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、*AtNRT2.4* の発現制御を担う転写因子を同定し、その分子生物学的解析を通して窒素欠乏応答の制御メカニズムを明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 窒素欠乏応答に必要な最小プロモーター領域の同定

*AtNRT2.4* プロモーターの削り込みにより、最小プロモーター領域の絞り込みを行う。*AtNRT2.4* プロモーター:*GFP* 融合遺伝子を導入した形質転換体を用いる。

(2) Yeast 1-Hybrid 系と一過的発現系による転写因子の同定

最小プロモーターに結合する転写因子を、Matchmaker Gold Yeast 1-Hybrid システムとシロイヌナズナ転写因子ライブラリーを用いて探索する。遺伝子銃による一過的発現系を用いて、プロモーターと転写因子の相互作用を評価する。最終候補を Nitrogen Starvation Regulator (NSR) と命名する。

(3) NSR の分子生物学的解析

NSR が転写活性化因子なのか転写抑制因子なのかの検定、窒素栄養状態に応じた発現パターンの解析や T-DNA 変異体・恒常的活性化型 NSR 発現体の表現型解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) 窒素欠乏応答に必要な最小プロモーター領域の同定

5' 側から段階的に削り込んだ *AtNRT2.4* プロモーターと *GFP* を融合させたコンストラクトを導入した形質転換植物を作製した。*GFP* の発現を指標に窒素欠乏に対する応答を調べたところ、*AtNRT2.4* プロモーター 0.36 kbp があれば十分であることを明らかにした (図 1)。

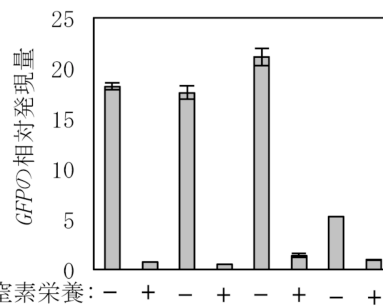


図 1. 削り込んだ *AtNRT2.4* プロモーターの窒素欠乏応答性

(2) Yeast 1-Hybrid 系と一過的発現系による転写因子の同定

*AtNRT2.4* プロモーター 0.36 kbp に結合する転写因子を探索するため、シロイヌナズナ転写因子ライブラリー (Mitsuda et al. 2010) を用いて Yeast One-Hybrid スクリーニングを行った。その結果 bZIP 型と GARP 型の転写因子を複数取得した。レポーターとして *AtNRT2.4* プロモーターとルシフェラーゼの融合遺伝子、エフェクターとして転写因子と強力な転写活性化ドメイン VP32 の融合遺伝子を用いて一過的発現系により検定したところ、一次構造が類似した一群の GARP 型転写因子のみが *AtNRT2.4* プロモーターと有意に相互作用することを見いだした (図 2)。これらを Nitrogen Starvation Regulator (NSR1 から NSR7) と命名した。

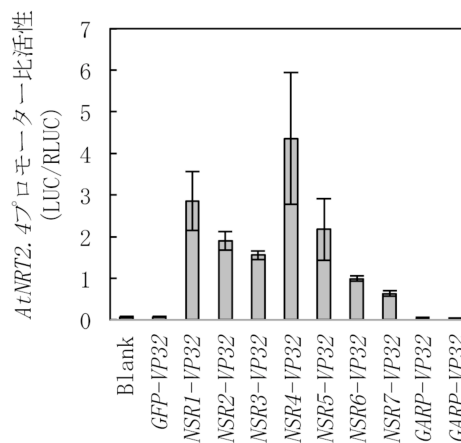


図 2. 一過的発現系による *AtNRT2.4* プロモーターと NSR の相互作用検定

(3) NSR の分子生物学的解析

NSR ファミリーは共通して、N 末端側に SRDX 転写抑制モチーフに類似した配列を持つ。一過的発現系を用いて調べたところ、確かに NSR はこの配列の働きにより、転写抑制因子として機能すること明らかにした (図 3)

次に、NSR ファミリー遺伝子の窒素栄養状態に応じた発現パターンを調べた。その結果、NSR ファミリー遺伝子 7 種類のうち 5 種類が窒素欠乏により抑制され、*AtNRT2.4* の発現と

負の相関を示すことがわかった。また窒素栄養の種類や組織に応じて特徴的な発現パターンを示すものがあることも明らかにした。

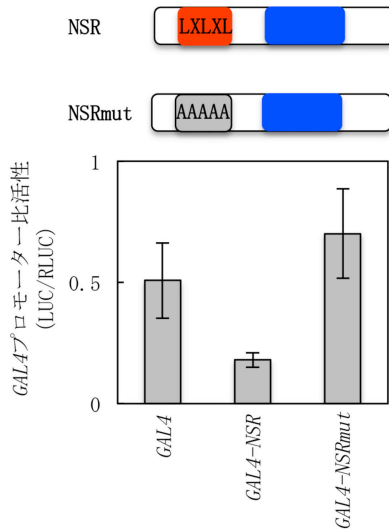


図3. NSR 転写抑制能と SRDX 類似配列の機能検定

NSR の生理的役割を明らかにするため、T-DNA 変異体と恒常的活性化型 NSR 発現体を確立し、解析を行った。シングル T-DNA 変異体では、明らかな表現型は見られないことから、7 種類の間機能の冗長性があることが示唆された。恒常的活性化型 NSR 発現体では、*AtNRT2.4* 遺伝子発現の恒常的高発現とともに、窒素欠乏時に似た植物体の矮化が見られた。これらの結果から、NSR は *AtNRT2.4* を含む窒素欠乏応答に関わる遺伝子の発現を抑制することにより、窒素欠乏応答を制御することが示唆された (図4)。

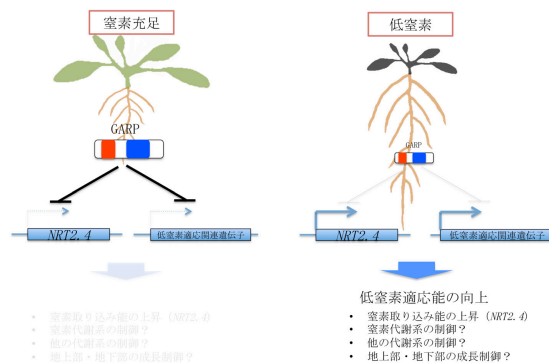


図4. NSR による窒素欠乏応答制御モデル

## 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6件)

- ① Takatoshi Kiba, Kentaro Takei, Mikiko Kojima, and Hitoshi Sakakibara (2013) Side-chain Modification of Cytokinins Control Shoot Growth in Arabidopsis.

*Developmental Cell* 27, 452-461. doi: 10.1016/j.devcel.2013.10.004. 査読有

- ② Nobuyuki Takatani, Takuro Ito, Takatoshi Kiba, Marie Mori, Tetsuro Miyamoto, Shin-ichi Maeda and Tatsuo Omata (2013) Effects of high CO<sub>2</sub> on growth and metabolism of Arabidopsis seedlings during growth with a constantly limited supply of nitrogen. *Plant Cell Physiol.* 55, 281-29. doi: 10.1093/pcp/pct186. 査読有

- ③ Takatoshi Kiba, Ana-Belen Feria-Bourrellier, Florence Lafouge, Lina Lezhneva, Stéphanie Boutet-Mercey, Mathilde Orsel, Virginie Bréhaut, Anthony Miller, Françoise Daniel-Vedele, Hitoshi Sakakibara, and Anne Krapp (2012) The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT2.4 Plays a Double Role in Roots and Shoots of Nitrogen-Starved Plants. *Plant Cell* 24, 245-258. doi: 10.1105/tpc.111.092221. 査読有

- ④ Norihito Nakamichi, Takatoshi Kiba, Mari Kamioka, Takamasa Suzuki, Takafumi Yamashino, Tetsuya Higashiyama, Hitoshi Sakakibara, and Takeshi Mizuno (2012) Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 17123-17128. doi: 10.1073/pnas.1205156109. 査読有

- ⑤ Jongchan Woo, Cameron R MacPherson, Jun Liu, Huan Wang, Takatoshi Kiba, Matthew Hannah, Xiu-Jie Wang, Vladimir B Bajic and Nam-Hai Chua (2012) The response and recovery of the Arabidopsis thaliana transcriptome to phosphate starvation. *BMC Plant Biol.* doi: 10.1186/1471-2229-12-62. 査読有

- ⑥ Hiroki Tokunaga, Mikiko Kojima, Takeshi Kuroha, Takashi Ishida, Keiko Sugimoto, Takatoshi Kiba and Hitoshi Sakakibara (2012) Arabidopsis LOG multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant J.* 69, 355-365. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04795.x. 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① Takatoshi Kiba, Kentaro Takei, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara. The trans-zeatin-type cytokinin is indispensable for shoot growth regulation in Arabidopsis. International conference on Arabidopsis Research. 2012/7/5

Vienna, Austria

- ② Takatoshi Kiba, Kentaro Takei, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara. The trans-zeatin-type cytokinin is indispensable for shoot growth regulation in *Arabidopsis*. **2<sup>nd</sup> Cytokinin Meeting**. 2012/7/9, Berlin, Germany
- ③ 木羽隆敏, 武井兼太郎, 小嶋美紀子, 榊原均. iP型サイトカイニンとtZ型サイトカイニンの生理機能の違い. **日本植物生理学会年会**, 2013/3/22, 岡山
- ④ Takatoshi Kiba, Kentaro Takei, Mikiko Kojima and Hitoshi Sakakibara. Root-borne *trans*-zeatin-type cytokinins can regulate shoot growth. **Plant Vascular Biology Meeting**. 2013/7/29, Helsinki, Finland
- ⑤ Takatoshi Kiba, Takuhiro Yoshida, Tomoko Abe, Tetsuya Sakurai, Hitoshi Sakakibara. *Setaria viridis* as a model for C4 photosynthesis: full-length cDNAs and heavy ion beam mutants. **The International Symposium of C4 and CAM Plant Biology**, 2013/8/8, Illinois, USA
- ⑥ Takatoshi Kiba, Kentaro Takei, Mikiko Kojima and Hitoshi Sakakibara. The *trans*-zeatin-type cytokinin controls shoot growth in *Arabidopsis*. **International Conference on Plant Growth Substances**, 2013/6/19, Shanghai, China
- ⑦ Takatoshi Kiba, Lina Lezhneva, Ana Belen Feria-Bourellier, Florence Lafouge, Stéphanie Boutet-Mercey, Nino Niccolo, Hitoshi Sakakibara, Françoise Daniel-Vedele, Anne Krapp. The Nitrate Transporter NRT2.5 Plays a Major Role in Nitrate Acquisition in Nitrogen-Starved Adult *Arabidopsis*. **Nitrogen meeting**, 2013/11/20, Puerto Varas, Chile
- ⑧ Takatoshi Kiba, Lina Lezhneva, Ana Belen Feria-Bourellier, Florence Lafouge, Stéphanie Boutet-Mercey, Nino Niccolo, Hitoshi Sakakibara, Françoise Daniel-Vedele, Anne Krapp. The nitrate transporter NRT2.5 plays a major role in nitrate acquisition in nitrogen-starved adult *Arabidopsis*. **日本植物生理学会年会**, 2014/3/19, 富山市

[その他]

○ホームページ

[http://www.riken.jp/research/labs/csrs/plant\\_prod\\_sys/](http://www.riken.jp/research/labs/csrs/plant_prod_sys/)

○プレスリリース

①超低濃度の窒素栄養を効率よく吸収する仕組みをシロイヌナズナで解明

(<http://www.riken.jp/pr/press/2012/20120111/>)

②植物ホルモン「サイトカイニン」の「質」の重要性を解明

([http://www.riken.jp/pr/press/2013/20131126\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2013/20131126_1/))

○ライフサイエンス新着レビュー

サイトカイニンの作用の器官に対する特異性は側鎖の修飾により制御される

(<http://first.lifesciencedb.jp/archive/s/8063>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木羽 隆敏 (KIB TAKTOSHI)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：20532097