

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25252014

研究課題名(和文)植物における硝酸応答の分子基盤の解明

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

研究者番号：20222359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物の窒素栄養環境への適応において硝酸応答型の遺伝子発現は中心的な役割を担う。この硝酸応答型遺伝子発現を担う転写因子はNLPタンパク質群であることを同定していることから、NLP転写因子群を手がかりに、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて硝酸応答型遺伝子発現の制御機構の解析を行った。DNAマイクロアレイ解析によって、NLP転写因子群は硝酸応答型遺伝子発現のほとんどを制御しているマスターレギュレーターであることを明らかにした。また、硝酸シグナルの伝達にตอบสนองしてNLP転写因子群がリン酸化されることが、NLP転写因子の活性化機構であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nitrate-responsive gene expression plays a key role in adaptation to diverse nitrogen conditions in plants. We previously identified NLPs as transcription factors responsible for nitrate-responsive gene expression. In this study, we analyzed the molecular mechanisms underlying NLP-mediated and nitrate-responsive gene expression in Arabidopsis. By DNA microarray analysis, we found that NLP transcription factors are master regulators responsible for expression of most of nitrate-regulated genes in Arabidopsis. We also found that phosphorylation of NLP transcription factors is a key for nitrate signaling and induction of NLP activity.

研究分野：植物分子栄養学

キーワード：植物 硝酸シグナル シグナル伝達 転写因子 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

窒素は植物の多量必須元素の一つであり、植物は土壌中の無機窒素化合物（主に、硝酸イオンとアンモニウムイオン）を吸収して同化し、アミノ酸、核酸、クロロフィルなど窒素原子を含む有機化合物を合成して成長している。このため、土壌中に存在する無機窒素化合物の量は植物の成長量を決定する大きな要素となっている。自然環境では植物が利用可能な化学形態の窒素の量は植物の最大成長を支えるには十分でなく、植物は利用可能な窒素を有効活用して成長する必要がある。また、陸上植物にとって主たる窒素源である硝酸イオンは河川や海洋に流出しやすく、窒素環境の変化にも植物は適応する必要もある。このため、植物の遺伝子発現パターンや代謝バランスは窒素環境に反応して大きく変化する。このような変化を制御している分子機構の解明は作物生産の向上を図る上で極めて重要となっている。

植物の窒素栄養環境への適応機構において硝酸イオンが中心的な役割を担うことが知られている。植物に取り込まれた硝酸イオンはアンモニウムイオンへと還元されアミノ酸へと同化される一方で、シグナル伝達物質としても働き、硝酸応答と呼ばれる様々な応答を引き起こす。硝酸応答は、植物の窒素利用を調節する最も主要な制御メカニズムと考えられており、例えば、根に局所的に硝酸イオンを与えた場合、その部分の成長が促進されることや、硝酸イオン投与によって硝酸還元酵素や亜硝酸還元酵素といった硝酸同化経路の酵素の遺伝子の発現が誘導されることが示されている。また、マイクロアレイ解析によって、硝酸イオンの投与は広範な遺伝子発現の変化を引き起こすことも明らかになっている。このような硝酸イオンの投与に反応した遺伝子発現は硝酸還元酵素遺伝子が欠損している突然変異体においても見られること、また、タンパク質合成阻害剤の存在下でも起こることから、硝酸イオン自体がシグナル伝達物質として、未同定の転写因子をタンパク質レベルで活性化することによって特定の遺伝子発現を誘導していると推測されてきた。このような硝酸応答型の遺伝子発現の分子メカニズムは全く解明されていなかった。しかしながら、我々は、シロイヌナズナの硝酸還元酵素遺伝子と亜硝酸還元酵素遺伝子の発現制御機構について詳細な解析を行い、これら遺伝子の硝酸シグナルに反応した転写を制御するために必要十分なDNA配列(NRE, nitrate-responsive cis-element)の同定、さらには、このNREに結合するシロイヌナズナ転写因子の同定に成功して、硝酸応答型の遺伝子発現の分子メカニズムの解明のための道筋を得た。同定された転写因子はNLP (NIN-like protein) と呼ばれるタンパク質群であり、NLPのN-末端側領域が硝酸シグナル受信ドメインであり、N-末端側領域を介した翻訳後制御によるNLP転写因

子の活性化が硝酸シグナルの伝達の実体であることも明らかにしている。

2. 研究の目的

硝酸シグナル応答の実体を担う転写因子としてNLPが同定されたことによって、植物における硝酸応答の分子基盤の全容を明らかにする道筋が拓けてきた。そこで、本研究課題では、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて硝酸シグナル応答型の遺伝子発現の制御機構の解明を目的とする。特に、硝酸シグナル応答型の遺伝子発現制御における硝酸シグナルの伝達によるNLP転写因子の翻訳後制御による活性化機構と、NLP転写因子の標的遺伝子の網羅的な同定に特に力点を置く。

3. 研究の方法

(1)シロイヌナズナには9つのNLP遺伝子が存在しており、これらの機能は重複していることが予測される。そこで、どの程度、NLP転写因子群が硝酸シグナル応答を制御しているかを明らかにするために、転写活性化因子であるNLP転写因子に転写抑制ドメインを融合させることにより転写抑制因子へと変換したもの(NLP6-SUPRDタンパク質)を発現している形質転換シロイヌナズナを作成し、硝酸イオンを含まない培地で生育させた後に硝酸イオンを与え、硝酸態窒素の投与によって引き起こされる遺伝子発現の変化を調べた。野生型株とNLP6-SUPRDタンパク質発現株を用いて、マイクロアレイ解析によって網羅的に調べ、トランスクリプトームを取得することにより、これらにおける硝酸シグナル応答型の遺伝子発現を比較した。

(2)NLP転写因子の転写後制御による活性化の分子機構を明らかにする実験系を構築するために、窒素源を制限した環境で栽培したシロイヌナズナからプロトプラストを調整し、このプロトプラストにNRE制御下にあるレポーター遺伝子をポリエチレングリコール法によって導入した。その後、プロトプラストを、硝酸イオンを含む培地と含まない培地中で培養し、レポーター遺伝子の一過的発現を調べることで硝酸シグナル応答の分子メカニズムを迅速に解析する実験系を確立した。

(3)硝酸シグナルに反応してNLP転写因子はリン酸化される可能性を示唆する予備的知見にも基づき、MYCエピトープタグを付加したNLP6あるいはNLP7を発現しているシロイヌナズナのT87細胞を作成した。これらの細胞の粗抽出液と抗MYC抗体を用いた免疫沈降によって得られた試料のnanoLC-MS/MS解析を行ない、NLP転写因子中のリン酸化されているアミノ酸残基を同定した。

(4)リン酸化されるアミノ酸残基に点変異を導入したNLP7の活性を一過的発現系によって調べると同時に、MYCタグを付加したNLP7を発現しているシロイヌナズナ形質転

換体を作成して硝酸シグナルに応答したリン酸化を調べた。

4. 研究成果

(1) NLP 転写因子の硝酸シグナル応答のマスターレギュレーターとしての機能

転写抑制ドメインを融合させた NLP6 (NLP6-SUPRD タンパク質) を発現している形質転換シロイヌナズナと野生型株における硝酸応答型の遺伝子発現の比較解析により、NLP6-SUPRD 株では硝酸応答型遺伝子発現が殆ど起らないことが示された。このことから、NLP 転写因子は硝酸シグナル応答のマスターレギュレーターであり、硝酸誘導性遺伝子の大多数は NLP 転写因子の制御下にあることがわかった。

トランスクリプトーム解析によって NLP 転写因子の制御下にあることが示された幾つかの遺伝子について、直接の標的遺伝子であるかどうか検討した。BT 遺伝子の産物はタンパク質相互作用ドメインを持つ足場タンパク質であると予測され、BT 遺伝子産物は広範囲な効果を生み出すと考えられた。そこで、プロトプラストを用いた一過的発現系とゲル電気泳動移動度シフトアッセイによって、NLP 転写因子が直接、BT 遺伝子のプロモーターを活性化していることを明らかにした。次に、BT 遺伝子が NLP 転写因子の直接の標的遺伝子であることの生理的意味について解析を行った。NLP6-SUPRD 株において、BT 遺伝子を恒常的に過剰発現させると、低下している硝酸シグナル応答が部分的に回復することを明らかにして、NLP 転写因子が BT 遺伝子の発現を誘導することが硝酸シグナル応答の重要な一部であることを示した。一方で、NLP 転写因子の直接の標的遺伝子に機能未知の葉緑体包膜に局在するタンパク質の遺伝子が含まれることを明らかにした。このタンパク質は亜硝酸輸送体であることが判明したことから、硝酸イオンの取り込みから還元に関わる全てのタンパク質の遺伝子を NLP 転写因子は直接制御していることが明らかとなった。さらに、NLP 転写因子はアスパラギン酸オキシダーゼ遺伝子の発現を直接、促進することも明らかにした。アスパラギン酸オキシダーゼは NADH の *de novo* 合成における鍵酵素であることから、窒素十分条件あるいは窒素飢餓条件にあるシロイヌナズナさらには窒素飢餓条件で生育させた後に硝酸態窒素を与えたシロイヌナズナにおける NADH 含量を測定し、NADH 含量は特に若い葉で硝酸態窒素の供給量に影響されることを明らかにした。NADH は硝酸還元に必要な補酵素であり、また、様々な酵素反応で使用される補酵素でもあるので、NADH 合成を介して硝酸シグナル伝達が広範な影響を及ぼすことが示唆された。

(2) NLP 転写因子の転写後制御

硝酸シグナルに応答して NLP6 と NLP7 タンパク質の SDS-PAGE 上における移動度が

変化することから、NLP タンパク質は硝酸シグナルに応答してリン酸化されるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、まず、脱リン酸化酵素で処理を行うと SDS-PAGE における NLP6 と NLP7 のバンドの位置が元に戻ることを確認した。NLP 転写因子の N-末端側領域が硝酸シグナル応答ドメインであることを明らかにしていたことから、この領域に存在する全てのシロイヌナズナ NLP タンパク質で保存されているセリン残基とスレオニン残基に点変異を導入することでアラニン残基に置換した変異型 NLP6 を作出した。この変異型 NLP6 の転写促進活性を、プロトプラストを用いた一過的発現系によって調べ、163 番目のセリン残基が転写促進活性に重要であることを明らかにした。また、NLP では対応する 205 番目のセリン残基が重要であることを示した。一方で、このセリン残基がリン酸化されるかどうかを明らかにするために、MYC エピトープタグを付加した NLP7 を発現しているシロイヌナズナの T87 細胞を作成し、抗 MYC 抗体を用いた免疫沈降によって得られた試料の nanoLC-MS/MS 解析を行った。その結果、205 番目のセリン残基はリン酸化されることが確認された。次に、205 番目のセリン残基のリン酸化は、硝酸シグナルに応答しているかどうかを明らかにするために、MYC タグを付加した野生型 NLP7 を発現しているシロイヌナズナ形質転換体と 205 番目のセリンがアラニンに置換された変異型 NLP7 を発現しているシロイヌナズナ形質転換体を作成し、これら植物体に硝酸イオンを投与した時に、これらの NLP7 タンパク質の SDS-PAGE 上での移動度に変化が起こるかを調べた。その結果、205 番目のセリン残基をアラニン残基に置換すると移動度の変化は起こらなくなることが判明した。これらのことから、硝酸シグナルの伝達に応じて保存されたセリン残基 (NLP7 の場合は 205 番目のアミノ酸残基) がリン酸化されることが、硝酸シグナルに応じた NLP 転写因子の転写後制御の実体であると結論付けた。さらに、米国の研究グループとの共同研究により、NLP タンパク質のリン酸化を行う酵素はカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 (CPK10、CPK30、CPK32) であること、また、これらのリン酸化酵素と NLP タンパク質の結合は核内で起こることも明らかにできたことから、硝酸シグナル伝達に応答した遺伝子発現制御のモデルを提唱した。このモデルを確立するために、シロイヌナズナを用いた植物個体レベルでの実験により、Ca⁺シグナリングの阻害剤を与えると NLP 転写因子のリン酸化が阻害されることも示した。

(3) NLP 転写因子を含む転写カスケード

活性化された NLP 転写因子は NIGT1 (Nitrate-inducible, GARP-type Transcriptional Repressor 1) 遺伝子の発現を直接、促進することによって転写カスケードを生み出して

いることを明らかにした。また、NIGT1 は自分自身の発現を抑制する転写抑制因子であること、また、NLP 転写促進因子と NIGT1 転写抑制因子は硝酸輸送体遺伝子の発現を拮抗的に制御していることも明らかにした。これらの発見から、硝酸態窒素量の変化に伴って正と負の制御のバランスが変化して、硝酸態窒素量の変動に合わせた遺伝子発現が起こるというモデルを提唱した。

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 12 件)

1. Liu, K.-H., Niu, Y., Konishi, M., Wu, Y., Du, H., Chung, H.S. Li, L., Boudsocq, M., McCormack, M., Maekawa, S., Ishida, T., Zhang, C., Shokat, K., Yanagisawa, S. and Sheen, J. (2017) Discovery of Nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient-growth networks, 査読有, *Nature*, 545: 311-316. DOI: 10.1038/nature22077.
2. Ueda, Y., Konishi, M. and Yanagisawa, S. (2017) Molecular basis of the nitrogen response in plants. 査読有, *Soil Sci. Plant Nutr.* 63: 329-341. DOI: 10.1080/00380768.2017.1360128.
3. Maekawa, S., Ishida, T. and Yanagisawa, S. (2018) Reduced expression of *APUM24*, encoding a novel rRNA processing factor, induces sugar-dependent nucleolar stress and altered sugar responses in *Arabidopsis thaliana*. 査読有, *Plant Cell*, 30: 209-227. DOI: 10.1105/tpc.17.00778.
4. Maekawa, S. and Yanagisawa, S. (2018) Nucleolar stress and sugar response in plants. 査読有, *Plant Signal Behav.*, 2018 Feb 21: e1442975. DOI: 10.1080/15592324.2018.1442975
5. Sato, T., Maekawa, S., Konishi, M., Yoshioka, N., Sasaki, Y., Maeda, H., Ishida T., Kato, Y., Yamaguchi, J. and Yanagisawa, S. (2017) Direct transcriptional activation of *BT* genes by NLP transcription factors is a key component of the nitrate response in *Arabidopsis*. 査読有, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483: 380-386. DOI: 0.1016/j.bbrc.2016.12.135
6. Ishida, T., Maekawa, S. and Yanagisawa, S. (2016) The pre-rRNA processing complex in *Arabidopsis* includes two WD-domain-containing proteins encoded by glucose-inducible genes and plant-specific proteins. 査読有, *Mol. Plant* 9: 312-315. DOI: 10.1016/j.molp.2015.11.003
7. Yoneyama, T., Fujimori, T., Yanagisawa, S., Hase, T. and Suzuki, A. (2015) ¹⁵N-tracing studies on *in vitro* reactions of ferredoxin-dependent nitrite reductase and glutamate synthase using reconstituted electron donation systems. 査読有, *Plant Cell Physiol.* 56: 1154-1161. DOI: 10.1093/pcp/pcv039
8. Maeda, S., Konishi, M., Yanagisawa, S. and Omata, T. (2014) Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts. 査読有, *Plant Cell Physiol.* 55: 1311-1324. DOI: 10.1093/pcp/pcu075
9. Yanagisawa, S. (2014) Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. *Plant Sci.* 229: 167-171. 査読有, DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.09.006
10. Konishi, M. and Yanagisawa, S. (2014) Emergence of a new step towards understanding the molecular mechanisms underlying nitrate-regulated gene expression. *J. Exp. Bot.* 65: 5589-5600. 査読有, DOI: 10.1093/jxb/eru267
11. Sato, S. and Yanagisawa, S. (2014) Characterization of metabolic states of *Arabidopsis thaliana* under diverse carbon and nitrogen nutrient conditions via targeted metabolomic analysis. *Plant Cell Physiol.* 55: 306-319. 査読有, DOI: 10.1093/pcp/pct192
12. 小西美穂子、柳澤修一 (2014) 植物の硝酸シグナル応答機構 -NIN 様タンパク質が硝酸シグナル応答を司る-。査読有, *化学と生物* 52: 421-423.

[学会発表] (計 23 件)

1. 柳澤修一、植物が持つ多様な栄養環境適応のための巧妙な仕組み、第 34 回 資源植物科学シンポジウム 第 10 回 植物ストレス科学研究シンポジウム、2018/3/5-6、(倉敷)
2. 小西美穂子、前田佳栄、木羽隆敏、柳澤修一、P 欠乏による硝酸イオン吸収抑制の分子機構、日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会、2017 年 9 月 5 日-7 日、(仙台)
3. 櫻庭康仁、馬淵敦士、射場厚、柳澤修一、フィトクロムを介した赤色光シグナルによるリン酸獲得機構の制御、日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会、2017 年 9 月 5 日-7 日、(仙台)
4. 植田佳明、宮尾(徳富)光恵、柳澤修一、栄養素の取り込みを指標としたイネの窒素・リン飢餓応答性の品種間差の解析、日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会、2017 年 9 月 5 日-7 日、(仙台)
5. 沖津孝幸、小西美穂子、柳澤修一、シロイヌナズナの硝酸応答を担う NLP 転写因子群の機能解析、日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会、2017 年 9 月 5 日

- 7日、(仙台)
6. 前川修吾、柳澤修一、根の形態形成への糖誘導性リボソーム生合成関連因子 OLI2 の関与、日本土壌肥料学会 2017 年度仙台大会、2017 年 9 月 5 日-7 日、(仙台)
 7. 郭鵬程、小西美稲子、柳澤修一、シロイヌナズナ高親和性硝酸イオン輸送体 NRT2.1 遺伝子のグルタミンによる発現抑制、日本土壌肥料学会 2017 年度仙台大会、2017 年 9 月 5 日-7 日、(仙台)
 8. Zhuo, M.N., Sakuraba, Y., Yanagisawa, S., Physiological roles of the nitrate-responsive gene encoded Dof2.1 transcription factor in Arabidopsis, 日本土壌肥料学会 2017 年度仙台大会、2017 年 9 月 5 日-7 日、(仙台)
 9. 齊藤守秋、小西美稲子、柳澤修一、硝酸シグナルによるシロイヌナズナ NAD⁺ 生合成制御の可能性の検討、日本土壌肥料学会 2017 年度仙台大会、2017 年 9 月 5 日-7 日、(仙台)
 10. Ueda, Y., Yanagisawa, S., Nutrient uptake-based assessment of genetic variation of nitrogen and phosphorus response in rice. International Plant Nutrition Colloquium - IPNC 2017, 2017/8/21-24, (Copenhagen, Denmark)
 11. Yanagisawa, S., Phenome analysis of natural genetic variations with *Arabidopsis* ecotypes and rice cultivars: Visualization of different nutrient uptake ability, Global Engage's 4th Plant Genomics & Gene Editing Asia Congress, 2017 年 4 月 10 日-11 日、(Hong Kong)
 12. 沖津孝幸、小西美稲子、柳澤修一、植物の硝酸応答を担う NLP 転写因子群の機能解析、日本土壌肥料学会 2016 年度佐賀大会、2016 年 9 月 20 日-22 日、(佐賀)
 13. 前田佳栄、小西美稲子、木羽隆敏、榊原均、柳澤修一、硝酸シグナル応答における転写因子群 NIGT ファミリーの役割、日本土壌肥料学会 2016 年度佐賀大会、2016 年 9 月 20 日-22 日、(佐賀)
 14. 小西美稲子、前川修吾、石田哲也、柳澤修一、硝酸シグナルによる NLP 転写因子の翻訳後修飾、日本土壌肥料学会 2016 年度佐賀大会、2016 年 9 月 20 日-22 日、(佐賀)
 15. Maeda, Y., Konishi, M., Kurai, T., Sawaki, N., Sugimoto, M., Yanagisawa, S. Molecular mechanism underlying regulation of the expression of a nitrate transporter gene *NRT2.1* in Arabidopsis, 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日-20 日、(岩手)
 16. Konishi, M., Yanagisawa, S., Interacting proteins of nitrate-responsive transcription factors NLP6 and NLP7, 第 57 回日本植

- 物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日-20 日、(岩手)
17. 柳澤修一、硝酸シグナルと植物成長、日本植物学会第 80 回大会シンポジウム、2016 年 9 月 16 日-19 日、(沖縄)
 18. Yanagisawa, S. NLP transcription factors governing nitrate-responsive gene expression. The Plant and Animal Genome XXIV Conference (PAG), 2016 年 1 月 9 日-13 日、(San Diego, CA, USA)
 19. 柳澤修一、植物の硝酸シグナル応答機構：わかってきたことと未解明の問題、日本土壌肥料学会 2015 年度京都大会シンポジウム、2015 年 9 月 9 日-11 日、(京都)
 20. 柳澤修一、窒素応答に関わる転写因子、第 1 回植物栄養研究会、2015 年 09 月 04 日-2015 年 09 月 05 日、(東京)
 21. 柳澤修一、植物の窒素応答、第 3 回ブラキボディウムワークショップ、2015 年 03 月 05 日、(川崎)
 22. 小西美稲子、柳澤修一、硝酸シグナル応答性転写因子による地上部と根の生長の制御、日本土壌肥料学会 2014 年度東京大会、2014 年 09 月 09 日-11 日、(東京)
 23. 小西美稲子、鈴木渉、柳澤修一、硝酸シグナル応答を制御する NIN/NLP ファミリータンパク質の転写促進活性と進化的考察、日本植物学会第 78 回大会、2014 年 09 月 12-14 日、川崎

[図書] (計 1 件)

1. Yanagisawa, S. (2015) Chapter 12: Structure and evolution of the plant Dof transcription factor family in *Plant Transcription Factors. Evolutionary, Structural and Functional Aspects* (Daniel H. Gonzalez, ed.), Elsevier/Academic Press, pp183-197.

[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. 植物の栄養による生長制御のためのネットワークにおける硝酸イオン-CPK-NLPシグナル伝達の発見
<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2017/20170518-1.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
教授

研究者番号：20222359