

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440129

研究課題名(和文)植物における窒素代謝の上流制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of nitrogen signaling in plants

研究代表者

今村 壮輔 (Imamura, Sousuke)

東京工業大学・資源化学研究所・准教授

研究者番号：70548122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：窒素は、植物の生長を決定付ける栄養元素である。しかしながら、その重要性にも関わらず、窒素代謝の制御機構については不明な点が多い。窒素源の量が減少すると、そのシグナルは下流に伝達、特定の転写因子や酵素などが活性化され、最終的な窒素欠乏応答が引き起こされる。その一連の流れの内、窒素代謝の上流で機能する因子は、植物において同定されていない。本研究では、紅藻シゾンを用いて、窒素代謝の上流で機能する因子を同定して解析することを目的とした。本研究の成果により、TOR (target of rapamycin) が、窒素代謝の上流において、窒素同化遺伝子の発現などの窒素欠乏応答を制御している事が解明された。

研究成果の概要(英文)：Nitrogen is the component of several biomolecules, such as amino acids and nucleic acids, and thus key nutrient for plant cell growth. Although regulation of nitrogen including perception of nitrogen status and its signal transduction are well documented in fungi and mammals, the related information in plant cells are very poor. Previous our study revealed that MYB1, an R2R3-type MYB transcription factor, is involved in nitrogen depletion responsive expression of nitrogen assimilation genes in the unicellular red alga, Cyanidioschyzon merolae. In this study, I tried to identify and examine an upstream regulator for nitrogen depletion responses, such as MYB1-mediated transcription. As the result on the research, I demonstrated that TOR (target of rapamycin) functions in nitrogen responses including MYB1-mediated transcription as an upstream regulator of nitrogen regulation.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：窒素

1. 研究開始当初の背景

窒素は、アミノ酸や核酸の主要な構成元素であり、生物にとって極めて重要である。それ故、窒素代謝の制御に関わる研究は盛んに行われており、「窒素シグナルの受容、転写調節因子へのシグナル伝達、窒素源に対する最終的な応答反応」に至るまでの一連の流れが明らかになっている。しかしそれは、真核生物の内、酵母や動物に限られた話であり、植物における知見については不明な点が多い。その理由として、多くの制御系・実験系が植物では複雑であることなどが挙げられる。

申請者は、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (以降シズンと呼ぶ) を用いることにより、植物で不明であった、窒素同化系を制御する MYB 型転写因子 CmMYB1 を初めて明らかにし、更に、その制御下の遺伝子を同定することに成功している。また、同定された MYB 型転写因子が、高等植物でも一般に窒素同化に関わることも見出している。しかし、窒素代謝を制御する転写因子とその下流に関する情報が明らかになる一方、上流で機能する調節因子についての知見は、シズンばかりでなく、植物全体を見渡しても不明である。

2. 研究の目的

本研究では、前述した背景や先行研究の結果を基にして、「植物の窒素代謝の上流で機能する調節因子の同定と機能解析」を行い、未だ不明な、植物における窒素代謝の上流制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、大きく分けて2つのステップから構成される。第1ステップでは、新規窒素調節因子を順遺伝学的・生化学的解析にて同定する。第2ステップでは、同定された調節因子の細胞内での機能を遺伝学的解析と生化学的解析を組み合わせ、窒素代謝の上流での役割を明らかにする。これらの解析を通して、植物における窒素代謝の上流制御機構の全体像を理解する。

4. 研究成果

MYB1 が窒素欠乏時に誘導されることを利用して、窒素代謝を制御する上流因子の同定を試みた。具体的には、MYB1 を GFP と融合して発現するシズン株を作出し、EMS を用いて変異原処理を施す。その後、窒素充足培地においても MYB1 の発現 (GFP の蛍光) が高い株を FACS を用いて濃縮する。GFP 融合 MYB1 株の作出はできたが、実験の過程においてシズンと FACS との相性が悪いことが判明した。その原因として、シズンが強固な細胞壁を持たないことから、FACS で分取する際に用いるシース液に曝されることで細胞が死滅していることが判明した。種々の条件検討を行ったが、改善が見込めなかったため、研究戦略を変更した。

次に、酵母・動物において、窒素を含む栄養素のシグナル経路で重要な機能を発揮する TOR (target of rapamycin) キナーゼに着目した。TOR はその阻害剤であるラパマイシンによって活性を特異的に阻害することが可能であるが、シズンを含む植物はラパマイシンに対して感受性を示さない。そのため、酵母 FKBP12 を発現させ、ラパマイシンに対して感受性を示すシズン F12 株 [Imamura et al. (2013) BBRC] を用いた。

F12 株にラパマイシンを添加した結果、興味深いことに、培地中に窒素源が充足しているにも拘らず、窒素欠乏時にのみ誘導される MYB1 支配下の窒素同化遺伝子群の発現誘導が観察された。このことは、TOR が窒素同化系上流で機能していることを意味している。

TOR が窒素欠乏応答に寄与していることが解明されたため、次にゲノムワイドな転写プロファイルを解析した。具体的には、窒素欠乏時とラパマイシンで TOR を阻害した条件下で上昇する遺伝子と、減少する遺伝子を比較した。その結果、意外なことに、窒素欠乏条件下で上昇もしくは減少する遺伝子の一部 (1 割程度) が TOR 阻害時で共通した挙動を示した。このことは、窒素欠乏応答性遺伝子発現のシグナル経路は、TOR 以外にも存在していることを意味している。

MYB1 の下流遺伝子についても解析を行い、MYB1 が制御する新規の遺伝子としてフォスファターゼをコードする遺伝子が同定された。TOR はリン酸化酵素であり、窒素欠乏条件下ではその活性が低下することが推測できる。一方、窒素欠乏条件下で MYB1 依存的に脱リン酸化酵素が上昇することから、窒素源の有無によるリン酸化を介した制御系が考えられた。

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8件)

(1) Sousuke Imamura, Aiko Ishiwata, Satoru Watanabe, Hirofumi Yoshikawa, and Kan Tanaka. Expression of budding yeast FKBP12 confers rapamycin susceptibility to the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 439(2) 264-269 (2013). 査読有

(2) Gaku Fujii, Sousuke Imamura, Mitsumasa Hanaoka, and Kan Tanaka.

Nuclear-encoded chloroplast RNA polymerase sigma factor SIG2 activates chloroplast-encoded phycobilisome genes in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. 査読有 *FEBS Lett.*, 587(20) 3354-3359 (2013).

(3) Satoru Watanabe, Jun Sato, Sousuke Imamura, Mio Ohnuma, Yusaku Ohoba, Taku Chibazakura, Kan Tanaka, and Hirofumi Yoshikawa.

Stable Expression of a GFP-reporter Gene in the

Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*.
Biosci. Biotechnol. Biochem., 78(1) 175-177 (2014). 査読有
(4) Gaku Fujii, Sousuke Imamura, Atsuko Era, Shin-ya Miyagishima, Mitsumasa Hanaoka, and Kan Tanaka.
Nuclear-encoded chloroplast RNA polymerase sigma factor SIG2 activates chloroplast-encoded phycobilisome genes in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae*.
FEMS Microbiol. Lett., 362(10) pii: fnv063 (2015). 査読有
(5) Yu Kanesaki, Sousuke Imamura, Motomichi Matsuzaki, and Kan Tanaka.
Identification of centromere regions in chromosomes of a unicellular red alga, *Cyanidioschyzon merolae*.
FEBS Lett., 589(11) 1219-1224 (2015). 査読有
(6) Sousuke Imamura, Yasuko Kawase, Ikki Kobayashi, Toshiyuki Sone, Atsuko Era, Shin-ya Miyagishima, Mie Shimojima, Hiroyuki Ohta, Kan Tanaka.
Target of rapamycin (TOR) plays a critical role in triacylglycerol accumulation in microalgae.
Plant Mol. Biol., 89(3) 309-318 (2015). 査読有
(7) Keiko Taki, Toshiyuki Sone, Yuki Kobayashi, Satoru Watanabe, Sousuke Imamura, and Tanaka K.
Construction of a URA5.3 deletion strain of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: A backgroundless host strain for transformation experiments.
J. Gen. Appl. Microbiol., 61(5):211-214 (2015). 査読有
(8) Sousuke Imamura, Yasuko Kawase, Ikki Kobayashi, Mie Shimojima, Hiroyuki Ohta, and Kan Tanaka.
TOR (target of rapamycin) is a key regulator of triacylglycerol accumulation in microalgae.
Plant Signal. Behav., 11(3) e1149285 (2016). 査読有

〔学会発表〕(計20件)

(1) 今村 壮輔、石綿 愛子、渡辺 智、吉川 博文、田中 寛
植物におけるTOR (Target of Rapamycin) の機能解明に向けて：ラパマイシン感受性を示すシゾン株の構築
第8回 日本ゲノム微生物学会年会、2014年3月8日、東京農業大学(世田谷)
(2) 安藤 洸幸、小倉 駿佑、佐藤 大地、藤井 岳、今村 壮輔、田中 寛、五十嵐 雅之、内海 龍太郎、華岡 光正
*Cyanidioschyzon merolae*の光応答転写制御における二成分制御系の役割
日本農芸化学会平成26年度大会、2014年3月28日、明治大学(生田)
(3) 安藤 洸幸、小倉 駿佑、大原 ひかる、藤井 岳、今村 壮輔、田中 寛、五十嵐 雅之、内海 龍太郎、華岡 光正

単細胞紅藻シゾンにおける葉緑体に依存した光応答転写制御
日本植物学会第78回大会、2014年9月12-14日、明治大学(生田)
(4) 安藤 洸幸、大原 ひかる、小倉 駿佑、藤井 岳、今村 壮輔、田中 寛、恵良 厚子、宮城島 進也、五十嵐 雅之、内海 龍太郎、華岡 光正
単細胞紅藻シゾンにおけるプラスチドシグナルを介した核遺伝子の転写制御
第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25-27日、神戸ポートアイランド
(5) 今村 壮輔
藻類バイオ燃料生産に向けた分子生物学的アプローチ
化学工学会 2014年度開発型企業の会、2014年12月12日、東京工業大学(大岡山)
(6) 今村 壮輔
単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における窒素同化系とその制御
微細藻類研究会 2014、2014年12月22日、岡崎コンファランスセンター
(7) Sousuke Imamura
Regulation of nitrogen assimilation in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*
Tokyo Tech-HHU Dusseldorf Joint Symposium on Photosynthesis as a New Chemical Resource、2015.3.4、Tokyo Institute of Technology (Tamachi)
(8) 大原 ひかる、安藤 洸幸、小倉 駿佑、藤井 岳、今村 壮輔、田中 寛、恵良 厚子、宮城島 進也、五十嵐 雅之、内海 龍太郎、華岡 光正
単細胞紅藻シゾンにおける葉緑体に依存した核遺伝子の光誘導転写制御
第56回日本植物生理学会年会、2015年3月16日、東京農業大学
(9) 神崎 陸、今村 壮輔、田中 寛
紅藻シゾンにおける窒素欠乏応答転写因子MYB1の機能解析
第56回日本植物生理学会年会、2015年3月17日、東京農業大学
(10) 今村 壮輔、田中 寛
単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* におけるTOR (target of rapamycin)の機能解析
第56回日本植物生理学会年会、2015年3月17日、東京農業大学
(11) Sousuke Imamura、Yoshinori Fukunaga、Yuzuru Tozawa、Kan Tanaka
Regulation of ribosome RNA transcription in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*
2nd International Symposium Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells, September 30-October 2, 2015, Tsukuba
(12) 瀧 景子、曾根 俊之、小林 勇気、渡辺 智、今村 壮輔、田中 寛

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) の遺伝子改変ホスト株の分離
第 38 回 日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド
(13) Eri Hirasawa, Kan Tanaka, Sousuke Imamura
Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase improves TAG productivity in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*
6th International Singapore Lipid Symposium/6th Asian Symposium on Plant Lipids、SLING, National University of Singapore、Dec 3-4, 2015
(14) Sousuke Imamura, Yasuko Kawase, Ikki Kobayashi, Toshiyuki Sone, Atsuko Era, Shin-ya Miyagishima, Mie Shimojima, Hiroyuki Ohta and Kan Tanaka
Target of rapamycin (TOR) plays a critical role in triacylglycerol accumulation in microalgae
6th International Singapore Lipid Symposium/6th Asian Symposium on Plant Lipids、SLING, National University of Singapore、Dec 3, 2015
(15) 平澤 英里、田中 寛、今村 壮輔
単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* のトリアシルグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼの機能解析
第 5 7 回 日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日、岩手大学上田キャンパス (盛岡)
(16) 今村 壮輔、河瀬 泰子、小林 一幾、曾根 俊之、恵良 厚子、宮城島 進也、下嶋 美恵、太田 啓之、田中 寛
微細藻類においてトリアシルグリセロール合成を制御する TOR キナーゼ
第 5 7 回 日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日、岩手大学上田キャンパス (盛岡)
(17) 小倉 駿佑、安藤 洸幸、佐藤 大地、渡辺 智、藤井 岳、今村 壮輔、田中 寛、五十嵐 雅之、内海 龍太郎、華岡 光正
単細胞紅藻シゾンの葉緑体光応答に関する CmHIK の機能解析
第 5 7 回 日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日、岩手大学上田キャンパス (盛岡)
(18) 片野 貴章、雪竹 健太郎、恵良 厚子、宮城島 進也、藤井 岳、今村 壮輔、田中 寛、華岡 光正
単細胞紅藻シゾンの概日時計応答に関する細胞内シグナル伝達の解析
第 5 7 回 日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日、岩手大学上田キャンパス (盛岡)
(19) 竹村 時空、小林 勇気、瀧 景子、今村 壮輔、田中 寛
単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における窒素欠乏応答低分子量 G タンパク CmRAB5 の機能解析
第 5 7 回 日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 20 日、岩手大学上田キャンパス (盛岡)
(20) 河瀬 泰子、今村 壮輔、田中 寛

単細胞紅藻類において暗誘導される R1 型 MYB 転写因子 MYB2 の機能解析
第 5 7 回 日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 20 日、岩手大学上田キャンパス (盛岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
今村 壮輔 (Imamura Sousuke)
東京工業大学・資源化学研究所・准教授
研究者番号：70548122

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし