

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840099

研究課題名(和文) 高等植物の硝酸への応答を担う転写因子群の解析

研究課題名(英文) Analysis of the transcription factors that control nitrate responses in higher plants

研究代表者

小西 美穂子 (Konishi, Mineko)

東京大学・生物生産工学研究センター・特任助教

研究者番号：20642341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物における硝酸シグナルに応答した遺伝子発現誘導を担うNLP転写因子ファミリーの分子的性質と植物体における役割の解析を行った。シロイヌナズナの9つのNLPのうち、発現レベルが低いと考えられた一つを除く残り8つのNLPについて解析を行い、これらすべてが硝酸シグナルによる活性化を受けること、中でもNLP6とNLP7が強く活性化されることを示した。また、NLPの多重変異体を作成して解析を行い、地上部のバイオマスに貢献している主要なNLPはNLP6とNLP7であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：I analyzed molecular characteristics of eight NLP proteins out of nine NLP transcription factors in Arabidopsis, which are presumably involved in nitrate-responsive gene expression. Although all NLP proteins analyzed were activated in response to nitrate signal, NLP6 and NLP7 were more strongly activated by nitrate, compared to others. Furthermore, by generating various multiple nlp mutants, NLP6 and NLP7 were found to contribute to biomass of shoots in Arabidopsis, while contribution of other NLP proteins to biomass was not apparent.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物栄養 硝酸シグナル

1. 研究開始当初の背景

硝酸イオンは陸上植物の主要な窒素源であり、農業においては作物の生育を促すために用いられる。アンモニウムイオンも同様に植物の生育を促すことができ、水中に生育する藻類や陸上でも湿地や水田などの還元的条件下で生育する植物は窒素源としてアンモニアを好んで利用する。しかしながら、陸上の多くの土壌は酸化的条件下にあり、アンモニアは速やかに硝酸イオンへと酸化されるため、硝酸イオンが陸上植物の主要な窒素源である。土壌中から植物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アへと還元されてアミノ酸へと取り込まれ、さらに葉緑体色素や核酸などの窒素含有化合物の構成成分となる。このような重要性故に、利用可能な硝酸イオンの量に応じて、高等植物の代謝や生長を調節する機構が生じたと考えられる。

その調節機構の一つが、硝酸イオンによる遺伝子発現の制御である。1980年代には、高等植物において硝酸イオンの輸送体や同化を担う酵素群の遺伝子が硝酸イオンの添加によって顕著に発現の誘導を受けることが報告されており、さらに2000年代の遺伝子発現の包括的発現解析によって、硝酸イオンの同化に関わる遺伝子以外にも炭素や鉄の代謝に関わる遺伝子や制御機能をもつ遺伝子などの発現も誘導されることが示された。

この遺伝子発現誘導過程においては、硝酸イオンそのものがシグナル分子として作用していると考えられている。しかしながら、どのように硝酸イオンが感知され、遺伝子発現誘導に至るのかについては、その分子機構は明らかではなかった。

近年、遺伝子発現を活性化する転写因子の研究については、大きな進展があった。本研究の研究代表者は、NIN-like protein (NLP) と呼ばれる転写因子が硝酸誘導性遺伝子の近傍に位置する特異的な DNA 配列に結合して転写を活性化することを明らかにした。さらに、NLP 転写因子のうちのひとつであるシロイヌナズナ NLP6 の活性は、硝酸シグナルで活性化されることを示した。これにより、硝酸シグナルが NLP 転写因子を活性化することで遺伝子発現が誘導されるという分子機構のフレームワークが提示された。

2. 研究の目的

NLP タンパク質ファミリーは、シロイヌナズナでは9つのメンバーで構成される小規模な転写因子ファミリーである。イネやミヤコグサなど、シロイヌナズナ以外の植物も合わせた系統解析から、各植物の NLP 転写因子はアミノ酸配列の相同性に基づいて、3つのグループに分類されることが報告されている。シロイヌナズナでは NLP1 から NLP5、NLP6 と NLP7、NLP8 と NLP9 がそれぞれグループを形成している。

そこで、本研究課題では、NLP のグループ

間で分子的特徴、特に硝酸応答性に違いがあるのか、また個々の NLP が植物体レベルでどのような役割をはたしているのかを明らかにすることを目的とし、シロイヌナズナの個々の NLP の分子的性質と発現量・パターンの解析、さらに機能欠損の影響についての解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 各 NLP タンパク質の硝酸シグナルによる活性化の有無を調べるために、NLP の DNA 結合ドメインよりもアミノ末端側領域と、大腸菌の DNA 結合タンパク質である LexA のキメラ転写因子を発現させるためのプラスミドを作成した。アミノ末端側領域を用いたのは、NLP6 の解析においてこの領域が硝酸シグナルによって活性化される領域であることが示されていたためである。LexA 転写因子の結合配列を持つレポーター遺伝子がゲノム DNA 上に挿入されたシロイヌナズナ形質転換体の根に、これらのプラスミドをパーティクルガンを用いて導入し、レポーターの活性を調べることで、キメラ転写因子の転写活性化能を解析した。また、キメラ転写因子発現用プラスミドとレポータープラスミドを同時に葉肉プロトプラストに一過的に導入してレポーターの活性を調べることで、キメラ転写因子の転写活性化能の解析を行った。

(2) NLP 遺伝子群の発現解析は、NLP 遺伝子の 5'側上流領域の制御下で GUS 遺伝子が発現させるコンストラクトを持つ形質転換体を作成し、その GUS 活性を調べることでより行った。

(3) NLP 遺伝子の一重変異体は、リソースセンターから分譲された T-DNA ラインの遺伝子型の確認と発現解析を行って確立した。多重変異体は、これらの変異体同士を交配することによって作成した。これらの変異体を窒素源の濃度を変えた培地で育成し、表現型を観察することで各 NLP の植物体における役割を推察した。

4. 研究成果

(1) 硝酸シグナルによる活性化が、NLP 転写因子群に共通した性質であるのか、もしくは特定のグループのみの特徴であるのかを明らかにするために、NLP6 以外のシロイヌナズナ NLP タンパク質も硝酸シグナルによる活性化を受けるかどうか検討した。このとき、発現量が非常に少ないと考えられた NLP3 は解析の対象から除外した。最初に実施したパーティクルガンを用いた解析では、NLP6 以外にも NLP7 と NLP9 が硝酸イオン処理によって活性化されることが明らかとなった(図1)。しかし他の NLP については明瞭な結果が得られにくいものがあったため、プロトプラストの一過的発現系を用いて硝酸応答性を

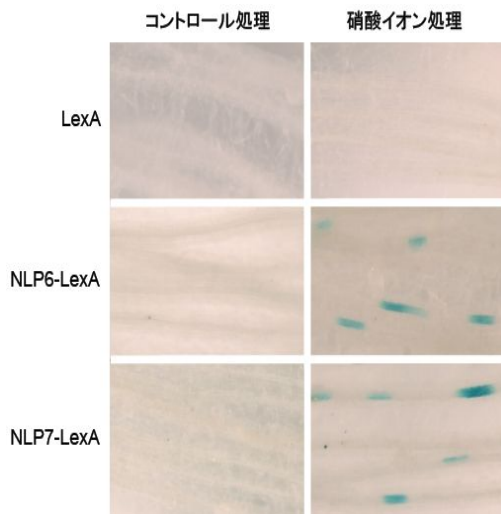


図 1. パーティクルガンを用いた硝酸応答性のアッセイの様子。青い染色が活性を示す。

モニターする系を新たに構築して解析を実施した。その結果、調べた全ての NLP が硝酸シグナルによる活性化を受けることが分かった(図 2)。硝酸シグナルによる活性化率は NLP6, NLP7 > NLP4, NLP5, NLP9 > NLP8 >> NLP1, NLP2 であった。NLP6 と NLP7 は硝酸イオン非添加時の活性が非常に低く、硝酸イ

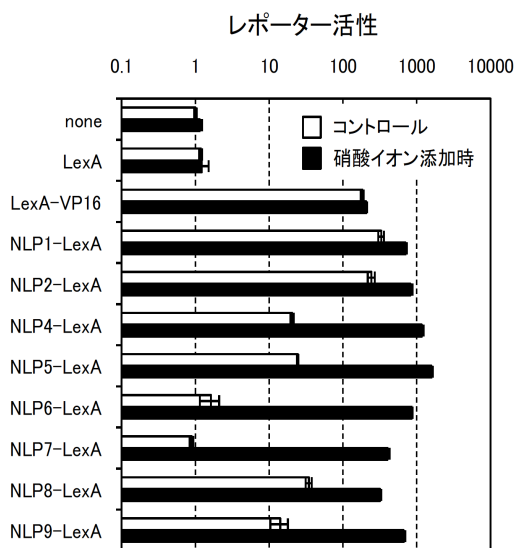


図 2. 硝酸イオン添加による、シロイヌナズナ NLP のアミノ末端領域の転写活性化能の変化

グナルによって 500 倍程度活性化され、強い硝酸応答性を示した。一方、応答性が最も低かった NLP1 と NLP2 では、硝酸イオン非添加時でも高い転写促進活性があり、硝酸イオ

ン添加によっては 2 倍程度活性が上昇した。以上の結果から、すべての NLP は硝酸シグナルによって活性化される特徴を有しているが、基底レベルの活性と硝酸シグナルによる活性化の程度にはそれぞれの NLP タンパク質ごとに違いがあることが明らかとなった。分子的な性質のみで判断すると NLP6 と NLP7 が硝酸シグナルによる遺伝子発現誘導に最も貢献し得る NLP であると考えられる。また、系統樹による NLP のグループ分けを考慮すると、NLP6 と NLP7 の属するグループの NLP は硝酸シグナルによる活性化の程度が大きいものである可能性が示唆された。

(2) NLP のプロモーター領域の下流に GUS 遺伝子を融合させたレポーター遺伝子を発現する形質転換体を用い、葉では NLP2 と NLP7 が、根においては NLP1, NLP4, NLP6, NLP7 の発現が強いことを明らかにした。NLP7 の発現が地上部と地下部の両方で強いことが、次項で述べる、欠損の際の表現型と関連していると考えられた。

(3) 各 NLP の植物体レベルでの役割を明らかにするために、NLP の T-DNA 変異体の二重変異体を 14 種類、三重変異体を 10 種類、四重変異体を 4 種類、五重変異体を 1 種類作出した。一重変異体では *nlp7* 変異体で地上部新鮮重の減少が見られ、*nlp6* と *nlp7* の二重変異体でそれがさらに顕著となった。他の *nlp* 変異体と *nlp7* の組み合わせでは *nlp7* 一重変異体と差は見られなかった。また、三重変異体、四重変異体や五重変異体では、*nlp6* と *nlp7* の両方の変異を含む組み合わせで *nlp6 nlp7* 二重変異体と同様の表現型となった。このことから、NLP7 が主要な役割を、NLP6 が NLP7 と重複した補助的な役割を持ち、硝酸シグナルによる地上部の生長制御に関与していることが示された。このことは、硝酸シグナルへの高い応答性を持つ NLP が地上部のバイオマスに貢献していることを示唆しており、今後他の植物種、特に作物などで主要な役割を果たしている NLP を同定する際にこの知見が重要な手がかりになると考えられる。

根系の生長については *nlp6* や *nlp7* とは異なる一重変異体で、野生型とは異なる表現型が見られた。この *nlp* 変異体では、窒素飢餓条件で前培養後、硝酸イオン添加条件で培養すると野生型よりも側根の伸長が良かった。しかし、前培養を硝酸イオン添加条件で行うと差は見られなくなった。(1)の項の解析において、この NLP は硝酸イオン非添加時においてもある程度の活性を持つことが示されていたことから、この NLP が窒素飢餓状態で機能して根系の発達に負的作用を起こす可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Konishi M, Yanagisawa S (2015) Transcriptional repression caused by Dof5.8 is involved in proper vein network formation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Plant Research* in press. 査読有, DOI 10.1007/s10265-015-0712-0

Konishi M, Donner TJ, Scarpella E, Yanagisawa S (2015) MONOPTEROS directly activates the auxin-inducible promoter of the Dof5.8 transcription factor gene in *Arabidopsis thaliana* leaf provascular cells. *Journal of Experimental Botany* 66 :283–291. 査読有. DOI:10.1093/jxb/eru418

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. *化学と生物* 52:421-423. 査読有.

Konishi M, Yanagisawa S (2014) Emergence of a new step towards understanding the molecular mechanisms underlying nitrate-regulated gene expression. *Journal of Experimental Botany* 65:5589-5600. 査読有. DOI:10.1093/jxb/eru267

Maeda S, Konishi M, Yanagisawa S, Omata T (2014) Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 55:1311-1324. 査読有. DOI: 10.1093/pcp/pcu075

[学会発表](計7件)

小西美穂子, 柳澤修一 (2015) 胚発生と維管束パターン形成におけるシロイヌナズナ Dof5.8 転写因子の役割, *日本植物生理学会 2015 年度年会*, 3月16日~3月18日, 東京農業大学世田谷キャンパス (東京都世田谷区)

小西美穂子, 鈴木渉, 柳澤修一 (2014) 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 2014 年度大会*, 9月12日~9月14日, 明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市)

小西美穂子, 柳澤修一 (2014) 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 年度大会*, 9月9日~9月11日, 東京農工大学小金井キャンパス (東京都小金井市)

Yoshioka N, Konishi M, Ishida T, Yanagisawa S (2014) Nitrate-responsive transcription factor NLP directly regulates expression of BT protein genes, *日本植物生理学会 2014 年度年会*, 3月18日~3月20

日, 富山大学 (富山県富山市)

小西美穂子, 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, *日本植物生理学会 2014 年度年会*, 3月18日~3月20日, 富山大学 (富山県富山市)

柳澤修一, 小西美穂子, 鈴木渉 (2014) 植物の硝酸応答機構研究の新展開, *日本植物生理学会 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, 富山大学 (富山県富山市)

小西美穂子, 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, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

[図書](計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 美穂子 (KONISHI, Mineko)

東京大学・生物生産工学研究センター・特任助教

研究者番号: 20642341