

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660046

研究課題名(和文) 栄養素シグナルによる植物の花成制御機構の解明

研究課題名(英文) Flowering regulation in response to C/N nutrient availability

研究代表者

山口 淳二 (YAMAGUCHI, Junji)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10183120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：炭素(C)と窒素(N)は代謝の必須要素であり、その利用可能な相対量比(C/Nバランスと称される)は植物の成長の最適化機構と密接な関係がある。特に花成はC/Nの影響は顕著である。環境シグナルに応答した花成制御に関しては多くの報告があるにもかかわらず、花成とC/Nのような栄養素状態に関する関連性は今でも不明の点が多い。そこでC/N依存的な花成の分子基盤の解明を目指して、大気中CO<sub>2</sub>濃度と水耕栽培によるN濃度制御システムを確立し、これを用いたC/N依存性花成解析の研究を実施した。長日条件下の高C/低N条件においてシロイニナズナの花成が促進することを明らかとし、その分子基盤の解析を実施した。

研究成果の概要(英文)：Carbon (C) and nitrogen (N) are essential elements for metabolism and relative balance of the availability, called as C/N balance, which must be tightly coordinated for the optimal growth in plants. Especially, phase transition such as flowering is suggested to be affected by C/N balance. Although there are a lot of findings of flowering regulation system in response to environmental cues, the relationship between flowering and C/N nutrient status is still unclear. To elucidate the molecular mechanism of C/N-inducible flowering, we performed C/N-responsible flowering analysis using an atmospheric CO<sub>2</sub> manipulation system combined with hydroponic culture to regulate N levels. We found that high C/low N condition promotes the flowering of Arabidopsis plant under long-day condition. In this meeting, we will present analyses of gene expression, metabolites, proteome and discuss about flowering regulation system by C/N-nutrient availability.

研究分野：植物科学

キーワード：花芽形成 栄養学 メタボローム マイクロアレイ 植物

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物は、生育環境の栄養条件に応じて代謝、成長を巧みに制御しながら生きている。各栄養素の代謝系は相互に影響し合っているが、特に代謝の根幹を担う炭素源(C)と窒素源(N)は、アミノ酸合成をはじめとして、多くの代謝系で密接に関連している。そのため植物は、その相対量比(C/Nバランス)を感知し適応する「C/N 応答」能力を有している。窒素欠乏や糖の分配異常などにより C/N バランスが崩れた場合、植物の発芽等の初期成長が阻害されるだけでなく、花成・老化といった植物のライフサイクルの転換点も重大な影響を受ける (Corruzi and Zhou, Curr. Opin. Plant Biol. 4: 247, 2001)。

(2) 特に、花成は「栄養成長相から生殖成長相への転換点」として非常に重要であり(図1)、個体レベルでの栄養素代謝のフローも劇的に変化する。しかし、その生理学的重要性が指摘される一方で、解析が困難な C/N 応答制御の分子機構に関する知見はほとんど得られていなかった。

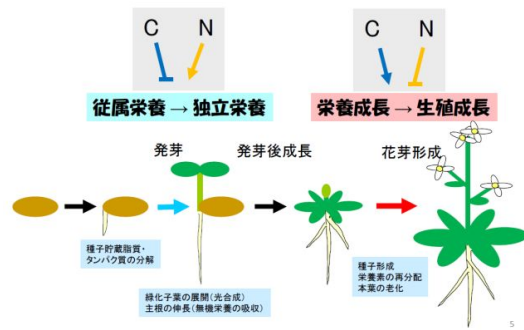


図1. C/Nによる植物成長相の転換制御モデル

2. 研究の目的

(1) 申請者らは、C/N 応答制御機構の解明を目指し、独自のC/Nストレス条件を用いたスクリーニングを行い、新規のC/N 応答異常変異体 *carbon/nitrogen insensitive 1-D (cni1-D)* の単離に成功した(図2)。この変異体は、新規のユビキチンリガーゼ ATL31 が過剰発現することで高C/低Nストレスでも発芽後成長が進行し、逆に機能欠損変異体 *at131* ではC/N 過剰応答性を示す (Sato et al., Plant J. 60: 852, 2009)。ユビキチンリガーゼは、特定の標的タンパク質をユビキチン化し、プロテアソームによる分解へと導くことで、多くの重要な生命現象を制御する (Santner and Estelle, Plant J. 61: 1029, 2010)。更なる解析から、ATL31 のユビキチン化標的分子として 14-3-3 タンパク質を同定した。すなわち、ATL31 はC/Nに応じた 14-3-3 安定性制御を介して、植物の発芽後成長を制御することを証明した (Sato et al., Plant J. 68: 137,

2011, Sato et al, Plant Signal. Behav. 6: 1465)。

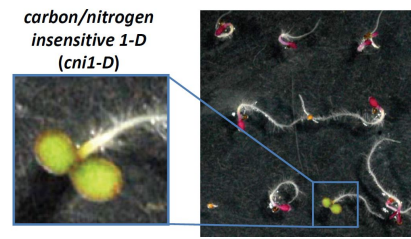


図2. C/N 応答異常変異体の単離

(2) 最近申請者らは、これまでの発芽後成長を指標にした解析から一段ステップアップして、より成熟した植物個体でのC/N 応答解析に取り組んでいる。この解析を進めるなかで、植物体を高C/低N処理すると「花成」が促進されること、それが *at131* 機能欠損変異体 (*at131 KO*) でより顕著になり、逆に過剰発現体 (*ATL31 OX*) では遅延するという結果を得た。これは、新たなC/N制御因子ATL31を介したシグナル伝達系により、植物の花成を制御する可能性を強く示唆している。

(3) 本計画では、「栄養素シグナルによる植物の花成制御機構の解明」を目指し、新たなアプローチを試みる。基幹代謝の根幹を担うC/N(炭素/窒素)バランスは、植物の花成制御に關与する。以下の3研究課題を実施することで、栄養素代謝と花成制御をつなぐ分子メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 以下3計画を実施する。

1) 花成変異体を用いた C/N 誘導性花成の解析: 既存の花成制御因子変異体(単独)および ATL31 変異体との交配株を用いて、高C/低Nストレス下での花成誘導性について遺伝学的に検証する。

2) C/N 誘導性花成におけるシグナル伝達ネットワークの解析: 野生型・ATL31 変異体を用いて、C/N 応答性の花成制御遺伝子群の発現変動を明らかにする。

3) メタボローム解析による C/N 誘導性花成鍵代謝物の同定: メタボローム解析とそれに続く代謝酵素変異体を用いた実験から、鍵代謝物を同定する。

4. 研究成果

1) C/N 応答性の花成を検証する実験系として、大気中CO2濃度と根圏窒素栄養条件の制御によるC/N処理系を確立した。野生型植物では高CO2/低窒素条件で花成が促進されること、さらに花成制御のマスターレギュレーターの1つである FT の機能欠損変異体では、

そうしたC/N応答性の花成促進効果が抑圧されていることから、C/NシグナルがFT経路の上流で花成シグナルとクロストークすることが分かった。

2)C/N処理後のリン酸化プロテオーム解析から、C/N誘導性花成のシグナル伝達因子候補として転写因子が同定された。一過的レポーター解析から、C/N応答性のリン酸化部位がこの転写因子の転写活性に重要なことが示された。

3)C/N処理後のメタボローム解析から、糖代謝物Xの量が顕著なC/N応答性を示すことが確認された。Xはシグナル因子として機能することが注目されており、C/N応答シグナルとの関係性について詳細な解析を行っている。

#### 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10件)-全て査読有。

1. Lu Y, Sasaki Y, Li X, Matsuura T, Mori IC, Hirayama T, Sato T, \*Yamaguchi J (2015) ABI1 regulates carbon/nitrogen-nutrient signal transduction independent of ABA biosynthesis and canonical ABA signalling pathways in Arabidopsis. *J Exp. Bot.*66:2763-2771 [10.1093/jxb/erv086]
2. Huarancca Reyes T, Maekawa S, Sato T, \*Yamaguchi J (2015) The Arabidopsis ubiquitin ligase *ATL31* is transcriptionally controlled by WRKY33 transcription factor in response to pathogen attack. *Plant Biotech.* 32: 11-19 [10.5511/plantbiotechnology.14.1201b]
3. Maekawa S, Takabayashi A, Huarancca Reyes T, Yamamoto H, Tanaka A, Sato T, \*Yamaguchi J (2015) Double mutant of *at131* and *at16* develops light intensity-dependent pale-green leaves, which is caused by inhibition of 5-aminolevulinic acid biosynthesis. *PLOS ONE* 10(2): e0117662 [10.1371/journal.pone.0117662]
4. Suzuki Y, Arae T, Green PJ, Yamaguchi J, \*Chiba Y (2015) AtCCR4a and AtCCR4b are involved in determining the poly(A) length of *Granule-bound starch synthase 1* transcript and modulating sucrose and starch metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*56: 863-874 [10.1093/pcp/pcv012]
5. Lu Y, Yamaguchi J, \*Sato T (2015) Integration of C/N-nutrient and multiple environmental signals into the ABA signaling cascade. *Plant Signaling Behavior* e1048940 [10.1080/15592324.2015.1048940]
6. Aoyama S, Huarancca Reyes T, Guglielminetti L, Yu L, Morita Y, \*Sato T, Yamaguchi J (2014) Ubiquitin ligase *ATL31* functions in leaf senescence in response to the balance between atmospheric CO<sub>2</sub> and nitrogen availability in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 55: 293-305 [10.1093/pcp/pcu002]
7. Maekawa S, Inada N, Yasuda S, Fukao Y, Fujiwara M, Sato T, \*Yamaguchi J (2014) The carbon/nitrogen regulator *ATL31* controls papilla formation in response to powdery mildew fungi penetration by interacting with *SYP121* in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 164: 879-887 [10.1104/pp.113.230995]
8. Aoyama S, Lu Y, Yamaguchi J, \*Sato T (2014) Regulation of senescence under elevated atmospheric CO<sub>2</sub> via ubiquitin modification. *Plant Signaling Behavior* e28839 [10.4161/psb.28839]
9. Yasuda S, Sato T, Maekawa S, Aoyama S, Fukao Y, \*Yamaguchi J (2014) Phosphorylation of Arabidopsis ubiquitin ligase *ATL31* is critical for plant C/N-nutrient response under control of 14-3-3 stability. *J. Biol. Chem.* 289: 15179-15193 [10.1074/jbc.M113.533133]
10. \*Sako K, \*Yanagawa Y, Kanai T, Sato T, Seki M, Fujiwara M, Fukao Y, Yamaguchi J (2014) Proteomic analysis of 26S proteasome reveals its direct interaction with transit peptides of plastid protein precursors for their degradation. *J. Proteome Res.* 13: 3223-3230 [10.1021/pr401245g]

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

1. 名称：不定根発生誘導剤及び根系発達促進剤  
発明者：山口淳二，眞木祐子，副島洋，谷野圭持，綿引雅昭，佐藤長緒  
権利者：国立大学法人北海道大学，雪印種苗株式会社  
種類：特許  
番号：P2016-068924  
出願年月日：平成 28 年(2016 年)3 月 25 日  
国内外の別： 国内
  
2. 名称：不定根形成促進剤及び根系発達促進剤  
発明者：山口淳二，眞木祐子，副島洋，綿引雅昭，佐藤長緒  
権利者：国立大学法人北海道大学，雪印種苗株式会社  
種類：特許  
番号：P2014-046  
出願年月日：平成 26 年(2014 年)8 月 25 日  
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/CSF2-web/>

6．研究組織

(1)研究代表者

山口 淳二 (YAMAGUCHI, Junji)  
北海道大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：1 0 1 8 3 1 2 0