

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2015

課題番号：26712009

研究課題名(和文) 慢性的窒素不足環境での植物の生存を支える転写制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the gene network underlying plant adaptation to chronic nitrogen limitation

研究代表者

木羽 隆敏 (Kiba, Takatoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・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) 8,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性的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として同定した、一群のGARP型転写因子 (NBG) の機能解析を行った。

発現解析、過剰発現体・恒常的活性化型NBG過剰発現体の解析などから、NBGは窒素充足条件時に窒素不足応答に関わる遺伝子の約2割の発現を抑制する転写抑制因子であることが明らかになった。これらの結果から、NBGは慢性的窒素不足転写応答のマスターレギュレーターの一つであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This project aims at characterizing a family of GARP-type transcription factors (NBG), which were identified as regulators of a high-affinity nitrate transporter gene AtNRT2.4 playing a important role for efficient uptake of nitrogen under chronic nitrogen limitation. Overexpression of NBG (NBGox) repressed AtNRT2.4 expression, while that of engineered NBG (NBG-VPox), which acts as an activator of transcription, induced it. NBGs are expressed throughout plant body being high under ample nitrogen and low under nitrogen limitation, suggesting that NBGs act as transcriptional repressors of not only AtNRT2.4 but also other genes involved in nitrogen-limitation responses. Comparative microarray analyses using NBGox and NBG-VPox suggest that NBGs function as one of master regulators of chronic nitrogen-limitation responses.

研究分野：農学

キーワード：植物分子生理学 植物栄養 窒素栄養 栄養欠乏 転写制御 GARP

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が求められるが、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必要である。

特に、植物が自然環境でしばしば遭遇する比較的長期間の窒素不足環境（慢性的窒素不足環境）への応答メカニズムの理解が欠かさないが、分子レベルでの研究は進んでいなかった。研究代表者は、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、そのメカニズム解明を進めてきた。

2. 研究の目的

研究代表者は既に、慢性的窒素不足環境における高効率の硝酸イオン吸収に必要な高親和性硝酸イオン輸送体 *AtNRT2.4* の発現制御に関わる新奇 GARP 型転写因子群 (NRT2.4-Binding GARP, NBG) の同定に成功していた (Kiba et al. 未発表)。NBG は7つの遺伝子からなる遺伝子ファミリーを構成し、N末端側に転写抑制ドメインを持つため、転写を抑制することで慢性的窒素不足環境に関与すると考えられた。本研究では、NBGの機能解析を行うことにより、慢性的窒素不足環境での植物の生存を支える転写制御ネットワークの実体を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) NBGの発現解析

定量的 RT-PCR 及び NBG プロモーター:GUS 融合遺伝子を導入した形質転換を用いて、窒素栄養環境を変化させた条件で、発現解析を行った。

(2) NBG 及び恒常的活性化型 NBG 過剰発現体の解析

NBG の機能解析のため、35S プロモーター及びエストラジオール誘導性プロモーターの下流で NBG1 及び NBG2 を高発現する形質転換体を確立した (NBGox)。また恒常的活性化型 NBG (NBG とウイルスの転写活性化ドメイン VP16 の融合遺伝子) を 35S プロモーター及びエストラジオール誘導性プロモーターの下流で高発現する形質転換体を確立した (NBG-VPox)。これら過剰発現体において、*AtNRT2.4* 発現解析を行った。

(3) NBGox と NBG-VPox を用いたゲノムワイドなターゲット探索

野生株、NBG2ox、NBG2-VPox を窒素充足条件と窒素欠乏条件で栽培し、マイクロアレイ解析を行った。そのデータを用いて、NBG ターゲットの絞り込みを行った。

4. 研究成果

(1) NBGの発現解析

硝酸イオンのみを窒素源とする培地、アンモニウムイオンのみを窒素源とする培地、窒素を含まない培地でシロイヌナズナ野生株を栽培し、地上部と根に分けて定量的 RT-PCR により発現解析を行った。その結果、根特異的に発現する遺伝子 (NBG3, 4) と根でも地上部で発現する遺伝子 (NBG1, 2, 5, 6, 7) に分けられることが明らかになった。また窒素栄養状態によって、発現応答パターンが分かれることもわかった (図1)。

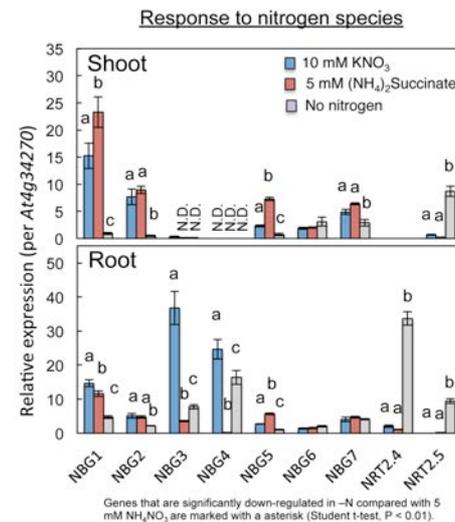


図1. 窒素栄養状態に応答した NBG の発現

NBG1, 2, 3, 5 は窒素欠乏状態で発現が低下し、*AtNRT2.4* とは逆相関を示した。一方 NBG6, 7 は窒素栄養状態に応答しなかった。NBG1, 2, 3, 5 プロモーター:GUS 融合遺伝子を用いた解析からも同様の結果が得られた。

(2) NBG 及び恒常的活性化型 NBG 過剰発現体の解析

NBG1ox, NBG1-VPox, NBG2ox, NBG2-VPox を作製し、*AtNRT2.4* の発現を解析した。*AtNRT2.4* の発現は、NBGox では抑制され (図2)、NBG-VPox では誘導されたことから (図3)、NBG は植物体内でも *AtNRT2.4* の転写抑

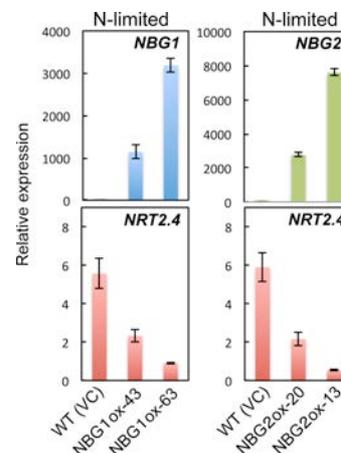


図2. 窒素欠乏条件で栽培した NBG1ox と NBG2ox では *AtNRT2.4* の発現が抑制された

制因子として働くことが明らかになった。

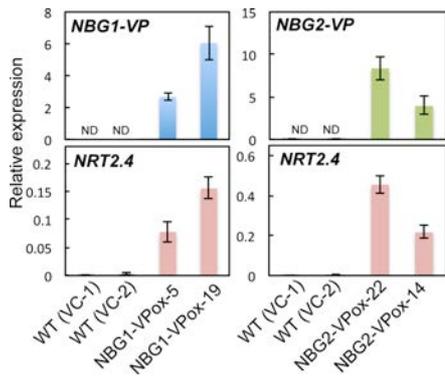


図3. NBG1-VPox と NBG2-VPox では *AtNRT2.4* の発現が促進された

(3) NBG2ox と NBG2-VPox を用いたゲノムワイドなターゲット探索

AtNRT2.4 以外の NBG のターゲット遺伝子を探索するため、NBG2ox と NBG2-VPox における遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。*AtNRT2.4* 同様に、NBG2ox で発現が下がる遺伝子及び NBG2-VPox で発現が上がる遺伝子を絞り込んだ結果、NBG は慢性的窒素不足で変動する遺伝子 2261 遺伝子のうち、500 遺伝子 (22%) の制御を担うマスターレギュレーターの一つであることが示唆された (図4)。制御遺伝子の中には、窒素栄養のリサイクル、炭素代謝、根の構造変化などに関わる遺伝子が多く含まれていた。

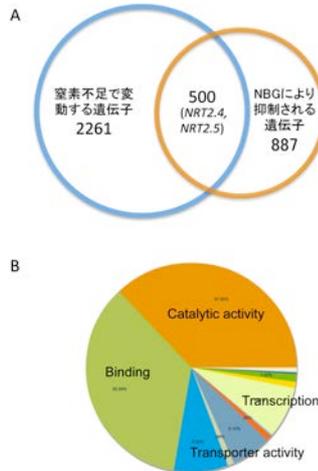


図4. ゲノムワイドな NBG ターゲット遺伝子の探索 (A) 窒素不足で変動する遺伝子と NBG の標的遺伝子のベン図 (B) NBG 標的遺伝子のオントロジー

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 and Anne Krapp (2016) Plant nitrogen acquisition under low

availability: regulation of uptake and root architecture. *Plant Cell Physiol.* 57, 707-714. 査読有

2. 榎原均, 木羽隆敏 (2016) C4 モデル植物 *Staria viridis* の研究ツールの整備, 植物科学の最前線 (BSJ-Review) 7, 42-46. 査読無
3. Norihito Nakamichi, Saori Takao, Toru Kudo, Takatoshi Kiba, Yin Wang, Toshinori Kinoshita, and Hitoshi Sakakibara (2016) Improvement of Arabidopsis biomass and cold-, drought-, and salinity-stress tolerance by modified circadian clock-associated PSEUDO-RESPONSE REGULATORS. *Plant Cell Physiol.* 57, 1085-1097. 査読有
4. 木羽隆敏, 榎原均 (2015) サイトカニンが器官間シグナルとして働く仕組み, 化学と生物 53, 421-422. 査読無
5. Donghwi Koh*, Joohyun Kang*, Takatoshi Kiba*, Jiyoung Park, Mikiko Kojima, Jihye Do, Kyung Yun Kim, Mi Kwon, Anne Endler, Won-Yong Song, Enrico Martinoia, Hitoshi Sakakibara, and Youngsook Lee (2014) *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111, pp7150-7155. *equal contribution. 査読有
6. Lina Lezhneva*, Takatoshi Kiba*, Ana-Belen Feria-Bourrellier, Florence Lafouge, Stéphanie Boutet-Mercey, Parzhak Zoufan, Hitoshi Sakakibara, Françoise Daniel-Vedele, and Anne Krapp (2014) The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *Plant J.* 80, pp230-241. 査読有

[学会発表] (計5件)

1. Takatoshi Kiba, Nobutaka Mitsuda, Yuko Takiguchi, Masaru Ohme-Takagi, Yoichi Kondou, Takeshi Yoshizumi, Minami Matsui, Hitoshi Sakakibara. Characterization of GARP-type transcription factor NBGs implicated in the regulation of nitrogen limitation-responses. 第57回日本植物生理学会年会, 2016年3月18日, 岩手大学

2. 木羽 隆敏. 窒素栄養欠乏応答
- 効率的な吸収のメカニズム -. 第1
回植物の栄養研究会, 2015年9月5日,
東京大学
3. 木羽隆敏, 光田展隆, 瀧口裕子, 高木
優, 近藤陽一, 吉積毅, 松井南, 榊原
均. 低窒素栄養応答に関わるGARP型転
写因子の機能解析. 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
4. 木羽隆敏, サイトカイニンの器官間輸
送メカニズムとその生理的役割, 第78
回植物学会シンポジウム-生理活性物質
の輸送制御を介した植物の生理-, 2014
年9月12日, 明治大学
5. 木羽隆敏, 超低濃度の窒素栄養を効率
よく吸収するメカニズム, 第53回ガン
マーフィールドシンポジウム-環境と戦
う遺伝子と突然変異-, 2014年7月16
日, 水戸市・三の丸ホテル

[図書] (計4件)

1. Takatoshi Kiba and Rossana Henriques
(2016) Assessing protein stability
under different light and circadian
conditions. *Methods in Molecular
Biology* (Environmental Responses in
Plants, Paula Duque (ed.)) 398,
pp141-152

[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

植物ホルモン「サイトカイニン」の輸送を担
う遺伝子を同定-根から葉へのサイトカイ
ニン長距離輸送の鍵遺伝子-

([http://www.riken.jp/pr/press/2014/201
40429_2/](http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140429_2/))

6. 研究組織

(1)研究代表者

木羽 隆敏 (KIBA Takatoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科
学研究センター・研究員

研究者番号: 20532097