

柳澤 修一

東京大学 生物生産工学研究センター
教授

フィールド環境での栄養応答ネットワークによる生長制御モデルのプロトタイプ構築

§ 1. 研究成果の概要

植物が持つ多様な栄養環境への適応能力の頑健性や植物が示す異なる栄養環境における栄養応答の仕組みを明らかにし、また、遺伝的要因がその仕組みにどのように影響しているのかを解明することが本研究課題の目標である。得られる知見は、どのような遺伝情報の改変が作物の栄養獲得と利用効率を向上させるかを明らかにして、農業生産の維持・向上に貢献することが期待される。植物の成長量や作物生産量に最も寄与する土壌中の栄養素は窒素栄養とリン栄養であることを踏まえて、窒素栄養とリン栄養の獲得バランスの維持を担う仕組みの解明、多様な窒素栄養環境への適応能力の基礎となる栄養応答ネットワークの解明、さらには低窒素あるいは低リン栄養環境への適応能力の向上に結びつく遺伝子とそれの優良アリル(遺伝子多型)の発掘を進めた。

窒素栄養とリン栄養の獲得バランス維持を担う仕組みについては、これまでに、リン飢餓応答とリン獲得促進を担う転写因子 PHR1 が窒素栄養獲得の抑制に働く転写抑制因子 NIGT1 をコードする遺伝子の発現を促進することで、リン飢餓時に窒素栄養獲得を抑制することを明らかにしている。今年度は、PHR1 の活性を阻害する SPX タンパク質をコードする遺伝子の発現を NIGT1 が直接、抑制しており、窒素不足時には、この NIGT1 による SPX 遺伝子の発現抑制が解除されて PHR1 の活性が阻害されることを明らかにした。窒素飢餓時のリン獲得抑制とリン飢餓時の窒素獲得抑制が複数の転写カスケードを統合して構築されるネットワークによって制御されていることが明らかとなり、窒素栄養とリン栄養の獲得バランス維持を担う仕組みが解明された。

低窒素環境での生育を支える転写制御ネットワークの解明のための、多様なイネ品種の根サンプルを用いた RNA-seq 解析とそのデータを使用した WGCNA(Weighted Correlation Network Analysis)ソフトウェアによる共発現モジュールの構造解析を 2018 年度までに完了しているので、この共発現モジュール構造の維持に重要な転写因子の同定を GENIE3 ソフトウェアを用いた機械学習によって行った。これにより、共発現モジュール構造でハブ遺伝子となっている遺伝子が窒素欠乏時のイネの根における転写制御ネットワークで中心的な役割を果たす転写因子をコードしている

ことが示された。同定された転写因子は、シロイヌナズナの窒素とリンの獲得バランス維持を担う転写因子のホモログなどを含んでいた。CRISPR/Cas9 システムを用いて、これら転写因子の遺伝子の破壊を行ったところ、遺伝子破壊を行ったゲノム編集イネでは窒素欠乏による転写パターンの変化が野生型イネとは異なっていることが確認され、これら転写因子が低窒素栄養環境での生育に重要であることが明らかとなった。これらの転写因子は自己抑制および相互制御を行うことも明らかになったことから、これら転写因子の自己抑制および相互制御が低窒素栄養環境での転写制御ネットワークの頑健性に寄与していることが考えられる。異なる窒素栄養環境に適応するための地上部の転写制御ネットワークの解析は、屋外(水田)で栽培したイネの葉身のRNA-seq データを用いて行った。共発現ネットワーク解析と機械学習によって、窒素栄養応答性の制御に関わると予想される転写因子が9つ選抜され、これらは二つの独立した転写ネットワークを構築していることが示された。一つは葉身の発達と機能発現(光合成と窒素同化)に関わる転写ネットワークであり、もう一つは多様なタンパク質リン酸化酵素の発現誘導に関連していると思われるネットワークであった。

栄養吸収あるいは低栄養環境適応に関連した優良形質をもたらす遺伝子や遺伝子多型(優良アリル)の同定は、主としてシロイヌナズナ野生系統を用いたゲノムワイドなアプローチにより実施した。2018年度までの解析により、リン栄養獲得におけるシロイヌナズナ野生系統間差を生み出す遺伝的要素の1つとして、赤色光受容体遺伝子(*phyB*)の多型があること、赤色光照射がリン酸吸収を促進することを明らかにしている。そこで、イネやブロッコリーなどにおける赤色光照射効果とこの効果に対するイネの*phyB* 遺伝子の破壊の影響を調べ、赤色光照射によるリン吸収促進は様々な植物種で起こっていることを示した。また、シロイヌナズナ野生系統を用いた GWAS (Genome Wide Association Study) によって見出した高いリン酸吸収能力に関わる遺伝子のイネのホモログの解析も実施した。この遺伝子を過剰発現しているイネの作出と共に、CRISPR/Cas9 システムを用いて、この遺伝子の破壊系統も作出して解析を行った結果、この遺伝子はイネにおいてもリン酸吸収能力に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

低窒素応答に関連する優良アリルの同定を目指して行った GWAS によって、ある硝酸輸送体遺伝子の多型が低窒素環境での生育改善をもたらす可能性が示唆されたことから、詳細な解析を実施し、この遺伝子のプロモーター中の多型が、この遺伝子の地上部における発現量を増大させ、その結果として低窒素環境での生育改善をもたらすことを明らかにした。低窒素環境での生育を可能にする優良アリルの同定は、極少量の窒素源存在下(0.03mM N)において他の野生系統よりも高成長を示す E244 野生系統を使用しても実施した。Col-0 系統と E244 系統を用いた接木実験により、E244 系統では地上部の遺伝子型が移動性シグナルを介して地下部の表現型に影響を及ぼして、低窒素環境での生育を大きく改善していることを明らかにした。この優良形質を担う遺伝子の同定に向け、RADシーケンスによる E244 系統の QTL マッピングを行ない、優良アリルの座乗位置を6カ所(合計 0.7 Mbp)の範囲内に絞り込んだ。さらに、イネ栽培種における栄養応答解析の応用として、近未来地球環境適合型有用植物の設計を目的とした高 CO₂ 環境で高効率に光合成を行うイネの開発を進めた。具体的には、ジーンターゲティング(GT)を基盤としたゲノム編集技術を用いて、気孔閉鎖制御を担う陰イオンチャネルタンパク質 SLAC1 に優良アリルを導入することで気孔の CO₂ 応答を改良し、高 CO₂ 環境下でも高効率に光合成を行うことができるイネの開発を進めた。ジーンターゲティング用のプラスミドベクターを作製して、アグロバクテリウムを介してイネ台

中 65 号の二次カルスに導入し、GT カルスを得て、個体再生を進めている。

【代表的な原著論文】

1. Yoshiaki Ueda, Takatoshi Kiba, and Shuichi Yanagisawa, “Nitrate-inducible NIGT1 Proteins Modulate Phosphate Uptake and Starvation Signaling via Transcriptional Regulation of *SPX* Genes”, *Plant Journal*, 102: 448-466, 2020
2. Yoshiaki Ueda And Shuichi Yanagisawa, “Perception, Transduction and Integration of Nitrogen and Phosphorus Nutritional Signals in the Transcriptional Regulatory Network in Plants”, *Journal of Experimental Botany*, 70: 3709-3717, 2019

§ 2. 研究実施体制

(1) 柳澤グループ

① 研究代表者:柳澤 修一 (東京大学生物生産工学研究センター 教授)

② 研究項目

- ・ 窒素栄養とリン栄養の獲得バランス維持の仕組みの解明
- ・ 異なる栄養獲得能力を持つイネ品種を用いたRNA-seq解析データとGENIE3ソフトウェアを用いた機械学習による根における窒素応答制御ネットワークの中心転写因子の同定
- ・ シロイヌナズナ野生系統とGWASにより見出された栄養獲得あるいは栄養環境適応に重要な遺伝子候補の機能解析
- ・ 栄養獲得に関して優良な遺伝子多型の同定

(2) 射場グループ

① 主たる共同研究者:射場 厚 (九州大学大学院理学研究院 主幹教授)

② 研究項目

- ・ 近未来地球環境適合型有用植物の設計を目的とした高CO₂で高効率に光合成を行うイネの開発
- ・ 低窒素条件で高成長を示す野生系統の表現型を規定する主働遺伝子のQTLマッピング

(3) 宮尾グループ

① 主たる共同研究者:宮尾(徳富) 光恵 (東北大学大学院農学研究科 教授)

② 研究項目

- ・ 窒素栄養応答性が異なるイネ8品種のRNA-seq解析データを用いた、イネ葉身におけるトランスクリプトームと表現型を関連づけるWGCNA解析
- ・ GENIE3ソフトウェアを用いた機械学習によるイネ葉身における窒素応答制御ネットワークの中心転写因子の同定