

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

平成 17 年度採択研究代表者

柳澤 修一

(東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授)

「栄養シグナルによる植物代謝制御の分子基盤」

1. 研究実施の概要

環境から植物体内に取り込まれる炭酸ガスや硝酸イオンといった無機物は植物栄養として生体物質の原料となるだけでなく、遺伝子発現制御や代謝調節のための情報伝達物質として植物の生長や物質生産に深く関わっており、また、無機物から生合成される初期産物である糖やアミノ酸などもエネルギー源あるいは他の有機物の生合成の原料となる一方で栄養シグナル伝達物質としても働いている。植物は、個々の栄養シグナルによる制御と栄養シグナル伝達系間でクロストークの基づく制御さらには栄養シグナル伝達系と他のシグナル伝達系間でのクロストークに基づく制御によって、植物栄養を効率よく利用して生長と物質生産を行っていると考えられている。植物栄養に基づく遺伝子発現と代謝調節の仕組みを明らかにすることは植物の物質生産能力を活用していく上で非常に重要であるにもかかわらず、現在のところ、そのごく一端がわかっているのみである。そこで、植物栄養による生長・物質生産の制御の包括的理解を目指して、栄養シグナルの伝達の仕組みと栄養シグナルによる遺伝子発現制御と代謝制御の解析を行う。特に、植物における物質生産のための中心的代謝を担う炭素の同化システムと窒素の同化システムおよび同化のためのエネルギー供給システムに着目し、これらの代謝経路が植物栄養に応答していかに同調して、また、いかに相互に影響を及ぼしながら機能しているかを明らかにすることに力を点を置いている。我々は、遺伝子導入により代謝バランス改変に成功し、ラン藻のフルクトース-1,6-セドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ (FBP/SBPase) を葉緑体に導入することによる炭素代謝能改変植物体、転写因子 Dof1 の遺伝子の導入による窒素同化能力強化植物、NAD キナーゼ過剰発現によるエネルギーバランス改変植物の作出を行った。今後、これら形質転換植物における代謝改変をメタボローム解析と遺伝子発現解析により精査することによって、代謝回路間の相互制御が明らかにされることが期待される。また、栄養シグナルの伝達とそれに基づく細胞応答に関しては核内における転写因子の機能発現の制御が植物栄養シグナルによる代謝制御の重要なステップであることを示唆しており、植物栄養シグナル応答変異株などを用いた核内タンパク質の網羅的解析により、栄養シグナルの伝達と応答の総合的解析も実施する。

2. 研究実施内容

(研究目的、方法、結果、全体研究計画に対する研究進捗状況など、研究実施の具体的内容について、2 ページ程度にまとめてください。図、表、写真等を含めていただいても結構です。)

炭素同化経路、窒素同化経路、エネルギー代謝の相互制御機構の解明に向け、転写因子 Dof1 の遺伝子の導入による窒素同化能力強化植物、ラン藻の FBP/SBPase を葉緑体に導入することによる炭素代謝能改変植物体および NAD キナーゼ過剰発現によるエネルギーバランス改変植物のメタボローム解析による代謝改変の精査を開始した。予備的実験から、トウモロコシ転写制御因子 Dof1 遺伝子をジャガイモに導入した場合においても、シロイヌナズナに導入した場合と同様に、葉の遊離アミノ酸や総窒素量の増大など窒素同化の亢進を示唆する表現型が得られていたので、この形質転換ジャガイモを用いてソース器官（葉）とシンク器官（塊茎）での代謝改変を評価した。その結果、Dof1 形質転換ジャガイモでは遺伝子を導入していない非形質転換ジャガイモに比べて葉の遊離アミノ酸含量が最大 1.4 倍に増加しており、特に、アスパラギンやグルタミンなどのアミド型アミノ酸の増加が顕著であること、定植 3 ヶ月目の栽培終了時には、地上部の生重量、塊茎数、および、塊茎重量の増加が認められること、塊茎成分の分析から塊茎中の遊離アミノ酸含量の大きな減少とデンプン含量の増加が示された。このことから、Dof1 遺伝子の導入は代謝システムの異なるシンク器官とソース器官で違った効果を及ぼすことが示唆され、器官ごとに分析する重要性が明らかとなった。そこで、ゲノムデータの整ったシロイヌナズナのソース器官（葉）とシンク器官（根）を用いてそれぞれに遺伝子発現とメタボローム解析を行なうことにより、異なる器官による代謝回路の制御が詳細に判明することが期待される。

ラン藻カルビンサイクルで機能するフルクトース-1, 6-/セドヘプツロース-1, 7-ビスホスファターゼ (FBP/SBPase) をタバコ葉緑体に導入することにより、光合成活性の増大、生育促進、収量増大が見られることを示していたが、タバコではマイクロアレイ解析など、分子生物学的な解析に多くの問題があるため、シロイヌナズナ葉緑体に FBP/SBPase を導入した形質転換体を作成し解析した。その結果、シロイヌナズナ葉緑体に FBP/SBPase を導入することにより、全 FBPase 活性が野生株の 3.3 倍に増加し、光合成速度は野生株の 1.7 倍に上昇すること、また、野生株に比べて生育が早く 9 週齢における湿重量は野生株の 1.7 倍に増大することが判明した。シロイヌナズナにおいてもタバコと同様の表現型を示すことが明らかになったので、今後、形質転換シロイヌナズナにおいて特異的に誘導されている遺伝子群の網羅的に解析を行うと同時に、光合成能力の強化が、窒素同化能力にどのような効果を及ぼしているかをメタボローム解



図 1. 播種後 6 週目の FBP/SBPase 導入シロイヌナズナ。左：野生株、右：FBP/SBPase 導入株 (ApFS-2)。

析により明らかにする。また、野生株との生育に差が見られる直前（約5週目）の植物体から調整したRNAを用いた予備的DNAマイクロアレイ解析では、約20の遺伝子の発現量が1.5-2.0程度増加していたので、今後、これら遺伝子および関連する遺伝子群の発現量をより詳細に検討する予定である。また、Dof1遺伝子導入株との掛け合わせにより、光合成能力と窒素同化能力が同時に強化されたシロイヌナズナを作出し、そのような植物ではどのような代謝バランスとなっているかを明らかにする予定である。

また、エネルギー代謝関連酵素をコードする遺伝子の破壊株及び過剰発現植物系統の整備をおこない、代謝変動に関する基本データを取得した。すなわち、エネルギー代謝関連酵素としてNADキナーゼ（NADK）の過剰発現植物、及び破壊株に注目し、NAD代謝変動が生育に及ぼす影響を解析した。その結果、NADK破壊株ではクロロフィル量の減少と共に著しい生育の遅延が観察され、過剰発現体ではクロロフィルの増加や生育促進が検出された。また、NADK過剰発現植物ではカルビン回路の代謝物が増加していることから、NAD代謝の変動が窒素や炭素の代謝調節に重大な影響を与えることが明らかとなった。この結果から、NAD代謝系の変動により窒素と炭素の双方の植物栄養同化システムが影響を受けることが考えられた。今後は、NADK改変植物の代謝変動と窒素代謝と炭素代謝のバランス制御に関して、さらに詳細な解明を進める。また、その他のエネルギー代謝関係因子の改変植物についても整備中であり、系統が確立され次第、代謝物の測定及び炭素と窒素の供給バランスを変化させた生育条件での生育検定を行う。これらの結果を統合することにより、エネルギー代謝システムと炭素ならび窒素同化システムの同調的制御機構を評価する予定である。

栄養シグナル伝達機構の解析のために有用なシロイヌナズナの変異株を同定した。ハイスループットサーマルイメージングと遺伝学的手法を組み合わせた技法を開発し、重要な栄養シグナルである二酸化炭素シグナルの伝達機構の中核に変異を持つシロイヌナズナの変異株 *ht1* (*high leaf temperature mutant 1*)を単離した。気孔が開くと蒸散量が上昇し気化熱が奪われるため葉面温度が低下するが、逆に閉じると葉面温度は上昇する。この原理により、高感度サーモグラフィーを用いて葉温測定を行うことにより、間接的に気孔開度変化を調べることができることを利用して、二酸化炭素濃度依存的な葉温変化に異常を持つシロイヌナズナ突然変異体のスクリーニングを行った。単離した変異株 *ht1* では二酸化炭素濃度変化に伴う気孔の応答性が完全に消失しており、葉面温度における二酸化炭素応答性は気孔開度測定、気孔コンダクタンスの測定から二酸化炭素濃度依存的な気孔開度変化と一致することを明らかにした。この *ht1* 変異の二酸化炭素濃度への応答特異性を検証するため、気孔開口を誘導する青色光やカビ毒フシコクシン、乾燥ストレスによる気孔閉鎖反応を誘導する植物ホルモンであるアブシジン酸に対する応答性を調べた結果、これらの刺激に対する応答性は損なわれていないことがわかり、二酸化炭素シグナル伝達系の構成因子における変異を *ht1* 変異株は持つと結論付けた。また、この変異の原因遺伝子 *HT1* は新規のタンパク質キナーゼをコードしており、同遺伝子のプロモーターとレポーター遺

伝子である *GUS* との融合遺伝子を導入した形質転換植物における解析や RT-PCR による発現解析により葉組織において孔辺細胞特異的な発現をしていることも明らかにした。HT1 によりリン酸化されるタンパク質の同定などにより二酸化炭素シグナルの伝達機構の詳細が明らかにされることが期待される。また、ハイスループットサーマルイメージングと遺伝学的手法を組み合わせた技法は、二酸化炭素シグナルと体内の窒素、リン酸、カリウムなどの主要栄養素シグナルとのクロストークについても解析することができると考えられるので、この手法を用いて新たな変異株の同定も進める予定である。

3. 研究実施体制

「東京大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：柳澤 修一（東京大学、助教授）
- ② 研究項目：異なる代謝回路の有機的關係による相互制御機構とそのような制御を生み出している栄養情報の伝達システムの解明を目指した代謝バランス改変植物を用いたメタボローム解析とプロテオーム解析。
 - (a) Dof1 遺伝子導入植物のソース器官とシンク器官に分けたメタボローム解析。
 - (b) プロテオーム解析の材料の検討。

「近畿大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：重岡 成（近畿大学、教授）
- ② 研究項目：炭素代謝回路などの改変が他の代謝系にどのように影響を及ぼすかを明らかにするための、炭酸固定能を強化した形質転換体（タバコ、シロイヌナズナ）などを用いたメタボローム解析とマイクロアレイ解析。
 - (a) 生育増大に関与する遺伝子群の網羅的解析
 - (b) 光合成能増大により影響を受ける代謝産物の同定
 - (c) 他の代謝系に及ぼす影響の評価

「東京大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：山田(川合) 真紀（東京大学分子細胞生物学研究所、講師）
- ② 研究項目：栄養シグナルによる細胞応答変化の解析
 - (a) エネルギー代謝改変植物の作成と生育、生産性の評価
 - (b) 代謝改変植物における C/N バランスの解析

「九州大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：射場 厚（九州大学大学院理学院、教授）
- ② 研究項目：栄養シグナル伝達機構の解析。

- (a) ハイスループットサーマルイメージングの手法を用いた炭素シグナル伝達因子に関する突然変異株の単離と機能解析

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文 (原著論文) 発表

- Tamoi, M., Nagaoka, M., Miyagawa, Y. and Shigeoka, S. (2006) Contribution of fructose-1,6-bisphosphatase and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase to the photosynthetic rate and carbon flow in the Calvin cycle in transgenic plants. *Plant Cell Physiol.*, 47, 380-390.
- Kawai-Yamada, M., Saito, Y., Jin, L., Ogawa, T., Kim, K.M., Yu, L.H., Tone, Y., Hirata, A., Umeda, M. and Uchimiya, H. (2005) A novel *Arabidopsis* gene causes Bax-like lethality in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 280, 39468-39473.
- Yoshinaga, K., Fujimoto, M., Arimura, S.I., Tsutsumi, N., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada, M. (2006) Mitochondrial fission regulator, DRP3B does not regulate cell death in plant. *Ann. Bot.*, in press.
- Hashimoto, M., Negi, J., Young, J., Israelsson, M., Schroeder, J.I. and Iba, K. (2006) Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nature Cell Biol.*, 8, 391-397.
- Yaeno, T., Saito, B., Katsuki, T. and Iba, K. (2006) Ozone-Induced expression of Arabidopsis FAD7 gene requires salicylic acid, but not NPR1 and SID2. *Plant Cell Physiol.*, 47, 355-362.