

「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・准教授

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

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合成に用いられるだけでなく、遺伝子発現の制御や代謝調節に関わるシグナル分子として植物の生長や物質の生産量に深く関与していると考えられている。また、無機物から生合成される糖やアミノ酸なども栄養シグナル伝達物質として機能しており、植物は様々な植物栄養シグナルの制御のもとに生長と物質生産を調節していると考えられる。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、栄養シグナルに基づく遺伝子発現と代謝制御の仕組み及び栄養シグナルの伝達の仕組みの解明を行う。具体的には、代謝バランスを改変した形質転換体のメタボローム解析による同化経路間の相互制御の解析（研究項目 1）とプロテオミクスやシグナル応答変異株を利用した方法による栄養シグナル伝達機構の解析（研究項目 2）を実施する。

研究項目 1 に関しては、昨年度までに、ラン藻の酵素遺伝子の導入による炭素代謝能改変植物体や転写因子遺伝子の導入による窒素同化能力強化植物などについてメタボローム解析や包括的遺伝子発現解析などを行い、個々の代謝改変の分子的基盤を明らかにしつつあった。今年度は、本研究課題の中心的内容であるトウモロコシ転写因子 Dof1 を発現しているシロイヌナズナ形質転換体の解析について進捗が見られ、人為的窒素同化の強化は光エネルギー依存的に光合成能力を強化することを明らかにし、また、Dof1 形質転換体は強い光環境への適応能力が増していることを示唆した。また、研究項目 2 に関しては、CO₂ 濃度変化に伴う気孔開度の変化とそれに基づく葉表面温度の変化を指標に CO₂ 非感受性変異株のスクリーニングを行い、これまでにシグナル伝達因子 HT1 キナーゼを同定している。今年度は類似のスクリーニングにより *slac1* 変異体を得た。原因遺伝子の同定によって SLAC1 は気孔閉鎖における細胞膜を介した陰イオン輸送に重要な役割を果たしている細胞膜型陰イオンチャネルの本体、もしくはその一部である可能性を示唆した。また、ナノス

ケールでの植物タンパク質のプロテオーム解析方法を確立し、制御因子の検索を行った。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

植物栄養による生長と物質生産量を制御する基本的な仕組みの解明を目的として、代謝バランスを改変した形質転換体のメタボロームによる同化経路間の相互制御の解析 (研究項目 1)とプロテオミックスやシグナル応答変異株を利用した方法による栄養シグナルの伝達機構の解析 (研究項目 2) を実施した。

平成 19 年度までに研究項目 (1) に関する成果として、Dof1 形質転換シロイヌナズナのメタボローム解析と遺伝子発現のプロファイリングの結果から代謝回路間の相互制御機構のモデルを提唱している (図 1)。本年度は、このモデルにおける最後のプロセスについて詳細な解析を実施した。Dof1 植物体では、最初に N 同化に必須な C 代謝物のレベルの上昇が引き起こされており、これによって N の同化が強化されている。この N 同化の強化に伴い S 同化も活性化している。本年度は、高い N 同化産物と S 同化産物

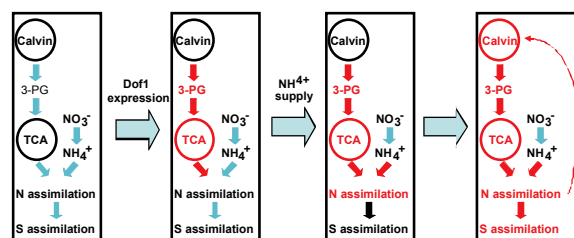


図 1 Dof1 形質転換体における代謝改変の概念図
活性化された経路が赤で示されている。

物含量を持つ Dof1 形質転換体は光合成能力が強化されており、光エネルギー依存的に炭酸固定量が野生型シロイヌナズナに比べて大きくなることを明らかにした。また、野生型シロイヌナズナではクロロフィル含量の低下が引き起こされる生育環境であっても Dof1 形質転換体ではそのような低下が見られないことから、Dof1 による代謝改変は環境適応能力にも大きな影響を及ぼしていることを示唆した。また、強化された光合成能力と N 同化能力に基づき、Dof1 形質転換体では実際にスターチとタンパク質の含量が増大しており物質生産能力が強化されていると判断できることを示した (投稿中)。

一方で、炭素代謝能改変植物、エネルギーバランス改変植物を用いたメタボローム解析も昨年に引き続き実施した。昨年度は、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) の細胞質での強発現が及ぼす効果を評価したが、今年度は葉緑体で FBP/SBPase を強発現させた時の効果を精査した。その結果、これら形質転換体では生育が促進しており湿重量が野生株の 1.08~1.39 倍に増加していた。次に、植物の光合成機能と物質生産能の相関を明らかにするために、活性の異なる種々のプロモーター (PpsbA, Prrn, Prsp2 及び Prsp12) 制御下で FBP/SBPase を葉緑体で発現させた形質転換タバコを作出した。形質転換体の生育および光合成活性を比較した結果、2~3 倍の FBPase 活性の上昇により光合成活性は上昇し、植物乾重量は最大で 1.8 倍までに増加することが判明した (2)。今後、Dof1

形質転換体で得られた代謝経路間制御のモデルに沿ってFBP/SBPase導入の窒素同化能力への効果を精査する予定である。エネルギー代謝あるいは細胞内酸化還元状態の改変が植物の物質生産能力に及ぼす影響についても、昨年度に引き続き、細胞内 NAD 代謝改変植物として、NAD 代謝酵素である NAD キナーゼ (NADK)、ニコチン酸/ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニル基転移酵素 (NNMNAT)、NAD 合成酵素 (NADS) の発現量を変化させた遺伝子組み換えシロイヌナズナを用いて実施した。NMNAT と NADS の欠損植物および過剰発現体の解析について成果が得られている。NMNAT の欠損植物体では花粉管の伸長活性と花粉寿命の低下により受粉能力が低下していること (3)、また、NADS 過剰発現体では老化が促進され花芽が枯死することを明らかにし (未発表)、NAD バランスの変動が植物の生殖、物質生産性に大きな影響を与えることを示した。この他に、脂質合成系の制御に関わると考えられる BI-1 遺伝子の機能解析を行い、本因子が細胞内情報伝達因子であるカルモジュリンと相互作用して機能することも明らかにしている (4, 5)。

第二の研究項目、栄養シグナル伝達機構の解析として本年度も CO₂ 伝達機構の構成因子の同定をシロイヌナズナ変異株を単離することによって実施した。昨年度までに、CO₂ 濃度変化に伴う気孔開度の変化とそれに基づく葉表面温度の変化を指標に、低 CO₂ 条件下でも高温を示す *ht1* (*high leaf temperature 1*) 変異体を単離して CO₂ 伝達機構の構成因子としてタンパク質リン酸化酵素 HT1 を同定している。今年度も、類似のスクリーニング方法により、新たな CO₂ 非感受性シロイヌナズナ変異株 *slac1* (*slow anion channel-associated 1*) 変異体を得た。この変異体では、高 CO₂ による気孔閉鎖が阻害され、恒常的に高い気孔開度を示し、また、他の気孔閉鎖シグナルであるアブシジン酸や暗闇に対する応答性も低下していた。その原因遺伝子は、テルル耐性-ジカルボン酸輸送体 (TDT) ファミリーに属する、植物では機能未知のタンパク質をコードしていた。気孔閉鎖時には孔辺細胞から細胞外へリンゴ酸²⁻ や Cl⁻ などの陰イオンが排出されると考えられているが、この変異体の孔辺細胞ではこれらの陰イオンが野生株と比較して高蓄積していた。孔辺細胞において陰イオンの排出に中心的な役割を担うのは S(slow)タイプの陰イオンチャネルであることが示唆されている。従って、気孔閉鎖における細胞膜を介した陰イオン輸送に重要な役割を果たしている SLAC1 は、これまで実体が不明であった細胞膜型陰イオンチャネルの本体もしくはその一部であると考えられる (10)。一方で、ナノスケールで植物タンパク質のプロテオーム解析を行う実験系の確立を行った。この実験系を用いて、植物栄養応答の観点から重要であり、長距離シグナル伝達系を含む可能性のある篩管液タンパク質の分析を実施し、3 種類の TERMINAL FLOWER 1/FLORING LOCUS T (FT) 様タンパク質が篩管液に存在することを示した。イネの FT は花成を制御する因子として大きな関心がもたれているが、FT ファミリーのタンパク質がイネ篩管液に存在することの証拠を示した (9)。次に、イネ核タンパク質のプロテオーム解析も実施し、新規タンパク質が核に存在することを明らかにしている (投稿準備中)。また、病原応答と糖応答の両方に関わる HYS1/CPR5 タンパク質はヘキソキナーゼ依存型糖シグナル伝達経路の調整にも関わっていることも明らかにしている (1)。

3. 研究実施体制

(1)「柳澤」グループ

①研究分担グループ長:柳澤 修一 (東京大学、准教授)

②研究項目

1. Dof1 遺伝子導入植物のメタボローム解析
2. Dof1 遺伝子導入植物の遺伝子発現変動の解析
3. イネ栄養応答のプロテオーム解析

(2)「重岡」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

1. 光合成機能を強化した形質転換シロイヌナズナの作出と光合成機能解析
2. ショ糖合成機能を強化した形質転換シロイヌナズナの作出と光合成機能解析
3. 光合成機能と窒素代謝能を同時に強化した形質転換シロイヌナズナの作出
4. 光合成機能および窒素代謝能に異常を示す変異体の選抜と解析

(3)「川合」グループ

①研究分担グループ長:川合 真紀 (東京大学、講師)

②研究項目

1. エネルギー代謝改変植物の作成と生育、メタボローム解析と生産性の評価
2. 代謝改変植物における C/N バランスの解析

(4)「射場」グループ

①研究分担グループ長:射場 厚 (九州大学、教授)

②研究項目

1. 栄養シグナル伝達機構の解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. Aki, T., Konishi, M., Kikuchi, T., Fujimori, T., Yoneyama, T., Yanagisawa, S. (2007) Distinct modulations of the hexokinase1-mediated glucose responses and hexokinase1-independent processes by HYS1/CPR5 in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, 58, 3239-3248.

2. Yabuta, Y., Tamoi, M., Yamamoto, K., Tomizawa, K.-I, Yokota, A., Shigeoka, S. (2007) Molecular design of photosynthesis-elevated chloroplasts for mass accumulation of a foreign protein, *Plant Cell Physiol.*, 49, 375-385.
3. Hashida, S., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. (2007) *Arabidopsis thaliana* nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (AtNMNAT) is required for the growth of pollen tube. *Plant J.*, 49, 694-703.
4. Ihara-Ohori, Y., Nagano, M., Muto, S., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada M. (2007) Cell death suppressor, *Arabidopsis* BI-1, is associated with calmodulin-binding and ion homeostasis. *Plant Physiol.*, 143, 650-660.
5. Oshima, R., Yoshinaga, K., Ihara-Ohori, Y., Fukuda, R., Ohta, A., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada, M. (2007) The Bax Inhibitor-1 needs a functional electron transport chain for cell death suppression. *FEBS Lett.*, 581, 4627-4632.
6. Ogawa, T., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M. (2007) Mutual regulation of *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein and a plant floral homeotic gene, APETALA2. *An. Bot.*, 99, 239-244.
7. Yara, A., Yaeno, T., Hasegawa, T., Seto, H., Montillet, J.-L., Kusumi, K., Seo, S., Iba, K. (2007) Disease resistance against *Magnaporthe grisea* is enhanced in transgenic rice with suppression of ω -3 fatty acid desaturases. *Plant Cell Physiol.*, 48, 1263-1274.
8. Sugimoto, H., Kusumi, K., Noguchi, K., Yano, M., Yoshimura, A., Iba, K. (2007) The rice nuclear gene, VIRESCENT 2, is essential for chloroplast development and encodes a novel type of guanylate kinase targeted to plastids and mitochondria. *Plant J.*, 52, 512-527.

(in press)

9. Aki, T., Shigoyo, M., Yoneyama, T., Yanagisawa, S. (2008) Nano scale proteomics revealed the presence of regulatory proteins including three FT-like proteins in phloem and xylem saps from rice. *Plant Cell Physiol.*, in press.
10. Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., Iba, K. (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*, in press.