

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基礎技術」
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であり、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いる。本研究課題では、栄養シグナルによる植物の同調的かつ効率的な植物栄養同化のための制御機構の解明を目指している。

この目的に沿って、これまでの代謝バランス改変植物のメタボローム解析とトランスクリプトーム解析により、植物の炭素 (C) 同化システム、窒素 (N) 同化システムおよび硫黄 (S) 同化システムの相互依存性を実証し、一つの遺伝子操作により同調的に複数の同化能力を強化して物質生産能力の向上を図れることを明らかにしている。また、ヘキソースなどの代謝中間体や葉緑体内の NADP (H) 量が同化システムの制御や生長制御に深く関わっていることなどを示唆してきた。さらには、新規な栄養シグナル制御因子の同定方法を開発し、シロイヌナズナの炭酸ガス (CO₂) 応答変異株を単離することにより、CO₂ 特異的なシグナル伝達経路が存在することを明らかにしている。

平成 20 年度は、Dof1 形質転換植物における同調的に C, N 及び S 同化が強化されている改変代謝バランスの可視化に成功した。これにより、改変代謝バランス維持に関わる因子を遺伝学的に同定することが可能となった。また、既に同定している同化能力強化因子の相加的あるいは相乗的効果を検討するため、Dof1 転写因子の遺伝子とラン藻由来フルクトース-1, 6-セドヘプツロース-1, 7-ビスホスファターゼ (FBP/SBPase) 遺伝子を導入した多重遺伝子導入シロイヌナズナを作成した。また、NADK2 過剰発現イネの解析により、葉緑体内の NADP (H) プールと最大利用可能光エネルギーの相関を示した。Dof1 形質転換体と NADK2 過剰発現体の解析結果はともに、より多くの光エネルギーが利用可能となることが同化能力の強化と直接的に結びつくことを示しており、今後は、より多くの光エネルギーが利用可能な代謝バランスを精査する予定である。

また、栄養シグナル伝達機構の解明を目指し、C シグナル伝達あるいは応答異常シロイヌナズナ変異株の単離し解析を行った。また、植物栄養応答に関わる因子のプロテオーム解析による検索を行い、進化的に保存された糖応答性の核内シグナル伝達因子の候補を選

抜した。今後は同定した因子の機能を精査すると同時に C シグナル伝達あるいは応答システムの全体像の中に位置づける予定である。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

Dof1 形質転換シロイヌナズナの昨年度までの解析により、同調的な CO₂ 固定、N 同化、S 同化の活性化を明らかにしている。この改変代謝バランスに関わる因子の同定を目指し、本年度はこの代謝バランスの可視化を行った。S 同化関連遺伝子(*APR1*)の発現が代謝バランスの変化に応じてよく変動したことから、この遺伝子のプロモーターに緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を接続し、この融合遺伝子を Dof1 形質転換シロイヌナズナに導入した。その結果、この GFP 遺伝子の発現は、N 同化が強化されるアンモニウム存在下で強く、さらに光合成も強化される強光下でさらに強く発現された(図 1)。このことにより、改変代謝バランスを GFP 蛍光の強度として可視することができ、改変代謝バランスの維持に関わる因子を同定する道が開けた。

違う S 同化関連遺伝子(*APR3*)のプロモーターを用いた場合には、この現象は観察されておらず、S 同化関連遺伝子の発現に関わる共通の *cis*-element は遺伝子の 5' 側上流領域と 3' 側下流の領域に存在する可能性があると考えられた。同化能力全般のさらなる強化を目指して多重遺伝子導入株も作出した。Dof1 遺伝子と FBP/SBPase 遺伝子の両方を持つ形質転換体の T3 世代を確立した。予備的実験では、この形質転換体は、野生株および Dof1 導入株のいずれと比較しても生育が促進していることを確認した。

一方で、ラン藻由来の FBP/SBPase を葉緑体で発現しているシロイヌナズナ形質転換植物(35S-ApFS)を作出し、この植物体ではカルビン回路が強化されており、9 週齢での生重量が野生型の約 1.3 倍に増大することを、昨年度までに明らかにしている。そこで、今年度は、この形質転換体の光合成活性を測定し、活性が約 1.2 倍に増大していることを確認した。リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現の解析により、形質転換体では内在性の FBPase および SBPase 遺伝子の発現のわずかな減少とともに、アスパラギン酸合成酵素およびグルタミン酸脱水素酵素の発現量も減少していることもわかった。一方で、糖および糖リン酸の比較を行ったところ、野生株と比較して明らかに増加しているピークが見られた。現在、これら糖リン酸の同定を試みている。FBPase-II をサイトゾルで発現することにより、ショ糖生成能を強化した形質転換シロイヌナズナ(AcF)を作出したところ、



図 1 Dof1 形質転換植物における代謝バランスの可視化。APR1 プロモーター制御下の GFP 遺伝子を野生型シロイヌナズナと Dof1 形質転換シロイヌナズナに導入し、アンモニウムを含む培地で強光下で生育させ、GFP 遺伝子の発現を比較した。



AcF2-3-4 WT

図 2 遺伝子導入により細胞質中の FBP 活性を増大させたシロイヌナズナ(AcF2-3-4)と野生型シロイヌナズナ(Wild type)の高 CO₂ 環境(1000 ppm)における生育。

通常 CO₂ 環境下での生育は野生型株との間に有意な表現型の違いは見られなかったが、高 CO₂ 環境下(1000 ppm)では野生型株と比較して枝数の増加が認められ、AcF の生重量は野生株の 1.2~1.5 倍に増大しており、また、枝葉数の増加が認められた(図 2)。これらから、高 CO₂ 環境下での糖代謝の変化がシグナルとなり、枝葉数の制御に関係している可能性が示唆された。

細胞内酸化還元プールの改変による植物代謝増進を目指し、引き続き葉緑体局在型 NAD キナーゼ(NADK2)、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(NNMT)、NAD 合成酵素(NADS)の発現量を変化させた遺伝子組換えシロイヌナズナやイネの代謝解析および表現型の解析をおこなった。NADK2 を過剰発現させた形質転換イネの代謝物解析の結果、NADK2 高発現イネでは野生型と比較して細胞内 NADP(H) 量が 1.2-1.6 倍に増加していることがわかった。この変化が一次代謝物に及ぼす影響を解析した結果、アミノ酸と RuBP

の蓄積量に若干の増加が検出された。また、クロロフィル蛍光測定の結果、この NADK2 高発現イネでは、生育光強度である 300 μmol/m²/s で光化学系 I を通る電子伝達の量子収量である φ II が非形質転換体より高い値を示した。そこで、光強度を変えて電子伝達速度を測定した結果、この形質転換イネは 300 μmol/m²/s 以上の強光下で電子伝達速度が有為に増加していた(図 3)。これらのことから、葉緑体の NAD 代謝改変により物質生産代謝の増進する可能性が考えられた。一方、細胞内 NAD 量の増大を目的として作成したサイトゾル型 NNMT、及び NADS 高発現イネの代謝解析からは、NAD の分解産物であるニコチンアミドの増加が検出され、暗所老化の促進などの表現型が観察された。この結果により、サイトゾルの NAD 生合成の活性化は必ずしも、葉緑体 NADP プールの増加に直結せず、葉緑体内における NAD 代謝改変の重要性が示唆された。

生体膜脂質における脂肪酸組成の変化は、脂質系シグナル分子の量的変動を介して細胞レベルの代謝ネットワークに多面的な影響をおよぼす可能性があることから、生物的ストレス曝された場合の脂質代謝物質の解析⁶⁻⁸および非生物的ストレスに曝された場合の脂質代謝物質の解析^{1,9}も行なった。また、脂質代謝制御に関与すると考えられる小胞体膜因子(AtBI-1)の機能解析により本因子の発現量を上昇させると細胞膜のヒドロキシ脂肪酸量が増加することを明らかにした¹¹。一方で、γ-アミノ酪酸(GABA)代謝が植物の病原応答としておきる細胞死現象に関与することも明らかにしており⁵、これらのことから植物代謝と植物ストレス応答が密接な関係にあることも示唆した。

第二の研究項目である栄養シグナル伝達機構の解析として、本年度もシロイヌナズナ栄養突然変異株の解析とプロテオーム解析による栄養応答関連因子の検索を実施した。まず、シロイヌナズナ栄養突然変異株を用いて同定した CO₂ シグナル因子である HT1 キナーゼの

	Control	NK2		
		1	2	15
F_v/F_m	0.824 ± 0.011	0.839 ± 0.002	0.838 ± 0.003	0.831 ± 0.007
φII	0.424 ± 0.078	0.536 ± 0.025	0.503 ± 0.017	0.516 ± 0.027
NPQ	0.668 ± 0.190	0.378 ± 0.099	0.479 ± 0.022	0.465 ± 0.074

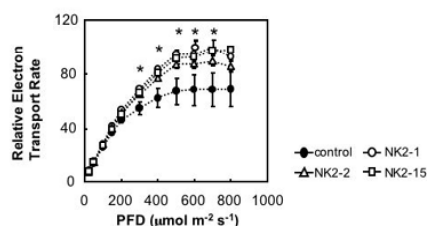


図 3 NADK2 過剰発現イネにおける光合成収率の上昇。 F_v/F_m , 光化学系 II の最大収率; φ II, 光化学系 II を通る電子伝達の量子収率; NPQ, 非光化学消光(熱放散)の大きさの指標。

特性を知るために、阻害剤を用いた *in vitro* kinase assay を行い、HT1 が MAPKKK の一種である Raf の阻害剤で特に活性が阻害されることを明らかとした。これにより、いまだ未開の部分が多い植物の CO₂ シグナル応答機構にも MAP カスケードが関与している可能性を示唆した。また、CO₂ 非感受性変異株 (*carbon dioxide insensitive*) のシリーズの解析を行い、一つは細胞膜型陰イオンチャネル遺伝子 SLAC1 における変異が原因であることを明らかにし¹⁰、また、新たな CO₂ 非感受性変異株 *cdi8* は HT1 遺伝子に変異を持っていることを明らかにした。*cdi8* では CO₂ 濃度に関わらず常に気孔が開いており、高 CO₂ 条件でも低い葉面温度を示す優性変異体であったことから、HT1 遺伝子上の変異の入り方によって逆の表現型が生み出されることがわかった。したがって、HT1 は CO₂ レベルに応答した正負の両方の制御に関わっている可能性が考えられた。一方で、低 CO₂ 条件下でも高温を示す *ht2* 変異体も単離した。この変異体は CO₂ 応答性だけでなく、乾燥などによる水分放出を防ぐために働く植物ホルモンである ABA の応答性にも異常をきたしていたことから、HT2 は CO₂ シグナルと ABA シグナルの両方に関与している因子であると考えられた。また、新規 CO₂ 非感受性変異株である *cdi6* も解析を開始した。

糖応答異常が異常なシロイヌナズナ変異株、*sicy-192* (*sugar-inducible cotyledon yellow-192*) も単離した。*sicy-192* はスクロースやグルコースなどの糖を含む培地上で子葉や展開中の第一、第二本葉の緑化が抑制される変異株であり、この変異の原因はプラスチド局在型中性/塩基性インベルターゼ (INV-E) 遺伝子に 1 塩基置換 (Cys294 が Tyr へ置換) が生じていることによるものであった。変異型 INV-E (INV-E:C294Y) の酵素学的性質は野生型 INV-E と変わらなかったにも関わらず、この変異株の幼植物では野生型と比べて光合成関連遺伝子の発現が抑制されており、また、硝酸還元酵素の活性が上昇していた。以上の結果より、INV-E の Cys294

は、光合成装置構築時における炭素・窒素代謝バランス制御に重要であることが示唆された。また、糖によって分解が促進される転写因子 EIN3 のフィードバック制御機構を明らかにし、この制御機構が直接的に表現型と結びついていることを明らかにした^{3,4}。

植物栄養応答に関わる因子のプロテオーム解析による検索として、イネの導管液と篩管液の包括的プロテオーム解析に引き続き²、イネ核タンパク質の包括的プロテオーム解析を行った。同定した約 700 種のイネのタンパク質の中から、シロイヌナズナのタンパク質と一対一の関係が明確であるタンパク質であること、また、対応する遺伝子の発現の糖応答性がトランスクリプトーム解析で認められていることを指標として、単子葉植物と双子葉植物の両方の核で糖応答機構に関わる因子の候補として、2つの WD40 リpeatタンパク質とアルマジロリpeatタンパク質を同定した。これらのタンパク質の核局在は GFP との融合タンパク質を用いて確認され、また、シロイヌナズナとイネの両方で遺伝子発現レベルでの糖応答性が RT-PCR により確認されたので、現在、シロイヌナズナの T-DNA ノックアウト株を用いた表現型解析と LC/MS/MS 解析による結合タンパク質の同定を行っている。

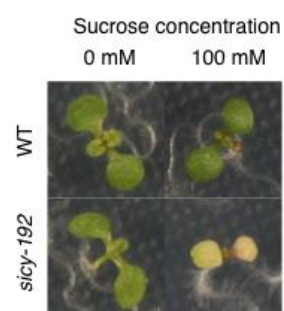


図4 ショ糖 (100 mM) を含む培地上で子葉が黄化するシロイヌナズナ変異体 *sicy-192*。

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

- ・ Dof1 遺伝子導入植物のメタボローム解析
- ・ Dof1 遺伝子導入植物の遺伝子発現変動の解析
- ・ 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

- ・ 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
- ・ 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
- ・ 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
- ・ 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(埼玉大学、准教授)

②研究項目

- ・ 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
- ・ 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

- ・ 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. Matsuda, O., Sakamoto, H., Nakao, Y., Oda, K., Iba, K. (2009) CTD phosphatases in the attenuation of wound-induced transcription of jasmonic acid-biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 57, 96-108.
2. Aki, T., Shigyo, M., Nakano, R., 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.*, 49, 767-790.
3. Konishi, M., Yanagisawa, S. (2008) Ethylene signaling in *Arabidopsis* involves feedback regulation by an elaborate control of *EBF2* expression by EIN3. *Plant J.*, 55, 821-831.

4. Konishi, M., Yanagisawa, S. (2008) Two different mechanisms control ethylene sensitivity in *Arabidopsis* via the regulation of EBF2 expression. *Plant Signaling Behavior*, 3, 749-751.
5. Takahashi, N., Matsumura, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. (2008) The cell death factor, cell wall elicitor of rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) causes metabolic alterations including GABA shunt in rice cultured cells. *Plant Signaling Behavior*, 3, 1-9.
6. Yara, A., Yaeno, T., Montillet, J.L., Hasegawa, M., Seo, S., Kusumi, K., Iba, K. (2008) Enhancement of disease resistance to *Magnaporthe grisea* in rice by accumulation of hydroxy linoleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 370, 344-347.
7. Yara, A., Yaeno, T., Hasegawa, M., Seto, H., Seo, S., Kusumi, K., Iba, K. (2008) Resistance to *Magnaporthe grisea* in transgenic rice with suppressed expression of genes encoding allene oxide cyclase and phytyldienoic acid reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 376, 460-465.
8. Yaeno, T., Iba, K. (2008) BAH1/NLA, a RING-type ubiquitin E3 ligase, regulates the accumulation of salicylic acid and immune responses to *Pseudomonas syringae* DC3000. *Plant Physiol.*, 148, 1032-1041.
9. Sakamoto, H., Matsuda, O., Iba, K. (2008) *ITN1*, a novel gene encoding an ankyrin-repeat protein affects the ABA-mediated production of reactive oxygen species and is involved in salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 56, 411-422.
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*, 452, 483-486.
11. Nagano, M., Ihara-Ohori, Yuri, Inada, N., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M. (2009) Functional association of cell death suppressor, Arabidopsis Bax Inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b5. *Plant J.*, in press.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)