

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「環境変動に対する植物の頑健性の解  
明と応用に向けた基盤技術の創出」  
研究課題「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」

## 研究終了報告書

研究期間 2015年 12月～2021年 3月  
(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)

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)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

植物は無機物を植物栄養として吸収し、必要な有機物を合成して成長している。特に重要な栄養素は窒素栄養(多くの場合、硝酸イオン)とリン栄養(リン酸イオン)である。植物は、これらの存在量が大きく異なる多様な環境に適応して成長できる一方で、自然環境では大変しばしば、これらの不足によって成長が制限されている。また、窒素栄養の量と植物成長量・作物生産高の間には極めて高い相関関係が認められる一方で、同じ耕地でも植物の成長量は系統毎にあるいは品種毎に大きく異なっている。これらのことは、植物は様々な栄養環境で栄養素を確保して生き延びる能力を持っている一方で、遺伝的多様性(すなわち DNA 配列の違い)によって栄養獲得・利用能力が異なっていることを意味する。近代農業では、無機窒素化合物とリン酸塩を主成分とした肥料の使用によって高い作物生産を維持しているが、大量の肥料の使用は環境負荷が大きく持続的社會を構築するためには望ましくない。このような背景から、植物が異なる栄養環境に頑健に適応して適切に栄養素を確保している仕組みを解明し、栄養獲得・利用能力の向上をもたらす遺伝的要素を明らかにできれば、作物生産の向上と食料の安定確保に大きく貢献する。そこで、これを目的として本研究課題は実施された。

植物の栄養確保システムの頑健性については、窒素とリンの獲得制御の仕組みをモデル化することに焦点をおき、獲得制御の素過程の解析を行った。その結果、以下の事柄を発見した。まず、硝酸イオンがシグナルとなり NLP 転写活性化因子の硝酸イオン依存的なリン酸化を引き起こし、リン酸化された NLP は活性型となって硝酸輸送体や硝酸同化関連酵素などの遺伝子の発現を促進する。同時に、NLP は NIGT1 転写抑制因子の発現を促進し、NLP と NIGT1 は硝酸輸送体遺伝子などの発現を拮抗的に制御する。また NIGT1 は自分自身の発現も抑制する。NIGT1 による抑制が NLP による活性化と時間差をおいて起こることで、硝酸イオンの量的変動に合わせて硝酸態窒素の確保能力の最適化が起こる。一方でリン飢餓応答を担い、リン栄養の獲得を促進する転写因子 PHR1 も *NIGT1* 遺伝子の発現を促進するので、リン欠乏時には硝酸イオンの取り込みが抑制される。他方、NIGT1 は *SPX* 遺伝子の発現を抑制する。*SPX* タンパク質はリン十分条件では PHR1 と結合して PHR1 活性を抑制するので、硝酸シグナルはリン栄養の吸収を促進し、窒素欠乏はリン栄養の吸収を抑制する。このような素過程に関する発見を統合することで、窒素の獲得とリンの獲得の相互制御の仕組みがモデル化された。これにより、多数の転写カスケード、フィードバック制御、翻訳後制御が融合された、多様な栄養環境で窒素とリンの獲得バランスを頑健に維持している仕組みが解明された。この仕組みは、栄養状態に合わせて窒素とリンの獲得のいずれを優先させるかを決定する仕組みである。

窒素が不足した環境に適応するための応答の制御ネットワークの解明と、栄養獲得能力の向上や貧栄養環境での生育改善などの優良形質をもたらす遺伝子あるいは遺伝子の多型の同定は、系統間や品種間で見られる遺伝情報の多様性を活用して実施した。シロイヌナズナ野生系統(200 系統強)とイネ品種(100 品種強)について、リン吸収能力のイメージング解析などのフェノーム解析を行い、栄養獲得能力や栄養応答における系統間差あるいは品種間差を明らかにした。次に、栄養応答が異なるイネ 20 品種を窒素十分条件と窒素欠乏条件で栽培し、これらの根のトランスクリプトーム解析を行い、WGCNA 法による共発現ネットワーク解析と GENIE3 を用いた回帰分析によってイネの根における窒素欠乏応答制御ネットワークの推定を行なった。HHO3、HHO4 などの5つの転写因子間での相互制御が、このネットワークの中心部を形成していた。ゲノム編集技術を用いて、これら転写因子の遺伝子を破壊すると窒素欠乏応答が異常になることを示し、これによって、これらが窒素欠乏応答の鍵転写因子であり、これら転写因子間での相互制御がネットワークの頑健性に重要であると結論付けた。窒素応答機構の中心転写因子であった NIGT1 と HHO3、HHO4 は構造的に非常に類似したタンパク質であり、シロイヌナズナの NIGT1 タンパク質と HHO タンパク質はヘテロ二量体も形成することから、これらは協同して機能すると考えられた。しかし、*NIGT1* 遺伝子の発現は硝

酸シグナルによって誘導されるが、*HHO* 遺伝子は誘導されないという違いがあり、栄養環境によって *NIGT1* と *HHO* のどちらが主因子となるかが変わると考えられる。*NIGT1* と *HHO* の役割分担の解析により将来的には窒素応答制御と窒素飢餓応答の制御が統合されることが期待される。本研究課題では、野外で生育しているイネの葉における窒素利用にかかわる遺伝子の発現制御ネットワークも解析している。

栄養の獲得と利用に関連した優良形質をもたらす遺伝子と遺伝子多型の同定は、シロイヌナズナ野生系統間に見られた栄養応答の多様性を活用して実施した。窒素飢餓時のクロロフィルの分解を指標とした GWAS によって、硝酸輸送体遺伝子 *NRT1.1* を低窒素環境での生育改善に貢献する遺伝子として同定した。さらに、幾つかの野生系統では、*NRT1.1* のプロモーター領域の DNA 配列の自然突然変異によって地上部での *NRT1.1* の発現量が增大しており、これによって低窒素環境での成長が改善していることを明らかにした。この優良形質をもたらす自然突然変異の同定は、実用植物の窒素利用効率の向上への展開を可能とする。一方で、極めて少量の窒素源しか存在しない環境でも高い成長を示す野生系統も見出している。他系統との掛け合わせ実験から、この系統の優良形質は複数の優良アレルの相加的な効果によって生み出されると見られたが、QTL マッピング、RAD-seq 解析、全ゲノムシーケンズ解析より鍵アレルが存在する領域を特定した。さらに、リン獲得能力を量的形質として行なった GWAS によってリン酸吸収能力を向上させ、収量増加を引き起こす遺伝子の同定に成功した。イネにおいて、この遺伝子を過剰発現させると、植物内のリン酸イオン濃度の上昇とともに、分けつ数と収量の増加が起こることを明らかにし、農学上の極めて優れた形質をもたらす遺伝子であることを示した。今後、実用展開に向けた研究が期待される。加えて、リン獲得能力が低いシロイヌナズナ野生系統の解析によって、フィトクロム B によって伝達される赤色光シグナルがリン酸イオンの吸収を促進することを発見した。これによって、栄養素の存在量や充足度だけでなく、他の環境要因によっても栄養獲得が調節されていることを明らかにした。赤色光による栄養吸収促進効果は、イネなどの実用植物でも見られたことから、人工的な環境での作物の栽培方法の開発などに役立つ発見である。食料安定確保を実現する環境適応型植物設計には、優良形質をもたらす遺伝子や遺伝子多型の情報が不可欠である。本研究課題で発掘された優良形質につながる遺伝子、遺伝子多型は、食料安定確保に向けた取り組みで極めて重要である。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け 6 ヶ月間研究期間を延長し、窒素応答ネットワーク、窒素欠乏応答ネットワークの鍵因子の機能解析、栄養の獲得と利用に関連した優良形質をもたらす遺伝子と遺伝子多型の解析、ゲノム編集による栄養獲得・利用に関連した有用形質の強化を実施した。その結果、本研究課題で見出した因子の一つを、ゲノム編集技術を用いて破壊すると低窒素環境で窒素獲得能力が向上し、低窒素環境での生育が改善することなどを明らかにした。この成果によって、低窒素環境への適応能力の高いイネを作出する技術を開発した。

## (2) 顕著な成果

### < 優れた基礎研究としての成果 >

#### 1.

##### 概要:

植物の主要な窒素源である硝酸イオンは、シグナル伝達物質として働き、硝酸イオンの吸収に伴って細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇し、これにより  $\text{Ca}^{2+}$  依存性タンパク質リン酸化酵素が活性化され、硝酸シグナルに応答した遺伝子発現を司る NLP 転写因子のリン酸化が起こり、リン酸化により活性化となった NLP が様々な硝酸応答型遺伝子の発現を引き起こすことを明らかにした。また、NLP が *NIGT1* 転写抑制因子の発現を誘導し、NLP と *NIGT1* が時間差において、硝酸輸送体遺伝子などの発現を拮抗的に制御することで、窒素栄養の獲得量の最適化を行っているというモデルを提唱した。

## 2.

### 概要:

窒素栄養とリン栄養の獲得は互いに影響し合うということは昔よりよく知られていたが、その分子メカニズムは不明であった。転写抑制因子として硝酸輸送体遺伝子の発現を抑制している NIGT1 の発現を、リン飢餓応答を担う転写活性化因子 PHR1 が促進することで、リン欠乏時には窒素栄養の獲得の抑制が起こることを明らかにした。また、PHR1とそのホモログの活性を抑制する SPX タンパク質の遺伝子の発現を NIGT1 が抑制することで、硝酸シグナルに応答して窒素の獲得が促進される時にはリンの獲得も亢進させ、窒素が不足している時にはリンの獲得も抑制することを明らかにした。これによって、長らく未解明であった窒素栄養とリン栄養の獲得バランスの最適化を行う分子メカニズムを解明した。

## 3.

### 概要:

動物細胞で起こっている核小体ストレス応答が植物細胞でも起こっていることを発見した。動物細胞での核小体ストレス応答は rRNA 不足時、リボソームタンパク質の異常時、栄養飢餓時などに見られる応答であり、タンパク質合成異常と細胞増殖制御をつなぐ調節機構とされる。植物細胞でも栄養依存的にリボソーム合成が亢進すること、rRNA の合成に必要な APUM24 の機能が低下するとリボソーム合成の異常と核小体サイズの異常という核小体ストレス応答時の典型的な症状が起こることを明らかにし、栄養応答の異常が植物細胞で核小体ストレス応答を引き起こして、成長が抑制されることを示唆した。この研究成果は、論文タイトルを “Reduced expression of APUM24, encoding a novel rRNA processing factor, induces sugar-dependent nucleolar stress and altered sugar responses in *Arabidopsis thaliana*” として *Plant Cell*(30: 209-227, 2018) で公表した。

### < 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

## 1.

### 概要:

低窒素環境での生育改善をもたらす自然突然変異を同定した。シロイヌナズナの二つの野生系統で、硝酸輸送体遺伝子 *NRT1.1* のプロモーター領域の自然突然変異によって地上部での *NRT1.1* の発現量が増大しており、これによって低窒素環境での生育が改善していることを発見した。さらに、その自然突然変異を特定した。他の植物の *NRT1.1* ホモログのプロモーター配列はシロイヌナズナの *NRT1.1* のものとは間違いなく異なっているだろうが、プロモーター領域の配列比較によって発現抑制に関わっている部位を予測し、ゲノム編集技術を利用して変異を導入することは可能である。したがって、収量向上を目指した作物の分子育種に直ちに応用できる発見である。

## 2.

### 概要:

赤色光がリン酸イオンの吸収を促進する効果があることを発見した。リン酸イオン吸収力が弱いシロイヌナズナの二つ野生系統を見出し、その原因が赤色光受容体(フィトクロム B) 遺伝子中の自然突然変異により、フィトクロム B の赤色光に対する感受性が低下に起因していることを明らかにした。シロイヌナズナに加えて、イネやブロッコリーなどでも赤色光がリン酸イオンの吸収を促進することを明らかにしており、赤色光がフィトクロム B を介してリン酸イオンの吸収を促進するという現象は種々の植物種で見られることが期待される。植物工場など人工的な環境で作物生産の向上を図るうえで、赤色光の光量の調節を行うことの重要性を示した。原著論文だけでなく総説でも赤色光の応用利用について言及した (*Semin. Cell Dev. Bio.*, 83: 123-132, 2018)。

### 3.

#### 概要:

窒素飢餓応答を担う鍵転写因子としてNIGT1 転写因子群とその近縁転写因子であるHHO 転写因子群を同定した。これらは全く異なるアプローチで同定した近縁転写因子群であるが、NIGT1 と HHO はヘテロ二量体を形成することを示し、NIGT1/HHO ファミリーとして窒素応答と窒素飢餓応答を制御している可能性を示した。窒素飢餓応答を担う転写因子は窒素獲得能力の強化や窒素飢餓応答の改変のための強力なツールであるが、窒素飢餓応答を担う転写因子として同定されて、分子機能の裏付けがなされているのは NIGT1/HHO ファミリーだけである。この研究成果は、論文タイトルを“Gene regulatory network and its constituent transcription factors that control nitrogen deficiency responses in rice”として *New Phytol.* (227: 1434-1452, 2020) で公表した。

#### <代表的な論文>

### 1.

#### 概要:

植物の主要な窒素源である硝酸イオンは、シグナル伝達物質として窒素栄養環境に適合した成長を制御している。硝酸イオンの吸収に伴って細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇し、これにより  $Ca^{2+}$  依存性タンパク質リン酸化酵素であるCPK が活性化され、硝酸シグナルに応答した遺伝子発現を司るNLP 転写因子のリン酸化を行うこと、リン酸化により活性型となったNLP 転写因子が様々な硝酸応答型遺伝子の発現を引き起こすことを明らかにした。更に、*cpk* 三重変異体を用いて、栄養シグナルと結びついた  $Ca^{2+}$ シグナル伝達ネットワークが、トランスクリプトーム、細胞の代謝、根系形成、地上部-根のバランス調整など器官形成上の可塑性を統合していることを示した。この研究成果は栄養シグナル伝達に関する先駆的な発見であり、論文タイトル“Discovery of nitrate-CPK-NLP signaling in central nutrient-growth networks”として、研究代表者の柳澤が共同責任著者となって、*Nature* (545: 311-316, 2017)で公表した。

### 2.

#### 概要:

植物の栄養環境を決める最大要素は、土壌中の硝酸塩とリン酸塩である。転写因子 NIGT1 を含む転写カスケードである NLP-NIGT1 カスケードと PHR1-NIGT1 カスケードが、それぞれ、硝酸イオン量の変動に合わせた硝酸イオンの取り込み調節とリン飢餓に応答した硝酸イオンの取り込み調節を制御していることを明らかにして、異なる栄養環境に適応するための植物メカニズムを解明した。この研究成果は、栄養獲得の巧妙な制御機構に迫る最先端かつ重要な発見である。論文タイトル“A NIGT1-centered transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in Arabidopsis”として、*Nature Communications* (9: 1376, 2018)で公表した。また、この研究成果は朝日新聞などでも紹介された。

### 3.

#### 概要:

シロイヌナズナの野生系統間におけるリン酸吸収能力の違いが赤色光受容体(フィトクロム B) 遺伝子の多型に由来するケースを見出し、赤色光シグナル伝達がリン酸獲得の制御に関わっていることを明らかにした。赤色光シグナルがフィトクロム B を介して3つの転写因子(PIF 4、PIF5 および HY5)の活性を調節して、リン酸輸送体遺伝子の発現を促進すること、これによりリン酸イオンの吸収量が増大することを明らかにした。栄養条件以外の環境要因が栄養獲得を制御している分子メカニズムを明らかにした。この研究成果は、論文タイトル“A phytochrome B-mediated regulatory mechanism of phosphorus acquisition”として、*Nature Plants* (4: 1089-1101, 2018)で公表を行った。

## §2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ① 「柳澤」グループ

研究代表者:柳澤 修一(国立大学法人東京大学生物生産工学研究センター 教授)

研究項目

- 多様な栄養環境に適応できるという植物が持つ栄養獲得の頑健性の仕組みのモデル化
- リン酸イオンの吸収のイメージングを用いた栄養応答の異なるシロイヌナズナの野生系統の選抜
- リン酸イオンの吸収のイメージングを用いた栄養応答の異なるイネ栽培品種の選抜
- イネ栽培品種間及びシロイヌナズナ野生系統間を利用した栄養応答ネットワークの解析
- 栄養応答の異なるシロイヌナズナを用いた栄養応答の多様性を決める遺伝的要素の検索

#### ② 「射場」グループ

主たる共同研究者:射場 厚(国立大学法人九州大学大学院理学研究院 主幹教授)

研究項目

- 気孔応答の改変による高CO<sub>2</sub>環境で高効率に光合成を行うイネの開発
- 栄養応答の異なるシロイヌナズナ野生系統の選抜
- 限界低窒素環境での生育を可能にする優良アレルの同定

#### ③ 「宮尾」グループ

主たる共同研究者:宮尾 光恵(国立大学法人東北大学大学院農学研究科 教授)

研究項目

- サーマルイメージング(サーモグラフィ)を用いた、窒素栄養応答性の異なるイネ栽培品種のスクリーニング法の検討と解析対象品種の選抜
- 屋内とフィールドで栽培した選抜品種の窒素栄養応答性の比較解析
- 遺伝子共発現ネットワーク解析によるイネの窒素栄養応答性制御因子候補の絞り込みと SNP 解析

#### ④ 「植田」グループ (2020 年度に発足、2020 年度のみの参加)

主たる共同研究者:植田 佳明(国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生産環境・畜産領域 研究員)

- ハブ遺伝子を利用した栄養応答改変型イネの創出およびその形質評価

### (2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

RNA-seq解析は永野チームの協力によって行われた。また、本CREST領域以外のグループとの連携による解析も行われた。硝酸シグナル伝達機構の解析ではハーバード大学の研究グループと共同研究を実施し、ゲノム編集は農業産業技術総合研究機構の研究グループのサポートで行った。また、構造生物学的手法による解析は東京大学農学生命研究科の研究グループの助力を得て行われ、ネットワーク解析は東京大学農学生命研究科アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニットの協力を得て行われた。植物のCO<sub>2</sub>応答の解析ではカリフォルニア大学(サンディエゴ校)の研究グループ、東京大学理学系研究科の研究グループ、埼玉大学理学部の研究グループの協力を得た。このように広範囲な学問分野に跨る研究ネットワークが形成された。