



・准教授
・木羽 隆敏

・経歴
2003年 名古屋大学生命農学研究科博士課程修了
2004年 ロックフェラー大学 博士研究員
2008年 理化学研究所植物科学研究センター
&環境資源科学研究センター 研究員
2018年 名古屋大学大生命農学研究科 准教授

窒素不足応答制御による低窒素耐性植物の開発

1. 研究の背景と目的

窒素は、植物の成長・生産性を規定する最も重要な栄養素の1つである。このことから窒素施肥は近代農業には欠かすことができず、人為的な窒素固定の産物の過半は窒素肥料用となっている。しかし作物は投入された窒素肥料の半分程度しか利用できないため、大量の窒素が環境中に流出してしまっている。今や地球の窒素循環において、人間活動由来の窒素固定量は、自然作用による固定量を上回っており、窒素肥料の大量使用は地球規模で様々な問題を引き起こしている。河川や海洋の水質汚染、土壌の酸性化、生物多様性の減少、温暖化ガス（N₂O等）の発生等が挙げられる。これらの問題は、国連で採択された「持続可能な開発目標（SDGs）」や国連環境計画の「Frontiers: Emerging Issues of Environmental Concern」報告書においても取り上げられており、窒素問題は国際社会の喫緊の課題として認識されつつある。高い収量を維持しつつ低環境負荷を両立するための植物科学的ソリューションとして、低窒素投入でも収量が低下しない低窒素耐性作物の開発に期待が寄せられている。

一方自然界は概して低窒素であり、野生植物は窒素不足環境に適応して生き延びている。このとき野生植物は、効率良く窒素を吸収・利用するための応答だけでなく、他の栄養素とのバランスを保つためにほかの代謝系を制御したり、地上部と地下部のバイオマス比を変化させたりする(Kiba and Krapp, 2016)。これらの代謝から形態に及ぶドラスティックな応答は、窒素栄養が存在するときの応答（硝酸応答など）の単なる裏返しではなく、窒素不足環境に積極的に適応するためのものであることが明らかになりつつある (Krouk and Kiba, 2020)。野生植物の窒素不足応答機構の理解が進めば、低窒素耐性作物の開発につながる知見が得られると期待されている。しかし近年の硝酸応答やリン酸欠乏応答メカニズム研究の急速な進展に対し (Liu and Sheen, 2021)、窒素不足応答メカニズムに関しては

関係因子が散発的に同定されているだけであり (Krouk and Kiba, 2020)、体系的な理解には程遠い状況にある。

窒素不足応答の研究が進んでいない主因として、窒素不足マーカーが同定されていなかったことが挙げられる。そこで本研究では (A) 我々が同定した窒素不足マーカー (Kiba et al. 2018) を利用したシロイヌナズナにおける新奇因子探索と (B) エノコログサを用いた窒素不足応答メカニズムの植物における普遍性と多様性の検討を通して、植物の窒素不足感知から出力に至る情報伝達の分子基盤の体系的な理解とそれに基づいた低窒素耐性植物デザインのための知見を得ることを目指した。

2. 研究方法

(A) シロイヌナズナにおける新奇因子同定のため、窒素不足マーカー遺伝子 *NRT2.4* (Kiba et al. 2012) を指標に、変異体スクリーニングと Yeast One-hybrid スクリーニングを行った。変異体スクリーニングでは、*NRT2.4* のプロモーター約 1.9 kbp と GUS 遺伝子の融合遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを窒素不足応答レポーター系統 (pNRT2.4:GUS) として用い、この系統に ethyl methanesulfonate により変異を導入して得た M2 種子をスクリーニングに供した。Yeast One-hybrid スクリーニングは、*NRT2.4* プロモーター上の窒素不足応答最小領域 (NRT2.4minP; Kiba et al. 2018) を bait、窒素不足条件で 4 日間栽培したシロイヌナズナの根から抽出した RNA を用いて作製したライブラリーを prey としてスクリーニングを行った。基本的には、Matchmake Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System (Clontech) のマニュアルに従って行なった。

(B) 窒素不足応答メカニズムの、植物における普遍性と多様性の検討においては、エノコログサを用い、トランスクリプトーム解析を行なった。発芽処理後 3 日目の実生を、窒素源として硝酸イオンを含む培地 (+N 培地) と含まない培地 (-N 培地) に移植し、移植後 24 時間と 120 時間の根から抽出した全 RNA を RNA-seq 解析に供した。その結果、+N 培地で育てた植物の根と比較して、-N 培地で育てた植物根において発現量が増加または低下する遺伝子 (DEG) を同定した。DEG の基準は、発現量の絶対値が 2 倍以上変化かつ FDR が 5% 以下のものとした。

3. 結果と考察

(A) 変異体スクリーニングでは、まず窒素不足応答が恒常的に活性化された変異体を同定するため、窒素源として 10 mM グルタミンを含む寒天培地 (窒素充足条件) で栽培しているにもかかわらず、窒素不足応答レポーターが活性化される変異体の探索を行った。3,000 系統相当の M2 種子をスクリーニングした結果、5 系統の恒常的窒素不足応答変異体 (*cnsr*) を得た (図 1A)。次に窒素不足応答が抑圧された変異体を同定するため、ごく低濃度 (0.05 mM NH_4NO_3) の窒素源を含む寒天培地で栽培しても、窒素不足応答レポーターが活性化され

ない変異体の探索を行った。一次スクリーニングの結果、114 系統の窒素不足応答抑圧変異体 (*snsr*) 候補を得た (図 1B)。これら変異体については、現在戻し交配を行なっているところであり、続いてリシーケンシングによる原因遺伝子の同定と機能解析を進める予定である。

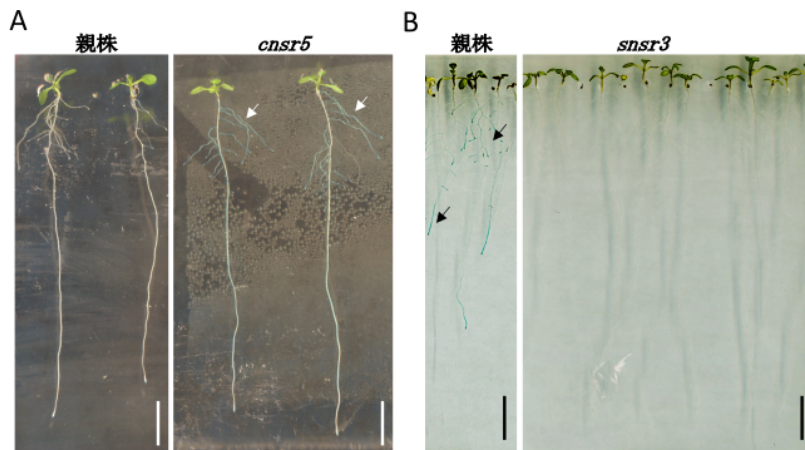


図 1. 窒素不足応答変異体の一例

(A) 窒素不足レポーター系統 (pNRT2.4:GUS) の親株と恒常的窒素不足応答変異体のうちの 1 系統 (*cnsr5*) の GUS 染色結果。窒素充足条件で栽培すると、親株では染色が見られないが、変異体候補では染色が観察された。(B) 親株と窒素不足応答抑圧変異体候補の 1 つ (*snsr3*) の GUS 染色結果。窒素不足条件で栽培すると、親株は染色されるが、変異体候補では染色が非常に弱かった。矢印は GUS 染色 (青い色素の沈着) された根を示す。スケールバー: 1.0 cm。

NRT2.4minP を bait、窒素不足条件のシロイヌナズナの根から抽出した RNA をもとに作製したライブラリーを prey としてスクリーニングを行った結果、NRT2.4minP と相互作用する転写因子群 NIPs を単離した (図 2A)。シロイヌナズナ葉肉プロトプラスを用いたトランジェントアッセイにより、NIPs は植物体内においても NRT2.4minP と相互作用することも確認した (図 2B)。現在変異体や過剰発現体の作製などを進めており、準備が出来次第、NIPs の窒素欠乏応答制御における役割を明らかにするための研究を行う。

(B)シロイヌナズナは光合成型が C3 タイプの双子葉植物である。本研究では、シロイヌナズナとは体制や光合成タイプが異なる、C4 単子葉植物のエノコログサに着目した。エノコログサは、栽培種である *Zea mays* (トウモロコシ)、*Saccharum officinarum* (サトウキビ)、*Sorghum bicolor* (ソルガム)、*Setaria italica* (アワ) などの重要な食料、飼料、燃料およびバイオエネルギー作物と同じ、キビ亜科に属する野生種の植物である。またゲノムは解読済みであり、自家受粉・形質転換・交配が可能である。それに加え、これまで研究に用いられてきた C4 植物と比較して、世代時間が短く、植物体が小さいなど、実験室レベルでの分子遺伝学材料として適した

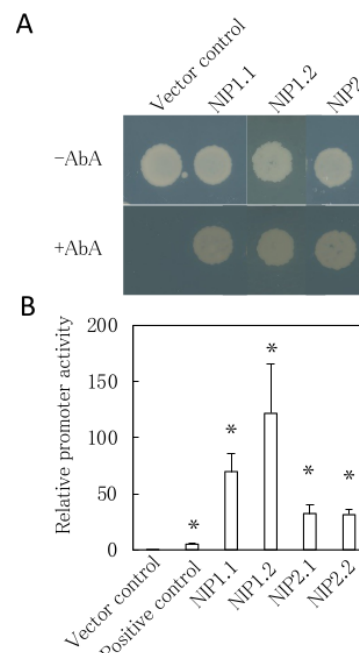


図 2. NRT2.4プロモーターの窒素不足応答最小領域とNIPsの相互作用

(A) Yeast One-hybrid法によるNRT2.4プロモーターの窒素不足応答最小領域 (NRT2.4minP) とNIP1 およびNIP2の相互作用検定。選択のための薬剤なし (-AbA) とあり (+ABA) の条件でのスポットテストの結果の一例。(B) シロイヌナズナプロトプラスを用いたトランジェントアッセイの結果。レポーターにNRT2.4minPを、エフェクターにNIP1およびNIP2を用いた。*はベクターコントロールと比べて有意な変化を示す (Dunnett's test, $P < 0.05$)。

特徴ももつ (Mamidi et al. 2020)。

エノコログサの窒素不足応答に関する基礎情報収集のため、トランスクリプトーム解析を行なった。移植後 24 時間と 120 時間の根から抽出した全 RNA を RNA-seq 解析に供し、+N 培地で育てた植物と比較して、-N 培地で育てた植物の根において、発現量が増加または低下する遺伝子 (DEG) を同定した (図 3)。

DEG の中には、シロイヌナズナで窒素不足応答制御に関わることが明らかにされている遺伝子 (*NIGT1*, *LBD*, *CEPD* など) のホモログが見出された。また、それらの発現は、シロイヌナズナのホモログと同じように応答したことから、エノコログサでも窒素不足応答制御の基本的な分子機構は類似している可能性が示唆された。

現在はこれら遺伝子の過剰発現体や変異体の作製を進めており、準備出来次第、窒素不足応答メカニズムの植物における普遍性と多様性の検討するための実験を行う計画である。

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援いただきました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団ならびに財団関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

5. 参考文献

1. Kiba T., Feria-Bourrellier A-B., Lafouge F., Lezhneva L., Boutet-Mercey S., Orsel M., Bréhaut V., Miller A., Daniel-Vedele F., Sakakibara H., and Krapp A. (2012) The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell*, 24, 245-258.
2. Krouk G. and Kiba T. (2020) Nitrogen and Phosphorus interactions in plants: from agronomic to physiological and molecular insights. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 57, 104-109.

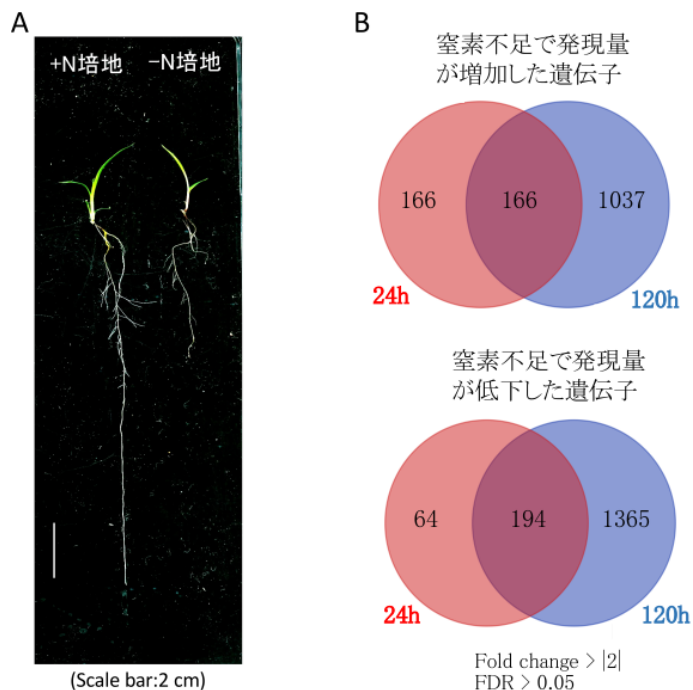


図3.エノコログサの根における窒素不足に応答したトランスクリプトーム変化
発芽処理後3日目の実生を、窒素源として硝酸イオンを含む培地(+N培地)と含まない培地(-N培地)に移植し、移植後24時間と120時間の根をサンプリングした。(A) 120時間後の実生の様子。(B) +N培地で育てた植物と-N培地で育てた植物を比較して、発現量の絶対値が2倍以上変化かつFDRが5%以下の遺伝子をDEGとして絞り込み、その数をベン図で表した。

3. Kiba, T., Inaba, J., Kudo, T., Ueda, N., Konishi, M., Mitsuda, N, Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Ohme-Takagi, M., Matsui, M., Yano, K., Yanagisawa, S., and Sakakibara, H. (2018) Repression of nitrogen-starvation responses by members of the Arabidopsis GARP-type transcription factor NIGT1/HRS1 subfamily. *Plant Cell*, 30, 925-945.
4. Lei L., Liu, K-H, and Sheen J. (2021) Dynamic nutrient signaling networks in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 37, 341-367.
5. Mamidi, S., Healey, A., Huang, P., Grimwood, J., Jenkins, J., Barry, K., Sreedasyam, A., Shu, S., Lovell, J.T., Feldman, M., Wu, J., Yu, Y., Chen, C., Johnson, J., Sakakibara, H., Kiba, T., Sakurai, T., Tavares, R., Nusinow, D.A., Baxter, I., Schmutz, J., Brutnell, T.P., and Kellogg, E.A. (2020) A genome resource for green millet *Setaria viridis* enables discovery of agronomically valuable loci. *Nat. Biotech.*, 38, 1203-1210.