

研究報告書

「低窒素で持続可能な二酸化炭素資源化のための中心代謝バランス制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 草野 都

1. 研究のねらい

【着眼点】

本研究は、二酸化炭素の効率的資源化のための技術開発を目指し、低窒素条件下での植物の生育抑制に着目する。植物の生育は、炭素代謝と窒素代謝の相互作用(CN バランス)により制御されることが知られているが、その分子機構は不明な点が多い。地球温暖化回避のための二酸化炭素削減に加え、低投入持続型の植物生産が求められている中、土壌が低窒素状態にあっても植物の生育を維持し、二酸化炭素資源化の促進を目指すには、上記の抑制機構の解明が急務である。

【研究目標の再設定および将来への展望】

本研究では、光合成および窒素同化能の強化による二酸化炭素資源化促進を目指すのではなく、CN バランスを介した植物の生育抑制の仕組みを解明する。研究開始時には中心代謝物において、花形成時のシグナル分子として同定されたトレハロース 6 リン酸(T6P)に焦点を当て、T6P がいかに CN バランス制御に寄与するのかという仮説に基づき研究を進めた。栄養成長期に発現するサイトゾル型グルタミン生合成酵素(GS1)をコードする遺伝子 3 種類のうちの 1 つである *OsGS1;1* 欠損変異イネは窒素十分条件下では葉の生長が抑制され、*OsGS1;2* 欠損変異イネでは抑制が見られないことが再現性よく確認できた。しかし T6P の物性が不安定であり、ごく微量しか存在しないこと、本研究で行った転写物プロファイリングにおいて T6P 合成酵素遺伝子群の増加が検出されなかったことから、当初の仮説に疑問を抱いた。意外なことに、*OsGS1;1* 欠損変異イネの根の転写物プロファイリングの結果から、光合成関連遺伝子群の発現に有意な上昇が認められた。通常、根では光照射条件下において成熟した葉緑体分化は誘導されない。このことから *OsGS1;1* によって同化される窒素同化産物もしくはその代謝物(群)が未知のしくみを介して代謝ネットワークを変化させ、光合成関連遺伝子群発現量を制御するのではという新たな仮説構築に至った。よって、本研究では本制御機構を明らかにするとともに、*GS1;1* が関与する未知の制御機構解明の解明を行う。当初の目的であった低窒素条件下での健全な植物生育のための鍵因子を特定する。本研究支援で得た知見を応用展開に繋げるため、様々なイネ栽培種の低窒素応答と生長の関係性についても解析する。これにより、窒素肥料過多によって支えられている従来型の農業形態を低窒素施肥でも高収量を確保できる革新的な食糧生産技術の創出へと変換する技術開発に利用する。

2. 研究成果

(1) 概要

栄養成長期における低窒素条件下でのイネ生長抑制機構の解明に向けて、(1)アンモニウ

ム態窒素同化酵素のひとつである GS1 が担う中心代謝を介した健全なイネ生長調節のための鍵因子の同定、および(2)世界で栽培されている代表的イネ品種についてオミックス解析による窒素応答に関する研究を行った。

研究項目1では、GS1 をコードする 3 種類の遺伝子のうち、栄養成長期に発現する *OsGS1;1* および *OsGS1;2* に着目した。両者の組織発現部位は異なっており、*OsGS1;1* はイネの全体の部位で発現が認められるのに対し、*OsGS1;2* は主に根に発現が認められた。次に、イネレトロトランスポゾン *Tos17* によって誘発されたイネ変異体 *Osgs1;1* および *Osgs1;2* を用いて代謝物プロファイリングによる解析を行った。その結果、両変異体の根において *Osgs1;1* では糖類の過剰蓄積が認められたのに対し、*Osgs1;2* ではアミノ酸類の減少といった窒素欠乏時に見られる代謝物群の量的変化が認められた。次に、*Osgs1;1* の根における糖類の過剰蓄積に関する知見を得るため、転写物プロファイリングを行った結果、予期せぬことに、葉緑体タンパク質をコードする遺伝子を含む光合成関連遺伝子群の発現に有意な上昇が認められた。通常野生型のイネの根では少量の光照射による葉緑体分化は起こらない。この原因を探るべく、異なる葉令期時系列のサンプルに対する高解像度転写物プロファイリングにより解析を進めた。本解析により、幼苗の従属栄養から独立栄養期への移行期に葉緑体関連遺伝子群の発現量が増加することを明らかにした。研究項目1で使用した栽培種が日本晴であり、他の系統では栄養成長期における低窒素環境に対してどのような応答を示すのかに興味を持たれた。よって、研究項目2では、極少数の品種で遺伝的多様性をカバーする代表的栽培品種および対照区となる2品種(日本晴およびカサラス)の合計69品種について、窒素濃度がダイナミックに変化する際のそれぞれの品種の生育スピードを指標とした観測システムを構築し、低濃度の窒素条件下でも生育抑制を起こさず生長可能なイネ品種の選抜を行った。その結果、窒素濃度の変化に対する応答性が高い5品種を選抜した。この中の1品種に対し、RNA-seq 解析を行った。本品種は日本晴を対照区とした場合、窒素十分条件から低窒素濃度への変化に応じて転写物群が顕著に変化するのに対し、日本晴ではこのような変化は認められなかった。故に日本晴が有する応答とは異なる、比較的短期の窒素濃度変化に素早く応答するメカニズムの存在が示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A, B 「窒素十分条件下での有機態窒素代謝の中心代謝へのインパクト解明」

本テーマは 2 つのサブテーマにより構成される。一つ目は、対照区であり今回用いている変異体と同じ遺伝背景を持つ野生型イネにおける異なる窒素条件下での葉身伸長抑制・回復に対する予備知見を得るための解析である。イネの栄養生長期の中で、発芽から分けつが認められる前までの主幹生長時期では、(1)種子からのイネ生長に必要なエネルギー源の供給(従属栄養)、(2)生長したイネ葉身での光合成によるエネルギー源の供給(独立栄養)がその生長を支えている。(1)は有機態窒素(アミノ酸等)、有機態炭素(糖类等)および根からの無機態窒素を含む無機栄養分の吸収により起こるが、第何葉令期までが従属栄養により生長するか不明であった。そのため、対照区である日本晴を発芽時から第 6 葉令期まで生育させ、種子、根、地上部のバイオマス測定したところ、第 3 葉令から第 4 葉令にかけて種子内容物が消費され、その後根および地上部のバイオマスが大幅に増加した。次に、日本晴およびインディカの対照区として用いられるカサラスを第 3 葉令期まで窒素欠乏条件、その後段階的に窒素濃度を上昇させて生育させ、各葉身の生長度を新鮮重量により評価した。その結果、従属栄養後期に

窒素供給が行われない場合、葉身生長は抑制され、この効果はのちに無機窒素が供給された場合でも十分に回復しなかった。よって、サブテーマ二つ目で着目した第3葉令期から第4葉令期における窒素有効利用がバイオマス増大に重要な生育時期であると推測した。続いて、イネ変異体 *Osgs1;1* に対し、これらの時期における根、基部および未幼鞘の時系列オミックス解析を行った。通常根においては葉緑体形成がおこらないが、本組織に対するガスクロマトグラフ質量分析計を用いた代謝物およびマイクロアレイによる転写物プロファイリングで得た結果から、糖類の蓄積、光合成関連遺伝子群発現の有意な上昇が認められた。また、糖類トランスポーター遺伝子群の発現量が有意に減少すること、光合成関連遺伝子群以外にも、*Osgs1;1* の根では植物の生育に必須の無機物の取り込みに関わる遺伝子群の発現量も有意に減少した。本結果は、*OsGS1;1* が単純に有機態窒素供給としての役割を担うだけでなく、何等かの制御機構の一因子として、代謝恒常性の維持ひいては光合成関連遺伝子群発現等、広範囲にわたる遺伝子群の制御に関わることを初めて見いだした。

研究テーマC「窒素欠乏条件でのイネ葉の生長抑制機構の解明」

イネは窒素十分条件では生長を続けるが、低窒素条件では生長を一時的に抑制することが知られている。本研究では、多様な品種が示す窒素栄養応答を解析するため、RFLP マーカーを元に選抜された世界のイネコレクション 67 品種に対照区となる 2 品種を加えた 69 品種を対象とし、アンモニウム態窒素十分条件、超低窒素条件および低窒素条件の 3 種類の窒素濃度をダイナミックに変化させた時のイネ地上部の生長変化について、本研究内で開発したデジタルフェノタイピング技術により解析した。低窒素条件で最も早く生長が回復する品種1種類の選抜を行い、本品種を研究テーマD, Eの実験に供した。

研究テーマD, E「低窒素生長耐性品種の選抜と低窒素下での植物の継続的生長のための代謝物マーカー候補の決定」

研究テーマCで選抜したイネコアコレクション1種類について、窒素十分条件、超低窒素条件および低窒素条件における地下部の中でも、特に基部に着目し、これらの遺伝子発現パターン変化を捉えるため、RNA-seqにより解析を行った。本データを用い、多変量解析を行った結果、選抜した品種は遺伝子発現レベルで窒素濃度の変化に素早く応答することを明らかにした(研究テーマD)。本実験により、これらの遺伝子群を低窒素下での植物の継続的生長のためのマーカー候補として抽出することに成功した(研究テーマE)。

3. 今後の展開

さきがけ研究では、低窒素条件下で持続的に生育可能な事象を明らかにするため、イネの窒素同化鍵酵素の変異体に対し、オミックス解析を駆使した基礎研究を行った。その結果、全く予期しなかった窒素が光合成、すなわち炭素同化と密接にかかわることを代謝物変化および遺伝子発現変化を捉えることで見出した。平行して、基礎研究を応用研究につなぐため、多様なイネ品種について低窒素条件で地上部の生育が抑制されない品種を選抜することに成功している。今後は、本研究で得た新たな知見を通じ、窒素同化によって制御される鍵因子を同定するとともに、窒素応答遺伝子マーカーをアフリカ等の低窒素土壌において生育可能な品種選抜技術として応用する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

植物が低窒素条件でも生育抑制を受けず生育可能なしくみを解明するために、本研究では有機態炭素による CN バランスの恒常性に着目した。加えて、最終的に土壤貧栄養条件でも健やかに生長する植物を作出する技術開発に資する知見を得ることを目指した。本研究目標を達成するために、これまでに明らかにされてきた常識を覆すような CN バランス機構の解明と、応用研究に繋がるような低窒素応答性を有する植物種の選抜に利用可能なマーカーの発見を平行して行った。

先行研究により、*OsGS1;1* が栄養生長期に地上部の葉身伸長制御に密接にかかわることが示唆されていた。また、本研究を開始する前に得ていた結果では、有機態 CN 代謝物のバランス維持に重要であることを見出していた。しかし、*OsGS1* のホモログ遺伝子である *OsGS1;2* で代謝物群の量的制御にどのように関わるか、*OsGS1;1* および *OsGS1;2* の機能分化については未解明であった。よって、両者の代謝物群および転写物群の変化を包括的に解析可能な統合オミックス解析を行うことにより、*OsGS1;2* で同化されたグルタミンがアミノ酸類量を調整する働きを担うのに対し、*OsGS1;1* では中心代謝の炭素同化およびその代謝調節に関わることを明らかにした。

低窒素条件下で比較的短期間で応答するマーカー候補の探索では、生長の様子を charge coupled device (CCD) カメラで追跡し、高解像度デジタルデータとして得る手法を開発した。本手法により選抜した品種の遺伝子発現変化を他の品種と比較解析し、最小限の窒素応答マーカー候補の組み合わせを見出す予定である。

オミックス解析は包括的データ解析から仮説を構築し、それを証明する手法のひとつである。しかしながら、オミックス解析により得たデータは、従来法の「スクリーニング」に用いられる傾向にあった。本さきがけ研究では、明らかにしたい事象に対し、最適化した実験デザインを構築し、環境条件、個体変動から生じるノイズを様々な統計解析を適用することで区別し、有意に変化する要因を客観的に抽出することができた。このようなアプローチを、今後の研究スタイルの一つとして発信していきたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

草野氏は、本研究において、窒素欠乏下での生育抑制が植物の中心代謝内の代謝物群のバランス(C/Nバランス)で制御される仕組みを解明し、貧栄養の土地でも健全な成長を行う品種の選抜に応用できる基盤技術の開発を目的とした。その結果、C/Nバランスの観点から特定のグルタミン合成酵素に研究のターゲットを絞り込むことができた。しかし、それがC/Nバランスの制御に重要な関与をして、その制御機構の理解を通して、低窒素環境下でも無機物同化機能を十分に発揮できる植物体を開発する具体的な戦略が未だ見えていない。メタボローム研究者として、これまで培ってきた協力関係をさらに発展させ、二酸化炭素資源化に貢献できる研究成果を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ohashi, M., Ishiyama, K., Kusano, M., Fukushima, A., Kojima, S., Hanada, A., Kanno, K., Hayakawa, T., Seto, Y., Kyojuka, J., Yamaguchi, S., and Yamaya, T. Lack of cytosolic glutamine synthetase1;2 in vascular tissues of axillary buds caused severe reduction in their outgrowth and disorder of metabolic balance in rice seedlings. *The Plant Journal*. 2015, 81, 347–356.
2. Kusano, M., Baxter, I., Fukushima, A., Oikawa, A., Okazaki, Y., Nakabayashi, R., Bouvrette, D., Achard, F., Jakubowski, A., Ballam, J., Phillips, J., Culler, A., Saito, K., and Harrigan, G. Assessing metabolomic and chemical diversity of a soybean lineage representing 35 years of breeding. *Metabolomics*. 2014, 11, 261–270.
3. Kusano, M.*, Yang, Z.G., Okazaki, Y., Nakabayashi, R., Fukushima, A., and Saito, K. Using Metabolomic Approaches to Explore Chemical Diversity in Rice. *Molecular Plant*. 2015, 8, 58–67.
4. Yamaya, T., and Kusano, M. Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH–glutamate synthases in rice. *Journal of Experimental Botany*. 2014, 65, 5519–5525.
5. Fukushima, A., and Kusano, M.* A network perspective on nitrogen metabolism from model to crop plants using integrated ‘omics’ approaches. *Journal of Experimental Botany*. 2014, 65, 5619–5630.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会招待講演

Kusano, M.: Cytosolic glutamine synthetase 1;1 involves plastid differentiation via metabolic homeostasis in rice. The Third International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants (Nitrogen 2016), Montpellier, France, 22–26 August (2016).

国内学会発表

草野都、福島敦史、舟山和宏、小林(田淵)真由美、西澤具子、小林誠、佐藤繭子、若崎眞由美、豊岡公德、近藤久益子、内海好規、関原明、小島創一、斉藤和季、山谷智行. イネサイトゾル型 GS1;1 による代謝とオルガネラの恒常性の維持に対する役割. 第 34 回日本植物細胞分子生物学会(上田)大会, 上田, 9 月 1–3 日(2016).

大橋美和, 石山敬貴, 草野都, 福島敦史, 小島創一, 山谷知行, 早川俊彦: Lack of

cytosolic glutamine synthetase1;2 reduced the availability of glutamine and sucrose for axillary bud outgrowth in the rice seedling. 第 57 回日本植物生理学会年会, 盛岡, 岩手, 3 月 18—20 日 (2016).