

平成21年7月7日
千葉大学 大学院園芸学研究科

植物肥料の要：窒素栄養の取り込み調節因子を初めて解明

<研究成果の概要>

本学園芸学研究科の田中 寛 教授、今村 壮輔 JSPS特別研究員（現・中央大学助教）、兼崎 友（東京大学博士研究員）らは、大沼 みお 立教大学博士研究員、関根 靖彦 立教大学准教授、黒岩 常祥 立教大学教授らのグループと共同で、窒素栄養の取り込みを活性化する転写調節因子を、植物で初めて特定することに成功しました。これは、最も原始的なモデル植物として注目される藻類「シゾン（注1）」の研究により得られた成果であり、米国科学アカデミー紀要（Proceedings of National Academy of Science, USA）に2009年7月6日の週に電子版で公開されます。

植物肥料の三大要素が窒素、リン、カリウムとされることから判るように、植物にとって窒素は極めて重要な栄養素です。植物は窒素栄養を主にアンモニアや硝酸の形で取り込みますが、これら窒素が不足すると植物の生長は著しく阻害されます。このため、窒素肥料は作物に施用される肥料の主要な成分となっています。他方、農業による過剰な窒素肥料の散布は、河川・地下水の富栄養化や、脱窒作用による温室効果ガス発生などの環境問題を引き起こしてしまいます。これら問題の解決に向けた一つの方策は、植物の窒素取り込み能力を高めることであり、このような観点から植物、特に作物の窒素取り込み系の研究はこれまでも盛んに進められてきました。しかし、作物を含む高等植物における調節の仕組みは極めて複雑で、窒素の取り込みがどのように制御されているかは今でも余り理解されていない状況です。

今回研究グループは、現存する植物の中で最も原始的、かつ単純な特徴をもつとされる藻類「シゾン」に注目し、植物が窒素栄養を細胞に取り込む仕組みや、その調節について解析を行いました。シゾン細胞を窒素欠乏状態におくと、窒素分を細胞に取り込む輸送体（トランスポーター）や、取り込んだ窒素分からアミノ酸を合成する酵素などの遺伝子が活性化され、これら遺伝子からの伝令RNA（mRNA）合成が増加します。この際には、これら遺伝子周辺のDNAに結合し、mRNA合成を促す「転写因子」と呼ばれるタンパク質が関わるはずですが、そこで研究グループは、窒素欠乏状態においたシゾン細胞でのmRNA合成を網羅的に調べることで、MYBと呼ばれるグループの転写因子の一つ（MYB1）が、窒素欠乏時に活性化されることを突き止めました。

さらに研究グループは、このMYB1タンパク質が実際に、窒素輸送体やアミノ酸合成酵素の遺伝子（DNA）に特異的に結合すること。さらに、MYB1遺伝子を欠損する変異体で

は、窒素欠乏によるこれら遺伝子の活性化が起こらないことを示しています。また、この変異体が窒素欠乏状態において速やかに死んでいくことから、MYB1遺伝子は生理的にも窒素欠乏時に重要な役割を果たしていました。これらのことから研究グループは、MYB1がシゾンにおいて、窒素栄養の取り込みを中心的に制御する因子であると結論しています。

作物などの高等植物にも、MYBグループの転写因子は多数見いだされていますが、余りに多くの種類があることから、それらの機能の多くは知られていないままです。今回、原始的な植物における窒素取り込みの調節がMYB型転写因子によることが判りましたので、植物一般でも基本的な制御系は同様であることが予想されます。このような調節因子の同定は、その人為的な活性化による窒素取り込み能の増強に直結します。従って本研究は、今後は作物を含む高等植物に研究を展開することで、農産物増産などの応用に役立つことが期待される成果といえます。

*本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金 学術創成研究費（16GS0304）、基盤研究B（21370015）によって得られました。

<研究の背景と経緯>

すべての生物にとって、窒素は体を構成する主要な元素であり、その外界からの摂取は生命活動に極めて重要な意義を持ちます。真核生物のうち、窒素栄養の取り込み系が最も詳しく解明されてきたのは出芽酵母であり、従来、その制御系が真核生物に共通な仕組みであるとされてきました。出芽酵母において、窒素の取り込みに関わる遺伝子群は、GLN3と呼ばれる転写因子により活性化されます。GLN3はGATA型と呼ばれる転写因子に含まれ、このタイプの転写因子は植物にもみつかりますので、当初は植物でもGATA型転写因子と窒素制御の関連が想定されました。しかしその後、植物でGATA型の転写因子を調べても窒素との関連は観察されず、植物において窒素制御に関わる転写因子は長く不明のままになっています。

一方、今回の研究成果を挙げた研究グループは、植物に基本的な機能構築や制御システムについて、もっとも原始的、かつ単純な植物細胞である「シゾン」を用いた研究や考察を進めてきました。シゾンはイタリア・ナポリ近郊の温泉から見つかった単細胞紅藻で、

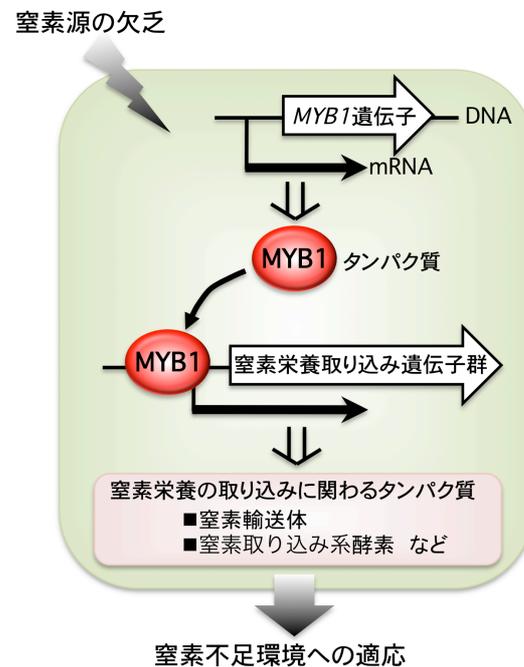


図1: シゾンにおいて窒素栄養が不足すると、核内ではたらく転写因子であるMYB1が活性化され、窒素栄養の取り込みに関わる遺伝子群の発現を上げることで窒素の不足した環境に適応する。

核、ミトコンドリア、葉緑体を細胞内に一個ずつしか含みません。また、ゲノム配列の決定により、シゾンの持つ遺伝子の数は非常に少なく、他の真核生物に比べて非常に単純な制御系を持つことも示唆されています。研究グループはこれまでもシズンを材料として、リボソーム合成に関わる酵素、葉緑体からの細胞増殖シグナルなど、真核生物に根本的な仕組みを解明してきており、今回は窒素栄養の取り込みに関わる制御系の研究により、本成果を得るに至りました。

<研究の内容>

本研究では、単細胞紅藻であるシズンを材料として、植物における窒素栄養の取り込みに関わる転写制御因子の検索が行われました。最初に研究グループは、シズンを通常の栄養培地から窒素欠乏条件に移した際の遺伝子発現の変動について、マイクロアレイ（注2）を用いた網羅的解析を行いました。その結果、R2R3タイプのMYBタンパク質の一つ

（MYB1）の発現が、窒素欠乏に応答して誘導されることが明らかになりました。MYBタンパク質とは、真核生物に普遍的に見つかるDNA結合タンパク質であり、多くの場合で転写因子として機能することが知られています。今回研究グループは、MYB1タンパク質のDNA結合能や、その特異性について検討を進めました。その結果、MYB1タンパク質が実際に、窒素欠乏時に発現誘導を受ける硝酸還元酵素、亜硝酸還元酵素、硝酸誘導体などの遺伝子上流領域に特異的に結合することが示されました。またクロマチン免疫沈降法（注3）により、この特異的結合が細胞

内でも証明されたことで、MYB1がこれら遺伝子の転写活性化に関わる転写因子であることが示唆されたのです。次に研究グループは、最近シズンにおいて開発された「相同組換えによる遺伝子破壊法」によりMYB1遺伝子を特異的に破壊し、MYB1変異株の取得に成功しました。この株は、シズンにとって質の悪い窒素源である硝酸を用いて生育することができません。また野生株と比較して、窒素欠乏時に速やかに死滅していきます。これらの観察により、研究グループはMYB1を、窒素同化に関わる中心的な制御因子であると結論づけました。シズン細胞において、通常の栄養培地ではMYB1タンパク質は殆ど発現しておらず、その変異株も表現系を示しません。しかし、窒素欠乏条件ではMYB1タンパク質は細胞核の中に蓄積するので、これも窒素制御因子としての役割を支持する結果となりました。

作物における窒素取り込み系調節遺伝子の活性化



窒素取り込み能の増強

生長の促進

作物の増産

図2: 同定した窒素取り込み系の制御因子を活性化することで、窒素同化の活性化や植物の生長促進が期待される。

<今後の展開>

今後シゾンにおいて、MYB1がどのようなシグナル伝達系により制御されているかを解明することで、葉緑体を持つ植物細胞における、窒素代謝制御の大枠が明らかにされることでしょう。また、作物を含む高等植物に研究を展開することで、窒素取り込み系を活性化することによる植物生産力増強に向けた研究を進めていきます（図2）。

<掲載論文名および著者名>

'R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen assimilation regulator in *Cyanidioschyzon merolae*'

(R2R3タイプのMYB転写因子 CmMYB1 は、単細胞紅藻シゾン（シアニディオシゾンメロラエ）における窒素同化の中心制御因子である）

Proceedings of National Academy of Science, USA

Online Early Edition (<http://www.pnas.org/pabbyrecent.shtml>)

Sousuke Imamura, Yu Kanasaki, Mio Ohnuma, Takayuki Inouye, Yasuhiko Sekine, Takayuki Fujiwara, Tsuneyoshi Kuroiwa and Kan Tanaka

(今村 壮輔、兼崎 友、大沼 みお、井上 貴之、関根 靖彦、藤原 崇之、黒岩 常祥、田中 寛)

本件に関するお問い合わせ先
田中 寛（タナカ カン）教授
千葉大学 大学院園芸学研究科 微生物工学研究室
〒271-8510 松戸市松戸 648
Tel/Fax : 047-308-8866
E-mail : kntanaka@faculty.chiba-u.jp

<用語解説>

注1) シゾン

シゾン（学名 *Cyanidioschyzon merolae*）はイタリアの温泉で見つかった単細胞性の紅藻（海苔の仲間）で、東京大学（現・立教大学）の黒岩常祥教授らにより、葉緑体やミトコンドリアなどオルガネラの分裂装置研究に最適な、もっとも単純な構造をもつ真核細胞として紹介された。真核生物として初めて100%の核ゲノムが決定されるなど、モデル植物、モデル真核生物としての基盤情報の整備が進んでおり、真核生物の初期進化や基盤的な制御機構の解明に向けた研究が開始されている。

注2) マイクロアレイ

マイクロアレイとは、多数の DNA 断片をプラスチックやガラス等の基板の上に高密度に配置し、それらに一致する DNA や RNA を検出・定量することにより、細胞内の遺伝子発現量を網羅的に測定することが出来る技術である。例えば、ある特定のストレス（本研究の場合は窒素欠乏条件）を細胞に与えた際と、ストレスを与えていない細胞（窒素充足条件）における遺伝子発現量をマイクロアレイにて比較することにより、ストレス条件下において特異的に変動する遺伝子を網羅的に決定することが出来る。

注3) クロマチン免疫沈降法

クロマチン免疫沈降（ChIP）法とは、標的タンパク質（転写因子など）に対する特異的な抗体を用いて、ゲノムDNA上における標的タンパク質の結合領域を特定する方法である。よって、ChIP解析を行うことにより、転写因子が細胞内で結合しているDNA領域を特定することが出来る。