

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月20日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780108

研究課題名（和文） 糖応答変異体を用いたC/Nバランス制御および葉緑体-核間シグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanisms of C/N-balance by plastid signaling using sugar-sensitive mutants

研究代表者

田茂井 政宏 (TAMOI MASAHIRO)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：70340768

研究成果の概要（和文）：

プラスチド型インベルターゼ（INV-E）変異株（*sicy-192*）は、ショ糖を含む培地上で緑化が抑制され、光合成系および窒素同化系遺伝子群の発現が野生株とは異なる。そこで、プラスチドから核への逆行性シグナリング（プラスチドシグナリング）のマスターレギュレーターである GENOME UNCOUPLED1 欠損株（*gun1-101*）と *sicy-192* の二重変異株を作成し解析した結果、*sicy-192* で見られた光合成系遺伝子群の発現抑制および窒素同化系遺伝子群の発現誘導は、二重変異株において部分的に回復していたことから、*sicy-192* 変異はプラスチド遺伝子発現を抑制し、GUN1 を介したプラスチドシグナリングを活性化することにより種々の核コード遺伝子の発現を変化させることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We recently identified an *Arabidopsis* gain-of-function mutant of plastidic invertase (INV-E), *sicy-192*, as a sucrose sensitive mutant, and found that INV-E participates in regulating the carbon/nitrogen (C/N) balance. Interestingly, PGE was suppressed in the mutants on treatment with sucrose, suggesting that INV-E regulates C/N balance via the plastid signaling. We created and analyzed double mutants of *sicy-192* and *genome uncoupled 1* (*gun1-101*), which lacks GUN1, a master regulator of the plastid signaling. On treatment with sucrose, the expression of photosynthesis- and nitrogen assimilation-related genes was lower and higher, respectively, in the *sicy-192* mutants compared to the wild-type plants. Interestingly, the perturbation of C/N balance was recovered by the disruption of GUN1, suggesting an involvement of INV-E in the GUN1-mediated plastid signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：植物生化学

## 1. 研究開始当初の背景

植物は炭素（C）と窒素（N）それぞれ個別の代謝調節機構に加えて、細胞内の C と N の相対量比（C/N バランス）を感知し調節することによって、環境に適応する能力を備えているが、その制御機構は明らかになっていない。これまで、C/N バランス制御に関わる研究が多数行われてきたが、これらは外部か

ら炭素源および窒素源を施肥、もしくは制限することによって見られる遺伝子発現や酵素活性などの影響を解析した例が多く、C/N バランスの情報伝達と C および N の分配に関する分子機構については断片的な知見が得られているに過ぎない。我々はこれまでに、発芽時の糖応答に異常を示す変異体（*sicy-192*）を単離・解析した結果、プラス

チド局在の中性/塩基性インペルターゼに点変異が起きていることを明らかにした (図1) (*J.Biol.Chem.*285,15339-15407,2010)。

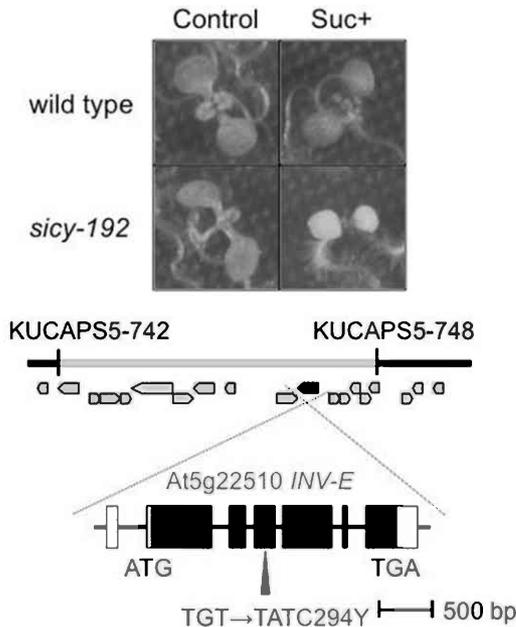


図1 *sicy-192* 変異株

この変異体では、高濃度のショ糖を含む培地上では発芽時の葉緑体での光合成装置が十分に構築されておらず、光合成関連の遺伝子発現が抑制されているのに対し、窒素代謝系の遺伝子発現が誘導されていた (図2)。この事実は、葉緑体内のショ糖/ヘキソースバランスがシグナルとなって、光合成および窒素代謝系の遺伝子発現を制御していることを示唆すると共に、インペルターゼ変異による葉緑体のショ糖/ヘキソースバランスの変化が、細胞全体の C/N 代謝のバランス制御にも影響することを示唆していた (図3)。しかし、葉緑体内の糖がシグナルによる種々の遺伝子発現の制御機構は未だ明らかになっていない。

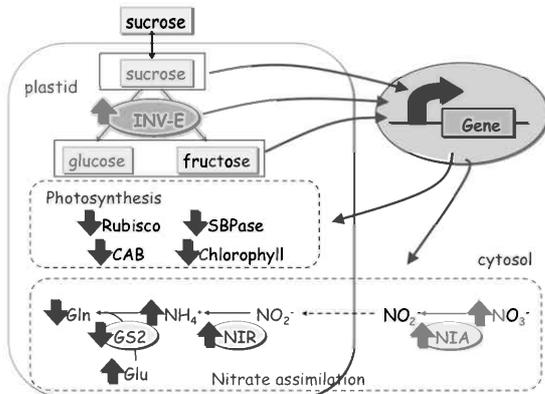


図2 *sicy-192* 変異による遺伝子発現への影響

## 2. 研究の目的

C/N バランス制御の分子機構を明らかにするために、我々が明らかにした C/N 調節の中心的因子である可能性を有する葉緑体型インペルターゼの変異株 (*sicy-192*) を用いて、既報の糖応答変異体および葉緑体-核間シグナル伝達変異体との二重変異体を作製し、光合成および窒素代謝関連遺伝子の発現解析、代謝産物解析を行い、インペルターゼによる葉緑体内のショ糖/ヘキソースバランスの変化が C/N 調節および葉緑体-核間シグナル伝達に及ぼす影響を解析するとともに、これらの制御に関わるマスターレギュレーターの探索を行う。

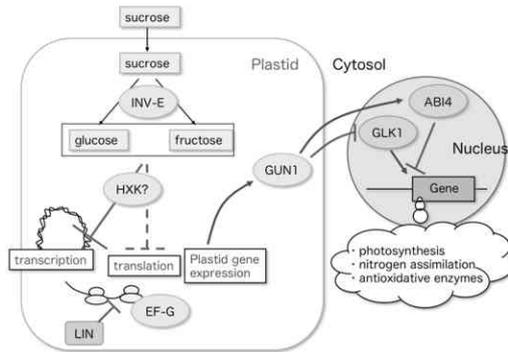


図3 INV-E を介したプラスチドシグナリング機構の予想図

## 3. 研究の方法

葉緑体ゲノム発現を介したシグナル伝達系の統合因子である GENOMES UNCOUPLED1 (GUN1) の欠損株と *sicy-192* の二重変異株を作製し、光合成および窒素同化に関する遺伝子発現に及ぼす影響をリアルタイム PCR およびマイクロアレイによって解析した。また、酵母 Two-hybrid system により INV-E との相互作用を示すタンパク質の探索を試みた。

## 4. 研究成果

ショ糖添加培地上の *sicy-192* では、プラスチドコード RNA ポリメラーゼの下流遺伝子の発現が特異的に抑制された (図4)。PGE 阻害剤処理は光合成系遺伝子群の抑制および窒素同化系遺伝子群の誘導を引き起こしたが、この現象は *gun1-101* では緩和されていた。また、ショ糖添加培地上の *sicy-192* ではプラスチドシグナリングの下流で機能する転写因子群の発現が抑制されていた。さらに、ショ糖添加培地の *sicy-192* で見られた光合成系遺伝子群の発現抑制および窒素同化系遺伝子群の誘導は、*gun1-101* との二重変異株において部分的に回復していた (図5, 6)。これらの事実は、INV-E がプラスチドシグナリングを介した C/N バランス制御に関与する

ことを如実に示していた。

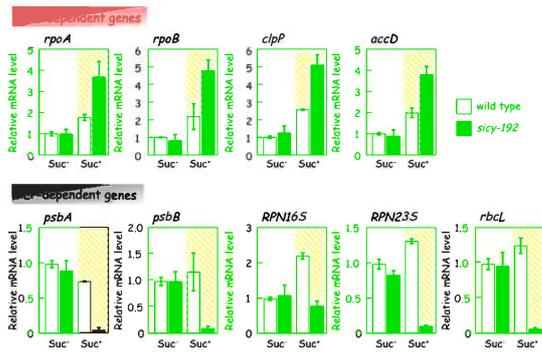


図4 NEP および PEP 依存遺伝子発現に及ぼす *sicy-192* 変異の影響

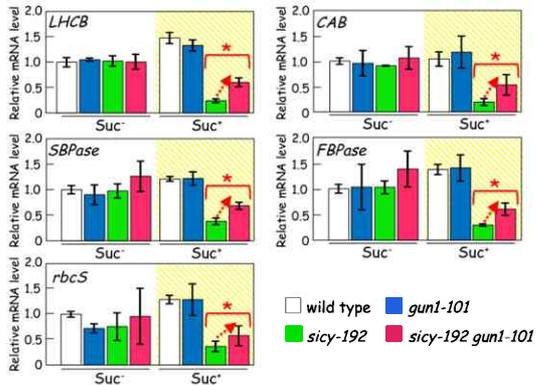


図5 *sicy-192 gun1* 変異株における光合成関連遺伝子の発現量

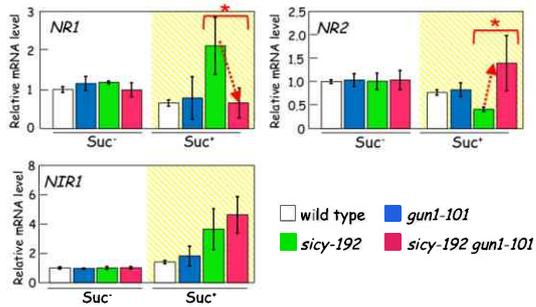


図6 *sicy-192 gun1* 変異株における窒素同化関連遺伝子の発現量

次に、*sicy-192* と二重変異株を用いてマイクロアレイ解析を行った。野生株と比較して、*sicy-192* では 1017 遺伝子の発現が 2 倍以上または 1/2 以下に変化していたが、その約 40% にあたる 420 遺伝子の発現は GUN1 欠損により有意に回復していた (図 7)。それらには、C/N 代謝に関わる遺伝子だけではなく、PGE、

テトラピロール生合成やプラスチドシグナリングに関連する遺伝子が数多く含まれた。したがって、*sicy-192* 変異は PGE を抑制し、GUN1 を介したプラスチドシグナリングを活性化することにより C/N 代謝系遺伝子を含む核コード遺伝子の発現を変化させることが明らかになった。興味深いことに、*sicy-192* のシヨ糖高感受性は *gun1-101* 欠損により促進されたことから、本変異株におけるシードリング緑化抑制は GUN1 の上流で生じていること、また GUN1 経路はプラスチド異常の回復に必要であることが示唆された (図 8)。

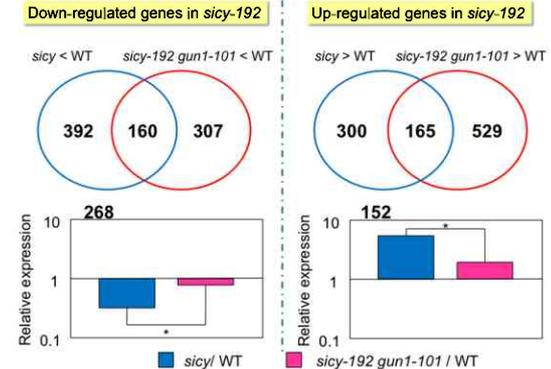


図7 遺伝子発現に及ぼす *sicy-192* および *sicy-192 gun1* 変異の影響

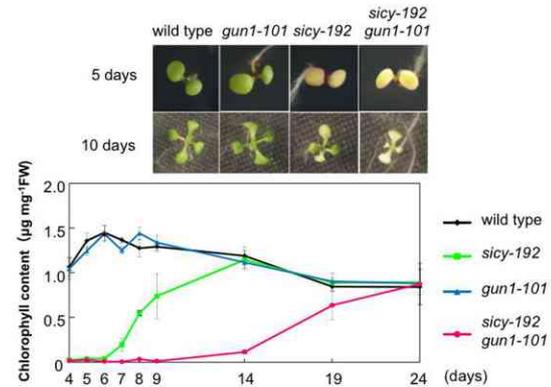


図8 *sicy-192* および *sicy-192 gun1* 変異株のシヨ糖感受性

一方、酵母 Two-hybrid system により、INV-E と相互作用を示すタンパク質の探索を行ったところ、2 つの候補遺伝子 (INV-E-Interacting Protein: IIP-1, -2) を単離した。種々の糖含有培地における発芽初期の遺伝子発現解析を行った結果、IIP-1 は INV-E の発現と相関があったが、IIP-2 はそれらとは異なる糖応答性を示した。

研究者番号：70340768

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計7件)

①宮崎 望、Daniel Padilla-Chacon、野坂亮太、田中裕之、大鳥久美、丸田隆典、吉村和也、田茂井政宏、重岡 成「プラスチックドシグナリングを介したインベルターゼの炭素・窒素バランス制御への関与」日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 03 月 24 日～2013 年 03 月 27 日、東北大学 (宮城)

② 田茂井政宏、大鳥久美、Daniel Padilla-Chacon、重岡 成「栄養シグナルによる植物ホルモン代謝制御を介した側枝形成」第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 03 月 20 日～2013 年 03 月 23 日、岡山大学 (岡山)

③ Daniel-Padilla Chacon、Kumi Otiri、Takanori Maruta、Masahiro Tamoi、Shigeru Shigeoka 「Analysis of sugar signaling pathway via plastid invertase in Arabidopsis seedlings」第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日、マリンメッセ福岡 (福岡)

④宮崎 望、Daniel Padilla-Chacon、北條真之、大鳥久美、丸田隆典、田茂井政宏、重岡 成「インベルターゼはプラスチックドシグナリングを介した炭素・窒素代謝バランス制御に関与する」日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学 (京都府)

⑤田茂井政宏「光合成炭素代謝の強化による C/N バランス制御およびホルモンを介した形態形成への影響」日本学術振興会「地球環境・食糧・資源のための植物バイオ第 160 委員会」第 4 期 第 2 回研究会 (招待講演)、2012 年 3 月 2 日、ホテルセントラザ博多 (福岡県)

⑥田茂井政宏「光合成炭素代謝の制御機構に関する研究」2011 年度日本農芸化学会 関西・中部支部合同大会 (招待講演)、2011 年 10 月 1 日、京都大学 (京都府)

⑦田茂井政宏「光合成炭素代謝の制御機構に関する研究」日本農芸化学会関西支部 第 469 回 講演会 (招待講演)、2011 年 5 月 28 日、京都府立大学 (京都府)

[その他]

ホームページ等

<http://plantmolphysiol.sakura.ne.jp/PMP/Home.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

田茂井 政宏 (TAMOI MASAHIRO)

近畿大学・農学部・准教授