

2020年2月17日

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学
国立大学法人 東北大学
国立研究開発法人 理化学研究所
国立研究開発法人 国際農林水産業研究センター
国立大学法人 岐阜大学

根の葉緑体を作るのに窒素同化鍵酵素が重要であることを発見
～イネグルタミン合成酵素アイソザイムの巧妙な使い分けを明らかに～

研究成果のポイント

1. イネの窒素同化^(注1)に欠かせない細胞質型グルタミン合成酵素(GS1)アイソザイム^(注2)のうち、根で働く2種類の働き方の違いを明らかにしました。
2. 2種類のうち OsGS1;1 は炭素・窒素代謝の恒常性制御を担っており、OsGS1;2 はアミノ酸生合成に影響を与えていました。また、OsGS1;1 の働きを抑制すると、光合成を行わない根に葉緑体が形成されることを世界で初めて明らかにしました。
3. 葉緑体形成に関係ないと考えられてきた窒素同化および炭素・窒素代謝を制御することで、根に光合成能力を付与できる可能性があることを示す研究成果です。

筑波大学生命環境系の草野都教授（理化学研究所環境資源科学研究センター客員主管研究員）、東北大学の山谷知行名誉教授、理化学研究所環境資源科学研究センターの福島敦史研究員、国際農林水産業研究センターの圓山恭之進主任研究員、岐阜大学の山本義治教授らの研究グループは、イネの窒素同化に不可欠な細胞質局在型グルタミン合成酵素 (OsGS1) のアイソザイムである OsGS1;1 が、光合成を行わない根の葉緑体形成に大きく関わることを明らかにしました。窒素は肥料の三大必須栄養素の一つで、植物の生存に不可欠な葉緑素やアミノ酸等の材料となります。植物体内に取り込まれた窒素はアンモニウムに変換された後、グルタミン合成酵素 (GS) によりアミノ酸の一種であるグルタミンを作ります。植物は細胞質局在型 GS1 をコードする遺伝子を複数個持っていますが、植物が多数の GS1 アイソザイムを持つ理由は明らかにされていませんでした。

本研究では、食糧として重要な作物であるイネの GS1 アイソザイムの中で、窒素肥料を与える時期として効果的な生育初期段階で発現する OsGS1;1 および OsGS1;2 に着目しました。それぞれの遺伝子を破壊した変異型イネを解析した結果、*Osgs1;1* 変異体の根では中心代謝に属する糖類やアミノ酸類の蓄積バランスが崩れるのに対し、*Osgs1;2* 変異体ではアミノ酸類の量のみが減少することが分かりました。さらに、*Osgs1;1* 変異体では、光合成を行わない根の部分に葉緑体が形成されることを明らかにしました。OsGS1;1 は炭素・窒素代謝の恒常性や葉緑体形成など広範な現象に関わり、*Osgs1;2* は代謝中のアミノ酸生合成制御に特に関わっていることとなります。

本研究の成果は、2020年2月6日に「Plant Physiology」で公開されました。

* 本研究は、さきがけ（研究期間：2013－2017年度）、新学術領域研究（研究期間：2010－2017年度）、科研費（研究期間：2017－2019年度）および国立大学法人運営費交付事業フードセキュリティ実現のための循環型研究拠点の構築（研究期間：2016－2020年度）により実施しました。

研究の背景

窒素は肥料の中でも植物の成長に最も重要な要素の一つで、光合成に欠かせない葉緑素やアミノ酸、タンパク質、核酸といった窒素含有化合物を生産する材料として不可欠です。窒素の有効利用は農作物の収量増大だけでなく、肥料の大量投与に伴う環境汚染の低減にもつながります。よって、これから持続的な農業を進めるためにも、植物体内に取り込まれた窒素がどのように使われるのか、その制御機構を理解することは極めて重要です。

植物が窒素化合物のアンモニウムを取り込み、アミノ酸の一つであるグルタミンへ変換する窒素同化が植物の健全な生長に重要な役割を持つことが知られています。本研究では、その仕組みを明らかにするために、この反応を担うグルタミン合成酵素(GS)に着目しました。

植物には細胞質型局在型のGS1と葉緑体局在型のGS2が存在します。どの植物においてもGS2をコードする遺伝子数は非常に少ないのに対し、GS1をコードする遺伝子の数には多様性があり、植物種によって2-16個存在します。なぜ植物は多様なGS1のアイソザイムを持つのか、またそれぞれのアイソザイムが担う窒素同化はその下流の代謝にどのような影響を与えるのか、その詳細ははまだ明らかにされていませんでした。

本研究では窒素同化を理解するための研究材料としてイネを用いました。人類の食糧として重要な作物の一つであるイネは、他の植物とは違い、毒性が強いアンモニウムを主要な窒素源として利用することができます。イネの細胞質型GS1のうち、生育の初期段階で発現する2種類のアイソザイム(*OsGS1;1*および*OsGS1;2*)が代謝に与えるインパクトの差を捉えるため、それぞれの機能欠損変異体2種類に対してメタボローム解析^(注3)、トランスクリプトーム解析^(注4)に加え、統合オミックスネットワーク解析^(注5、6)を行いました。

研究内容と成果

イネには3種類の細胞質型GS1が存在しており、そのうち2種類のアイソザイム(*OsGS1;1* および *OsGS1;2*)が根に局在していることが知られています。

これらの酵素をコードする遺伝子を破壊した変異体(*OsGS1;1* および *OsGS1;2*)の地上部の形態を観察したところ、従属栄養から独立栄養に切り替わる時期において、*OsGS1;1* 変異体のみには葉の抽出が起こらないといった生育阻害が起きました(図1)。

これらの変異体の中でどのような変化が起こっているのかを明らかにするために、ガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析計(GC-TOF-MS)を用いたメタボローム解析を行いました。その結果、*OsGS1;1* 変異体の根ではアミノ酸類および糖類の蓄積バランスが崩れていたのに対し、*OsGS1;2*変異体ではアミノ酸類の量のみが減少していました。*OsGS1;2*のアミノ酸類の減少は、イネの窒素欠乏条件下で見られる現象と類似していることから、*OsGS1;2*が担う窒素同化はグルタミン供給量の制御によるものであると推測されました。

しかし、*OsGS1;1* 変異体で見いだされた代謝異常は窒素同化だけでは説明できなかったため、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行いました。結果として、光合成を行わない根において、*OsGS1;1* 変異体では光合成関連遺伝子群の発現が野生型イネに比べて上昇していました。次に、*OsGS1;1* で起こった代謝異常がどの代謝経路によるものなのかを捉えるため、GAM(genes and metabolites)によるネットワーク解析を行いました。ショ糖やトレハロースの過剰蓄積が解糖系の一部の遺伝子発現の減少とリンクしていること、グルタミンおよびアスパラギンの過剰蓄積とTCA サイクル^(注7) 関連遺伝子群の発現減少に関連があること、葉緑体内で行われるカルビン・ベンソン^(注8) 回路の増強が起こるといった関係性を可視化することに成功しました(図2)。

また、光合成関連遺伝子群発現の上昇が何に起因するのかを知るために、透過型電子顕微鏡を用いて*OsGS1;1* 変異体の根を観察しました。その結果、*OsGS1;1* 変異体では根に光合成可能で機能的な葉緑体が見いだされましたが、*OsGS1;2*変異体では葉緑体形成は観察されませんでした(図3)。

本研究により、イネの*OsGS1;1*と*OsGS1;2*の役割が異なること、すなわち*OsGS1;1*が担う窒素同化は転写・代謝レベルでの制御を介した代謝の恒常性や葉緑体形成といった広範な現象に関わる一方で、*OsGS1;2*による窒素

同化はアミノ酸量の調節に関わるが炭素代謝には影響しないことを世界で初めて明らかにしました。

今後の展開

本研究により、イネが巧みに GS1アイソザイムの役割を使い分けることが明らかとなり、炭素代謝、窒素代謝およびそのバランスを制御できる可能性が見えてきました。光合成を行わない根に葉緑体を作らせるには、GLK2という転写因子が深く関わるということが知られています。今回発見した *Osgs1;1* 欠損変異体の根における葉緑体形成に、この転写因子は関与しないことも見いだしています。これまで知られてこなかった窒素同化に関わる葉緑体形成の仕組みを明らかにすることで、根に光合成能力を付加する新たな方法の開発につなげることができると考えられます。

参考図

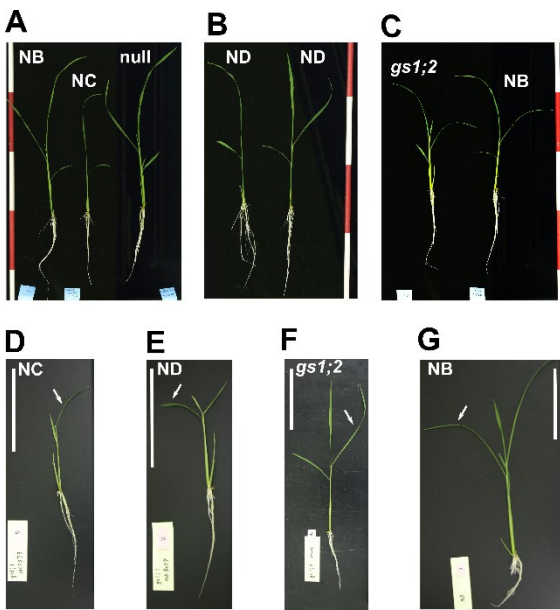


図 1. イネ生育初期段階の *Osgs1;1* および *Osgs1;2* の形態観察結果
 A, B, C: 従属栄養期の *Osgs1;1* (NC, ND) および *Osgs1;2* の形態的表現型。
 D, E, F, G: 独立栄養期のそれぞれの変異体の形態的表現型。
 NC および ND は異なる *Osg1;1* 遺伝子領域に変異が挿入された株のことを指す。NB は、野生型を示す。

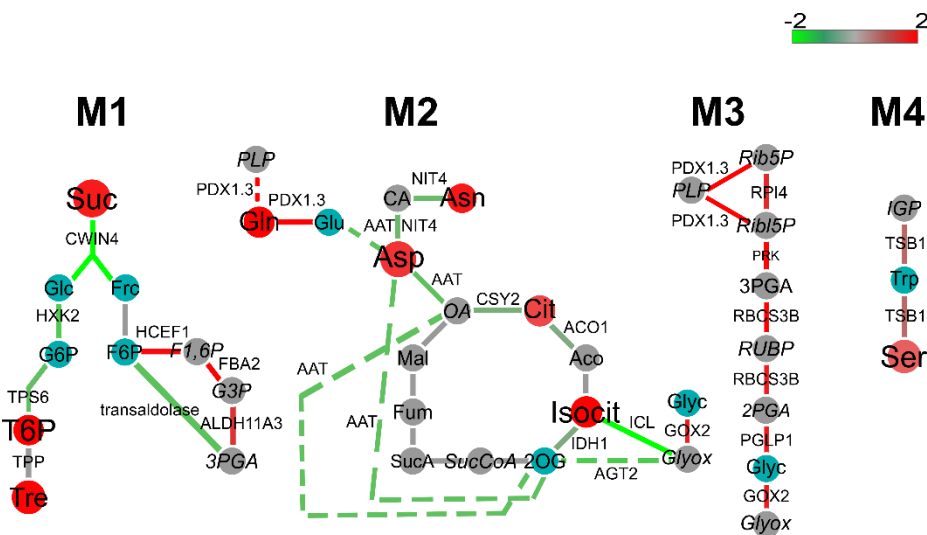


図 2. GAM (genes and metabolites) によるネットワーク解析で可視化した *Osgs1;1* の代謝異常丸は代謝物、線は転写物の変化を示す。赤は増加、緑は減少、灰色は大きな変化がないことを示す。
Osgs1;1 変異体ではサブネットワークとして解糖系 (M1)、アミノ酸—TCA 回路 (M2) およびカルビン・ベンソンサイクル (M3) に顕著な変化が起こっていることが分かった。

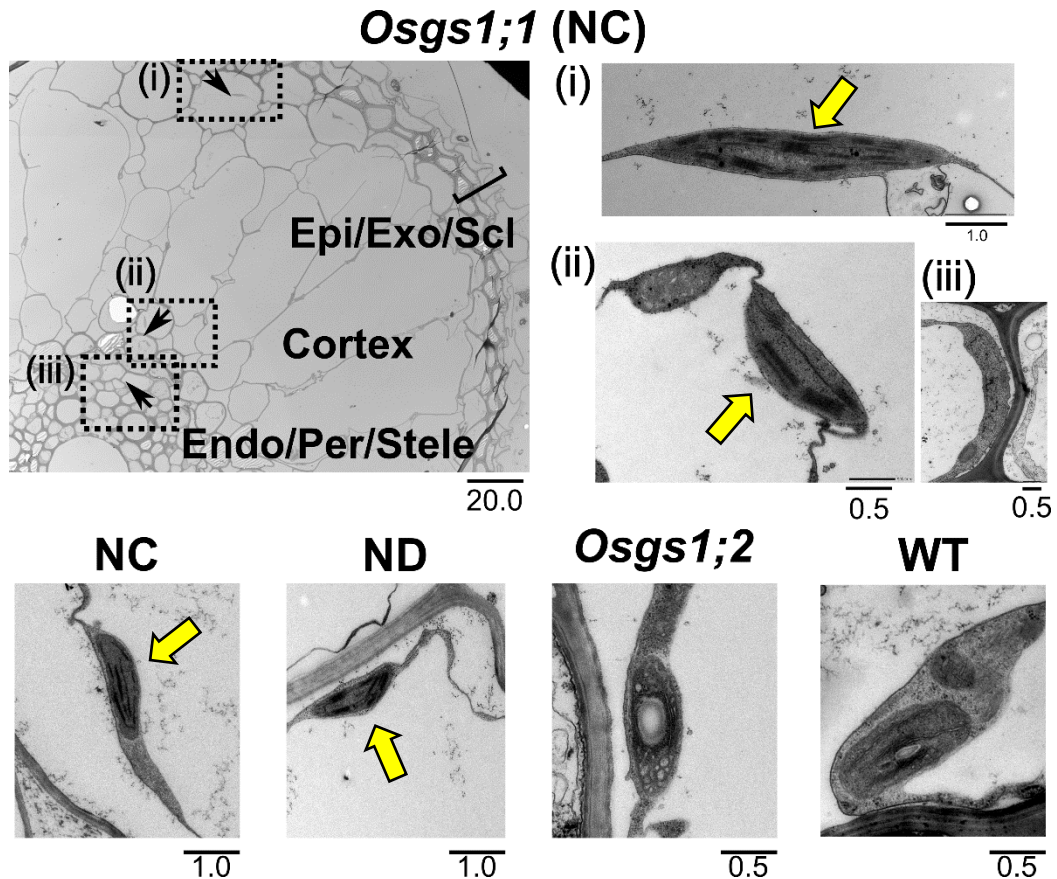


図3. 透過型電子顕微鏡による *Osgs1;1* 変異体(NC および ND)、*Osgs1;2*変異体および野生型 (WT) 根の切片観察結果。

*Osgs1;1*変異体 (NC、ND) は光合成を行わない根に葉緑体が形成されている (黄色矢印)。WT および GS1 のアイソザイムである *Osgs1;2*の根では葉緑体形成は見られなかった。

用語解説

注1) 窒素同化

硝酸イオンやアンモニウムイオンなどの無機窒素化合物を材料にアミノ酸等の有機窒素化合物を合成する反応のこと。

注2) アイソザイム

同一の生化学反応を触媒する複数の酵素群を指す。個々のアイソザイムが持つ分子構造や物理化学的性質は異なる。

注3) メタボローム

ある生物がもつ代謝物(メタボライト)全てを指す呼称。「オーム」という言葉は「総体」を示す。「メタボライト+オーム」が語源である。

注4) トランスクリプトーム

細胞中に存在するすべてのmRNA の総体のこと。トランスクリプトームは特定の条件下(環境、組織等)によって変化する。

注5) オミックス解析

総体(オーム)を科学する(-ミクス)ことを示すのがオミックスであり、生体を構成している分子を網羅的に調べる方法。

注6) ネットワーク解析

現実世界に存在する巨大で複雑な関係性を持つ対象を点と線からなるネットワークとして表現し、その構造的な特徴を探る方法。本研究の場合、点が代謝物蓄積量、線が遺伝子発現量を示している。GAM によるネットワーク解析により、データベースの代謝ネットワーク内でどのサブネットワークが強調されているかを視覚化している。

注7) TCA 回路(クエン酸回路)

tricarboxylic acid 回路の略称。ミトコンドリアのマトリクス(細胞質の液状の部分)でアセチル CoA 由来のアセチル基を二酸化炭素にまで完全分解する過程を指す。NADH や FADH₂ などのエネルギーを生み出す好氣的代謝における最も重要な生化学反応回路である。

注8) カルビン・ベンソン回路

光合成電子伝達系で合成した NADPH と ATP を利用し、二酸化炭素を還元して有機化合物を合成する反応。葉緑体内のストロマという無色の液体に局在する。

参考文献

kusano M, et al. Plant J (2011). doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04506.x.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-313X.2011.04506.x>
ohashi M, et al, Plant J (2015). doi:10.1111/tpj.12731
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tpj.12731>

掲載論文

【題名】 Cytosolic GLUTAMINE SYNTHETASE 1;1 modulates metabolism and chloroplast development in roots (イネ細胞質局在型グルタミン合成酵素 1;1 が根の代謝と葉緑体形成を調節する)

【著者名】 Miyako Kusano, Atsushi Fukushima, Mayumi Tabuchi-Kobayashi, Kazuhiro Funayama, Soichi Kojima, Kyonoshin Maruyama, Yoshiharu Y Yamamoto, Tomoko Nishizawa, Makoto Kobayashi, Mayumi Wakazaki, Mayuko Sato, Kiminori Toyooka, Kumiko Osanai-Kondo, Yoshinori Utsumi, Motoaki Seki, Chihaya Fukai, Kazuki Saito, and Tomoyuki Yamaya

【掲載誌】 Plant Physiology doi:10.1104/pp.19.01118
<https://doi.org/10.1104/pp.19.01118>

問い合わせ先

草野 都 (くさの みやこ)
筑波大学 生命環境系 教授
〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1