

生物情報科学・細胞生物学的手法から見えてきた 植物栄養応答

1. 植物が硝酸イオンに応答して遺伝子発現を制御する メカニズム

小西美穂子

東京大学生物生産工学研究センター

キーワード 硝酸応答, 硝酸シグナル, NLP転写因子, 遺伝子発現

1. 講座の概要

近年, 様々な作物においてゲノム情報や遺伝子発現情報等のデータベースが整備されてきている. 植物栄養学研究においてもそれらの情報が取り入れられ, 栄養応答制御機構の解明が飛躍的に進み, 応答の品種間差を育種に活かすための研究も行われている. また細胞生物学的手法の発展により, 細胞レベルでの応答についてもさらに詳細が明らかにされつつある. 本講座では, これら新しい手法を取り入れた植物栄養学分野研究の最近の動向を紹介すべく, 各分野でご活躍される若手研究者から6回にわたって寄稿を頂くこととした.

第1回「植物が硝酸イオンに応答して遺伝子発現を制御するメカニズム」では, 硝酸イオンのシグナル分子としての作用によりその輸送や同化に関わる遺伝子の発現が誘導される分子機構を解説して頂く. 第2回「植物の窒素リサイクルとオートファジー」では, 植物に限られた窒素で効率的に成長するために行う老化葉からの窒素リサイクルについて, イネオートファジー変異体の解析より明らかになった知見を中心に紹介して頂く. 第3回「オミクスデータが解き明かす土壌ストレス耐性システム」では, トランスクリプトーム解析, ゲノムワイド関連解析, 網羅的転写開始点情報を利用したシスエレメント予測など, 生体内分子情報の大規模データ解析が明らかにした土壌ストレスに対する植物の適応機構について解説する. 第4回「マグネシウム栄養の温故知新-欠乏応答・吸収輸送・輸送体」では他の多量要素と比較して解析が遅れていたマグネシウムの吸収機構や欠乏応答についての最新の知見を紹介して頂

く, 第5回の「作物の金属ストレス耐性機構」では, 酸性土壌で問題となるアルミニウムやマンガンの耐性機構についてイネ科の作物を中心に紹介するとともに, RNA-Seqを用いて明らかとなったソバの耐性機構についても解説する. 第6回の「次世代トランスクリプトーム解析による植物の新しい無機栄養応答機構の探索」では, 遺伝子転写産物やタンパク質の構造に多様性を与えるエキソンの組み合わせが栄養に反応して変化することやその生理的意義についての知見を解説して頂く.

本講座の連載により, 読者の方々が植物栄養学分野研究の最新動向について興味を持って頂ければ幸いである.

(講座企画者: 大津直子・高野順平・石田宏幸)

2. はじめに—高等植物の硝酸応答機構の概略—

陸上植物にとって土壌中の NO_3^- は NH_4^+ と並ぶ主要な窒素源である. 一方で, NO_3^- は植物体内で情報伝達物質としての生理活性 (硝酸シグナル活性) を示し, 遺伝子発現の変動や地上部と根の比率の変化など「硝酸応答」あるいは「硝酸シグナル応答」と呼ばれる応答を引き起こす. 硝酸シグナルに反応した遺伝子の発現誘導は1980年代から報告されていたが, モデル植物であるシロイヌナズナを用いた近年の研究により, 硝酸応答の分子メカニズムについての理解がこの数年の間に飛躍的に進んだ. この分子機構の概略は, 「不活性な状態で細胞内に存在している NIN-like protein (NLP) と呼ばれる一群の転写因子が, NO_3^- シグナルの伝達に反応して活性化され, 硝酸応答配列 (NRE) と呼ばれる配列に結合して標的遺伝子の転写を促進し, 様々な応答を引き起こす」というものである (図1). 本稿では, 植物の栄養応答の重要な一部であり, 近年理解が大きく深まった「硝酸シグナルによる遺伝子発現制御の分子機構」について解説する.

3. 硝酸シグナルによる遺伝子発現誘導

1957年にイネに NO_3^- を与えると硝酸還元酵素活性が誘導されることが報告され (Tang and Wu, 1957), また,

Mineko KONISHI: Plant responses to nutrition revealed by bioinformatics and cell biology. 1. The mechanism of nitrate-responsive gene expression in plants

113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

2016年3月29日受付・2016年4月13日受理

日本土壌肥科学雑誌 第87巻 第4号 p.260~266 (2016)

1986年にはオオムギの硝酸還元酵素遺伝子が同定されて、その mRNA レベルが NO_3^- の投与によって上昇すること示された (Cheng *et al.*, 1986). その後、 NO_3^- 投与後 15 分程度で、硝酸還元酵素遺伝子だけでなく硝酸イオン輸送体の遺伝子や亜硝酸還元酵素遺伝子など硝酸同化に関わる一連の遺伝子の発現が同調的に誘導されることが判明した。さらには、転写産物の包括的解析 (トランスクリプトーム解析) により、 NO_3^- の輸送や同化に関わる遺伝子だけでなく、転写因子やタンパク質リン酸化酵素の遺伝子、他の元素の輸送に関わる因子の遺伝子などの多様な遺伝子の発現が NO_3^- の投与によって誘導されることも明らかにされた (Obertello *et al.*, 2015; Scheible *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003). これらの研究によって、硝酸シグナルが遺伝子発現の制御を介して硝酸同化の促進にとどまらない広範囲な生理反応に関わっている可能性が示唆されてきた。このような現象はシロイヌナズナにおいて最もよく解析されているが、タバコ、オオムギ、トウモロコシ、ハウレンソウなど様々な植物種でも報告されており、硝酸シグナルによる遺伝子発現の誘導は高等植物種において広く見られる現象であると考えられる。

さらに、 NO_3^- 投与に反応した遺伝子発現誘導はシグナル分子としての NO_3^- 自体の活性に由来することが、硝酸還元酵素活性を欠く変異体の解析によって示されている。細胞に取り込まれた NO_3^- は硝酸還元酵素によって NO_2^- へと還元され、その後、 NH_4^+ に還元されてアミノ酸に

取り込まれる (図 1)。この同化経路の最初の酵素である硝酸還元酵素の活性を欠くタバコやシロイヌナズナの変異株においても、 NO_3^- 投与に反応した遺伝子発現誘導が見られること (LaBrie *et al.*, 1991; Pouteau *et al.*, 1989; Scheible *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004) から、硝酸同化後に生成するアンモニウムやアミノ酸などの同化産物ではなく、「 NO_3^- そのものが情報伝達物質である」と考えられるようになった。また、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドで前処理をした場合でも、 NO_3^- 投与による遺伝子発現の誘導が起こることから、「 NO_3^- 投与後に新たに転写因子タンパク質が合成される必要はない、すなわち、 NO_3^- 処理前に既に不活性型として存在していた転写因子タンパク質が硝酸シグナルの伝達によって活性型となって遺伝子発現を誘導する」と考えられるようになった (Gowri *et al.*, 1992; Sakakibara *et al.*, 1996)。

4. 硝酸シグナルに反応した遺伝子発現を担う DNA 配列

多くの研究によって、硝酸シグナルによる遺伝子発現誘導という概念が広く受け入れられるようになり、その分子機構の解明に向けた研究も多数なされてきた。硝酸誘導性遺伝子の近傍に存在するであろう硝酸応答を担う DNA 配列 (Nitrate-Responsive Element, NRE) を同定することは、この分子機構解明に向けた大きな手がかりとなる。1990 年代からの複数のグループによる NRE の同定の試みに関わらず、その特定には至っていなかったが、2010

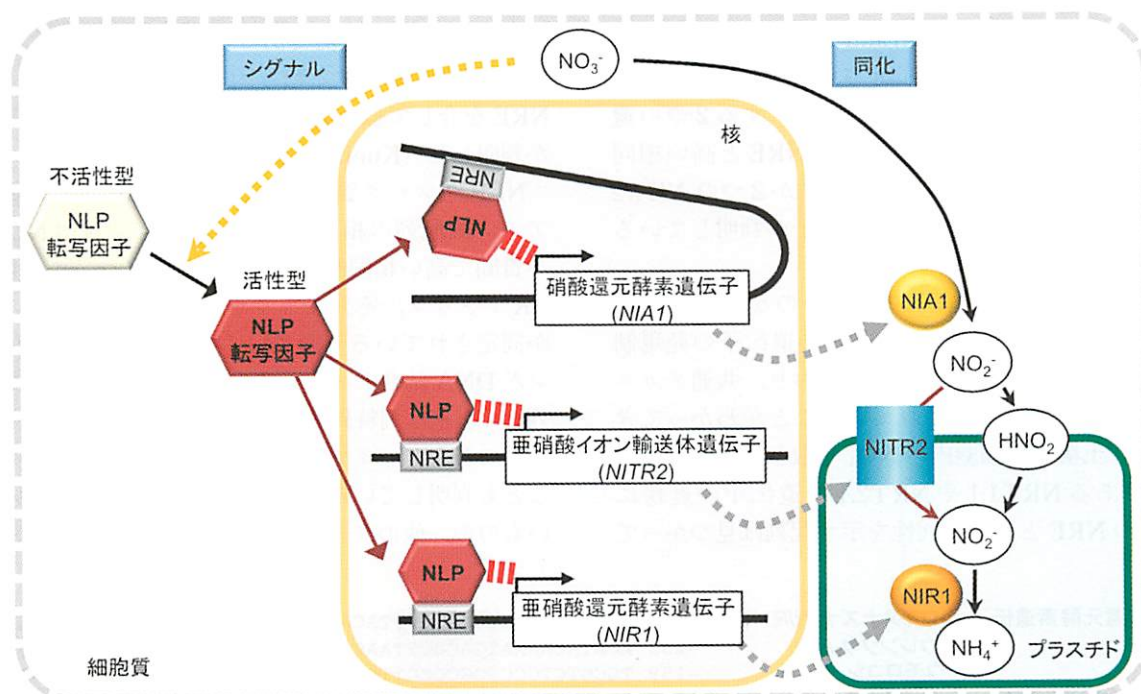


図1 高等植物における硝酸シグナル応答型の遺伝子発現のモデル図

NO_3^- がシグナルとして作用すると、NLP は活性型となり、核内で硝酸応答配列 (NRE) に結合して標的遺伝子の転写を促進する。この活性化型への移行が、細胞質で起こるか細胞核で起こるかは確定していない。植物細胞に取り込まれた NO_3^- は硝酸還元酵素によって NO_2^- へと還元されるが、その産物は pH がおよそ 7 前後である細胞質において HNO_2 と NO_2^- の二つの存在形態で存在する。前者は電荷を持たないため拡散によってプラスチド膜を通過するが、 NO_2^- は亜硝酸イオン輸送体を通じてプラスチド内へ移行する。その後、亜硝酸還元酵素によって NH_4^+ へと還元される。これらの硝酸同化に関わる遺伝子の NRE は特定されている。

年にシロイヌナズナ亜硝酸還元酵素遺伝子 (*NIR1*) のプロモーター解析によって、NRE が同定された (Konishi and Yanagisawa, 2010). その配列は、*NIR1* の主要な転写開始点から 40 bp 上流 (翻訳開始点から数えると 62 bp 上流) にある 5'-TGACCCCTT-(N₁₀)-AAGAG-3' という配列であり、5' 側に CCCTT、10 塩基のスペーサーを挟み 3' 側に AAGAG と、不完全な回文様配列となっている (図 2). この配列 4 コピーを最小プロモーター (転写開始点や TATA ボックスを含む、転写開始に最低限必要なプロモーター配列) の上流に付加した合成プロモーターでも、NO₃⁻ 処理に応答した転写の活性化が見られ、この配列だけで硝酸誘導型の転写促進に十分であることが判明している. また、シロイヌナズナだけではなく、ハウレンソウやトウモロコシなど他の植物の亜硝酸還元酵素遺伝子の転写開始点近傍にも相同性のある配列が存在しており、それが NRE として機能し得ることが実験的に確認されていることから、NRE 配列を介した硝酸誘導性遺伝子発現は高等植物に共通したものであると考えられる (Konishi and Yanagisawa, 2011b).

その後、*NIR1* プロモーター中に発見された NRE と類似した配列が他の硝酸誘導型の遺伝子の NRE として機能していることもわかってきた (図 2). 転写量を調節する DNA 配列は、「プロモーター」と呼ばれる遺伝子の 5' 側領域だけでなく、イントロンや遺伝子の 3' 側領域に存在することもあるが、シロイヌナズナの硝酸還元酵素遺伝子 *NIA1* の場合には、NRE は 3' 非翻訳領域の 1.5 kb 下流に発見された (図 1; Konishi and Yanagisawa, 2011a, 2013a, b). また、ごく最近に同定されたシロイヌナズナ亜硝酸イオン輸送体 (*NITR2*) をコードする 2 つの遺伝子のプロモーター領域には *NIR1* の NRE と高い相同性を持つ配列が存在しており、この配列が 2 つの *NITR2* 遺伝子の硝酸応答性に関わっていることが判明している (Maeda *et al.*, 2014).

このように、NO₃⁻ 同化に関わる遺伝子のうち、NO₃⁻ の還元から NO₂⁻ の還元までのプロセスの遺伝子の発現制御は一つの共通配列を介して行われており、共通メカニズムによって一括して制御されていることがわかってきた. しかし、土壌から細胞内へ NO₃⁻ を取り込む硝酸イオン輸送体である *NRT1.1* や *NRT2.1* の遺伝子の近傍には、*NIR1* の NRE と高い相同性を示す配列は見つかつて

いない. 代表的な硝酸誘導型の遺伝子である *NRT1.1* や *NRT2.1* も *NIA1* や *NIR1* などと同じ機構で制御されていることが期待されるにも関わらず、既知の NRE が見当たらないことから、今後、これらの NRE を明らかにすることが硝酸誘導型の遺伝子の同調的発現の一括制御のより正確な理解に必要であると思われる.

5. 硝酸応答を制御する転写因子 NLP

1) NLP タンパク質の構造と機能

NODULE INCEPTION (NIN) はマメ科植物の根粒形成開始に必要な因子であるが、ゲノム情報から、根粒をつくらない植物にも NIN と相同性のあるタンパク質があることがわかり、これらは NIN-like protein (NIN-like タンパク質; NLP) と命名された (Schauser *et al.*, 2005, 図 3A). NLP をコードする遺伝子はひとつの植物に複数存在しており、シロイヌナズナには 9 つ、イネには 4 つ、ミヤコグサには 4 つの NLP 遺伝子がある. Castaings ら (2009) により、シロイヌナズナの *NLP7* に T-DNA 挿入を持つ変異体は硝酸応答が減衰していることを示唆する表現型 (硝酸還元酵素遺伝子や硝酸輸送体遺伝子 *NRT2.1* の発現低下や地上部/地下部の比の変化など) を示すことが報告され、また、Wang らによって、硝酸誘導性のレポーター遺伝子の発現が低下するシロイヌナズナ突然変異体として *NLP7* の変異体が単離された (Wang *et al.*, 2009). これらから、*NLP7* が硝酸応答に関与している可能性が示唆されてきたが、NLP が直接的に硝酸応答を担う転写因子であるかは不明であった. しかし、最近、*NIR1* の NRE 配列に結合する転写因子の探索によって、NLP が NRE を介して転写促進を行っている転写因子であることが判明した (Konishi and Yanagisawa, 2013a).

NLP タンパク質は 90 kDa 前後のタンパク質であり、アミノ酸配列の相同性からアミノ末端側に NLP タンパク質間で高い相同性がある新奇ドメイン、中央に RWP-RK ドメイン、そしてカルボキシ末端側に PB1 ドメインが同定されている (図 3A). そして、RWP-RK ドメインが DNA 結合ドメインとして *NIR1* や *NIA1* の NRE 配列との塩基配列特異的な結合を担っていることやアミノ末端側の新奇ドメインが NLP の硝酸応答性に関わっていることも判明している. 一方、未だ機能解析はなされていないものの、他のタンパク質中の PB1 ドメインの機能をも

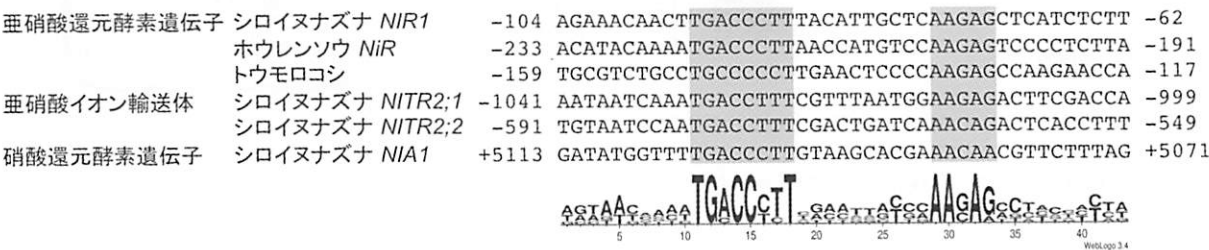


図 2 硝酸応答配列 (NRE) の塩基配列
数字は翻訳開始点からの距離を示す. また、保存されている塩基を下に示した.

とに、NLPのPB1ドメインはタンパク質—タンパク質相互作用に関わるドメインであると予測されている。

NLPを最も特徴付けるドメインはアミノ末端側の新奇ドメインであるが、このドメインの機能はキメラ転写因子を用いて解析された。すなわち、硝酸応答とは無関係な大腸菌のDNA結合タンパク質であり標的DNA配列に結合できるが転写活性化能力はもたないLexAタンパク質に、シロイヌナズナNLP6のRWP-RK DNA結合ドメインよりもアミノ末端側の領域（1から546番目までのアミノ酸配列）を付加したキメラ転写因子（図3B）の硝酸シグナル応答性が調べられた。その結果、このキメラ転写因子は植物細胞内で硝酸シグナルに応答した転写促進活性を示すが、アンモニアやグルタミンなどの他の窒素源には応答しないことから（図3C）、NLP6のアミノ末端側の領域は硝酸シグナルの受信機能と転写促進機能を担っていることが示された（Konishi and Yanagisawa, 2013a）。さらに、このアミノ末端側の領域は転写活性化ドメインと硝酸シグ

ナル受信ドメインに分けられ、アミノ末端側の新奇ドメインは硝酸シグナル受信ドメインに対応していることも明らかとなっている（図3A、小西ら、未発表データ）。また、調べた限り、シロイヌナズナのNLPは硝酸シグナル応答型の転写促進因子であったことから（小西ら、未発表データ）、少なくともシロイヌナズナのNLPの大部分は硝酸応答に関わる転写因子であると推察されている。

2) 植物体における生理的役割

NLPは遺伝子ファミリーを形成していることから、多くの遺伝子ファミリーの例に漏れず、そのメンバーの役割は重複していると予想される。実際、*nlp7*変異体では硝酸応答が減衰している表現型を示すと報告されているが、完全になくなるわけではない。そこで、SUPERMANという転写抑制因子の転写抑制ドメインを転写活性化因子に付加することで、転写活性化因子を転写抑制因子に変換する方法（キメラリプレッサー法；Hiratsu *et al.*, 2003；Hiratsu *et al.*, 2002）によって、植物体におけるNLP転

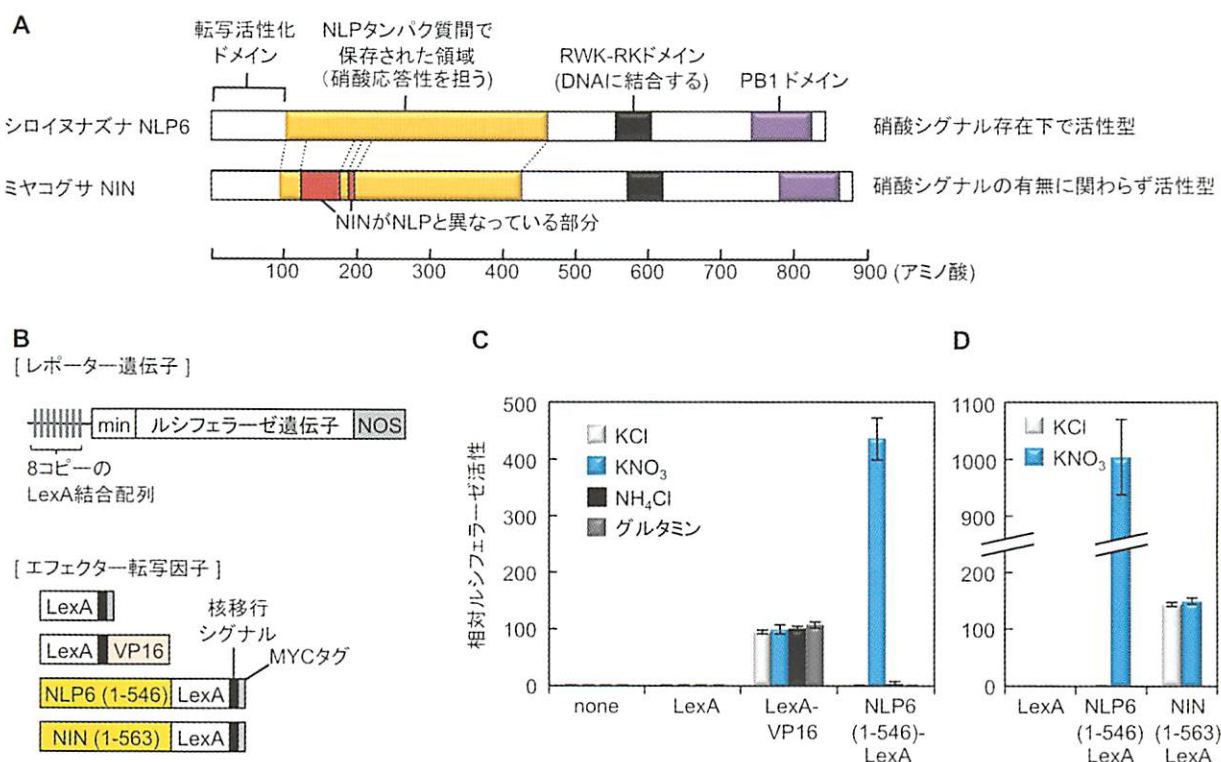


図3 NLPとNINの構造と硝酸応答性

(A) シロイヌナズナNLP6とミヤコグサNINのドメイン構造。

(B) NLPとNINの硝酸応答性解析実験に用いられたプラスミド。NLP6のアミノ末端側領域（1番目から546番目のアミノ酸残基までの領域）とNINのアミノ末端側領域（1番目から563番目のアミノ酸残基の領域）とLexA DNA結合タンパク質との融合タンパク質をエフェクター転写因子とした。LexAは原核生物の転写因子であるため、真核細胞である植物細胞内で細胞核に局在できるように核移行シグナルが付加されており、ウイルスの遺伝子由来の転写活性化ドメインであるVP16をLexAに付加したLexA-VP16融合タンパク質を転写活性化のポジティブコントロールとして用いた。シロイヌナズナの葉肉プロトプラストにLexA結合配列を持つレポーター遺伝子のプラスミドとエフェクター転写因子を35Sプロモーターの制御下で発現させるためのプラスミドを導入した後、KCl、KNO₃、NH₄Clまたはグルタミンを含む培養液を用いて培養し、レポーター活性を測定した。minはTATAボックスを含む最小プロモーターを、NOSはノバリン合成酵素遺伝子由来の転写終結配列を示す。

(C) シロイヌナズナNLP6の硝酸応答性。

(D) ミヤコグサNINの硝酸非応答性。NINのアミノ末端側1から563番目のアミノ酸配列はNO₃の有無に関わらず転写活性化能を持つ。

写因子群の役割が解析された (図4A). 転写抑制ドメインを付加した NLP6 を過剰発現させると内在性の NLP と競合するため, 本来ならば活性化されるはずの遺伝子の発現が抑制されることが期待される. 実際, トランスクリプトーム解析により, NLP6 のキメラリプレッサーを過剰発現しているシロイヌナズナでは, 硝酸還元酵素遺伝子や亜硝酸還元酵素遺伝子を含む硝酸シグナルにより誘導される遺伝子の多くの発現レベルが低下しており, NLP が硝酸応答の鍵転写因子であることが判明した (Konishi and Yanagisawa, 2013a; 2014). さらに, Marchive らはクロマチン免疫沈降法によって植物細胞内で NLP7 が結合しているゲノム領域を網羅的に解析し, NO_3^- 添加時に NLP7 が多くの硝酸誘導性遺伝子の近傍に結合していることを示しており (Marchive *et al.*, 2013), このことから NLP 転写因子は硝酸シグナルに応答した遺伝子の発現全体を直接的に司っていると見られている.

NLP6 キメラリプレッサー株では硝酸還元酵素遺伝子や亜硝酸還元酵素遺伝子など NO_3^- の同化に関わる遺伝子の発現が抑制されており, このことと一致して, NO_3^- を窒素源として利用できない硝酸還元酵素変異体と同様に, NO_3^- のみを窒素源としたときの NLP6 キメラリプレッサー株の生育は野生型株に比して低下している (図4B; Konishi and Yanagisawa, 2013a). しかし, 硝酸還元酵素変異体の生育は NO_3^- と NH_4^+ の両方を窒素源とした場合には回復するのに対して, このキメラリプレッサー株の生育は回復せず (図4B), 硝酸同化経路以外にも NLP によって制御されている生理反応が正常な植物成長に重要であると推測されている (Konishi and Yanagisawa, 2013a). 実際, 硝酸シグナルによって発現が誘導される遺伝子には硝酸同化経路以外の遺伝子も多数含まれており (Scheible *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003), それらの発現が NLP6 キメラリプレッサー株では抑制されていた. このような NLP6 キメラリプレッサー株の表現型は, 植物における硝酸シグナルの役割を解明するための手がかりとなることが期待される.

6. 硝酸応答を担う NLP と根粒形成に関わる NIN の進化的な関係

少し本題から外れるが, NIN と NLP の関係について触れたい. NIN はマメ科植物に特異的な根粒形成に関わる転写因子である. 根粒菌の共生によって生じる根粒内で根粒菌が大気中の窒素ガスを固定して, NH_4^+ を宿主植物へ供給する. 窒素の利用に関与するという視点では NIN と NLP の役割には類似性がある. しかし, 根粒形成は土壌中の窒素栄養が十分なときには起こりにくいとされており, NO_3^- を高濃度で与えた場合には根粒の数が減少することが報告されている (Barbulova *et al.*, 2007). そこで, 硝酸シグナルによって活性化する転写活性化因子である NLP と NIN の分子的性質は異なっているのではないかと考えられ, そのような視点から NIN の分子的性質が調べられた (Suzuki *et al.*, 2013). その結果, NIN は NRE に結合して転写を促進することができるが, 硝酸シグナルの伝達がなくとも転写促進活性を示すこと, すなわち, NIN と NLP は DNA 結合ドメインの認識配列の特異性や転写活性化因子であることは共通しているが硝酸応答性に違いがあることが明らかにされている (図3D). NIN では, NLP の硝酸シグナル受信ドメインに大きくアミノ酸配列が異なっている部分があり (図3A), これによって NIN は硝酸応答性を失っていると考えられる. ミヤコグサの NIN に限らず, タルウマゴヤシやエンドウの NIN においても同じ位置にアミノ酸配列の違いが見られることから, マメ科植物の祖先種において, 硝酸シグナルの伝達がなくとも転写促進活性を示せる変異型 NLP が生じ, これが進化の過程において NIN として根粒形成に利用されるようになったのではないかと推測される (Suzuki *et al.*, 2013).

7. NLP の活性化と細胞核への局在

NLP のアミノ末端側の保存領域が硝酸シグナルを受信して転写を促進する分子メカニズムは今後の課題である

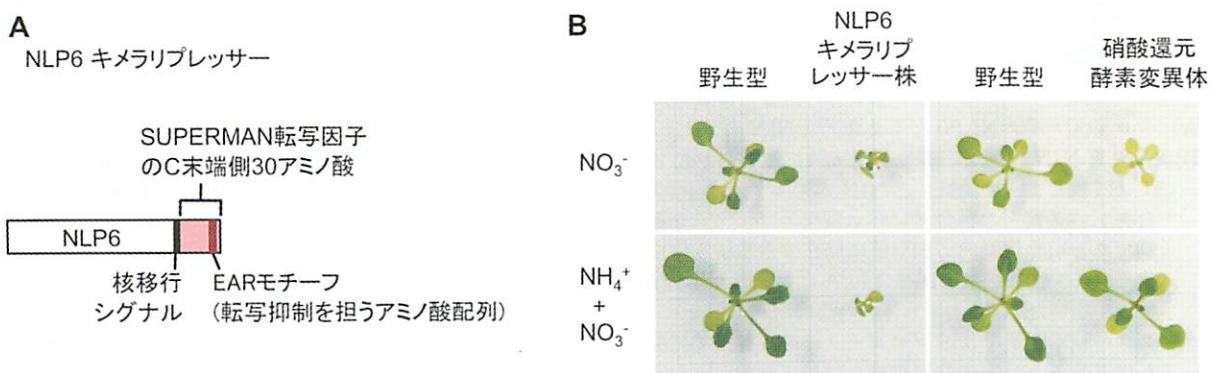


図4 NLP 転写因子の機能を抑制したシロイヌナズナ

(A) NLP 転写因子の機能抑制のために用いた NLP6 キメラリプレッサーの構造

(B) 15mM NO_3^- (15mM KNO_3 または 5mM KNO_3 と 5mM NH_4NO_3) を含む寒天培地で 11 日間栽培した NLP 転写因子の機能抑制株 (NLP6 キメラリプレッサー株).

が、これについて重要な手掛かりを与える興味深い研究が報告されている。NLPは転写因子であるので、それが働く場は細胞核内である。したがって、細胞質で合成されたNLPタンパク質は細胞核へ移行する必要がある。細胞質と細胞核間の物質輸送は核膜にある核膜孔を通じて行われるが、一般に40 kDaより小さいタンパク質は自由に核膜孔を通過し細胞質と核の両方に拡散する一方で、40 kDaより大きいタンパク質の核膜孔通過は能動的な輸送を必要とするとされている。NLPは90 kDa程度の大きさのため、NLPの核膜孔の通過は能動的な輸送を必要とする制御されたプロセスであると考えられた。Marchiseら(2013)は、NLP7を緑色蛍光蛋白質(GFP)と融合させたNLP7-GFPタンパク質の細胞内の局在を観察し、 NO_3^- を与えない場合にはNLP7-GFPは細胞質に存在し、 NO_3^- 添加により速やかに細胞核に蓄積することを見出した。さらに、NLPのアミノ末端側の保存された領域に、細胞核から細胞質へ排出するためのシグナルと予想される配列があることから、核外排出阻害剤を用いた実験を行い、 NO_3^- を与えていない状態でも核外への排出を阻害するとNLP7-GFPは細胞核に蓄積することを示した。これにより、「NLP7は NO_3^- が無い状態でも常に核内へ移行しているが、同時に積極的に細胞質へ排出されている。硝酸シグナルが伝達されると細胞核から細胞質へのNLP7の排出が抑制されてNLP7は細胞核に蓄積する」という仮説が提唱された(図5)。今後は、この核外輸送の制御機構の解明が、硝酸シグナルによるNLP活性化の作用機作を理解するための一つの鍵となると思われる。

8. NO_3^- 輸送体NRT1.1と Ca^{2+} シグナリング

NLP活性化に先立って、受容体による NO_3^- の感知が起こるはずであるが、現時点では、硝酸シグナル受容体は確定していない。これまでに、硝酸シグナルの受容体として提案されたものは、シロイヌナズナの NO_3^- 輸送体NRT1.1(別名CHL1, NPF6.3)のみである(Ho *et al.*, 2009)。NRT1.1の欠損株である*chl1-5*変異体で

は、 NO_3^- 吸収能が低下するとともに、硝酸誘導性遺伝子NRT2.1の発現誘導も低下するが、NRT1.1の点突然変異体である*chl1-9*変異体では NO_3^- 吸収能は低下しているもののNRT2.1の発現誘導は正常であった。すなわち、*chl1-9*変異体では硝酸シグナル応答が NO_3^- の取り込みから独立して起きていると考えられ、NRT1.1が硝酸シグナル受容体としても働くのではないかという提案がなされた。しかしながら、最近の研究ではNRT2.1以外の複数の硝酸誘導性遺伝子の発現誘導が、*chl1-9*変異体でも*chl1-5*変異体と同程度まで低下していることが報告されており(Alvarez *et al.*, 2014; Riveras *et al.*, 2015)、NRT1.1が硝酸シグナル受容体であるという仮説については再検討が必要であると思われる。

一方で、最近、別の方向から、NRT1.1が NO_3^- による遺伝子発現誘導に関与していることが示された。 Ca^{2+} は細胞内の様々なシグナル伝達経路のセカンドメッセンジャーとして働く物質であり、硝酸シグナルによる遺伝子発現の誘導においても、 Ca^{2+} が必要であるとされていた(Sakakibara *et al.*, 1996)。最近、Riverasら(2015)は、 NO_3^- 添加により細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇すること、また、NRT1.1の変異体ではそれが起こらないことを示しており、 NO_3^- 添加後、NRT1.1の働きによって細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇し、 Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして働くことが硝酸シグナルによる遺伝子発現誘導に必要なプロセスであることが示唆された。NRT1.1、 Ca^{2+} シグナリングそしてNLPが分子レベルでどのようにつながっているのか、今後の進展が期待される。

9. おわりに

高等植物に限らず、バクテリア、藍藻、真菌、藻類など、 NO_3^- を利用する生物では NO_3^- に反応した遺伝子発現が見られるが、これらの生物でそれぞれに異なるメカニズムが硝酸応答を制御している。最近、高等植物では NO_3^- に反応した遺伝子発現誘導を担う転写因子がNLPであることが判明して、バクテリア、真菌や藍藻のものと異なる分子機構が硝酸シグナル応答型の遺伝子発現誘導を制御していることが明白となった。今後、硝酸シグナル受容体からNLP活性誘導の分子メカニズムが明らかにされ、硝酸シグナル応答の分子的全容が明らかになることが期待される。また、NLPとその標的遺伝子を手がかりとして、硝酸シグナルが植物に与える影響がより深く理解されるようになることも期待される。

謝辞：本講座に執筆する機会を与えて頂きました企画者の大津先生、高野先生、石田先生に深く感謝致します。また、本稿を執筆にあたり東京大学柳澤修一准教授にはご助言を頂きました。深く謝意を表します。

文献

Alvarez, J. M., Riveras, E., Vidal, E. A., Gras, D. E., Contreras-López, O., Tamayo, K. P., Aceituno, F., Gómez, I., Ruffel, S.,

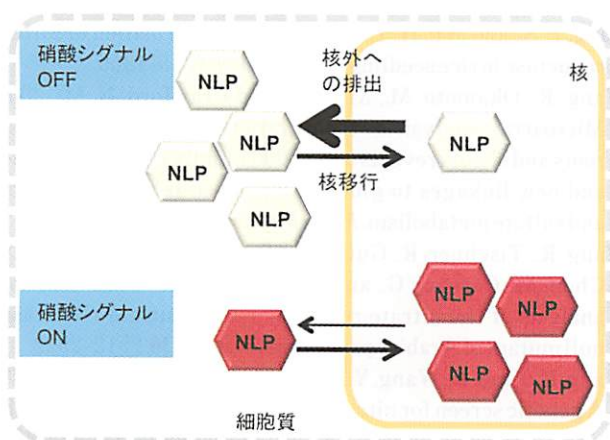


図5 硝酸シグナルによって引き起こされるNLPの細胞核への蓄積のモデル図

- Lejay, L., Jordana, X., and Gutiérrez, R. A. 2014. Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J.* **80**, 1-13.
- Barbulova, A., Rogato, A., D'Apuzzo, E., Omrane, S., and Chiurazzi, M. 2007. Differential effects of combined N sources on early steps of the Nod factor-dependent transduction pathway in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 994-1003.
- Castangs, L., Camargo, A., Pocholle, D., Gaudon, V., Texier, Y., Boutet-Mercey, S., Taconnat, L., Renou, J. P., Daniel-Vedele, F., Fernandez, E., Meyer, C., and Krapp, A. 2009. The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J.* **57**, 426-435.
- Cheng, C. L., Dewdney, J., Kleinhofs, A., and Goodman, H. M. 1986. Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6825-6828.
- Gowri, G., Kenis, J. D., Ingemarsson, B., Redinbaugh, M. G., and Campbell, W. H. 1992. Nitrate reductase transcript is expressed in the primary response of maize to environmental nitrate. *Plant Mol. Biol.* **18**, 55-64.
- Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T., and Ohme-Takagi, M. 2003. Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**, 733-739.
- Hiratsu, K., Ohta, M., Matsui, K., and Ohme-Takagi, M. 2002. The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS Lett.* **514**, 351-354.
- Ho, C. H., Lin, S. H., Hu, H. C., and Tsay, Y. F. 2009. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, **138**, 1184-1194.
- Konishi, M., and Yanagisawa, S. 2010. Identification of a nitrate-responsive cis-element in the *Arabidopsis NRI1* promoter defines the presence of multiple cis-regulatory elements for nitrogen response. *Plant J.* **63**, 269-282.
- Konishi, M., and Yanagisawa, S. 2011a. The regulatory region controlling the nitrate-responsive expression of a nitrate reductase gene, *NIA1*, in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **52**, 824-836.
- Konishi, M., and Yanagisawa, S. 2011b. Roles of the transcriptional regulation mediated by the nitrate-responsive cis-element in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**, 708-713.
- Konishi, M., and Yanagisawa, S. 2013a. *Arabidopsis* NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nat. Commun.* **4**, 1617.
- Konishi, M., and Yanagisawa, S. 2013b. An NLP-binding site in the 3' flanking region of the nitrate reductase gene confers nitrate-inducible expression in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Soil Sci. Plant Nutr.* **59**, 612-620.
- Konishi, M., and Yanagisawa, S. 2014. Emergence of a new step towards understanding the molecular mechanisms underlying nitrate-regulated gene expression. *J. Exp. Bot.* **65**, 5589-5600.
- LaBrie, S. T., Wilkinson, J. Q., and Crawford, N. M. 1991. Effect of chlorate treatment on nitrate reductase and nitrite reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **97**, 873-879.
- Maeda, S., Konishi, M., Yanagisawa, S., and Omata, T. 2014. Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **55**, 1311-1324.
- Marchive, C., Roudier, F., Castangs, L., Brehaut, V., Blondet, E., Colot, V., Meyer, C., and Krapp, A. 2013. Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nat. Commun.* **4**, 1713.
- Obertello, M., Shrivastava, S., Katari, M. S., and Coruzzi, G. M. 2015. Cross-species network analysis uncovers conserved nitrogen-regulated network modules in rice. *Plant Physiol.* **168**, 1830-1843.
- Pouteau, S., Cherel, I., Vaucheret, H., and Caboche, M. 1989. Nitrate reductase mRNA regulation in *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase-deficient mutants. *Plant Cell*, **1**, 1111-1120.
- Riveras, E., Alvarez, J. M., Vidal, E. A., Oses, C., Vega, A., and Gutiérrez, R. A. 2015. The Calcium ion is a second messenger in the nitrate signaling pathway of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **169**, 1397-1404.
- Sakakibara, H., Takei, K., and Sugiyama, T. 1996. Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize uroporphyrinogen III methyltransferase, an enzyme involved in the synthesis of siroheme, which is prosthetic group of nitrite reductase. *Plant J.* **10**, 883-892.
- Schauser, L., Wieloch, W., and Stougaard, J. 2005. Evolution of NIN-like proteins in *Arabidopsis*, rice, and *Lotus japonicus*. *J. Mol. Evol.* **60**, 229-237.
- Scheible, W. R., Gonzalez-Fontes, A., Lauerer, M., Muller-Rober, B., Caboche, M., and Stitt, M. 1997. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell*, **9**, 783-798.
- Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K., and Stitt, M. 2004. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol.* **136**, 2483-2499.
- Suzuki, W., Konishi, M., and Yanagisawa, S. 2013. The evolutionary events necessary for the emergence of symbiotic nitrogen fixation in legumes may involve a loss of nitrate responsiveness of the NIN transcription factor. *Plant Signal. Behav.* **8**, e25975.
- Tang, P. S., and Wu, H. Y. 1957. Adaptive formation of nitrate reductase in rice seedlings. *Nature*, **179**, 1355-1356.
- Wang, R., Okamoto, M., Xing, X., and Crawford, N. M. 2003. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol.* **132**, 556-567.
- Wang, R., Tischner, R., Gutierrez, R. A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Coruzzi, G., and Crawford, N. M. 2004. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **136**, 2512-2522.
- Wang, R., Xing, X., Wang, Y., Tran, A., and Crawford, N. M. 2009. A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1. *Plant Physiol.* **151**, 472-478.