

## 植物の窒素栄養吸収制御の巧みな仕組み

大久保 祐里, 松林 嘉克

### 1. はじめに

植物にとって窒素は最も要求量の多い栄養素であり、その欠乏は作物の収量や品質に大きく影響する。しかし、自然界における土壌中の窒素源の分布は時空間的に均一ではなく、成長段階に応じて植物が必要とする窒素量も変動する。そこで、植物は変動する外的な窒素環境と内的な窒素需要に適応するため、根から効率よく巧妙な硝酸イオンを吸収するための仕組みを進化させてきた。本稿では、根から葉、そしてあるいは葉から根へと長距離移行して窒素吸収を制御するペプチド群に関わる最新の研究を紹介する。

### 2. 不均一に分布する硝酸イオンを効率よく吸収する仕組み

植物は、土壌中から窒素源として主に硝酸イオンを吸収している。しかしながら、土壌中における硝酸イオンの分布は他の生物種との取り合いや雨水による流出によって均一ではなく、硝酸イオンにありつける根とそうでない根に分かれる。そこで植物は、一部の根において土壌中の硝酸イオン欠乏を感知すると、周辺に十分な硝酸イオンが存在する別の根において吸収量を増やし、個体全体として硝酸イオン量を最適に保っている。この仕組みは全身的窒素要求シグナル伝達と呼ばれており、多くの植物窒素栄養分野の研究たちの興味を集めてきた<sup>1)</sup>。硝酸イオン欠乏を感知した根から離れた根へ欠乏情報を伝えるには、地上部(葉)が必要であることがわかって以来、根から葉、そして再び根へ向かう長距離移行因子の存在が予想されていたものの、その分子メカニズムは長年にわたって未解明のまま

だった。しかし近年、筆者らのグループが発見したペプチドホルモンのCEPと下流二次シグナルCEPDが主要なシグナル分子であることが判明し、メカニズムの理解が大きく進んだ。

### 3. ペプチドホルモンCEPと下流2次シグナルCEPD

CEP (C-terminally encoded peptide) は、既知のペプチドホルモンの構造的な特徴を基に、シロイヌナズナのゲノム情報を使って発見されたペプチドファミリーである<sup>2)</sup>。発見当初は遺伝子重複によって機能解明が難航していたものの、受容体CEPR1の同定とその欠損株の解析から、全身的な窒素要求シグナル伝達に関与していることが明らかになった<sup>3)</sup>。その巧妙なシグナル伝達機構は以下のとおりである。土壌中の硝酸イオン欠乏を感知した根でCEPが産生され、蒸散流によって道管を通して地上部まで長距離輸送される。葉では気孔は裏側に多いので、葉の道管から裏側方向ににじみ出たCEPは、蒸散作用で濃縮されながら道管のすぐ下(裏側方向)にある師管に到達する。そして葉の師管で発現するCEP受容体にCEPが認識されると、何らかの別のシグナルが誘導され、硝酸イオン欠乏部位から離れた根で硝酸イオントランスポーターの発現を誘導し、硝酸イオンの吸収を相補的に増大させるという仕組みである。このCEPを介した全身的な窒素要求シグナル伝達において、葉のCEP受容体下流で誘導され根へ向かう未知の二次シグナルに興味を持たれたため、次に筆者らはその探索を行った。

CEP受容体下流の二次シグナルは葉の師管でCEP依存的に産生すると考え、根からCEPを吸わせた植物から葉の維管束組織だけを機械的に単離して、CEP処理によって発現が誘導される遺伝子を網羅的に探索した。そして候補遺伝子の中から、過剰発現させたときに根において硝酸トランスポーターの発現を上昇させるものを探した結果、二つの遺伝子を見いだした。これらの遺伝子は約100アミノ酸からなるポリペプチドをコードしており、配列は互いによく似ていた。解析の結果、この2遺伝子はCEP経路の下流で硝酸トランスポーターの発現を特異的に制御していたことから、*CEP Downstream* (*CEPD1*および*CEPD2*)と命名した<sup>4)</sup>。CEPD欠損株では、一部の根を窒素欠乏状態に置いても他の根で相補的な硝酸イオン吸収が行われないこ

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 (〒464-8602 名古屋市中千種区不老町)

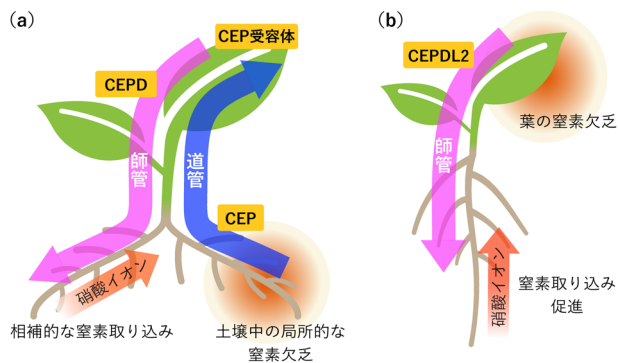
An ingenious mechanism of regulating nitrogen acquisition in plants.

Yuri Ohkubo and Yoshikatsu Matsubayashi (Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan)

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930400

© 2021 公益社団法人日本生化学会



**図1** CEP-CEP受容体-CEPD経路とCEPDL2経路のモデル  
(a) 土壤中の窒素欠乏を感知した根でCEPが産生され、道管を通して地上部へと運ばれCEP受容体に認識される。そしてCEP受容体下流で二次シグナルCEPDが産生され、師管を通して根へ移行する。CEPDは周囲に硝酸イオンが存在する根において硝酸イオン取り込みを促進する。(b) 葉の窒素欠乏によってCEPDL2が産生され、師管を通して根へ移行し硝酸イオン取り込みを促進する。

とから、CEPDは全身的な窒素要求シグナル伝達に必須であることが示された。

CEPD遺伝子の発現パターンを解析すると、葉の維管束の師管側でのみ発現しており、根では検出されなかった。しかし、面白いことにCEPDペプチドは根の師管で明瞭に検出された。この結果はCEPDが葉で産生され、師管を通して根へ長距離移行して情報を伝えるホルモンであることを示している。また、別の実験から、CEPDペプチドはすべての根に等しく移行するが、周囲に硝酸イオンが存在する根においてのみ硝酸トランスポーターの発現を誘導することが明らかとなった。これは、植物の根が、CEP-CEPR1-CEPD経路を介して長距離伝達された窒素欠乏情報と土壤中の硝酸イオンの有無を照らし合わせて、硝酸トランスポーターの発現を上昇させるか否かを判断していることを示している (図1a)。

#### 4. 葉の窒素欠乏を根へ伝達するCEPDL2

CEP-CEPR1-CEPD経路は、土壌からの不均一な窒素供給に応じてそれぞれの根における吸収量を適切に調節するシステムである。しかし、植物側も成長段階に応じて窒素要求量が増加していく。つまり、地上部(葉)が成長する時期には窒素要求量が増加するため、根からより多くの硝酸イオンを吸収する必要がある。実は先ほど紹介したCEPDのホモログには、地上部の窒素要求量を根に伝えて硝酸イオン吸収を促進させるホルモンも存在することがわかってきた<sup>5)</sup>。

シロイヌナズナにはCEPDと構造が似たポリペプチドが21個あるが、これらの詳細な機能は一部を除いて不明な

ままであった<sup>6)</sup>。筆者らはこのファミリーを解析するなかで、そのうちの一つにCEPDよりも強い硝酸イオン吸収促進活性があることを見いだした。このポリペプチドの配列はCEPD1/2と80%以上一致していたことから、CEPD-like 2 (CEPDL2) と命名した。CEPDL2遺伝子は葉の葉脈の師管で発現しており、葉が窒素欠乏になると急速に発現量が増加する一方、根から与えたCEPペプチドには応答しなかった。また、CEPDL2ペプチドはCEPD同様に葉から根へ長距離移行することも確かめられた。さらに、CEPDL2欠損株では、地上部の窒素需要が高まる生育後期において野生株よりも葉が小さくなり、正常に生育できないことが明らかとなった。以上から、CEP-CEPR1-CEPD経路は根の局所的な窒素欠乏に応じて硝酸イオン吸収活性を制御し、CEPDL2は地上部の窒素要求量に応じて吸収活性を制御する経路であると結論づけた (図1b)。このCEP-CEPR1-CEPD経路とCEPDL2経路の協調的な働きによって、植物は環境変動下における硝酸イオンの取り込み効率を厳密に調整しているのである。

#### 5. CEPD/CEPDL2下流ホスファターゼCEPH

硝酸イオン吸収活性は、硝酸トランスポーターの転写活性化と翻訳後制御の両方で制御されることがわかっている<sup>7,8)</sup>。さらにここ数年の間に、植物の主要な硝酸トランスポーターであるNRT2.1には複数のリン酸化部位があり、そのリン酸化が活性や局在に影響することが相次いで報告されている<sup>9-12)</sup>。この制御を担う酵素に関心が高まるなか、筆者らはCEPD/CEPDL2下流で誘導されるホスファターゼがNRT2.1を活性化していることを突き止めた。

このホスファターゼは、CEPD/CEPDL2過剰発現株の根で発現が上昇した因子群の中において、上昇率が最上位の分子として見いだされた。protein phosphatase 2C (PP2C) のサブファミリーEに属しているが<sup>13)</sup>、このサブファミリーに含まれる12個のホスファターゼのうち、CEPD/CEPDL2によって発現が誘導されるのはこの一つだけである。このホスファターゼは根の外皮や皮層の細胞質で主に発現し、窒素欠乏状態に陥るとCEPD/CEPDL2依存的に発現量が増加することから、CEPD-induced phosphatase (CEPH) と命名して解析を進めた<sup>14)</sup>。CEPH欠損株の表現型を観察したところ、野生株よりも地上部サイズの減少や側根が長くなるといった窒素欠乏特有の症状がみられた。さらに地上部や根における硝酸含有量が低下しており、CEPHが硝酸取り込みに関与している可能性が示唆された。そこで、CEPH欠損株における硝酸取り込み活性を測定したところ、高親和性トランスポーターの活性が野生株より約40%低下していることが判明した。またCEPHを一過的に過剰発現させると、欠損株とは反対に活性が約

25%増加した。いずれの場合も高親和性トランスポーターの転写量は変動していなかったことから、CEPHは高親和性の硝酸取り込みを翻訳後レベルで活性化していることが示唆された。

## 6. CEPHは高親和性硝酸トランスポーター NRT2.1を活性化する

CEPHがホスファターゼであることから、筆者らは基質タンパク質が硝酸取り込みに関わっており、CEPH欠損株では基質のリン酸化レベルが増加していると予想した。そこでCEPH欠損株でリン酸化レベルが変動したタンパク質を探索するため、 $^{15}\text{N}$ 代謝標識を用いた定量比較リン酸化プロテオミクスを実施した<sup>15)</sup>。まず、野生株とCEPH欠損株を $^{14}\text{N}$ または $^{15}\text{N}$ を含む培地で培養して代謝標識を行い、 $^{14}\text{N}$ 野生株/ $^{15}\text{N}$  CEPH欠損株、または $^{15}\text{N}$ 野生株/ $^{14}\text{N}$  CEPH欠損株というペアで根を等量で混ぜて回収した。そして以降のタンパク質抽出から酵素消化、リン酸化ペプチド濃縮、nano LC-MS/MS解析までを同時に行った。試料調製の初期段階においてサンプルを混合することができ、各過程のブレを最小限に抑えられるのが $^{15}\text{N}$ 代謝標識法の利点である。 $^{14}\text{N}$ 標識ペプチドと $^{15}\text{N}$ 標識ペプチドはカラムから同じ時間に溶出されるため、野生株由来とCEPH欠損株由来のピーク強度からリン酸化レベルを同時に比較することが可能となる。実際にピーク強度が変動したタンパク質を探索した結果、CEPH欠損株において、高親和性硝酸トランスポーター NRT2.1由来のペプチドのリン酸化レベルが顕著に上昇していることが明らかとなった。

NRT2.1には複数のリン酸化部位が存在することが知られているが、CEPH欠損株でリン酸化レベルが増加していたのは501番目のSer (S501)のみだった。そしてほぼ同時期に、フランスのグループによってNRT2.1のS501がリン酸化されると硝酸取り込み活性が低下するという報告がなされた。その報告と合わせて考えると、CEPH欠損株において硝酸取り込み活性が低下していたのは、S501がリン酸化され不活性化したNRT2.1の量が野生株より多くなったことが原因と結論づけられた。

では、CEPHはNRT2.1のS501を直接脱リン酸化しているのだろうか。これを検証するため、NRT2.1のS501を含む周辺配列のリン酸化ペプチドを化学合成し、シロイヌナズナで発現させたCEPH-GFPと反応させ、*in vitro* ホスファターゼアッセイを実施した。もし、NRT2.1のS501がCEPHの直接のターゲットであれば、リン酸化ペプチドはCEPH-GFPによって脱リン酸化されるはずである。LC-MS解析による定量の結果、予想どおりCEPH-GFPによって脱リン酸化したS501ペプチドが増加していた。さらに、CEPHを一過的に過剰発現させたシロイヌナズナではS501

のリン酸化レベルが低下しており、これは前述した硝酸取り込み活性の上昇と一致していた。これらの*in vitro*, *in vivo*両方の実験結果より、CEPHはNRT2.1のS501を直接脱リン酸化することで、硝酸取り込みを活性化していることが明らかとなった。

## 7. CEPHを介した翻訳後制御の意義

CEPHの発見により、CEPD/CEPDL2が硝酸トランスポーター NRT2.1の転写活性化だけでなく、翻訳後修飾による活性制御を介して硝酸取り込みを増大させていることも明らかとなった。では、なぜ植物は転写と翻訳後の両面から硝酸取り込みを制御する仕組みを持つようになったのだろうか？ 筆者らは、植物が窒素欠乏時に抱えるジレンマを解決するためだと考えている。植物は窒素欠乏状態に陥ると、硝酸取り込みを増加しようとする。しかしこのとき植物体内のアミノ酸貯蔵量は低下しているため、NRT2.1を大量に新規合成する余裕はないと考えられる。そこで植物は体内に窒素が十分に存在するタイミングでNRT2.1を合成しておき、S501のリン酸化で不活性化した状態でストックしておくのではないだろうか（図2a）。窒素欠乏になると地上部からCEPD/CEPDL2が根に移行してCEPHを誘導し、CEPHはNRT2.1のS501を脱リン酸化することで活性化させ、硝酸取り込みを増大させる（図2b）。CEPHは酵素であるので、触媒量を合成すれば十分である。実際、植物は低窒素環境ではNRT2.1の転写調節よりも翻訳後調節を優先しているようである。本稿で紹介したCEP-CEPR1-CEPD, CEPDL2, そしてCEPHは、単子葉類・双子葉類ともに広く保存されたシステムである。このシグナル経路の強化によって、より効率よく窒素栄養を

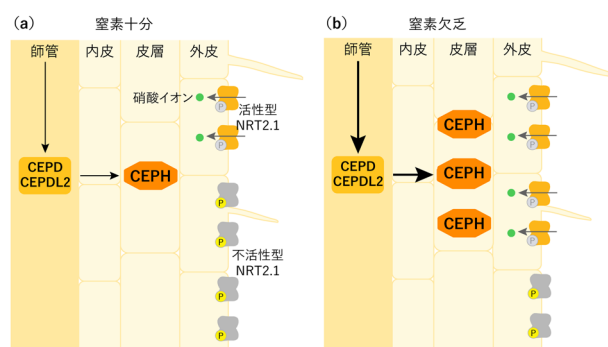


図2 CEPHを介したNRT2.1活性化のモデル

(a) 植物は窒素十分な場合にNRT2.1を合成し、S501のリン酸化で不活性化してストックしておく。(b) 窒素欠乏状態になると地上部からより多くのCEPD/CEPDL2が根へ運ばれ、その下流でCEPHが誘導される。CEPHは不活性型NRT2.1のS501を脱リン酸化によって活性化し、硝酸イオン取り込みを増大させる。



取り込み、最小限の肥料で生育できる作物の作出も可能かもしれない。

## 文 献

- 1) Drew, M.C., Saker, L.R., & Ashley, T.W. (1973) Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. *J. Exp. Bot.*, **24**, 1189–1202.
- 2) Ohyama, K., Ogawa, M., & Matsubayashi, Y. (2008) Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by *in silico* gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *Plant J.*, **55**, 152–160.
- 3) Tabata, R., Sumida, K., Yoshii, T., Ohyama, K., Shinohara, H., & Matsubayashi, Y. (2014) Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science*, **346**, 343–346.
- 4) Ohkubo, Y., Tanaka, M., Tabata, R., Ogawa-Ohnishi, M., & Matsubayashi, Y. (2017) Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nat. Plants*, **3**, 17029.
- 5) Ota, R., Ohkubo, Y., Yamashita, Y., Ogawa-Ohnishi, M., & Matsubayashi, Y. (2020) Shoot-to-root mobile CEPD-like 2 integrates shoot nitrogen status to systemically regulate nitrate uptake in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.*, **11**, 641.
- 6) Rouhier, N., Couturier, J., & Jacquot, J.P. (2006) Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. *J. Exp. Bot.*, **57**, 1685–1696.
- 7) Gansel, X., Munos, S., Tillard, P., & Gojon, A. (2001) Differential regulation of the  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant J.*, **26**, 143–155.
- 8) Wirth, J., Chopin, F., Santoni, V., Viennois, G., Tillard, P., Krapp, A., Lejay, L., Daniel-Vedele, F., & Gojon, A. (2007) Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **282**, 23541–23552.
- 9) Jacquot, A., Chaput, V., Mauries, A., Li, Z., Tillard, P., Fizames, C., Bonillo, P., Bellegarde, F., Laugier, E., Santoni, V., et al. (2020) NRT2.1 C-terminus phosphorylation prevents root high affinity nitrate uptake activity in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, **228**, 1038–1054.
- 10) Engelsberger, W.R. & Schulze, W.X. (2012) Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.*, **69**, 978–995.
- 11) Menz, J., Li, Z., Schulze, W.X., & Ludewig, U. (2016) Early nitrogen-deprivation responses in *Arabidopsis* roots reveal distinct differences on transcriptome and (phospho-) proteome levels between nitrate and ammonium nutrition. *Plant J.*, **88**, 717–734.
- 12) Zou, X., Liu, M.Y., Wu, W.H., & Wang, Y. (2019) Phosphorylation at Ser28 stabilizes the *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.1 in response to nitrate limitation. *J. Integr. Plant Biol.*
- 13) Bhaskara, G.B., Wong, M.M., & Verslues, P.E. (2019) The flip side of phospho-signalling: Regulation of protein dephosphorylation and the protein phosphatase 2Cs. *Plant Cell Environ.*, **42**, 2913–2930.
- 14) Ohkubo, Y., Kuwata, K., & Matsubayashi, Y. (2021) A type 2C protein phosphatase activates high-affinity nitrate uptake by dephosphorylating NRT2.1. *Nat. Plants*, **7**, 310–316.
- 15) Nelson, C.J., Huttlin, E.L., Hegeman, A.D., Harms, A.C., & Sussman, M.R. (2007) Implications of  $^{15}\text{N}$ -metabolic labeling for automated peptide identification in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, **7**, 1279–1292.

## 著者寸描

### ●大久保 祐里 (おおくぼ ゆうり)



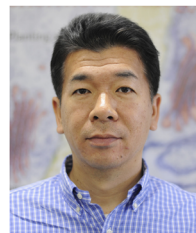
名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻博士後期課程。

■略歴 2020年名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻博士後期課程。同年より、日本学術振興会特別研究員 (DC1)。

■研究テーマと抱負 植物の窒素栄養吸収に関わるシグナル伝達について、質量分析により標的タンパク質を直接同定しシグナル伝達経路の解明を目指したい。

■趣味 ライブ鑑賞、スポーツ観戦 (陸上、フィギュアスケート)。

### ●松林 嘉克 (まつばやし よしかつ)



名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻教授。博士 (農学)。

■略歴 1999年名古屋大学大学院生命農学研究科助手。02年同准教授。11年自然科学研究機構基礎生物学研究所教授。14年名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻教授。

■研究テーマと抱負 現象に着目して分子を探る一般的な手法でなく、シグナルや受容体などの分子から現象へ遡るアプローチで、これまで見過ごされていた植物のかたちづくりや環境応答などのしくみを探りたい。

■ウェブサイト <http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~b2/index.html>

■趣味 幌型乗用車、純米無濾過生原酒、写真。