

# コンパートメンテーション研究チーム

## Laboratory for Metabolic Compartmentation

チームリーダー 高橋 秀樹  
TAKAHASHI, Hideki

植物は土壤中から無機窒素、無機硫黄を吸収し、光合成により得られる還元力を利用してアミノ酸を合成する。植物体を構成する器官や組織は維管束系でつながっており、土壤中の栄養成分の吸収、器官間輸送には、組織特異的に発現するトランスポーターの機能が重要である。当研究チームの研究プロジェクトは、植物におけるイオン輸送と代謝の恒常性、栄養環境に関する検知機構と制御機構の解析を目的としている。第一のテーマでは、シロイヌナズナの14種の硫酸イオントランスポーターについて発現の局在性の解析を行う。遺伝子破壊株の解析から硫酸イオンの吸収、器官間輸送の機構を明らかにする。第二のテーマでは、硫黄欠乏に対する植物の応答についてシロイヌナズナを用いて制御因子の探索を行う。硫酸イオントランスポーターの硫黄欠乏による発現誘導の制御機構について解析を行う。第三のテーマでは、6種のアンモニウムトランスポーターと6種のグルタミン合成酵素についてトランスポーターおよび代謝系酵素群の役割と窒素環境応答機構を明らかにする。

### 1. 硫酸イオンの吸収と転流に関する研究

#### (1) 根における硫酸イオン吸収 (吉本\*, 高橋)

SULTR1;1, SULTR1;2はシロイヌナズナの根の表皮、皮層に存在する高親和型硫酸イオントランスポーターである。土壌からの硫酸イオン吸収は、硫黄欠乏条件で優位に蓄積するSULTR1;1と通常条件でも発現が見られるSULTR1;2の2種類のトランスポーターにより分担されている。本年度は、酵母を用いてSULTR1;1, SULTR1;2のタンパク質レベルでの活性制御について検討を行い、SULTR1;1, SULTR1;2が複合体を形成すること、両トランスポーターが共発現することにより硫酸イオン吸収活性を増加させることを明らかにした。

#### (2) 維管束における硫酸イオン輸送 (片岡, 林, 高橋)

SULTR2;1はシロイヌナズナの根の内鞘細胞、木部柔細胞で発現する低親和型硫酸イオントランスポーターである。SULTR3;5は硫酸イオントランスポーターのホモログであり根の維管束組織で恒常的に発現するが、単独では硫酸イオン輸送機能を有しない。酵母発現系およびシロイヌナズナT-DNA挿入変異体を用いた解析では、SULTR2;1とSULTR3;5の共発現により最大活性が得られ、SULTR3;5が低親和型硫酸イオン輸送に必須の輸送体であることが示された。維管束組織では、液胞膜に局在するSULTR4;1, SULTR4;2により根から地上部への硫酸イオン輸送が制限されることが明らかにされている。本年度は、*sultr4;1 sultr4;2*変異体、*sultr1;2*変異体を用いてのマイクロアレイ解析を行い、変異体で発現量が変化し地上部への硫酸イオン輸送に関わると推定される新規輸送体遺伝子の探索を進めた。

### 2. 硫黄欠乏応答に関する研究 (丸山, 中村, 渡部, 高橋)

#### (1) 硫黄栄養応答性シス因子の同定

SULTR1;1のプロモーター領域について硫黄欠乏に応答するシス因子を同定した。SURE (Sulfur Responsive Element) と命名したシス因子は、シロイヌナズナのオーキシン応答に関わるARF結合配列に一致したが、ARF結合配

列で一般的に見られるようなプロモーター上でのタンデムな重複はなく、オーキシンによる遺伝子の発現応答も認められなかった。また、マイクロアレイ解析により同定された硫黄欠乏応答性遺伝子のプロモーター上にもSUREが存在し発現応答に関わることが示唆された。さらに、SULTR1;2, SULTR2;1のプロモーターおよびターミネーター領域の硫黄欠乏に対する発現応答解析を進めたが、これらの遺伝子の制御領域には今回同定したSUREと一致する配列は存在せず、硫黄栄養によるSULTR1;1, SULTR1;2, SULTR2;1の遺伝子発現制御の機構が異なることが示唆された。

#### (2) 硫黄欠乏応答変異体の解析

シロイヌナズナSULTR1;2-GFP植物を用いて硫黄欠乏条件でGFPの発現誘導が低下する変異体、増幅される変異体を単離した。また、SULTR1;2-GFP植物を親株として用い、SULTR1;2プロモーターにより約15,000種の独立クローン由来の完全長cDNAを根で発現させた形質転換体を作製し、約18,000株についてT2世代の種子をプール化した。

### 3. アンモニウムイオンの吸収と同化に関する研究 (石山, 井上, 高橋)

#### (1) アンモニウムトランスポーターの発現解析

シロイヌナズナの高親和型アンモニウムトランスポーターAMT1;1, AMT1;3は窒素欠乏により根で発現が誘導される。AMT1;1, AMT1;3のプロモーターとGFPの融合遺伝子を発現させたシロイヌナズナの解析から、両トランスポーターが窒素欠乏時に表皮細胞、根毛細胞で機能することを明らかにした。また、シロイヌナズナT-DNA挿入変異体を用いた解析から、窒素欠乏時にAMT1;1, AMT1;3がアンモニウム吸収に必須であることが示唆された。

#### (2) グルタミン合成酵素の機能分担

イネの根においてアンモニウム同化に主要な役割を果たす細胞質型グルタミン合成酵素遺伝子全て (OsGln1;1, OsGln1;2) について酵素特性、組織特異性、窒素環境応

答を明らかにした。両者とも基質に対する親和性が高いが、OsGLN1;1はOsGLN1;2の約2倍の活性を示した。OsGLN1;1は窒素欠乏時に表皮細胞、皮層細胞で発現するが、OsGLN1;2の発現はアンモニウム添加により誘導され、表皮および維管束組織で発現がみられた。また、イネ *Tos17* 挿入変異体から単離した *gln1;1* ノックアウト体の解析を行い、OsGLN1;1がアンモニウム同化に主要な役割を担い、同遺伝子の欠損によりグルタミン生合成および生育が著しく阻害されることが示された。

\* 基礎科学特別研究員

Nutrient use efficiency is an important aspect of primary metabolic function controlling the nutritional qualities and productivities of plants. The Laboratory for Metabolic Compartmentation focuses on the regulatory circuits of transport and primary assimilatory pathways of two major mineral elements, sulfur and nitrogen. The final goal of this project is to plot the functions of transporters and assimilatory enzymes to the individual physiological processes in plants and to clarify their regulatory mechanisms. The following are the three major topics studied in the lab.

### 1. Characterization of sulfate transporters in Arabidopsis

SULTR1;1 and SULTR1;2 are the two components of high-affinity sulfate transport system localized at the root epidermis and cortex to facilitate the initial uptake of sulfate from the soil. Using yeast as a model system for the sulfate uptake studies, we showed that SULTR1;1 and SULTR1;2 form a hetero-oligomeric transporter complex, which is essential for the positive regulation of sulfate uptake under low-sulfur conditions. In addition to the previously known transcriptional regulation of *SULTR1;1* and *SULTR1;2* gene expression, our results suggested that the activity of the high-affinity sulfate uptake system is functionally modulated to retain a maximum capacity of sulfate influx under sulfur limited conditions.

As for the long distance inter-organ transport of sulfate, we have determined the role of a novel non-functional type sulfate transporter, SULTR3;5, as an essential component of the root-to-shoot sulfate transport system in Arabidopsis. *SULTR3;5* was expressed in the vasculature both under sulfur-replete and sulfur-deficient conditions. By contrast, *SULTR2;1*, the low-affinity sulfate transporter that co-localizes with *SULTR3;5* in the root vasculature, was abundantly expressed during sulfur limitation. We demonstrated that knockout of *SULTR3;5* expression affects the root-to-shoot transport of sulfate only in the presence of *SULTR2;1* under sulfur deficiency. In addition, we demonstrated that vacuolar sulfate transporters, SULTR4;1 and SULTR4;2, play essential roles in releasing sulfate reserve in the root vacuoles, facilitating the transfer of sulfate to the upper-ground tissues. Based on these information, comparative analysis of *sultr4;1 sultr4;2* and *sultr1;2* knockout plants has been performed using microarrays to identify additional transporter proteins mediating translocation of sulfate through the plant vasculatures.

### 2. Genome-wide analysis of sulfur limitation response in Arabidopsis

The *cis*-acting element for sulfur limitation response

was identified from dissection of *SULTR1;1* promoter region. SURE (Sulfur Responsive Element) identified in *SULTR1;1* contained a consensus sequence of an ARF binding site, which confers auxin response in Arabidopsis; however, unlike the ARF sites that occur generally as tandem duplication, SURE was present as a singlet sequence and was not responsive to auxin. Microarray analysis of sulfur-deficiency response indicated that SURE sequences are found also in other sulfur-regulated genes in Arabidopsis roots. Additional studies on sulfur response of promoter and terminator regions of *SULTR1;2* and *SULTR2;1* indicated that SURE is present only in the *SULTR1;1* promoter region, and is suggested to be specific to the early-responsive genes co-regulated with *SULTR1;1*.

As a genetic approach to uncover the regulatory circuitry of plant sulfur-response, mutagenized pools of *SULTR1;2* promoter-GFP transgenic plants were screened for mutants showing reduced and enhanced responses of GFP expressions to sulfur-limited and sulfur-replete conditions, respectively. A mutant showing no-response to sulfur limitation was further characterized. Expression of GFP from the reporter gene construct, as well as *SULTR1;2* was significantly repressed in this mutant even under sulfur-limited conditions, and the results suggested that these phenotypes are derived from a single recessive mutation. To establish a gain-of-function screening method for the genome-wide analysis of nutrient response, we generated transgenic plants independently expressing approximately 15,000 clones of RIKEN Arabidopsis full-length cDNAs (RAFL) under the control of *SULTR1;2* promoter, which provides randomized over-expression of genes of interest in root epidermis and cortex. The seeds of over 18,000 transformants were collected and pooled at T2 generation for reverse genetics screening of effector molecules that may modulate the expression of *SULTR1;2*.

### 3. Characterization of ammonium transporters and GS/GOGAT cycle enzymes

AMT1;1 and AMT1;3 are two major high-affinity ammonium transporters in Arabidopsis root. Transgenic plants expressing the promoter-GFP constructs indicated that they were predominantly expressed in the epidermis and root hairs. As indicated from a drastic decrease of ammonium influx activities in the knockout plants, AMT1;1 facilitated the uptake of ammonium under low-nitrogen conditions. By contrast, AMT1;3 was abundantly expressed even under N-rich conditions and contributed to the basal uptake of ammonium.

The ammonium taken up in root is further converted to glutamine by cytosolic glutamine synthetase. Previously, we have determined the roles of the four isoenzymes of cytosolic Gln synthetase (GS) expressed in Arabidopsis roots, and demonstrated that synthesis of glutamine is shared by two classes of glutamine synthetase having different substrate specificities and cell-type-specific localization. In contrast to Arabidopsis, the two cytosolic GS in rice, OsGLN1;1 and OsGLN1;2, were both high-affinity isoenzymes, but showed 2-fold differences in their specific activities. The high-capacity isoenzyme, OsGLN1;1, was localized in the root epidermis and cortex of nitrogen-starved plants, whereas OsGLN1;2 was expressed in response to excessive supply of ammonium in the epidermis and vasculatures. In addition, the analysis of *Tos17*-inserted *gln1;1* knockout plants indicated that OsGLN1;1 plays a major role in glutamine synthesis, as suggested from the severe growth reduction and decrease of glutamine synthesis.

## Staff

### Laboratory Head

Dr. Hideki TAKAHASHI

### Research Scientist

Dr. Keiki ISHIYAMA

Dr. Tatsuhiko KATAOKA

Dr. Akiko MARUYAMA-NAKASHITA

### Technical Staff

Ms. Naomi HAYASHI

Ms. Eri INOUE

Ms. Yumiko NAKAMURA

Ms. Akiko WATANABE-TAKAHASHI

### Special Postdoctoral Researcher

Dr. Naoko YOSHIMOTO

### Visiting Members

Dr. Mitsuhiro OBARA (Grad. Sch. Agric. Biol. Sci.,  
Tohoku Univ.)

Mr. Douglas VAN HOEWYK (Colorado State Univ.,  
USA)

---

## 誌 上 発 表 Publications

### [雑誌]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文

Ishiyama K., Inoue E., Takahashi A., Obara M., Yamaya T., and Takahashi H.: “Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*”, J. Biol. Chem. **279**, 16598–16605 (2004). \*

Buchner P., Takahashi H., and Hawkesford M. J.: “Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport”, J. Exp. Bot. **55**, 1765–1773 (2004). \*

Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Yamaya T., and Takahashi H.: “Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation”, J. Exp. Bot. **55**, 1843–1849 (2004). \*

Kataoka T., Takahashi A., Hayashi N., Ohnishi M., Mimura T., Buchner P., Hawkesford M. J., Yamaya T., and Takahashi H.: “Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*”, Plant Cell **16**, 2693–2704 (2004). \*

Nakashita A. M., Nakamura Y., Takahashi A., Yamaya T., and Takahashi H.: “Induction of SULTR1;1 sulfate transporter in *Arabidopsis* roots involves protein phosphorylation/dephosphorylation circuit for transcriptional regulation”, Plant Cell Physiol. **45**, 340–345 (2004). \*

Ishiyama K., Inoue E., Tabuchi M., Yamaya T., and Takahashi H.: “Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots”, Plant Cell Physiol. **45**, 1640–1647 (2004). \*

Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Yamaya T., and Takahashi H.: “A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation”, Plant J. **38**, 779–789 (2004). \*

Kataoka T., Hayashi N., Yamaya T., and Takahashi H.: “Root-to-shoot transport of sulfate in *Arabidopsis*. Evidence for the role of SULTR3;5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature”, Plant Physiol. **136**, 4198–4204 (2004). \*

## 口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Takahashi H., Nakashita A. M., Nakamura Y., and Yamaya T.: “Regulation of gene expression and transport functions: S responsive regions of sulfate transporter gene promoters and regulatory factors”, Ann. Main Meet. of the Soc. for Experimental Biology (SEB 2004), Edinburgh, UK, Mar.–Apr. (2004).

Yamaya T., Obara M., Yano M., and Sato T.: “Chromosome-substituted lines confirmed QTL on chromosome 2 for GS1 protein content and tiller number in rice”, 7th Int. Symp. on Inorganic Nitrogen Assimilation in Plants: From the Genome to the Agro-Ecosystem, (European Nitrate Ammonium Assimilation Group), Wageningen, The Netherlands, June (2004).

Ishiyama K., Tabuchi M., Inoue E., Yamaya T., and Takahashi H.: “Cytosolic glutamine synthetase for ammonium assimilation in *Arabidopsis* and rice roots”, 7th Int. Symp. on Inorganic Nitrogen Assimilation in Plants: From the Genome to the Agro-Ecosystem, (European Nitrate Ammonium Assimilation Group), Wageningen, The Netherlands, June (2004).

Wren N. V., Rauch S., Yuan L., Loque D., Gojon A., Ishiyama K., Takahashi H., and Kojima S.: “Characterisation of the physiological role of *AtAMT1;2* in *Arabidopsis thaliana*”, 13th Int. Workshop on Plant Membrane Biology, (Biochimie et Physiologie Moleculaire des Plantes), Montpellier, France, July (2004).

Yoshimoto N., Saito K., Yamaya T., and Takahashi H.: “Interaction of two high-affinity sulfate transporters modulates sulfate uptake capacity in *Arabidopsis* roots”, 13th Int. Workshop on Plant Membrane Biology, (Biochimie et Physiologie Moleculaire des Plantes), Montpellier, France, July (2004).

Kataoka T., Hayashi N., Yamaya T., and Takahashi H.: “Sulfate transporters expressed in pericycles of *Arabidopsis* root facilitate long-distance transport of sulfate to shoot under sulfur starvation”, 13th Int. Workshop on Plant Membrane Biology, (Biochimie et Physiolo-

- gie Moléculaire des Plantes), Montpellier, France, July (2004).
- Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Yamaya T., and Takahashi H.: “Nutrient-dependent and hormonal regulation of sulfate transporters in Arabidopsis”, 15th Int. Conf. on Arabidopsis Research, Berlin, Germany, July (2004).
- Yoshimoto N., Saito K., Yamaya T., and Takahashi H.: “Two interacting high-affinity sulfate transporters regulate the uptake of sulfate in response to sulfur conditions”, 15th Int. Conf. on Arabidopsis Research, Berlin, Germany, July (2004).
- Takahashi H.: “Sulfate transport in roots: specialized function and regulation”, 13th Int. Workshop on Plant Membrane Biology, (Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes), Montpellier, France, July (2004). (国内会議)
- 峠隆之, 平井優美, 矢野美弦, 中嶋淳一郎, 井上恵理, 高橋秀樹, Goodenowe D., 野路征昭, 山崎真巳, 斉藤和季: “*PAP1* 遺伝子過剰発現体を用いた網羅的解析によるアントシアニン蓄積機構の解明 (1): トランスクリプトミクスとメタボロミクスの統合”, 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 丸山-仲下明子, 中村有美子, 高橋晶子, 山谷知行, 高橋秀樹: “サイトカイニンによる硫酸イオン吸収の制御”, 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 石山敬貴, 井上恵理, 高橋晶子, 小原実広, 山谷知行, 高橋秀樹: “シロイヌナズナの根における細胞質型グルタミン合成酵素の窒素環境に適応した制御”, 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 吉本尚子, 斉藤和季, 山谷知行, 高橋秀樹: “シロイヌナズナの根における硫酸イオン獲得を仲介する高親和型硫酸イオントランスポーターの機能解析”, 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 片岡達彦, 林尚美, 高橋晶子, 井上恵理, 山谷知行, 高橋秀樹: “シロイヌナズナ根組織の内鞘細胞および木部柔細胞に局在する硫酸トランスポーターの機能解析”, 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 高橋秀樹: “植物における硫酸イオン輸送システムの制御”, 第 7 回植物生体膜シンポジウム「生体膜研究の新世紀」, (植物生体膜談話会), 東京, 3 月 (2004).
- 石山敬貴, 高橋秀樹: “グルタミン合成酵素の役割と代謝調節”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 高橋秀樹, 丸山明子, 吉本尚子, 中村有美子, 高橋晶子, 山谷知行: “植物における硫黄同化代謝の制御”, 第 5 回ミレニアム植物科学研究プロジェクト研究成果報告会「21 世紀に期待される植物科学研究」, (農業生物資源研究所, 理研他), 東京, 12 月 (2004).
- 高橋秀樹, 片岡達彦, 石山敬貴, 吉本尚子, 高橋晶子, 林尚美, 井上恵理, 山谷知行: “硫黄・窒素同化に関わるイオン輸送系及び代謝酵素の生理機能の解明”, 第 5 回ミレニアム植物科学研究プロジェクト研究成果報告会「21 世紀に期待される植物科学研究」, (農業生物資源研究所, 理研他), 東京, 12 月 (2004).