

コミュニケーション分子機構研究チーム

Laboratory for Communication Mechanisms

チームリーダー 榊原 均
SAKAKIBARA, Hitoshi

根圏に存在する窒素化合物量は植物の成長速度を規定する重要な化学的環境因子である。植物はその供給量に応じて代謝系や形態を変化させることにより、限られた窒素の効率的な利用を可能にしている。このことは多数の遺伝子の発現が窒素栄養により巧みに制御されていることを示している。また、植物固体としての秩序だった応答には他の代謝系や細胞間での情報のやり取り（コミュニケーション）も必要である。本研究チームでは植物が窒素栄養に対し代謝的および形態的応答を示す過程で行う代謝間、細胞間、器官間での情報コミュニケーションに関わるシグナル伝達機構の解明を目指す。具体的には地下部での窒素源の感知とシグナル分子であるサイトカイニンの生合成、地上部への情報の伝達、地上部での窒素情報伝達とその応答に関わる遺伝子の機能同定、器官間での情報伝達因子の同定に焦点を絞り、生化学的および分子生物学的手法を用いて研究を展開する。

1. 窒素によるサイトカイニン生合成および輸送制御の分子機構研究

(1) サイトカイニン生合成経路に関する研究（武井，上田，小嶋，榊原（均））

サイトカイニンは植物細胞の分化・増殖に極めて重要な役割を果たすホルモンであるとともに器官間での窒素栄養情報伝達物質としても機能している。我々は昨年度までにシロイヌナズナを用いてイソペンテニルアデニン（iP）型のサイトカイニン合成酵素遺伝子（*AtIPTs*）を同定し、各遺伝子の発現組織および細胞内局在場所を明らかにした。本年度はさらに20年来不明であったトランスゼアチン（tZ）型サイトカイニンの合成に関わるP450酵素遺伝子（*CYP735As*）を初めて同定することに成功した。従来tZ合成のための水酸化反応は塩基型もしくはヌクレオシド型サイトカイニンで起こるとされてきたが、我々の生化学的解析からこの反応はヌクレオチド型でのみ起こることを明らかにし、従来の説を訂正した。*CYP735A* 遺伝子発現はオーキシンにより抑制されることを見だし、サイトカイニン生合成制御へのオーキシンの作用点の1つを明らかにした。

(2) 植物と微生物におけるサイトカイニン生合成経路の研究（榊原（均）上田，小嶋；笠原，山口（PSC発芽生理機構研究チーム））

アグロバクテリウムのサイトカイニン合成酵素であるTmrはアミノ末端側に明確なトランジット配列を持たないにもかかわらず、感染後宿主細胞のプラスチド内に移行されることを見いだした。Tmrは高等植物の酵素とは基質特異性が異なりDMAPPの他にHMBDPも基質にした。HMBDPはプラスチド内のメチルエリスリトールリン酸経路の中間代謝産物である。以上のことから高等植物のtZ合成はP450酵素を介するiP型サイトカイニンの水酸化による経路が主なものに対し、アグロバクテリウムにおいては宿主細胞のプラスチド内でのHMBDP利用による1段階のtZ合成経路であることを明らかにした。

(3) サイトカイニン生合成酵素の構造生物学的研究（菅原，榊原（均）；河野（研究技術開発室））

サイトカイニン生合成反応機構を明らかにするべく、アグロバクテリアのイソペンテニルトランスフェラーゼの1つTzsの大量発現および精製系を構築し、Tzsタンパク質の結晶化に成功した。この結晶を用いてSPRING-8において回折データを収集し、立体構造を解析中である。これまでにTzsと基質（AMP）や基質アナログ（DMASPP）との複合体結晶も得られている。これらの構造を解くことができれば、単にサイトカイニン生合成反応機構を明らかにするだけでなく、サイトカイニン生合成の阻害剤などの開発のための基盤情報が得られることが期待され興味深い。

(4) ヌクレオシド型サイトカイニン輸送体遺伝子の同定と解析（広瀬，横田，榊原（均））

イネのヌクレオシド輸送体OsENTについて生化学的な特徴付けを詳細に行い、植物体内におけるサイトカイニンヌクレオシド輸送はサイトカイニン特異的な輸送体によって媒介されるのではなく、他の類縁体ヌクレオシド群とともに共通の輸送体を介して行われることを提唱した。さらにOsENT2はiPRとtZRに対して有意な親和性の違いを持つことを見だし、この違いが師管と道管におけるiPRとtZRの局在性の違いの1つの原因である可能性を示唆した。

OsENT2 プロモーター：GUS融合遺伝子を導入した形質転換イネ（T1世代）を解析し、根の維管束と幼側根部、葉鞘と葉身の師部で発現することを見だし、OsENT2が長距離のヌクレオシド輸送に関わることを示唆した。一方、種子では吸水直後から胚盤組織で発現が誘導されたことから、胚乳から胚へのヌクレオシドの移動にも関わると考えられた。以上のことからOsENT2は長距離輸送に加え、必要部位への局所的なヌクレオシド輸送の役割も果たしていることを示唆した。

2. 植物におけるHis-Aspリン酸リレー情報伝達系の研究

(1) サイトカイニン受容体のリガンド特異性と機能分化に関する研究（榊原（均）；榊原（圭）（PSCコンパートメ

ンテーション研究チーム))

地下部でサイトカイニンに置き換えられた窒素情報が光合成細胞へ到達した後は、His-Asp リン酸リレー系因子により細胞内へ伝達される。昨年までに3種類のサイトカイニン受容体遺伝子 (*ZmHK1*~*ZmHK3*) をトウモロコシから単離同定してきたが、本年度さらに3種類の受容体遺伝子を同定した (*ZmHK1a2*, *ZmHK1b1*, *ZmHK1b2*)。これらのリガンド特異性について大腸菌と酵母での発現系を用いた手法で検討した結果、*ZmHK1b* 型は *ZmHK1a* 型に比べ cZ に対する応答性が有意に低いことを見いだした。以上のことから cZ の生理活性は受容するレセプターの種類に大きく依存することを示唆した。

トウモロコシの CK 配糖化に関わる酵素 cis-zeatin-O-glucosyltransferase (*cisZOG1*) がイソプレノイド型サイトカイニンのみならず芳香族型サイトカイニンの修飾にも関わることを明らかにするとともに、*cisZOG1* の cZ, tZ に対する基質親和性と、CK 受容体 (*ZmHK1*) のこれらリガンドに対する親和性の類似性を見だし、*cisZOG1* と *ZmHK1* の間での基質 (リガンド) 認識機構の共通性を指摘した。

(2) *ZmRR* と相互作用する因子の探索 (広瀬, 横田, 榊原 (均))

昨年までの酵母 Two-hybrid 法により選抜された、*ZmRR1*~*ZmRR3* と相互作用する因子 MVD の特徴付けを行った。MVD と細胞質型 RR との相互作用は、イネのオルソログについても再現できたが、シロイヌナズナには *ZmRR1*~*ZmRR3* のオルソログは見いだせなかった。このことからイネ科植物などの限られた植物種内に見られる制御機構であると予想された。この相互作用の生理的意義について検証するため、イネのオルソログ遺伝子 *OsRR1*, *OsRR2* および *OsMVD* を単離し、それらの形質転換イネを作出した。

(3) 二成分制御系の下流で転写制御を受ける遺伝子の探索 (青木, 榊原 (均))

His-Asp リン酸リレー系の下流で転写制御を受ける遺伝子を探索するため、シロイヌナズナの *ARR21* および *ARR22* の過剰発現体と野生型間での遺伝子発現プロファイリングをマイクロアレイ解析により行い、この情報伝達系の下で制御される遺伝子候補の絞り込みを行った (名古屋大学 水野猛教授との共同研究)。

3. 細胞間および器官間でのシグナル物質輸送機構の研究

(1) 篩管液中を長距離移動するタンパク質輸送の極性および選択性に関する研究 (青木, 榊原 (均))

導管および篩管を介した物質の輸送は、植物の器官間情報伝達の根幹である。しかし、篩管を介した物質輸送極性および選択性の制御機構については全く知られていない。昨年度までに異なる極性輸送様式を示す篩管タンパク質 2 種 *CmPP16-1*, *CmPP16-2* を同定した。本年度はこれらと相互作用し輸送極性制御に関わる因子を探索し、いくつかの候補タンパク質を選抜した。相互作用の有意性とそれらの機能解明については今後の検討課題である。

Inorganic nitrogen source is an important factor ruling plant growth and development. Plants constantly sense

differences in the nutrient status, and modulate their own metabolism and developmental program to adapt to their changing environment. This ability to orchestrate changes throughout the whole plant calls for an integrated network of intracellular, intercellular and inter-organ signaling of nitrogen status. In the inter-organ signaling, plants have dual paths delivering the nutritional information: one is mediated by nitrate ion itself and another is by cytokinin, a plant hormone. Nitrate-specific signaling mainly functions to regulate production of amino acids and nucleotides, and cytokinin-mediated route mainly functions to modulate nitrogen partitioning and developmental program. Thus, co-ordination of both regulations must be important to integrate nitrogen responses as a whole plant. In our laboratory, we focus on the cytokinin-mediated nitrogen signaling. We aim to elucidate the molecular mechanism of nitrogen-dependent cytokinin biosynthesis and translocation and signal transduction in the target cells in order to obtain new concepts and rules for long-distance nitrogen signaling.

1. Elucidation of regulatory mechanism of nitrogen-dependent accumulation and translocation of cytokinins

We identified *CYP735A1* and *CYP735A2* from *Arabidopsis thaliana* as cytokinin hydroxylase that catalyzes *trans*-zeatin (tZ)-type cytokinin biosynthesis. Both of the two types of *CYP735As* preferentially utilized iP nucleotides rather than the nucleoside-or-free-base forms in *in vitro* system, and produced tZ nucleotides but neither not the *cis*-isomer nor dihydrozeatin. The expression of *CYP735A1* and *CYP735A2* was regulated in an organ specific manner. Root-specific induction of *CYP735A2* expression by cytokinin suggests that the *trans*-hydroxylation is involved in the regulation of cytokinin metabolism and signaling in roots.

The phytopathogenic bacterium *Agrobacterium tumefaciens* infects plants and induces the formation of tumors called "crown galls". This neoplastic morphogenesis is attributable to the function of genes coded on the transferred-DNA (T-DNA) region of the Ti-plasmid, which integrates into the plant nuclear genome upon infection. Cytokinin and auxin biosynthesis enzymes encoded on the T-DNA are expressed by using the transcription/translation machinery of the host plant, and increase these hormone levels to cause tumorigenesis. We demonstrated that a cytokinin biosynthesis enzyme *Tmr*, encoded by the *Agrobacterium* T-DNA region, is targeted to and functions in plastids of infected plant cells. The plastid-localization of *Tmr* allows this bacterial enzyme to create a new metabolic bypass, to produce bioactive cytokinins using an intermediate in the plastid-specific methylerythritol phosphate pathway.

We identified four genes for potential equilibrative nucleoside transporters (ENTs) from *Oryza sativa* (*OsENT1* - *OsENT4*). Direct measurements with radiolabeled cytokinins demonstrated that *OsENT2* mediated uptake of iP riboside ($K_m = 32 \mu M$) and tZ riboside ($K_m = 660 \mu M$), suggesting that *OsENT2* participates in iPR transport *in planta*. The *OsENT2* expression was found in the scutellum during germination and in vascular tissues in germinated plants. These results suggest that *OsENT2* participates in the retrieval of endosperm-derived nucleosides by the germinating embryo and in the long-distance transport of nucleosides in growing plants, respectively.

2. Elucidation of physiological function of His-Asp phosphorelay in cytokinin-mediated nitrogen signaling

Cytokinin-mediated nitrogen signal is transmitted by His-Asp phosphorelay system in the target cell. We had identified genes for a series of His-Asp phosphorelay signaling modules from maize. This year, we identified genes for cytokinin receptors (*ZmHK1a2*, *ZmHK1b1*, *ZmHK1b2*) from maize, and characterized their ligand specificity and expression patterns.

3. Molecular characterization of traffic system via phloem for organ-to-organ signaling

A number of substances, not only metabolites but also growth regulators and macro-molecules (protein and RNA), are translocated via xylem and phloem to transmit long-distance metabolic signals. We profiled their direction and selectivity of translocation in rice phloem.

Staff

Laboratory Head

Dr. Hitoshi SAKAKIBARA

Research Scientist

Dr. Koh AOKI

Dr. Naoya HIROSE

Dr. Emi SUDO

Dr. Hajime SUGAWARA

Dr. Kentaro TAKEI

Technical Staff

Ms. Akiko TAKAHASHI

Ms. Nanae UEDA

Ms. Mikiko KOJIMA

Ms. Mayumi KATOH

Ms. Nobue MAKITA

in collaboration with

Dr. Hiroyuki KASAHARA (Lab. Cell. Growth Dev., PSC)

Dr. Yoshiaki KAWANO (Div. Bio-Crystalogr. Technol., Spring-8)

Dr. Shinjiro YAMAGUCHI (Lab. Cell. Growth Dev., PSC)

Dr. Keiko YONEKURA-SAKAKIBARA (Lab. Metab. Compartment., PSC)

and cytokinin homeostasis in tobacco”, *Plant Mol. Biol.* **53**, 877–890 (2003). *

Hatakeyama T., Shiba K., Matsuo N., Fujimoto T., Oda T., Sugawara H., and Aoyagi H.: “Characterization of recombinant CEL-I, a GalNAc-specific C-type Lectin, expressed in *Escherichia coli* using an artificial synthetic gene”, *J. Biochem.* **135**, 101–107 (2004). *

Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Yamaguchi S., and Sakakibara H.: “Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-Zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*”, *J. Biol. Chem.* **279**, 14049–14054 (2004). *

Uchida T., Yamasaki T., Eto S., Sugawara H., Kurisu G., Nakagawa A., Kusunoki M., and Hatakeyama T.: “Crystal structure of the hemolytic lectin CEL-III isolated from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*”, *J. Biol. Chem.* **279**, 37133–37141 (2004). *

Takei K., Yamaya T., and Sakakibara H.: “*Arabidopsis* *CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-Zeatin”, *J. Biol. Chem.* **279**, 41866–41872 (2004). *

Sugawara H., Kusunoki M., Kurisu G., Fujimoto T., Aoyagi H., and Hatakeyama T.: “Characteristic recognition of *N*-acetylgalactosamine by an invertebrate C-type lectin, CEL-I, revealed by x-ray crystallographic analysis”, *J. Biol. Chem.* **279**, 45219–45225 (2004). *

Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., and Sakakibara H.: “*AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*”, *Plant Cell Physiol.* **45**, 1053–1062 (2004). *

Kiba T., Aoki K., Sakakibara H., and Mizuno T.: “*Arabidopsis* response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokinin-receptor mutant”, *Plant Cell Physiol.* **45**, 1063–1077 (2004). *

Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., and Sakakibara H.: “Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to *cis*-zeatin”, *Plant Physiol.* **134**, 1654–1661 (2004). *

Sugawara H., Kawano Y., Hatakeyama T., Yamaya T., Kamiya N., and Sakakibara H.: “Crystal structure of the histidine-containing phosphotransfer protein ZmHP2 from maize”, *Protein Sci.* **14**, 202–208 (2005). *

□ 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Kasahara H., Takei K., Sakakibara H., Kuzuyama T., Kamiya Y., and Yamaguchi S.: “Roles of the methylerythritol phosphate and mevalonate pathways in the biosyntheses of plant hormones”, 6th Int. Symp. on Isoprenoids and Terpenes (TERPNET 2003), (University of Kentucky, Lexington, USA, May (2003).

Kiba T., Aoki K., Sakakibara H., and Mizuno T.: “A novel

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Lee J. H., Takei K., Sakakibara H., Cho H. S., Kim D. M., Kim Y. S., Min S. R., Kim W. T., Sohn D. Y., Lim Y. P., and Pai H. S.: “CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase, plays a role in plant development

- class of *Arabidopsis* response regulator genes, the ectopic expression of which results in phenocopy of the wol cytokinin-receptor deficient mutant", 15th Int. Conf. on *Arabidopsis* Research, Berlin, Germany, July (2004).
- Sakakibara H., Takei K., Kojima M., Ueda N., and Yamaya T.: "Nutritional regulation of cytokinin biosynthesis: a possible role for long-distance signaling molecule", 15th Int. Conf. on *Arabidopsis* Research, Berlin, Germany, July (2004).
- Sakakibara H.: "Regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*: nitrogen nutrition and isoprenoid side chain origin", Cytokinin 2004: metabolism, signaling and function, Berlin, Germany, July (2004).
- Sakakibara H., Takei K., and Yamaya T.: "*Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin", 7th Int. Symp. on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, Awaji, Aug. (2004).
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Kamiya Y., Yamaya T., and Yamaguchi S.: "An agrobacterial IPT, TMR, functions in the plastids of the host plant cell", 18th Int. Conf. on Plant Growth Substances (IPGSA Conf. 2004), (International Plant Growth Substances Association), Canberra, Australia, Sept. (2004).
- Hirose N., Makita N. T., Kojima M., Yamaya T., and Sakakibara H.: "Characterisation of the nucleoside transporters in rice: a possible role as cytokinin transporters", 18th Int. Conf. on Plant Growth Substances (IPGSA Conf. 2004), (International Plant Growth Substances Association), Canberra, Australia, Sept. (2004).
- Takei K., Ueda N., Kojima M., Yamaya T., and Sakakibara H.: "Cytochrome P450 genes for the hydroxylation of cytokinins", 18th Int. Conf. on Plant Growth Substances (IPGSA Conf. 2004), (International Plant Growth Substances Association), Canberra, Australia, Sept. (2004).
- Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., and Sakakibara H.: "Molecular characterisation of cytokinin-responsive histidine kinases in maize: differential ligand preference and response to *cis*-zeatin", 18th Int. Conf. on Plant Growth Substances (IPGSA Conf. 2004), (International Plant Growth Substances Association), Canberra, Australia, Sept. (2004).
- Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Sakakibara H., and Yamaguchi S.: "Origin of the hydroxyl group of *trans*-zeatin in *Arabidopsis*", 18th Int. Conf. on Plant Growth Substances (IPGSA Conf. 2004), (International Plant Growth Substances Association), Canberra, Australia, Sept. (2004).
- Tanaka M., Mori H., Kojima M., Takei K., and Sakakibara H.: "Role of auxin in apical dominance: auxin represses the expression of *PSIPT*", 18th Int. Conf. on Plant Growth Substances (IPGSA Conf. 2004), (International Plant Growth Substances Association), Canberra, Australia, Sept. (2004).
- (国内会議)
- 広瀬直也, 横田 (高内) 庸絵, 山谷知行, 榊原均: "Characterization of the nucleoside transporters in rice: a possible role as cytokinin transporters", 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).
- 青木考, 鈴木伸郎, 林浩昭, 山谷知行, 榊原均: "Possible control mechanisms of long-distance movement of phloem proteins", 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).
- 武井兼太郎, 山谷知行, 榊原均: "サイトカイニン側鎖の水酸化に関わるシトクロム P450 の同定", 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).
- 木羽隆敏, 青木考, 榊原均, 水野猛: "シロイヌナズナの新奇レスポンスレギュレーター因子 ARR22 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).
- 榊原圭子, 小嶋美紀子, 山谷知行, 榊原均: "トウモロコシ由来サイトカイニン受容ヒスチジンカイネースの機能解析: リガンド選択性, シスゼアチン応答性および細胞内局在性", 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).
- 榊原均: "微生物と植物におけるサイトカイニン生合成", 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 笠原博幸, 武井兼太郎, 葛山智久, 菱山正二郎, 浅見忠男, 榊原均, 神谷勇治, 山口信次郎: "植物の 2 つのイソプレノユニット生合成経路の役割: 植物イソプレノイドの選択的かつ効率的な *in vivo* 同位体標識法", 第 46 回天然有機化学物討論会, 広島, 10 月 (2004).
- 上田七重, 笠原博幸, 小嶋美紀子, 武井兼太郎, 神谷勇治, 山谷知行, 山口信次郎, 榊原均: "アグロバクテリウムのサイトカイニン合成酵素 Tmr は宿主細胞プラスチド内で機能する", 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).
- 榊原均, 武井兼太郎, 上田七重, 小嶋美紀子, 広瀬直也, 榊原圭子, 菅原肇, 青木考, 横田 (高内) 庸絵, 山谷知行: "サイトカイニンを介した窒素情報コミュニケーション機構の研究", 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).