植物の全身的な窒素吸収を制御するシグナル伝達経路

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

大久保祐里

2022 年 3 月

目次

序論…… 3

第 1 章　葉から根へ移行する窒素要求シグナル CEPD の同定
緒言…… 9
結果…… 10
考察…… 32
材料と手法…… 36

第 2 章　タンパク質脱リン酸化酵素 CEPH による NRT2.1 の活性化
緒言…… 42
結果…… 44
考察…… 59
材料と手法…… 62

謝辞…… 72

参考文献…… 73

序論

植物にとって，窒素は最も重要な無機栄養の一つである．タンパク質を構成するアミノ酸や，核酸など生物を構成する要素の多くは窒素を含む化合物であるため，土壌中の窒素含量は植物の生産性を決める主要な因子である．植物は土壌中の窒素源を根から吸収しており，硝酸イオン（NO_3^-）とアンモニウムイオン（NH_4^+）の無機態と，アミノ酸，ペプチド，尿素などの有機態の双方を吸収することができる．一般的には，畑のような好気的な環境ではNO_3^-が主要な窒素源であるが [1]，自然界の土壌中の NO_3^-の濃度や分布は，植物自身による吸収や雨水による流出のために不均一かつ不足しがちとなるため，植物は常に十分量を吸収できるとは限らない．そこで農業の現場では，農作物の窒素欠乏を防ぐため窒素肥料を施与している．特に，空気中の窒素からアンモニアを合成するハーバー・ボッシュ法の開発は，安定的な化学肥料の供給を可能にし，食糧生産性を大幅に向上させることで世界の人口増加に貢献した．一方で，農作物は与えた窒素肥料の 50~75%は利用できるものの，残りは環境中に排出されてしまうため，河川や海洋の水質汚染，温暖化ガス（N_2O 等）の発生，土壌の酸性化，生物多様性の減少など様々な影響が報告されている [2]．こうした社会的背景から，余剰窒素による環境汚染を軽減するため農作物生産における窒素利用効率の向上が求められており，そのためには植物が窒素を効率的に吸収・利用する仕組みの解明が急務である．

土壌からの NO_3^-の吸収は，根の細胞膜上に存在する NO_3^-トランスポーター（Nitrate transporter, NRT）によって行なわれる．高等植物では，基質親和性の異なる 2 種類の NO_3^-トランスポーターが使い分けられており，高濃度（>0.5 mM）の NO_3^-を基質濃度に比例して輸送する低親和性トランスポーターを LATS（low-affinity transport system），低濃度（＜0.5 mM）NO_3^-を輸送する高親和性トランスポーターを HATS（high-affinity transport system）と呼ぶ [3]． 一般的に，NO_3^-量が制限されることが多い自然界の環境では，HATS が NO_3^-吸収の大部分を占める [4]．シロイヌナズナでは， NRT1（NRT1/PTR family，NPF とも呼ばれる）が LATS として働き，NRT2 ファミリーが HATS として働くことが知られており，ゲノム上には，NRT1 ファミリー遺伝子が 53 個 [5]，NRT2 ファミリー遺伝子が 7 個 [6] 存在している．NRT1/NRT2 のほかにも CLC や SLAC/SLAH と呼ばれるファミリーが NO_3^-輸送に関わっていることが知られているが [7]，根で NO_3^-吸収を行なっているのは NRT1 ファミリーの 2 遺伝子（NRT1.1, NRT1.2）と NRT2 ファミリーの 4 遺伝子（NRT2.1, NRT2.2, NRT2.4, NRT2.5）である．

植物の NO_3^-トランスポーターとして最初に同定されたのは NRT1.1（CHL1 または NPF6.3 とも呼ばれる）で[8]，12 回膜貫通型の疎水性タンパク質をコードしており，NO_3^-によって発現が誘導される．NRT1 ファミリーの多くは低親和性のトランスポーターであるが，NRT1.1 のみ NO_3^-への親和性を切り替えできることが報告されており，低 NO_3^-条件下では，NRT1.1 の 101 番目の Thr 残基がリン酸化されて高親和性のトランスポーターとなる[9]．NRT2 ファミリーは，1991 年に糸状菌 *Aspergillus nidulans*[10] で最初に報告されたのを皮切りに，クラミドモナス[11]，オオムギ[12]，タバコ[13]，ダイズ[14]，シロイヌナズナ[15] と相次いで報告された．高親和性の NO_3^-トランスポーターであり，NRT1 と同様に 12 回膜貫通型の疎水性タンパク質をコードしている．NRT2.1 は根における主要な高親和性 NO_3^-トランスポーターであり，そのノックアウト株では根における NO_3^-吸収量が 75%も減少する[16,17]．同じファミリーの NRT2.2 も NRT2.1 と同様の働きをするが, NRT2.1 と比べるとその寄与は小さい[18]．NRT2.4 と NRT2.5 は低 NO_3^-条件で発現が誘導され，ごく低濃度（≦0.025 mM）における NO_3^-吸収活性に寄与すると考えられており，NRT2.4 は幼植物の根，NRT2.5 は成熟した植物の根で機能することが知られている[19,20]．

植物の主要な NO_3^-トランスポーターである NRT2.1 の制御は，これまで主に転写レベルで研究されてきた．*NRT2.1* は NO_3^-を与えると発現が誘導される一方，NH_4^+などの窒素代謝物や高 NO_3^-によってその発現は抑制されることが知られており[21,22]，これは体内の窒素量が過剰となることを防ぐためだと考えられている．また，植物体内の C/N バランスを維持するために，光合成が活発となる光条件や糖投与で発現が誘導される[21,23,24]．さらに 2000 年代に入ると, NRT2.1 による NO_3^-吸収はタンパク質レベルでも制御されることがわかってきた[25–27]．NRT2 ファミリー（NRT2.7 を除く）は NRT3.1/NAR2.1 タンパク質とヘテロ二量体を形成して細胞膜上に保持されており，NRT3.1 を欠損した植物では NRT2.1 による NO_3^-吸収活性が失われることが知られている[11,28–31]．NRT2.1 には複数のリン酸化部位（Ser11, Ser21, Ser28, Ser501, Thr521）が存在しており[32–35]，リン酸化修飾もまた，NRT2.1 の NO_3^-吸収活性制御にとって重要な役割を果たしていることが見えてきた．そのなかで，2020 年に Jacquot らは，C 末端に存在する Ser501 がリン酸化されると NRT2.1 による NO_3^-吸収活性が著しく低下することを報告した[32]．Ser501 のリン酸化はタンパク質の安定性や，NRT3.1 との相互作用には影響を与えなかったため，この結果は NRT2.1 が Ser501 のリン酸化によって直接的に NO_3^-吸収活性が制御されている可能性を示唆する．しかしながら，Ser501 のリン酸化が可逆的な吸収制御スイッチとして機能するのかや，そのリン酸化および脱リン酸化機構はまだ明らかになっておらず，NRT2.1 の活性制御の仕組みに関心が高まっている．

自然界の土壌中における NO_3^-濃度は数 μM から数十 mM という非常に広範囲で変化し，その分布も雨水や他の生物種の吸収によって刻々と変化していく．このような窒素環境下でも効率よく NO_3^-を取り込むために，植物は局所的な NO_3^-欠乏を感知すると，NO_3^-が周囲に十分に存在する根における NO_3^-吸収を促進することが知られている．この仕組みは 1975 年に Drew らによって最初に報告され，“全身的な窒素要求シグナル伝達”と呼ばれている．Drew らはプレートを 3 区画に分け，区画ごとに異なる NO_3^-濃度の液体培地を循環させるシステムを開発し [36]，オオムギの根を 3 区画にまたがるように設置して実験を行なった（Fig. 1a）．3 区画ともに高 NO_3^-培地を流してオオムギを培養した後，中央の区画には高 NO_3^-培地，それ以外の区画には低 NO_3^-培地を流して，根を不均一な NO_3^-環境に 24 時間さらした．その後各区画における NO_3^-吸収活性を測定したところ，高 NO_3^-培地にさらされた中央の区画の根では，3 区画とも高 NO_3^-培地にさらした場合と比較して NO_3^-吸収活性の上昇が確認され，オオムギの根は局所的な NO_3^-欠乏を感知すると NO_3^-が十分に存在する区画の根で NO_3^-吸収量を相補的に増大させることが明らかとなった [37]．Drew らが開発したこの手法は”Vertical system”と呼ばれているが，植物の根を不均一な環境にさらす手法としては他に”Split-root system”があり，これは一つの植物から出る根を 2 束に分け，一方は NO_3^-を十分に含む培地に，もう一方は NO_3^-を含まない培地に置く培養法である（Fig. 1b）．これらの手法によって，その後，この相補的な NO_3^-吸収はトウモロコシ [38]，イネ科植物 [39]，レタス [40]，セイヨウアブラナ [41] など他の植物種でも次々と報告され，単子葉類・双子葉類問わず保存された仕組みであることが判明した．

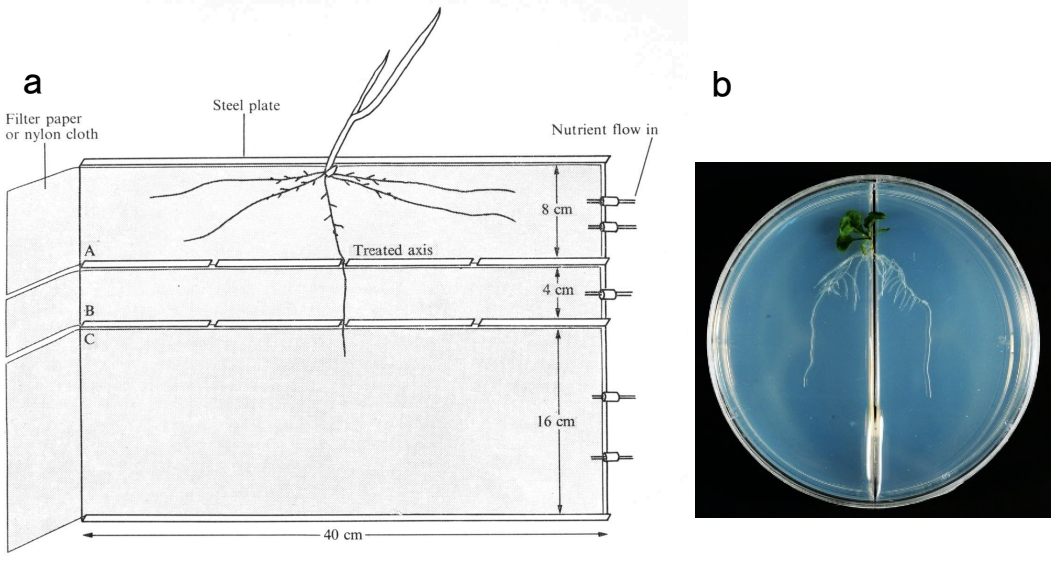

Fig. 1. 植物の根を不均一な窒素環境にさらす手法
(a) Vertical system の概要図．縦に 3 分割し，各区画に異なる組成の培地を入れることが可能．
(b) Split-root system の写真．シャーレを中央で 2 分割し，左右に異なる組成の培地を入れる．

2001 年に Gansel らは，シロイヌナズナで初めて Split-root system を用いた実験を行ない，NO_3^-を十分に含む培地に置いた根で NO_3^-吸収が増加したとき，NO_3^-トランスポーター*NRT2.1* の発現も増加することを明らかにした [22]．この実験により，主要な NO_3^-トランスポーターである NRT2.1 は，全身的な窒素要求シグナル伝達のターゲットであることが初めて報告された．その後 2011 年に Ruffel らは，Split-root system を用いたマイクロアレイ解析によって，一方の根を窒素欠乏状態にするともう一方の窒素十分側の根において *NRT2.1* を含めた 8 遺伝子（*NRT2.1*，*NRT3.1*，*At4g31910*，*At2g15620*，*At5g40850*，*At1g30510*，*At1g24280*，*At2g28780*）の発現が上昇し，全身的な窒素要求シグナル伝達のターゲット遺伝子が複数存在することを報告した [42]．また，地上部を切り離した植物ではこの応答が失われることも観察しており，一部の根における局所的な NO_3^-欠乏の情報は地上部まで送られ，地上部から根へ向かう下向きのシグナルへと変換されて，他の根へ窒素情報を伝えることが示唆された．

植物の根を不均一な環境にさらす手法を用いた研究と並行して，1970 年代から 1980 年代にかけて，培地中の窒素濃度や Shoot/Root 比を変えても地上部における窒素含有量は大きく変動しないことが報告され [43,44]，植物は地上部の窒素恒常性を維持するために根における NO_3^-吸収量を状況に応じて変化させている可能性が浮上した．そして 1989 年に Cooper と Clarkson によるコムギを用いた実験から，葉を含む植物体全身の窒素含有量が低下すると根における NO_3^-吸収が上昇することが立証されたことで [45]，葉から根へ窒素情報を伝える長距離移行因子の存在が想定されるようになった．

窒素情報を伝達するシグナル分子として，植物ホルモンのサイトカイニンが最もよく研究されている．サイトカイニンは土壌中に NO_3^-が存在すると根での生合成が促進され，道管を通って地上部へと輸送されるため，土壌中に NO_3^-が十分量存在することを地上部へと伝達するシグナル分子だと考えられている [46]．地上部にサイトカイニンが蓄積すると，葉でのグルタミン代謝に関わる酵素群の発現が変動することから [47]，グルタミンが葉から根へ窒素情報を伝えるシグナル分子だとする仮説もある．実際，1989 年には，師管液中のグルタミンを含むアミノ酸の量によって根における NO_3^-吸収が調節される可能性を示唆する報告があったが [45]，その後の Split-root システムを用いた実験によって，師管液中のアミノ酸量の変化とは関係なく根の NO_3^-吸収効率が変動することが報告された [41]．このように，グルタミンを含むアミノ酸が葉から根へ窒素情報を伝えるという仮説には否定的な見方もあり [48]，サイトカイニンだけでは全身的な窒素要求シグナル伝達を説明できないことから，他のシグナル分子の存在が示唆されていた．しかし，この長距離移行因子の実体は，多数の状況証拠の存在にも関わらずこれまで明らかにされていなかった．その解明の突破口となったのは，当研究室の Tabata らによる，ペプチドホルモンの CEP とその受容体の CEPR が，全身的な窒素要求シグナル伝達に関わることを見出した 2014 年の報告である [49]．

CEP（C-terminal encoded peptide）ファミリーは，2008 年に当研究室の Ohyama らによって見出された 15 アミノ酸残基のペプチドである[50]．シロイヌナズナのゲノム中に 15 個存在しており[51,52]，主として側根の基部側で発現している．過剰に発現させた場合あるいは培地に合成ペプチドを加えた場合に主根の顕著な伸長阻害が観察されたことから，根の生長に関与する可能性が考えられていたが，CEP ファミリーは高度に遺伝子重複しているため欠損株の作製が困難であり，当初その機能の解明は難航していた．そこで，CEP を認識する受容体を同定し，その欠損株の解析を行うというアプローチによって，CEP が根における局所的な窒素の欠乏を植物全体に伝達し，全身的な窒素要求シグナル伝達に関わることを報告した．

CEP は LRR XI グループの 2 つの受容体（CEPR1，CEPR2）と特異的に結合するが，特に CEPR1 が CEP の認識に主として関わっており，CEPR1 と CEPR2 を二つとも欠損させた株（*cepr1,2* 株）は，側根の伸長や葉の黄化，植物体の矮小化など，窒素欠乏で特有の症状を示していた．さらに，*cepr1-1* 株の根を用いたマイクロアレイ解析を行なったところ，前述の Ruffel らの Split-root system を用いたマイクロアレイ解析で見つかった全身的窒素要求シグナル伝達の制御下にある遺伝子群の多くが *cepr1-1* 株で低下していることが判明し（Table. 1），CEP-CEPR がこの経路に関与する可能性が見出された．その後，植物を窒素欠乏状態にすると根において CEP 発現が上昇することや，*cepr1,2* 株では一方の根を窒素欠乏状態にした際に相補的な NO_3^-吸収が起こらないことなどが検証された．リガンドの CEP は根において発現し，受容体の CEPR は地上部の維管束で主に発現していたことから，CEP が根から葉へ移行していることが予想されたが，実際に接木実験と道管液の分析によって，根で産生した CEP は道管を移行して地上部の CEPR に認識されていることが明らかとなった．以上の結果から，全身的な窒素要求シグナル伝達において，CEP は一部の根における局所的な NO_3^-欠乏の情報を地上部まで伝達するシグナル分子であることが明らかとなった．

Table. 1. *cepr1-1* 株の根における全身的な窒素要求シグナル伝達ターゲット遺伝子群の発現量
Tabata.R, *et al* (2014) より改変.

Gene Symbol	AGI code	Description	WT	*cepr1-1*	Ratio
NRT2:1	AT1G08090.1	nitrate transporter 2:1	218.5	51.6	0.24
NRT3.1	AT5G50200.3	nitrate transmembrane transporters	45.1	24.1	0.53
---	AT4G31910.1	HXXXD-type acyl-transferase family protei	492.6	277.5	0.56
NIR1	AT2G15620.1	nitrite reductase 1	1790.8	1220.5	0.68
UPM1	AT5G40850.2	urophorphyrin methylase 1	814.6	535.2	0.66
RFNR2	AT1G30510.1	root FNR 2	1685.0	1015.8	0.60
G6PD3	AT1G24280.1	glucose-6-phosphate dehydrogenase 3	1189.0	1010.1	0.85
---	AT2G28780.1	Unknown protein	328.2	48.7	0.15

これまでの研究で明らかとなっている，CEP を介した全身的な窒素要求シグナル伝達の流れをまとめる（Fig. 2）．根の一部が土壌中の窒素の欠乏を感知すると CEP が産生され，それらが道管を移行して地上部の CEPR に認識される．そしてそのことを引き金として，おそらく再び根に向かう未知の 2 次シグナルが産生され，NO_3^-トランスポーターをコードする NRT2.1 などの発現量を上昇させ，離れた根での NO_3^-吸収を相補的に増大させている．

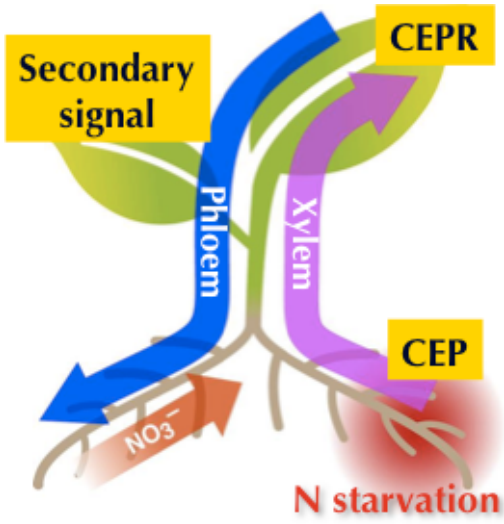

Fig. 2. CEP を介した全身的な窒素要求シグナル伝達のモデル図

本研究の第 1 章では，CEPR 下流で産生される 2 次シグナル CEPD を同定し，CEPD が葉から根へ移行して NO_3^-吸収を促進する窒素要求シグナル分子であることを明らかにした．CEPD は，その存在が長らく予想されてきた葉から根へ窒素情報を伝える長距離移行因子の実体であると考えられる．そして第 2 章では，根において CEPD によって根で誘導される脱リン酸化酵素 CEPH に着目し，CEPH が植物の主要な NO_3^-トランスポーターNRT2.1 を翻訳後レベルで活性化することを見出した．窒素要求シグナル CEPD と脱リン酸化酵素 CEPH はいずれも単子葉類・双子葉類問わず多くの植物で保存されていることから，植物の窒素吸収において普遍的かつ重要な役割を担う新しい分子群である．これらの研究により，刻々と変動する土壌窒素環境に対する植物の適応メカニズムの全容解明が大きく前進したと考えられる．

第 1 章　葉から根へ移行する窒素要求シグナル CEPD の同定

緒言

自然界における土壌中の NO_3^-の分布は，窒素肥料の投与や動物の死骸の分解などによって高濃度となる区域と，他の植物体による吸収や雨水による流出によって低濃度となる区域がモザイク状に混在している．したがって，植物はあらゆる方向に根を伸ばしているものの，周囲に NO_3^-が十分に存在する根と欠乏する根に分かれてしまう．このような不均一な窒素環境下では，植物は一部の根が土壌中の NO_3^-欠乏を感知すると，NO_3^-が周囲に高濃度で存在する根での吸収を促進させ，個体全体として生育に必要な窒素量を維持する仕組みを進化させていることが 1970 年代には知られていた [37].「全身的窒素要求シグナル伝達」と呼ばれるこの仕組みには地上部の存在が不可欠であることから [42], “根から地上部へ NO_3^-欠乏情報を伝える上向きシグナル”と，その情報を受け取った後に“地上部から根に対して NO_3^-吸収を促進するよう指示を出す下向きシグナル”が存在すると予想されていた．

我々の研究室では，2014 年にペプチドホルモン CEP が根の NO_3^-欠乏情報を地上部へ伝えるシグナル分子であることを報告した [49]．NO_3^-欠乏を感知した根ではペプチドホルモンの CEP が産生され，道管を移行して地上部の師管に存在する受容体 CEPR に認識される．これを引き金として，おそらく再び根に向かう未知の 2 次シグナルが産生され，NO_3^-トランスポーターをコードする NRT2.1 などの発現量を上昇させ，離れた根での NO_3^-吸収を相補的に増大させているものと考えられる．このペプチドホルモン CEP の発見により，葉の師管において受容体 CEPR 下流で産生される 2 次シグナルこそが，地上部から根に対して NO_3^-吸収を促進するよう指示を出すシグナルである可能性が浮上した．

そこで，本章では受容体 CEPR 下流の 2 次シグナルの同定を目的とし，葉の維管束で CEP 依存的に発現する遺伝子をトランスクリプトーム解析によって探索した．その過程で見出したポリペプチド CEPD1/2 について欠損株の表現型解析や発現部位解析を行ない，これらが葉で産生されて根に長距離移行し，根における NO_3^-吸収を促進する 2 次シグナルであることを明らかにした．

結果

CEP 受容体 CEPR1 の発現パターン解析

根の一部が土壌中の窒素の欠乏を感知するとペプチドホルモンの CEP が産生され，道管を通って地上部へと輸送される．そして葉の維管束に存在する CEP 受容体（CEPR1）に認識されると，未知の 2 次シグナルが産生され，離れた根に働きかけて *NRT2.1* などの NO_3^- トランスポーター遺伝子の発現を上昇させる．葉から根へ情報を伝達する 2 次シグナルは，CEPR1 の下流で産生されると予想したため，まず CEPR1 の発現パターンの解析を行った．

CEPR1promoter:GUS 形質転換株を用いて *CEPR1* のプロモーター解析を行ったところ，葉の維管束での発現が確認された（Fig. 1a）．そこで，ミクロトーム切片を作製して維管束内部の発現部位を詳細に観察すると，維管束の中でも師部側で特異的に発現していることが明らかとなった（Fig. 1b）．次に，葉における *CEPR1* の発現量が窒素欠乏および根への CEP1 ペプチド投与によって変動するかを qRT-PCR で定量した．窒素欠乏処理を行った場合，*CEPR1* の発現量はコントロールの約 5 倍まで上昇したのに対し，CEP1 ペプチドを投与しても発現量は変動しなかった（Fig. 2a,b）．この結果から，*CEPR1* は，CEP1 非依存的に全身の窒素欠乏によって発現が上昇することが明らかとなった．このことから，受容体の CEPR1 は，全身の窒素ステータスを反映して発現を調節することで，根の局所的な窒素欠乏によって産生された CEP に対する感受性を変化させていると考えられる．すなわち，局所的窒素欠乏によって根から CEP が葉に伝えられた場合，他の根からの窒素栄養の供給が少なければ少ないほど，窒素吸収を促進する 2 次シグナルの産生が促進されている可能性が高い．

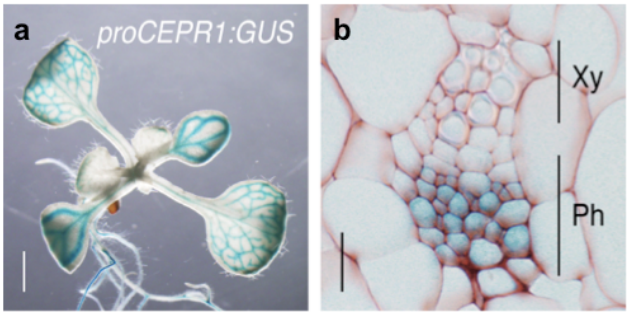

Fig. 1. CEPR1 のプロモーターGUS 解析
(c)　播種後 10 日目の *proCEPR1:GUS* 発現シロイヌナズナ芽生え全体の GUS 染色．Scale bar: 1 mm.
(d)　(a)の葉の横断面．Scale bar: 10 µm.

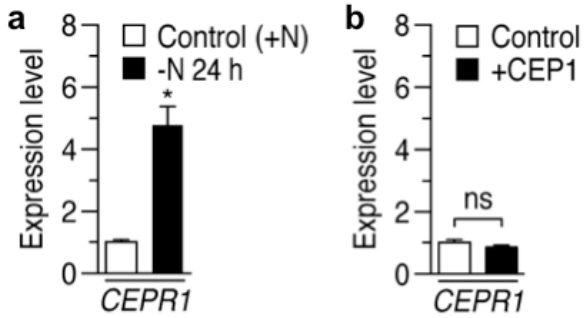

Fig. 2. 窒素欠乏処理および CEP1 ペプチド投与による *CEPR1* 発現量への影響

(a) 播種後 14 日目の野生株に窒素欠乏処理して 24 時間後の葉における *CEPR1* 発現量（mean±s.d.; n=3）.

(b) 播種後 9 日目の野生株の根に CEP1 ペプチドを投与して 24 時間後の葉における *CEPR1* 発現量（mean±s.d.; n=3）.

データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

葉の維管束における CEP1 ペプチドの動態

根で産生された CEP は道管を通って地上部へ輸送されることが明らかとなっている．そこで, 道管を通る CEP がどのように師管に存在する CEPR1 に認識されているのか調べるため, Alexa488 色素で蛍光標識した CEP1（Alexa488-CEP1）を用いて葉の維管束における CEP1 の動態を解析した．CEP1 ペプチドの N 末端から 3 番目のリジンに Alexa488 を付加し，Alexa488-CEP1 を作製した（Fig. 3a）. CEP1 ペプチドを培地に添加して植物を生育させると，根において *NRT2.1* 発現量が上昇することが知られていることから，Alexa488-CEP1 に CEP 活性があるか調べるために，Alexa488-CEP1 を添加した培地で生育させた植物の *NRT2.1* 発現量を qRT-PCR で定量した．その結果，Alexa488-CEP1 は 1 µM の濃度において CEP1 の約 40%の活性を保持していることが確認された（Fig. 3b）.

合成した Alexa488-CEP1 を終濃度 1 µM になるよう添加した培地に，平培養 7 日目の植物を移した．6 時間後に蛍光実体顕微鏡で子葉を観察すると，葉脈の末端で Alexa488-CEP1 のシグナルが蓄積していた（Fig. 4a）．また，この部分の切片を作製し共焦点顕微鏡で観察したところ，シグナルが道管から師管へと拡散していた（Fig. 4b）．これらの結果から，道管を通って地上部に輸送された CEP1 は，おそらく蒸散によって葉脈の末端で濃縮され，道管から師管へと拡散していると考えられる．

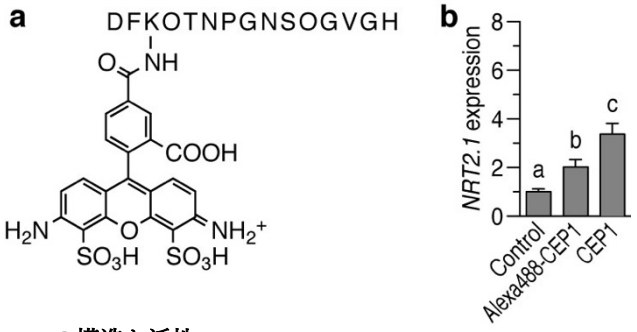

Fig. 3. Alexa488-CEP1 の構造と活性

(a) Alexa488-CEP1 の構造.

(b) CEP1 および Alexa488-CEP1（終濃度各 1 µM）を含む培地で生育した野生株の根における *NRT2.1* 発現量．播種後 9 日目の植物体を使用（mean±s.d.; n=3）．データは分散分析（one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test）を用いて解析した．$P < 0.05$.

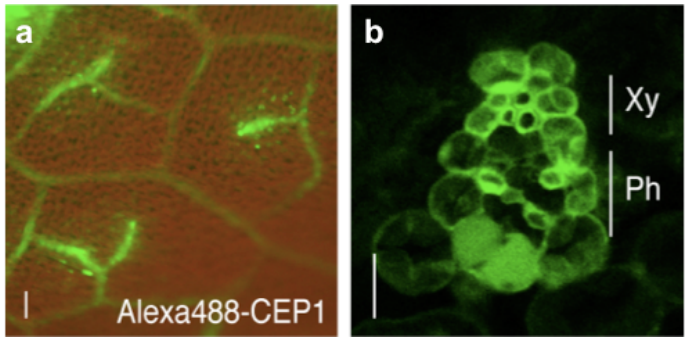

Fig. 4. 葉における Alexa488-CEP1 の局在

(a) 播種後 7 日目の野生株の根から Alexa488-CEP1 を投与し，6 時間後に子葉を観察した．Scale bar: 100 µm.

(b) (a)の葉脈末端の横断面．Scale bar: 10 µm.

CEPR1 下流 2 次シグナル候補遺伝子の探索

CEPR1 下流の 2 次シグナルは，維管束の師部で CEP を認識すると産生されると考えられることから，師部で発現している遺伝子のうち CEP によって発現が変動する遺伝子の探索を目指した．しかし，葉全体に対して維管束はごく少量であることから，葉全体から回収した RNA でトランスクリプトーム解析を行っても，維管束の師部のみで発現している遺伝子の変動はマスクされる可能性が高い．そこで，葉をセルラーゼ処理と超音波処理を組み合わせてマイルドに破砕し，維管束だけを効率よく単離する手法を用いた [53]．

CEPR1 promoter:GFP 形質転換株の子葉を蛍光実体顕微鏡で観察すると，葉脈に沿ってシグナルが検出された（Fig. 5a）．この株の子葉に対して酵素処理と超音波処理を行なった後にピンセットで解剖すると，GFP 蛍光が残ったまま維管束がきれいに単離された（Fig. 5b）．この手法を用いて維管束を単離することで，師部で発現する遺伝子が子葉全体と比較してどの程度濃縮されたのか調べるために，野生株の子葉全体および維管束における *CEPR1* 発現量を qRT-PCR で定量した．その結果，維管束では *CEPR1* 発現量が子葉全体と比べて約 8 倍になっていたことから，師部で発現する遺伝子が維管束の単離によって濃縮されたことが確認された（Fig. 6）．

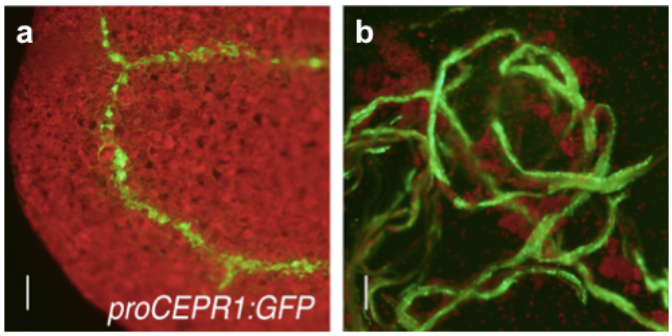

Fig. 5. 子葉維管束の単離
(a)　播種後 8 日目の *proCEPR1:GFP* 株の子葉におけるシグナル．Scale bar: 100 µm.
(b)　単離後の維管束．Scale bar: 100 µm.

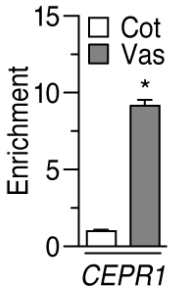

Fig. 6. 播種後 8 日目の子葉全体と維管束における *CEPR1* 発現量の比較
mean±s.d.; n=3．データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

野生株，CEP 処理をした野生株，および *cepr1-1* 株からそれぞれ維管束を単離して RNA を回収し，マイクロアレイ解析によって CEP で特異的に発現が誘導される遺伝子を探した．その結果，CEP 処理をした株で発現が 2 倍以上上昇し，*cepr1-1* 株では半分以下まで減少する遺伝子が 17 個見つかった．この遺伝子群の中で，CEP と同様に種子植物で保存されているものは 14 個あり，さらにその中で 6 遺伝子は分泌型シグナルを持たない比較的小さなタンパク質をコードしていたため，篩管内部を移行しうると考えられた（Table. 1，赤字で示した遺伝子）．そこでこの 6 遺伝子を CEPR1 下流の 2 次シグナル候補として解析を進めることにした．

Table. 1. 葉の維管束において CEP 依存的に変動する遺伝子群
播種後 8 日目の葉の維管束で発現しており，CEP 処理で 2 倍以上，*cepr1-1* 株で半分以下まで発現量が変動した遺伝子 17 個を示す．赤字は CEPR1 下流の 2 次シグナル候補．

Signal intensity			Ratio		Z-score		Gene				Protein	
WT	+CEP	*cepr1-1*	+CEP/W	*cepr1*/W	+CEP/W	*cepr1*/W	Locus	Symbol	Description	Orthologs	Signal P	Length (aa)
31.6	211.6	4.2	6.69	0.13	20.98	-3.52	At5g46871	---	Encodes a defensin-like (DEFL) family	N	Y	78
18.9	116.1	8.9	6.13	0.47	18.91	-2.17	At3g22240	---	---	Y	N	72
26.5	108.2	9.3	4.08	0.35	11.34	-2.65	At2g15480	UGT73B5	UDP-glucosyl transferase 73B5	Y	N	484
16.3	57.0	8.2	3.50	0.50	9.19	-2.05	At3g47090	---	LRR protein kinase family	Y	Y	1009
456.6	1577.4	82.6	3.45	0.18	9.01	-3.32	At3g49780	PSK4	Phytosulfokine 4 precursor	Y	Y	79
16.6	55.3	3.4	3.32	0.21	8.53	-3.20	At2g47880	---	Glutaredoxin family protein	Y	N	102
99.7	321.3	41.2	3.22	0.41	8.16	-2.41	At3g28007	SWEET4	Nodulin MtN3 family protein	Y	Y	251
80.5	252.2	11.2	3.14	0.14	7.86	-3.48	At3g46880	---	---	Y	N	153
175.9	512.3	10.5	2.91	0.06	7.01	-3.80	At1g06830	---	Glutaredoxin family protein	Y	N	99
22.0	58.5	10.6	2.67	0.48	6.13	-2.13	At4g28490	HAESA	LRR receptor-like protein kinase	Y	Y	999
55.3	141.6	17.7	2.56	0.32	5.72	-2.77	At1g44800	SIAR1	Nodulin MtN21 family	Y	Y	370
283.6	701.0	72.1	2.47	0.25	5.39	-3.04	At1g67860	---	---	N	Y	78
477.6	1090.2	177.5	2.28	0.37	4.68	-2.57	At5g17450	HIPP21	Heavy metal transport/detoxification family	Y	N	149
9.1	19.3	4.2	2.12	0.46	4.09	-2.21	At1g56240	PP2-B13	Phloem protein 2-B13	Y	N	284
13.3	28.0	6.1	2.12	0.46	4.09	-2.21	At2g05632	---	---	N	N	52
77.2	163.3	11.6	2.11	0.15	4.06	-3.44	At3g24230	---	Pectate lyase family protein	Y	Y	452
24.6	51.5	6.9	2.09	0.28	3.98	-2.92	At3g14385	MIR169F	miRNA	Y	–	–

2 次シグナル候補遺伝子群の解析

マイクロアレイ解析によって見出した 2 次シグナルの候補の 6 遺伝子が CEPR1 の下流で産生される 2 次シグナルであれば，*35S* プロモーター下流で過剰発現させた場合，CEP1 過剰発現株と同様に根で *NRT2.1* の発現を誘導すると考えられる．そこで，6 つの 2 次シグナル候補遺伝子（At3g22240，At2g47880，At3g46880，At1g06830，At5g17450，At1g56240）について，それぞれ過剰発現株を作製し，根において *NRT2.1* 発現量を上昇させる遺伝子を探した．

各過剰発現株を 9 日間培養して根を回収し，根における *NRT2.1* 発現量を qRT-PCR で定量した結果，At1g06830 過剰発現株ではコントロールの約 4 倍，At2g47880 過剰発現株では約 7 倍まで発現量が上昇した（Fig. 7）．また，このとき各過剰発現株の根において，それぞれの遺伝子が過剰に発現していることも確認した（Fig. 8）．At1g06830 と At2g47880 は，いずれも植物特異的なグルタレドキシン様ポリペプチドをコードしていた（Fig. 9）．クラスⅠ，Ⅱのグルタレドキシンは動物において酸化還元反応に関与することが知られているが，At1g06830 と At2g47880 が含まれるクラスⅢは植物特異的であり，生化学的機能は明らかとなっていない．At1g06830 と At2g47880 は，それぞれ 98 残基，102 残基の非分泌型ポリペプチドをコードしている．これらのアミノ酸配列を比較したところ，配列の 85%が互いに一致していた（Fig. 10）．シロイヌナズナのゲノム上にはクラスⅢのグルタレドキシンが 21 個存在しており，例えば，ROXY1/2 は花弁や葯の発生に必要であることが知られている [54,55]．一方，今回見つかった At1g06830/At2g47880 サブファミリーについては，これまでその機能解析の報告はない．

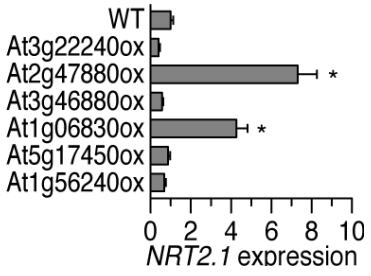

Fig. 7. 播種後 9 日目の 2 次シグナル候補遺伝子過剰発現株の根における *NRT2.1* 発現量
mean±s.d.; n=3．データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

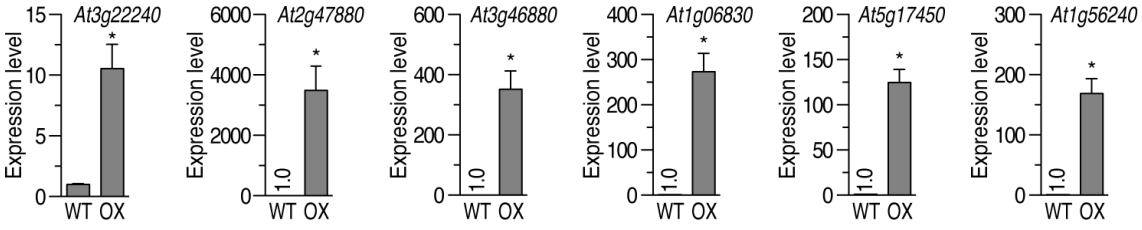

Fig. 8. 各過剰発現株の根における各遺伝子の発現量
mean±s.d.; n=3．データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

```
AT1G06830 (CEPD1)   1 MDKVMRMSSEKGVVIFTKSSCCLSYAVQVLFQDLGVNPKIHEIDKDPECREIEKALMRLG  60
AT2G47880 (CEPD2)   1 MDKVMRMSSEKGVVIFTKSSCCLCYAVQILFRDLRVQPTIHEIDNDPDCREIEKALLRLG  60

AT1G06830 (CEPD1)  61 CSKPVPAVFIGGKLVGSTNEVMSMHLSSSLVPLVKPYLC---                   99
AT2G47880 (CEPD2)  61 CSTAVPAVFVGGKLVGSTNEVMSLHLSGSLVPLIKPYQSILY                  102
```

Fig. 10. At1g06830 と At2g47880 のアミノ酸配列

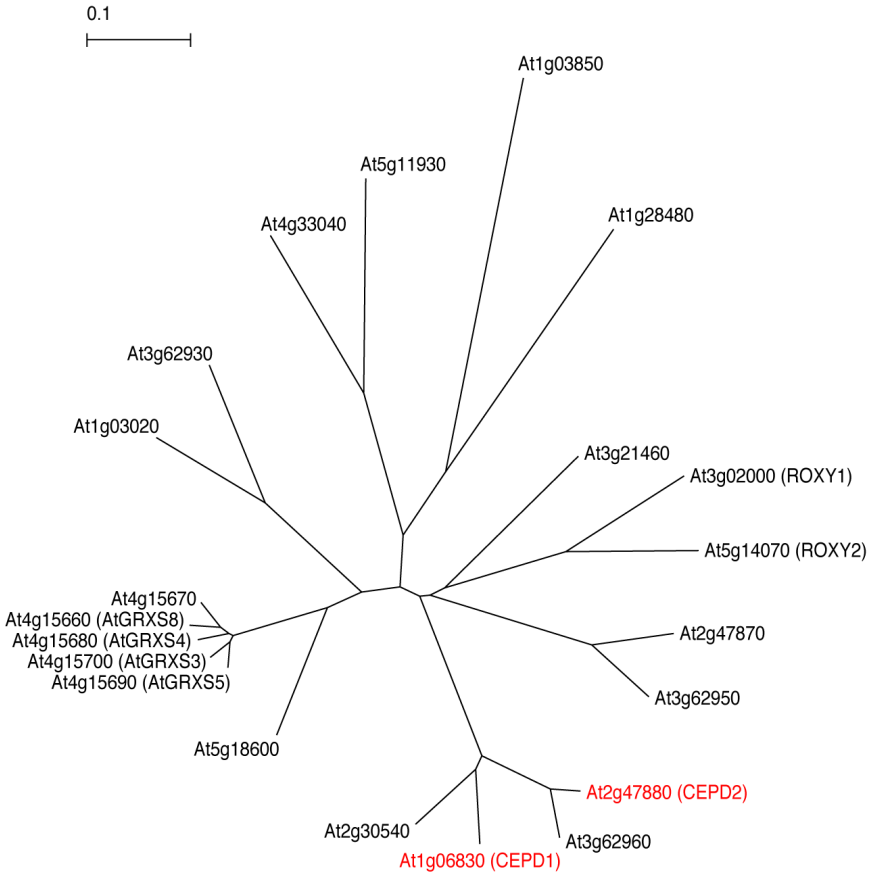

Fig. 9. シロイヌナズナにおけるクラスⅢグルタレドキシンの分子系統樹

CEP1 ペプチド投与による *At1g06830, At2g47880* 発現量への影響

At1g06830 と At2g47880 が CEPR1 下流の 2 次シグナルであるか検証するために，CEP1 ペプチド投与による *At1g06830*，*At2g47880* 発現量への影響を調べた．CEP1 ペプチドを添加した培地で野生株と *cepr1-1* 株を生育させ，子葉における *At1g06830*, *At2g47880* 発現量を qRT-PCR で定量した．野生株では CEP1 を与えると，*At1g06830* は約 7 倍，*At2g47880* は約 3 倍発現量が上昇したのに対し，*cepr1-1* 株ではその応答が見られなかった（Fig. 11a）．この結果から，*At1g06830* と *At2g47880* は，CEPR1 依存的に CEP1 に応答して発現が上昇することが明らかとなった．次に，CEP1 ペプチド投与による遺伝子発現のタイムコース（0〜48 時間）を定量したところ，*At1g06830* と *At2g47880* はともに投与 2 時間後から発現が上昇し，12〜24 時間後にピークに達した（Fig. 11b）．また，培地中の CEP1 ペプチド濃度を 10 nM から 1 μM まで振ると，*At1g06830* は 10 nM で発現が上昇し，*At2g47880* は 100 nM で上昇した（Fig. 11c）．これは CEP1 ペプチドを与えたときに，根で *NRT2.1* の発現を誘導できる最小濃度と一致していた．

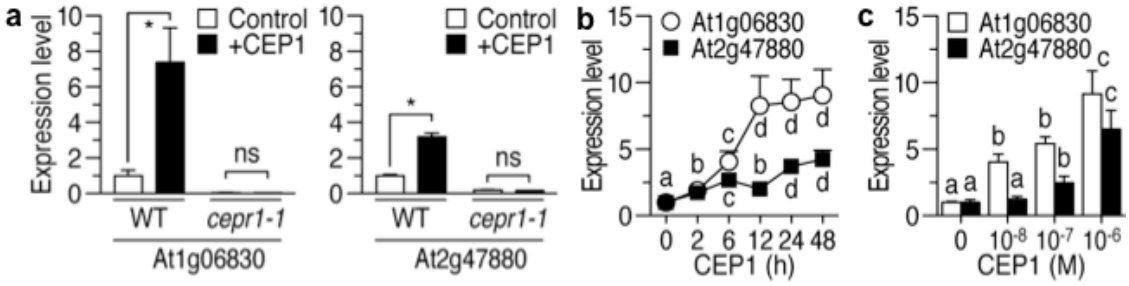

Fig. 11. CEP1 ペプチド投与による葉における *At1g06830*，*At2g47880* 発現量への影響

(a) CEP1 ペプチド（終濃度 1 μM）を含む培地で生育した播種後 9 日目の野生株と *cepr1-1* 株の子葉で発現量を比較した（mean±s.d.; n=3）.

(b) 発現誘導のタイムコース．播種後 7 日目の野生株を CEP1 ペプチド（終濃度 1 μM）を含む培地に移し，2〜48 時間後に子葉を回収した（mean±s.d.; n=3）.

(c) 発現誘導の CEP1 濃度依存性．CEP1 ペプチド濃度を 10 nM，100 nM，1 μM と変えた培地で生育した播種後 9 日目の野生株の子葉を用いた（mean±s.d.; n=3）.

データは Student's *t* test および分散分析（one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test）を用いて解析した．$P < 0.05$.

窒素欠乏・再投与処理による *At1g06830, At2g47880* 発現量への影響

さらに，窒素欠乏処理による *At1g06830*，*At2g47880* 発現量への影響を調べた．窒素欠乏培地に野生株と *cepr1-1* 株を移し，24 時間後に子葉を回収して *At1g06830*，*At2g47880* 発現量を qRT-PCR で定量した．野生株では，窒素欠乏によって *At1g06830* は約 8 倍，*At2g47880* は約 12 倍発現量が上昇した．*cepr1-1* 株では，*At1g06830* は窒素欠乏に応答しなかったが，一方 *At2g47880* はわずかに応答を示した（Fig. 12a）．この結果から，*At1g06830* の発現は完全に CEP1 経路に依存しているが，*At2g47880* の発現はわずかながら CEP-CEPR1 非依存的な経路によっても制御されていることが示された．また，野生株を窒素欠乏培地に移し，24 時間後に再び通常培地に戻して窒素を再投与する処理を行ったところ，*At1g06830*，*At2g47880* ともに窒素欠乏によって上昇した発現量が，窒素の再投与によって通常のレベルまで戻った（Fig. 12b）．このことから葉における *At1g06830*，*At2g47880* 発現量は，根からの窒素供給レベルに応じて可逆的に変動することが明らかとなった．

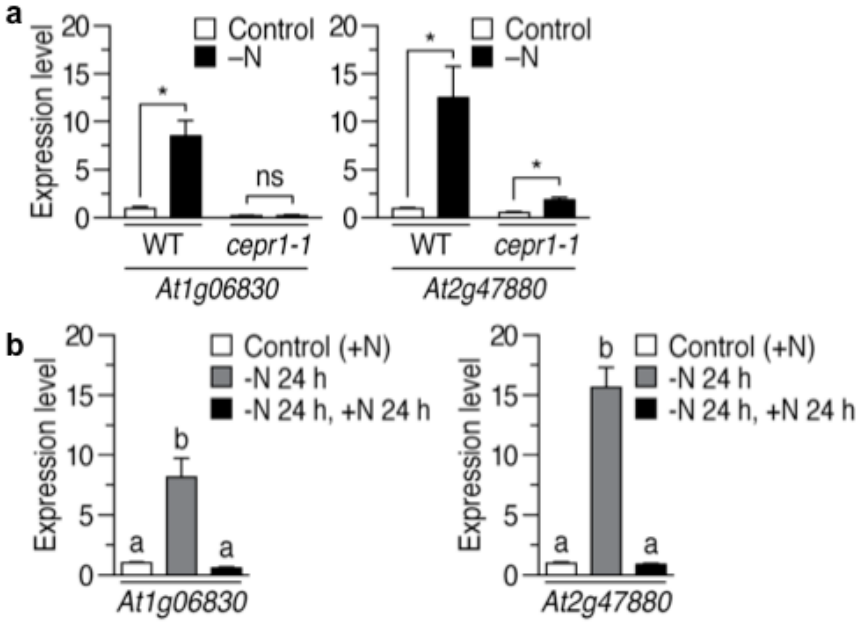

Fig. 12. 窒素欠乏および再投与による *At1g06830*，*At2g47880* 発現量への影響

(a) 窒素欠乏による発現量の変動．播種後 14 日目の野生株および *cepr1-1* 株を窒素欠乏処理し，24 時間後の地上部における発現量を比較した（mean±s.d.; n=3）．

(b) 窒素欠乏および再投与による発現量の変動．播種後 14 日目の野生株に対して窒素欠乏処理および再投与処理をそれぞれ 24 時間行ない，地上部における発現量を比較した（mean±s.d.; n=3）．

データは Student's *t* test および分散分析（one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test）を用いて解析した．$P < 0.05$.

At1g06830, *At2g47880* 各過剰発現株における窒素応答遺伝子群の発現

At1g06830，*At2g47880* 各過剰発現株では，根において *NRT2.1* の発現が誘導されることが明らかになった．そこで，*NRT2.1* 以外の NO_3^-トランスポーターや他の窒素応答遺伝子は，*At1g06830*, *At2g47880* 各過剰発現株で発現が誘導されているのかを調べた．まず，*NRT2.1* 以外の NO_3^-トランスポーターとしてよく知られている *NRT1.1*，*NRT3.1* の発現量を定量したところ，これらの遺伝子はまったく変動していなかった．他の窒素応答遺伝子として，*AMT1.1*，*NIA1*，*NIR1*，*NLP7* も調べたが，やはり変動していなかったことから，At1g06830 と At2g47880 は，*NRT2.1* の発現を特異的に制御していることが明らかとなった（Fig. 13）．以上の結果から，At1g06830 と At2g47880 は CEP-CEPR1 の下流で *NRT2.1* の発現を制御していることが明らかとなった．そこで *At1g06830* を *CEP Downstream 1*（*CEPD1*），*At2g47880* を *CEPD2* と命名し，さらに解析を進めることにした．

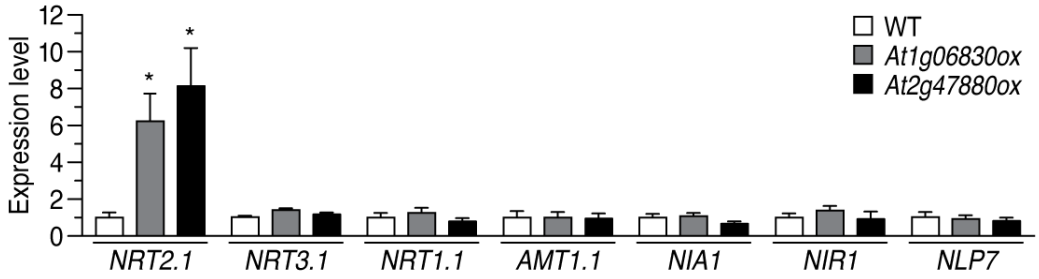

Fig. 13. ***At1g06830，At2g47880*** **各過剰発現株における窒素応答遺伝子群の発現**
播種後 9 日目の野生株および各過剰発現株の根における発現量（mean±s.d.; n=3）.データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

cepd1,2 株の表現型解析

CEPD が CEPR1 の下流でどのように機能しているのか調べるために，まず，*CEPD1* 遺伝子と *CEPD2* 遺伝子の T-DNA 挿入ライン（SALKseq_086598：*cepd1-1*，RATM13-0053：*cepd2-1*）を取り寄せ，*cepd1,2* 二重変異株を作製した（Fig. 14a）．これらの変異株で，*CEPD1*，*CEPD2* の全長の転写産物が生成されていないことを RT-PCR によって確認した（Fig. 14b）．野生株と *cepd1,2* 株を 14 日間垂直培養して主根と側根の長さの比を測定したところ，*cepd1,2* 株は野生株より側根が長くなる傾向がみられた．また，葉が黄緑色になっており，CEP 受容体欠損株である *cepr1-1* 株で観察された表現型と類似していた（Fig. 15 a-b）．

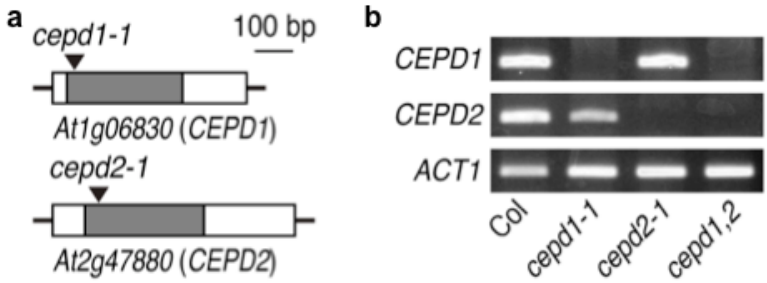

Fig. 14. *cepd1,2* 二重変異株の作製
(a)　*cepd1-1*（SALKseq_086598），*cepd2-1*（RATM13-0053）の T-DNA 挿入部位.
(b)　RT-PCR による発現確認．*ACT1* は内在性コントロールとして用いた.

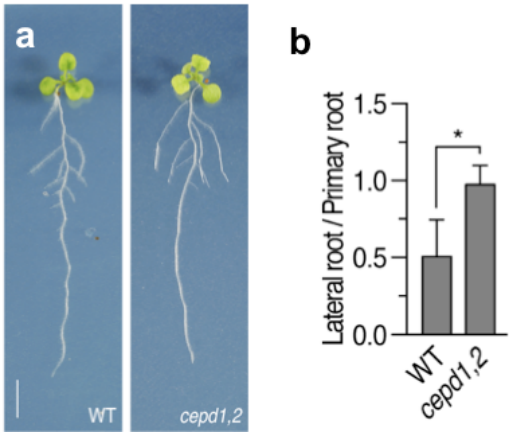

Fig. 15. *cepd1,2* 二重変異株の表現型
(a)　播種後 12 日目の野生株，*cepd1,2* 株の表現型．Scale bar: 5 mm.
(b)　播種後 12 日目の野生株，*cepd1,2* 株における側根/主根長の比率（mean±s.d.; n=5）．データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

cepd1,2 株の CEP 感受性

この *cepd1,2* 株が CEP への応答を示すのか解析したところ，野生株では CEP1 を与えると *NRT2.1* 発現量が 4 倍近くまで上昇したのに対して，*cepd1,2* 株では全く上昇しなかった．この結果から，*cepd1,2* 株は CEP 非感受性であることが明らかとなった（Fig. 16）．また *cepd1-1* 単独変異株では CEP 感受性が低下していたが，*cepd2-1* 株では野生株と差がなかったことから，CEP を介したシグナル伝達において CEPD1 が主要な機能を担っており， CEPD2 は補助的な因子として両者が重複して機能していることが明らかとなった．

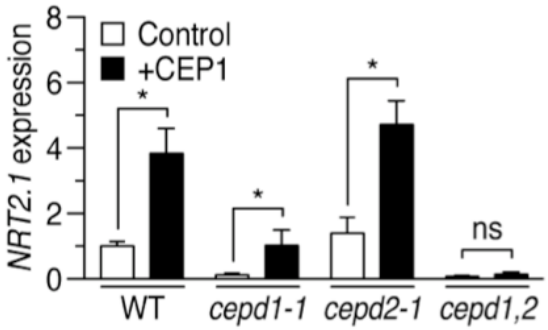

Fig. 16. *cepd1,2* 二重変異株および各単独変異株の CEP 感受性
CEP1 ペプチド（終濃度 1 μM）を含む培地で生育した播種後 9 日目の野生株と各変異株の根で *NRT2.1* 発現量を比較した（mean±s.d.; n=3）．データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

cepd1,2 二重変異株における全身的な窒素要求シグナリングの解析

植物は，一部の根が窒素欠乏を感知すると離れた根で *NRT2.1* の発現を上昇させ，相補的に NO_3^-を取り込む仕組みを持つ．この全身的な NO_3^-吸収の制御には CEP-CEPR1 が大きく関わっていることから，*cepd1,2* 株ではこの相補的な NO_3^-吸収が行われているのかを調べた．この解析では，野生株と *cepd1,2* 株に対して，一つの植物から出る根を二束に分ける“Split-root システム”と呼ばれる手法を用いた（Fig. 17a）．一方の根は NO_3^- 10 mM 培地に，もう一方は NO_3^- 0 mM 培地に置くという片側 NO_3^-欠乏処理を行い，24 時間後に根における *NRT2.1* の発現量を定量した．

その結果，野生株では，NO_3^- 10 mM 培地に置いた根で *NRT2.1* の発現が上昇したのに対し，*cepd1,2* 株ではそのような上昇は見られなかった（Fig. 17b）．*cepd1,2* 株では *cepr1-1* 株と同様, 相補的な NO_3^-吸収が行われていなかったことから, CEPD は CEPR1 の下流にあり，全身的な NO_3^-吸収の制御に必須であることが明らかとなった．

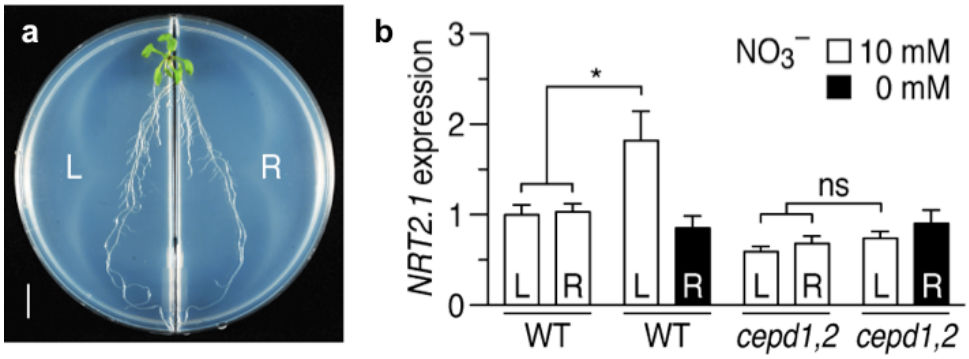

Fig. 17. 全身的な窒素要求シグナリングの解析

(a) Split-root システムの写真．二分割シャーレの左右で異なる組成の培地を入れることが可能.

(b) 野生株と *cepd1,2* 株に対して片側 NO_3^-欠乏処理を 24 時間行ない，左右の根における *NRT2.1* 発現量を比較した（mean±s.d.; n=3）．データは Student’s *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

CEPD 遺伝子の発現部位解析

CEPR1 は葉の維管束の師部側で発現していることから，その下流で産生される CEPD も同様の部位で発現していると考えられる．そこで，本節では *CEPD* 遺伝子の発現部位を調べるために，プロモーターGUS 解析，および葉と根における *CEPD* 遺伝子発現量の定量を行った．*CEPD1, CEPD2* の *promoter:GUS* 形質転換株を作製し，播種後 10 日目の植物を GUS 染色したところ，*CEPD1* のプロモーター活性は CEPR1 と同様，葉の維管束の師部側で特異的に検出され，根など他の組織では検出されなかった（Fig. 18a-b）．また，*CEPD2* の発現部位は *CEPD1* と同様であった（Fig. 18c-d）．

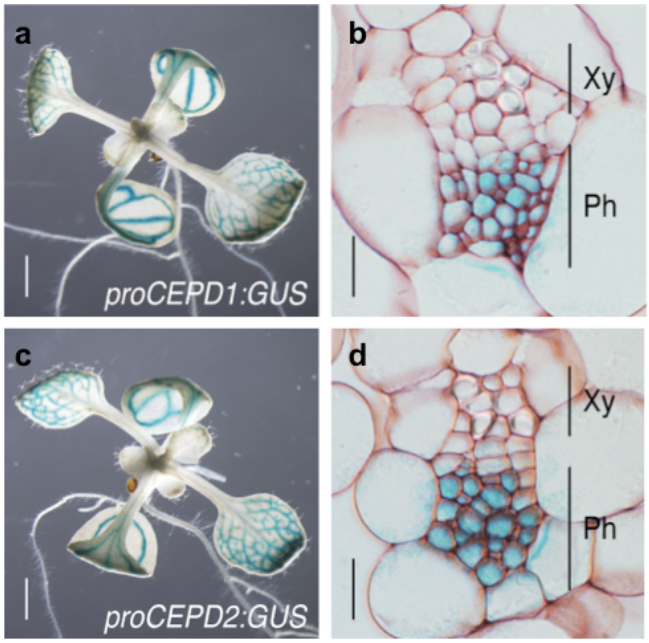

Fig. 18. CEPD1，CEPD2 のプロモーターGUS 解析
(a)　播種後 10 日目の *proCEPD1:GUS* 発現シロイヌナズナ芽生え全体の GUS 染色. Scale bar: 1 mm.
(b)　(a)の葉の横断面．Scale bar: 10 µm.
(c)　播種後 10 日目の *proCEPD2:GUS* 発現シロイヌナズナ芽生え全体の GUS 染色. Scale bar: 1 mm.
(d)　(b)の葉の横断面．Scale bar: 10 µm.

次に，qRT-PCR によって，播種後 9 日目の野生株の地上部と根における *CEPD* 発現量を定量した．その結果，*CEPD1* および *CEPD2* ともに地上部だけで発現しており，根では全く発現していなかった．また CEP1 ペプチドを培地に加えると，地上部では *CEPD1* 発現量が 5 倍以上，*CEPD2* 発現量が 3 倍以上上昇したが，根では上昇がみられなかった（Fig. 19）．以上の結果をまとめると，*CEPD* 遺伝子群は葉の維管束の師部側で特異的に発現しており，根では全く発現していないことが明らかとなった．

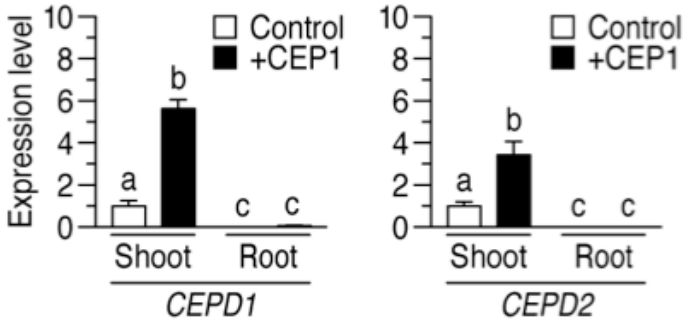

Fig. 19. CEP1 ペプチドを投与した野生株の葉と根における *CEPD* 遺伝子群の発現量
通常培地および CEP1 ペプチドを含む培地で野生株を培養し，播種後 9 日目の葉と根における発現量を定量した（mean±s.d.; n=3）．データは分散分析（one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test）を用いて解析した．$P < 0.05$.

GFP-CEPD1/cepd1,2 株の機能相補解析

葉で発現した CEPD が根において *NRT2.1* の発現を誘導することから，CEPD タンパク質は根に移行して機能していると予想した．そこで，タンパク質レベルで CEPD の局在を明らかにするため，*CEPD1 promotor:GUS* と同じプロモーター領域を使用して GFP タグ融合 CEPD1 を発現する植物体を作製した．通常は目的タンパク質の C 末端側にタグを融合することが多いが，CEPD1-GFP/ *cepd1,2* 株では表現型の回復がみられなかったことから，CEPD は C 末端側に活性に重要な部位があることが示唆された．そこで，N 末端側にタグ融合して活性が確認できた *GFP-CEPD1/ cepd1,2* 株を局在解析に使用した（Fig. 20）．

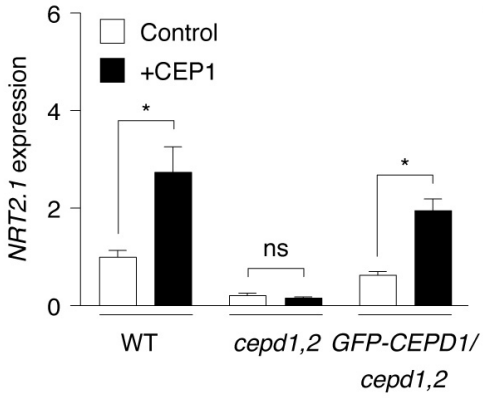

Fig. 20. *GFP-CEPD1/cepd1,2* 株の CEP 感受性
CEP1 ペプチド（終濃度 1 μM）を含む培地で生育した播種後 9 日目の野生株，*cepd1,2* 株，*GFP-CEPD1/cepd1,2* 株の根で *NRT2.1* 発現量を比較した（mean±s.d.; n=3）．データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

GFP–CEPD1 の局在解析

cepd1,2 株および *GFP-CEPD1* 株の根を PI 染色し，共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果，*CEPD* 遺伝子は葉の維管束の師部だけで発現しているにもかかわらず，タンパク質レベルにおいては根で明瞭な GFP-CEPD1 のシグナルが検出された（Fig. 21a）．CEP1 ペプチドを与えて 24 時間後に観察するとシグナルが強くなっていたが，これは CEP 処理による *CEPD* 発現量の上昇を反映したものだと考えられる．また，窒素欠乏処理によっても GFP-CEPD1 のシグナルは増強しており，再び窒素を与えるとシグナルは通常レベルまで回復した（Fig. 21b）．

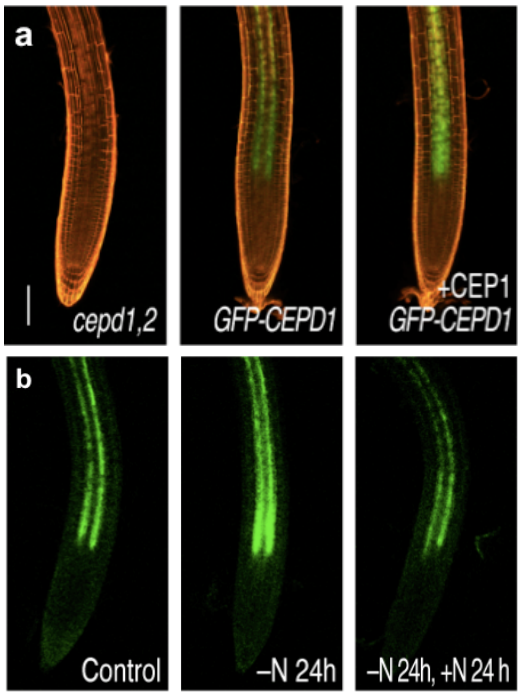

Fig. 21. 根における GFP-CEPD1 局在解析

(a) 播種後 9 日目の *cepd1,2* 株および *GFP-CEPD1* 株の根における GFP-CEPD1 の局在．CEP1 ペプチド（終濃度 1 μM）を含む培地に移すと，24 時間後にはシグナルが増強した（右）．Scale bar: 100 μm.

(b) 播種後 9 日目の *GFP-CEPD1* 株に対して窒素欠乏処理 24 時間（中央）および窒素再投与処理 24 時間（右）を行ない，根における GFP-CEPD1 のシグナル強度を観察した．

次に，GFP-CEPD1 が根の中でどの細胞層に局在しているのか調べるために，CEP1 ペプチドを与えて 24 時間後の *GFP-CEPD1* 株の主根を用いてビブラトーム切片を作製した．GFP-CEPD1 は師部側で最も強く局在しており，師管から内皮へと拡散している様子が観察された（Fig. 22a-b）．そして，内皮細胞内では細胞質および核に局在していた（Fig. 22c）．以上の結果をまとめると，葉の維管束師部側で発現した CEPD は師管を通って根に輸送され，周辺の細胞の核へと移行して機能している可能性が高い．

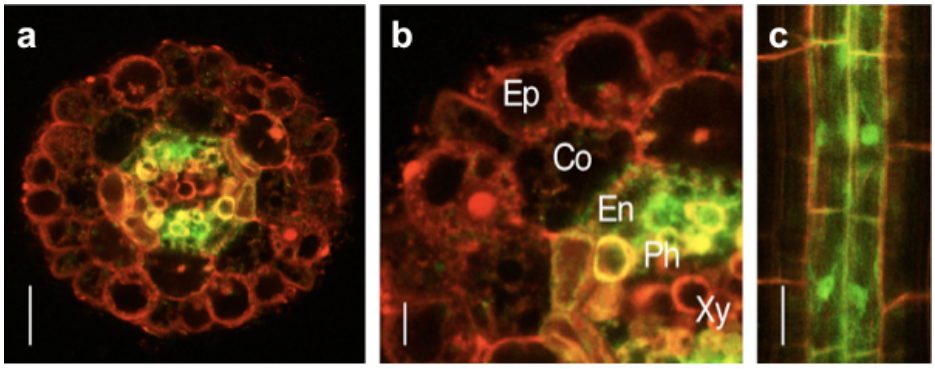

Fig. 22. 詳細な GFP-CEPD1 の局在解析
播種後 9 日目の *GFP-CEPD1* 株を CEP1 ペプチド（終濃度 1 μM）を含む培地に移し，24 時間後の植物体の根を観察に用いた．
(a) *GFP-CEPD1* 株の根の横断切片．Scale bar: 25 μm.
(b) (a)の拡大図．Ep：外皮，Co：皮層，En：内皮，Ph：師管，Xy：道管．Scale bar: 10 μm.
(c) 根の内皮細胞における GFP-CEPD1 の局在．Scale bar: 20 μm.

接木実験による CEPD の移行解析

GFP-CEPD1 が根で非特異的に発現してシグナルが根で検出された可能性を完全に排除し，GFP-CEPD1 が葉から根へ移行していることを証明するために，*GFP-CEPD1* 株と *cepd1,2* 株を相互に組み合わせて胚軸接木を行った．地上部の接穂，地下部の台木ともに *GFP-CEPD1* 株を用いたポジティブコントロールでは，根で GFP-CEPD1 のシグナルが確認できた．次に，地上部を *GFP-CEPD1* 株，地下部を *cepd1,2* 株で組み合わせると，ポジティブコントロールと同様に根でシグナルが検出できた．一方，地上部を *cepd1,2* 株，地下部を *GFP-CEPD1* 株と逆の組み合わせを行ったところ，根でシグナルは検出できなかった（Fig. 23a）．

また，葉から移行した GFP-CEPD1 が根において *NRT2.1* の発現を実際に誘導するのか調べるため，接木した植物の根における *NRT2.1* 発現量を qRT-PCR で定量した．*GFP-CEPD1* 株同士を接木した場合をコントロールとすると，*cepd1,2* 株同士では *NRT2.1* 発現量はコントロールの 3 割程度まで低下していた．一方，地上部を *GFP-CEPD1* 株，地下部を *cepd1,2* 株という組み合わせで接木すると，コントロールと同程度まで *NRT2.1* 発現量は回復した（Fig. 23b）．以上の結果から，GFP-CEPD1 が根で非特異的に発現している可能性は排除され，CEPD は葉から根へ師管を通って移行して機能することが証明された．

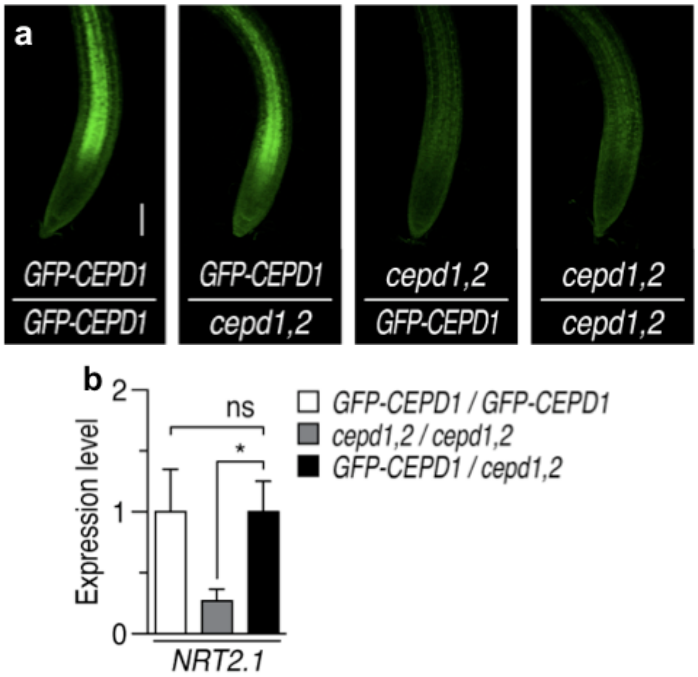

Fig. 23. *GFP-CEPD1* 株と *cepd1,2* 株を用いた相互接木実験

(a) 接ぎ木した植物の根における GFP-CEPD1 の局在．上段は接穂，下段は台木を示す．Scale bar: 100 µm.

(b) 接木した植物の根における *NRT2.1* 発現量（mean±s.d.; n=3）．データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

全身的窒素要求シグナリングにおける CEPD の作用機構

植物は，片側 NO_3^-処理を行うと，反対側の NO_3^-が十分に存在する根で *NRT2.1* の発現を上昇させ，相補的に NO_3^-を取り込む仕組みを持っている．これまでの解析から，この全身的な NO_3^-吸収の制御には CEPD が必須であり，CEPD は葉から根へ師管を通って移行することが明らかとなった．しかし，局所的な窒素欠乏時に，CEPD はどのように NO_3^-が十分に存在する根だけに *NRT2.1* の発現を誘導しているのかが分かっていない．この疑問に対して，以下の 2 つの仮説を考え（Fig. 24），これらの仮説についてそれぞれ検証を行った．

仮説①

CEPD は周囲に NO_3^-が存在する根だけに移行して，*NRT2.1* の発現を誘導する．

仮説②

CEPD は周囲の NO_3^-量に関係なくどの根にも移行するが，周囲に NO_3^-が存在する根だけで *NRT2.1* の発現を誘導できる．

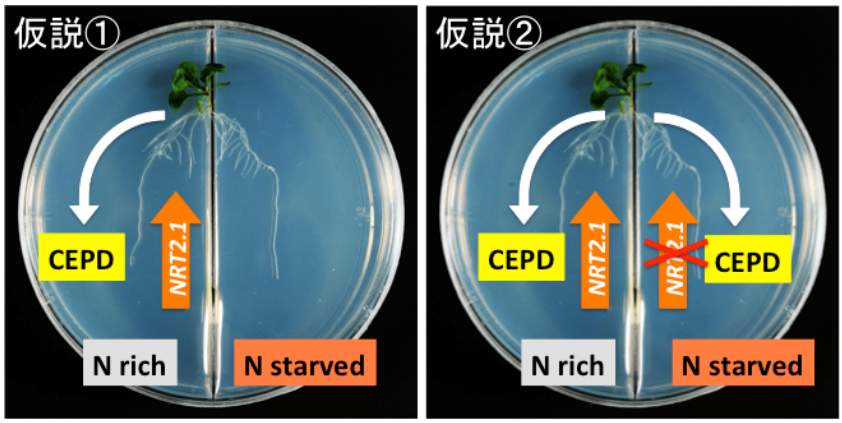

Fig. 24. 仮説①・②のモデル図

仮説①の検証　*GFP-CEPD1* 株の片側 NO_3^- 欠乏処理

CEPD が周囲に NO_3^- が存在する根だけに移行するのであれば, *GFP-CEPD1* 株を片側 NO_3^- 欠乏処理した場合，NO_3^- 10 mM 培地に置いた根の方がより GFP-CEPD1 のシグナルが強くなると考えられる．そこで，*GFP-CEPD1* 株を 24 時間片側 NO_3^- 欠乏処理し，両側の根における GFP-CEPD1 の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した．その結果，NO_3^- 10 mM 培地に置いた根と NO_3^- 0 mM に置いた根の比較では，GFP-CEPD1 のシグナル強度に差は見られなかった（Fig. 25）．このことから，CEPD が周囲に NO_3^- が存在する根だけに選択的に移行する可能性は低いと考えられる．

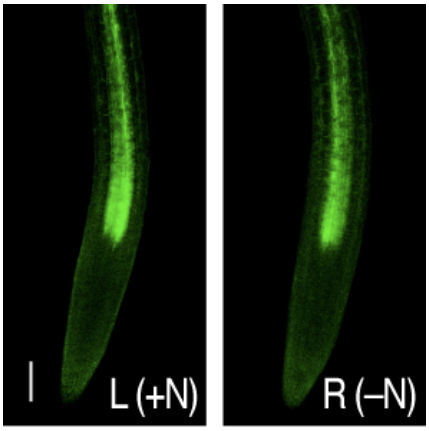

Fig. 25. 片側 NO_3^- 欠乏処理した *GFP-CEPD1* 株の根における GFP-CEPD1 の局在
(c)　NO_3^- 10 mM に置いた根（左）と NO_3^- 0 mM に置いた根（右）．Scale bar: 100 μm.

仮説②の検証　CEPD 過剰発現株の片側 NO_3^-欠乏処理

CEPD 過剰発現株では，本来葉でしか発現しない *CEPD* が根においても十分に発現しており，窒素十分条件下で培養した場合においては野生株よりも根における *NRT2.1* 発現量が高くなっている．この状態で片側 NO_3^-欠乏処理を 24 時間行った場合，周囲の NO_3^-量によって根における *NRT2.1* の発現量がどのように変動するのか，qRT-PCR によって定量した．その結果，*CEPD1* 過剰発現株では，NO_3^- 10 mM 培地に置いた根では *NRT2.1* 発現量が野生株の 2 倍程度上昇したのに対し，NO_3^- 0 mM 培地に置いた根ではそのような上昇はみられなかった（Fig. 26a）．このとき，それぞれの根における *CEPD1* 発現量を調べたところ，周囲の NO_3^-量に関係なく発現量は両側の根で等しかった（Fig. 26b）．この結果は，*CEPD2* 過剰発現株でも同様であった（Fig. 26a-b）．

以上の結果をまとめると，葉で発現した CEPD は周囲の NO_3^-量に関係なくどの根にも等しく移行するが，周囲に NO_3^-が存在する根においてのみ *NRT2.1* の発現を誘導することが明らかとなった．

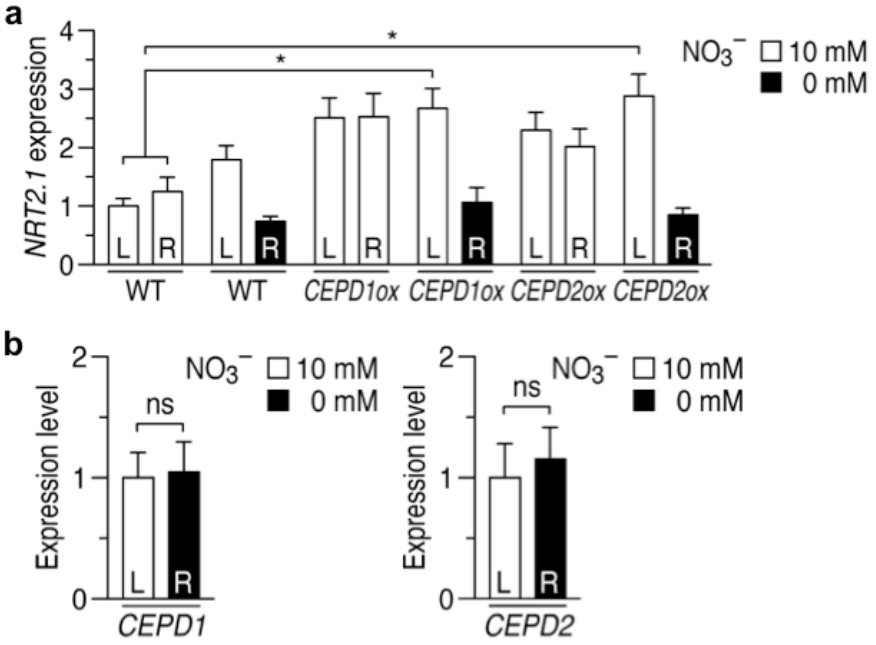

Fig. 26. *CEPD* 過剰発現株の片側 NO_3^-欠乏処理

(a)　*CEPD1* および *CEPD2* 過剰発現株に対して片側 NO_3^-欠乏処理を 24 時間行ない，左右の根における *NRT2.1* 発現量を比較した（mean±s.d.; n=3）．

(b)　(a)と同じサンプルを用いて，*CEPD1*，*CEPD2* 発現量を測定した（mean±s.d.; n=3）．

データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

考察

全身的な窒素要求シグナル伝達の研究は 1970 年代から行なわれており，そのなかで葉から根に向かう下向きのシグナルによって，根における NO_3^-吸収が制御される可能性は示唆されていたものの，その分子実体は長らくの間不明だった．本章では，ペプチドホルモン CEP の下流で産生される 2 次シグナルの中からポリペプチド CEPD を同定し，葉から根へ向かう CEPD が根における NO_3^-吸収を制御することを証明した．本研究において得られた結果をもとに，CEP を介した全身的な窒素要求シグナル伝達の全貌をまとめる（Fig. 27）．

（1） 局所的な窒素欠乏を感知した根で CEP が産生し，道管を通って葉へ輸送される．
（2） 蒸散流によって CEP は葉の道管で濃縮され，師管側へと拡散する．
（3） CEP は師管に存在する CEPR1 に認識され，CEPD ポリペプチドが産生される．
（4） CEPD は師管を通って葉から根へ長距離移行し，皮層・表皮細胞の核へ移行する．
（5） 周囲に NO_3^-が存在する根においてのみ CEPD は *NRT2.1* の発現を誘導する．

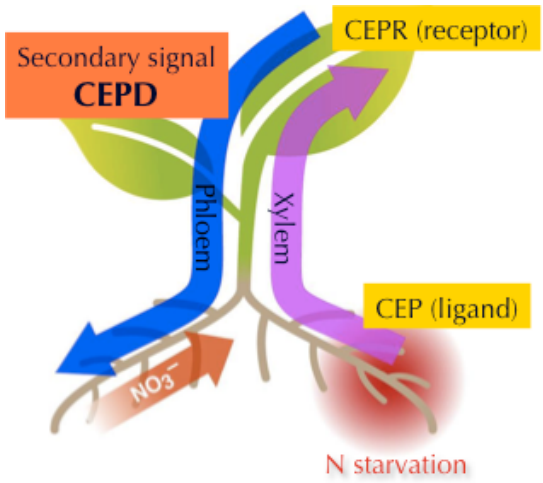

Fig. 27. CEP-CEPR-CEPD を介した全身的な窒素要求シグナリング

これまでの研究では，葉から根へ移行して NO_3^-吸収を制御するシグナル分子の候補として，アミノ酸や植物ホルモン，二次代謝物などが挙げられていたが，いずれも決定的な証拠は得られていなかった．2016 年には，光に応答して葉で産生される bZIP 型転写因子 HY5 が，師管を通って根へ移行して NO_3^-トランスポーター*NRT2.1* の発現を誘導することが報告されたものの [56]，全身的な窒素要求シグナル伝達への関与は不明だった．2002 年に Forde は，「師管液中には低分子量のタンパク質も存在しており，これらの分子が葉から根へ窒素情報を伝える可能性も考慮しなければならない」と述べており [57]，本章で発見したポリペプチド CEPD1/2 はまさにこの予想に当てはまるシグナル分子である．

シロイヌナズナではグルタレドキシンは 3 クラスに分類されており，クラス Ⅰ，Ⅱ のグルタレドキシンは酸化還元反応に関与することが知られている一方，CEPD1（At1g06830）と

CEPD2（At2g47880）が含まれるクラスⅢについては，酸化還元活性を持つと主張する報告はあるものの決定的な証拠は得られておらず，生化学的機能は不明である [58,59]．クラス III は全長が 100 アミノ酸程度と非常に小さく，植物特異的に見出されるグループであり，シロイヌナズナのゲノム上には 21 個存在している．そのなかで，花弁や葯の発生に関わる ROXY1/2 や [54,55], NO_3^-やサイトカイニンに応答して根の伸長を負に制御する AtGRXS3/4/5/8 などが知られているものの [60]，多くのクラスⅢグルタレドキシンの機能は未知である．クラスⅢグルタレドキシンファミリーには C 末端側に ALWL モチーフを持つものが多いが，今回見つかった CEPD ファミリーではそのモチーフは保存されておらず [61]，分子系統樹において CEPD の近くに存在する At2g30540 と At3g62960 も同様に ALWL モチーフを持っていない．

本研究の後に，At2g30540 を CEPD-like1（CEPDL1），At3g62960 を CEPDL2 と命名して当研究室で解析を進めたところ，CEPDL2 は CEPD1/2 よりも強い NO_3^-吸収促進活性を持つことが見出された [62]．CEPDL2 は葉の成長に必要な窒素量が不足すると CEPD1/2 同様に葉の師管で産生する一方，根の NO_3^-欠乏には全く応答しないため，本章の維管束マイクロアレイ解析では CEPDL2 は候補として挙がっていなかったと考えられる．土壌の窒素欠乏時には CEP-CEP 受容体-CEPD システムが，地上部の窒素不足時には CEPDL2 システムが根における NO_3^-吸収を制御しており，これらの協調的な働きによって植物は変動する外的・内的な窒素環境に適応していることが分かってきた．

また，窒素欠乏時に CEPD ファミリーが誘導されるためには，土壌の NO_3^-量を地上部へ伝達するサイトカイニンが必要ということも明らかとなっている．サイトカイニン輸送体 ABCG14[63,64] の変異株では，窒素欠乏状態でも CEPD ファミリーの産生が抑制されるため，植物は土壌中に NO_3^-が存在していなければ無駄に CEPD ファミリーを合成しないようにしていると考えられる．加えて，根に移行した CEPD は，周囲に NO_3^-が存在する根においてのみ *NRT2.1* の発現を誘導することから，植物は葉での CEPD 産生と根での *NRT2.1* 発現誘導の 2 ヶ所で土壌中の NO_3^-量の情報を統合し，最終的な NO_3^-吸収量を決定する合理的なシステムを獲得したのではないだろうか．ただし，植物の根がどのように周囲の NO_3^-量を感知しているかは不明な点が多く，今後の解析が期待される．

2016 年の Paultre らの報告によると，シロイヌナズナ師管液中のタンパク質の多くは分子量が 10-70 kDa であり [65]，これは師部伴細胞で合成したタンパク質を原形質連絡によって師管へ積み込む際のサイズの限界だといわれている [66]. CEPD を含めこれまでに同定された葉で産生される師管移行性のタンパク質, 例えば, 花成ホルモン FLOWERING LOCUS T（FT）[67,68] や根での Fe 吸収を制御する IRONMAN（IMA）[69]，光に応答して根での NO_3^-吸収を促進する転写因子 HY5[56] は，いずれも分子量が 70 kDa 未満である（Table. 2）．言い換えれば，師管を通る低分子量のタンパク質は, CEPD のような長距離移行シグナル分子である可能性が高い.

Table. 2. 主な師管移行性タンパク質の分子量

Protein name	Length (aa)	Mw (kDa)
CEPD1	99	10.9
FT	175	19.8
IMA1	50	5.4
HY5	168	18.4

師管液に含まれるタンパク質の網羅的解析は 2000 年代の半ばから行なわれており，キュウリとカボチャの師管液のプロテオミクス解析 [70] を皮切りに，その後，ポプラ [71] やセイヨウアブラナ [72]，トマト [73] でも同様の解析が実施された．2016 年のシロイヌナズナ師管液のプロテオミクス解析では，クラスⅢグルタレドキシンの Grx2 が同定されており [74]，CEPD/CEPDL 以外のグルタレドキシンも師管移行性ポリペプチドである可能性を示すとともに，師管液プロテオミクス解析による新規の長距離移行シグナル分子の同定が期待される．師管液の採取は，切断面がカロースの蓄積で急速に塞がれてしまうため，道管液と比較して難しいといわれているが，近年の質量分析計の感度は目覚ましい進歩を遂げているため，従来よりも少量の師管液サンプルでも解析可能ではないかと考える.

窒素以外の栄養素における全身的な吸収制御の仕組みについても研究が進められており [75,76]，例えばリン欠乏状態になると，地上部で産生された miR399/827 が根へ移行し，PO_4^-トランスポーターの分解に関わる PHO2 の発現を抑制することで，根における PO_4^-トランスポーター量を増やして PO_4^-吸収を促進することが知られている [77–80]．一方，窒素やリンとともに肥料の三要素と呼ばれるカリウムについては，全身的な吸収制御機構があるかは不明である．また，硫黄欠乏状態では地上部におけるグルタチオン量が低下し，根における SO_4^{2-}トランスポーターの発現が低下することから，グルタチオンが地上部からの硫黄欠乏シグナルだといわれているが [81,82]，これについてはさらなる解析が待たれる [83]．さらに，2018 年には，葉で産生されたポリペプチドの IRONMAN（IMA）が長距離移行して，根における鉄イオン吸収を制御することが報告された [69]．鉄欠乏時には転写因子の

bHLH105/115 が根の Fe トランスポーターなどの発現を促進することが知られており，IMA はこの転写因子群がユビキチン修飾によって分解されるのを防ぐことで鉄イオン吸収を促進する [84]．このように，まだ主要なシグナル分子群が同定されていない栄養素も多いため，本研究で得られた窒素吸収を制御する CEP-CEPR-CEPD 経路の知見が，他の栄養素における全身的な吸収制御の理解の一助となることを期待する．

本研究では，ペプチドホルモン CEP によって葉の維管束で発現変動する遺伝子群をマイクロアレイ解析で探索し，師管を移行しうる低分子量のタンパク質候補の中から，過剰発現させたときに根で *NRT2.1* の発現を誘導した CEPD1/2 に着目した．他の候補遺伝子は *NRT2.1* の発現は誘導しなかったものの，CEP 依存的に葉の師管で産生するため，CEPD1/2 とは異なる機能をもつ 2 次シグナル候補である可能性は残されている（Table. 1）．今後はこれらの候補遺伝子についても，欠損株を用いた解析などによって機能を明らかにしたいと考えている．

材料と手法

改変 MS 培地の組成

窒素源として NH_4Cl および KNO_3 を用い，その他の栄養源は通常の MS 培地の 1/2 濃度とした．0.5%スクロースを添加し，pH5.7 となるよう KOH で調整した．本文中で使用した窒素条件を下記に記す．

窒素条件		N・K 源		
NH_4^+ [mM]	NO_3^- [mM]	NH_4Cl [mM]	KNO_3 [mM]	KCl [mM]
10	10	10	10	0
0	10	0	10	0
0	0	0	0	10

GUS 染色

CEPR1 promoter:GUS 形質転換株 T2 株の種子を滅菌・春化処理し，B5 寒天培地 (1.5% agar) に播種して恒明下 22°C で培養を行った．生育 10 日目の株全体を適量の GUS 染色液（1 ml 中に，12.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 40 µl, 2.5 mM $K_4Fe(CN)_6$ 40 µl, Triton X-100 3 µl，メタノール 200 µl, 200 mM リン酸バッファー (pH 7.0) 500 µl, H_2O 167 µl, 19.15 mM X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide Cyclohexylammonium Salt) 50 µl） に浸し，真空ポンプで減圧したデシケーター内に 20 分おいた後，37°C で 3 時間インキュベートし，70%エタノールで脱色した．

ミクロトーム切片の作製

GUS 染色した植物を 70%エタノールで脱色した後，FAA (3.7%ホルムアルデヒド，5%酢酸，50%エタノール) で一晩固定化した．固定化した子葉を 1.5 ml チューブに入れ，1 ml の 50%エタノールを加えて静置した．その後，60%エタノール，70%エタノール，80%エタノール，90%エタノール，95%エタノール，99.5%エタノール×3 と 15 分おきに置換した．99.5%エタノール 1 ml に置換されたものから 250 µl を除き，同量の 50%テクノビット 7100 溶液 (Heraeus Kulzer) を加え転倒混和し 15 分静置した．500 µl, 1 ml と同様の操作を行い，50%テクノビット 7100 溶液／エタノールと置換した．さらに，100%テクノビット 7100 溶液を用いて同様の操作を行い，100%テクノビット 7100 溶液に置換して 4°C で一晩おいて固めた．固化した樹脂サンプルから，ミクロトーム (Leica RM2235) を用いて 4 µm の厚さの切片を作製した．切片は 0.05%ナイルレッドで染色し，Entellan (Merck) で封入した後，光学顕微鏡 (Olympus BX60) で観察した．

窒素欠乏処理

通常の改変 MS 寒天培地 (1.5% agar) を角シャーレに作成し, 滅菌・春化処理したシロイヌナズナ Nössen 株を播種し, インキュベーター (22°C, 明所) で垂直培養を行なった. 播種後 14 日目の株を窒素欠乏条件の改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) に移し, 24 時間後に地上部を回収した. コントロールには, 通常条件の改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) に移した植物を使用した. RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて回収した根からトータル RNA を精製し, 精製 RNA 1 µg から Superscript IV first-strand synthesis system (Invitrogen) を用いて一本鎖 cDNA を合成した. プライマーと Taqman probe は Universal Probe Library Assay Design Center の ProbeFinder software（Roche）を用いて設計した. StepOne system (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム qRT–PCR を実施し, リファレンス遺伝子には *EF-1α* を用いた.

CEP1 ペプチド投与処理

通常の改変 MS 寒天培地 (1.5% agar) を角シャーレに作成し, 滅菌・春化処理したシロイヌナズナ Nössen 株を播種し, インキュベーター (22°C, 明所) で培養を行なった. 培養 9 日目の株を CEP1 ペプチド (終濃度 10^{-6} M) を添加した改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) に移し, 24 時間後に子葉を回収した.

Alexa488–CEP1 の合成

Alexa Fluor 488 succinimidyl ester 0.5 mg, Fmoc-[Lys^3]CEP1 3.0 mg, $NaHCO_3$ 1.0 mg を 50%アセトニトリル 200 µl に溶解し, 室温, 暗所で 2 時間攪拌した. このペプチド溶液を HPLC および凍結乾燥によって精製し, 凍結乾燥を行った. 得られた Fmoc-[(Alexa488)Lys^3]CEP1 に 20%ピペリジン/アセトニトリル 200 µl を加え, 室温, 暗所で 1 時間静置して脱保護を行った. そして HPLC および凍結乾燥によって精製し, [(Alexa488)Lys^3]CEP1(Alexa488-CEP1) を得た.

CEP1 および Alexa488–CEP1 添加培地でのシロイヌナズナの培養

CEP1 および Alexa488-CEP1 (終濃度各 1 µM) をそれぞれ添加した改変 MS 寒天培地(0.7% agar) を作製し, 滅菌・春化処理後のシロイヌナズナ Nössen 株の種子を等間隔に約 50 粒播種した. インキュベーター（22°C, 明所）で培養を行い, 培養 9 日目の株から根を回収した.

Alexa488–CEP1 の局在観察

改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) を作製し, 滅菌・春化処理後のシロイヌナズナ Nössen 株の種子を等間隔に約 50 粒播種した. インキュベーター（22°C, 明所）で培養を行い,培養 9 日目の株を Alexa488-CEP1 (終濃度 1 µM) を添加した改変 MS 液体培地に移し, 6 時間後に葉を蛍光実体顕微鏡で観察した. 切片は, 上記と同様の方法で作成し, 共焦点レーザー顕微鏡で観察した. なお, この操作は, 共同研究者の田畑亮博士が行った.

維管束の単離 [53]

改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) を作製し, 滅菌・春化処理後のシロイヌナズナ Nössen 株及び *cepr1-1* 株の種子を等間隔に約 100 粒播種した. 同様に CEP1 ペプチド (終濃度 1 μM) を添加した改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) には Nössen 株の種子を播種した. インキュベーター（22°C, 明所）で培養を行い, 培養 8 日目の株から子葉を回収した. 約 20 株分の子葉を 1.5 ml チューブに入れ, そこに酵素液 (0.75% Cellulase Onozuka R-10（Yakult）, 0.25% Macerozyme R-10 (Yakult), 0.4 M マンニトール, 5 mM MES-KOH (pH 5.6), 8 mM $CaCl_2$) 1 ml を加えた. Bioruptor UCD-250 (Cosmo Bio) を用いてソニケーションを各 5 秒間, 3〜5 セット行い, 脆くなった子葉をシャーレ上に広げ, 実体顕微鏡下でピンセットを用いて維管束を回収した. マイクロアレイ解析を行うにあたって, 約 200 株の植物体から子葉維管束を回収した. RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて回収した根からトータル RNA を精製した. 調整した RNA について, 東京大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻の杉澤由姫子さんに依頼し, *Arabidopsis* Gene 1.0 ST Array によるマイクロアレイ解析を行った. なお, この操作は共同研究者の田中美名博士が行った.

各候補遺伝子の過剰発現株の作製

各遺伝子の全長 ORF を PCR によって増幅し, 得られた DNA 断片を In-fusion Cloning Kit (TAKARA) を用いて *Sac*I 及び *Xba*I 処理したベクターpBI121 へ導入した. このベクターはアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ Col 株に導入し, 得られた T1 種子を 50 mg/l カナマイシン, 50 mg/l カルベニシリン, 100 mg/l セフォタキシムを含む B5 寒天培地で選抜した. これらのベクター作製操作および以下の形質転換操作は, 共同研究者の田中美名博士が行った.

2 次シグナル候補過剰発現株の根における *NRT2.1* 発現量

改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) を作製し, 滅菌・春化処理した 2 次シグナル候補の各過剰発現株および Col 株の種子を等間隔に約 100 粒播種した. インキュベーター (22°C, 明所) で培養を行い, 培養 9 日目の株から根を回収した. トータル RNA を精製し, 各過剰発現株の根における *NRT2.1*, および各候補遺伝子の発現量を定量した.

CEP1 ペプチド処理における *At1g06830*, *At2g47880* 発現量

CEP1 ペプチド (終濃度 1 μM) を添加した改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) を作製し,春化処理後のシロイヌナズナ Nössen 株, 及び *cepr1-1* 株の種子を等間隔に約 50 粒播種した. インキュベーター (22°C, 明所) で培養を行い, 培養 9 日目の株から子葉を回収した. CEP1 ペプチド濃度を 10 nM, 100 nM, 1 μM と変えた場合も同様の操作を行った. タイムコースでは, 通常の改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) で 7 日間培養した Nössen 株を CEP1 ペプチド (終濃度 1 μM) を添加した培地に移し, 2, 6, 12, 24, 48 時間後にそれぞれ子葉を回収した.

窒素欠乏・再投与処理における *At1g06830, At2g47880* 発現量

Nössen 株および *cepr1-1* 株について，上記と同様の操作を行った．窒素の再供給では,窒素欠乏条件で 24 時間培養した植物を通常の培地に移し，さらに 24 時間培養してから地上部を回収した．

cepd1,2 二重変異株の作製

まず *cepd1, cepd2* を準備した．*cepd1* (Col 由来) は SALK 研究所が提供する T-DNA タグラインから 1 系統単離し (SALKseq_086598：*cepd1-1*), Nössen に対して戻し交配を 2 回行った．*cepd2* (Nössen 由来) は理研バイオリソースセンターが提供するトランスポゾンタグラインから 1 系統単離した (RATM13-0053：*cepd2-1*). *cepd1-1* に *cepd2-1* を掛け合わせ F1 世代の種子を得た．F1 世代の株を自家受精させることで得た F2 世代の中から, *cepd1,2* 二重ホモ株を探索した．Nössen 株, *cepd1-1* 株, *cepd2-1* 株，および *cepd1,2* 株の地上部からそれぞれ RNA を精製し, cDNA 合成を行った．得られた cDNA をテンプレートとして, RT-PCR を行った．

片側 NO_3^- 欠乏処理

改変 MS 寒天培地 (1.5% agar) を角シャーレに作成し，そこに滅菌インキュベーター (22°C, 明所) で垂直培養を行い, 7 日目の株の主根を根端から約 5 mm の部分で切り，そのまま 4 日間培養を続けた，側根が 2 本生えてきたら，改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) を入れた Split シャーレ (Kord-Valmark #2903, USA) に移し，さらに 7 日間培養した．そして，Split シャーレの一方に NO_3^- を十分に含む培地，もう一方に NO_3^- を含まない培地 (ともに 0.7% agar) を入れ，根を 2 束に分けた植物を置き, 24 時間後にそれぞれの根を回収した．

CEPD1 promotor:GUS および *CEPD2 promotor:GUS* 解析

CEPD1 及び *CEPD2* のプロモーター領域 2.0 kb を PCR によって増幅し，得られた DNA 断片を In-fusion Cloning Kit (TAKARA) を用いて *Sma*I 及び *Xba*I 処理したベクターpBI101 へ導入した．以降の操作は *CEPR1 promoter:GUS* 解析と同様である．

GFP-CEPD1 形質転換体の作製

CEPD1 遺伝子のプロモーター領域 2.0 kb, *CEPH* の終止コドンを除いた全長 ORF, そして GFP の開始コドンか終止コドンまでを PCR により増幅した. 得られた DNA 断片を In-fusion Cloning Kit (TAKARA) を用いて *Hind*Ⅲ及び *BamH* Ⅰ処理したベクターpCAMBIA1300-BASTA へ導入し, GFP-CEPD1/ pCAMBIA ベクターを作製した. このベクターはアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ *cepd1,2* 株に導入し, 得られた T1 種子を 10 mg/l Basta, 50 mg/l カルベニシリン, 100 mg/l セフォタキシムを含む B5 寒天培地で選抜した.

GFP-CEPD1/cepd1,2 株および *cepd1,2* 株の垂直培養

改変 MS 寒天培地 (1.5% agar) を角シャーレに作成し, そこに滅菌・春化処理した *GFP-CEPD1/cepd1,2* 株, および *cepd1,2* 株の種子を直線上に 5 mm 間隔で播種した. インキュベーター (22°C, 明所) で垂直培養を行い, 生育 9 日目の株を観察に使用した. 根を切り取って 50 µg/ml ヨウ化プロピジウム溶液 (Wako) に 1 分間浸して染色し, 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV300) によって根の縦断面を観察した. また, 生育 9 日目の *GFP-CEPD1/cepd1,2* 株を CEP1 ペプチド (終濃度 1 µM) を含む改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) に移し, 24 時間後に同様の手順で観察を行った.

窒素欠乏処理

GFP-CEPD1/cepd1,2 株に対して窒素欠乏処理を行ない, 共焦点レーザー顕微鏡（Olympus FV300）によって根の縦断面を観察した.

ビブラトーム切片の作製

改変 MS 寒天培地 (1.5% agar) を角シャーレに作成し, そこに滅菌・春化処理した *GFP-CEPD1/cepd1,2* 株の種子を直線上に 5 mm 間隔で播種した. インキュベーター (22°C, 明所) で垂直培養を行い, 生育 9 日目の株を観察に使用した. 根を切り取って 50 µg/ml ヨウ化プロピジウム溶液 (Wako) に 1 分間浸して染色し, 小シャーレに 5%寒天を入れて包埋した. 寒天が完全に固まったら, カミソリを用いてトリミングした. 形を整えた寒天サンプルをビブラトーム (Leica VT1200S) にセットし, 厚さ 250 µm の切片を作製した. 切片はスライドグラスに貼り付けて蒸留水を滴下してカバーグラスをかけ, 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV300) によって根の横断面を観察した.

GFP-CEPD1 株と *cepd1,2* 株の接木

改変 MS 寒天培地 (1.5% agar) を角シャーレに作成し，そこに滅菌・春化処理した *GFP-CEPD1/cepd1,2* 株および *cepd1,2* 株の種子を直線上に 5 mm 間隔で播種した．インキュベーター (22°C，明所) で垂直培養を行い，7 日目の株を接ぎ木に使用した．台木となる植物の胚軸をサージカルナイフで切り，切断部から約 2 mm を 0.4 mm シリコンチューブに差し込んだ．同様に接穂となる植物の胚軸も切断し，シリコンチューブの反対側に差し込んで台木と密着させ，そのまま 5 日間培養を続けた．活着した植物体は改変 MS 寒天培地 (0.7% agar) に移してさらに 7 日間培養した．その後，共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV300) によって根を観察した．

GFP-CEPD1 株の片側 NO_3^- 欠乏処理

GFP-CEPD1 株を片側 NO_3^- 欠乏処理し，両側の根における GFP-CEPD1 の局在を共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV300) で観察した．

CEPD 過剰発現株の片側 NO_3^- 欠乏処理

CEPD1 過剰発現株，CEPD2 過剰発現株を片側 NO_3^- 欠乏処理し，両側の根における *NRT2.1* 発現量および *CEPD1*，*CEPD2* 発現量を測定した．

第 2 章　タンパク質脱リン酸化酵素 CEPH による NO_3^-トランスポーターNRT2.1 の活性化

緒言

植物は根の細胞膜に存在する低親和性または高親和性の NO_3^-トランスポーターを介して，土壌中の NO_3^-を体内へと吸収するが，自然界において土壌の NO_3^-量は限られているため，高親和性トランスポーターによる NO_3^-吸収がメインとなる [4]．NRT2.1 は植物の主要な高親和性トランスポーターであり，その欠損株では NO_3^-吸収活性が 75%近く低下する [16,17]．NRT2.1 による NO_3^-吸収量は転写レベルで制御されていることが知られており，その発現は土壌の窒素環境と植物体内の窒素ステータスの双方から制御を受ける．しかし，2000 年代頃から，NRT2.1 による NO_3^-吸収は翻訳後レベルでも緻密に制御されることが明らかとなってきた．シロイヌナズナ根の膜画分を用いた網羅的なリン酸化プロテオミクス解析から，NRT2.1 には複数のリン酸化部位（Ser11, Ser21, Ser28, Ser501, Thr521）が存在し，そのリン酸化レベルは窒素環境に依存することが分かっている．例えば，NO_3^-十分条件下で Ser21 はリン酸化を受ける一方，Ser28 は NO_3^-欠乏条件でリン酸化される [33,34]．Ser28 アミノ酸置換変異株の解析からは，N 末端に存在する Ser28 のリン酸化は低窒素環境下におけるタンパク質の安定性に重要であることが示唆されている [35]．また，2020 年に Jacquot らは，C 末端に存在する Ser501 がリン酸化されると NRT2.1 による NO_3^-吸収活性が著しく低下することを報告した [32]．Ser501 のリン酸化はタンパク質の安定性や，NRT2.1 の補助タンパク質と考えられている NRT3.1 との相互作用には影響を与えなかったため，この結果は NRT2.1 が Ser501 のリン酸化によって直接的に NO_3^-吸収活性が制御されている可能性を示唆する．しかしながら，Ser501 のリン酸化が可逆的な吸収制御スイッチとして機能するのかや，そのリン酸化および脱リン酸化機構はまだ明らかになっておらず，NRT2.1 の活性制御の仕組みに関心が高まっていた．

植物は，土壌中の NO_3^-分布が不均一となっても個体全体の窒素恒常性を維持するため，根と葉の間で長距離移行するペプチド群によって窒素情報の伝達を行なっている．第 1 章ではこのシグナル伝達のうち，葉で産生されて根へ長距離移行し，根において NO_3^-トランスポーター遺伝子の転写を促進するポリペプチド CEPD を同定した．シロイヌナズナには CEPD と構造が似たポリペプチドが 21 個存在しているが，これらのうちのひとつが CEPD1/2 よりも強く *NRT2.1* の発現を誘導することがその後見出された．このポリペプチドは CEPD-like 2（CEPDL2）と命名されたが，根の窒素欠乏ではなく葉自身の窒素不足に応じて葉で産生され，葉から根へと移行して NO_3^-トランスポーターの転写を誘導することが明らかになっている．CEPD1/2 と CEPDL2 を欠損した植物では，根における NO_3^-吸収活性が大幅に減少することから，これらの長距離移行ペプチド群は植物の窒素恒常性の維持に必須な因子であると言える [62,85]．

CEPDL2/CEPD1/2 の主な機能は，根における NO_3^- トランスポーターの転写促進であることが第 1 章およびその後の研究において明らかとなっている．しかし，CEPDL2/CEPD1/2 経路によって発現制御される遺伝子群は他にも数多く存在しており，詳細な解析はこれまで行なわれていない．そこで第 2 章では，CEPDL2/CEPD1/2 過剰発現株のトランスクリプトーム解析によって，*NRT2.1* を含む NO_3^- トランスポーターと同程度に発現が上昇した機能未知のタンパク質脱リン酸化酵素に着目した．その欠損株の表現型解析や定量リン酸化プロテオミクスによる基質探索により，これまで知られていなかった NRT2.1 の脱リン酸化を介した活性制御機構が明らかになった．

結果

CEPDL2/CEPD1/2 過剰発現株のマイクロアレイ解析

根において CEPDL2/CEPD1/2 が制御する遺伝子群を探索するため，*CEPD1*，*CEPD2*，*CEPDL2* 遺伝子の各過剰発現株の根を用いてマイクロアレイ解析を行なった．その結果，各過剰発現株の根において Protein phosphatase 2C (PP2C) family の Group-E に属する At4g32950 の発現が強く誘導されており，その誘導倍率は，CEPD や CEPDL2 のメインターゲットである NO_3^-トランスポーターNRT2.1 と同程度であった（Table. 1）．シロイヌナズナにおける PP2C family の Group-E には 12 個の遺伝子が含まれているが，その中で CEPDL2/CEPD1/2 によって発現が誘導されるのは At4g32950 だけであった（Fig. 1）．At4g32950 のホモログは双子葉類のジャガイモ [86] やタルウマゴヤシ [87]，単子葉類のイネ [88] やトウモロコシ [89] において保存されている一方，コケ植物のヒメツリガネゴケ [90] には存在しないことが分子系統解析により判明した（Fig. 2）．

Table. 1. CEPDL2/CEPD1/2 各過剰発現株の根を用いたマイクロアレイ解析
播種後 10 日目の CEPDL2/CEPD1/2 各過剰発現株の根における誘導倍率 TOP10 の遺伝子を示す．

Signal intensity				Log_2FC			Gene		
WT	*CEPDL2ox*	*CEPD1ox*	*CEPD2ox*	*CEPDL2ox*	*CEPD1ox*	*CEPD2ox*	Locus	Symbol	Description
12.7	181.8	43.7	58.7	3.84	1.78	2.21	AT4G32950	---	Protein phosphatase 2C family protein
11.8	155.6	40.2	56.4	3.72	1.76	2.25	AT1G08090	NRT2.1	Nitrate transporter 2:1
19.9	207.6	51.3	54.5	3.38	1.37	1.46	AT2G30670	---	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
4.5	45.7	9.9	24.8	3.33	1.13	2.45	AT1G06225	CLE3	CLAVATA3/ESR-RELATED 3
61.9	462.9	137.4	93.4	2.90	1.15	0.59	AT1G60050	---	Nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
6.3	37.9	11.0	7.0	2.60	0.82	0.16	AT5G07050	---	Nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
18.1	100.6	65.8	79.0	2.47	1.86	2.13	AT1G49570	---	Peroxidase superfamily protein
41.5	224.6	72.6	69.0	2.43	0.80	0.73	AT4G36570	RL3	RAD-like 3
36.5	177.5	72.0	72.6	2.28	0.98	0.99	AT2G30660	---	ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein
3.8	18.1	3.9	8.7	2.27	0.03	1.21	AT3G09922	IPS1	Induced by phosphate starvation1

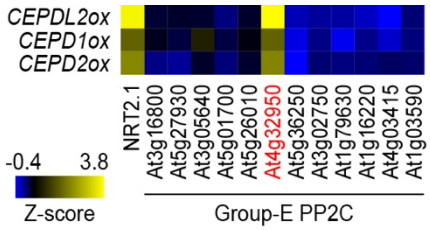

Fig. 1. CEPDL2/CEPD1/2 各過剰発現株における Group-E PP2C の発現量
マイクロアレイ解析結果から Group-E PP2C を抽出し，Z-score を用いてヒートマップを作製した．

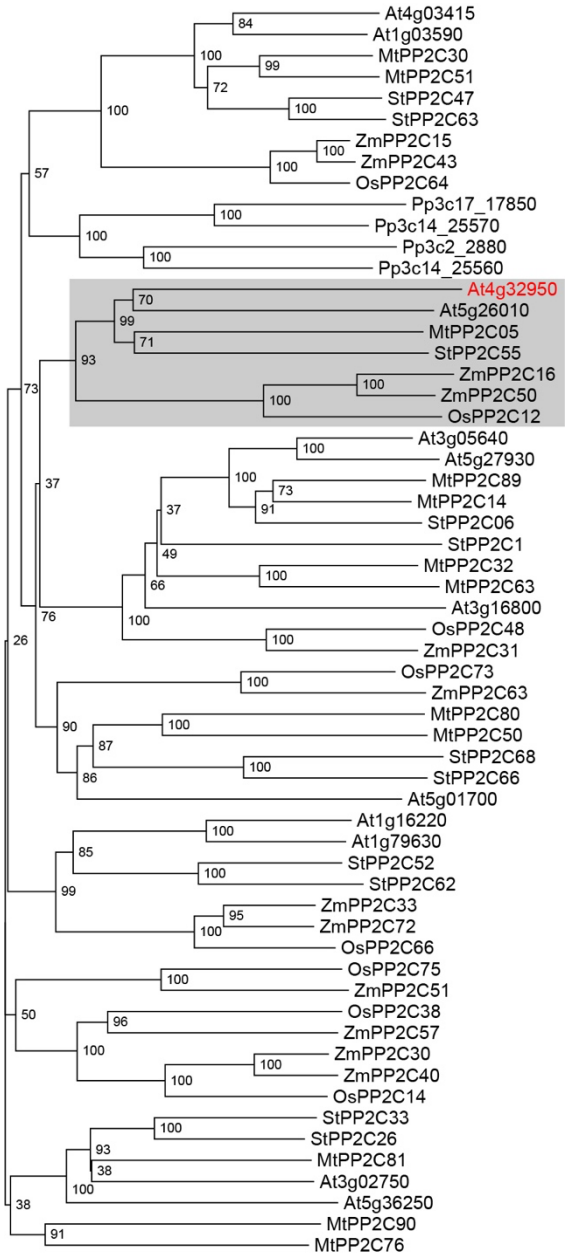

Fig. 2. PP2C Group-E の分子系統樹

シロイヌナズナ（At），ジャガイモ（St），タルウマゴヤシ（Mt），イネ（Os），トウモロコシ（Zm），ヒメツリガネゴケ（Pp）における PP2C Group-E タンパク質の 1 次配列を基に作製した．灰色で囲ったタンパク質が At4g32950 のホモログである．

窒素源の違いによる *At4g32950* 発現量の変化

上記のマイクロアレイ解析は NH_4^+ 10 mM / NO_3^- 10 mM という NH_4^+を含む条件で実施した．そこで次に，培地の窒素源を NO_3^- 10 mM だけにしたところ *At4g32950* のベース発現量が 11.4 倍まで増加したことから，*At4g32950* の発現は NH_4^+によって抑制されることが示された．またこの条件下においても，*CEPDL2* 過剰発現株では *At4g32950* 発現量が 4.7 倍まで増加した（Fig. 3）．

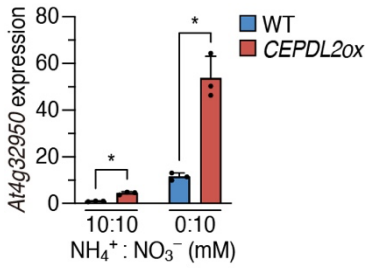

Fig. 3. 窒素源の違いによる *At4g32950* 発現量の変化
播種後 14 日目の野生株と CEPDL2 過剰発現株の根における *At4g32950* 発現量を NH_4^+ 10 mM / NO_3^- 10 mM 条件と NO_3^- 10 mM 条件で比較した．

窒素欠乏時における CEPDL2/CEPD1/2 依存的な *At4g32950* 発現量の変動

培地中に含まれる NO_3^-濃度を 3, 1, 0.3 mM と減らしていくと，野生株における *At4g32950* 発現量はそれに応じて増加しており，特に 1 mM および 0.3 mM 条件では NO_3^-トランスポーター*NRT2.1* よりも強く誘導されていた(Fig. 4a). また, この窒素欠乏依存的な応答は *cepd1,2 cepdl2* 三重欠損株においてほぼ失われた（Fig. 4b）．しかし NO_3^- 1 mM 条件下において，*cepd1,2* 二重欠損株や *cepdl2* 単独欠損株では *At4g32950* 発現量の低下はみられなかったことから，CEPD1/2 と CEPDL2 は *At4g32950* の発現制御において冗長的に機能していると考えられる（Fig. 5）．以上の結果から，根における *At4g32950* の発現は，窒素欠乏時に葉で産生される CEPD1/2 や CEPDL2 を介して制御されていることが明らかとなったため, At4g32950 を CEPD-induced phosphatase，CEPH と命名した.

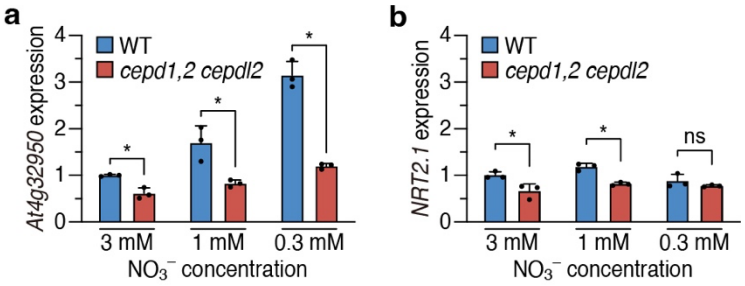

Fig. 4. 窒素欠乏時における *At4g32950* および *NRT2.1* 発現量の変動

播種後 14 日目の野生株と *cepd1,2 cepdl2* 三重欠損株の根における（a）*At4g32950* 発現量と（b）*NRT2.1* 発現量を比較した.

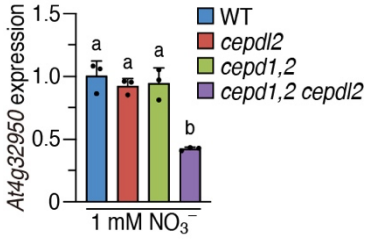

Fig. 5. CEPDL2/CEPD1/2 多重欠損株における *At4g32950* 発現量

播種後 14 日目の野生株，*cepdl2* 単独欠損株，*cepd1,2* 二重欠損株，*cepd1,2 cepdl2* 三重欠損株の根における *At4g32950* 発現量を比較した.

CEPH の発現部位解析と細胞内局在解析

CEPH が植物体のどの組織で機能するのかを調べるため，プロモーターGUS 解析および細胞内局在解析を行った．*CEPH* のプロモーターGUS 解析では植物体の根だけでの発現が示された（Fig. 6a）．根内部の発現部位を詳細に観察するため，ミクロトームを用いて横断切片を作製したところ，表皮および皮層細胞で特に強いプロモーター活性を検出した（Fig. 6b）．また CEPH の細胞内局在を明らかにするため，シロイヌナズナにおいて C 末端側に GFP を繋いだ融合タンパク質を *CEPH* 自身のプロモーター制御下で発現させた．この CEPH-GFP タンパク質の機能性は後述する相補実験により確認している．共焦点レーザー顕微鏡により根の細胞を観察したところ，細胞質への局在が観察された（Fig. 6c）．以上の結果から，CEPH は根の細胞質において機能する脱リン酸化酵素だと考えられる．

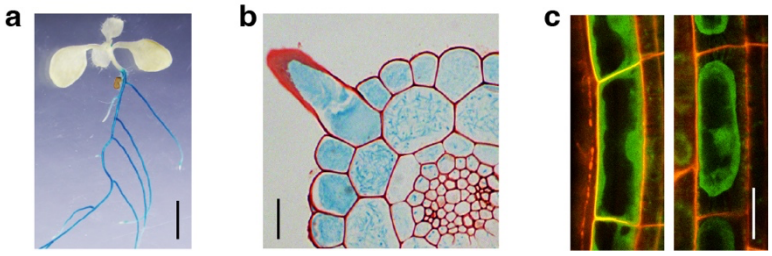

Fig. 6. CEPH のプロモーターGUS 解析と細胞内局在解析

(c)　播種後 10 日目の *CEPHpro:GUS* 発現シロイヌナズナ芽生え全体の GUS 染色．Scale bar: 2 mm.

(d)　(a)の根の横断面．Scale bar: 20 μm.

(e)　播種後 10 日目の *CEPH-GFP* 株における CEPH タンパク質の局在（左）．原形質分離後（右）．Scale bar: 20 μm.

CEPH 変異株の表現型解析

CEPH の機能を明らかにするため，*CEPH* 変異株の表現型解析を行なった．*CEPH* 遺伝子の T-DNA 挿入ライン（GABI_787G04: *ceph-1*）を取り寄せ，この変異株で全長の転写産物が生成されていないことを RT-PCR によって確認した（Fig. 7a, b）．野生株と *ceph-1* 株を NO_3^- 1 mM (*CEPH* 発現量が増加する条件) で培養したところ，*ceph-1* 株では地上部の矮化や葉のわずかな黄化といった表現型が観察された（Fig. 7c）．この時の地上部の生重量は野生株の 60%まで低下しており，これらの表現型は *CEPH* 遺伝子や *CEPH-GFP* 遺伝子の導入によって回復することを確認した（Fig. 7d）．*ceph-1* 株では根の生重量も低下していたが，主根長は野生株と変わらず，側根はむしろ野生株よりも長くなっていた（Fig. 8a, b, c）．一方，*ceph-1* 株を NH_4^+ 10 mM / NO_3^- 10 mM (*CEPH* 発現が抑制される条件) で培養すると，野生株との差は一切観察されなかった（Fig. 9a, b）．

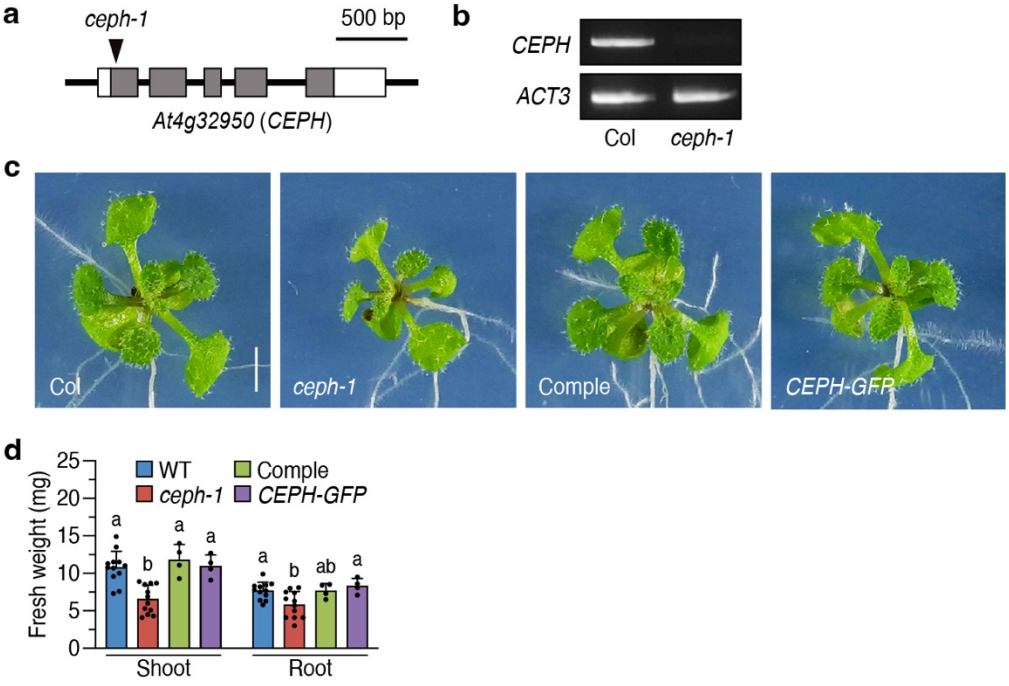

Fig. 7. *ceph-1* 株の表現型解析

(c)　*ceph-1*（GABI_787G04）の T-DNA 挿入部位.

(d)　RT-PCR による発現確認．*ACT3* は内在性コントロールとして用いた.

(e)　播種後 14 日目の野生株，*ceph-1* 株，*CEPH* 相補株（Comple），*CEPH-GFP/ceph-1* 株の地上部. Scale bar: 2 mm.

(f)　(c)の地上部および根の生重量（mean±s.d.; n=4–12）.

データは分散分析（one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test）を用いて解析した．$P < 0.05$.

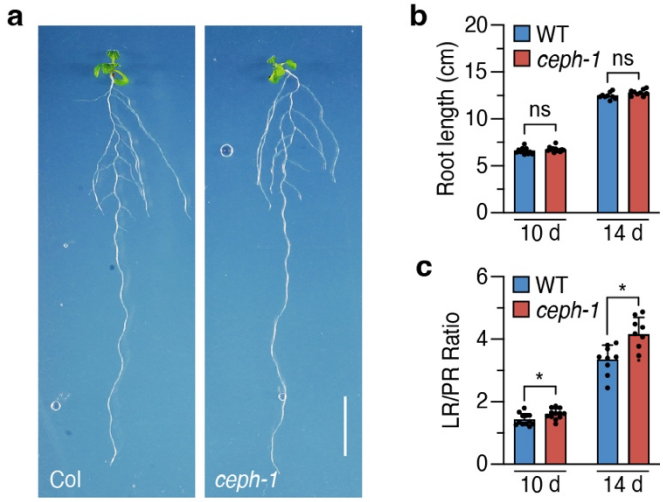

Fig. 8. *ceph-1* 株の根の表現型解析
(c)　播種後 10 日目の野生株，*ceph-1* 株の根の表現型．Scale bar: 1 cm.
(d)　播種後 10 日目および 14 日目の野生株，*ceph-1* 株の主根長（mean±s.d.; n=9）.
(e)　播種後 10 日目および 14 日目の野生株，*ceph-1* 株における側根/主根長の比率（mean±s.d.; n=9）.
データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

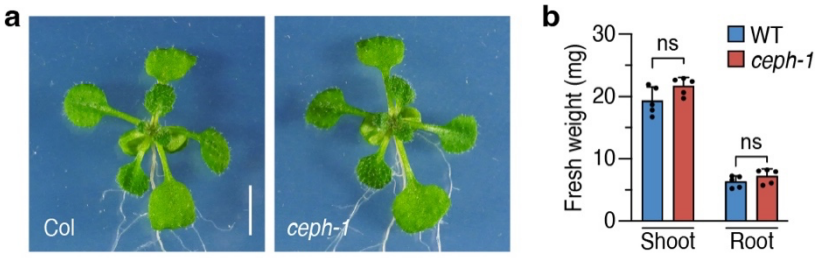

Fig. 9. NH_4^+ 10 mM / NO_3^- 10 mM 条件下での *ceph-1* 株の表現型解析
(a)　播種後 14 日目の野生株，*ceph-1* 株の表現型．Scale bar: 5 mm.
(b)　(a)の地上部および根の生重量（mean±s.d.; n=5）.
データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

ceph-1 株における NO_3^-吸収への影響

地上部の矮化や葉の黄化，側根の伸長促進といった表現型は，窒素欠乏に陥った植物体特有の症状と類似していたため，*ceph-1* 株が窒素欠乏状態にあると考えられた．そこで *ceph-1* 株の NO_3^-含有量をイオンクロマトグラフィーによって測定したところ，地上部は野生株の 37%，根は野生株の 56%まで NO_3^-含有量が低下していた（Fig. 10a）．この結果から，*ceph-1* 株は根における NO_3^-吸収活性が低下している可能性が示唆されたため，次に NO_3^-吸収活性の評価を実施した．NO_3^-吸収活性は，植物体の根を $^{15}NO_3^-$を含む液体培地に浸し，10 分間で吸収した $^{15}NO_3^-$量から算出する．高親和性トランスポーターの吸収活性 (HATS 活性) は $^{15}NO_3^-$ 0.2 mM を，また低親和性トランスポーターの吸収活性 (LATS 活性) は $^{15}NO_3^-$ 10 mM を含む液体培地を用いて測定した．NO_3^- 1 mM 条件で 14 日間培養した *ceph-1* 株では，HATS 活性が野生株の 62%まで低下しており，NO_3^-含有量の低下を裏付ける結果となった（Fig. 10b）．一方，LATS 活性も野生株より低下していたものの，HATS 活性と比較するとその差は僅かであった（Fig. 10c）．しかしながら，根で機能する主要な NO_3^-トランスポーター（*NRT2.1, NRT2.2, NRT2.4, NRT3.1, NRT1.1*）の発現量は *ceph-1* 株で低下していなかったため，NO_3^-吸収活性の低下は NO_3^-トランスポーターの発現量低下によるものではないと考えられた（Fig. 10d）．

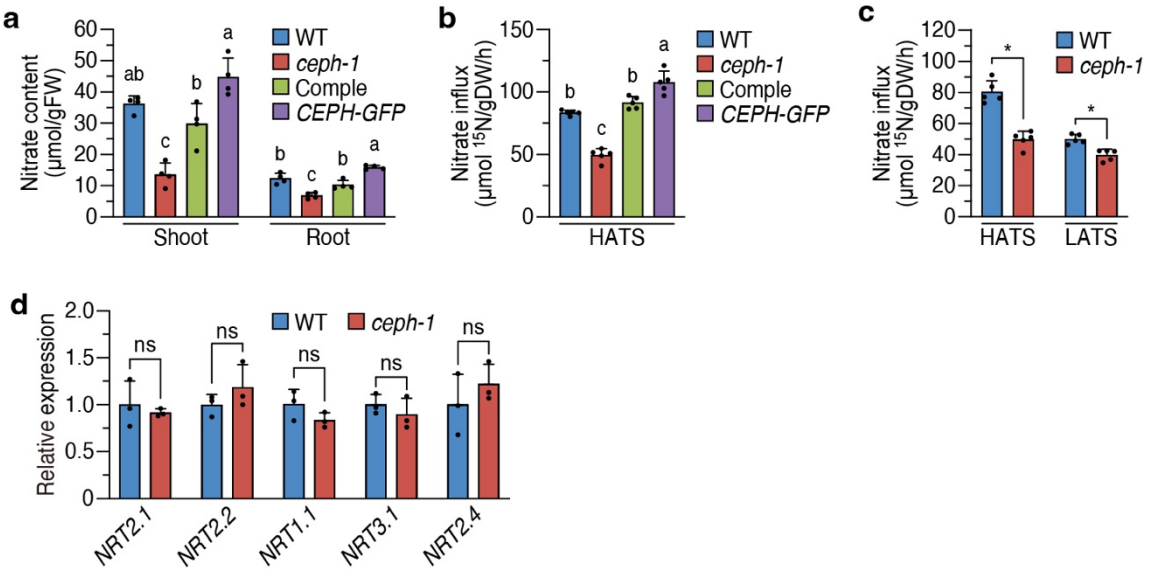

Fig. 10. *ceph-1* 株における NO_3^-含有量および NO_3^-吸収活性
播種後 14 日目の植物体を用いて各項目を比較した．
(a)　野生株，*ceph-1* 株，*CEPH* 相補株，*CEPH-GFP* 株の地上部と根における NO_3^-含有量（mean±s.d.; n=5）．
(b)　野生株, *ceph-1* 株, *CEPH* 相補株, *CEPH-GFP* 株の根における高親和性 NO_3^-吸収活性（mean±s.d.; n=5）．
(c)　野生株，*ceph-1* 株の根における高親和性および低親和性 NO_3^-吸収活性（mean±s.d.; n=5）．
(d)　野生株，*ceph-1* 株の根における主要な NO_3^-トランスポーター発現量（mean±s.d.; n=3）．
データは Student's *t* test および分散分析（one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test）を用いて解析した．
$P < 0.05$.

CEPH の一過的発現による NO_3^- 吸収への影響

さらに，エストラジオール誘導系（XVE システム）を用いて，CEPH を一過的に過剰発現させた際の NO_3^- 吸収活性を評価した．NO_3^- 10 mM 条件で 14 日間培養した *XVE-CEPH* 株の根を 50 μM エストラジオールで処理し，*CEPH* 遺伝子が十分に誘導される処理 6 時間後に NO_3^- 吸収活性を測定した．その結果，エストラジオール処理を行った *XVE-CEPH* 株では，Mock 処理と比較して HATS 活性が 25%増加していた（Fig. 11a, b）．短時間の CEPH 過剰発現によって HATS 活性の上昇がみられたことから，CEPH は高親和性の NO_3^- 吸収活性を翻訳後レベルで活性化する可能性が示された．

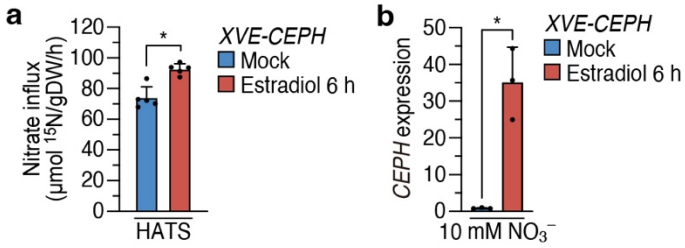

Fig. 11. CEPH の一過的発現による NO_3^- 吸収への影響
播種後 14 日目の *XVE-CEPH* 株に対してエストラジオール処理を行ない，6 時間後に各項目を Mock 処理と比較した．
(a)　根における高親和性 NO_3^- 吸収活性（mean±s.d.; n=5）．
(b)　根における *CEPH* 発現量（mean±s.d.; n=3）．
データは Student's *t* test を用いて解析した．$P < 0.05$.

定量リン酸化プロテオミクスによる CEPH の網羅的な基質探索

ceph-1 株および *XVE-CEPH* 株の解析から，CEPH の基質が NO_3^-吸収に関わるタンパク質であり，そのリン酸化レベルは *ceph-1* 株において増加していると予想した．そこで，*ceph-1* 株でリン酸化レベルが上昇したタンパク質を網羅的に探索するため，^{15}N 代謝標識を用いた定量リン酸化プロテオミクスを実施することとした [91].

まず，野生株は ^{14}N，*ceph-1* 株は ^{15}N 培地で培養して代謝標識を行ない，根を生重量比 1:1 で混ぜて回収し 1 つのサンプルとした（forward サンプル）．試料調製の初期段階においてサンプルを混合し，タンパク抽出から酵素消化，リン酸化ペプチド濃縮，nano LC-MS/MS 解析まではひとつのサンプルとして処理することで，2 サンプル間の測定誤差を完全に排除できるのが ^{15}N 代謝標識法の利点である．^{14}N 標識ペプチドと ^{15}N 標識ペプチドは化学的には同一でカラムからほぼ同じ時間に溶出されるため，野生株由来と *ceph-1* 株由来のピーク強度からリン酸化レベルを同時かつ定量的に比較することが可能となる（Fig. 12）．再現性確認のため，反対の組み合わせ，つまり野生株を ^{15}N，*ceph-1* 株を ^{14}N 培地で代謝標識したものについても同様の手順で解析を実施した（reciprocal サンプル）．さらに，同定するペプチド断片の種類を増やすため，酵素消化は Trypsin と LysC（リジン残基の C 末端側で切断する）の 2 種類で実施した．

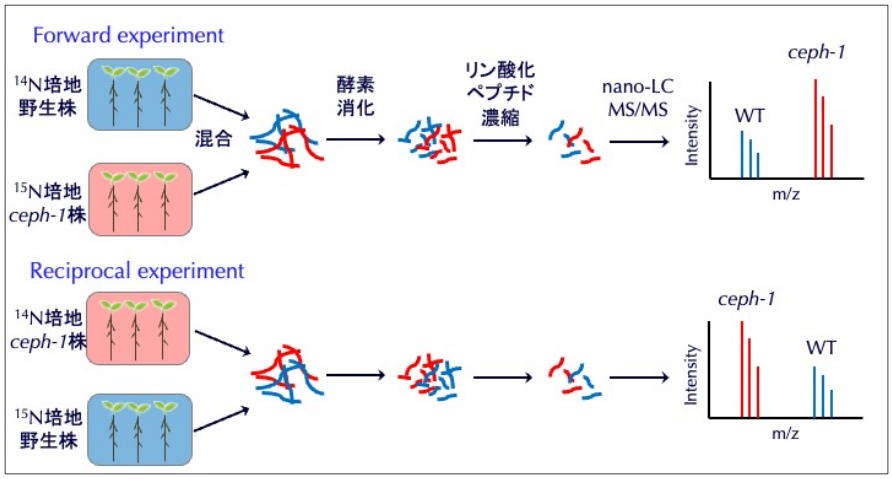

Fig. 12. 定量リン酸化プロテオミクスの概略図

$^{14}N/^{15}N$ 培地で代謝標識した植物体を 1:1 で混合し，タンパク抽出から nano LC-MS/MS 解析までひとつのサンプルとして処理する．

Nano LC-MS/MS 解析で同定したリン酸化ペプチドの情報から，アミノ酸配列・修飾部位・価数が一致した ^{14}N 標識ペプチドと ^{15}N 標識ペプチド，すなわち野生株由来のペプチドと *ceph-1* 株由来のペプチドのペアを作成した．そしてペアとなったペプチド同士でピーク強度を比較し，forward と reciprocal 双方において *ceph-1* 株/野生株 ≧1.5 となったペプチドについて，full MS スペクトルを目視確認し，実際にピーク強度が *ceph-1* 株において増加しているものを抽出した．Trypsin 消化産物からは ^{14}N /^{15}N ペプチドペアが 2,051 個同定され，うち *ceph-1* 株/野生株 ≧1.5 となったペプチドは 11 個見つかった．一方，LysC 消化産物からは ^{14}N /^{15}N ペプチドペアが 1,448 個同定され，うち *ceph-1* 株/野生株 ≧1.5 となったペプチドは 8 個見つかった（Fig. 13a, b）．これらのペプチドの Full MS スペクトルを目視で確認した結果，*ceph-1* 株においてピーク強度が増加していたのは，LysC 消化産物由来のペプチド 2 個のみであった．

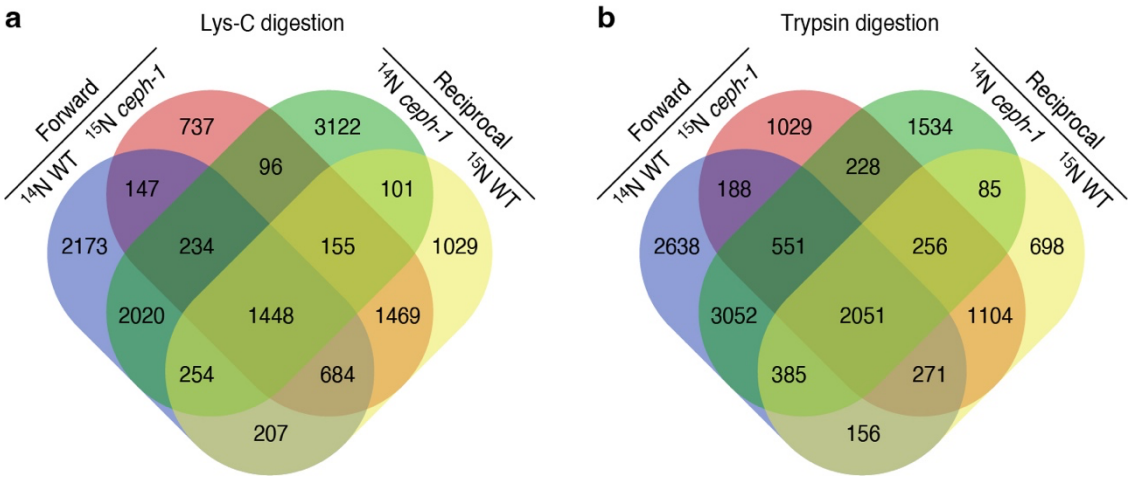

Fig. 13. forward と reciprocal で同定したリン酸化ペプチドのベン図

(a)　LysC 消化サンプルで同定したリン酸化ペプチドの個数.
(b)　トリプシン消化サンプルで同定したリン酸化ペプチドの個数.

ceph-1 株における NRT2.1 Ser501 のリン酸化レベル

定量リン酸化プロテオミクスによって見出された 2 個のペプチドは，どちらも NO_3^-トランスポーターNRT2.1 の 501 番目のセリン（Ser501）を含む NMHQG(S501(PO_3H_2))LRFAENAK に由来しており，3 価と 4 価のイオンとして同定されていた．*ceph-1* 株における NRT2.1 Ser501 のリン酸化レベルは，forward サンプルで 2.2 倍，reciprocal サンプルでは 3.1 倍まで増加していた（Fig. 14a, b）．NRT2.1 には Ser28 や Thr521 など他のリン酸化部位が存在するが，*ceph-1* 株でリン酸化レベルが増加していたのは Ser501 だけであった（Fig. 14c, d）．また, このときのリン酸化ペプチド濃縮前のサンプルを用いて, NRT2.1 タンパク量を nano LC-MS/MS 解析で測定したところ, 野生株と *ceph-1* 株でタンパク量の差はみられなかった（Fig. 14e）.

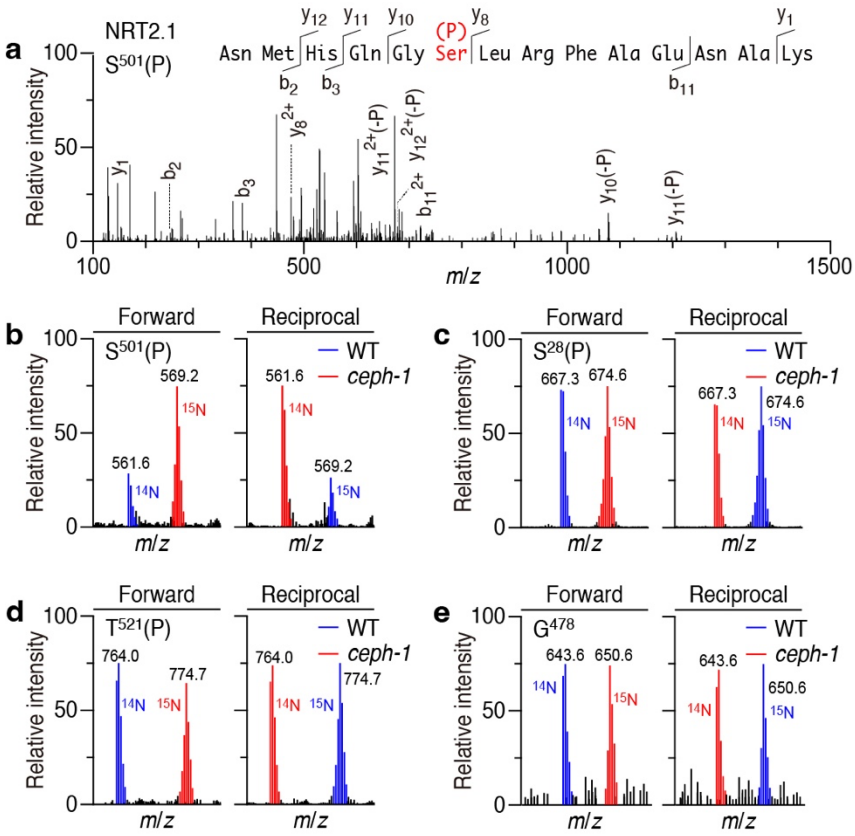

Fig. 14. NRT2.1 Ser501 のリン酸化レベルの比較

(a) NRT2.1 Ser501 を含むペプチド NMHQG(S501(PO_3H_2))LRFAENAK の MS/MS 解析.

(b) 野生株と *ceph-1* 株における NRT2.1 Ser501 のリン酸化レベル．NRT2.1 の 496-509 番目までのリン酸化ペプチドのピーク強度を比較した.

(c) Ser28（19-35 番目）のリン酸化レベル.

(d) Thr521（516-530 番目）のリン酸化レベル.

(e) 野生株と *ceph-1* 株における NRT2.1 タンパク量の比較. Gly478 を含む非リン酸化ペプチド（478-493 番目までの配列）のピーク強度を用いた.

NRT2.1 Ser501 **アミノ酸置換変異株の表現型解析**

2020 年に Jaquout らによって，NRT2.1 の Ser501 がリン酸化を受けると NRT2.1 の NO_3^-吸収活性が著しく低下することが報告されていた [32]．この報告では，Ser501 を Ala 置換（疑似非リン酸化型）または Asp 置換（疑似リン酸化型）した変異株の表現型解析を実施していたため，これらのアミノ酸置換変異株を同様に作製し，NO_3^- 1 mM の改変 MS 寒天培地で培養した際の表現型解析を行なった．野生株と *nrt2.1-2.2* 欠損株，*S501A/ nrt2.1-2.2* 株，*S501D/ nrt2.1-2.2* 株を比較すると，*S501A/ nrt2.1-2.2* 株は野生株とほぼ同程度まで生育が回復した一方，*S501D/ nrt2.1-2.2* 株は著しく矮化したままであった（Fig. 15a, b）．*S501D/ nrt2.1-2.2* 株の根における NO_3^-吸収活性（HATS 活性）は *nrt2.1-2.2* 株と同程度まで低下しており，Ser501 の Asp 置換で NO_3^-吸収活性が完全に失われるという Jaquout らの結果と一致した（Fig. 15c）．*S501D/ nrt2.1-2.2* 株では重度の窒素欠乏により NRT2.1 タンパク量が野生株の約 1/3 まで低下していたものの，完全には失われていない（Fig. 15d）．したがって，NO_3^-吸収活性が *nrt2.1-2.2* 株と同程度まで失われていたのは，Ser501 を Asp 置換したことが原因だといえる．また，*ceph-1* 株に *NRT2.1-S501A* を導入すると，*S501A/ nrt2.1-2.2* 株と同程度まで NO_3^-吸収活性を回復することができた（Fig. 15e）．

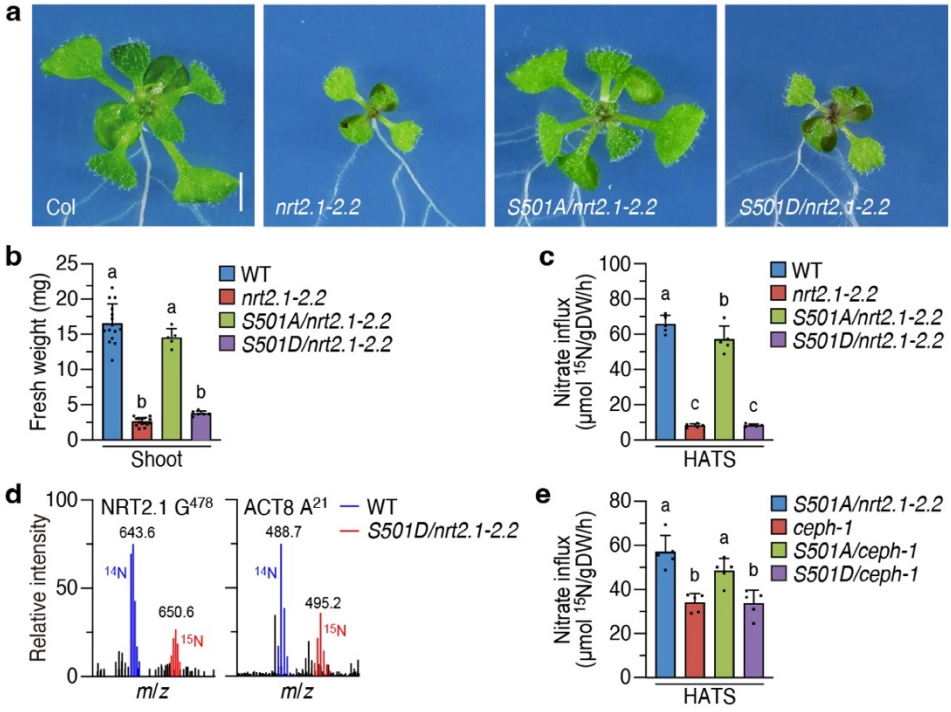

Fig. 15. NRT2.1 Ser501 アミノ酸置換変異株の表現型解析

(a) 播種後 14 日目の野生株，*nrt2.1-2.2* 株，*S501A/ nrt2.1-2.2* 株，*S501D/ nrt2.1-2.2* 株の表現型．Scale bar: 2 mm.

(b) (a)の地上部生重量（mean±s.d.; n=5-15）．

(c) (a)の根における高親和性 NO_3^-吸収活性（mean±s.d.; n=5）．

(d) 野生株と *S501D/ nrt2.1-2.2* 株における NRT2.1 タンパク量の比較．Gly478 を含む非リン酸化ペプチド（478-493 番目までの配列）のピーク強度を用いた．

(e) *S501A/ ceph-1* 株における高親和性 NO_3^-吸収活性（mean±s.d.; n=5）．

データは分散分析（one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test）を用いて解析した．$P < 0.05$.

CEPH による NRT2.1 Ser501 の脱リン酸化アッセイ

CEPH が NRT2.1 の Ser501 を直接脱リン酸化しているのかを検証するため，合成リン酸化ペプチドを用いた *in vitro* の脱リン酸化アッセイを行なった．まず基質として，NRT2.1 の Ser501 を含む周辺 15 アミノ酸残基のリン酸化ペプチドを化学合成した．また，コントロールとして，NRT2.1 の他のリン酸化部位（Ser28，Thr521）の周辺配列でリン酸化ペプチドを合成した．一方，酵素 CEPH は GFP-tag 融合タンパク質（CEPH-GFP）をシロイヌナズナで発現させ，anti-GFP 抗体をクロスリンクした磁気ビーズを用いた免疫沈降によって精製した．合成リン酸化ペプチドと CEPH-GFP ビーズを混合して 3 時間反応させ，反応液を LC-MS 解析した結果，Ser501 ペプチド反応液からは脱リン酸化されたペプチドが検出されたのに対し，他の Ser28，Thr521 ペプチドの脱リン酸化はみられなかった（Fig. 16a, b，Thr521 は省略）．このことから，CEPH は NRT2.1 の Ser501 に対して特異的に脱リン酸化活性を示すことが明らかになった．

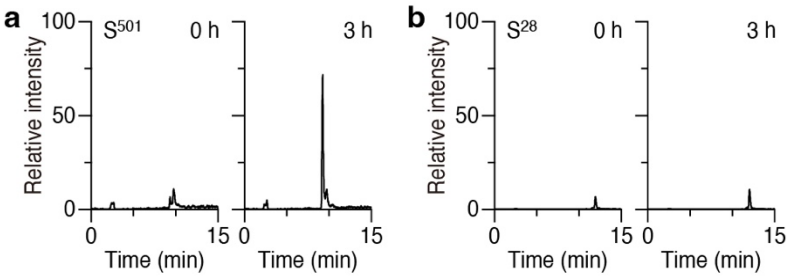

Fig. 16. シロイヌナズナで発現させた CEPH-GFP 用いた *in vitro* 脱リン酸化アッセイ
(a)　脱リン酸化した Ser501 ペプチド（*m/z* 865.9）を LC/MS で検出.
(b)　脱リン酸化した Ser28 ペプチド（*m/z* 831.9）を LC/MS で検出.

CEPH の一過的発現による Ser501 リン酸化レベルへの影響

次に，エストラジオール誘導した *XVE-CEPH* 株における NRT2.1 Ser501 のリン酸化レベルを解析した．*XVE-CEPH* 株を ^{14}N 培地，または ^{15}N 培地（NO_3^- 10 mM 条件）で培養して代謝標識を行ない，播種後 14 日目に ^{15}N 標識した *XVE-CEPH* 株の根を 50 µM エストラジオールで誘導処理した．誘導 6 時間後に根を回収し，Mock 処理の ^{14}N 標識植物と 1:1 で混ぜてタンパク質抽出を行ない，定量リン酸化プロテオミクスを実施した．NRT2.1 Ser501 を含むリン酸化ペプチド NMHQG(S501(PO_3H_2))LRFAENAK のピーク強度を比較すると，エストラジオール処理株では Mock 処理株の 46%まで低下していた．代謝標識の組み合わせを変えたサンプル（^{15}N Mock 処理/^{14}N エストラジオール処理）でも同様に，ピーク強度が Mock 処理株の 59%まで低下したことに加え，このときの NRT2.1 タンパク量は変動していなかったことから，CEPH の一過的発現によって NRT2.1 Ser501 が脱リン酸化されることが分かった（Fig. 17a, b）．エストラジオール処理を行なった *XVE-CEPH* 株では，Mock 処理と比較して HATS 活性が 25%増加した前述の結果と合わせると，CEPH は NRT2.1 の Ser501 を直接脱リン酸化して NRT2.1 を活性型へと切り替え，高親和性の NO_3^-吸収を促進する酵素であることが明らかとなった．

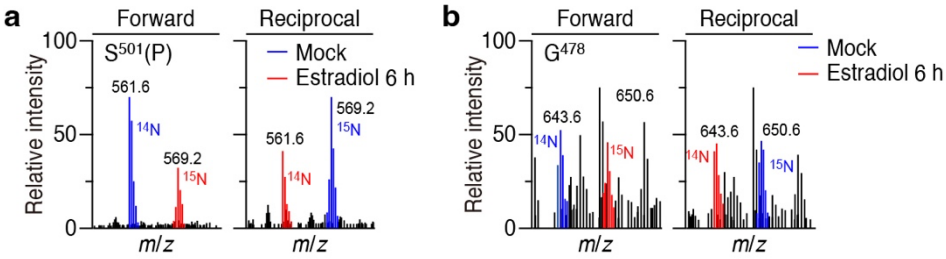

Fig. 17. CEPH の一過的発現による Ser501 リン酸化レベルの変化
播種後 14 日目の *XVE-CEPH* 株に対してエストラジオール処理を行ない，処理 6 時間後に根からタンパク質を抽出して各項目を Mock 処理と比較した．
(a) NRT2.1 Ser501 のリン酸化レベル．NRT2.1 の 496-509 番目までのリン酸化ペプチドのシグナル強度を比較した．
(b) NRT2.1 タンパク量．Gly478 を含む非リン酸化ペプチド（478-493 番目までの配列）のシグナル強度を用いた．

考察

植物の主要な NO_3^-トランスポーターである NRT2.1 について，ここ数年でリン酸化部位が複数存在することや，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たが，そのリン酸化/脱リン酸化を担う酵素群はまだ見つかっておらず，NRT2.1 の活性制御の仕組みに関心が高まっていた．本章では，CEPDL2/CEPD1/2 下流で制御される脱リン酸化酵素 CEPH が，NRT2.1 の Ser501 を直接脱リン酸化することで高親和性の NO_3^-吸収を活性化していることを発見した（Fig. 18）．

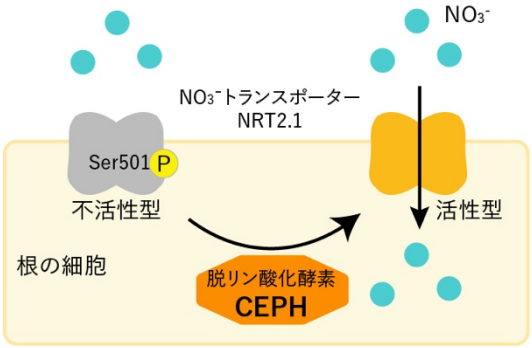

Fig. 18. タンパク質脱リン酸化酵素 CEPH を介した NO_3^-トランスポーターNRT2.1 の活性化

葉で産生された CEPDL2/CEPD1/2 は師管を通って根へ長距離移行し，根の皮層・表皮細胞の核へと拡散して，*NRT2.1* や *CEPH* の発現を誘導することが明らかとなったが，グルタレドキシンである CEPDL2/CEPD1/2 は DNA 結合ドメインを持たないため，おそらく転写因子と相互作用して下流遺伝子の発現を制御すると予想された．そこで，本研究と並行して当研究室では，共免疫沈降と nano LC-MS/MS 解析を組み合わせ，根において CEPDL2 と相互作用する因子の網羅的探索が行なわれた．その結果，CEPDL2 は特定の転写因子ファミリーと特異的に結合し，その転写因子ファミリーは *NRT2.1* や *CEPH* のプロモーター領域に結合することが判明している．これらの解析により，*NRT2.1* と *CEPH* は同一経路上で CEPDL2/CEPD1/2 によって発現が制御されることが明らかとなりつつある．

CEPH の発見により，CEPDL2/CEPD1/2 は NO_3^-トランスポーターNRT2.1 の転写活性化だけでなく，翻訳後修飾によるタンパク質レベルでの活性化によって NO_3^-吸収を促進することが明らかとなった．転写と翻訳後修飾の両面から NO_3^-吸収を促進するシステムを作り上げた点が大変興味深く，これは植物が窒素欠乏時に陥るジレンマを解決する手段ではないかと考えている．植物は窒素欠乏状態に陥ると，NO_3^-吸収を増加しようとするが，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 を余分に合成しておき，Ser501 のリン酸化で不活性化した状態で NRT2.1 をストックしておくのでは

ないだろうか（Fig. 19a）．窒素欠乏になると地上部から CEPDL2/CEPD1/2 が根に移行して CEPH を誘導し，CEPH は NRT2.1 の Ser501 を脱リン酸化することで活性化させ，NO_3^-吸収を増大させる（Fig. 19b）．CEPH は酵素であるため触媒量を合成すれば十分であり，NRT2.1 タンパク質を新規合成するよりははるかに低コストとなる．実際，重度の窒素欠乏条件下（NO_3^- 0.3 mM）では，*NRT2.1* の発現が誘導されなかった一方，*CEPH* の発現は強く誘導されたため（Fig. 4a, b），この結果から転写調節よりも翻訳後調節を優先していることがわかる．CEPH は単子葉類・双子葉類問わず保存されており（Fig. 2），植物は変動する窒素環境に適応するために効率よく NO_3^-吸収を制御する仕組みを獲得したことが本研究からみえてきた．

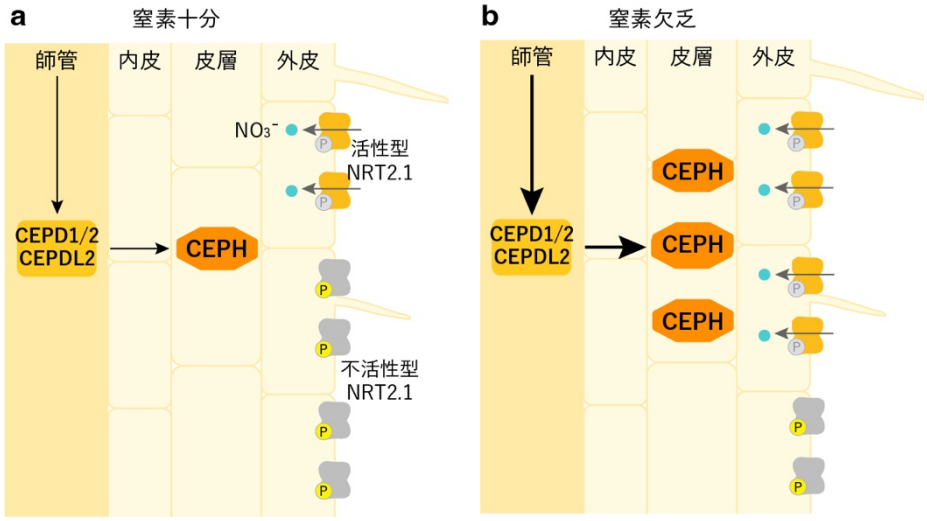

Fig. 19. 窒素条件に応じた NRT2.1 活性化メカニズム

(a) 植物は窒素十分な場合に NO_3^-トランスポーターNRT2.1 を多めに合成し，その一部をリン酸化して不活性型でストックしておく．

(b) 窒素不足になると葉からの窒素要求シグナル CEPDL2/CEPD1/2 によって根で CEPH が強く誘導され，CEPH は NRT2.1 のリン酸基を外して活性化し，NO_3^-吸収を促進させる．

NO_3^-トランスポーターのリン酸化／脱リン酸化による活性制御は，低親和性トランスポーターNRT1.1 で最初に報告された[92]．低窒素環境下では Thr101 がリン酸化されると高親和性へと切り替わることが分かっており，このリン酸化は CIPK23-CBL1/9 複合体によって行なわれる[93]．2014 年にはその結晶構造が解かれ，低親和性状態の非リン酸化 NRT1.1 は二量体を形成しており，Thr101 がリン酸化されると二量体が解離して単量体の高親和性トランスポーターに切り替わることが明らかとなった[94,95]．このようなリン酸化による活性制御は NO_3^-以外のトランスポーターについても多数研究されており，例えば，NH_4^+トランスポーターの AMT1 ファミリーは Thr460 のリン酸化で NH_4^+吸収が阻害される[96]．興味深いことに，NRT1.1 の Thr101 をリン酸化する CIPK23-CBL1/9 複合体は，上述の AMT1 ファミリーや K^+トランスポーターの HAK5[97,98]，K^+チャネルの AKT1[99,100] のリン酸化も担う

ことが知られている．その他にも，CIPK24-CBL4 複合体は Na^+/H^+ exchanger の SOS1 を[101]，CIPK5-CBL1 複合体は孔辺細胞の K^+チャネルである GORK[102] をそれぞれリン酸化する．CIPK と相互作用するカルシウムセンサーの CBL タンパク質は，ファミリーの大部分が膜に固定する脂質修飾モチーフを持つため，CIPK-CBL 複合体も細胞膜に結合し，トランスポーターの活性制御を担うと考えられている[103]．

Jacquot らの報告によると，シロイヌナズナを高窒素条件（NH_4NO_3 10 mM）へ移すと NRT2.1 の Ser501 は数時間で急速にリン酸化されることがわかっており[104]，根の周囲の窒素環境に応じて Ser501 をリン酸化する酵素の存在が示唆されている．ただし，CIPK23-CBL1/9 複合体は低窒素環境下で NRT1.1 を高親和性トランスポーターに切り替えるため，NRT2.1 の Ser501 をリン酸化して NO_3^-吸収を阻害する方向に働くとは考えにくい．そのため，CIPK23-CBL1/9 複合体とは異なる，おそらく細胞膜に結合するリン酸化酵素が NRT2.1 の Ser501 をリン酸化すると考えており，今後はこのリン酸化酵素の同定を目指していきたい．

CEPH を含む PP2C family にはシロイヌナズナでは 80 個の遺伝子が含まれており，A-L の 12 個のグループに分けることができる[105]．Group-A の ABI1 などは遺伝学スクリーニングによって ABA 応答の制御因子であることが報告されており，最もよく研究されているグループである．また，Group-B の AP2C1-4 は MAPK シグナル伝達に関わることが報告された一方で，CEPH は 12 個の遺伝子を含む Group-E に属しているが，そのうちこれまでに機能が報告されていたのは EGR1，EGR2，EGR3 だけであり[106]，PP2C 全体の半数以上は機能が未解明のままとなっている．脱リン酸化酵素の機能解析には基質の同定が不可欠であるが，脱リン酸化酵素と基質の相互作用は他のタンパク質間相互作用と比べて非常に弱く，瞬間的だといわれているため[107]，従来の酵母ツーハイブリッド法や共免疫沈降法では，基質の同定は難しいと考えられる．したがって，脱リン酸化酵素の基質探索にはリン酸化レベルの変動を指標とする定量リン酸化プロテオミクスが有効だが，シロイヌナズナ PP2C で実施された例はまだ限られており，イネなど他の植物種では未実施である[106,108–110]．本章では，植物 PP2C の基質探索としては初めてとなる ^{15}N 代謝標識法による定量リン酸化プロテオミクスを実施し，これまで機能未知であった CEPH のターゲットが NRT2.1 であることを明らかにしており，この手法が他の機能未知 PP2C の解析についても有効である可能性を示した．シロイヌナズナ機能未知 PP2C の中には，CEPH と同様に植物の生育にとって重要なタンパク質脱リン酸化酵素がまだ残されていると考えており，本手法を応用して基質側からの機能解析によって新たな知見が得られることを期待している．

材料と手法

改変 MS 培地の組成

窒素源として NH_4Cl および KNO_3 を用い，その他の栄養源は通常の MS 培地の 1/2 量とした．そこに 0.5%スクロースを添加し，pH5.7 となるよう KOH で調整した．本研究で使用した窒素条件を下記に記す．

窒素条件		N・K 源		
NH_4^+ [mM]	NO_3^- [mM]	NH_4Cl [mM]	KNO_3 [mM]	KCl [mM]
10	10	10	10	0
0	10	0	10	0
0	3	0	3	7
0	1	0	1	9
0	0.3	0	0.3	9.7

マイクロアレイ解析

改変 MS 寒天培地（10 mM NH_4^+ / 10 mM NO_3^-, Agar: 0.7%）を角シャーレに作製し，そこに滅菌・春化処理したシロイヌナズナ Col 株, *CEPD1ox* 株, *CEPD2ox* 株, *CEPDL2ox* 株の種子を等間隔に約 100 粒播種した．インキュベーター（22°C, 明所）で培養を行い，培養 10 日目の株から根を回収した．RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて回収した根からトータル RNA を精製した．調整した RNA について，東京大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻の杉澤由姫子さんに依頼し，*Arabidopsis* Gene 1.0 ST Array によるマイクロアレイ解析を行った．

PP2C subfamily E の系統樹解析

Arabidopsis (At), potato (St), *Medicago truncatula* (Mt), rice (Os), maize (Zm), moss *Physcomitrella patens* (Pp)における PP2C subfamily E の配列を得て，Genetyx Mac を用いて分子系統樹を作製した．ブートストラップは 1,000 回試行した．

窒素源による *At4g32950* 発現量の変動

B5 寒天培地 (1% スクロース, 1.5% agar) を角シャーレに作製し，滅菌・春化処理したシロイヌナズナ Col 株, *CEPDL2ox* 株を播種し，インキュベーター（22°C, 明所）で垂直培養を行なった．播種後 7 日目に芽生えを改変 MS 寒天培地（NH_4^+ 10 mM / NO_3^- 10 mM, または NO_3^- 10 mM のみ，1.5% agar）へ植え替え，さらに 7 日間垂直培養を行ない，播種後 14 日目の株から根を回収した．RNA 回収とリアルタイム qRT-PCR は第 1 章と同様の方法で行なった．

窒素欠乏条件下における *At4g32950* 発現量の変動

B5 寒天培地 (1% スクロース, 1.5% agar) を角シャーレに作製し, 滅菌・春化処理したシロイヌナズナ Nössen 株, *cepd1-1 cepd2-1 cepdl2-1* 三重欠損株を播種し, インキュベーター（22°C, 明所）で垂直培養を行なった. 播種後 7 日目に芽生えを改変 MS 寒天培地 (NO_3^- 3 mM, 1 mM, 0.3 mM, 1.5% agar) へ植え替え, さらに 7 日間垂直培養を行ない, 播種後 14 日目の株から根を回収した.

CEPD 多重欠損株における *At4g32950* 発現量

B5 寒天培地 (1% スクロース, 1.5% agar) を角シャーレに作製し, 滅菌・春化処理したシロイヌナズナ Nössen 株, *cepdl2-1* 株, *cepd1-1 cepd2-1* 二重欠損株, *cepd1-1 cepd2-1 cepdl2-1* 三重欠損株を播種し, インキュベーター（22°C, 明所）で垂直培養を行なった. 播種後 7 日目に芽生えを改変 MS 寒天培地 (NO_3^- 1 mM, 1.5% agar) へ植え替え, さらに 7 日間垂直培養を行ない, 播種後 14 日目の株から根を回収した.

At4g32950 promotor:GUS 解析

At4g32950 遺伝子のプロモーター領域 2.0 kb を PCR によって増幅し, 得られた DNA 断片を Gibson Assembly システム (New England Biolabs Japan) を用いて *SmaI* 及び *XbaI* 処理したベクターpBI101 へ導入した. このベクターをアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ Col 株に導入し, 得られた T1 種子を 50 mg/l カナマイシン, 50 mg/l カルベニシリン, 100 mg/l セフォタキシムを含む B5 寒天培地で選抜した. *At4g32950 promotor:GUS* 形質転換株 T2 株の種子を滅菌・春化処理し, B5 寒天培地 (1.5% agar) に播種して恒明下 22 °C で培養を行った. 播種後 7 日目に芽生えを改変 MS 寒天培地 (NO_3^- 1 mM, 1.5% agar) へ植え替え, さらに 3 日間垂直培養を行ない, 植物体全体を GUS 染色した. なお, GUS 染色の操作は第 1 章と同様の方法で行った.

ミクロトーム切片の作製

GUS 染色した植物の根を切り取って FAA (3.7% ホルムアルデヒド, 5% 酢酸, 50% エタノール) で一晩固定化した. 以降の操作は第 1 章と同様の方法で行った.

At4g32950-GFP 形質転換体の作製

At4g32950 遺伝子のプロモーター領域 2.0 kb, *CEPH* の終止コドンを除いた全長 ORF, そして GFP の開始コドンから終止コドンまでを PCR により増幅した. 得られた DNA 断片を Gibson Assembly システム (New England Biolabs Japan) を用いて *Hind*III 及び *BamH*I 処理したベクターpCAMBIA1300-BASTA へ導入し, CEPH-GFP/ pCAMBIA ベクターを作製した. このベクターをアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ *ceph-1* 変異株に導入し, 得られた T1 種子を 10 mg/l Basta, 50 mg/l カルベニシリン, 100 mg/l セフォタキシムを含む B5 寒天培地で選抜した.

At4g32950-GFP の局在観察

播種後 10 日目の株の根を切り取って観察に用いた. 根の細胞の輪郭を 50 µg/ml ヨウ化プロピジウム溶液 (Wako) に 1 分間浸して染色し, 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV300) を用いて He-Ne レーザー (543 nm) で観察した. また, GFP イメージは Ar レーザー (488 nm) で観察した. 原形質分離は 0.8 M mannitol で 20 分処理した後に観察した.

ceph-1 株の作製

ceph-1 は GABI-Kat *Arabidopsis* mutant collection (GABI_787G04, Col 株由来) から 1 系統単離した. *ceph-1* 株の根から RNA を精製し, cDNA 合成を行った. 得られた cDNA をテンプレートとして, RT-PCR を行った.

CEPH 相補株の作製

CEPH 遺伝子のプロモーター領域 2.0 kb から *CEPH* の終止コドンまでを PCR により増幅した. 得られた DNA 断片を Gibson Assembly システム (New England Biolabs Japan) を用いて *Hind*III 及び *BamH*I 処理したベクターpCAMBIA1300-BASTA へ導入し, CEPH-GFP/ pCAMBIA ベクターを作製した. このベクターをアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ *ceph-1* 変異株に導入し, 得られた T1 種子を 10 mg/l Basta, 50 mg/l カルベニシリン, 100 mg/l セフォタキシムを含む B5 寒天培地で選抜した.

ceph-1 株表現型解析

B5 寒天培地 (Agar: 1.5%) を角シャーレに作製し, 滅菌・春化処理したシロイヌナズナ Col 株, *ceph-1* 株, CEPH 相補株, *CEPH-GFP* 株を播種し, インキュベーター (22°C, 明所) で垂直培養を行なった. 播種後 7 日目に芽生えを改変 MS 寒天培地 (NO_3^- 1 mM, 1.5% agar) へ植え替え, さらに 7 日間垂直培養を行ない, 播種後 14 日目の株を表現型解析に使用した.

硝酸イオン含量の測定

培養した植物を胚軸で切断し, 地上部と根のそれぞれを回収した. 地上部は液体窒素で凍結した後, マルチビーズショッカー (安井器械) を用いて 2,000 rpm, 20 sec, 1 サイクルという条件で破砕し, 破砕後のサンプルを milliQ 1 ml に懸濁した. 根は milliQ 1 ml で 3 回リンスして表面に付着した培地成分を除いた後, milliQ 1 ml を加えて 15 min 超音波破砕し, 105°C で 5 min 処理した. 地上部と根それぞれの懸濁液を 15,000 rpm, 5 min, 20°C で遠心分離し, 得られた上清を 10 倍希釈したものを準備した. 希釈液 25 µl に含まれる硝酸イオン含量を, イオンクロマトグラフィーシステム Dionex Aquion (Thermo Fisher) を用いて測定した. 分析カラムは Dionex IonPac AS22 column (4 mm i.d. × 250 mm), 溶離液は 4.5 mM Na_2CO_3, 1.4 mM $NaHCO_3$, 溶出条件は流速 1.2 ml/min, 30°C, 15 min で分離を行った. 溶出したイオンは Dionex AERS 500 suppressor unit で溶離液のバックグラウンドを低減させた後, 電気伝導度検出器で検出した.

NO_3^-吸収活性の測定

垂直培養 14 日目の植物体の根を 0.1 mM $CaSO_4$ で 1 min 洗浄し, $^{15}NO_3^-$を 0.2 mM または 10 mM 含む改変 MS 液体培地に植物体全体を浸した. チャンバーで 10 min 静置した後, 植物体を 0.1 mM $CaSO_4$ で 3 回リンスし, 胚軸において根を切り離した. 回収した根を凍結乾燥し, Total-N と ^{15}N content を同位体比質量分析計 Flash EA1112-DELTA V PLUS ConFlo III system (Thermo Fisher Scientific) で測定した. 測定は昭光サイエンスに依頼した.

***CEPH* エストラジオール誘導株の作製**

CEPH 遺伝子の全長 ORF を PCR により増幅し, 得られた DNA 断片を Gibson Assembly システム (New England Biolabs Japan) を用いて *Xho*I 及び *Spe*I 処理したベクターpER8 へ導入した. このベクターをアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ Col 株に導入し, 得られた T1 種子を 20 mg/l ハイグロマイシン, 50 mg/l カルベニシリン, 100 mg/l セフォタキシムを含む B5 寒天培地で選抜した.

エストラジオール誘導条件

20 mg/l ハイグロマイシンを含む B5 寒天培地 (1% スクロース, 1.5% agar) を角シャーレに作製し, 滅菌・春化処理した *CEPH* エストラジオール誘導株 T2 種子を播種し, インキュベーター（22°C, 明所）で垂直培養を行なった. 播種後 5 日目にハイグロマイシン耐性を示した芽生えを改変 MS 寒天培地 (NO_3^- 10 mM, 1.5% agar) へ植え替え, さらに 9 日間垂直培養を行ない, 播種後 14 日目の株にエストラジオール処理を行なった. 角シャーレ 1 枚に対してエストラジオール 50 µM を含む改変 MS 液体培地 (NO_3^- 10 mM) を 2 ml 添加し, 6 時間後に各アッセイを実施した.

^{15}N 代謝標識

定量リン酸化プロテオミクスを行うため, WT 株 (Col) と *ceph-1* 株を ^{14}N (Light) または ^{15}N (Heavy) で代謝標識した．ここでは Forward：^{14}N WT/^{15}N *ceph-1*, Reciprocal：^{15}N WT/^{14}N *ceph-1* とした. WT 株および *ceph-1* 株の種子を ^{14}N または ^{15}N の B5 培地 (1.5% agar) に播種し, 22°C, 明所で 7 日間培養して芽出しを行った．その後改変 MS 培地 (1 mM NO_3^-, 1.5% agar) に植え替え, 22°C, 明所で 7 日間培養した.

タンパク質抽出・濃度測定

Forward では ^{14}N 標識した WT 株と ^{15}N 標識した *ceph-1* 株の根を生重量換算で 1:1 となるように混合して回収した. Reciprocal も同様に行った．回収した根を液体窒素で凍結させ，マルチビーズショッカー (安井器械) を用い, 1,500 rpm, 20 sec, 1 サイクルという条件で破砕した．破砕したサンプル 500 mg あたり 2.5 ml の抽出バッファー (250 mM Tris-HCl [pH 7.6], 290 mM sucrose, 25 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 100 µM 1,10-phenanthroline, 1× PhosSTOP phosphatase inhibitors [Roche]) を添加して懸濁し，氷温で超音波処理を 30 sec 行った．破砕液を 5,000 *g*, 15 min, 4°C で遠心分離し，得られた上清をメタノール/クロロホルム抽出によって精製した．まず，得られた上清に対して，4 倍量のメタノールを添加して vortex し，次に 1 倍量のクロロホルムを添加して vortex した．そして，3 倍量の milliQ を添加して vortex し，5,000 *g*, 15 min, 20°C で遠心分離した．遠心分離後に上層（メタノール・水）と下層（クロロホルム）の 2 層に分離し，タンパク質は中間層に沈殿した．上層だけを取り除き，再び 4 倍量のメタノールを添加して vortex し，5,000 *g*, 15 min, 20°C で遠心分離した．沈殿したタンパク質を減圧乾燥し, 8 M urea/250 mM Tris-HCl [pH 8.5]に終濃度 2 mg/ml となるよう溶解した．タンパク質濃度は Bradford 法によって測定した.

LysC/Trypsin **消化**

8 M urea/250 mM Tris-HCl [pH 8.5]に溶解したタンパク質溶液に対し, 500 mM tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) を 1/20 量加えたのち, 60°C, 1,000 rpm, で 1 時間インキュベート攪拌した．そのあと用時調製した 500 mM iodoacetamide をタンパク質溶液に対し 1/20 量加えたのち, 37°C, 1000 rpm, 30 分間, 遮光下インキュベートした．タンパク質重量の 1/100 重量に相当する LysC (Promega) 溶液を加えたのち, 37°C, 300rpm, 3 時間反応させた．その後 ProteaseMAX™ SurfactantMAX (終濃度 0.03%, Promega) , phosSTOP (1/20 量, Merck) およびタンパク質重量の 1/100 重量に相当する Trypsin (Promega) を含む 50 mM Tris-HCl [pH8.5]をタンパク質溶液の 3 倍量加えたのち, 37°C, 300 rpm, 16 時間攪拌反応させた. 20% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を加えて反応を停止させたのち, MonoSpinC18 カラム (GL サイエンス) で脱塩を行なった．脱塩後のサンプルを Speed Vac (Thermo Fisher Scientific) で乾固し, 80% アセトニトリル (0.1% TFA) 200 µl を加えて再溶解したのち, AssayMAP Bravo platform (Agilent) 上で Fe (III) -NTA cartridges (Agilent) を使ってリン酸化ペプチド濃縮を

行なった. カートリッジに吸着したリン酸化ペプチドを, 20% アセトニトリル (1% TFA) 20 µl, 25% アセトニトリル (5% NH_3) 20 µl, 25% アセトニトリル (5% pyrrolidine) 20 µl によって 3 回に分けて溶出した. 1st フラクションは milliQ 80 µl を加えて希釈し, 2nd および 3rd フラクションは一つにまとめて 20% TFA 40 µl を添加して酸性化したのち, GL-Tip SDB チップ (GL サイエンス) で脱塩を行なった. 脱塩後のサンプルは Speed Vac で乾固し, 測定まで-80°C で保存した.

LysC 消化

8M urea/250 mM Tris-HCl [pH 8.5]で溶解したタンパク質溶液に対し, 500 mM tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) を 1/20 量加えたのち, 60°C, 1,000 rpm で 1 時間インキュベートした. そのあと用時調製した 500 mM iodoacetamide をタンパク質溶液に対し 1/20 量加えたのち, 37°C, 1,000 rpm, 30 分間, 遮光下インキュベートした. タンパク質重量の 1/100 重量に相当する LysC (Promega) 溶液を加えたのち, 37°C, 300 rpm, 16 時間反応させた. 20% TFA を加えて反応を停止させたのち, MonoSpinC18 カラム (GL サイエンス) で脱塩を行なった. 以降の操作は LysC/Trypsin 消化と同様に行なった.

LC-MS/MS 解析

Q Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) に Dionex U3,000 gradient pump (Thermo Fisher Scientific) を組み合わせたシステムを用いた. 濃縮したリン酸化ペプチドサンプルを 2% アセトニトリル (0. 1% TFA) 20 µl で溶解し, 20,000 *g*, 5 min, 25°C で遠心分離して, 上清 7.5 µl を LC-MS/MS 解析に用いた. サンプルをトラップカラム (L-column ODS (300 µm i.d. × 5 mm), 化学物質評価研究機構) にインジェクトし, 2% アセトニトリル (0.1% TFA) でトラップカラムを洗浄した. トラップカラムから溶出したペプチドは nano-HPLC キャピラリーカラム (NTCC-360/100 (100 µm i.d. × 125 mm), 日京テクノス) に送られ, 流速 500 nl/min, アセトニトリル 5-40% (0.5% FA) , 100 min の条件で分離した. Q Exactive では, Dynamic exclusion 10 s に設定した data-dependent モードでデータ取得した. Full MS スキャンは *m/z* 350-5,000, resolution 70,000, maximum injection time 60 ms で行ない, 各スキャンにおけるピーク強度上位 10 個のペプチドについて MS/MS フラグメンテーションを実施した. MS/MS は, HCD 27 V, キャピラリー温度 250°C にて行なった.

Proteome Discoverer 2.3 によるペプチド同定

解析は Proteome Discoverer 2.3 (Thermo Fisher Scientific) にて行なった. 取得した MS/MS raw file について, TAIR10 シロイヌナズナタンパク質データベースに対して SEQUEST HT アルゴリズムを用いてペプチド検索を実施した. なお, ^{14}N 標識ペプチドと ^{15}N 標識ペプチドは別々に検索を行なった (SEQUEST HT の設定は以下に記載). ペプチドの同定信頼性は Percolator アルゴリズムで計算し, High-confidence のペプチドだけを定量解析に用いた.

■^{14}N, ^{15}N に共通の設定

・Peptide mass range: 350-5,000 Da

・Enzyme: Trypsin or LysC

・Precursor Mass Tolerance: 10 ppm

・Fragment Mass Tolerance: 0.02 Da

■^{14}N 標識ペプチド検出の設定

Dynamic Modifications

・S, T, Y: +79.966 Da (Phospho)

・M: +15.992 Da (Oxidation)

Static Modification

・C: +57.021 Da (Carbamidometyl)

■^{15}N 標識ペプチド検出の設定

Dynamic Modifications

・S、T、Y: +79.966 Da (Phospho)

・S, T, Y: +80.963 Da (^{15}N (1), Phospho)

・S, T, Y, M: +0.997 Da (^{15}N (1))

・M: +16.992 Da (^{15}N (1), Oxidation)

Static Modification

・C: +58.018 Da (^{15}N (1), Carbamidometyl)

・A, D, E, F, G, I, L, M, P, V: +0.997 Da (^{15}N (1))

・K, N, Q, W: +1.994 Da (^{15}N (2))

・H: +2.991 Da (^{15}N (3))

・R: +3.988 Da (^{15}N (4))

リン酸化レベルが変動したペプチドの絞り込み

Proteome Discoverer 解析後のデータのうち, annotated sequences, modifications, master protein accession, charge, *m/z*, retention time, precursor abundance の情報を用いた. まず, 同定ペプチドのうち非リン酸化ペプチドを除外し, ^{14}N 標識ペプチドと ^{15}N 標識ペプチドのグループに分けた. このとき, annotated sequences, modifications, charge が同一のペプチドを複数同定していた場合, precursor abundance が最も大きいペプチドを残して重複削除を行なった. 次に Microsoft Excel を用いて, ^{14}N 標識ペプチドと ^{15}N 標識ペプチドの間で annotated sequences, modifications, charge が一致するペアを作製し, 各ペアに対して Abundance Ratio (*ceph-1*/WT) を算出した. Forward と Reciprocal 双方において Abundance Ratio > 1.5 となったペプチドペアを絞り込み, それらのマススペクトルを Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) を用いて目視確認した.

リン酸化ペプチドの化学合成

NRT2.1 のリン酸化部位 (Ser28, Ser501, Thr521) を中心に配置した 15 アミノ酸配列のリン酸化ペプチドを, Fmoc 法により 0.05 mmol スケールで Initiator+ Alstra (Biotage) を用いて TrtA-PEG resin 上で合成した. 合成したペプチドレジンをジクロロメタンで洗浄したのち, TFA/DTT/Water/TIPS (2, 640 µl/150 mg/150 µl/60 µl) に懸濁し, 30°C, 100 rpm, 2 時間反応させて保護基およびレジンを外した. ペプチド溶液に冷却ジエチルエーテル 40 ml を添加して転倒混和し, 2,000 rpm, 5 min 遠心してペプチドを沈殿させた. この操作を再度行なって沈殿を洗浄し, 真空デシケーターによって沈殿を乾燥させ, milliQ 500 µl に溶かしたものを HPLC で精製した. カラムは Cadenza CD-C18 column (4. 6 × 250 mm, Imtakt) を用い, 流速 1 ml/min, アセトニトリル 10-50% (0.1% TFA), 15 min のグラジエント条件で行なった. ペプチドを含むピークを分取し, 凍結乾燥により粉末状の精製ペプチドを得た. 精製ペプチドは semi-micro HPLC system (日本分光) と LCQ Deca XP-plus ESI ion-trap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を用いた LC/MS で構造の確認を行なった. カラムは Cadenza CD-C18 column (2.0 × 150 mm, Imtakt) を用い, 流速 100 µl/min, アセトニトリル 0-50% (0.1% FA), 15 min のグラジエント条件で行なった.

CEPH-GFP の免疫沈降

タンパク質抽出には, 播種後 14 日目の CEPH-GFP 形質転換体 T2 株の根 500 mg を用いた. マルチビーズショッカー (安井機械) で根を凍結破砕し, タンパク質抽出バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, 1 tablet/10 ml)) を 1 ml 加えて懸濁した. 氷温において 5 秒間超音波破砕し, 氷上で 30 分間置いたのち, 懸濁液を 4°C, 15,000 rpm, 15 min で 2 回遠心し上清を回収した. Dynabeads Protein G (Invitorogen) の懸濁液を 100 µl 分注し, Mcllvaine buffer (24.46 mM Citric Acid, 51.66 mM Na_2HPO_4, pH 5.0) で 3 回洗浄した. Anti-GFP 抗体 ab290 (5 mg/ml, abcam) 10 µl を PBS buffer (2.88 mM NaH_2PO_4, 7.06 mM Na_2HPO_4, 13.69 mM NaCl, pH 7.0) で 15 倍に希釈し, Dynabeads と常温で 40 分間ローテーターを用いて反応させた. Mcllvaine buffer で再び 3 回洗浄後, 0.2 M triethanolamine で 2 回洗浄し, 20 mM dimethyl pimelimidate x2HCl (DMP) (in 0.2 M triethanolamine) を加えて懸濁し, 20°C で 30 分間ローテーターを用いて反応させた.上清を除いた後, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) を加えて懸濁し, 20°C で 15 分間ローテーターを用いて反応させた. そして PBS buffer/0.1 % Tween-20 で 3 回洗浄, タンパク質抽出バッファーで 3 回洗浄した. ab290-crosslinked Dynabeads に CEPH-GFP タンパク質抽出物を加えて懸濁し, 4°C で 2 時間ローテーターを用いて反応させた. 洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, 1 tablet/10 ml)) で 3 回洗浄した.

In vitro phosphatase assay

CEPH-GFP 結合ビーズを phosphatase バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 60 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EGTA, 0.1% β-mercaptoethanol)で 3 回洗浄した. CEPH-GFP 結合ビーズ 10 µl を phosphatase バッファーに懸濁し, 各合成リン酸化ペプチド (終濃度 200 µM) を加えて 50 µl としたものを 96-well プレートにアプライし, 30°C, 800 rpm, 3 時間反応させた. 1% FA を 5 µl 加えて反応を止めた後, 反応液 5 µl を LC/MS で解析した. カラムは Cadenza CD-C18 column (2.0 × 150 mm, Imtakt) を用い, 流速 100 µl/min, アセトニトリル 0-50% (0.1% FA), 15 min のグラジエント条件で行なった. SIM (selected ion monitoring) モードを用い, isolation width を 3.0 *m/z* に設定してマスクロマトグラムを得た. 各ペプチドの *m/z* は下記に示す.

・Ser501 ペプチド: *m/z* 865.9
・Ser28 ペプチド: *m/z* 831.9
・Thr521 ペプチド: *m/z* 833.4

NRT2.1 Ser501 **置換変異体の作製**

nrt2.1-2.2 二重欠損株は SALK tDNA mutant collection (SALK_035429, Col 株由来) から 1 系統単離した. *NRT2.1* 遺伝子のプロモーター領域 1,335 bp から終止コドンまでを PCR により増幅した. Ser501 を Ala と Asp に置換した変異はプライマーによって導入した. 得られた DNA 断片を Gibson Assembly システム (New England Biolabs Japan) を用いて *Hind*III 及び *BamH*I 処理したベクターpCAMBIA1300-BASTA へ導入し, NRT2.1/ pCAMBIA ベクターを作製した. これらのベクターをアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ *nrt2.1-2.2* 二重欠損株に導入し, 得られた T1 種子を 10 mg/l Basta, 50 mg/l カルベニシリン, 100 mg/l セフォタキシムを含む B5 寒天培地で選抜した.

謝辞

本研究の遂行及び論文作製にあたり，適切かつ懇切丁寧な御指導を賜りました細胞間シグナル研究グループの松林嘉克教授に心より厚く御礼申し上げます．先生には学部 4 年で研究室に配属された当初からご指導いただいており，植物の栽培方法や実験装置の取り扱い，データの解釈，論文の書き方など，研究に関わるあらゆる事柄を教えていただきました．また，修士で卒業して民間企業に就職した私が研究の世界に戻りたいと相談した際に，即座に研究員として復帰する目処を立てて頂き，その後の博士後期課程への進学を含めて，研究に専念できる環境を整えてくださいました．本研究をまとめることができたのは，松林先生の後押しがあったおかげです．本当にありがとうございました．

第 1 章の維管束マイクロアレイや過剰発現株の作製を行なっていただいた田中美名博士，CEPR1 の GUS 染色や Alexa-CEP1 の局在観察を行なっていただいた名古屋大学大学院生命農学研究科植物情報分子研究室の田畑亮特任講師に深く感謝致します．

第 2 章の CEPH 欠損株の定量リン酸化プロテオミクスにおいて，サンプルの前処理から nano LC-MS/MS 解析までを実施していただいた名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所分子構造センターの桑田啓子特任講師ならびに野田沙希技術補佐員に深く感謝致します．

Arabidopsis Gene 1.0 ST Array によるマイクロアレイ解析を行って頂きました，東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻　生体制御研究室の杉澤由姫子氏に深く感謝致します．

本研究室の篠原秀文講師（現・福井県立大学生物資源学部 准教授）と大西（小川）真理助教のお二人にも，学部 4 年の頃から大変お世話になりました．配属当初は他に学生がいませんでしたが，私が研究室に馴染めるようサポートしていただきました．また，お二人からも多くの実験操作を教わり，研究のアドバイスをいただきました．学位取得も応援していただき，本当にありがとうございました．

また，林陽子研究員や山下恭子研究員，そして後輩の皆さんには，日々の研究室生活でお世話になりました．研究が行き詰まったときに雑談に付き合っていただき，リフレッシュすることができました．ありがとうございました．

参考文献

1. Crawford Nigel, M. *et al.* Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen N utrition. *The Arabidopsis Book.* **1**, 1–24 (2002).
2. Gutiérrez, R. A. Systems Biology for Enhanced Plant Nitrogen Nutrition. *Science.* **336**, 16 73–1675 (2012).
3. Crawford, N. M. & Glass, A. D. . Molecular and physiological aspects of nitrate uptake i n plants. *Trends Plant Sci.* **3**, 389–395 (1998).
4. Malagoli, P. *et al.* Modeling Nitrogen Uptake in Oilseed Rape cv Capitol during a Growt h Cycle Using Influx Kinetics of Root Nitrate Transport Systems and Field Experimental Data. *Plant Physiol.* **134**, 388–400 (2004).
5. Léran, S. *et al.* A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRA NSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci.* **19**, 5–9 (2014).
6. von Wittgenstein, N. J. *et al.* Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptid e transporters in land plants. *BMC Evol. Biol.* **14**, 11 (2014).
7. Dreyer, I. *et al.* Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. *J. Exp. Bot.* **50**, 1073–1087 (1999).
8. Tsay, Y. F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. a & Crawford, N. M. The herbicide sensitivit y gene *CHL1* of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705– 713 (1993).
9. Liu, K. H. & Tsay, Y. F. Switching between the two action modes of the dual-affinity n itrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.* **22**, 1005–1013 (2003).
10. Unkles, S. E. *et al. crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 204–208 (1991).
11. Quesada, A., Galvan, A. & Fernandez, E. Identification of nitrate transporter genes in *Chl amydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **5**, 407–419 (1994).
12. Trueman, L. J., Richardson, A. & Forde, B. G. Molecular cloning of higher plant homolo gues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene* **175**, 223–231 (1996).
13. Quesada, A. *et al.* PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous t o the high-affinity nitrate transporters of the *crnA* family. *Plant Mol. Biol.* **34**, 265–274 (1997).
14. Ranamalie Amarasinghe, B. H. R. *et al.* Regulation of *GmNRT2* expression and nitrate tra nsport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta* **206**, 44–52 (1998).
15. Filleur, S. & Daniel-Vedele, F. Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter is olated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* **207**, 461–469 (1999).

16. Filleur, S. *et al.* An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nit rate uptake. *FEBS Lett.* **489**, 220–224 (2001).
17. Cerezo, M. *et al.* Major alterations of the regulation of root NO_3^- uptake are associated with the mutation of *Nrt2.1* and *Nrt2.2* genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **127**, 262–271 (2001).
18. Li, W. *et al.* Dissection of the *AtNRT2.1:AtNRT2.2* Inducible High-Affinity Nitrate Transp orter Gene Cluster. *Plant Physiol.* **143**, 425–433 (2007).
19. Kiba, T. *et al.* The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots a nd shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell* **24**, 245–58 (2012).
20. Lezhneva, L. *et al.* The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acq uisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *Plant J.* **80**, 230–241 (2014).
21. Lejay, L. *et al.* Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N- a nd C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J.* **18**, 509–519 (1999).
22. Gansel, X., Muños, S., Tillard, P. & Gojon, A. Differential regulation of the NO_3^- and N H_4^+ transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in *Arabidopsis*: relation with long-distance an d local controls by N status of the plant. *Plant J.* **26**, 143–155 (2001).
23. Lejay, L. *et al.* Regulation of Root Ion Transporters by Photosynthesis: Functional Import ance and Relation with Hexokinase. *Plant Cell* **15**, 2218–2232 (2003).
24. Lejay, L. *et al.* Oxidative Pentose Phosphate Pathway-Dependent Sugar Sensing as a Mec hanism for Regulation of Root Ion Transporters by Photosynthesis. *Plant Physiol.* **146**, 20 36–2053 (2008).
25. Fraisier, V., Gojon, A., Tillard, P. & Daniel-Vedele, F. Constitutive expression of a putati ve high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcript ional regulation by a reduced nitrogen source. *Plant J.* **23**, 489–496 (2000).
26. Wirth, J. *et al.* Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidop sis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **282**, 23541–23552 (2007).
27. Jacquot, A., Li, Z., Gojon, A., Schulze, W. & Lejay, L. Post-translational regulation of ni trogen transporters in plants and microorganisms. *J. Exp. Bot.* **68**, 2567–2580 (2017).
28. Tong, Y., Zhou, J.-J., Li, Z. & Miller, A. J. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *Plant J.* **41**, 442–450 (2004).
29. Okamoto, M. *et al.* High-Affinity Nitrate Transport in Roots of Arabidopsis Depends on Expression of the *NAR2*-Like Gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiol.* **140**, 1036–1046 (2006).
30. Orsel, M. *et al.* Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol.* **142**, 1304–1317 (2 006).
31. Laugier, E. *et al.* Regulation of high-affinity nitrate uptake in roots of arabidopsis depend

s predominantly on posttranscriptional control of the NRT2.1/NAR2.1 transport system. *Pl ant Physiol.* **158**, 1067–1078 (2012).

32. Jacquot, A. *et al.* NRT2.1 C-terminus phosphorylation prevents root high affinity nitrate u ptake activity in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **228**, 1038-1054 (2020).
33. Engelsberger, W. R. & Schulze, W. X. Nitrate and ammonium lead to distinct global dyn amic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved Arabidopsis seedlings. *P lant J.* **69**, 978–995 (2012).
34. Menz, J., Li, Z., Schulze, W. X. & Ludewig, U. Early nitrogen-deprivation responses in Arabidopsis roots reveal distinct differences on transcriptome and (phospho-) proteome lev els between nitrate and ammonium nutrition. *Plant J.* 1–18 (2016).
35. Zou, X., Liu, M. Y., Wu, W. H. & Wang, Y. Phosphorylation at Ser28 stabilizes the *Ar abidopsis* nitrate transporter NRT2.1 in response to nitrate limitation. *J. Integr. Plant Biol.* **62**, 865–876 (2020).
36. Drew, M. C., Saker, L. R. & Ashley, T. W. Nutrient Supply and the Growth of the Sem inal Root System in Barley. *J. Exp. Bot.* **24**, 1189–1202 (1973).
37. Drew, M. C. & Saker, L. R. Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley: II. Localized, compensatory increases in lateral root growth and rates op nitrate uptake when nitrate supply is restricted to only part of the root system. *J. Exp. Bot.* **26**, 79–90 (1975).
38. Edwards, J. H. & Barber, S. A. Nitrogen Flux into Corn Roots as Influenced by Shoot Requirement. *Agron. J.* **68**, 471–473 (1976).
39. Robinson, D. & Rorison, I. H. A COMPARISON OF THE RESPONSES OF *LOLIUM P ERENNE L.* *, *HOLCUS LANATUS L.* AND *DESCHAMPSIA FLEXUOSA* (L.) TRIN. TO A LOCALIZED SUPPLY OF NITROGEN. *New Phytol.* **94**, 263–273 (1983).
40. Burns, I. G. Short- and long-term effects of a change in the spatial distribution of nitrate in the root zone on N uptake, growth and root development of young lettuce plants. *Plan t. Cell Environ.* **14**, 21–33 (1991).
41. Tillard, P., Passama, L. & Gojon, A. Are phloem amino acids involved in the shoot to r oot control of NO_3^- uptake in *Ricinus communis* plants? *J. Exp. Bot.* **49**, 1371–1379 (199 8).
42. Ruffel, S. *et al.* Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cyt okinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proc. Natl. Acad. S ci. U. S. A.* **108**, 18524–18529 (2011).
43. Clement, C. R., Hopper, M. J., Jones, L. H. P. & Leafe, E. L. The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution: II. Effect of light, defoliation, and relation ship to CO_2 flux. *J. Exp. Bot.* **29**, 1173–1183 (1978).

44. Clarkson, D. T., Hopp, M. J. & Jones, L. H. P. The effect of root temperature on the u ptake of nitrogen and the relative size of the root system in *Lolium perenne.* I. Solutions containing both NH_4^+ and NO_3^-. *Plant. Cell Environ.* **9**, 535–545 (1986).
45. Cooper, H. D. & Clarkson, D. T. Cycling of Amino-Nitrogen and other Nutrients betwee n Shoots and Roots in Cereals—A Possible Mechanism Integrating Shoot and Root in the Regulation of Nutrient Uptake. *J. Exp. Bot.* **40**, 753–762 (1989).
46. Sakakibara, H. Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling. *Plant J.* **105**, 421–430 (2021).
47. Poitout, A. *et al.* Responses to Systemic Nitrogen Signaling in Arabidopsis Roots Involve *trans*-Zeatin in Shoots. *Plant Cell* **30**, 1243–1257 (2018).
48. Gent, L. & Forde, B. G. How do plants sense their nitrogen status? *J. Exp. Bot.* **68**, 253 1–2540 (2017).
49. Tabata, R. *et al.* Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* **346**, 343–346 (2014).
50. Ohyama, K., Ogawa, M. & Matsubayashi, Y. Identification of a biologically active, small, secreted peptide in Arabidopsis by *in silico* gene screening, followed by LC-MS-based st ructure analysis. *Plant J.* **55**, 152–60 (2008).
51. Delay, C., Imin, N. & Djordjevic, M. A. *CEP* genes regulate root and shoot development in response to environmental cues and are specific to seed plants. *J. Exp. Bot.* **64**, 5383 –5394 (2013).
52. Roberts, I. *et al.* The CEP family in land plants: Evolutionary analyses, expression studie s, and role in Arabidopsis shoot development. *J. Exp. Bot.* **64**, 5371–5381 (2013).
53. Endo, M., Shimizu, H. & Araki, T. Rapid and simple isolation of vascular, epidermal and mesophyll cells from plant leaf tissue. *Nat. Protoc.* **11**, 1388–95 (2016).
54. Xing, S. & Zachgo, S. *ROXY1* and *ROXY2*, two Arabidopsis glutaredoxin genes, are requi red for anther development. *Plant J.* **53**, 790–801 (2008).
55. Xing, S., Rosso, M. G. & Zachgo, S. *ROXY1*, a member of the plant glutaredoxin famil y, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana. Development* **132**, 1555–1565 (2005).
56. Chen, X. *et al.* Shoot-to-Root Mobile Transcription Factor HY5 Coordinates Plant Carbon and Nitrogen Acquisition. *Curr. Biol.* **26**, 640–646 (2016).
57. Forde, B. G. LOCAL AND LONG-RANGE SIGNALING PATHWAYS REGULATING P LANT RESPONSES TO NITRATE. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 29–70 (2002).
58. Rouhier, N. Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. *J. Exp. Bot.* **57**, 1685–1 696 (2006).
59. Gutsche, N., Thurow, C., Zachgo, S. & Gatz, C. Plant-specific CC-type glutaredoxins: Fu

nctions in developmental processes and stress responses. *Biological Chemistry* **396**, 495–50 9 (2015).

60. Patterson, K. *et al.* Nitrate-Regulated Glutaredoxins Control Arabidopsis Primary Root Gro wth. *Plant Physiol.* **170**, 989–99 (2016).
61. Li, S., Gutsche, N. & Zachgo, S. The ROXY1 C-terminal L**LL motif is essential for th e interaction with TGA transcription factors. *Plant Physiol.* **157**, 2056–68 (2011).
62. Ota, R., Ohkubo, Y., Yamashita, Y., Ogawa-Ohnishi, M. & Matsubayashi, Y. Shoot-to-roo t mobile CEPD-like 2 integrates shoot nitrogen status to systemically regulate nitrate upta ke in *Arabidopsis. Nat. Commun.* **11**, 641 (2020).
63. Zhang, K. *et al. Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nat. Commun.* **5**, 3274 (2014).
64. Ko, D. *et al. Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytok inin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7150–7155 (2014).
65. Paultre, D. S. G., Gustin, M.-P., Molnar, A. & Oparka, K. J. Lost in transit: long-distanc e trafficking and phloem unloading of protein signals in Arabidopsis homografts. *Plant Ce ll* **28**, 2016-2025 (2016).
66. Liu, Y., Lin, T., Valencia, M. V., Zhang, C. & Lv, Z. Unraveling the roles of vascular proteins using proteomics. *Molecules* **26**, 1–17 (2021).
67. Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. & Araki, T. A Pair of Related Genes with Antagonistic Roles in Mediating Flowering Signals. *Science* **286**, 1960–1962 (1999).
68. Kardailsky, I. *et al.* Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science* **286**, 1962–1965 (1999).
69. Grillet, L., Lan, P., Li, W., Mokkapati, G. & Schmidt, W. IRON MAN is a ubiquitous f amily of peptides that control iron transport in plants. *Nat. Plants* **4**, 953–963 (2018).
70. Walz, C. *et al.* Proteomics of curcurbit phloem exudate reveals a network of defence prot eins. *Phytochemistry* **65**, 1795–1804 (2004).
71. Dafoe, N. J. *et al.* Analysis of the poplar phloem proteome and its response to leaf wou nding. *J. Proteome Res.* **8**, 2341–2350 (2009).
72. Giavalisco, P., Kapitza, K., Kolasa, A., Buhtz, A. & Kehr, J. Towards the proteome of *B rassica napus* phloem sap. *Proteomics* **6**, 896–909 (2006).
73. Ogden, A. J. *et al.* Phloem exudate protein profiles during drought and recovery reveal a biotic stress responses in tomato vasculature. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–20 (2020).
74. Carella, P. *et al.* Comparative proteomics analysis of phloem exudates collected during the induction of systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* **171**, 1495–1510 (2016).
75. Ruffel, S. Nutrient-Related Long-Distance Signals: Common Players and Possible Cross-Ta lk. *Plant Cell Physiol.* **59**, 1723–1732 (2018).

76. Oldroyd, G. E. D. & Leyser, O. A plant's diet, surviving in a variable nutrient environm ent. *Science* **368**, eaba0196 (2020).
77. Fujii, H., Chiou, T. J., Lin, S. I., Aung, K. & Zhu, J. K. A miRNA involved in phospha te-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **15**, 2038–2043 (2005).
78. Chiou, T. J. *et al.* Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Pl ant Cell* **18**, 412–421 (2006).
79. Aung, K. *et al. pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol.* **141**, 1000–1011 (2006).
80. Lin, S. I. *et al.* Regulatory network of microRNA399 and *PHO2* by systemic signaling. *P lant Physiol.* **147**, 732–746 (2008).
81. Lappartient, A. G. & Touraine, B. Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact canola: The role of phloem-translocated glutathione. *Plant Phy siol.* **111**, 147–157 (1996).
82. Lappartient, A. G., Vidmar, J. J., Leustek, T., Glass, A. D. M. & Touraine, B. Inter-orga n signaling in plants: Regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expressi on in roots mediated by phloem-translocated compound. *Plant J.* **18**, 89–95 (1999).
83. Rouached, H. *et al.* Differential regulation of the expression of two high-affinity sulfate tr ansporters, SULTR1.1 and SULTR1.2, in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **147**, 897–911 (200 8).
84. Li, Y. *et al.* IRON MAN interacts with BRUTUS to maintain iron homeostasis in *Arabid opsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, 1–10 (2021).
85. Ohkubo, Y., Tanaka, M., Tabata, R., Ogawa-Ohnishi, M. & Matsubayashi, Y. Shoot-to-roo t mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nat. Plants* **3**, 1–6 (2017).
86. Wang, Y. fan *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of *StPP2C* gene f amily in response to multiple stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Integr. Agric.* **19**, 1609–1624 (2020).
87. Yang, Q. *et al.* Genome-wide Identification of *PP2C* Genes and Their Expression Profilin g in Response to Drought and Cold Stresses in *Medicago truncatula*. *Sci. Rep.* **8**, 1–14 (2018).
88. Xue, T. *et al.* Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice an d Arabidopsis. *BMC Genomics* **9**, 1–21 (2008).
89. Fan, K. *et al.* Molecular evolution and lineage-specific expansion of the PP2C family in *Zea mays*. *Planta* **250**, 1521–1538 (2019).
90. Komatsu, K. *et al.* Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C r eveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between Arabidopsis an

d the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol. Biol.* **70**, 327–340 (2009).

91. Nelson, C. J., Huttlin, E. L., Hegeman, A. D., Harms, A. C. & Sussman, M. R. Implicati ons of ^{15}N-metabolic labeling for automated peptide identification in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* **7**, 1279–1292 (2007).
92. Liu, K.-H. H. & Tsay, Y.-F. F. Switching between the two action modes of the dual-affi nity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.* **22**, 1005–1013 (2003).
93. Ho, C. H., Lin, S. H., Hu, H. C. & Tsay, Y. F. CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell* **138**, 1184–1194 (2009).
94. Sun, J. *et al.* Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature* **507**, 73–77 (2014).
95. Parker, J. L. & Newstead, S. Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transp orter NRT1.1. *Nature* **507**, 68–72 (2014).
96. Straub, T., Ludewig, U. & Neuhäuser, B. The kinase CIPK23 inhibits ammonium transpor t in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **29**, 409–422 (2017).
97. Xu, J. *et al.* A Protein Kinase, Interacting with Two Calcineurin B-like Proteins, Regulate s K^+ Transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* **125**, 1347–1360 (2006).
98. Li, L., Kim, B. G., Cheong, Y. H., Pandey, G. K. & Luan, S. A Ca^{2+} signaling pathway regulates a K^+ channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12625–12630 (2006).
99. Ragel, P. *et al.* The CBL-interacting protein kinase CIPK23 regulates HAK5-mediated hig h-affinity K^+ uptake in arabidopsis roots. *Plant Physiol.* **169**, 2863–2873 (2015).
100. Scherzer, S. *et al.* Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cell s of Venus flytraps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 7309–7314 (2015).
101. Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S. & Zhu, J. K. Regulation of SOS 1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Pr oc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8436–8441 (2002).
102. Förster, S. *et al.* Wounding-Induced Stomatal Closure Requires Jasmonate-Mediated Activa tion of GORK K^+ Channels by a Ca^{2+} Sensor-Kinase CBL1-CIPK5 Complex. *Dev. Cell* **4 8**, 87-99.e6 (2019).
103. Tang, R. J. *et al.* Plant Membrane Transport Research in the Post-genomic Era. *Plant Co mmun.* **1**, 1–18 (2020).
104. Jacquot, A. *et al.* NRT2.1 C-terminus phosphorylation prevents root high affinity nitrate u ptake activity in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **228**, 1038–1054 (2020).
105. Bhaskara, G. B., Wong, M. M. & Verslues, P. E. The flip side of phospho-signalling: Re gulation of protein dephosphorylation and the protein phosphatase 2Cs. *Plant Cell Enviro n.* **42**, 2913–2930 (2019).

106. Bhaskara, G. B., Wen, T. N., Nguyen, T. T. & Verslues, P. E. Protein phosphatase 2Cs and *microtubule-associated stress protein 1* control microtubule stability, plant growth, and drought response. *Plant Cell* **29**, 169–191 (2017).

107. Fahs, S., Lujan, P. & Köhn, M. Approaches to study phosphatases. *ACS Chem. Biol.* **11**, 2944–2961 (2016).

108. Carrasco, J. L. *et al.* Arabidopsis protein phosphatase DBP1 nucleates a protein network with a role in regulating plant defense. *PLoS One* **9**, (2014).

109. Xiang, Y. *et al.* Sequence polymorphisms at the *REDUCED DORMANCY5* pseudophospha tase underlie natural variation in Arabidopsis dormancy. *Plant Physiol.* **171**, 2659–2670 (2 016).

110. Wong, M. M. *et al.* Phosphoproteomics of Arabidopsis Highly ABA-Induced1 identifies A T-Hook-Like10 phosphorylation required for stress growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sc i. U. S. A.* **116**, 2354–2363 (2019).