การควบคุมการแสดงออกของยีนไนเตรตรีดักเตสในพืชชั้นสูง: บทบาทของปัจจัยควบคุมการถอดรหัสและสัญญาณสิ่งแวดล้อม

บทคัดย่อ

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยพืชส่วนใหญ่ดูดไนโตรเจนจากดินในรูปไนเตรต การนำไนเตรตไปใช้เริ่มต้นจากปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตส ซึ่งเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ ดังนั้น การควบคุมปริมาณและกิจกรรมของเอนไซม์นี้จึงมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการใช้ไนโตรเจนของพืช การแสดงออกของยีนไนเตรตรีดักเตสไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณไนเตรตเพียงอย่างเดียว แต่ยังตอบสนองต่อแสง น้ำตาล เมแทบอไลต์ที่มีไนโตรเจน ฮอร์โมนพืช อุณหภูมิต่ำ ภาวะแล้ง และวัฏจักรกลางวัน–กลางคืน ปัจจัยควบคุมการถอดรหัสกลุ่ม NODULE INCEPTION-like proteins หรือ NLPs โดยเฉพาะ NLP6 และ NLP7 มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดและการเปลี่ยนแปลงไนเตรต ขณะที่ปัจจัยกลุ่ม LBD37–LBD39 อาจทำหน้าที่ควบคุมย้อนกลับเชิงลบเมื่อมีสารประกอบไนโตรเจนสะสม ส่วน HY5 และ HYH เชื่อมโยงการแสดงออกของยีนไนเตรตรีดักเตสเข้ากับสัญญาณแสง ความเข้าใจกลไกเหล่านี้มีความสำคัญต่อการปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนและการพัฒนาพืชที่ให้ผลผลิตสูงโดยลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม บทความนี้เรียบเรียงจากบทความทบทวนของ Yanagisawa เรื่องปัจจัยควบคุมการถอดรหัสที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนไนเตรตรีดักเตสในพืชชั้นสูง

คำสำคัญ: ไนเตรตรีดักเตส, การดูดกลืนไนโตรเจน, การแสดงออกของยีน, NLP, LBD, HY5, สัญญาณไนเตรต

---

1. ไนเตรตรีดักเตสกับการใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนของพืช

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิก คลอโรฟิลล์ โคเอนไซม์ และสารชีวโมเลกุลอีกหลายชนิด แม้บรรยากาศจะมีแก๊สไนโตรเจนในปริมาณมาก แต่พืชส่วนใหญ่ไม่สามารถนำแก๊สไนโตรเจนมาใช้โดยตรงได้ จึงต้องอาศัยสารประกอบไนโตรเจนในดิน โดยเฉพาะไนเตรต ($\mathrm{NO_3^-}$) และแอมโมเนียม ($\mathrm{NH_4^+}$)

เมื่อไนเตรตเข้าสู่เซลล์พืช ขั้นตอนแรกของการนำไปใช้คือการรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ ($\mathrm{NO_2^-}$) โดยเอนไซม์ **ไนเตรตรีดักเตส** หรือ NR ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นในไซโทพลาซึมและต้องใช้ NADH หรือ NADPH เป็นแหล่งอิเล็กตรอน จากนั้นไนไตรต์จะถูกลำเลียงเข้าสู่พลาสติดหรือคลอโรพลาสต์ และเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมโดยเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเตส แอมโมเนียมที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่วัฏจักร GS/GOGAT เพื่อสร้างกลูตามีน กลูตาเมต และกรดอะมิโนชนิดอื่นต่อไป

เนื่องจากปฏิกิริยาที่เร่งโดยไนเตรตรีดักเตสเป็นจุดเริ่มต้นและเป็นขั้นตอนสำคัญของเส้นทางการดูดกลืนไนเตรต พืชจึงต้องควบคุมการสร้างเอนไซม์นี้อย่างละเอียด หากสร้างมากเกินไปในช่วงที่ไม่มีไนเตรตหรือไม่มีพลังงานเพียงพอ พืชจะสูญเสีย

พลังงานโดยไม่จำเป็น แต่หากสร้างน้อยเกินไปเมื่อมีไนเตรตมาก พืชก็ไม่สามารถนำไนโตรเจนมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่

ในพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* มียีนไนเตรตรีดักเตสหลักสองยีน ได้แก่ **NIA1** และ **NIA2** โดย NIA2 มีส่วนรับผิดชอบต่อกิจกรรมของไนเตรตรีดักเตสส่วนใหญ่ ขณะที่ NIA1 และ NIA2 อาจตอบสนองต่อสัญญาณบางประเภทแตกต่างกัน

---

2. การควบคุมยีนไนเตรตรีดักเตสมีความซับซ้อน

การควบคุมไนเตรตรีดักเตสเกิดขึ้นได้หลายระดับ ทั้งระดับการถอดรหัส ระดับหลังการถอดรหัส และระดับหลังการแปลโปรตีน กิจกรรมของเอนไซม์สามารถเปลี่ยนแปลงได้จากการเติมหรือกำจัดหมู่ฟอสเฟต การจับกับโปรตีน 14-3-3 และการสลายโปรตีน ขณะเดียวกัน ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน NIA1 และ NIA2 ก็ถูกควบคุมโดยสัญญาณจากทั้งภายในและภายนอกเซลล์

แผนภาพในหน้า 2 ของบทความต้นฉบับแสดงให้เห็นว่าไนเตรต แสง และไซโทไคนินส่งเสริมการแสดงออกของยีนไนเตรตรีดักเตส ขณะที่กลูตามีน กรดแอบไซซิก ภาวะแล้ง และอุณหภูมิต่ำมีแนวโน้มยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าว แผนภาพยังเชื่อมโยงกระบวนการดูดกลืนไนโตรเจนเข้ากับการสังเคราะห์ด้วยแสงและเมแทบอลิซึมของคาร์บอนอย่างชัดเจน

2.1 ไนเตรตเป็นทั้งสารอาหารและโมเลกุลส่งสัญญาณ

ไนเตรตไม่ได้ทำหน้าที่เป็นเพียงแหล่งไนโตรเจน แต่ยังทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ เมื่อพืชที่ขาดไนโตรเจนได้รับไนเตรต การแสดงออกของยีน NIA1 และ NIA2 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว พร้อมกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงไนเตรต การลำเลียงไนไตรต์ และการเปลี่ยนไนไตรต์เป็นแอมโมเนียม

การตอบสนองอย่างรวดเร็วนี้ช่วยให้พืชสามารถปรับระบบเมแทบอลิซึมให้พร้อมใช้ประโยชน์จากไนเตรตที่เพิ่งได้รับ โดยไม่ต้องรอให้ปริมาณไนโตรเจนภายในเซลล์เพิ่มขึ้นก่อน

2.2 แสงและน้ำตาลเชื่อมโยงเมแทบอลิซึมของคาร์บอนกับไนโตรเจน

การดูดกลืนไนเตรตเป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานสูง การรีดิวซ์ไนเตรตและไนไตรต์ต้องใช้สารรีดิวซ์ ส่วนการนำแอมโมเนียมเข้าสู่สารอินทรีย์ต้องใช้ ATP และโครงคาร์บอน โดยเฉพาะ 2-ออกโซกลูตาเรต ดังนั้น การกระตุ้นยีนไนเตรตรีดักเตสด้วยแสงจึงช่วยประสานการใช้ไนโตรเจนเข้ากับการสังเคราะห์ด้วยแสง

น้ำตาลที่เกิดจากการสังเคราะห์ด้วยแสง เช่น ซูโครส กลูโคส และฟรักโทส สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนไนเตรตรีดักเตสได้ แม้พืชจะอยู่ในความมืด ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าพืชใช้ระดับน้ำตาลเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีพลังงานและโครงคาร์บอนเพียงพอสำหรับการนำไนโตรเจนไปสร้างกรดอะมิโนหรือไม่

2.3 การควบคุมย้อนกลับจากสารประกอบไนโตรเจน

เมื่อพืชดูดกลืนไนเตรตและสร้างกรดอะมิโนมากขึ้น สารประกอบที่มีไนโตรเจน โดยเฉพาะกลูตามีน สามารถส่งสัญญาณย้อนกลับให้ลดการแสดงออกของยีนไนเตรตรีดักเตส กลไกนี้ช่วยป้องกันการดูดกลืนไนโตรเจนมากเกินความต้องการและรักษาสมดุลระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนภายในเซลล์

2.4 ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมและฮอร์โมนพืช

อุณหภูมิต่ำทำให้รูปแบบการแสดงออกของยีนไนเตรตรีดักเตสในรอบวันล่าช้า ขณะที่ภาวะแล้งลดปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของไนเตรตรีดักเตสในใบพืชบางชนิด ผลดังกล่าวสอดคล้องกับสภาพทางสรีรวิทยา เพราะเมื่อพืชขาดน้ำ การเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง ความต้องการไนโตรเจนจึงลดลงตามไปด้วย

ฮอร์โมนไซโทไคนินมีแนวโน้มส่งเสริมการแสดงออกของยีนไนเตรตรีดักเตส ส่วนกรดแอบไซซิกหรือ ABA มีผลตรงกันข้าม อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นยีนไนเตรตรีดักเตสโดยไนเตรตสามารถเกิดขึ้นได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องอาศัยการเพิ่มขึ้นของไซโทไคนินเสมอไป

---

3. NLPs: ตัวควบคุมหลักของการตอบสนองต่อไนเตรต

ความก้าวหน้าสำคัญในการทำความเข้าใจสัญญาณไนเตรตคือการค้นพบปัจจัยควบคุมการถอดรหัสกลุ่ม **NODULE INCEPTION-like proteins หรือ NLPs** โปรตีนกลุ่มนี้มีบริเวณจับดีเอ็นเอชนิด RWP-RK ซึ่งพบเฉพาะในพืช

จีโนมของ *Arabidopsis* มียีน NLP อย่างน้อยเก้ายีน ได้แก่ NLP1–NLP9 แต่สมาชิกที่ได้รับการศึกษาอย่างละเอียดคือ **NLP6** และ **NLP7** หลักฐานจากพืชกลายพันธุ์พบว่าเมื่อ NLP7 ทำงานบกพร่อง การกระตุ้นยีน NIA1, NIA2 รวมทั้งยีนลำเลียงไนเตรต NRT2.1 และ NRT2.2 จะลดลงอย่างชัดเจน

3.1 การกระตุ้น NLP โดยไนเตรต

คุณสมบัติสำคัญของ NLP คือ ไนเตรตไม่ได้กระตุ้นการสร้างโปรตีน NLP เพียงอย่างเดียว แต่กระตุ้นการทำงานของโปรตีนที่มีอยู่แล้วผ่านกลไกหลังการแปลโปรตีน ตัวอย่างเช่น ไนเตรตทำให้ NLP7 คงอยู่และสะสมในนิวเคลียสมากขึ้น เมื่อ NLP อยู่ในนิวเคลียส จึงสามารถจับกับลำดับดีเอ็นเอเฉพาะและกระตุ้นการถอดรหัสยีนเป้าหมายได้อย่างรวดเร็ว

การตอบสนองแบบนี้เหมาะกับบทบาทของ NLP ในฐานะตัวรับช่วงสัญญาณระยะแรก เพราะพืชไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์โปรตีนควบคุมขึ้นใหม่ทั้งหมด แต่สามารถเปลี่ยนตำแหน่งหรือกิจกรรมของโปรตีนเดิมทันทีหลังได้รับไนเตรต

3.2 การจับกับ nitrate-responsive element

NLP6 และ NLP7 จับกับลำดับควบคุมที่เรียกว่า **nitrate-responsive element หรือ NRE** ซึ่งอยู่บริเวณควบคุมของยีนที่ตอบสนองต่อไนเตรต การจับดังกล่าวกระตุ้นการถอดรหัสยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดกลืนและการเปลี่ยนแปลงไนเตรต

สำหรับยีน NIA1 พบตำแหน่งจับของ NLP อยู่ในบริเวณด้านท้ายนอกเหนือจากส่วนที่กำหนดรหัสโปรตีน หรือบริเวณ 3′ flanking region การเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้ทำให้การกระตุ้น NIA1 โดยไนเตรตลดลง แสดงว่าบริเวณดังกล่าวมีความสำคัญต่อการควบคุมยีน

แม้ NIA2 จะมีแนวโน้มเป็นยีนเป้าหมายของ NLP เช่นกัน แต่ในช่วงเวลาที่บทความต้นฉบับตีพิมพ์ ยังไม่สามารถระบุตำแหน่งจับของ NLP บริเวณยีน NIA2 ได้อย่างชัดเจน

---

4. NLPs ประสานยีนทั้งเส้นทางการดูดกลืนไนเตรต

บทบาทของ NLP ไม่ได้จำกัดอยู่ที่ยีนไนเตรตรีดักเตส แต่ครอบคลุมยีนหลายขั้นตอนในเส้นทางการใช้ไนเตรต ได้แก่

- **NRT2.1** ซึ่งสร้างโปรตีนลำเลียงไนเตรตแบบความสัมพันธ์สูง
- **NIA1 และ NIA2** ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์
- **NITR2;1 และ NITR2;2** ซึ่งเกี่ยวข้องกับการลำเลียงไนไตรต์เข้าสู่พลาสติด
- **NIR1** ซึ่งสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเตสสำหรับเปลี่ยนไนไตรต์เป็นแอมโมเนียม

แผนภาพในหน้า 3 ของบทความต้นฉบับแสดงแบบจำลองที่ไนเตรตกระตุ้น NLP6 และ NLP7 จากนั้น NLPs จับกับ NRE ของยีนหลายยีน ทำให้การนำไนเตรตเข้าสู่เซลล์ การรีดิวซ์ไนเตรต การลำเลียงไนไตรต์ และการสร้างแอมโมเนียมเพิ่มขึ้นอย่างประสานกัน

การควบคุมแบบประสานนี้มีความสำคัญมาก หากพืชกระตุ้นเฉพาะยีนไนเตรตรีดักเตส แต่ไม่กระตุ้นการลำเลียงไนไตรต์หรือไนไตรต์รีดักเตส อาจทำให้ไนไตรต์ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษสะสมในเซลล์ได้ NLPs จึงช่วยให้แต่ละขั้นตอนของเส้นทางทำงานสัมพันธ์กัน

นอกจากนี้ NLPs ยังควบคุมยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับไซโทไคนิน โปรตีนไคเนส และปัจจัยควบคุมการถอดรหัสชนิดอื่น จึงอาจทำหน้าที่เชื่อมสถานะไนโตรเจนเข้ากับการแบ่งเซลล์ การพัฒนาอวัยวะ และการเจริญเติบโตโดยรวมของพืช

---

5. ความสัมพันธ์ระหว่าง NLP กับตัวรับรู้ไนเตรต NRT1.1

โปรตีน **CHL1/NRT1.1** ทำหน้าที่ทั้งเป็นตัวลำเลียงไนเตรตและตัวตรวจจับไนเตรต หรือ nitrate transceptor สามารถทำงานได้ทั้งในช่วงความเข้มข้นไนเตรตต่ำและสูง การตรวจจับไนเตรตโดย NRT1.1 เชื่อมโยงกับโปรตีนไคเนสหลายชนิด เช่น CIPK8 และ CIPK23

อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างเส้นทาง NRT1.1 กับเส้นทาง NLP ยังไม่ชัดเจน ผลการทดลองบางส่วนชี้ว่า NLP6 ยังสามารถถูกกระตุ้นด้วยไนเตรตในพืชกลายพันธุ์ที่ NRT1.1 บกพร่อง และการกลายพันธุ์ของ NLP7 กับ NRT1.1 ส่งผลต่อยีนคนละกลุ่มกัน จึงเป็นไปได้ว่าเส้นทางทั้งสองสามารถทำงานแยกจากกันบางส่วน แต่ยังอาจมีการเชื่อมโยงหรือปรับการทำงานซึ่งกันและกันในบางสภาวะ

---

6. LBD37–LBD39 กับการควบคุมย้อนกลับเชิงลบ

แม้ NLPs จะกระตุ้นการตอบสนองต่อไนเตรต แต่พืชยังต้องมีกลไกลดการทำงานของระบบเมื่อมีไนโตรเจนเพียงพอ ปัจจัยควบคุมการถอดรหัสกลุ่ม **LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN** ได้แก่ LBD37, LBD38 และ LBD39 เป็นตัวเลือกสำคัญสำหรับกลไกนี้

ยีน LBD37–LBD39 ถูกกระตุ้นได้โดยไนเตรต แอมโมเนียม และกลูตามีน เมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนเหล่านี้ใน *Arabidopsis* พบว่าการแสดงออกของ NIA1, NIA2 และยีนอื่นในเส้นทางการใช้ไนโตรเจนลดลง ลักษณะดังกล่าวคล้ายกับการยับยั้งย้อนกลับจากสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์

กลไกที่เป็นไปได้คือ เมื่อพืชได้รับไนเตรต NLPs จะกระตุ้นยีนสำหรับการดูดกลืนไนเตรตอย่างรวดเร็ว พร้อมทั้งกระตุ้นยีน LBD บางส่วน เมื่อกรดอะมิโนและสารประกอบไนโตรเจนสะสมมากขึ้น LBDs จะช่วยลดการแสดงออกของระบบ เพื่อป้องกันการใช้พลังงานและการสะสมไนโตรเจนที่มากเกินไป อย่างไรก็ตาม ยังไม่ชัดเจนว่า LBD37–LBD39 จับกับยีน NIA1 และ NIA2 โดยตรงหรือควบคุมผ่านตัวกลางชนิดอื่น

---

7. HY5 และ HYH เชื่อมสัญญาณแสงกับไนเตรต

ปัจจัยควบคุมการถอดรหัส **LONG HYPOCOTYL 5 หรือ HY5** และโปรตีนที่คล้ายกันคือ **HYH** เป็นสมาชิกของกลุ่ม bZIP ซึ่งทำหน้าที่ถ่ายทอดสัญญาณจากตัวรับแสง เช่น ไฟโตโครมและคริปโตโครม ไปสู่การควบคุมยีนในนิวเคลียส

ในพืชกลายพันธุ์ที่ขาดทั้ง HY5 และ HYH การกระตุ้นยีน NIA2 ด้วยแสงลดลงอย่างเด่นชัด ขณะที่การตอบสนองของ NIA1 และยีนบางชนิดยังเกิดขึ้นได้ แสดงว่า HY5/HYH มีบทบาทเฉพาะต่อการควบคุม NIA2 มากกว่ายีนอื่น

ในทางตรงกันข้าม ปัจจัยควบคุมการถอดรหัส PIF4 ซึ่งมักทำงานตรงข้ามกับ HY5 มีผลยับยั้งการแสดงออกของ NIA2 ความสัมพันธ์ระหว่าง HY5 กับ PIF4 จึงช่วยให้พืชปรับการใช้ไนโตรเจนตามสภาพแสง

เมื่อมีแสงเพียงพอ HY5 อาจช่วยกระตุ้นทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงและยีน NIA2 ทำให้การสร้างพลังงาน การสร้างโครงคาร์บอน และการดูดกลืนไนโตรเจนเกิดขึ้นพร้อมกัน แต่เนื่องจากยีน NIA1 ยังคงตอบสนองต่อแสงได้ในพืชที่ขาด HY5/HYH จึงน่าจะมีเส้นทางควบคุมด้วยแสงชนิดอื่นร่วมด้วย

8. ปัจจัยควบคุมอื่นและคำถามที่ยังต้องศึกษา

นอกจาก NLP, LBD และ HY5/HYH แล้ว ยังมีปัจจัยควบคุมการถอดรหัสชนิดอื่นที่อาจเกี่ยวข้อง ตัวอย่างเช่น **SPL9** ซึ่งเมื่อสร้างมากเกินไปจะลดการกระตุ้น NIA2 โดยไนเตรต แต่ไม่ส่งผลเด่นชัดต่อ NIA1 อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบว่า SPL9 ควบคุม NIA2 โดยตรงหรือผ่านเครือข่ายยีนอื่น

การแสดงออกของยีนไนเตรตรีดักเตสยังเปลี่ยนแปลงตามรอบกลางวัน–กลางคืน โดยในใบ ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเออาจเพิ่มขึ้นในช่วงกลางคืน สูงสุดใกล้รุ่งเช้าหรือหลังรุ่งเช้า แล้วค่อย ๆ ลดลงในเวลากลางวัน รูปแบบนี้อาจเกิดจากทั้งนาฬิกาชีวภาพและการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรตกับกลูตามีน

NLP มีส่วนเกี่ยวข้องกับรูปแบบรายวัน เนื่องจากกิจกรรมของ NLP ขึ้นอยู่กับไนเตรต แต่หลักฐานจากพืชบางชนิดแสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงตามรอบวันยังสามารถเกิดขึ้นได้แม้ไม่มีการตอบสนองต่อไนเตรตโดยตรง จึงน่าจะมีปัจจัยควบคุมอื่นร่วมอยู่ด้วย

ประเด็นที่ยังต้องศึกษา ได้แก่

1. ปัจจัยใดควบคุม NIA1 และ NIA2 ภายใต้ภาวะแล้ง อุณหภูมิต่ำ หรือการสะสม ABA
2. เส้นทาง NLP เชื่อมโยงกับ NRT1.1 และโปรตีนไคเนสอย่างไร
3. การควบคุม NIA2 เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครมาติน การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ หรือการดัดแปลงฮิสโตนหรือไม่
4. กลไกที่พบใน *Arabidopsis* สามารถประยุกต์อธิบายพืชเศรษฐกิจ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี และพืชผักได้มากน้อยเพียงใด

---

9. ความสำคัญต่อการเกษตร

ปุ๋ยไนโตรเจนช่วยเพิ่มผลผลิตพืช แต่ไนโตรเจนที่ใส่ลงในแปลงไม่ได้ถูกพืชนำไปใช้ทั้งหมด ไนเตรตบางส่วนอาจถูกชะล้างลงสู่แหล่งน้ำหรือสูญเสียผ่านกระบวนการของจุลินทรีย์ การทำความเข้าใจเครือข่าย NLP–LBD–HY5 จึงอาจนำไปสู่การพัฒนาพืชที่มีประสิทธิภาพการใช้ไนโตรเจนสูงขึ้น

แนวทางประยุกต์ที่เป็นไปได้ ได้แก่ การคัดเลือกพันธุ์ที่ตอบสนองต่อไนเตรตได้ดี การปรับระดับการแสดงออกของ NLP ให้เหมาะสม การลดการยับยั้งที่มากเกินไปจาก LBD หรือการประสานการใช้ไนโตรเจนกับการสังเคราะห์ด้วยแสงผ่าน HY5 อย่างไรก็ตาม การเพิ่มการดูดหรือการรีดิวซ์ไนเตรตเพียงขั้นตอนเดียวอาจไม่เพียงพอ เพราะกระบวนการทั้งหมดต้องสมดุลกับพลังงาน โครงคาร์บอน การสร้างกรดอะมิโน และอัตราการเจริญเติบโต

ดังนั้น เป้าหมายของการปรับปรุงพืชไม่ควรเป็นเพียงการเพิ่มกิจกรรมไนเตรตรีดักเตส แต่ควรปรับเครือข่ายการดูด การลำเลียง การรีดิวซ์ และการนำไนโตรเจนไปสร้างชีวมวลให้ทำงานสอดคล้องกัน

บทสรุป

การแสดงออกของยีนไนเตรตรีดักเตสเป็นจุดสำคัญในการควบคุมการใช้ไนโตรเจนของพืช กระบวนการนี้ตอบสนองต่อไนเตรต แสง สถานะคาร์บอน สารประกอบไนโตรเจน ฮอร์โมน ความเครียดจากสิ่งแวดล้อม และรอบกลางวัน–กลางคืน

NLP6 และ NLP7 ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมหลักของการตอบสนองต่อไนเตรต โดยกระตุ้นยีนหลายยีนตลอดเส้นทางตั้งแต่การลำเลียงไนเตรตจนถึงการสร้างแอมโมเนียม LBD37–LBD39 อาจช่วยควบคุมย้อนกลับเมื่อมีไนโตรเจนสะสม ขณะที่ HY5 และ HYH เชื่อมการใช้ไนเตรตเข้ากับแสงและการสังเคราะห์ด้วยแสง เครือข่ายดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าพืชไม่ได้ควบคุมยีนไนเตรตรีดักเตสอย่างโดดเดี่ยว แต่ประสานการใช้ไนโตรเจนเข้ากับเมแทบอลิซึมและการเจริญเติบโตทั้งระบบ

การศึกษาปัจจัยควบคุมเหล่านี้ในพืชเศรษฐกิจจะช่วยสนับสนุนการพัฒนาพันธุ์พืชที่ใช้ปุ๋ยไนโตรเจนอย่างมีประสิทธิภาพ ลดต้นทุนการผลิต และลดผลกระทบของไนโตรเจนส่วนเกินต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิงหลัก

Yanagisawa, S. (2014). Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. *Plant Science, 229*, 167–171.

Plant Science 229 (2014) 167–171

Contents lists available at ScienceDirect

Plant Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plantsci

Review

Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants

Shuichi Yanagisawa*

Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 June 2014
Received in revised form 9 September 2014
Accepted 11 September 2014
Available online 22 September 2014

Keywords:
Nitrate reductase
Nitrate response
NLP
Transcription factor
LBD transcription factors
HY5

ABSTRACT

Nitrate reductase is a key enzyme in nitrogen assimilation, and it catalyzes the nitrate-to-nitrite reduction process in plants. A variety of factors, including nitrate, light, metabolites, phytohormones, low temperature, and drought, modulate the expression levels of nitrate reductase genes as well as nitrate reductase activity, which is consistent with its physiological role. Recently, several transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes have been identified in *Arabidopsis*. NODULE-INCEPTION-like proteins (NLPs) are transcription factors responsible for nitrate-inducible expression of nitrate reductase genes. Since NLPs also control nitrate-inducible expression of genes encoding nitrate transporter, nitrite transporter, and nitrite reductase, the expression levels of nitrate reduction pathway-associated genes are coordinately modulated by NLPs in response to nitrate. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) transcription factors (LBD37-LBD39) are strong candidates for transcription factors mediating negative feedback regulation in response to increases in the contents of nitrogen-containing metabolites, whereas LONG HYPOCOTYL 5 (HY5) that promotes photomorphogenesis in light may be a transcription factor involved in light-induced expression of a nitrate reductase gene. Furthermore, unidentified transcription factors likely mediate other signals and regulate the expression of nitrate reductase genes. This review presents a summary of our current knowledge of such transcription factors.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Complex regulation of the expression of nitrate reductase genes 167
2. NODULE INCEPTION-like proteins (NLPs) are key regulators of nitrate-inducible expression of nitrate reductase genes 168
3. NLPs may synchronously activate a series of genes associated with the nitrate assimilation pathway 170
4. Unknown transcription factors also participate in modulating the expression levels of nitrate reductase genes 170
Acknowledgments 171
References 171

1. Complex regulation of the expression of nitrate reductase genes

Nitrate reductase is the first enzyme in the nitrate assimilation pathway (Fig. 1), and it catalyzes the reduction of nitrate-to-nitrite in the cytoplasm of plant cells [1]. A number of studies over the past few decades have focused on intensive characterization of the structure and regulation of nitrate reductase proteins and their genes due to its pivotal role in nitrogen assimilation in plants [1,2]. Such studies have revealed that nitrate reductase activity is post-translationally controlled by a regulatory mechanism that includes protein kinases, protein phosphatases, 14-3-3 proteins and protease [3], and they have also demonstrated that the levels of nitrate reductase mRNAs are carefully controlled in response to various internal and external signals as well (Fig. 1).

A primary factor affecting the expression of nitrate reductase genes is nitrate, which functions as a signaling molecule and promotes the transcription of many nitrate assimilation- and nitrate response-related genes in plants [1,2]. Several studies have established that immediate induction of the expression of nitrate reductase genes in response to nitrate provision to nitrogen-deprived plants occurs in a variety of plant species, including

* Tel.: +81 3 5841 3066.
E-mail address: asyanagi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.006
0168-9452/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

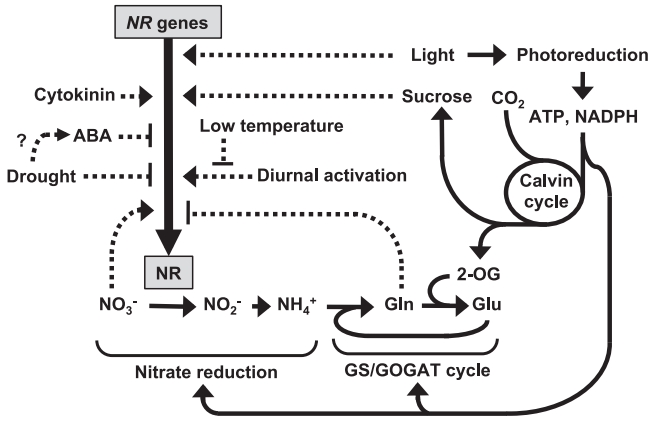

Fig. 1. A variety of environmental factors influence nitrate reductase gene expression. Positive regulation of nitrate reductase (NR) gene expression by nitrate, light and cytokinin and negative regulation by glutamine (Gln), drought, low temperature, and abscisic acid (ABA) are indicated by dotted arrows and bars, respectively. Metabolic pathways for nitrogen assimilation and photosynthesis are also shown. Since drought promotes abscisic acid biosynthesis, the possible route *via* accumulation of abscisic acid (for drought repression) is also indicated. GS, glutamine synthetase; GOGAT, glutamine oxoglutarate aminotransferase; Gln, glutamine; Glu, glutamate, 2-OG; 2-oxoglutarate.

both monocots and dicots [1,2]. Another major factor enhancing nitrate reductase gene expression is light, which also induces nitrate reductase activity at the protein level [1–3]. Like photosynthesis, nitrate assimilation is an energy-consuming pathway that fundamentally depends on light energy (Fig. 1). Reductions of nitrate-to-nitrite by nitrate reductase and nitrite-to-ammonium by nitrite reductase require NAD(P)H and reduced ferredoxin as reducing energy, respectively [1]. Furthermore, assimilation of ammonium into amino acids by the GS (glutamine synthetase)/GOGAT (glutamine oxoglutarate aminotransferase) cycle also requires ATP and NADH or reduced ferredoxin. Light-inducible expression of nitrate reductase genes is therefore consistent with the requirement of light energy in nitrogen assimilation. The light induction of gene expression may, in part, be mediated by the activation of sucrose synthesis [1], although the light-signaling pathway is also directly involved in nitrate reductase gene expression [4]. Sucrose promotes the transcription of nitrate reductase genes in carbohydrate-depleted *Arabidopsis* and mimics light induction of nitrate reductase genes [2]. Similarly, sucrose, glucose, and fructose induce the expression of nitrate reductase genes in dark-adapted *Nicotiana plumbaginifolia* plants. Since nitrogen assimilation requires carbon skeletons (2-oxoglutarate), products of photosynthesis are utilized for sucrose and starch synthesis as well as nitrogen assimilation (Fig. 1). Sugar-induced expression of nitrate reductase genes may comprise part of a system that is responsible for the activation of nitrate assimilation coupled with the activation of photosynthesis and the maintenance of balanced levels of carbohydrate and amino acids. Conversely, nitrogen-containing metabolites (probably mainly glutamine) function as negative regulators of nitrate reductase genes *via* feedback regulation [1,2]. Moreover, the expression of nitrate reductase genes fluctuates during a day/night cycle by transcriptional or post-transcriptional regulation [1]. In leaves but not roots, the levels of nitrate reductase mRNA increase during the night, peak at dawn or a few hours after dawn and gradually decrease during the day [1,2]. Other environmental factors, such as low temperature and drought, also influence the expression of nitrate reductase genes. Chilling delays the diurnal pattern of nitrate reductase gene expression and reduces diurnal activation of these genes in tomato [5], whereas drought decreases the levels of nitrate reductase mRNA in maize leaves [6]. In addition to these environmental factors, phytohormones also affect the expression of nitrate reductase genes [1]. Cytokinin and abscisic acid antagonistically modulate the levels of nitrate reductase mRNA in barley leaves [1]. Although nitrate promotes both the expression of cytokinin biosynthesis-associated genes and the accumulation of cytokinin, nitrate-inducible expression of nitrate reductase genes is basically independent of the accumulation of cytokinin but is directly controlled by nitrate [7]. It is unknown whether drought decreases nitrate reductase gene expression through the accumulation of abscisic acid, which is promoted by drought.

The intricately regulated expression of nitrate reductase genes in plants has been well-documented over the past few decades. Still, the molecular mechanisms underlying such control of nitrate reductase gene expression remain to be elucidated due to the lack of information about related *cis*-elements and *trans*-acting transcription factors. However, several transcription factors involved in the control of nitrate reductase gene expression have been suggested by recent studies of *Arabidopsis*, which contains two nitrate reductase genes, *NIA1* and *NIA2*. Some of these transcription factors directly modulate the expression levels of *NIA1* and *NIA2* or are strong candidates for such transcription factors.

2. NODULE INCEPTION-like proteins (NLPs) are key regulators of nitrate-inducible expression of nitrate reductase genes

Important progress in understanding the mechanisms underlying plant responses to nitrate has been made in the past several years, as summarized in several recent reviews [8–11]. Such progress includes the identification of key components in the nitrate-signaling pathway, including CHL1/NRT1.1, CHIP8 (CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 8), and CIPK23 in *Arabidopsis*. CHL1/NRT1.1 functions as a dual affinity nitrate transporter involved in both high- and low-affinity nitrate uptake as well as a nitrate sensor [12], while CIPK8 and CIPK23 are positive and negative regulators of CHL1/NRT1.1, respectively [8–10,12]. Although nitrate-inducible expression of the high affinity nitrate transporter gene *NRT2.1* is diminished in a *chl1* deletion mutant (*chl1-5*), its expression is not hampered in another *chl1* mutant (*chl1-9*), which carries a point mutation causing an amino acid substitution and a nitrate uptake defect. Thus, nitrate sensing activity of CHL1/NRT1.1 is decoupled with its nitrate uptake activity [12]. Recent progress also includes the identification of NODULE INCEPTION-like proteins (NLPs) as key transcription factors responsible for nitrate-inducible expression of a number of genes, including nitrate reductase genes.

NLPs are a subfamily of the group of proteins containing the RWP-RK DNA-binding domain, which is unique to plants. The RWP-RK domain-containing proteins in higher plants are classified into two subgroups, the NLP family and the RKD (RWP-RK domain-containing) family, based on their similarity in amino acid sequences of RWP-RK domains and their overall protein structures [11]. Although NODULE INCEPTION (NIN) in *Lotus japonicus* was the first member of the NLP family to be described, NIN is a unique member of the NLP family. NIN plays a role in nodulation [13] and is distinguishable from other members of the NLP family by its unique mutations within a conserved region flanking the RWP-RK DNA-binding domain [11]. Higher plants possess multiple copies of NLP genes in their genomes. For instance, nine copies of NLP genes (*NLP1–NLP9*) are present in the *Arabidopsis* genome, while *Lotus japonicus* possesses four copies of NLP genes and a single NIN gene in its genome [14].

The involvement of NLPs in the control of nitrate-inducible gene expression was first implied by the observed reductions in the nitrate-inducible expression levels of major high affinity nitrate

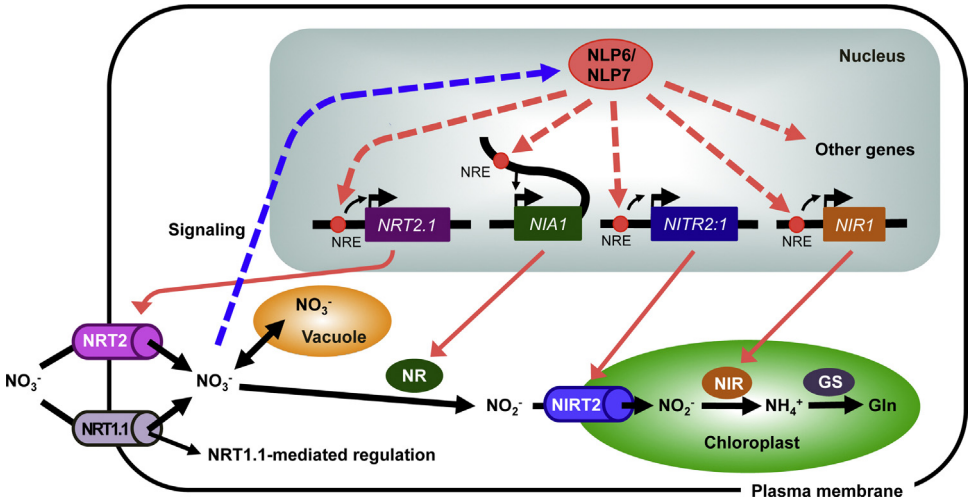

Fig. 2. NLP-mediated synchronized expression of nitrate assimilation-related genes in response to nitrate provision in *Arabidopsis*. Nitrate induces NLP6 and NLP7 activity in a post-translational manner, and NLPs then bind to nitrate-responsive elements (NREs) in the promoters of a high affinity nitrate transporter gene (*NRT2.1*), nitrite transporter genes (*NITR2;1*), and a nitrite reductase gene (*NIR1*), as well as the 3′ flanking region of a nitrate reductase gene (*NIA1*). This model adequately explains how the expression of these genes coordinately increases in response to nitrate provision in nitrogen-deprived plants. The binding sites of NLPs were exactly mapped in the *NITR2;1*, *NIR1* and *NIA1* loci but have not been yet mapped in the *NRT2.1* promoter. Since the figure represents a cell in a shoot, *NITR2;2*, which is expressed in roots but not shoots, is not shown. Although another nitrate reductase gene, *NIA2*, is probably a target of NLPs, *NIA2* is not shown because direct binding of NLPs to the sequence at the *NIA2* locus has not yet been demonstrated. *NRT2.1* is shown in this model because *NRT2.1* is expressed in both shoots and roots, although its expression is stronger in roots than in shoots. A connection between this NLP-mediated pathway and the CHL1/NRT1.1.-mediated regulatory pathway has not yet been found. GS, chloroplast-expressed glutamine synthetase; Gln, glutamine.

transporter genes (*NRT2.1* and *NRT2.2*), as well as *NIA1* and *NIA2*, in the *Arabidopsis nlp7* mutants [15], along with the isolation of another *Arabidopsis nlp7* mutant based on the impaired expression of the yellow fluorescent protein marker gene under the control of a nitrate-inducible promoter (containing DNA sequences from the *NIA1* promoter and the *Arabidopsis* nitrite reductase gene promoter) [16]. Evidence that NLPs are direct regulators of nitrate-inducible gene expression was provided by the isolation of *Arabidopsis* NLP cDNAs by yeast one-hybrid screening based on their binding to the nitrate-responsive *cis*-element (NRE) within the nitrite reductase gene promoter and by subsequent analyses [17]. It is currently unknown whether all NLPs are involved in nitrate-inducible gene expression, because detailed analyses have only been reported for NLP6 and NLP7. However, since all tested NLPs (NLP1, 2, 5, 6, 7, and 9) similarly bind to the NRE and transactivate NRE-dependent transcription, most NLPs may be associated with nitrate-inducible gene expression [17]. Interestingly, nitrate, but not ammonium or glutamine, induces the activity of NLP6 as a transcriptional activator in a post-translational manner (Fig. 2). This nitrate-specific induction of NLP6 activity is mediated by the N-terminal region conserved in NLPs [17], and NIN has mutations within this conserved region and functions as a transcriptional activator independently of nitrate signaling [14]. It has also been shown that nuclear retention of NLP7 is controlled by nitrate [18]. Hence, nitrate might promote nuclear accumulation of NLPs through their conserved N-terminal regions and induce nitrate-inducible gene expression. Post-translational activation is an expected characteristic of transcription factors that primarily respond to signals.

Subsequent to the observed binding of NLP6 to the nitrite reductase gene promoter, direct binding of this protein to the 3′ flanking sequence of *NIA1*, which is necessary for its nitrate-inducible expression, was detected by an *in vitro* binding assay [17]. Since mutations within the NLP-binding site diminish nitrate-inducible *NIA1* expression *in planta* [17], this site is a major regulator of nitrate-inducible expression of *NIA1* (Fig. 2). Unlike the *NIA1* locus, NLP-binding sites have not yet been mapped at the *NIA2* locus. However, nitrate-induced activation of both *NIA1* and *NIA2* was similarly impaired in transgenic *Arabidopsis* lines in which NLP activity was reduced by expression of a chimeric transcriptional repressor (NLP6 fused to a transcriptional repressor domain) [17]. Thus, *NIA2* is a putative target gene of NLPs, although this possibility needs to be further examined through the identification of NLP-binding sites at the *NIA2* locus.

Recent studies have suggested that NLPs are major regulators of nitrate-inducible expression of many genes including *NIA1* and *NIA2* [10,11,15–18]. However, an additional regulator may also be involved in nitrate-inducible expression of *NIA2*, because overexpression of an *Arabidopsis* transcription factor, SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 9 (SPL9), decreased nitrate-induced expression levels of *NIA2* by approximately one-half. Since SPL9 overexpression did not affect *NIA1* expression, the function of SPL9 may be specifically associated with *NIA2* expression [19]. SPL9, which promotes the juvenile-to-adult phase transition and flowering and directly regulates genes involved in trichome formation, was predicted to be a potential hub in the regulatory network in response to nitrate (as determined by modeling using time-series transcriptome data). Thus, SPL9 was overexpressed in *Arabidopsis* and effects of the overexpression were analyzed [19]. However, it is uncertain whether SPL9 is a direct regulator of nitrate-inducible expression of *NIA2*.

Responses to nitrate occur in bacteria and fungi as well as in plants. As NLPs are transcription factors unique to plants, different systems operate nitrate-inducible expression of nitrate reductase genes in bacteria and fungi [11]. In bacteria, a two-component regulatory system consisting of nitrate sensor-histidine kinases and transcription factors operates the nitrate-inducible expression of nitrate reduction-related genes, whereas GAL4-type transcription factors function as transcription factors that mediate nitrate signaling in fungi. On the other hand, in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, a RWP-RK domain-containing protein, NIT2, plays a pivotal role in controlling the expression of nitrate reductase genes [20], suggesting a similarity between mechanisms underlying nitrate-inducible expression of nitrate reductase genes in higher and lower plants.

3. NLPs may synchronously activate a series of genes associated with the nitrate assimilation pathway

NLP7 transactivates the promoter of a major high affinity nitrate transporter gene (the *NRT2.1* promoter) in *Arabidopsis* protoplasts and selectively binds to the promoter region *in vivo*, as detected in a chromatin immunoprecipitation experiment [18]. Thus, *NRT2.1* is probably another target of NLPs, although the NLP-binding sites in the *NRT2.1* promoter has not yet been precisely defined. Furthermore, targets of NLPs were recently found to include genes encoding plastidic nitrite transporters (*NITR2;1* expressed in both shoots and roots, and *NITR2;2* expressed in roots) [21] (Fig. 2). NLP6 binds to a short sequence that is conserved in two nitrite transporter gene promoters and is similar to the NRE in the nitrite reductase gene promoter, and NLP6 transactivates these promoters through its interaction with this short sequence [21]. Hence, potentially, NLPs can coordinately induce the expression of a series of nitrate assimilation-associated genes, including nitrate reductase genes, in response to nitrate provision (Fig. 2). As NLPs are widely conserved in plants, these transcription factors may play a role in synchronizing the expression of nitrate assimilation-associated genes in most plants. However, although NLP activity is probably associated with nitrate responsiveness of almost all nitrate-inducible genes, NLPs are not responsible for regulating the expression of all of these genes [11]. Indeed, nitrate-inducible expression of two nitrate transporter genes (*NRT2.3* and *NRT2.6*) is probably not under the control of NLPs [11].

Not only do decreases in NLP activity reduce the nitrate-induced expression of genes encoding nitrate assimilation-associated transporters and enzymes, but they also reduce that of genes encoding an enzyme involved in cytokinin synthesis (*IPT3*), transcription factors (*LBD37-LBD39*), a protein kinase (*CIPK3*), and other regulatory proteins [11]. Hence, NLPs may also play a role in synchronizing nitrate assimilation with other cellular systems for growth control, including protein phosphorylation, hormonal regulations, and so on. However, the relationship between the NLP-mediated regulatory pathway and another important regulatory pathway for nitrate response, the CHL1/NRT1.1-mediated pathway, is currently obscure. The nitrite reductase gene promoter can direct nitrate-inducible expression in the *chl1/nrt1.1* mutant (*chl1-5*) [22], and NLP6 activity can be induced by nitrate in the mutant (unpublished data). Furthermore, the results of meta-analysis reveal that *nlp7* and *chl1-5* mutations influence the expression of different sets of nitrate-regulated genes [23]. These results suggest that NLP-mediated regulation does not basically require CHL1/NRT1.1, although it is still possible that CHL1/NRT1.1-mediated regulation modulates NLP-mediated nitrate-inducible gene expression. The relationship between NLP-mediated and CHL1/NRT1.1-mediated pathways has emerged as a key question for understanding the mechanisms governing the nitrate response in higher plants.

4. Unknown transcription factors also participate in modulating the expression levels of nitrate reductase genes

The expression levels of nitrate reductase genes are modulated not only by nitrate but also by other environmental factors. Thus, other transcription factors in addition to NLPs are expected to participate in controlling the expression levels of nitrate reductase genes. This hypothesis does not conflict with the results of complementation experiments with *Arabidopsis nia2* mutants (*NIA2* rather than *NIA1* is responsible for major NR activity in *Arabidopsis* [2]). Introduction of a 6.7 kb genomic DNA fragment from the *NIA2* locus (including the 2.5 kb promoter, the coding region, and the 0.7 kb sequence downstream of its coding region) into the *nia2* mutant did not restore full nitrate reductase activity. Since the NLP-binding site for nitrate-inducible expression of *NIA1* was found in its 3′ flanking region (approximately 1.5 kb downstream of the site corresponding to the polyadenylation site) [24], we speculated that the 6.7 kb DNA fragment did not contain the NLP-binding site(s) and therefore directed the expression of nitrate reductase genes only at lower levels. Experiments based on this speculation revealed the following: (1) The 6.7 kb fragment did not confer nitrate-inducible expression. (2) Although the 6.7 kb fragment fused to the DNA fragment containing the NLP-binding site for nitrate-inducible expression of *NIA1* could direct nitrate-inducible expression, even this DNA fragment did not direct full expression of *NIA2* [24]. Hence, full expression of *NIA2* probably requires additional activation by unknown transcription factors and/or gene locus-specific events, such as locus-specific DNA demethylation and histone acetylation.

It is currently unknown which transcription factors regulate the expression of nitrate reductase genes in response to environmental factors such as low temperature and drought, as well as internal hormonal conditions such as ABA and cytokinin levels. However, good candidates for transcription factors that regulate the expression of nitrate reductase genes in response to nitrogen-containing metabolites and light have been identified. LBD37, LBD38, and LBD39 of the LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) family in *Arabidopsis* may be involved in negative feedback regulation by nitrogen-containing metabolites. Overexpression of these genes (which are induced by ammonium and glutamine as well as nitrate) reduced the expression levels of nitrogen assimilation-related genes including *NIA1* and *NIA2*, mimicking the negative effects of organic nitrogen-containing compounds in *Arabidopsis* [25]. Interestingly, the repressive effects of this overexpression on *NIA1* and *NIA2* expression was evident under nitrogen free conditions but not under the nitrogen replete conditions [23,25]. Furthermore, it was suggested that overexpression of *LBD37* and *LBD38* does not occur under nitrogen replete conditions by post-transcriptional regulation [23]. Thus, these LBD transcription factors may be involved in inducing rapid downregulation after the activation of nitrogen assimilation-related genes by nitrogen provision. It is unknown whether LBD37, LBD38, and LBD39 are directly involved in the expression control of *NIA1*, *NIA2*, and other nitrate-inducible genes. Identification of the exact roles of these LBD transcription factors in regulation of nitrogen-assimilated associated gene expression might uncover new nutrient signaling pathways regulating nitrogen assimilation.

Two bZIP transcription factors, LONG HYPOCOTYL 5 (HY5) and HYH (HY5 Homologue), are candidates for direct regulators of light-regulated *NIR2* expression [4]. HY5 and HYH are components downstream of the photoreceptors, phytochromes and cryptochromes, in the light signal transduction pathway and are direct regulators of light-regulated genes, such as the chalcone synthase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit genes. In the Arabidopsis *hy5 hyh* mutant, the light-dependent activation of *NIA2* is inhibited, while the light-dependent activation of other nitrate assimilation-related genes including *NIA1* is not. Conversely, the expression levels of *NIA2* are higher in the *bHLH-phytochrome interacting factor 4* (*pif4*) mutant [4], which is consistent with the fact that PIFs are transcription factors that are antagonistic to HY5 and negatively regulate common gene targets through binding to the same *cis*-element. These observations indicate that HY5- and HYH-mediated light regulation affects *NIA2* expression, although it is unknown whether the effects of HY5 and HYH are direct or indirect. Since NIA2 is responsible for major nitrate reductase activity in *Arabidopsis* [2], HY5 and HYH can potentially induce synchronized activation of nitrate assimilation and photosynthesis in response to light. Nevertheless, light-dependent increases in the transcript levels of *NIA1* and other nitrate assimilation-associated genes in the *hy5 hyh* mutant suggest the involvement of a regulatory pathway different from the

HY5/HYH-mediated pathway in the light-regulated expression of *NIA1* and nitrate assimilation-associated genes.

NLPs are also involved in the diurnal expression patterns of nitrate reductase genes. Although circadian gene expression is generally regulated by the circadian clock, the diurnal oscillation of the levels of mRNAs of nitrate reductase genes may be regulated by changes in nitrate or glutamine contents, because nitrate consumption and glutamine accumulation result from high nitrate reductase activity during the day [1,2]. Indeed, in transgenic *Arabidopsis* plants harboring the GUS reporter gene under the control of four copies of the NRE (the NLP-binding site), GUS exhibited a diurnal expression pattern similar to those of *NIA1* and *NIR1* [26]. Since NLP activity depends on nitrate but not glutamine [11], the diurnal expression of nitrate reductase genes may be modulated by NLPs in response to changes in nitrate content. However, since the tobacco nitrate reductase gene promoter did not direct nitrate-inducible expression of a reporter gene but directed diurnal expression of the reporter gene [2], both NLP-mediated regulation and other types of regulation likely contribute to the diurnal expression of nitrate reductase genes.

In summary, recent studies have suggested that NLP transcription factors are key regulators of nitrate-inducible expression of nitrate reductase genes, and that NLPs potentially coordinate nitrate-inducible expression of nitrate reductase genes with that of other nitrate assimilation-related genes. Since the expression of nitrate reductase genes is also regulated by various environmental factors, several other transcription factors probably regulate these genes as well. Indeed, some good candidates for such factors, such as LBD37–LBD39 and HY5, have been identified to date. Like NLPs, some transcription factors (LBD37–LBD39 are candidates) may play a role in coordinating the expression of nitrate reductase genes and other nitrogen assimilation-related genes in response to the fluctuating metabolic balance. Some transcription factors (HY5 and HYH are candidates) may simultaneously regulate the expression of nitrate reductase genes and genes associated with other metabolic pathways. Hence, identification and characterization of transcription factors might provide clues for fully understanding the mechanisms underlying the complex regulation of nitrate reductase gene expression, as well as revealing systems that coordinate nitrate assimilation and other metabolic or growth regulatory processes to optimize plant growth. As recent advances have been made using *Arabidopsis*, it is important to investigate whether similar mechanisms underlie the regulation of nitrate reductase gene expression in other plant species, particularly crop plants, due to the importance of controlling nitrogen assimilation in agriculture.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Japan Society for the Promotion of Science (Grant no. 25252014 and 26221103). I apologize to the authors of the many publications that I was unable to cite due to space constraints.

References

[1] T. Hoff, H.-N. Truong, M. Caboche, The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation, Plant Cell Environ. 17 (1994) 489–506.
[2] N.M. Crawford, Nitrate nutrient and signal for plant growth, Plant Cell 7 (1995) 859–868.
[3] C. MacKintosh, S.E.M. Meek, Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis, Cell. Mol. Life Sci. 58 (2001) 205–214.
[4] E.M. Jonassen, B.A.A. Sandsmark, C. Lillo, Unique status of *NIA2* in nitrate assimilation: *NIA2* expression is promoted by HY5/HYH and inhibited by PIF4, Plant Signal Behav. 4 (2009) 1084–1086.
[5] T. Jones, D.E. Tucker, D.R. Ort, Chilling delays circadian pattern of sucrose phosphate synthase and nitrate reductase activity in tomato, Plant Physiol. 118 (1998) 149–158.
[6] C.H. Foyer, M.-H. Valadier, A. Migge, T.W. Becker, Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves, Plant Physiol. 117 (1998) 283–292.
[7] H. Sakakibara, Nitrate-specific and cytokinin-mediated nitrogen signaling pathways in plants, J. Plant Res. 116 (2003) 253–257.
[8] G. Krouk, N.M. Crawford, G.M. Coruzzi, Y.-F. Tsay, Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments, Curr. Opin. Plant Biol. 13 (2010) 265–272.
[9] R.A. Gutiérrez, Systems biology for enhanced plant nitrogen nutrition, Science 336 (2012) 1673–1675.
[10] A. Krapp, et al., Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*, J. Exp. Bot. 65 (2014) 789–798.
[11] M. Konishi, S. Yanagisawa, Emergence of a new step towards understanding the molecular mechanisms underlying nitrate-regulated gene expression, J. Exp. Bot. (2014), http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eru267 (in press).
[12] C.-H. Ho, S.-H. Lin, H.-C. Hu, Y.-F. Tsay, CHL1 functions as a nitrate sensor in plants, Cell 138 (2009) 1184–1194.
[13] L. Schauser, A. Roussis, J. Stiller, J. Stougaard, A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules, Nature 402 (1999) 191–195.
[14] W. Suzuki, M. Konishi, S. Yanagisawa, The evolutionary events necessary for the emergence of symbiotic nitrogen fixation in legumes may involve a loss of nitrate responsiveness of the NIN transcription factor, Plant Signal Behav. 8 (2013) e25975.
[15] L. Castaings, et al., The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in Arabidopsis, Plant J. 57 (2009) 426–435.
[16] R. Wang, X. Xing, Y. Wang, A. Tran, N.M. Crawford, A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene *NRT1.1*, Plant Physiol. 151 (2009) 472–478.
[17] M. Konishi, S. Yanagisawa, Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling, Nat. Commun. 4 (2013) 1617.
[18] C. Marchive, et al., Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants, Nat. Commun. 4 (2013) 1713.
[19] G. Krouk, P. Mirowski, Y. LeCun, D.E. Shasha, G.M. Coruzzi, Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate, Genome Biol. 11 (2010) R123.
[20] A. Camargo, et al., Nitrate signaling by the regulatory gene *NIT2* in *Chlamydomonas*, Plant Cell 19 (2007) 3491–3503.
[21] S. Maeda, M. Konishi, S. Yanagisawa, T. Omata, Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts, Plant Cell Physiol. 55 (2014) 1311–1324.
[22] M. Konishi, S. Yanagisawa, Identification of a nitrate-responsive *cis*-element in the Arabidopsis *NIR1* promoter defines the presence of multiple *cis*-regulatory elements for nitrogen response, Plant J. 63 (2010) 269–282.
[23] A. Medici, G. Krouk, The Primary Nitrate Response: a multifaceted signaling pathway, J. Exp. Bot. (2014), http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eru245 (in press).
[24] M. Konishi, S. Yanagisawa, The regulatory region controlling the nitrate-responsive expression of a nitrate reductase gene, *NIA1*, in *Arabidopsis*, Plant Cell Physiol. 52 (2012) 824–836.
[25] G. Rubin, T. Tohge, F. Matsuda, K. Saito, W.-R. Scheible, Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*, Plant Cell 21 (2009) 3567–3584.
[26] M. Konishi, S. Yanagisawa, Roles of the transcriptional regulation mediated by the nitrate-responsive *cis*-element in higher plants, Biochem. Biophys. Res. Commun. 411 (2011) 708–713.