

令和元年6月7日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07955

研究課題名(和文) 根の水分屈性能の改変による節水型植物成長制御法を開発するための基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental studies for improving hydrotropic ability of roots and developing water-saving plant culture system

研究代表者

高橋 秀幸 (Takahashi, Hideyuki)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70179513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、根の水分屈性(水分勾配にตอบสนองして高水分側に屈曲伸長する能力)を制御するMIZ1の機能を解析し、また、水分屈性におけるオーキシンの根冠の関与を植物種間で比較した。その結果、シロイヌナズナでは、MIZ1が伸長領域の皮層で機能すること、その水分屈性がオーキシンおよび根冠に非依存的に発現することがわかった。ミヤコグサの水分屈性もオーキシン非依存的に発現する一方で、イネ、エンドウ、キュウリでは、オーキシンが水分屈性を制御するものの、その水分屈性は根冠非依存的であることがわかった。このように、水分屈性が重力屈性とは異なる新奇メカニズムによって制御されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、新奇の成長制御メカニズムを明らかにし、植物の感覚生物学にブレークスルーをもたらしただけでなく、根の水分屈性制御因子の調節によって、植物の水獲得能・効率的な水利用を大幅に改善できる革新的技術開発への糸口を見出した。すなわち、根の水分屈性を制御するユニークな分子メカニズムとその植物種間差は、地球上の半乾燥地や宇宙空間のような閉鎖生態系における植物工場をも視野に入れた技術開発の基盤となり、砂漠の緑化や耕地拡大と増収、さらには制御環境下における効率的植物生産を確保するための独創的かつ革新的な技術に発展する可能性をもたらした。

研究成果の概要(英文)： In this study, we attempted to reveal the molecular function of MIZ1 essential for root hydrotropism and comparatively analyzed the involvement of auxin and the root tip (the cap and meristem) in hydrotropism of different plant species. It was found that in Arabidopsis roots MIZ1 functions at the cortex of elongation zone and that neither the root tip nor auxin transport/redistribution were required for the induction of hydrotropism. Roots of Lotus japonicus also displayed hydrotropism in an auxin-independent manner. On the other hand, auxin transport and redistribution were required for hydrotropic responses of rice, pea and cucumber roots, although it occurred even in the de-tipped roots of rice and cucumber seedlings. These results implied that mechanistic aspect of hydrotropism differs from that of gravitropism and also differs among plant species. We thereby proposed two types of mechanism unique to hydrotropic response in seedling roots.

研究分野：植物分子・生理学

キーワード：水分屈性 MIZ1 皮層 オーキシン 根冠 シロイヌナズナ イネ キュウリ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、根が水分勾配に応答して高水分側に屈曲成長する水分屈性 (hydrotropism) を発現することを科学的に証明し、水分屈性突然変異体 (*mizu-kussei: miz*) の取得と解析により世界ではじめて水分屈性制御分子 (MIZ1, MIZ2) を見出した (Kobayashi *et al.* 2007, Miyazawa *et al.* 2009)。MIZ1 は陸上植物固有のモチーフ (MIZ ドメイン) を有する機能未知タンパク質を、MIZ2 は小胞輸送に必要な低分子量 G タンパク質の制御分子 GNOM をそれぞれコードしていた。そして、近年の解析から MIZ1 については、そのタンパク質が細胞質および小胞体表面に局在して機能することや、その発現が光やアブシジン酸によって調節されること、MIZ1 が MIZ2 の上流で働くことなども明らかになった (Moriwaki *et al.* 2012, Moriwaki *et al.* 2013, Yamazaki *et al.* 2013)。これらは、水分屈性に特有の分子機構が存在することを意味しているが、MIZ1 タンパク質の分子機能は未知のままである。さらに、これまでに重力屈性や光屈性の主要制御因子と考えられてきた植物ホルモンのオーキシンの水分屈性における役割は、植物種間で異なることも明らかになってきた。とくに、シロイヌナズナでは MIZ1 が内生オーキシシン量を調節する機能を有するが、そのオーキシシン動態と水分屈性の関係は小さく、一方、キュウリ、エンドウではオーキシシンの極性輸送による動態制御が水分屈性の発現に重要であることが見出されている (Takahashi 2009, Moriwaki *et al.* 2012)。

このように水分屈性の発現を制御する分子・要因を同定した研究代表者らの成果は、植物の形態変化を植物細胞において進行する水環境情報の処理システムとして理解し、その分子ネットワークを人為的に制御することによって、限られた資源としての水を効率的に獲得・利用する植物機能を活用し、半乾燥地や植物工場での植物・作物の生産性を向上させる新たな技術基盤を構築できる可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究では、(1)シロイヌナズナで見出された水分屈性制御因子の分子機構を明らかにするとともに、(2)その水分屈性発現機構をイネ科植物やマメ科植物のものと比較解析することによって、水分屈性発現機構の全体像・種間差を明らかにすることを目的にした。それによって、それら水分屈性制御分子を利用して水分屈性能改変植物を作出し、植物・作物が水を効率的に獲得・利用するための全く新しい成長制御技術の基盤を創出する。

3. 研究の方法

これまでに見出した水分屈性制御因子 MIZ1 に着目し、組織特異的プロモーターを用いた局所的 MIZ1 遺伝子発現による MIZ1 機能細胞の特定、MIZ1 相互作用分子の解析、トランスクリプトーム解析等によって、MIZ1 の機能および MIZ1 に支配される分子ネットワークを解明する。また、イネ科植物やマメ科植物の根の水分屈性制御機構、並びに水分屈性制御機構の種間差を明らかにするために、植物ホルモンのオーキシシンの関与について阻害剤等を用いて解析し、重力屈性の発現機構と比較する。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの水分屈性制御分子 MIZ1 の機能解析

これまでに見出したシロイヌナズナの水分屈性制御分子 MIZ1 の機能を明らかにするために、水分屈性を欠損した *miz1* 突然変異体において組織特異的に MIZ1-GFP を発現させた形質転換体の水分屈性能を解析し、MIZ1 を伸長領域の皮層で発現させた場合に水分屈性が回復し、根冠・分裂組織、表皮、内皮に MIZ1 を発現させても水分屈性が回復しないことを見出した (図1, 2

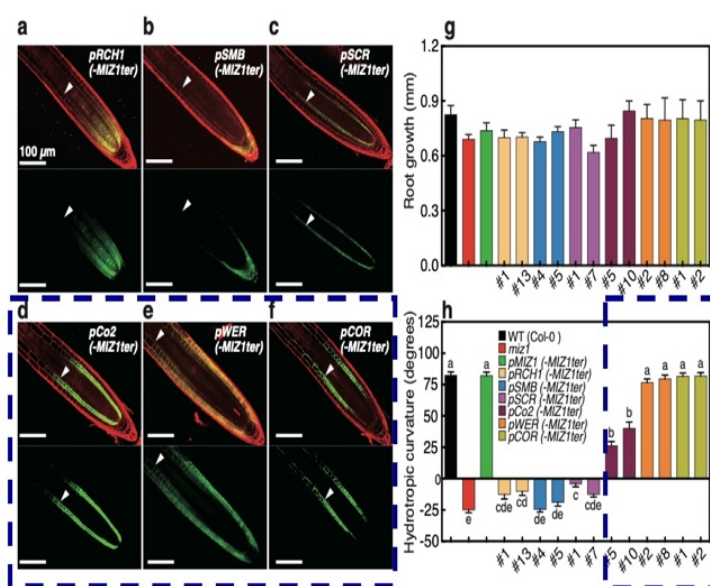


図1 *miz1* 突然変異体の根における組織特異的プロモーターによる MIZ1-GFP の局所的発現と水分屈性回復の関係 (I)。MIZ1-GFP が伸長領域の皮層または表皮+皮層で発現すると水分屈性が回復する。(Dietrich *et al.*, Nature Plants 2017)

Dietrich *et al.*, Nature Plants 2017)。これらの結果は、水分屈性の発現には伸長領域の皮層における MIZ1 機能が重要であること、皮層を介した新奇の根の成長制御機構の存在することを意味した。また、レーザー照射で根冠および分裂組織を破壊した根の水分屈性能を調べた結果、根冠・分裂組織の機能しない根は重力屈性を正常に発現できないが、その水分屈性は正常であることがわかった (図3 Dietrich *et al.*, Nature Plants 2017)。これらの結果から、根の水分屈性では、伸長領域が水分勾配の感受と偏差成長の場であると考えられた。

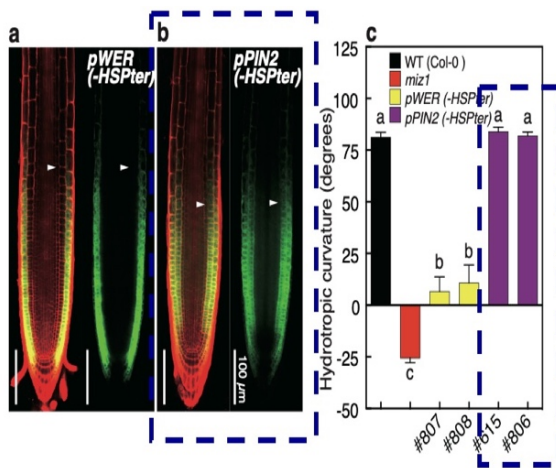
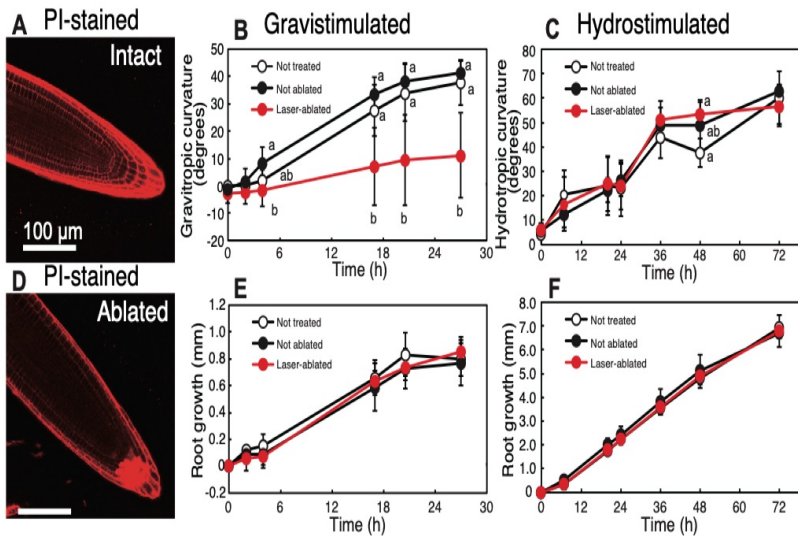


図2 *miz1*突然変異体の根における組織特異的プロモーターによるMIZ1-GFPの局所的発現と水分屈性回復の関係 (II)。MIZ1-GFPを表皮だけで発現させても水分屈性は回復しないが、表皮+皮層で発現させると回復する。(Dietrich *et al.*, Nature Plants 2017)

これまでにMIZ1の機能を解明することを目的に、MIZ1と相互作用する候補タンパク質群を解析した結果、得られた候補にHSP90、NPH3、AHA4が含まれていた。そこでタンパク質間相互作用を酵母2ハイブリッド法およびBiFC法で解析した結果、HSP90とNPH3はいずれもMIZ1とは直接的に相互作用しないことがわかった。しか

し、HSP90の突然変異や阻害剤処理、NPH3の突然変異は水分屈性を有意に低下させた。したがって、これらの分子は、第三者を介した複合体を形成して水分屈性に機能することが考えられた。AHA4はアポプラストのpH制御を介して重力屈性や光屈性に関与することが知られている。そこで、AHA4がシロイヌナズナの根の水分屈性に果たす役割を解析した。まず、 H^+ -ATPaseの阻害剤であるオルトバナジン酸ナトリウムの処理が水分屈性に及ぼす影響、および *aha4* 突然変異体の水分屈性を解析した。その結果、オルトバナジン酸ナトリウムは水分屈性を抑制したが、*aha4* と野生型の水分屈性に有意な差がなかった。これらの結果から、AHA4が他の H^+ -ATPase と冗長的に機能している可能性を否定できない。そこで次に、AHA4をはじめとする H^+ -ATPase の水分屈性への寄与を確認するために、apo-pHusion 系統を用いて根のアポプラストpHと水分屈性の関連を調べた。取得した画像からpHの相対値を定量したところ、水分勾配刺



激下で根の高水分側のpHが低水分側に比べて高くなる傾向が見られた。これによって、水分勾配刺激にตอบสนองした H^+ -ATPase が根のアポプラストpHを偏差的に制御している可能性が示された。

図3 フェムト秒レーザー照射顕微鏡によって根冠機能を破壊すると、根の重力屈性は抑制されるが、水分屈性は正常に発現する。(Dietrich *et al.*, Nature Plants 2017)

また、MIZ1タンパク質にリン酸化部位の存在が推定され、且つ、アブシジン酸 (ABA) が SnRK2キナーゼを介して水分屈性に機能することが見出されたので、Phos-tag アクリルアミドゲルを用いた Western blot 解析およびリン酸化プロテオーム解析を行った。その結果、MIZ1がリン酸化修飾を受けることが明らかになり、それによる水分屈性制御の可能性が示唆されるとともに、水分屈性発現時にSnRK2依存的あるいは非依存的に変動するリン酸化タンパク質が検出された。さらに、細胞内 Ca^{2+} レポーターであるYellow Cameleon 3.6 (YC3.6) を形質転換したシロイヌナズナ系統を用いて、水分屈性の発現にともなう細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動をみることに成功した。これまでに細胞内 Ca^{2+} が水分屈性に関与することが示唆されており、これによって、今後、水分屈性とメカノセンサーや細胞内 Ca^{2+} の関係、並びに細胞内 Ca^{2+} とMIZ1の関係を解析するためのツールが検証された。

(2) オーキシンを介した水分屈性制御機構の植物種間差

重力屈性で重要な役割を果たす植物ホルモンのオーキシンは、シロイヌナズナの根の水分屈性をネガティブに制御し、キュウリとエンドウでは水分屈性をポジティブに制御することが報告されている。そこで、イネ科植物のイネとマメ科植物のミヤコグサの根を用いて水分屈性とオーキシンの関係を薬理的に解析した。その結果、イネの根の水分屈性はオーキシンの輸送と応答を必要とし、ミヤコグサの根の水分屈性は既知のオーキシンの輸送・応答に非依存的なメ

カニズムによって制御される可能性が見出された (図4, 5 Nakajima *et al.*, J. Exp. Bot. 2017)。

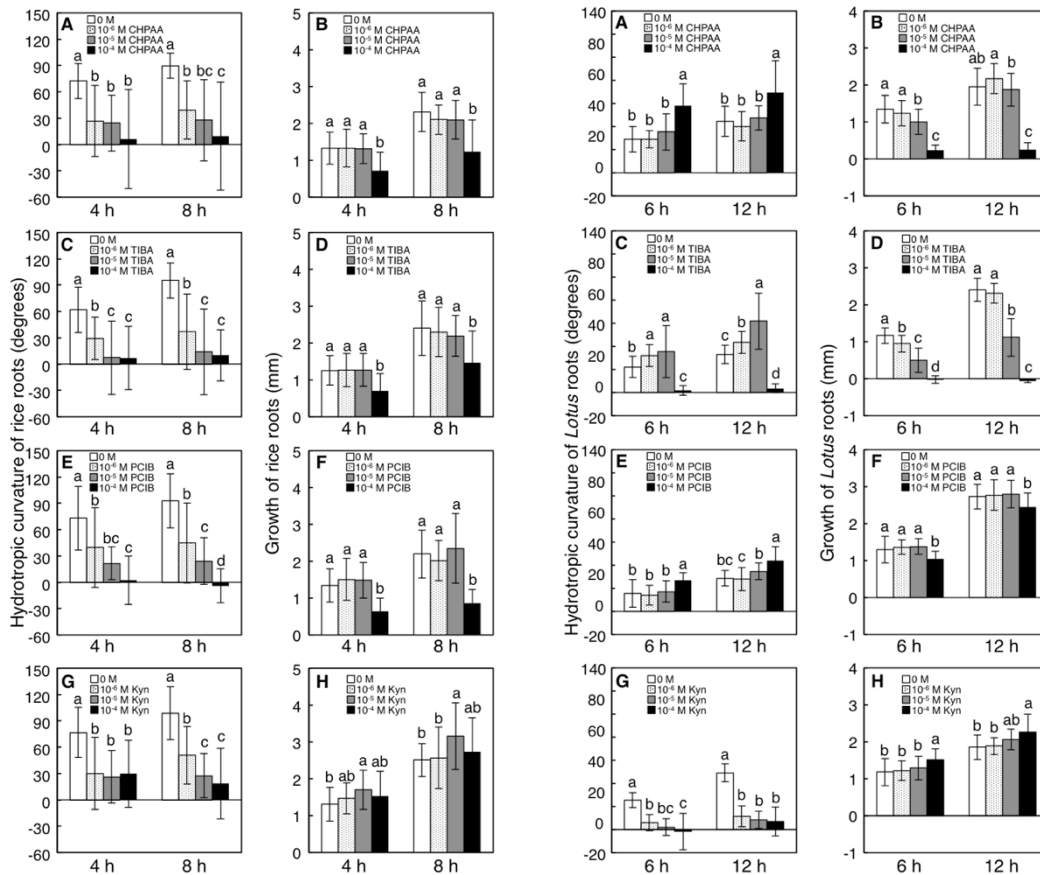
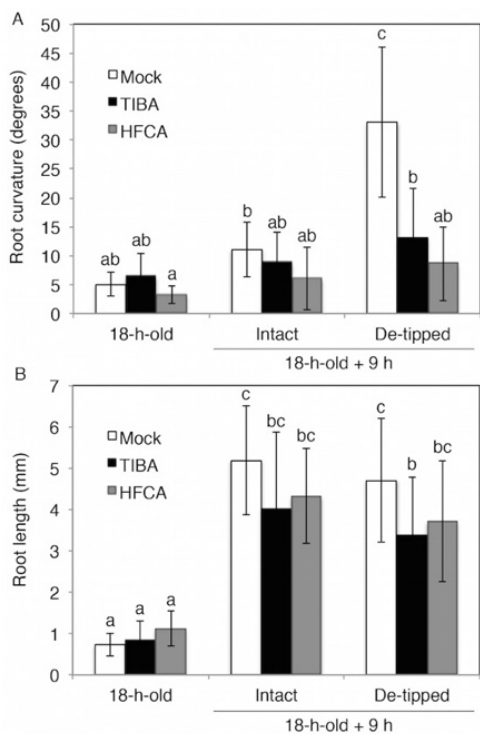


図4 (左) イネ根の水分屈性に及ぼすオーキシン輸送・作用・生合成阻害剤処理の影響
 図5 (右) ミヤコグサ根の水分屈性に及ぼすオーキシン輸送・作用・生合成阻害剤処理の影響
 (Nakajima *et al.*, J. Exp. Bot. 2017)

イネの根においては、シロイヌナズナの根と同様に、根冠の切除によって重力屈性は抑制されるものの、水分屈性は正常に発現した。また、イネとキュウリの根では、根冠を切除すると重力屈性による干渉が排除され、水分屈性を顕著に発現することがわかった (図6 Nakajima *et al.*, J. Exp. Bot. 2017; Fujii *et al.*, PLOS ONE 2018)。このキュウリ根の水分屈性に対する重力屈性の干渉は、宇宙実験によっても検証された (図7 Morohashi *et al.*, New Phytol. 2017)。



これらの結果は、水分屈性の発現機構に植物種間差が存在することを明らかにした。さらに、イネやキュウリの水分屈性の発現にともなうオーキシン動態の変化は、重力屈性の場合とは異なるメカニズムによって制御されることを示した (Morohashi *et al.*, New Phytol. 2017; Nakajima *et al.*, J. Exp. Bot. 2017)。重力屈性および水分屈性を発現しているキュウリの根の遺伝子発現を、RNA-Seqにより網羅的に解析した。その結果、重力屈性時に偏差的に発現する46遺伝子と、水分屈性時に偏差的に発現する23遺伝子を見出した。両屈性で偏差的に発現する6遺伝子のうち、3遺伝子はAux/IAAオーキシン誘導性遺伝子であった (Morohashi *et al.*, New Phytol. 2017; Fujii *et al.*, PLOS ONE 2018)。したがって、重力屈性と水分屈性は、オーキシンを介して相互作用している可能性が示唆された。

図6 キュウリ根の水分屈性は、根冠の切除によって促進され、オーキシン輸送阻害剤によって抑制される。(Fujii *et al.*, PLOS ONE 2018)

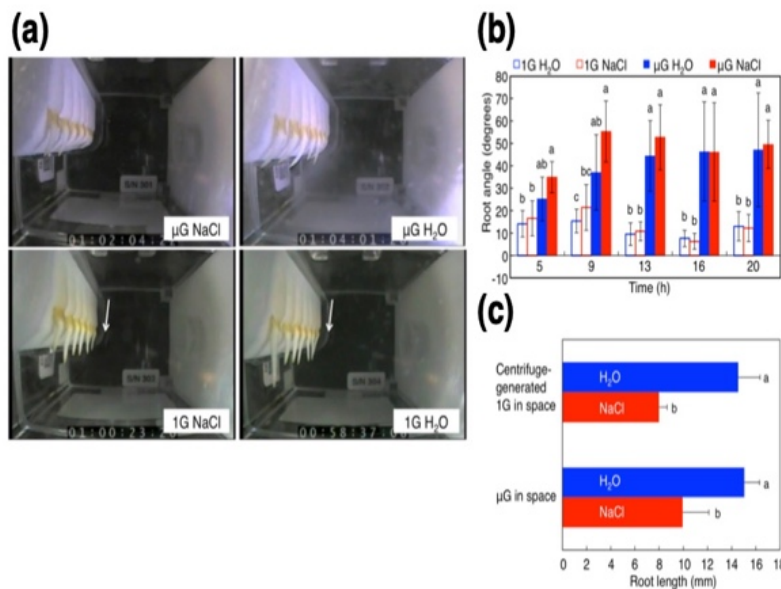


図7 宇宙（国際宇宙ステーション‘きぼう’実験棟）の微小重力下と人工重力下におけるキュウリ根の水分屈性。キュウリ根の水分屈性は重力屈性によってマスクされるが、微小重力下ではわずかな水分勾配にตอบสนองして顕著に発現する。(Morohashi *et al.*, *New Phytol.* 2017)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Fujii N, Miyabayashi S, Sugita T, Kobayashi A, Yamazaki C, Miyazawa Y, Kamada M, Kasahara H, Osada I, Shimazu T, Fusejima Y, Higashibata A, Yamazaki T, Ishioka N, Takahashi H. Root-tip-mediated inhibition of hydrotropism is accompanied with the suppression of asymmetric expression of auxin-inducible genes in response to moisture gradients in cucumber roots. *PLOS ONE* 13: e0189827 (2018). DOI: 10.1371/journal.pone.0189827. 査読あり
- ② Dietrich D[#], Pang L[#], Kobayashi A[#], Fozard JA, Boudolf V, Bhosale R, Antoni R, Nguyen T, Hiratsuka S, Fujii N, Miyazawa Y, --- (省略) ---Takahashi H^{*}, Bennett MJ^{*} (計32名、[#] Authors equally contributed; ^{*} Co-corresponding authors). Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. *Nature Plants* 3: 17057 (2017). DOI: 10.1038/nplants.2017.57. 査読あり
- ③ Nakajima Y, Nara Y, Kobayashi A, Sugita T, Miyazawa Y, Fujii N, Takahashi H. Auxin transport and response requirements for root hydrotropism differ between plant species. *Journal of Experimental Botany* 68: 3441-3456 (2017). DOI: 10.1093/jxb/erx193. 査読あり
- ④ Morohashi K, Okamoto M, Yamazaki C, Fujii N, Miyazawa Y, Kamada M, Kasahara H, Osada I, Shimazu T, Fusejima Y, Higashibata A, Yamazaki T, Ishioka N, Kobayashi A, Takahashi H. Gravitropism interferes with hydrotropism via counteracting auxin dynamics in cucumber roots: clinorotation and spaceflight experiments. *New Phytologist* 215: 1476-1489 (2017). DOI:10.1111/nph.14689. 査読あり

[学会発表] (計 19 件)

- ① 山崎 誠和、小泉 日輪、小林 啓恵、藤井 伸治、宮沢 豊、高橋 大輔、河村 幸男、上村 松生、高橋 秀幸. シロイヌナズナの根の水分屈性に MIZ1 と共に HSP90 と NPH3 が機能する. 日本宇宙生物科学会第 32 回大会、2018 年
- ② 里 和希、小林 啓恵、藤井 伸治、Dietrich Daniela、Bennett Malcolm、高橋 秀幸. SnRK2s によるリン酸化に着目した ABA-MIZ1 シグナリング経路の解明. 日本宇宙生物科学会第 32 回大会、2018 年
- ③ 山崎 誠和、小泉 日輪、小林 啓恵、藤井 伸治、宮沢 豊、高橋 大輔、河村 幸男、上村 松生、高橋 秀幸. HSP90 と NPH3 がシロイヌナズナの根の水分屈性を MIZ1 と協調的に制御する可能性. 日本植物学会第 82 回大会、2018 年
- ④ Hideyuki Takahashi. Regulatory mechanism of root hydrotropism for water acquisition in arid environment. International Symposium on Plant Survival Strategies in Extreme Environment at 32nd Annual Meeting of the Japanese Society for Biological Sciences in Space (招待講演) (国際学会)、2018 年
- ⑤ Hideyuki Takahashi. Comparison of the regulatory mechanisms for gravitropism and hydrotropism in seedling roots. Commission on Space Research (COSPAR) 42nd Assembly (国際学会)、2018 年
- ⑥ 高橋 秀幸. 宇宙惑星居住科学の戦略. 第 31 回宇宙環境利用シンポジウム (招待講演)、2018 年
- ⑦ 小林 啓恵、庄司 千捷、櫛 聖奈、内田 真弓、岩田 悟、宮沢 豊、藤井 伸治、高橋 秀幸. シロイヌナズナ根の水分屈性欠損突然変異体 *mizu-kussei 1* のサプレッサーの探索. 東北植物学会第 7 回大会、2017 年

- ⑧ 藤井 伸治、宮林 彩智子、小林 啓恵、山崎 千秋、宮沢 豊、鎌田 源司、笠原 春夫、長田 郁子、嶋津 徹、伏島 康男、東端 晃、山崎 丘、石岡 憲昭、高橋 秀幸. キュウリの根の重力・水分屈性時の偏差発現遺伝子のオーキシン応答性の解析. 東北植物学会第7回大会、2017年
- ⑨ 杉田 智樹、宮林 彩智子、藤井 伸治、小林 啓恵、高橋 秀幸. キュウリの根の水分屈性は重力を感受する根端に非依存的なオーキシン輸送によって制御される. 東北植物学会第 7 回大会、2017 年
- ⑩ 藤井 伸治、宮林 彩智子、小林 啓恵、山崎 千秋、宮沢 豊、鎌田 源司、笠原 春夫、長田 郁子、嶋津 徹、伏島 康男、東端 晃、山崎 丘、石岡 憲昭、高橋 秀幸. キュウリの根の重力屈性と水分屈性時に偏差的に発現する遺伝子のオーキシン応答性の解析. 日本宇宙生物科学学会第31回大会、2017年
- ⑪ 杉田 智樹、宮林 彩智子、藤井 伸治、小林 啓恵、高橋 秀幸. キュウリの根の水分屈性は重力を感受する根端に非依存的なオーキシン輸送によって制御される. 日本宇宙生物科学学会第 31 回大会、2017 年
- ⑫ 高橋 秀幸. 重力宇宙生物学が解明した植物機能、水分屈性. 日本宇宙生物科学学会第 31 回大会（招待講演）、2017 年
- ⑬ Lei Pang, Akie Kobayashi, Nobuharu Fujii, Hideyuki Takahashi. Auxin and cytokinin negatively regulate hydrotropism in Arabidopsis roots. 第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年
- ⑭ 小林 啓恵, Pang Lei, 平塚 奏太郎, 藤井 伸治, 宮沢 豊, 長谷 あきら, 細川 陽一郎, Dietrich Daniela, Bennett Malcolm, 高橋 秀幸. シロイヌナズナの根の水分屈性と重力屈性は刺激受容・シグナル伝達機構を異にする. 第31回宇宙環境利用シンポジウム、2017年
- ⑮ Lei Pang, Akie Kobayashi, Nobuharu Fujii, Hideyuki Takahashi. Hydrotropism interacts with gravitropism by reducing auxin content in Arabidopsis roots. 東北植物学会第 6 回大会、2016 年
- ⑯ 小菅 慎之助, 岩田 悟, 小林 啓恵, 宮沢 豊, 藤井 伸治, 高橋 秀幸. シロイヌナズナの根の水分屈性欠損突然変異体 *miz1* のサブレッサー *mzp1* 遺伝子の解析. 東北植物学会第 6 回大会、2016 年
- ⑰ Nobuharu Fujii, Chiaki Yamazaki, Yutaka Miyazawa, Motoshi Kamada, Haruo Kasahara, Ikuko Osada, Toru Shimazu, Yasuo Fusejima, Akira Higashibata, Takashi Yamazaki, Noriaki Ishioka, Hideyuki Takahashi. A pathway that laterally transports auxin from the upper side to the lower side of the transition zone of cucumber seedlings via endodermal layers is formed due to gravitstimulation. 11th Asian Microgravity Symposium (国際学会)、2016年
- ⑱ Hideyuki Takahashi. Gravity-regulated/influenced growth responses in plants: gravitropism vs. Hydrotropism. Luncheon seminar at the 11th Asian Microgravity Symposium (招待講演) (国際学会)、2016 年
- ⑲ 藤井 伸治, 宮林 彩智子, 小林 啓恵, 高橋 秀幸. キュウリの根の重力屈性による水分屈性の抑制機構. 日本宇宙生物科学学会第 30 回大会、2016 年

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ : <http://www.ige.tohoku.ac.jp/tekio/>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 小林 啓恵

ローマ字氏名 : Kobayashi Akie

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。