

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870057

研究課題名(和文) 乾燥環境で植物生産の向上に寄与する水分屈性制御因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of molecules that function in root hydrotropism for innovation of plant production under drought condition

研究代表者

小林 啓恵 (Kobayashi, Akie)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：60463783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの根の水分屈性制御因子MIZ1は、根の伸長領域の皮層細胞で働くこと、水分屈性が根冠・分裂組織非依存的に発現することを明らかにした。マイクロアレイを用いたMIZ1依存的に発現変動する遺伝子群の網羅的解析では、直接水分屈性に影響する因子は見出されなかったが、MIZ1と相互作用する因子について、Yeast two-hybrid法を確立し、相互作用の確認を継続して行っている。

研究成果の概要(英文)：By targeted expression studies, I revealed that MIZ1 indispensable for hydrotropism in Arabidopsis roots functions in cortical cells of the elongation zone. Also, laser-ablation experiments showed that hydrotropic response occurs independently of the root cap and meristem. Novel genes directly involved in hydrotropism were not found by microarray analysis, but I established the yeast two-hybrid system for verifying the MIZ1-interactive proteins.

研究分野：植物生理学

キーワード：環境応答 水分屈性

1. 研究開始当初の背景

温暖化による耕作地の減少による食料生産の限界や、人口の爆発的な増加による食料不足は、昨今深刻な問題である。これらの食料問題解決のための一手段として、植物の効率的な成長制御法の確立がある。その成長制御法を開発するために、植物が進化の過程で獲得した成長制御機構の解明が必要である。成長制御機構の中でも、根が水分勾配を感受して水分の多い方へ屈曲伸長する『水分屈性』は、乾燥環境下で植物が生存に必須である水を効率的に獲得するために機能すると考えられ、水分屈性の発現機構を理解することから、新たな植物成長制御法を創造できると期待される。

水分屈性は、植物にとって重要な成長制御機構であるにもかかわらず、それを重力屈性から分離して研究することが困難であったために、近年まで注目されてこなかった。このような中、Jaffe ら (1985) や Mizuno ら (2002) は、エンドウやキュウリの植物の水分屈性を検出し、解析することに成功した。また、Kobayashi ら (2007) と Miyazawa ら (2009) は、モデル植物として実験手法も確立され、ゲノム解読も完了していたシロイヌナズナに注目し、突然変異体を単離するための水分屈性実験系を構築し、水分屈性の欠損した突然変異体 *mizu-kussei1* (*miz1*) と *miz2* を単離し、それらの変異原因遺伝子の同定に成功した。この *MIZ1* は、機能未知ドメインをコードしており、*MIZ1* 転写産物は根冠にあるものの、*MIZ1* タンパク質は根の側部根冠組織と皮層に蓄積し、細胞内では小胞体膜 (ER) に局在することが明らかになった (Moriwaki et al. 2013, Yamazaki et al. 2012)。*MIZ1* の発現量は、bZIP 型転写因子である HY5 依存的で、植物ホルモンであるアブシシン酸によっても変動することも明らかになった (Moriwaki et al. 2012)。また、*MIZ1* 過剰発現体で水分屈性が亢進される (Miyazawa et al. 2012)。もう一つの水分屈性制御遺伝子 *MIZ2* は、既知の遺伝子 (GN) であり、細胞内小胞輸送に関わる ADP リボシル化因子 (ARF) のグアニンヌクレオシド交換因子 (ARF-GFP) をコードしていた。この遺伝子の突然変異体は、胚発生のパターン形成が異常になり、胚発生致死となることが報告されているが、*miz2* 突然変異体は正常な植物体を形成し、稔性を持つ (Miyazawa et al. 2009)。遺伝学的解析によって、水分屈性では *MIZ1* が *MIZ2* の上流で働くことが推定された (Moriwaki et al. 2011, Miyazawa et al. 2012)。しかし、それらの機能や作用機序は未解明である。そこで、まず *MIZ1* に注目し、その機能解明を試みた。

2. 研究の目的

これまでいくつかの植物種で水分屈性の実験方法が確立され、生理学的解析や遺伝学的解析が行われてきたが、まだ全容の解明に

は至っていない。そこで、まず水分屈性に必須の *MIZ1* に注目し、その転写産物とタンパク質の発現領域が異なる事実に基づいて *MIZ1* が機能する領域 (細胞群) の同定を進めるとともに、免疫沈降法および LC-MS/MS 解析を用いて *MIZ1* と相互作用する分子を見出し、*MIZ1* による水分屈性の制御機構を解明する研究を行っている。*MIZ1* が機能する細胞群を同定するために、*GAL4* アクティベーションタグラインおよび組織特異的プロモーターを用いた解析の準備を行った。また、*MIZ1* 過剰発現体で水分屈性が亢進されることを見出し (Miyazawa et al. 2012)、その際に転写レベルで発現変動する遺伝子を網羅的に解析することによって、*MIZ1* の機能を理解することを試みている。本研究では、これらの解析を発展させ、主に下記の 3 つの研究から水分屈性発現の分子機構を明らかにし、植物の新たな成長制御法、分子育種法を開発するための足がかりを見出す。

- (1) *MIZ1* の機能する細胞群の同定
- (2) *MIZ1* と相互作用する因子の同定
- (3) *MIZ1* 依存的に発現変動する遺伝子群の網羅的解析

3. 研究の方法

(1) 供試材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) の野生型 Columbia (Col) と Col バックグラウンドの水分屈性欠損突然変異体 *mizu-kussei1* (*miz1*)、*MIZ1* 過剰発現体 (*MIZ10Es*) を用いた。水分屈性実験には、種子滅菌後、1/2MS 寒天培地に播種し、4 日 2 日間吸水させ、23 連続白色光で培地を垂直置きにして、4 日間生育した芽生えを用いた。

(2) 水分屈性実験系

Takahashi ら (2003) および Kaneyasu ら (2007) が確立した 2 つの水分屈性実験系を用いた。実験は、密閉アクリルチャンパー内に、 K_2CO_3 飽和塩溶液をいれた容器と、根端 0.3 mm を気中に出すように芽生えを乗せた寒天片を置くことで、水分勾配を形成した。対照区には、 K_2CO_3 飽和塩溶液の代わりに H_2O を入れた容器を用いた。水分勾配刺激処理後、実体顕微鏡下で根端を撮影し、その画像を用いて ImageJ で角度と根長を計測した。実験は、1%寒天と 14.8%ソルビトール入り 1%寒天をはり合わせて水分勾配を形成した。芽生えは、寒天をはり合わせた境界から 1%寒天側に 1 cm 離れた場所に根端がくるように並べた。対照区には、1%寒天を 2 つはり合わせた培地を用いた。水分勾配刺激処理後、スキャナーで芽生えを撮影し、その画像を用いて ImageJ で角度と根長を計測した。

(2) 組織特異的プロモーターを利用した *MIZ1* の局所的発現誘導

MIZ1 の機能領域を明らかにするために、組

織特異的発現プロモーター (Tissue specific promoter; TSP) *RCH* (Casamitjana-Martinez et al. 2003)、*SOMBRERO* (*SMB*, Willemssen et al. 2008)、*WEREWOLF WER*, Lee et al. 2008)、*SCARECROW* (*SCR*, Wysocka-Diller et al. 2000)、*Co2* (Heidstra et al. 2004)、*COR* (Lee et al. 2006) に *MIZ1-GFP* を融合したコンストラクトを作成し、水分屈性欠損突然変異体 *miz1* に形質転換した。コンストラクトは、既に相補することが確認されている *MIZ1pro:MIZ1-GFP* を用いて、プロモーター領域を置換し作出した。形質転換後、独立した2つの T₃ ホモ系統を用いて、水分屈性能および光屈性能を確認した。

(3) アクティベーションタグラインである GAL4 による *MIZ1* の局所的発現誘導

UAS-*MIZ1* 形質転換体を作成し、いくつかの GAL4 形質転換体と交配し、根の組織別に *MIZ1* を発現誘導させた系統を作成し、水分屈性能を検証した。

(4) Yeast two-hybrid

MIZ1 および、免疫沈降で *MIZ1* と相互作用する可能性のある候補因子について、その cDNA を元に PCR で CDR を増幅して、転写活性化ドメイン (AD) を含む pGADT7 および DNA 結合ドメイン (DNA-BD) を含む pGBKT7 に導入した。作成したコンストラクトは、CDR の塩基配列をシーケンサーにより確認してから使用した。これらのプラミドを酵母に形質転換を行い、培養し判断した。

(5) マイクロアレイ解析

野生型 Columbia、水分屈性の欠損している *miz1* 突然変異体と *MIZ10Es* の間で、通常の生育状態と根に水分勾配刺激を与えたときの根端約 5 mm を用いて、RNA を抽出し、マイクロアレイにより網羅的な遺伝子発現解析を行った。そこで得られた、*MIZ1* 依存的に発現変動する遺伝子について、T-DNA 系統を取り寄せて、水分屈性能を確認した。

4. 研究成果

(1) *MIZ1* の機能する細胞群の同定

MIZ1 がどの細胞群で機能するかを2つの方法で検証した。*miz1* 突然変異体で *MIZ1* の発現を誘導する方法として、組織特異的プロモーターを用いて発現誘導する方法とアクティベーションタグラインである GAL4 を用いて発現誘導する方法をとり、特定の細胞群で *MIZ1-GFP* を発現させて、水分屈性能を回復させるかを確認した。

水分屈性実験系に供試したときに、水分勾配を感受した野生型 Col は約 80° の水分屈性を示し、水分屈性欠損突然変異体 *miz1* は約 -25° の屈曲を示すが、*MIZ1pro:MIZ1-GFP* を導入した形質転換体では野生型 Col と同様に水分屈性を示す (図 1)。この相補したコンストラクトと同じ *MIZ1-GFP* 配列で、プロモ-

ーター領域を組織特異的プロモーター (TSP) で置き換えたコンストラクトを用いて形質転換体を作成して水分屈性能を観察した。その結果、分裂領域 (*RCH*)、根冠 (*SMB*)、内皮 (*SCR*) で *MIZ1* を発現させても、根は *miz1* 突然変異体と同様に水分屈性を示さず、水分屈性の回復はみられなかった。しかし、分裂および境界領域の皮層 (*Co2*) で発現させると水分屈性がやや回復した。さらに、境界領域と伸長領域の皮層 (*COR*) で *MIZ1* を発現させると水分屈性が回復した。また、推定された表皮だけではなく、皮層にも *MIZ1* の発現がみられた *WERpro:MIZ1-GFP* も水分屈性を完全に回復させた。*HSP* のターミネーターを用いたもう一種類のコンストラクトで作出した形質転換体 *WERpro:MIZ1-GFP-HSPter* と *PIN2pro:MIZ1-GFP-HSPter* の *MIZ1* の発現領域を確認したところ、各々表皮のみ、表皮と皮層のみに *MIZ1* が発現していた。そして、*WERpro:MIZ1-GFP-HSPter* は *miz1* 変異による水分屈性欠損を回復しなかったが、*PIN2pro:MIZ1-GFP-HSPter* では水分屈性を回復した。よって、*MIZ1* が境界領域および伸長領域の皮層で機能することで、根は正常な水分屈性を発現することが明らかになった。この成果は、レーザーアブレーションを用いた特異的細胞群の破壊により、水分屈性には根冠および分裂領域は必須ではないことを明らかにした成果、そして、アブシシン酸シグナル伝達系の因子 SnRK2 の機能領域は *MIZ1* と同様に伸長領域の皮層細胞であることを同定した成果とともに Nature Plants に掲載された。

一方、*miz1* 変異体は光屈性が野生型 Col に比べて低下することから、作出した *TSP:MIZ1-GFP* 形質転換体を用いて、水分屈性だけではなく、光屈性の相補も確認した。その結果、水分屈性とほぼ同様に境界領域および伸長領域の皮層で *MIZ1* を発現させる (*COR*, *WER*) と光屈性は野生型と同様の角度まで回復した。それゆえ、*MIZ1* が境界領域および伸長領域の皮層で機能することで、正常な水分屈性や光屈性が誘導されることが明らかとなった。

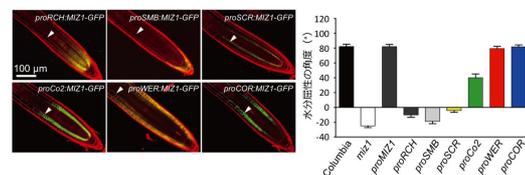


図1 組織特異的プロモーターを用いた *MIZ1* の発現誘導形質転換体とその系統の水分屈性能。左図：各組織特異的プロモーターを用いて *MIZ1* を発現させたときの画像を示す。緑および黄色は *MIZ1* の発現している領域を示す。右図：組織特異的プロモーターを用いて *MIZ1* を誘導した系統を用いて、12時間の水分勾配刺激を与え、その時の屈曲角度を測定した。

また、GAL4 形質転換体についても、伸長領域の表皮等で発現誘導するものを作成したが、いずれも水分屈性能の回復が認められなかった。組織特異的プロモーターと GAL4 の実験結果の差異については、GAL4 形質転換系統で、MIZ1 を可視化するために融合したマーカーが MIZ1 機能に影響した可能性を考えた。

(2)MIZ1 と相互作用する因子の同定

MIZ1 および、免疫沈降で MIZ1 と相互作用する可能性のある HSP81 など複数の候補因子について、その CDR 全長を pGADT7 および pGBKT7 に挿入した。CDR の塩基配列を確認できたプラスミドを使用して、酵母に形質転換を行い、相互作用する可能性のある因子が得られた。

(3)MIZ1 依存的に発現変動する遺伝子群の網羅的解析

野生型 Columbia に加え、水分屈性の欠損している *miz1* 突然変異体と MIZ1 を過剰に発現させた形質転換体 MIZ10Es の間で、通常の生育状態と根に水分勾配刺激を与えたときの根端を用いてマイクロアレイを行った。そのデータから網羅的な遺伝子発現解析を行い、複数の候補遺伝子を選抜した。そして、その発現の再現性をリアルタイム RT-PCR 法により確認するとともに、候補遺伝子の機能欠損形質転換体の形質評価を複数系統行った。MIZ1 依存的に発現を変動させる遺伝子が見出されたものの、その機能欠損形質転換体の水分屈性能は Col と変動がなく、有力な候補を見出すことができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nakajima Y.^{*}, Nara Y.^{*}, Kobayashi A.^{*}, Sugita T., Miyazawa Y., Fujii N., Takahashi H. Auxin transport and response requirements for root hydrotropism differs between plant species.

J Exp Bot (in press)

^{*}equal contribution (査読有)

Dietrich D.^{*}, Pang L.^{*}, Kobayashi A.^{*}, Fozard J.A., Boudolf V., Bhosale R., Antoni R., Nguyen T., Hiratsuka S., Fujii N., Miyazawa Y., Bae T-W., Wells D.M., Owen M.R., Band L.R., Dyson R.J., Jensen O.E., King J.R., Tracy S.R., Sturrock C.J., Mooney S.J., Roberts J.A., Bhalerao R.P., Dinneny J.R., Rodriguez P.L., Nagatani A., Hosokawa Y., Baskin T.I., Pridmore T.P., Veylder L.D., Takahashi H., Bennett M.J. Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism.

Nat Plants 3:17057, 2017

doi: 10.1038/nplants.2017.57

^{*}equal contribution (査読有)

Kim H-J., Kobayashi A., Fujii N., Miyazawa Y., Takahashi H. Gravitropic response and circumnutation in pea (*Pisum sativum*) seedling roots.

Physiol Plant 157(1):108-118, 2016

doi: 10.1111/ppl.12406. (査読有)

〔学会発表〕(計 40 件)

小林啓恵, パンレイ, 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、宇宙航空研究開発機構 宇宙科学研究所 (神奈川県相模原市) 2017 年 1 月 16 日-17 日

小林啓恵「根の水分屈性分子機構に関する研究」東北植物学会第 6 回大会、東北大学 (宮城県仙台市) 2016 年 12 月 10 日-11 日

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、東北大学 (宮城県仙台市) 2016 年 12 月 10 日-11 日

Pang L., Kobayashi A., Fujii N., Bae T-W., Miyazawa Y., Dietrich D., Bennett M.J., Takahashi H. "Identification of tissues responsible for MIZ1 and MIZ2/GNOM functions in hydrotropism and phototropism of *Arabidopsis* roots" 第 57 回日本植物生理学会年会 岩手大学(岩手県盛岡市) 2016 年 3 月 18-20 日

小林啓恵, パンレイ, 平塚奏太郎, 藤井伸治, 宮沢豊, 長谷あきら, 細川陽一郎, 高橋秀幸「レーザーアブレーション法によるシロイヌナズナの水分屈性の機能細胞群の解析」第 5 回新学術領域「植物の環境感覚」ワークショップ、奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県生駒市) 2015 年 12 月 14 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 啓恵 (KOBAYASHI, Akie)

東北大学大学院・生命科学研究科・助教
研究者番号: 60463783