

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05524

研究課題名（和文）ストレス応答欠如による根の伸長阻害を回復した突然変異植物の遺伝子機能解析

研究課題名（英文）Study on suppressor mutants elongate the bz1728 mutant short root

研究代表者

金 俊植（Kim, June-Sik）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：60769610

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：この研究は、植物の成長促進とストレス応答の両メカニズムを解明することを目的としている。具体的には、bZIP17とbZIP28の二重機能欠損植物（bz1728）の根の伸長阻害を回復するサプレッサー変異体「nobiro」を探索した。nobiro系統の原因変異を特定し、各変異の分子遺伝学的機能解析を実施した。研究の結果、nobiro6、nobiro1、nobiro9の原因変異がそれぞれ異なるメカニズムで根の伸長阻害を回復す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

この研究の社会的意義は、「根の伸長制御による地下部生産性向上と生産残渣の軽減」にある。植物の根の成長を効果的に制御することで、地下部の生産性を向上させることが可能となる。これにより、土壌からの栄養吸収が促進され、作物の成長が全体的に改善される。また、根の健全な成長により、生産過程で発生する残渣の量が減少し、農業の効率化と持続可能性の向上が期待される。この研究は、食糧生産の最適化と環境負荷の軽減に貢献する重要な一歩である。

研究成果の概要（英文）：This research aims to elucidate the mechanisms underlying both growth promotion and stress responses in plants. Specifically, it involves the investigation of a double mutant plant (bz1728) with bZIP17 and bZIP28 deficiencies, which exhibits root elongation inhibition. Suppressor mutants named "nobiro" were explored to recover the root elongation in bz1728. The research identified the causative mutations in the nobiro lines and conducted molecular genetic functional analyses for each mutation. The findings revealed that the mutations in nobiro6, nobiro1, and nobiro9 each recover root elongation inhibition through different mechanisms.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：小胞体ストレス応答 環境応答 転写制御 根の伸長成長 転写補因子

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

生物における成長促進とストレス応答の両メカニズムは、可用エネルギーの制約からトレードオフの関係を示すことが一般的な理解である。植物の遺伝子制御においてもそれは例外ではなく、多くのストレス応答性転写因子の活性は、植物のストレス耐性を強化すると同時に、栄養成長への悪影響をもたらす。また、それらの転写因子の機能欠損は、充分環境における栄養成長を助ける。これまで、ストレスに応答した耐性機構に寄与するストレス耐性遺伝子は多数発見され、転写因子による制御機構が確立しつつあるが、栄養成長への調節機構はいまだに多くが不明のままである。

申請者は、これまで従来のストレス応答性転写因子として研究されてきた bZIP17 と bZIP28 の二重機能欠損植物 (*bz1728*) の作出に成功し、その植物が著しい根の身長阻害を示すことを発見した (Kim et al. Plant Physiol 2018)。従来のトレードオフへの理解に相反するこの現象に対する分子遺伝学解析を通して、植物の成長とストレス応答の両機構を結ぶ新たな制御メカニズムの発見を目指す研究を推進している。

### 2. 研究の目的

これまでの取り組みから、根の伸長成長に寄与する既知の遺伝因子や植物ホルモンとの明確な関連性は認められなかった。新規の遺伝因子の探索を目標に、突然変異を誘導し *bz1728* 変異植物が示す根の伸長阻害を回復するサプレッサー変異の探索を行なった。その結果、もっとも長い根の伸長回復を示す 10 以上の遺伝変異系統の単離に成功し、*nobiro* と名づけた。本申請課題では、もっとも長い根の伸長回復を示す三つの *nobiro* 系統、*nobiro1*、*nobiro6*、*nobiro9* の原因変異を解明し、*bz1728* による根の伸長阻害の分子機構の一端を明らかにすることを目的とする。

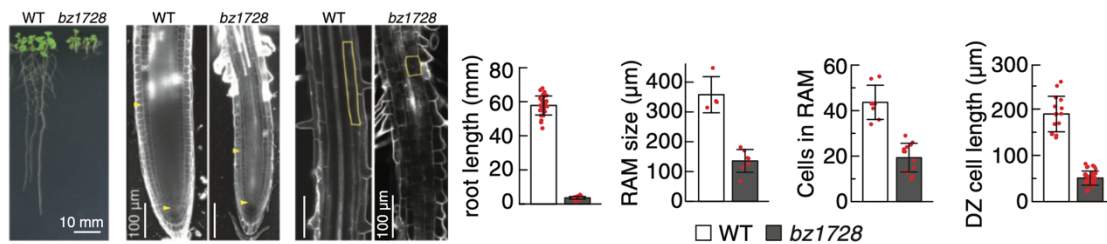


図 *bz1728* 変異植物が示す、根の伸長阻害の具体的な表現型。

### 3. 研究の方法

#### (1) 網羅的ゲノム解読による *nobiro* 原因変異候補の探索

対象となる *nobiro* 系統とその親系統である *bz1728* 間の戻し交配した後代 (BC1F1) の表現型と、その自殖後代 (BC1F2) における表現型の分離比を調べることで、原因変異の遺伝的特徴を確認する。BC1F2 系統群から、対立する表現型を示す個体をそれぞれ 6-8 個体選抜し、これらの個体に対する次世代シーケンス技術 (NGS) による網羅的ゲノム解読を行う。獲得したゲノム配列は、シロイヌナズナのレファランスゲノムとの比較を行い、それぞれに導入された遺伝変異情報を収集する。以降は、表現型解析から収集した変異の遺伝的特徴に合わせて、条件に合致する遺伝変異を選抜、*nobiro* 原因変異候補とする。例えば、もっとも一般的な単一劣勢変異である場合、親 *nobiro* 系統と同等な根の伸長回復を示す BC1F2 個体間で共通する遺伝変異を探索すると同時に、根の伸長回復がない BC1F2 個体のどれかでホモ接合型変異と検出されたものは、偽陽性変異と判断し、候補から除外する。

#### (2) 多重変異作出による原因変異候補の検証

候補変異の検証には、候補変異が座標する遺伝子座の独立した機能欠損を利用する。T-DNA 挿入による単一欠損変異と *bz1728* 間の交配組換えを利用する多重変異植物の作出と、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を利用した多重変異創出を行う。2 系統以上の独立した多重変異と *nobiro* 系統間の表現型を比べることで、検証の精度を高める。

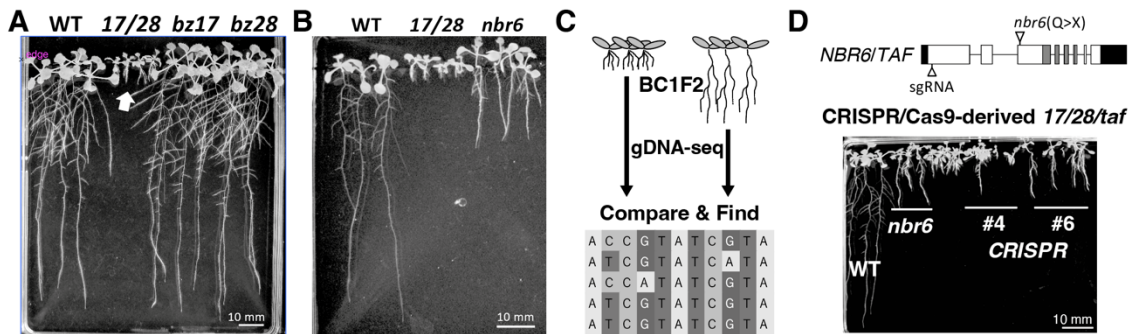


図. 原因変異探索の概略。単一劣勢変異である *nobi6* の原因変異を特定する過程を示す。

### (3) *nobi6* 原因変異の分子遺伝学的機能解析

*bZIP17* と *bZIP28* は植物の小胞体ストレス応答性転写制御を担う転写因子であり、*bz1728* 変異は、上昇と下落両方向に対するダイナミックな遺伝子変動を示す。そのため、先ず網羅的遺伝子発現解析を通して、獲得した *nobi6* 原因変異の機能を判断する。その後、それぞれの原因遺伝子の機能を参考に、機能解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) *nobi6* ; 転写補因子の機能欠損による過剰なストレス応答軽減

*nobi6* の原因変異は、基本転写因子 TAF の一種のタンパク質の発現を阻止するナンセンス変異であることが明らかになった。網羅的遺伝子発現解析より、TAF の欠損は、本来 *bz1728* 変異がもたらす多数の過剰発現遺伝子の発現を正常の戻す効果があることが明らかになった。細胞実験系を駆使することで、TAF は *bz1728* 変異において過剰な活性化が確認されているもう一つの小胞体ストレス応答性転写因子 *bZIP60* と直接相互作用し、その活性を助長することを明らかにした。これらのことから、TAF は植物の小胞体ストレス応答に寄与する新規の転写補因子であることが明らかになった。さらに、*bz1728* が示す根の伸長阻害は、過剰なストレス応答性の遺伝子発現制御機構に起因することが示唆された。

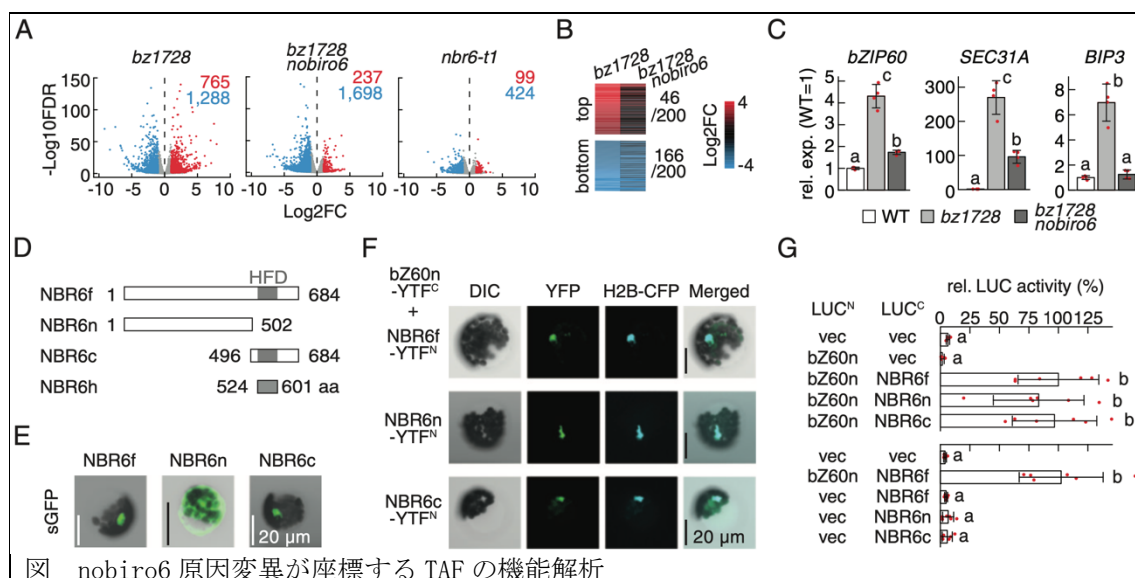


図 *nobi6* 原因変異が座標する TAF の機能解析

### (2) *nobi1* ; ヒストンアセチル修飾の軽減によるストレス応答性遺伝子の抑制

*nobi1* の原因変異は、3番ヒストン (histone 3) にアセチル化修飾を付与するヒストンアセチル化酵素 (HAC) の発現を阻止するナンセンス変異であることが明らかになった。網羅的遺伝子発現解析により、HAC の欠損が、本来 *bz1728* 変異により過剰な発現を示した複数の遺伝子の遺伝子発現軽減をもたらすことが認められた。一般的に遺伝子座のアセチル化は、その遺伝子の活性化と相関する。追加の網羅的ヒストンアセチル化解析を行い、上記遺伝子らのアセチル化が野生型に比べて *bz1728* では蓄積していたものの、*nobi1* 変異では野生型レベルまで復帰していることが確かめられた。これらの結果から、*bz1728* 変異における HAC の活性化が特定の遺伝子群の過剰な発現を誘導し、それらによる根の伸長阻害が引き起こされた可能性が示唆された。以降、それらの遺伝子群の根の伸長制御における機能解析をさらに推進していく。

### (3) *nobi9* ; タンパク質リン酸化酵素の機能欠損

*nobiro9* の原因変異は、特定のタンパク質にリン酸残機を付与するタンパク質リン酸化酵素 (kinase) の一アミノ酸置換をもたらすミスセンス変異であることを明らかにした。機能欠損体を用いた多重変異植物体もまた、*bz1728* に比べて根の伸長回復を示すものの、*nobiro9* に比べて回復程度が低いため、*nobiro9* の原因変異は単なる機能欠損ではなく、未知の機能変更が行われたものと考えられる。以降、網羅的リン酸化タンパク質解析を通して、kinase のターゲットとなるタンパク質を検出し、根の伸長制御との関連性を追う研究を推進する。

(4) 「先進ゲノム支援事業」支援による、他の *nobiro* 系統解析  
本課題を基盤とする「先進ゲノム支援事業 (#221005)」の支援を受け、研究対象以外の7つの *nobiro* 系統 (2、3、4、5、7、8、10) に対する原因変異探索を行なった。その結果、計5つの新規の原因変異を獲得することに成功した。原因変異の一つは、細胞壁を構成するセルロースの結合を緩めることで細胞伸長を助ける XTH 酵素の発現を阻止するナンセンス変異であり、単一機能欠損では効果が弱いものの、相同遺伝子間の複合変異ではより強い効果を示すことが報告されている。以降、*bz1728* の細胞壁の構成をより詳しく調べると同時に、*bZIP17* と *bZIP28* との制御関係を明らかにする研究を推進する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kim June-Sik, Mochida Keiichi, Shinozaki Kazuo	4. 巻 11
2. 論文標題 ER Stress and the Unfolded Protein Response: Homeostatic Regulation Coordinate Plant Survival and Growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 3197 ~ 3197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants11233197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kim June-Sik, Sakamoto Yuki, Takahashi Fuminori, Shibata Michitaro, Urano Kaoru, Matsunaga Sachihiro, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko, Shinozaki Kazuo	4. 巻 119
2. 論文標題 <i>Arabidopsis</i> TBP-ASSOCIATED FACTOR 12 ortholog NOBIR06 controls root elongation with unfolded protein response cofactor activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2120219119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2120219119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kim June-Sik, Kidokoro Satoshi, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko, Shinozaki Kazuo	4. 巻 195
2. 論文標題 Regulatory networks in plant responses to drought and cold stress	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 170 ~ 189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiae105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

【土中の不思議】植物の最適な根の長さとは  
<https://news.mynavi.jp/techplus/article/20220315-2293617/>  
理研などの研究グループ、環境変動に応じた植物の根の伸長調節に関わる遺伝子制御因子を発見  
<https://innoplex.org/archives/52486>  
植物工場や都市型農業の生産性向上への貢献に期待  
<https://jp.techcrunch.com/2022/02/15/controls-root-elongation-with-unfolded-protein-response/>  
最適な根の長さとは  
[https://www.riken.jp/press/2022/20220209\\_1/index.html](https://www.riken.jp/press/2022/20220209_1/index.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------