

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	植物根の水分屈性発現機構の解明とその利用による植物成長制御の革新
研究機関・部局・職名	山形大学・理学部・准教授
氏名	宮沢 豊

【研究目的】

「水」の獲得能力は固着性生物の植物にとって、個体の存続を規定する。植物の主要な吸水器官である根は、水分勾配に応答した屈性能、すなわち水分屈性を発現するが、その発現機構は、その存在が示唆されてから 200 年を経た本課題開始時においては未解明であった。本研究は、申請者らが初めて発見した水分屈性制御分子と水分環境に応答した色素体、輸送小胞動態がいつ、どこで、どのように機能することにより「水分環境を感じ根の形態が動的変化をする仕組み」を解明する。さらに、根の養水分の効率的供給を可能にするとともに根系の発達を担う、新規の根の伸長制御法を開発することにより、地球上の限定された水環境の有効利用を可能にし、耕作地の拡大および人工的な環境における効率的な植物育成法の開発を行うことを目的とする。

植物の水分環境に応じた成長制御に関する科学的記述として、19 世紀より主要な吸水器官である根が、水分の多い方へ向かい成長する水分屈性の存在が示唆されてきた (Knight 1811)。しかしながら、近年に至るまで水分屈性を科学的に確証するものはなく、全く理解が進んでこなかった。それは、実験系が確立されていなかったことにもよる。申請者らは水分屈性異常突然変異体 (*mizu-kussei: miz*) の取得と解析により世界ではじめてとなる水分屈性制御分子 (MIZ1、 MIZ2) を見出した (Kobayashi et al. 2007、 Miyazawa et al. 2009)。これは、水分屈性の存在の議論に終止符を打つ成果であるとともに、水分屈性が遺伝的に制御される現象であることを証明した成果である。このうち 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。

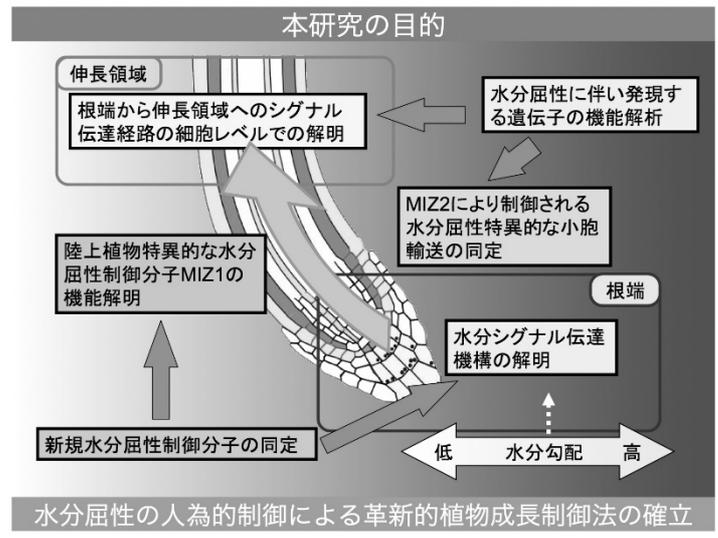
これらの成果を踏まえ、本研究では未だ明らかにされていない、環境応答の最も重要な因子である水センサー分子に連なる水分屈性発現機構を明らかにする。

具体的には、

- (1) 水分屈性制御分子 MIZ1 の機能解明
- (2) MIZ2 の水分屈性における機能解明と水分屈性特異的な小胞輸送の同定
- (3) 水分屈性に必要な細胞群の同定と網羅解析による新規水分屈性制御分子の同定
- (4) 水分屈性制御分子の改変による水分屈性強化植物の作出

を達成目標に掲げ、申請者が見いだしてきた MIZ1、 MIZ2 のタンパク質機能の解明によりそれらの水分屈性 における役割を明らかにする。加えて、新規水分屈性異

常突然変異体の解析により新規水分屈性制御分子を同定し、水環境受容機構を解明する。そのために、細胞生物学的手法と遺伝学的手法を合わせて、水分屈性に必要な細胞の同定とその細胞機能を明らかにする。得られた成果を統合して、水分屈性の全容を水分屈性制御分子の連なりとしてモデル化する。そのうち、特に重要な分子についてその動態を人為的に調節することにより、水分屈性能を強化した植物を作出する。



【総合評価】	
	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

課題担当者らが発見した水分屈性制御分子 MIZ1, MIZ2 を鍵として、根の水分屈性発現機構を解明し、植物の成長制御に革新をもたらそうという取り組みである。当初、①新規水分屈性制御分子の取得とその環境刺激情報処理に伴う動態解析、②水分情報感受細胞の同定と水分センサーの探索、③水分屈性分子機構のモデル化とグリーンイノベーションへ向けた技術基盤の確立という目標を掲げて、研究を開始した。研究を進める過程で、より具体的に、以下の4つの項目を設定して展開した。

- (1) 水分屈性制御分子 MIZ1 の機能解明
- (2) MIZ2 の水分屈性における機能解明と水分屈性特異的な小胞輸送の同定
- (3) 水分屈性に必要な細胞群の同定と網羅解析による新規水分屈性制御分子の同定
- (4) 水分屈性制御分子の改変による水分屈性強化植物の作出

当初、東日本大震災により被害を被ったこと、水分勾配感受にかかわる細胞の特定において、当初の予測と異なる表現型を得たことなどから進捗に遅れが生じ、目標達成が困難ではないかと懸念されたが、精力的に研究を展開し、所期の目的をおおむね達成したと言える成果を上げたことは高く評価できる。

MIZ1 に関する研究において、発現制御機構、発現時期、部位、機能様式を概ね明ら

かにし、水分屈性制御分子 MIZ1 が現象の発現に決定的な役割を有することを見いだしたことは、研究の主目的に応える成果として評価できる。MIZ1 や MIZ2 に関する重要な相互作用因子についても、候補分子の同定が進み、MIZ1 と MIZ2 の相互作用へのかかわりや、植物ホルモンであるオーキシンの極性輸送とのかかわりなど、分子レベルの機能解明が進んでいる。水分屈性制御細胞の同定と、そこで発現する遺伝子の網羅的解析による新規水分屈性制御分子の同定についても、水屈性に必須な小胞輸送制御にかかわると考えられる、水屈性発現に伴い特異的に局在の変化する分子が特定され、小胞輸送の実態が解明されることが期待される。また、新規水分屈性制御分子の同定において、MIZ1 過剰発現体、野生型、miz1 突然変異体の根で発現量の有意な変化がある遺伝子として 2 遺伝子を同定しており、今後の展開が興味深い。

「水分屈性制御分子改変による水分屈性強化作物の作出」に関わる研究課題については、MIZ1 の過剰発現系統を作出し、その主根の水分屈性能を解析したところ明瞭な水分屈性能の亢進が見られた (Miyazawa et al. 2012)。さらに、MIZ1 の過剰発現は、根の細胞の水ストレス耐性も促進していることが見いだされた。この効果は、本来 MIZ1 を発現していない細胞でも観察できたことから、MIZ1 に水ストレスから細胞を保護する機能があることも示唆された。MIZ1 過剰発現個体において、生存率の上昇とバイオマスの増大が認められることを明らかにした (Iwata et al. 2013)。これによって、水分屈性の人為的制御が水分勾配存在下における植物生存に直結する成長調節技術になり得ることを示すことに成功した。

植物の根の水分屈性の発現機構研究としては、国際的にも優位性を保った展開であり、今後も研究を主導していくことが期待できる。

一方では、水分屈性の全容の解明には、さらに明らかにしなければならないことも少なからず残されていると言えよう。得られた成果は積極的に公表していると見受けられるが、レベルの高いジャーナルへの論文発表に挑戦し続けてほしい。

② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

研究開始直後に当時所属していた東北大学が東日本大震災に見舞われたことや、細胞破壊による表現型が当初の予想と異なったことなどから、初期においては進捗に若干の遅れが認められたが、精力的な研究の展開によって、所期の目的をおおむね達成できたと高く評価できる。

本研究は、以下の 4 項目を具体的な達成目標にかかげて展開されたが、

- (1) 水分屈性制御分子 MIZ1 の機能解明
- (2) MIZ2 の水分屈性における機能解明と水分屈性特異的な小胞輸送の同定
- (3) 水分屈性に必要な細胞群の同定と網羅解析による新規水分屈性制御分子の同定
- (4) 水分屈性制御分子の改変による水分屈性強化植物の作出

(1) については、おおむねその目標を達成している。具体的には、MIZ1 過剰発現個体において水分屈性の向上が認められたことなどから、MIZ1 が水分屈性の正の制御分子であること、水分勾配刺激に依存して合成されたアブシシン酸によって発現が誘

導されることを明らかにした。また、MIZ1 の発現は青色光によっても誘導され、乾燥の激しい地表付近でより強く水分屈性が発現する機構が存在することを明らかにした。これらの環境要因によって発現した MIZ1 は、根におけるオーキシンの動態を変化させ、水分屈性を制御すると同時に、根の細胞に対して水ストレスへの耐性を付与することも明らかにしている。

(2) においても、当初の目的を達成していると評価できる。すなわち、MIZ2 は細胞内小胞輸送を制御する ARF-GEF、GNOM をコードしており、水分屈性には二量体形成を果たした GNOM が一定量以上必要であることを示唆した。水分屈性発現過程で、MIZ1 の細胞内局在が変化することと、この変化に MIZ2 が必要であることを見いだすなど、新たな知見を得て、MIZ の機能を明らかにしている。

(3) については、レーザーによる細胞破壊を用いて水分屈性に必須の役割を有する細胞(群)を同定し、そこで発現する遺伝子群の解析から新規水分屈性制御分子を探索同定する方向で研究を展開し、植物種間で水分勾配の感受に関わる細胞に差異がある可能性を示唆する興味深い結果を得たことをはじめとして、新たな発見や進展があった。

(4) についても、その研究目標をおおむね達成していると評価できる。具体的には、MIZ1 過剰発現個体の作出を行いその解析をしたところ、水分屈性の向上が認められたことをはじめ、この水分屈性能の向上した植物は、野生型と比べ、水分限定環境下において生存能が高く、水分限定による生産力の低下もほとんど認められなかった。一方、水分屈性欠損植物は、野生型と比べ水分限定環境下における生存能が著しく低く、また生産力も小さいことを明らかにした。このことは、水分屈性の人為的な制御が行えることを実証したことともに、水分屈性が水分限定環境下における生存能の向上と生産力の維持に寄与することを示したものである。本研究の最も大きな目的であった、水分限定環境下において有用な新規植物成長制御法の開発に道を拓いたと言える。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

本研究課題は水分屈性発現の分子機構の解明と、結果として明らかになる水分屈性制御分子の改変による水分屈性強化植物の作出にある。そのため、まず、研究開始時点で水分屈性に機能することが明らかとされていた分子 (MIZ1、MIZ2) の機能解明とそれと関連する新規水分屈性制御分子の単離をすすめた。その結果、それぞれの課題について下記の成果を得た。

1、水分屈性制御分子 MIZ1 の機能解明

MIZ1 は水分屈性制御分子として最初に見いだしたものであり、その欠損変異体 *miz1* は水分屈性の異常のほか、目立った表現型を呈さない。また、MIZ1 は陸上植物

に保存されたドメインを持っていたが、類似するドメインをコードする遺伝子はこれまでに解析されていなかった。MIZ1 の機能が水分屈性特異的であると考えられること、さらに MIZ1 と相同と考えられる遺伝子が陸上進出を果たした植物のゲノムでのみ見いだされることは、*MIZ1* 遺伝子が植物の陸上進出に伴い獲得された水分屈性の発現で決定的な役割を果たすことが示唆された。そこで、MIZ1 の細胞内局在と発現制御機構を解析することにより、MIZ1 がいつ、どこで発現することが水分屈性発現に重要であるかの解明に着手した。そのために、まず、*miz1* 変異を相補できる MIZ1-GFP 融合タンパク発現システムを作出し解析した。その結果、MIZ1 は根端の細胞群（コルメラ細胞、側方根冠）で発現すると同時に分裂領域と伸長領域の境界付近でも強く発現することが明らかになった。共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた解析ならびに、生化学的解析から、MIZ1 は小胞体の表面に局在していることが強く示唆された（Yamazaki et al. 2012）。一方、MIZ1 には明確な膜貫通ドメインや疎水性に富んだ領域が無く、小胞体膜上のタンパク質と相互作用することで表面への局在を確立していることが推測された。そこで、MIZ1 と物理的に相互作用する分子を免疫沈降法により探索し、現在までに光応答に関連するタンパク質、ストレス応答に機能するタンパク質をその候補として同定している。また、根における *MIZ1* の発現が青色光の照射や、アブシジン酸の処理により増大することを見いだした（Moriwaki et al. 2012）。この結果は、根が地表面へ出たときや、光のあたらない土中でも水分ストレスにさらされた際に水分屈性を強く発現させ、植物の水獲得を積極的に促す機構であると考えられた。前述した MIZ1 と相互作用する分子の水分屈性への寄与の理解と合わせることで、MIZ1 が植物の水獲得に果たす役割の全貌が明らかになることが期待できる。同時に、*miz1* 変異を抑圧する突然変異体のスクリーニングと解析を行い、1 系統の *miz1* 抑圧変異体 *mzp1* の取得に成功し、マップベースクローニングにより候補遺伝子が絞られてきている。表現型解析から、これまでは、なぜ多くの植物に普遍的に見られる現象の発現機構が普遍的でないのかの答えを見いだすことができていたが、*mzp1* の解析により、この疑問を解決する糸口を見いだすことができる。これは、今後水分屈性強化によるグリーンイノベーションを多種の植物に展開する際に重要な知見となると期待される。

2、MIZ2 の水分屈性における機能解明と水分屈性特異的な小胞輸送の同定

MIZ2 は細胞内小胞輸送を制御する ARF-GEF、GNOM をコードしている。これまでに報告のある *gnom* 変異体はオーキシン極性輸送に異常になる表現型を呈する一方で、補助事業者が水分屈性欠損変異体として単離している *miz2* はオーキシンの極性輸送に変化が認められず、水分屈性に特異的な未知の GNOM 機能に異常があることが強く推定されていた。5 系統の *gnom* アリル変異体を用いて、それぞれの水分屈性とアリル間の相補試験を実施した。その結果、他の *gnom* アリルもまた水分屈性を欠損していた。さらに *miz2* とそれぞれのアリルのヘテロ接合体の表現型を解析したところ、GNOM の二量体形成に関与するドメインに異常を有するアリルとのヘテロ接合体は水分屈性を欠損した一方で GEF 活性を欠損するアリルとのヘテロ接合体では水分屈性異常の有意な抑圧が認められた。GNOM は通常二量体で機能することから、水分屈性には二量体形成を果たした GNOM が一定量以上必要であることが示唆された。同時に

miz2 変異を抑圧する突然変異体のスクリーニングを実施した。約 12,000 個体の EMS 処理個体をスクリーニングし、順次二次スクリーニングを行ってきた。その結果、1 系統の *miz2* 抑圧変異体の取得に成功した。その生理学的特性と、マッピングの準備を進めている。加えて、免疫沈降法による MIZ2 と物理的に相互作用する分子の取得も進めており、現在までに実験系の確立が完了し、MIZ2 を含む候補分子の SDS-PAGE による分離を実施し、候補分子を LC/MS-MS で同定した。そして、50 分子程度の候補を得ることに成功した。さらに、水分屈性に必須な小胞輸送制御分子を同定するために 9 系統の小胞マーカー系統を、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてスクリーニングした。そして、1 系統マーカー分子の局在が水分屈性発現に伴い変化することを見いだした。勾配のない水ストレスでは当該分子の局在変化は認められないことから、この変化は水分屈性特異的であると考えられた。また、当該分子のノックアウト変異体では水分屈性が低下していた。今後は、この小胞の実態を解明することで、水分屈性制御に必須の役割を果たす小胞輸送を同定できると考えられる。また、これまでシロイヌナズナの水分屈性発現過程で根端コルメラ細胞内のデンプンが分解されることが知られてきたが、顕微鏡観察の過程で、この分解にはオートファジーが関与することを見いだした。

3、水分屈性に必要な細胞群の同定と網羅解析による新規水分屈性制御分子の同定

本研究課題はレーザーによる細胞破壊を用いて水分屈性に必須の役割を有する細胞（群）を同定し、そこで発現する遺伝子群の解析から新規水分屈性制御分子を探索同定するものである。まず、根端や伸長領域など、広範囲の組織をレーザーで破壊した個体の水分屈性を検証したところ、当初の予想とは反して、明確な水分屈性の低下を検出することができなかった。これについて、より精密な細胞破壊を実施し、少なくともシロイヌナズナでは根端が水分勾配の感受に必須ではないという結論を得た。一方、キュウリでは、根端が水分屈性に必須であることが示された。このことは、植物種間で水分勾配の感受に関わる細胞に差異がある可能性を示唆している。現在、根の他の部位の精密破壊を実施し、その後の水分屈性能を検証する実験を進めている。さらに、シロイヌナズナの根端を用いたトランスクリプトームを実施して、新規水分屈性制御分子の同定を行った。これまでに MIZ1 過剰発現体、野生型、*miz1* 突然変異体の根で発現量の有意な変化がある遺伝子として 2 遺伝子を同定した。

これまでの解析から、エンドウの根の水分屈性には、カルシウムイオンが必要であることが見いだされていた。そこで、カルシウムインジケーターを用いて水分屈性発現に伴う Ca^{2+} 動態変化の解析を行った。そして、水分勾配に伴い Ca^{2+} 濃度の変化が生じる細胞群を見いだした。また、この Ca^{2+} 動態変化にはグルタミン酸が関与することも見いだした。興味深いことに、lateral root cap は、水分屈性発現時に MIZ1 のタンパク量が上昇する場所でもある。

4、水分屈性制御分子の改変による水分屈性強化植物の作出

前述のように、本研究課題の推進により水分屈性制御分子 MIZ1 が現象の発現に決定的な役割を有することを見いだすことができた。また、その発現が光やアブジシン酸といった水環境変化と関連する要因によって調節されることから、MIZ1 の発現制御により人為的に水分屈性を制御できる可能性が考えられた。一方、水分屈性強化

植物の作出のためには、根系全体を念頭にした解析が必要になるため、我々はまず根系の大部分を占める側根の水分屈性能について検証した。シロイヌナズナを用いて、側根の水分屈性実験系を構築し検証したところ、側根もまた主根と同様のタイムコースで水分屈性を発現し、*miz1* 変異体の側根は水分屈性を発現しないことも示された (Iwata et al. 2012)。この結果を踏まえ、*MIZ1* の過剰発現系統を作出し、その主根の水分屈性能を解析したところ明瞭な水分屈性能の亢進が見られた (Miyazawa et al. 2012)。さらに、*MIZ1* の過剰発現は、根の細胞の水ストレス耐性も促進していることが見いだされた。この効果は、本来 *MIZ1* を発現していない細胞でも観察できたことから、*MIZ1* に水ストレスから細胞を保護する機能があることも示唆された。さらに研究を進展させ、実際の土壌中に水分勾配を形成させる実験系を構築し、野生型、*MIZ1* 過剰発現個体、*miz1* 突然変異体の生育実験を行い、*MIZ1* 過剰発現個体において、生存率の上昇とバイオマスの増大が認められることを明らかにした (Iwata et al. 2013)。これによって、水分屈性の人為的制御が水分勾配存在下における植物生存に直結する成長調節技術になり得ることを示すことに成功した。

先進性・優位性

MIZ1、*MIZ2* という、本課題の鍵となる因子を最初に手にした先進性・優位性を十分にいかして、水屈性を人為的に調節できる技術を開発した。先進性・優位性を保つとともに、グリーンイノベーションへの貢献も期待できる。しかし、真のブレークスルーと言えるか否かは、農業作物へ展開した時の成果を待たねばならない。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

植物根の水分吸収、水分生理は、農作物、樹木を問わず、生物と環境に関わる幅広い境界領域の研究課題であり、本研究の知見が関連研究の進歩に与える影響は大きい。

一方、社会的・経済的な課題の解決の波及効果については、現段階までの成果では社会的または経済的課題の解決に貢献できるかは不透明である。*MIZ1* の過剰発現体の利用は、今後乾燥耐性作物の開発に役立つ可能性を持っているが、作物を用いた今後の研究の進展が重要である。期待は大きいですが、作物種に応用ができて初めてその方向性が具体的に示されたと言えよう。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究マネジメントについては、所属や身分の変更に伴う、博士研究員、技術補佐員の雇用の組み換えなども、思慮深く機動的になされている。

東日本大震災による休校措置、停電、実験装置の損壊、サンプルダメージ、その後の所属機関変更（転勤）による実験室整備などの困難に対処しながら、10報の研究論文をはじめとする成果を上げていることから、研究開発マネジメントは適切であると判断する。

助成金の活用については、適切に運用されている。

成果の公表については、下記に示すように適切に行われている。国民との科学・技術対話についても、所属機関と連携して積極的に進めている。

雑誌論文：合計 11 件（掲載済み、査読有 11 件）

会議発表：合計 36 件（専門家向け 35 件、一般向け 1 件）

図書： 1 件

知的財産権の出願・取得：0 件

新聞・一般雑誌等の掲載：0 件

国民との科学・技術対話：合計 17 件