

研究終了報告書

「根毛と遺伝子制御ネットワークを軸とした植物環境応答機構の解明」

研究期間：2021年9月～2023年3月

研究者：柴田 美智太郎

1. 研究のねらい

植物は自身の発芽した場所で、その環境に巧みに馴化して生きる。それを可能としているのは、植物が多様な外部環境シグナルに対して適切な応答を分子レベルで行っているからである。地球の温暖化や砂漠化などの環境変動、それに際した食糧問題や緑の保全など、人類が直面する問題解決に向けて植物の環境応答機構の理解は急務である。ゆえに「多様な環境シグナルに対して植物が適切に応答する仕組みを解明する」ことは人類の最重要課題と言っても過言ではない。本研究はこの課題解決への糸口として、シロイヌナズナの「根毛」に着目した「遺伝子制御ネットワーク」の解明を行った。

「根毛」とは、植物の根の表面に生えるその名の通り毛のような組織である。「根毛」は、根の表面積を増大させることで、土壌からの効率的な栄養吸収に貢献する。例えば、根毛の有無がリン酸欠乏など貧栄養条件下での成長や収量に影響することが知られており、近年は作物の品種改良ターゲットとしても注目されている。そして根毛の特徴で最も注目したい点は、外部の環境に応答した柔軟な成長制御を受ける点である。例えば栄養が乏しい土壌で育てば根毛が長くなり、逆に豊富に存在する環境では根毛が短くなる。これは植物が根毛の成長制御を通して必要な土壌栄養素の吸収を調整している証左であり、植物の生存に直結する重要な環境応答機構であることを明確に示す。シロイヌナズナの根毛は、このような環境に応答した成長可塑性に加え、1細胞で構成されるという構造のシンプルさ、シロイヌナズナの豊富な遺伝学的知見と合わせて、植物の環境応答機構を解明する優れたモデルである。

これまでに根毛の成長制御機構として、「転写因子」による遺伝子制御が重要であることがわかってきた。一方、外部環境依存的に根毛の発生や成長が制御されるメカニズムは断片的であった。具体的には、鍵となる転写因子の存在は明らかであったものの、ある環境で「何が」「何に」制御されることで根毛の成長制御につながるのか、という制御の流れが明らかでなかった。そこで、本研究では「転写因子」による根毛の成長制御に狙いを定め、外部環境シグナルから根毛の成長制御に至る遺伝子制御系の解明を目指した。そしてその「ある環境における遺伝子制御系」を統合した「あらゆる環境における遺伝子制御系」を描き出すことで、「多様な環境シグナルに対して植物が適切に応答する仕組みの解明」を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

植物の根の表面にある組織「根毛」は、外部環境に応じた可塑的な成長をする。本研究はその成長可塑性を可能とする分子機構の解明、そして人為的に根毛の成長制御するための基盤確立を目指した。当初は、外部環境に対して直接応答する転写因子 PHR1 および LRL3 に着目する研究計画であった。しかしながら研究代表者の都合により研究計画を2年半から1年半へと短縮したため、形質転換体を1から作出する研究計画から短期間で成果



が挙げられるよう共同研究をベースとした計画へ変更した。そして着目する転写因子も数を減らし LRL3 のホモログ遺伝子である LRL1 に絞って解析する計画へ変更した。LRL1 は、当初着目した LRL3 と同じサブファミリーに属する転写因子で、アミノ酸配列の保存性も極めて高い。一方、LRL3 は根毛細胞特異的に機能するのに対し、LRL1 は精細胞でも機能し機能欠損株のホモラインが得られないという解析のしにくさがあった。今回、共同研究によって生殖細胞に影響しない LRL1 のドミナントネガティブ変異株を用いたことでその問題を克服した。さらに、LRL1 に GFP を付加したタグラインについても共同研究により加速させることができた。LRL1 の分子機能についてもタマネギや培養細胞を用いた一過的形質転換体を用いることによって短期間で成果を挙げることに成功した。

具体的な成果として、LRL1 が根毛の成長に必須な遺伝子であること、これまで根毛成長の重要因子として知られていた転写因子 RHD6 と相互作用すること、そしてその RHD6 を活性化させること、以上の 3 点を明らかとした。これらの結果は、根毛成長のマスターレギュレーターである転写因子 RHD6 の活性を LRL1 がタンパク質レベルで制御することで、環境に応答した可塑的な成長を可能とすることを示唆する。研究代表者である自身の所属変更のため当初の研究計画から短縮した1年半のプロジェクトとなり、研究計画も大きく変更することとなった。しかしながら研究計画の見直しと共同研究をベースとして研究のスピードアップにより、本研究計画の目的である根毛の成長可塑性を可能とする分子機構の一端を解明することができた。

(2) 詳細

◆ 当初の研究計画からの変更

根毛は外部環境依存的に最終的な長さが変わると高い成長可塑性を持つ。本研究計画では、その高い成長可塑性を可能とする分子機構の解明を大目標とし、その目標に向けて転写因子による遺伝子制御系の解明を目的とした。当初はリン酸飢餓応答のマスターレギュレーターである PHOSPHATE STARTVATION RESPONSE 1 (PHR1)と *Lotus japonicus* ROOT HAIR LESS-LIKE3 (LRL3)という転写因子に着目していた。しかしながら研究代表者の所属変更にともない研究期間を短縮したため、計画を大幅に見直して短期間で成果が挙げられる設計にした。具体的には、注目する転写因子を1つに絞った。そして、自身で形質転換体や遺伝子変異株を作出するのではなく共同研究ベースですでに確立されたラインを用いることとした。そのため焦点を当てる転写因子を LRL3 から LRL1 へ変更した。

◆ 研究実施内容

根毛の成長制御因子として知られている RHD6 サブファミリーのひとつ、*Lotus japonicus* ROOT HAIR LESS-LIKE1 (LRL1)、LRL2 の解析を進めた。まず、産業技術総合研究所の CRES-T(http://www.cres-t.org/fiore/public_db/index.shtml)を分与いただき、ラインのホモ化を行った。そして多面的な成長阻害を引き起こすラインを排除するなどの選抜を進め、図 1に示す LRL1 および LRL2 の機能抑制株(*LRL1-SRDX*、*LRL2-SRDX*)を単離した。*LRL1-SRDX* および *LRL2-SRDX* は著しく根毛の成長阻害を示し、LRL1 および LRL2 が根毛の成長制御に重要な機能を担うことを強く示唆する。

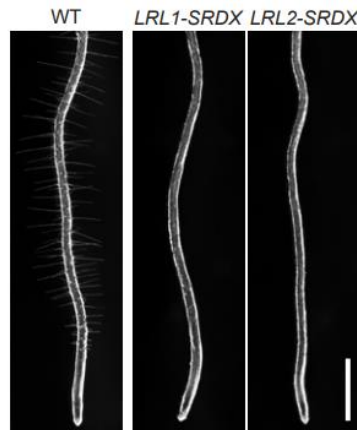


図 1. LRL1/LRL2 機能抑制株の表現型

野生株(WT)は根の表面に根毛を形成するが、LRL1 機能抑制株(*LRL1-SRDX*)および LRL2 機能抑制株(*LRL2-SRDX*)は根毛をほとんど形成しなかった。

次いで、LRL1の細胞内局在を調べるため、金粒子を用いたパーティクルデリバリー法によりタマネギ表皮の一過的形質転換体を作出した。すると、LRL1は根端(meristematic zone)では細胞質中に漂い、細胞の成熟につれて徐々に核内へ移行することを発見した。そこでLRL1を核内へ移行させる因子の実体として、発現パターンから同じ bHLH 型転写因子である RHD6 に着目した。そして、LRL1をRHD6と同時に導入すると、LRL1は核にのみ局在することを発見した。これらの結果は、根毛細胞において発現したLRL1はRHD6によって核へリクルートされることを示す。

さらにLRL1の転写因子としての活性を調べるために、シロイヌナズナ培養細胞 MM2d を用いたプロモーターアッセイを行った。すると、LRL1はRHD6と同時に培養細胞に導入した場合のみ根毛形成に関わる遺伝子の発現を強く誘導することを見出した。

最後に、LRL1タンパク質のどの領域がRHD6の活性化に重要なのかを明らかにする目的で、LRL1を短くしたコンストラクトを作出し、RHD6と同時に用いて標的遺伝子の活性を調べた。その結果、LRL1のbHLHドメインを含むコンストラクトが下流制御遺伝子の発現誘導に必要であることがわかった。

以上、本研究の成果をまとめると、転写因子LRL1は別の転写因子RHD6とヘテロダイマーを形成し、LRL1はRHD6と結合することで核内へ移行し、下流制御遺伝子の発現を誘導する。その結果、根毛の成長に必要な遺伝子発現が誘導され、根毛の形成が促される。

3. 今後の展開

本研究から、根毛の成長促進にはRHD6のみならずLRL1を同時に作用させる必要があることが示された。これまでは1つの転写因子を過剰発現させることで根毛の成長促進を促す

ようなアプローチが多かったが、本研究成果をもとに LRL1 を同時に過剰発現させる戦略を取るようになるだろう。

さらに、bHLH 型転写因子である RHD6 と LRL1 のヘテロ二量体が活性化フォームであるという本研究成果を一般化することができるかもしれない。これまでにある転写因子を過剰発現させることで有用な形質を引き出すという試みは広く行われてきたが、必ずしも成功するものでなかった。もしかすると bHLH ドメインをカスタマイズすることでターゲットとする転写因子の機能を人為的にコントロールする技術へと発展できるかもしれない。

4. 自己評価

当初の研究計画とは大きく異なるアプローチとはなったが、限られた時間のなかで効率よく当初の大目標から逸脱せずに研究成果を挙げられた。そして本研究成果は本研究代表者の手を離れても発展していきだけの自立した成果であると考えている。LRL1 のみならず本研究で注力しなかった LRL2、LRL3 を解析することでより詳細な根毛の成長制御機構が明らかになるだろう。当初の想定よりも短い期間とはなったが、十分にその痕跡は残せたと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

Trihelix transcription factors *GTL1* and *DF1* prevent aberrant root hair formation in an excess nutrient condition

Michitaro Shibata, David S. Favero, Ryu Takebayashi, Arika Takebayashi, Ayako Kawamura, Bart Rymen, Yoichiroh Hosokawa, Keiko Sugimoto

New Phytologist 2022 年 6 月 17 日

本論文では、シロイヌナズナを用いて栄養が豊富に存在する条件下で「根毛」の応答を解析し、栄養が豊富に存在する条件下で根毛成長が著しく抑制されることを示した。さらに、根毛の成長抑制因子である転写因子 *GTL1* と *DF1* がその栄養に応答した抑制に必要なこと、*GTL1* は根毛の成長促進に必要な別の転写因子と相互作用することで根毛の成長を抑制するという分子メカニズムまでを提示した。

(2) 特許出願

特許出願なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

○柴田美智太郎, 杉本慶子. “シロイヌナズナ根毛の可塑的な成長を支える転写制御機構” 日本植物学会第 86 回大会, シンポジウム・口頭, 京都, 2022 年 9 月



○Shibata M., Kawamura A., Sugimoto K. “An environmental response on root hairs under phosphate starvation in Arabidopsis” 第 63 回植物生理学会, Oral, つくば・オンライン, 2022 年 3 月

発表論文(査読あり)

Arabidopsis TBP-ASSOCIATED FACTOR 12 ortholog NOBIRO6 controls root elongation with unfolded protein response cofactor activity

June-Sik Kim, Yuki Sakamoto, Fuminori Takahashi, Michitaro Shibata, Kaoru Urano, Sachihiro Matsunaga, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki

Proceedings of the National Academy of Sciences 119(6) e2120219119–e2120219119

2022 年 2 月 8 日

Cytokinin signaling promotes root hair growth by directly regulating RSL4 expression

Hiroto Takatsuka, Anna Sasaki, Naoki Takahashi, Michitaro Shibata, Keiko Sugimoto,

Maho Tanaka, Motoaki Seki, Masaaki Umeda

Journal of Experimental Botany in press

プレスリリース

栄養が豊富過ぎると根毛は伸びなくなる

—植物が環境に応じて大胆に成長を制御する仕組みを解明—

https://www.riken.jp/press/2022/20220618_1/index.html

受賞

Journal of Plant Research 2022 Most-cited Paper Award

A gene regulatory network for root hair development.

Michitaro Shibata, Keiko Sugimoto

Journal of plant research 132(3) 301–309 2019 年 5 月

