

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08200

研究課題名(和文) イノシトールリン脂質が制御する形態形成

研究課題名(英文) Phosphoinositides control the formation in plant cells

研究代表者

平野 朋子 (Hirano, Tomoko)

京都府立大学・生命環境科学研究科・特任助教

研究者番号：20724496

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)：本研究計画のすべてを完了し、根毛がまっすぐチューブ状に伸長しながら形態形成するが、これは、「異なる二つのイノシトールリン脂質PI(4,5)P2とPI(3,5)P2が、先端成長と側面形成を追隨的に連続して行う」ことで達成される、ということを見出し、その分子メカニズムについて、分子生物学的、細胞生物学的に証明したほか、AFMによる根毛の堅さの物理的測定を立ち上げた他、根毛伸長形態形成の数理モデルの構築も世界初に確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、根毛が土の中をまっすぐ伸びるためには、「先端細胞膜に局在するPIP5K/PI(4,5)P2は、ROP2と共にアクチンや先端の極性分泌を制御し、一次細胞壁を形成しながら、先端成長を促す。一方、側面細胞膜に局在するFAB1/PI(3,5)P2は、ROP10と共に表層微小管や側面への二次細胞壁成分の極性分泌を制御し、側面形成を促す。」という相反する作用を動的に機能させることが必要であることを解明した。この考え方を植物細胞全体に適用すると、細胞に伸長を促進する領域と抑制する領域の形成によって、あらゆる植物細胞の形態形成を説明できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This research provided the findings and the new basic concept about the formation of plant root hair, shown in the following.

Root hairs elongate by tip growth and simultaneously harden the shank by constructing the inner secondary cell wall layer. While much is known about the process of tip growth, almost nothing is known about the mechanism by which root hairs harden the shank. In this study, we showed that phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate (PtdIns(3,5)P2), the enzymatic product of FORMATION OF APLIOD AND BINUCLEATE CELLS 1 (FAB1), is involved in the hardening of the shank in root hairs in Arabidopsis. FAB1 and PtdIns(3,5)P2 localize to the plasma membrane along the shank of growing root hairs. The localization of FAB1 in the plasma membrane of the root hair shank requires the activity of Rho-related GTPases from plants 10 (ROP10) and localization of ROP10 requires FAB1 activity.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：FAB1 イノシトールリン脂質 表層微小管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物細胞の形態は、アクチンと微小管という二種類の細胞骨格によって形成される。すなわち、アクチン繊維は細胞内で活発に重合することによって、細胞膜を外側に突き出す力を生み出す。一方、微小管は、細胞膜直下に細胞の伸長方向と垂直に並び、セルロース合成酵素の進行方向を決定することで、セルロース微繊維の配向を決め、細胞に“たが”をはめて成長を抑制する。その結果、複雑な細胞の形が決定される。

イノシトールリン脂質 (PIs) は、イノシトール環の 3, 4, 5 位の水酸基がリン酸結合されることにより、7 種類存在する。そのうち、3 位と 5 位にリン酸が結合した $PI(3,5)P_2$ は、FAB1 によって合成され、4 位と 5 位にリン酸が結合した $PI(4,5)P_2$ は、PIP5K によって合成される (図 1)。

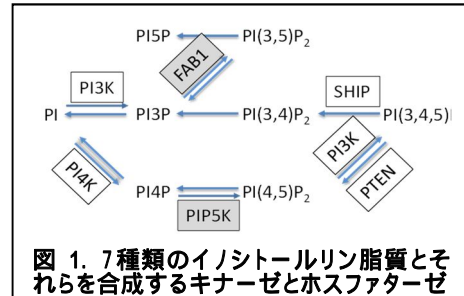


図 1. 7 種類のイノシトールリン脂質とそれらを合成するキナーゼとホスファターゼ

我々は、これまで、モデル植物シロイヌナズナを用いて、FAB1 の機能解析を中心に研究を行い、FAB1 が表層微小管の配向制御に機能していること (業績 4) や根毛において、細胞膜の先端に $PI(4,5)P_2$ が、基部に $PI(3,5)P_2$ がそれぞれ局在することを明らかにした (図 2, 未発表)。また、 $PI(3,5)P_2$ の欠乏系では根毛は太く短く、波状や枝分かれの表現型を示した (未発表)。これらの結果に加えて、 $PI(4,5)P_2$ は、将来根毛が生える

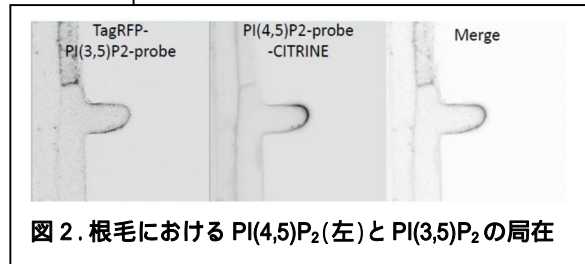


図 2. 根毛における $PI(4,5)P_2$ (左) と $PI(3,5)P_2$ の局在

部分に局在し、Rho-type の低分子量 GTPase である ROP2 と共同でアクチンの重合を制御することで、先端成長を引き起こすことが知られていることから、 $PI(4,5)P_2$ と $PI(3,5)P_2$ の細胞膜上でのすみ分けは、細胞の極性成長における形態形成の制御に関わっているのではないかと思に至った。

一方、植物の ROP には 11 のアイソフォームが存在し、脂質修飾の違いからタイプ ROP とタイプ ROP に分けられる。ROP1 から ROP8 までがタイプ ROP、ROP9 から ROP11 までがタイプ ROP として知られているが、タイプによる機能の違いは不明であった。我々は、根毛においてタイプ I ROP である ROP2, ROP4 が根毛の先端、タイプ II ROP である ROP10, ROP11 が根毛の基部に局在することを明らかにした (未発表データ)。さらに、我々は、免疫沈降・質量解析法により、FAB1 の相互作用タンパク質を多数同定し、そのなかの 1 つとして ICR1 を発見している (未発表データ)。ICR1 は、連携研究者の Shaul Yalovsky 博士によって ROP10 および微小管 (私信) と相互作用することが報告されている。以上のことから、我々は、「 $PI(3,5)P_2$ と $PI(4,5)P_2$ のすみわけ仮説」を提唱した。すなわち、細胞膜上で局所的なオーキシンもしくは ROS シグナリングが、ROP2 (タイプ ROP) と ROP10 (タイプ ROP) を活性化し、 $PI(4,5)P_2$ を足場にして、活性化した ROP2 がアクチン繊維の配向を制御することで先端成長を引き起こす。一方、活性化した ROP10 によって、 $PI(3,5)P_2$ を足場にして基部に定着した ICR1 が微小管結合タンパク質として表層微小管の配向を制御し (未発表)、成長を抑制し、細胞基部の強固な構造を形成するというものである (図 3)。この仮説は、根毛の形態形成のみならず、植物細胞の形態形成に普遍的に適用できる普遍的な仮説であると考えられる。

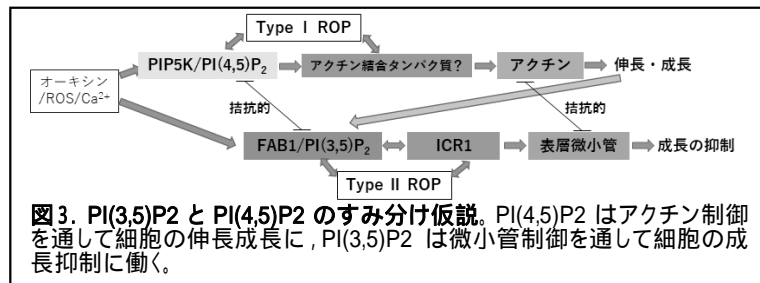


図 3. $PI(3,5)P_2$ と $PI(4,5)P_2$ のすみわけ仮説。 $PI(4,5)P_2$ はアクチン制御を通して細胞の伸長成長に、 $PI(3,5)P_2$ は微小管制御を通して細胞の成長抑制に働く。

2. 研究の目的

(a) $PI(3,5)P_2$ と $PI(4,5)P_2$ の局在解析

根毛の伸長開始、伸長終了の過程における $PI(3,5)P_2$ と $PI(4,5)P_2$ の局在解析を徹底的に行う。

(b) ROP10 に関する機能解析

タイプ ROP とタイプ ROP の使い分けが、それぞれ、成長の促進と抑制に働くか確かめる。特に、タイプ ROP の代表として ROP10 を調べ、また、 $PI(3,5)P_2$ と ROP10 の関係を調べる。

(c) ICR1 に関する機能解析

共免疫沈降質量分析によって、FAB1 と相互作用する分子として ICR1 を発見したが(未発表), *icr1* 変異体の形態は、PI(3,5)P₂ 抑制による形態形成異常と類似しており、また、GFP-ICR1 の細胞内局在は、PI(3,5)P₂ 抑制により細胞膜から細胞質に変化した(未発表)。また、我々は、リボソームアッセイにより、ICR1 は PI(3,5)P₂ と特異的に結合することを発見した(未発表)。従って、ICR1 をエフェクターの有力候補として考えており、これを同定し、動作原理の解明を目指す。

(d) PI(3,5)P₂ と微小管の関係をイメージング

PI(3,5)P₂ の量の変化に対応した微小管の動きを、動態学的イメージング構築で解析する。

3. 研究の方法

我々が開発、もしくは証明した、条件的にノックダウンできる FAB1 エストラジオール誘導型ノックダウン変異体(FAB1-cKD)、植物細胞において FAB1 ノックダウンと同じ効果をもつ、PI(3,5)P₂ 合成阻害剤 YM201636、分化した組織において PI(3,5)P₂ の観察がライブで同時にできる植物体 [TagRFP-PI(3,5)P₂ プローブ] の三つの道具を使って、「PI(3,5)P₂ と PI(4,5)P₂ の局在解析」、「ROP10 に関する機能解析」、「ICR1 に関する機能解析」、「PI(3,5)P₂ と微小管の関係をイメージング」を行う。

4. 研究成果

根毛の先端は、細胞膜とその外側に一次細胞壁が形成されており、側面は、細胞膜と一次細胞壁の間に、植物細胞を頑強にする二次細胞壁が形成されることが知られているが、その形成メカニズムは不明であった。

我々は、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸 5-キナーゼ、FAB1 とその生成産物ホスファチジルイノシトール 3,5 ニリン酸[PI(3,5)P₂]が、伸長中の根毛側面の細胞膜に局在することを(図1)、PI(3,5)P₂ の蛍光マーカータンパク質 TagRFP-ML1N*2 を開発することで初めて明らかにした。さらに PI(3,5)P₂ は表層微小管の形成を制御し、二次細胞壁成分を分泌することで根毛の側面形成を制御しているということを見出した。実際に、FAB1/PI(3,5)P₂ を低下させていくと寒天中で伸長させた根毛は、太く、波打った形態になり(図2)、最終的にはぷっくりと膨らんだような状態に変化した。このとき根毛側面の機械的強度を原子間力顕微鏡(AFM)を用いて

液中で直接測定すると、通常の根毛の半分程度の硬さしかなくなっていた。その原因は、表層微小管が極度に断片化されることと(図3)、二次細胞壁に硬さを与えるはたらきのあるキシランが分泌されなくなることであった。

さらに、細胞骨格の制御に関わる低分子量 G タンパク質の一種である ROP(Rho-related GTPases from plants) ファミリータンパク質のうち、ROP2 と ROP10 が根毛特異的に発現しており、PIP5PK3 は ROP2 と FAB1 は ROP10 とそれぞれ特異的に相互作用し、FAB1/PI(3,5)P₂ と ROP10 が協働して表層微小管を制御していることがわかった。FAB1/PI(3,5)P₂ の量依存的な表層微小管と二次細胞壁の制御が根毛の形態を決めていることは、計算機シミュレーションの結果からも裏付けられた。つまり、根毛が土の中をまっすぐ伸びるた

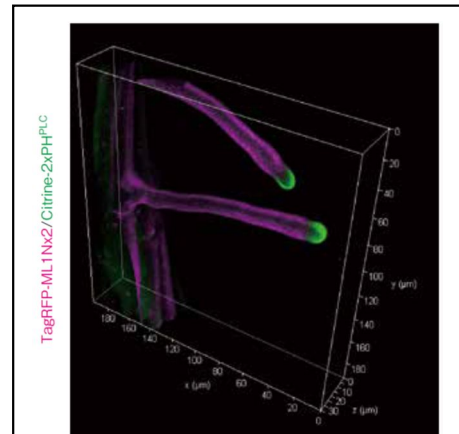


図1. PI(3,5)P₂ を TagRFP-ML1N*2 (マゼンタ)で、PI(4,5)P₂ を Citrine-2xPHPLC (緑) 標識して可視化し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

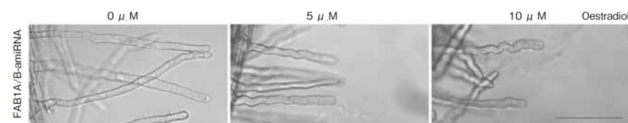


図2. Oestradiol 誘導型 FAB1 ノックダウンラインを用いて FAB1 の発現を段階的に抑制させると、FAB1 の発現を抑制すればするほど、根毛は激しく波状の形態を示した。

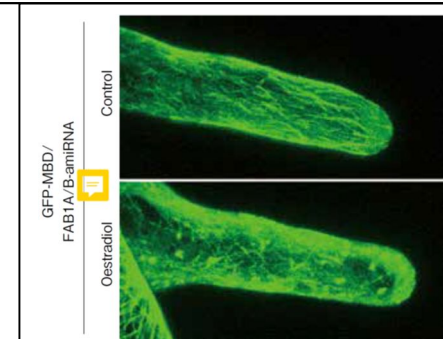


図3. FAB1 の発現を抑制すると、GFP-MBD で標識された表層微小管は断片化した。

めには、「先端細胞膜に局在する PIP5K/PI(4,5)P₂ は、ROP2 と共にアクチンや先端の極性分泌を制御し、一次細胞壁を形成しながら、先端成長を促す。一方、側面細胞膜に局在する FAB1/PI(3,5)P₂ は、ROP10 と共に表層微小管や側面への二次細胞壁成分の極性分泌を制御し、側面形成を促す。」という二種類のホスホイノシタイドの相反する作用を動的に機能させることが必要であり、PI(3,5)P₂ 量が低下し、根毛側面の強度が不足すると座屈（圧縮力を受けた物体がその力の軸の横方向に曲がること）により、波打つような形態になることが明らかになったのである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirano T, Sato MH.	4. 巻 22
2. 論文標題 Diverse Physiological Functions of FAB1 and Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate in Plants.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.00274.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirano T, Sato MH.	4. 巻 -
2. 論文標題 Physiological Functions of Phosphoinositide-Modifying Enzymes and Their Interacting Proteins in Arabidopsis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 1007/5584_2018_295.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirano T, Konno H, Takeda S, Dolan L, Kato M, Aoyama T, Higaki T, Takigawa-Imamura H, Sato MH.	4. 巻 4
2. 論文標題 PtdIns(3,5)P2 mediates root hair shank hardening in Arabidopsis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Plants.	6. 最初と最後の頁 888-897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-018-0277-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirano T, Munnik T, Sato MH.	4. 巻 58
2. 論文標題 Inhibition of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate production has pleiotropic effects on various membrane trafficking routes in Arabidopsis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 120-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcw164.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirano T, Stecker K, Munnik T, Xu H, Sato MH.	4. 巻 58
2. 論文標題 Visualization of Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate Dynamics by a Tandem ML1N-Based Fluorescent Protein Probe in Arabidopsis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1185-1195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcx011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koguchi M, Yamasaki K, Hirano T, Sato MH.	4. 巻 12
2. 論文標題 Vascular plant one-zinc-finger protein 2 is localized both to the nucleus and stress granules under heat stress in Arabidopsis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Signal Behav.	6. 最初と最後の頁 e1295907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2017.1295907.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平野 朋子
2. 発表標題 イノシトールリン脂質が制御する根毛の形態形成
3. 学会等名 植物学会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野朋子, 青山卓史, 加藤真理子, 武田征士, 松垣匠, 今村寿子, 佐藤雅彦
2. 発表標題 イノシトールリン脂質が制御する根毛の形態形成
3. 学会等名 第35回日本植物細胞生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平野朋子
2. 発表標題 二種類のイノシトールリン脂質とROP-GTPaseの制御による根毛の形態形成
3. 学会等名 第47回植物バイテクシンポジウム(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平野朋子, 山本美奈, 佐藤雅彦
2. 発表標題 SYP123 は根毛の二次細胞壁合成のための輸送を担う
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----