

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17595

研究課題名(和文)細胞膜上の流動性制御を基盤とした植物細胞の極性形成機構に関する解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of axis formation in plants mediated by the regulation of lateral diffusion of plasma membrane proteins

研究代表者

橋本 悟史(Naramoto, Satoshi)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：30612022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：PINの局在制御機構の理解にむけ、PINクラスターとMAB4、細胞壁の関係、ならびにPINクラスター化の分子機構の解析を行った。その結果、MAB4はPINと細胞膜において共局在することが明らかになり、MAB4がPINのクラスター形成に直接作用することが示唆された。一方、細胞壁については、細胞壁が直接PINクラスター形成を制御することを明確に示す結果を得ることはできなかった。また、化学遺伝学的解析からは、PINのクラスターは、生体膜の脂質成分の適切な合成や、細胞内のATP依存的に形成されることが明らかになった。また、PINクラスター形成に関与する新規突然変異体を1つ単離することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オーキシンの極性輸送の減少はダーウィン親子により140年前に見出されていたが、その分子機構は未だ未知なままである。本研究の成果は長らく未知とされてきたオーキシンの極性輸送の分子機構を明らかにするものであり、生物学上重要な研究課題である。また、オーキシンは単為結果や除草剤に利用されていることから、本研究の進展は将来的な農業利用の方策の礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：My previous research identified the formation of dot-like clusters of PIN proteins at PMs. It also identified that PIN clusters are established or maintained by the cell wall components and the unknown function protein MAB4. Here I analyzed the role of MAB4 and cell wall in PIN cluster formation. I also performed forward genetic and chemical genetic screening to further elucidate the mechanism of PIN cluster formation.

I identified that MAB4 and PIN proteins both formed cluster-like structures at PMs. I also identified that they are largely colocalized. These findings suggested that MAB4 directly regulate PIN cluster formation. In contrast, I could not get clear evidence that demonstrate the direct involvement of cell wall in PIN cluster formation. Regarding the screening, I identified that phospholipids composition as well as the ATP biosynthesis play important roles for PIN cluster formation. I also succeeded to isolate one mutant that display defects in PIN cluster formation.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：極性 オーキシン PIN

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物個体の発生・形態形成においてオーキシンの極性輸送は重要な役割を果たす。オーキシンの極性輸送はオーキシン排出担体 PIN の細胞における偏在化(極性局在)により制御されていることがこれまでに明らかにされている。これまでに植物細胞における PIN の極性局在において小胞輸送が重要な役割を果たすことが広く知られており、PIN の局在化における研究の焦点は小胞輸送を基盤としたものが中心であった。一方で、私は PIN2 が細胞膜上で多量体様のドット構造(以下、PIN2)クラスターを形成することを見出すとともに、この構造体は細胞膜上で移送しない構造体であることを見出した。そのため、PIN の偏在化において、小胞輸送に加え、細胞膜上で PIN を側方拡散しないように制御する機構が存在する可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究は、植物個体の形態形成の基盤となる、植物細胞の極性形成機構を明らかにすることを目的として、PIN の極性局在化機構を明らかにすることを目指している。特に、新規構造体 PIN クラスターの PIN の極性局在化における役割、ならびに、PIN クラスターの形成機構の解明を目指した実験を行う。

3. 研究の方法

(1) PIN の局在化における MAB4 の役割および MAB4 と PIN の分子的关系の解析

PIN2-mCherry と MAB4-GFP 共発現体を用いて、根の表皮細胞における両者の共局在性を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析する。なお、この際には、両者が一過的に相互作用する可能性を考え、タイムラプス解析も行う。また、MAB4 が PIN クラスター形成を介して、PIN の拡散性を制御する可能性を検証するために、FRAP の手法を用いて、*mab4* 変異体における PIN の細胞膜中の拡散速度の変化を解析する。

(2) 細胞壁による PIN の局在化・クラスター化制御機構の解析

細胞壁成分のペクチンを修飾する酵素 *PME1* の過剰発現体における PIN タンパク質の挙動を茎頂・根端分裂組織において解析し、ペクチンメチル化が細胞極性形成へ与える影響を解析する。具体的には、共焦点レーザー顕微鏡を用い、PIN クラスターの形成が正常かどうかを観察する。また、PIN クラスターの細胞膜上の動態を FRAP 解析を行うことで、細胞膜上での PIN タンパク質の動態・流動性に関して解析する。

(3) PIN クラスター構成タンパク質複合体の単離およびその後の機能解析

native PAGE を行うことで、PIN はそれぞれ多量体を形成するかどうかを検証する。また、PIN クラスターを形成する分子実態を明らかにするために、特異抗体を用いた免疫沈降を行い、その後の質量分析により、複合体構成因子を同定する。

(4) PIN の極性局在・クラスター化を制御する因子の探索・同定

遺伝学・化学遺伝学的手法を用い、PIN クラスター形成・局在化に関わる因子の探索を行う。

4. 研究成果

(1) PIN の局在化における MAB4 の役割および MAB4 と PIN の分子的关系の解析

PIN2-mCherry と MAB4-GFP 共発現体では、両者は良く共局在することが明らかになった。また、MAB4-GFP は一過的に PIN2-mCherry と共局在することも明らかになった。両者は物理的に相互作用する可能性が考えられることから、今後検証を行うべく、PIN2-Venus および MEL1(MAB4 のホモログ)-CFP 共発現体を作成した。今後 FRET 解析により両者の相互作用の検証を行う予定である。

また、MAB4/MEL が PIN クラスター形成を介して、PIN の拡散性を制御する可能性の検証を行った。その結果、MAB4/MEL 過剰発現体では、PIN の細胞膜中の側方拡散の速度が著しく低下することが明らかになった。一方、*mel4* 重変異体では、PIN の細胞膜中の拡散速度は、若干の上昇傾向にあるものの、顕著な差は見られなかった。今後、さらなる解析を行う。

(2) 細胞壁による PIN の局在化・クラスター化制御機構の解析

PME1 の過剰発現体では、PIN クラスターの形成が阻害されることが示唆された。また FRAP 解析により、PIN クラスターの細胞膜上の動態の解析を行った。茎頂分裂組織を用いて観察を行ったが、植物個体毎の差が大きく、実験条件の検討が要求される結果となった。さらには、*PME1* の細胞内輸送経路を解析するために、*PME1*-GFP 発現体の

作成を行った。しかしながら、PMEI-GFP の発現量は弱く観察することは困難であった。今後、プロモーターの検討を行う。

- (3) PIN クラスター構成タンパク質複合体の単離およびその後の機能解析
native PAGE の結果、PIN は多量体を形成する可能性が示唆された。また、特異抗体を用いた免疫沈降を行い、PIN クラスターを形成する分子の探索を行った。しかしながら、免疫沈降がうまくいかず、PIN クラスター構成タンパク質複合体の単離にはいたらなかった。今後、さらなる条件検討を行う。
- (4) PIN の極性局在・クラスター化を制御する因子の探索・同定
化学遺伝学的手法を用い、PIN クラスター形成・局在化に関わる因子の探索を行った結果、脂質の合成酵素阻害剤添加下では、PIN クラスターが顕著に減少することが明らかになった。また、ATP 依存的なエネルギーの合成を阻害した条件でも、PIN クラスターが消失することが明らかになった。また、遺伝学的解析の結果、PIN クラスターが異常になる突然変異体を 1 つ単離することに成功した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) BLADE-ON-PETIOLE genes temporally and developmentally regulate the sheath to blade ratio of rice leaves.

Toriba T, Tokunaga H, Shiga T, Nie F, Naramoto S, Honda E, Tanaka K, Taji T, Itoh JI and Kyoizuka J.

Nat Commun. 10 619 2019 年 2 月 doi: 10.1038/s41467-019-08479-5. (査読有り)

(2) Gibberellin DELLA signaling targets the retromer complex to redirect protein trafficking to the plasma membrane

Salanenko Y, Verstraeten I, Löffke C, Tabata K, Naramoto S, Glanc M and Friml, J.

Proc Natl Acad Sci U S A 2018 年 2 月 doi: 10.1073/pnas.1721760115. (査読有り)

(3) Deletion analysis of AGD1 reveals domains crucial for its plasma membrane recruitment and function in root hair polarity

Yoo CM, Naramoto S, Sparks JA, Khan BR, Nakashima J., Fukuda H. and Blancaflor EB

J Cell Sci 131 2018 年 1 月 doi: 10.1242/jcs.203828. (査読有り)

(4) ARF GTPase machinery at the plasma membrane regulates auxin transport-mediated plant growth

Naramoto S and Kyoizuka J

Plant Biotechnology 2018 年 0.5511/plantbiotechnology.18.0312a (査読有り)

(5) Polar transport in plants mediated by membrane transporters: focus on mechanisms of polar auxin transport

Satoshi Naramoto

Curr Opin Plant Biol. 40 8-14 2017 年 12 月 doi: 10.1016/j.pbi.2017.06.012. (査読有り)

(6) Insights into land plant evolution garnered from *Marchantia polymorpha* genome.

Bowman, JL, Kohchi, T, Yamato, KT, Jenkins, J, Shu, S, Ishizaki, K, Yamaoka, S, Nishihama, R, Nakamura, Y, Berger, F, Adam, C, Aki, SS, Althoff, F, Araki, T, Arteaga-Vazquez, MA, Balasubramanian, S, Barry, K, Bauer, D, Boehm, CR, Briginshaw, L, Caballero-Perez, J, Catarino, B, Chen, F, Chiyoda, S, Chovatia, M, Davies, KM, Delmans, M, Demura, T, Dierschke, T, Dolan, L, Dorantes-Acosta, AE, Eklund, DM, Florent, SN, Flores-Sandoval, E, Fujiyama, A, Fukuzawa, H, Galik, B, Grimaneli, D, Grimwood, J, Grossniklaus, U, Hamada, T, Haseloff, J, Hetherington, AJ, Higo, A, Hirakawa, Y, Hundley, HN, Ikeda, Y, Inoue, K, Inoue, SI, Ishida, S, Jia, Q, Kakita, M, Kanazawa, T, Kawai, Y, Kawashima, T, Kennedy, M, Kinose, K, Kinoshita, T, Kohara, Y, Koide, E, Komatsu, K, Kopischke, S, Kubo, M, Kyoizuka, J,

Lagercrantz, U, Lin, SS, Lindquist, E, Lipzen, AM, Lu, CW, De Luna, E, Martienssen, R A, Minamino, N, Mizutani, M, Mizutani, M, Mochizuki, N, Monte, I, Mosher, R, Nagasaki, H, Nakagami, H, Naramoto, S, Nishitani, K, Ohtani, M, Okamoto, T, Okumura, M, Phillips, J, Pollak, B, Reinders, A, Rövekamp, M, Sano, R, Sawa, S, Schmid, MW, Shirakawa, M, Solano, R, Spunde, A, Suetsugu, N, Sugano, S, Sugiyama, A, Sun, R, Suzuki, Y, Takenaka, M, Takezawa, D, Tomogane, H, Tsuzuki, M, Ueda, T, Umeda, M, Ward, JM, Watanabe, Y, Yazaki, K, Yokoyama, R, Yoshitake, Y, Yotsui, I, Zachgo, S, and Schmutz, J.
Cell 171 287-304 2017年10月 doi: 10.1016/j.cell.2017.09.030. (査読有り)

[学会発表](計13件)

(1) PpTAWs, encoding an ALOG family transcription factor, is required for stem cell maintenance in *Physcomitrella patens*
秦有輝、日渡祐二、経塚淳子、榎本悟史
日本植物生理学会第60回大会 2019年3月13日

(2) Lateral organ diversification in plants mediated by an ALOG family protein
榎本悟史
東北植物学会第8回大会 2018年12月8日

(3) オーキシン排出担体 PIN の極性局在を制御する細胞膜ドメイン形成機構の研究
榎本悟史
日本分子生物学会第41回大会 2018年11月28日

(4) Coordination of lateral organ development and meristem activity mediated by ALOG protein in *Marchantia polymorpha*
Satoshi Naramoto, Kimitsune Ishizaki, Masaki Shimamura, Sakiko Ishida, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi and Junko Kyozyuka
植物学会 2018年9月14日

(5) Coordination of lateral organ development and stem cell activity in *Marchantia polymorpha* is mediated by an ALOG family protein
Satoshi Naramoto, Nicola Trozzi, Victor Jones, Masaki Shimamura, Kanane Sato, Sakiko Ishida, Kimitsune Ishizaki, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi and Junko Kyozyuka
EMBO workshop New shores in land plant evolution 2018年6月21日

(6) 植物細胞の極性形成機構の細胞生物学的解析
榎本悟史
第20回オルガネラワークショップ 2018年3月27日

(7) 側性器官は頂端分裂組織を制御するのか？
榎本悟史
第1回コケ幹細胞研究会 2018年1月6日

(8) Evolutionary-Developmental Analysis of ALOG Family Protein in *Marchantia polymorpha*
Satoshi Naramoto, Kimitsune Ishizaki, Masaki Shimamura, Sakiko Ishida, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi and Junko Kyozyuka
The 85th NIBB Conference Marchantia Workshop 2017年12月17日

(9) 植物の極性構築メカニズムの分子細胞生物学的研究
榎本悟史
東北植物学会 2017年12月10日

(10) ゼニゴケ ALOG ドメイン遺伝子 MpTAW1 の進化発生学的解析
榎本悟史, 石崎公庸, 嶋村正樹, 徳永浩樹, 吉田明希子, 西浜竜一, 河内孝之, 経塚淳子
植物学会第81回大会 2017年9月9日

(11) Molecular and cell biological studies on the mechanisms of plant axis formation
榎本悟史
第35回日本植物細胞分子生物学会 2017年8月30日

(12) Evolutionary-developmental analysis of ALOG family protein in *Marchantia polymorpha*
榎本悟史, 石崎公庸, 嶋村正樹, 徳永浩樹, 吉田明希子, 西浜竜一, 河内孝之, 経塚淳子

第 35 回日本植物細胞分子生物学会 2017 年 8 月 29 日

(13)小胞輸送制御因子とオーキシン排出担体 PIN による植物細胞の極性形成機構

榎本悟史, 古谷将彦、中野明彦、福田裕穂、経塚淳子

第 69 回細胞生物学会大会 2017 年 6 月 15 日

〔図書〕(計 1 件)

(1)植物の体軸形成の分子基盤

榎本悟史

アグリバイオ 3(4) 49-51 2019 年 4 月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/teacher/detail---id-37398.html>

<http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/PlantDev/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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、研究者個人に帰属されます。