

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14730

研究課題名（和文）土壌粒子環境を模倣した生細胞イメージング系による根毛の接触応答機構の解明

研究課題名（英文）Live-imaging analysis of root hairs contacting with the soil-mimicked obstacles

研究代表者

四方 明格（Shikata, Hiromasa）

基礎生物学研究所・植物環境応答研究部門・助教

研究者番号：10813272

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）：陸上植物に存在する根毛は、土壌からの水分や養分の効率的吸収を担うとされる。根毛の形態や成長に関する解析は一般に、寒天培地上あるいは液体培地内で生育させた植物体を用いて行なわれる。しかしながら、根毛が本来働く土壌環境は、根毛伸長の障害となる土壌粒子などで満たされている。このような障害物に溢れた環境で、根毛がどのように成長しているのかに対してアプローチするため、本研究では土壌中の障害物を模倣した環境を顕微鏡観察可能な材料で構築した。この系を用いて、根毛が障害物と接触した際に引き起こされる細胞内変化を詳細に捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根毛は根の表面に無数に生える非常に細い構造体であるが、個々が1つの細胞から形成されている。根毛を生やすことで根と土壌との接触面積を増やし、植物は土壌からの水分や養分の吸収を効率的に行っているとされている。土壌は様々な大きさの粒子によって構成されているが、根毛がそのような粒子の中をどのように成長するのかわかっていない。そこで、本研究では根毛が土壌粒子とどのように接触し成長するのかについて明らかにするため、光を透過する物質を用いて障害物を構築することで、根毛と障害物との接触を顕微鏡下で観察することに成功した。今後、根毛を介した水分や養分の効率的な吸収の仕組み解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Root hairs in plants facilitate to absorb water and nutrients from soils. Morphology and growth of root hairs have been analyzed with plants conventionally grown on solidified media or in liquid media where root hairs can grow without space limitation. However, soils are filled with the particles like sands and silt, which could restrict root hair growth. To get insight into the root hairs growth in soils, we have established an imaging system to observe the contact between growing root hairs and obstacles. By this system, we revealed the dynamics in the root hair cells contacting with obstacles.

研究分野：植物分子細胞生物学

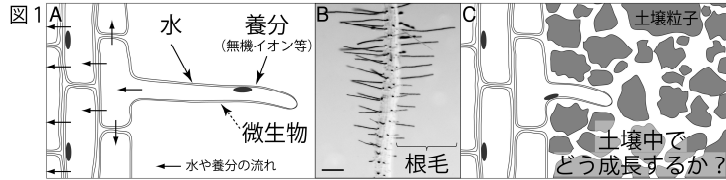
キーワード：根毛 土壌粒子 マイクロ流路 接触応答 機械刺激 脂質 キナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が細胞壁に囲まれる植物では、個々の細胞の伸長、特に方向性のある伸長が個体レベルの生長に大きく影響する。そのような植物細胞の伸長機構を理解するため、花粉管および根毛が代表的なモデル細胞として研究されてきた。いずれも1細胞から成り、シロイヌナズナでは直径10 μm程の管状構造を形成し、その長さは数百 μmから1 mm程度にも及ぶ。

根毛は、根の表皮上に生じた毛状組織であり、その形成は根の表面積を大きく増加させる。これにより根毛は、土壌からの水分や養分の効率的な取り込みや、土壌微生物との相互作用に寄与するとされる (Hofer, 1991; 図1A)。根毛の形態観察は容易であり、また根毛は培地等を用いた実験条件下では植物体の生育に必須ではない。このため、根毛の発生や形態に異常を示す変異体が多数単離され、根毛の発生や成長に関わる因子群が同定されている。



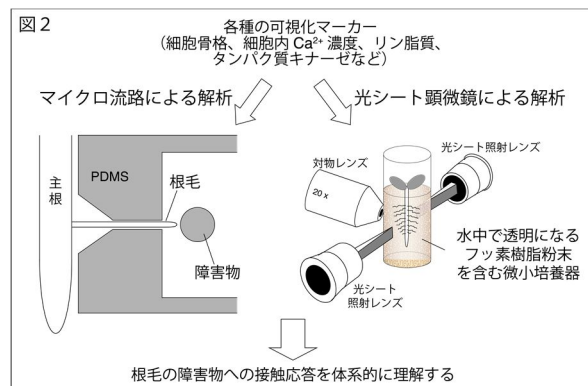
一般的に、根毛の形態や成長に関する解析は、寒天培地上あるいは液体培地内で生育させた植物体を用いて行なわれる。そのような条件下では、根毛は根表面から真っ直ぐに成長する(図1B)。しかしながら、根毛が本来働く土壌環境は、そのような直線的な伸長の障害となる土壌粒子などで満たされている(図1C)。では、根毛はこのような障害物に溢れた土壌環境で、どのように成長しているのだろうか。この命題は、根毛の本質を問うものであるにも関わらず、取り組まれた例は殆どなく、多くの文献で描かれる土壌中の根毛の姿は推測の域を出ないものである。これまで取り組まれて来なかった理由として、根毛が土壌中において成長する様子を観察することが、技術的に極めて困難であることが第一に挙げられる。

2. 研究の目的

これまで行われてきた多く研究では、障害物のない環境で根毛の先端成長が如何に確立され維持されるのかに着目が置かれてきた。本研究では、土壌中のような障害物が存在する環境における根毛の成長様式を明らかにするため、その観察系を確立し、それを用いて障害物との接触において根毛の細胞内において生じる変化を解析し、根毛の障害物への接触応答機構を体系的に理解することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 土壌は殆ど可視光を透過しないため、根毛が土壌内の障害物と接触する様子を細胞レベルで観察することは困難である。そこで本研究では、土壌粒子環境を光透過物質で模倣した観察系を構築し、顕微鏡観察を可能にすることにした。ミクロンレベルの高精細な立体構造を構築可能なシリコーンゴム素材ポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いて、カバーガラス上に根毛が成長するマイクロ流路と、その内部に任意の形状をもつ障害物の設計・構築を考えた。また、より自然環境に近い条件で根毛の成長を評価するため、植物体を垂直に生育させたまま高速で3D観察が可能な光シート顕微鏡(Lightsheet Z1, Zeiss)を用いる系の構築を目指した。光を透過させるため、水とほぼ同等の屈折率をもつフッ素樹脂FEPおよびNafionの微粉末を用いて土壌粒子環境の構築を試みた。なお、水の屈折率は1.31、FEP及びNafionは1.34である(参考までにPDMSは1.41であるとされる)。



(2) これらの系において、細胞内の現象を可視化する各種のマーカースystemを用いて、接触時に起こる細胞内の変化を解析する事とした。

(3) 根毛の接触応答に関わる因子の同定を生化学的手法により行った。

4. 研究成果

(1) マイクロ流路を用いることで根毛を成長させながら、蛍光観察を含めた顕微鏡観察が可能であることが近年示された(Yanagisawaら, 2017)。これを参考に、マイクロ流路内に任意の障害物を設計・構築し、成長する根毛と障害物との接触を観察することに成功した。円形の障害物との接触を例にとると、根毛は接触がない場合は直線的に細胞を伸長させたが、根毛は障害物と接触した後しばらくは障害物の表面に沿って成長した。そのような成長ののち、根毛は障害物の表面から接線方向に離れ、その後は再び直線的な成長を続けることが明らかになった。様々な大きさの円形障害物との接触試験を行ったが、接線方向に離れる条件を明らかにするまでには至らなかった。根毛は土壌との接触面積を増やすことで水分や養分の効率的な吸収

を担っていると考えられている。根毛が障害物の表面に沿って成長したことは、根毛の細胞表面と障害物の表面が密着していることを示唆し、土壌内では根毛と土壌粒子が密着し、接触面積を増加させていると考える。これは、根毛が土壌との接触面の増加を担うと言う従来の考えをさらに強く支持するものと言える。一方で、なぜ根毛が障害物と接触し続けようとしなないのかについて明確な回答は得られていないが、近くの土壌粒子からより多くのリソースを獲得する事と、根毛を長く伸長させてより遠くのリソースを獲得する事とのトレードオフがあるのではないかと推測される。時間的スケール(分単位)から、根毛1細胞内でその判断がなされている可能性が高く、その情報処理機構は非常に興味深い。今後の研究課題として、研究を進めている。

先行研究より、水に屈折率の近いフッ素樹脂である Nafion を使用した transparent soil (透明な土) 中で根の観察が報告されている (Downie ら, 2012)。Nafion を土壌粒子と近い粒子径に加工・化学処理したものを使用することで、土壌環境を再現しながらも顕微鏡観察が可能である。本研究では、さらに水に屈折率の近いフッ素樹脂 FEP を加え 2 種類の樹脂を検討した。まず凍結破砕法による FEP の粒子化を試みたが、適度な大きさに粒子化することは叶わなかった。また FEP は親水性が低く、水溶液中での凝集が予想されたため、FEP を検討から除外した。続いて、前例のある Nafion を粒子化したものを用いて実験を行った。光シート顕微鏡での観察には、屈折率の同等な液体で粒子間隙を充填し、透明化を行う必要がある。先行研究ではソルビトール等が充填材として用いられているが、成長変化の追跡のような長期観察を目的としたものではなく、充填材が植物の生育に影響を与える事がわかった。本研究では、根毛の成長変化を観察する為、長時間暴露しても成長に著しい影響を与えない充填材の選択が必要である。一般的に、屈折率を上昇させるためには溶質濃度を高めれば良いが、同時に浸透圧が上昇するため、浸透圧ストレスにより植物の生育に著しい影響が生じる。探索を行った結果、やや根の成長に影響がみられたが、デキストリンの一種であり低い浸透圧を示すクラスターデキストリン (江崎グリコ社) を屈折率調整材の候補として得た。今後、光シート顕微鏡と transparent soil を用いた観察系による、根毛の経時観察を試みる予定である。

(2) 上述の(1)で確立したマイクロ流路系を用いて、障害物との接触時における根毛の細胞内変化に関する解析を行った。これまで、根毛特異的な発現を示すタンパク質キナーゼが根毛の伸長制御に関わることを見出している。このキナーゼの細胞内局在と根毛の伸長方向との間には相関が見られるため、障害物との接触時においても同様の関係が成り立つかを調べた。興味深いことに、このキナーゼは、根毛が障害物と接触すると数分以内に接触面の細胞膜へと蓄積した。このキナーゼの細胞膜への局在には 2 種のリン脂質が関与することをこれまで明らかにしている。そこで、これらのリン脂質がキナーゼと同様の動態を示すかを、リン脂質の細胞内分布を解析するバイオセンサーを用いて調べた。その結果、これら 2 種のリン脂質もキナーゼ同様に数分以内に障害物との接触面に蓄積した。この事は、キナーゼの接触面細胞膜への局在には、これらの 2 種のリン脂質が関与することを強く示し、非接触時には細胞内で異なる蓄積パターンを示すこれらのリン脂質が協調して、キナーゼの局在部位を規定することが示された。また、接触のような機械刺激による細胞内へのカルシウム流入の誘導が広く生物にみられるため、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化をモニターするマーカー系統の解析を同様に行った。しかしながら、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化とキナーゼの局在との間に明確な関係性は見出せなかった。以上のことは、障害物との接触に反応したキナーゼの局在変化に関与するリン脂質の分布は、 Ca^{2+} 濃度変化とは直接関係のない経路を介して調節されることが示唆する。今後これがどのような分子機構に依るかを明らかにすることは、植物における機械刺激反応の理解に繋がると考える。

(3) 障害物との接触における根毛の成長機構を分子的に明らかにするため、前述のタンパク質キナーゼの下流因子を明らかにする必要がある。そこで、その同定を生化学的手法により進めた。タンパク質キナーゼの過剰発現は根毛の形態異常を引き起こすが、それと類似した根毛表現型を示す既知の変異体に着目し、それらの原因遺伝子コードするタンパク質、さらに根毛成長に重要なタンパク質を大腸菌において合成し、精製した。これらの精製タンパク質がタンパク質キナーゼによりリン酸化を受けるかを、*in vitro* リン酸化実験により調べた。これまで 33 因子について解析を行った結果、驚く事にその内の 10 因子がキナーゼにより *in vitro* でリン酸化を受けることを見出した。また、これらのタンパク質におけるリン酸化部位の大部分を決定することに成功した。これらのリン酸化が根毛の成長に果たす役割の解析を現在進めている。

根毛と土壌粒子との接触は、陸上植物による水分や養分の効率的な獲得の根底にあると考えられ、その仕組みを明らかにすることで、生物学的に新たな知見を与えるだけでなく、効率的な農作物栽培法や施肥法の確立にも貢献できると期待している。

<参考文献>

Hofer R-M (1991) Root hairs. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (Eds) Plant roots the hidden half. Marcel Dekker, New York, pp 129-148.

Yanagisawa ら, (2017) Capability of tip-growing plant cells to penetrate into extremely

narrow gaps, *Sci Rep* 7:1403.

Downie B , (2012) Transparent Soil for Imaging the Rhizosphere. *PLoS One* 7(9):e44276.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mergner, J., Frejno, M., List, M., Papacek, M., Chen, X., Chaudhary, A., Samaras, P., Richter, S., Shikata, H., et al.	4. 巻 579
2. 論文標題 Mass-spectrometry-based draft of the Arabidopsis proteome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 409-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-2094-2	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 四方 明格, 佐藤 良勝, Claus Schwechheimer
2. 発表標題 染色や薬剤処理に適した簡便なシロイヌナズナ根および根毛のライブイメージング系の構築
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四方明格、柳沢直樹、佐藤良勝、東山哲也、Claus Schwechheimer
2. 発表標題 根毛の伸長方向制御機構の解析：障害物との接触における根毛の成長ダイナミクス
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四方 明格
2. 発表標題 成長中のシロイヌナズナ根毛における細胞内動態の解析
3. 学会等名 植物細胞骨格研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四方 明格
2. 発表標題 シロイヌナズナ根毛の成長ダイナミクスの解析
3. 学会等名 新学術領域研究「植物多能性幹細胞」若手の会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四方 明格
2. 発表標題 水分・栄養吸収を担う植物の根毛は土壌中でどのように成長するか？
3. 学会等名 東京理科大学大学院理工学研究科農理工学際連携コース研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shikata. H.
2. 発表標題 Live-imaging of Arabidopsis roots and root hairs by a tiny hydroponic system.
3. 学会等名 International Meeting for Young Researchers “Frontiers in Imaging Probes and Technologies”（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 四方 明格
2. 発表標題 根毛において極性局在するAGCキナーゼによる細胞伸長調節
3. 学会等名 第8回エンドメンブレンミーティング（JANPER2019）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shikata, H., Yanagisawa, N., Sato, Y., Higashiyama, H., Schwechheimer, C.
2. 発表標題 Distribution of two phospholipids specifies a dynamic plasma membrane domain for re-orientation of root hair tip growth.
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://researchmap.jp/hiromasa_shikata/

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