

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03248

研究課題名(和文) 根の成長を最適化する根冠組織の特異的機能とその時空間統御

研究課題名(英文) Spatio-Temporal Regulation of Root Cap-specific Functions that Optimizes Root Growth

研究代表者

中島 敬二 (Nakajima, Keiji)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：80273853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：根の成長における根冠組織の機能とその発現機構の解明に取り組んだ。まず重力に従って下向きに成長する根の先端を自動的に追尾できる顕微鏡システムを構築した。これを用いた観察により、根冠の外側の細胞層で位置に応じた細胞内構造の転換が迅速に進行していることが見出された。また根冠の最外層で活性化するオートファジーが、細胞内構造の再編成と細胞の剥離に寄与していることを見出した。さらに根冠の最外層でグルコシノレートの生合成酵素や抗菌物質への転換を担う酵素の遺伝子群が発現し、これらの機能が根全体の病原性糸状菌への抵抗性に重要な役割を果たすことを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根冠は成長する根の最前線に位置する組織であり、根端の分裂組織を保護するほか、重力感受や代謝産物の分泌を介したミネラル吸収の促進、土壤微生物による病害への抵抗性など、植物の成長や生産力の維持に重要な役割を果たしている。根冠細胞の機能転換や細胞剥離を制御する仕組みの一端を解明した本研究成果は、植物の生産力の向上や土壤環境の改善につながる社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：We conducted research to investigate the specific functions of the root cap and their underlying mechanisms in root growth. First, we constructed a microscope system that can automatically track the tip of growing Arabidopsis roots. Using this microscope, we revealed that the root cap cells rapidly change their functions and subcellular structures according to their position in the tissue. We also found that autophagy is activated in the outermost root cap layer to reorganize their subcellular structures and the cell detachment process. We further revealed that the outer root cap cells express genes encoding enzymes for glucosinolate biosynthesis and their activation to produce antimicrobial substances, and thereby play an important role in the resistance of the entire root to pathogenic fungi.

研究分野：植物発生学

キーワード：根冠 細胞剥離 シロイヌナズナ 根 周期性 オルガネラ 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

根冠は根の先端を覆う層状の組織であり、発生动態と生理機能の2つの側面において興味深い特性と機能を持つ。発生学的な視点において、まず根冠は中央部のコルメラ細胞と、周縁部の側部根冠細胞という系譜の異なる2種類の細胞から成っている(図1)。これらは同調的に根冠組織を形成するが、それぞれに一定の機能分化を起こしており、コルメラが重力感受や代謝物分泌の主要な場となっているのに対し、側部根冠は土壌微生物との相互作用やオーキシン輸送に機能している。また根冠細胞を特徴づける最も大きな特性は、構成細胞群の恒常的なターンオーバーである(図1)。根端に位置する根冠組織は、常に土壌との生理的・機械的刺激に曝されダメージを受ける。従って根冠の活性を維持し続けるためには細胞自体を入れ替える必要があり、植物はこれを「根冠内側からの細胞供給」と「根冠最外層からの細胞除去」のバランスをとることで達成している。この細胞動態はちょうど人間の皮膚に類似しているが、根冠最外層からの細胞除去は生きた細胞の自発的な剥離による点で非常にユニークである。一方で根冠の剥離には側部根冠細胞の局所的なプログラム細胞死も関与することが分かっており、プログラム細胞死と生細胞の細胞壁分解の連携、および生きた細胞層を効果的に剥離するための細胞の適切な変形が、時空間的に高度に統御されていることが示唆される。

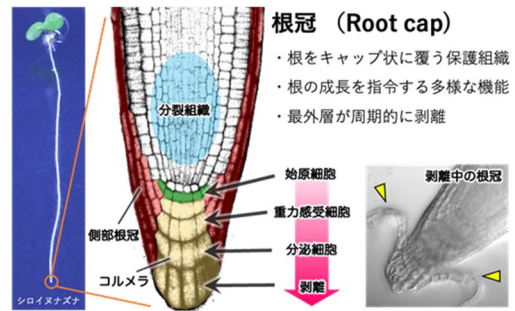


図1 シロイヌナズナの根冠発生

生理的な視点で興味深いのは、根冠が根の成長を最適化する多面的かつユニークな機能を有していることである(図2)。まず「剥離した生細胞」の土壌への分散が、細胞内容物の放出を通じて根圏環境の調節に寄与しているという仮説が古くから提唱されている。我々の解析結果は、剥離前のコルメラ最外層において、分泌経路が大きく転換されることを示しており、剥離した生細胞のみならず、剥離前の最外層細胞がその分泌機能を通じて根圏環境に何らかの働きかけを行っていることが示唆される。またコルメラの中央層は、デンプン顆粒を蓄積した巨大なアミロプラストを分化させ、これを重力平衡石とすることで根の重力感受細胞として機能する。

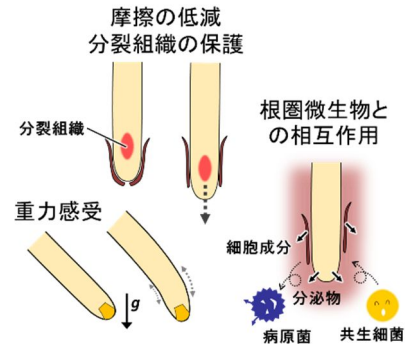


図2 根冠の生理機能

このような根冠の発生特性と生理機能は、根のみならず植物個体全体の成長に重要な意味を持つにもかかわらず、その発現機構の大部分は未解明である。根冠細胞は常にターンオーバーするため、その分化や機能発現の解析には時間的視点を加味した観察が必要であるが、根端の位置は根の伸長に伴って変化するため、これまで長時間のタイムラプス観察が困難であった。

2. 研究の目的

本研究課題では組織内の位置に応じた根冠細胞の機能分化をライブイメージングと分子遺伝学的手法を用いて解析した。根冠は根の先端部に存在し、土壌の生物的・非生物的环境情報を基に根全体の伸長速度や成長ベクトルを決定し、根系全体の構造をも決定する発生統御の中核である。このような重要かつ多角的な機能を持つにも関わらず、根冠細胞がその機能を発現させるメカニズムに関する知見は非常に乏しい。これまで研究代表者らは、根冠分化のマスター制御因子である3つのNAC転写因子、SOMBRERO (SMB), BEARSKIN1 (BRN1), BRN2を起点として根冠機能の発現機構を研究して来た(図3)。これらの転写因子が制御する多数の実働遺伝子を、比較トランスクリプトームとゲノムワイドなクロマチン免疫沈降により同定している。同定した実働遺伝子群の発現解析と機能解析を順次進めており、これまでに根冠細胞の外層で特異的に発現するBRN1とBRN2(BRN1/2)がペクチン分解酵素をコードするRCPG遺伝子の発現を時空間的に制御し、これにより最外層の細胞のみが層状に剥離することを明らかにしている(Kamiya et al. *Development*, 2016)。以上の状況を踏まえ、本研究課題では、研究代表者らが持つリソースとライブイメージング技術を組み合わせ、これまで未開拓であった根冠機能の発現メカニズムを、遺伝子と分子のレベルで解明することを目指した。

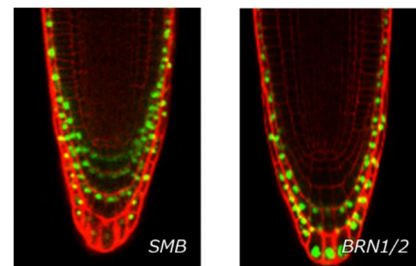


図3 根冠分化制御因子 SMB と BRN1/2 の発現

3. 研究の方法

根冠が持つユニークな特性と生理機能のうち、特に重要かつ未解明の課題である、(1) 組織内の位置に応じて根冠細胞が機能を転換させる機構と、(2) 根冠が発動する病害抵抗性の発現機構の2つをターゲットとして研究を行った。

(1) 組織内の位置に応じて根冠細胞が機能を転換させる機構

根冠分化の鍵制御因子とされる SMB, BRN1, BRN2 の3つの NAC 転写因子は、根冠分化に冗長的にはたらくと考えられてきたが、我々の詳細な発現解析と変異体の表現型解析、及びプロモータースワップ実験により、SMB と BRN1/2 の機能が明確に分化していることが明らかとなっている。SMB は分化した根冠全域で発現し、側部根冠のプログラム細胞死を促進することで根冠の剥離開始を制御する。また始原細胞の分裂を間接的に抑制することで、根冠への細胞供給速度を調整している。これに対し、BRN1/2 は根冠外側の 1-2 層で特異的に発現し、これらの細胞の機能や生細胞の剥離を冗長的に調節している。また、BRN1/2 の発現は一部 SMB に依存するものの、最外層の発現特異性は未知の機構で制御されていると考えられる。そこで *smb* 変異体背景で *BRN1-GFP* レポーターを発現するラインを変異原処理し、これらの中から *BRN1-GFP* レポーターの発現パターンが変化した変異体を単離した。これらの変異体の原因遺伝子の探索を通じて、根冠最外層を規定する制御系を明らかにすることを試みた。

さらに組織中の位置に応じた根冠細胞の分化過程を細胞構造や細胞内構造のレベルで明らかにするため、重力方向に従って下方に伸長するの根の先端を自動追尾できる共焦点顕微鏡「水平光軸型動体トラッキング顕微鏡」を開発した。この顕微鏡を用いたライブイメージングに、オートファジー関連因子の変異体やレポーターラインを組み合わせた解析を行った。

(2) 根冠が発動する病害抵抗性の発現機構

根端から剥離し土壤中に分散された生きた根冠細胞は、根と土壌の境界領域を形成することから border cell と呼ばれ、根圏環境との相互作用を担うと考えられている。実際に根冠細胞が病原性微生物の繁殖抑制に機能するという論文が報告されているが、この病原微生物の受容機構や、抵抗性発現の分子実体は不明である。我々は、根冠分化を促進する NAC 転写因子が多くの二次代謝酵素遺伝子を根冠特異的に制御することを見出しており、これらの代謝酵素遺伝子が根冠による病害抵抗性の発動に何らかの関与を果たしていることが考えられた。そこでこれらの遺伝子がコードするタンパク質の発現動態や、当該遺伝子の変異体の表現型解析から、根冠が発動する病害抵抗性の分子機構を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1) 組織内の位置に応じて根冠細胞が機能を転換させる機構

まず顕微鏡システムの構築を行った。シロイヌナズナの根は、1 時間に約 0.2~ 0.4 mm の速度で重力に従って下方へ成長する。このような根の成長を自然な状態で観察するため、顕微鏡全体を 90 度横に倒して架台に固定し、観察ステージに植物体を垂直に置くことができるようにした。さらに根の伸長に伴って移動する根端を自動的に追尾する機能を導入した。「水平光軸型動体トラッキング顕微鏡」と名付けたこのシステムにより、根冠細胞やその内部の変化を、最大で 5 日間に渡って経時的に観察することが可能となった。

この顕微鏡システムを用い、コルメラ細胞が重力感受細胞から分泌細胞へと変化し、その後剥離に至る過程を詳細に観察した。その結果、最も外側の層が剥離すると、内側に接していた次の細胞層でアミロプラストが縮小するとともに、液胞が急拡大して細胞体積のほぼ全体を占めるようになり、その直後に細胞の剥離が起こることが明らかとなった(図4左)。このことから、根冠の外側の細胞層では位置に応じた細胞機能の転換が迅速に進行し、この過程が後の細胞剥離と連動していることが明らかとなった。

さらに、コルメラ細胞の急激な液胞化には、細胞内の自己消化機構であるオートファジーが関わることが示唆された。オートファジーは進化的に保存された真核細胞の自己消化システムであり、細胞質成分やオルガネラを小胞に取り込んで液胞に輸送し分解することで、栄養分の再利用や細胞の恒常性を維持する。この仮説を検証するため、まずオートファジーで中心的に働くタンパク質(ATG8a タンパク質)を GFP (緑色蛍光タンパク質) で可視化できる植物体を使い、根冠におけるオートファジー活性の状態を調べた。その結果、ATG8a は、通常時は細胞質に局在し、オートファジーが活性化すると、オートフ

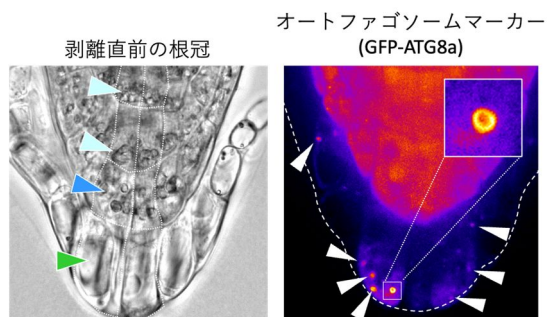


図4 位置に応じたコルメラ細胞の細胞内構造の変化(左)。根冠最外層特異的に形成されたオートファゴソーム

ァゴソームと呼ばれる小胞に局在することを見出した。また、細胞層の剥離に先立って根冠の最外層で特異的にオートファゴソームが形成されることを確認した(図4右)。

次に、オートファジーを制御する *ATG5* 遺伝子を欠損する変異体(*atg5-1*)を観察した。その結果、*atg5-1* 変異体の根冠では、野生型の根冠で見られる細胞質の縮小や液胞化などの細胞内構造の再構成が抑制されることを見出した。興味深いことに、*atg5-1*

変異体では根冠細胞間の接着が過剰に緩んでおり、野生型で見られるような層状の剥離(図5上段)ではなく、個々の細胞がバラバラに脱離していた(図5下段)。これらの結果から、オートファジーが根冠最外層の機能転換や剥離の準備期に特異的に活性化するようプログラムされていること、また、オートファジーの活性化により、根冠細胞の内部構造の再編成や、それに続く精密な剥離が制御されていることが明らかとなった。

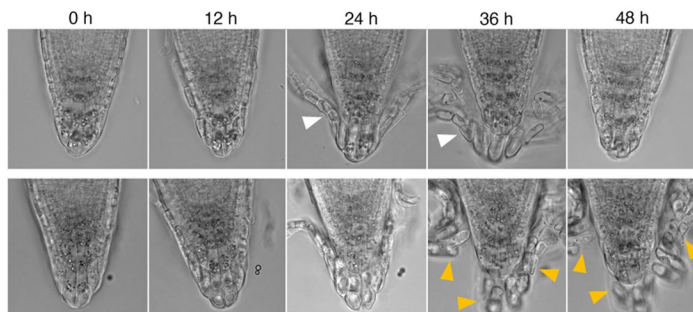


図5 野生型(上段)および *atg5-1* 変異体(下段)における根冠最外層の剥離。野生型の根冠最外層が層状に剥離する(白色矢頭)のに対し、*atg5-1* 変異体の根冠最外層細胞はバラバラに剥離する。

(2) 根冠が発動する病害抵抗性の発現機構

BRN1/2の標的遺伝子中にアブラナ科特異的な二次代謝産物であるインドールグルコシノレートの合成酵素遺伝子群や、それらの加水分解を介して抗菌性物質を生成するミロシナーゼをコードする遺伝子群が存在する(Kamiya et al., *Development* 2016)。この知見と一致し、NAC転写因子の機能欠損変異体において病原性糸状菌の感染が野生型よりも亢進することを示唆する結果が得られた。興味深いことに、この抵抗性は根冠が存在する根端領域のみならず、根の基部側にまで広がっていたことから、根冠の機能が根全体の病害抵抗性に重要な役割を果たすことが示唆された。

次に根における微生物認識の分子機構の解明を進め、下流現象の分子実体の解読に繋げることを試みた。その結果、病原性糸状菌の細胞壁生物であるキチンを認識する受容体LYK5が根冠細胞に特異的に発現していることを見出した。さらに、その共受容体であるCERK1の発現解析から、LYK5-CERK1共受容体が根冠細胞で特異に構築されていることを見出した。さらにキチン処理により、この系路の機能を確認したところ、キチン単独では、防御二次代謝経路の酵素遺伝子の発現誘導には不十分であることが明らかとなった。この結果は、糸状菌の認識において、キチンとは独立した経路が機能することを示唆していた。病原性糸状菌は、植物細胞への感染に際して細胞壁分解酵素を分泌し、植物の細胞壁を分解する。この過程で産生されたセルビオースなどの細胞壁分解産物が植物細胞により認識される。そこで糸状菌細胞壁成分のキチンと、植物細胞壁の分解産物のセルビオースについて、防御二次代謝酵素遺伝子の発現誘導を調べた結果、キチンとセルビオースの同時添加においてのみ、根冠細胞で酵素遺伝子の発現が誘導されること、また、このキチンとセルビオースの相乗的な効果が、LYK5-CERK1の機能に依存することが見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Goh Tatsuaki, Sakamoto Kaoru, Wang Pengfei, Kozono Saki, Ueno Koki, Miyashima Shunsuke, Toyokura Koichi, Fukaki Hidehiro, Kang Byung-Ho, Nakajima Keiji	4. 巻 149
2. 論文標題 Autophagy promotes organelle clearance and organized cell separation of living root cap cells in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev200593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujiwara Motohiro, Goh Tatsuaki, Tsugawa Satoru, Nakajima Keiji, Fukaki Hidehiro, Fujimoto Koichi	4. 巻 148
2. 論文標題 Tissue growth constrains root organ outlines into an isometrically scalable shape	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev196253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.196253	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 中島敬二	4. 巻 54
2. 論文標題 根冠組織の発生と生理機能の制御機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 119-128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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17件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Miyashima Shunsuke, Tatsuaki Goh, Keiji Nakajima
2. 発表標題 Tissue placement and cell-fate transition of the Arabidopsis root cap by positional information
3. 学会等名 EMBO Workshop: Intercellular communication and plasmodesmata in plant development and disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島敬二、射水勝利、大城翔平、米倉崇晃、田中慧太、近藤洋平、宮島俊介、郷達明
2. 発表標題 細胞の周期動態とその変調が駆動する根の自在な成長
3. 学会等名 日本植物学会 第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩井雅斗、宮島俊介、中島敬二
2. 発表標題 シロイヌナズナの根におけるキチン応答の組織特異性とその病害抵抗性における機能
3. 学会等名 日本植物学会 第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 郷達明, 坂本薫, Pengfei Wang, Byung-Ho Kang, 中島敬二
2. 発表標題 シロイヌナズナの根冠剥離における細胞層特異的なオートファジーの役割
3. 学会等名 日本植物生理学会 第63回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮島俊介、晝間敬、中島敬二
2. 発表標題 根冠が発動する根の病害応答
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 郷達明、阪本薫、中島敬二
2. 発表標題 細胞層特異的なオートファジーによる根冠剥離の制御
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島敬二、射水勝利、阪本薫、相馬優輝、大伏仙泰、米倉崇晃、富沢揺子、近藤洋平、稲見昌彦、宮島俊介、郷達明
2. 発表標題 細胞の立ち居振舞いから解く植物の自在な成長
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮島俊介、中島敬二
2. 発表標題 土壌微生物の動態を制御する根冠の細胞形態形成と防御機構との統御系
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 郷達明、阪本薫、中島敬二
2. 発表標題 根冠最外層の成熟と剥離におけるオートファジーの役割
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島敬二、阪本薫、飯田誠也、小堤彩水、松田隆、上野皓輝、小園紗希、安藤隆之介、古川明日香、神谷雅子、宮島俊介、郷達明
2. 発表標題 シロイヌナズナの根冠分化における非対称性と非連続性の表出機構
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunsuke Miyashima, Kei Hiruma, Keiji Nakajima
2. 発表標題 Root cap morphogenesis and function in the immune system
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuaki Goh, Kaoru Sakamoto, Shunsuke Miyashima, Keiji Nakajima
2. 発表標題 Periodic cellular behaviors during root cap maturation and detachment
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>土壌環境のセンサー機能を担う根冠組織の発生と分化制御 https://bsw3.naist.jp/nakajima/project/project5.html 根の先端の細胞がスムーズに剥がれ落ちる仕組みを解明 - オートファジーが細胞を作り変えていた - https://bsw3.naist.jp/research/index.php?id=2520</p>

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
研究 分担者	宮島 俊介 (Miyashima Shunsuke) (20727169)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

	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
研究 協力者	郷 達明 (Goh Tatsuki)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
中国	The Chinese University of Hong Kong		