

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03251

研究課題名(和文) VLCFAを新しいシグナル分子として利用する植物側根形成メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of lateral root development controlled by VLCFA

研究代表者

塚越 啓央 (Tsukagoshi, Hironaka)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：30594056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：側根形成を細胞の脱分化から再分化への変換を捉えるモデルとして、極長鎖脂肪酸(VLCFA)をシグナル分子として利用する新たな細胞分化の分子メカニズムの存在を明らかにすることを本研究の目的とした。本研究では特にVLCFA量が低下した変異体を用いたRNAseq発現解析から、VLCFA特異的に発現変動を示す転写因子VRTF1を同定し、その機能解析を進めた。詳細な表現型解析から、VRTF1が側根発達の後期に関わり、側根原基そのものではなく、側根原基上部の主根細胞で細胞壁リモデリング遺伝子の発現調節を行い、側根の主根からの出現をコントロールしていることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、植物の側根発達に植物ホルモンとは異なる新たな制御系が関わることを示すことができた。これまで、細胞膜やクチクラの構成成分と言われていた極長鎖脂肪酸(VLCFA)が、転写因子の発現を制御することで側根発達をコントロールしているという新たな発見に繋がった。側根発達は植物の根圏拡大において非常に重要なイベントで、これを植物ホルモンとは異なる制御系でコントロールできる基盤技術の開発につながるという。

研究成果の概要(英文)：Using lateral root development as a model to understand the transition from cellular dedifferentiation to differentiation, the goal of this study was to elucidate the existence of a new molecular mechanism of cell differentiation that utilizes very long-chain fatty acids (VLCFA) as a signaling molecule.

In this study, we identified VRTF1, a transcription factor that exhibits VLCFA-specific expression changes, based on RNAseq analysis using mutants with reduced VLCFA levels, and proceeded with its functional analysis.

Detailed phenotypic analysis revealed that VRTF1 is involved in the late stage of lateral root development and regulates the expression of cell wall remodeling genes in the main root cell above the lateral root primordium, rather than in the lateral root primordium itself, thereby controlling the emergence of lateral roots from the main root.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：側根発達 転写ネットワーク イメージング VLCFA

1. 研究開始当初の背景

植物は主根から側生器官である側根を新たに発生させ、生育に十分な根圏を形づくる。側根の原基は根の内側の内鞘で細胞の脱分化が起き、ついで再分化過程をへて側根が出現する。植物の側根形成メカニズムを明らかにすることは、根圏形成を知るだけでなく、脱分化から再分化への変遷プログラムの解明という個体再生の重要な知見を得ることに繋がる。側根形成にはオーキシンによる制御系が数多く報告されている。しかし、オーキシンとある程度独立して、活性酸素種 (ROS) が側根形成に関わることも報告され、ROS シグナル下流で働く分子も側根形成に重要であると考えられている。さらに申請者が報告した、ROS 応答性転写因子 MYB30(文献 1)の標的遺伝子である Lipid Transfer Protein with GPI Anchor1 と 2 (LTPG1 と LTPG2)は側根原基で特異的な発現を示し、それらの変異株では側根数が減少していた。LTPG は地上部の WAX 原料となる極長鎖脂肪酸(VLCFA)の細胞外輸送に関わるが、根での機能は不明である。しかし、VLCFA 合成酵素の変異株では根からのカルス形成や側根数に異常を示すと報告されている(文献 2)。これに関連し、VLCFA の合成阻害剤であるカフェンストロール処理は側根数を減少させ、カフェンストロールと炭素鎖数 20 の VLCFA アラキジン酸の共処理で、側根数が増加する結果を得た。以上のことから、VLCFA も側根形成に重要な役割を果たすと考えられる。また、概日時計に関わる鍵遺伝子群が側根原基のみで新たなリズムを刻み、オーキシンと連携しながら側根の発達を制御することも報告されている(文献 3)。この報告と関連して、我々が行った RNAseq 解析で、カフェンストロールとアラキジン酸を共処理した根では概日時計に関わる遺伝子群が有意な発現量変化をしめした。特に CCA1 と LHY は 8 倍以上発現量が上昇した。この RNAseq 解析ではオーキシンシグナルに関わる遺伝子群の発現には差異が見られず、概日時計関連遺伝子とともに 6 つの機能未知の転写因子がカフェンストロールもしくはアラキジン酸処理によって発現変動を示した。

2. 研究の目的

本研究は、側根形成を細胞の脱分化から再分化への変遷を捉えるモデルとし、VLCFA シグナルの(1)入力(LTPG の機能)、(2)伝達(概日時計関連遺伝子群への影響)、(3)出力(脱分化・再分化・分化のどのステージか)のそれぞれの分子メカニズムを解析する。そして、VLCFA をシグナルとする細胞分化のメカニズム全容を明らかにすることを本研究の目的とした。特に VLCFA はこれまで地上部の WAX の原料や細胞膜成分として物理的に重要な化合物と考えられていたが、我々の研究から VLCFA がシグナル分子として働くことが証明されると期待される。さらに VLCFA がシグナル分子として関わる側根発達は、我々の RNAseq 解析から、オーキシンシグナルとは異なる入力系であることが強く示唆されている。本研究結果より、新規の VLCFA シグナルによる新たな細胞分化メカニズムの存在が明らかにされることが期待される。

3. 研究の方法

分子遺伝学とイメージングを用いて、(1)入力(VLCFA の受容)、(2)伝達(シグナル伝達様式)、(3)出力(側根形成)まで段階に分け、それぞれの詳細を解析する。

(1) 入力(LTPG の機能)

LTPG タンパク質と脂肪酸の結合能・LTPG と相互作用するタンパク質・*ltpg* 変異株の VLCFA への応答様式の解析を行い LTPG が VLCFA を受容するかを明らかにする。

- LTPG タンパク質を in vitro で合成し、膜に固定した脂肪酸との結合を Protein-lipid overlay assayにより調べる。
- LTPG は細胞外に GPI アンカーにより係留されているため、細胞内へは他のタンパク質がシグナルを伝達すると考えられる。酵母ツーハイブリッド(Y2H)法によって相互作用するタンパク質を探索する。
- ltpg* 変異株・過剰発現株に外部から VLCFA を与え、タイムラプスイメージングを用い側根形成過程の時系列変化を追跡する。また、*ltpg* 変異株中での概日時計遺伝子群など、VLCFA 処理 RNAseq 解析から得られている遺伝子群への発現影響を qPCR 法で調査する。

(2) 伝達(概日時計関連遺伝子群への影響)

VLCFA 量を変化させ概日時計遺伝子の発現リズムの変化を LUC レポーターにより調べる。概日時計遺伝子と選抜遺伝子群との関連を発現解析によって調べる。

- 概日時計の鍵転写因子 *TOC1*、*CCA1* のリズムに VLCFA が関わるかを時計プロモーター LUC レポーターラインにより調べる。また、VLCFA 合成変異株中での時計遺伝子群のリズム変化を調

べることも重要であるので、時計 LUC レポーターラインを VLCFA 合成変異株に導入する。自動発光測定装置を用いてリアルタイムでリズム変化を調査する。

- (b) 概日時計変異株に VLCFA 処理を施し、側根形成に与える影響を調べる。同時に VLCFA 合成変異株中での概日時計遺伝子の発現を qPCR で調査する。

(3) 出力(脱分化・再分化・分化のどのステージか)

VLCFA 応答性遺伝子群の過剰発現株・遺伝子破壊株を用いた表現型・発現解析を行う。VLCFA 処理や変異株を用いた側根形成の継時変化をタイムラプスイメージングによる定量解析を行い、VLCFA シグナルの出力様式を決定する。同時に、原基の形や側根の各ステージ数を定量化する。

- (a) VLCFA 応答性遺伝子群の過剰発現株・遺伝子破壊株を作成し、側根ステージを定量化しそれら遺伝子が側根発達に与える影響を解析する。
- (b) 側根発達の解析をタイムラプスイメージングにより、連続的な定量解析が可能になるような解析システムを構築する。
- (c) VLCFA 応答性遺伝子群のプロモーターレポーターラインを作成し、それら遺伝子の時空間的発現様式を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 入力(LTPG の機能)

- (a) LTPG1 と LTPG2 の小胞体移行シグナル配列を欠失させたタンパク質を in vitro 系で合成し、Lipid Overlay assay を行ったところ、LTPG1, LTPG2 両タンパク質は炭素鎖数 20 以上の VLCFA と結合した。コントロールとして用いた C16 や C18 の飽和脂肪酸には結合を示さなかった。以上の結果から LTPG は VLCFA と特異的な結合を示すことがわかった。
- (b) LTPG とタンパク質相互作用を示す因子を探索するために Yeast Two Hybrid 法を試みたが、ベクター構築が期待通り進まなかった。そこで、公開遺伝子発現データベースから LTPG と共発現を示す、いくつかの候補遺伝子を絞り込み、シロイヌナズナプロトプラストを用いた一過的発現系を用いた BiFC 法を行った。膜タンパク質の一つが、プロトプラスト中で LTPG と弱いながら相互作用を示すことを明らかにした。現在はその遺伝子の遺伝子破壊株やプロモーターレポーターラインを作成し、LTPG との相互作用を in vivo でも解析を進めている。
- (c) *ltpg1* と *ltpg2* 遺伝子破壊株の側根発達をステージごとに詳細に解析した。その結果、*ltpg1*, *ltpg2* 変異株共に側根出現時の数が野生型株より顕著に減少することがわかった。この減少は LTPG1 と LTPG2 の Translational fusion によって相補された。以上の結果から LTPG が側根発達の後期ステージ、特に側根の出現に関わることが示された。*ltpg1* や *ltpg2* 変異株中では概日時計関連遺伝子群の発現レベルは野生型と同程度であり、この結果は LTPG による側根発達制御系は概日時計とは異なることを示唆している。

以上の結果から、LTPG は側根出現制御に関わることが示されたが、VLCFA を細胞膜上で受容して遺伝子発現変動を伴うシグナルを核に伝達しているかは明らかにできなかった。

LTPG がどのように側根出現に関わるかを調べるために、側根原基最外部に形成される Root Cap Cuticle(RCC)の形成を FY088 染色により調べた。興味深いことに LTPG1 と LTPG2 は RCC 形成能が野生型よりも顕著に低下しており、LTPG が RCC 形成をコントロールすることで側根出現に関わることが示唆された。また、*ltpg1* と *ltpg2* とともに GCMS 解析から VLCFA 量は野生型と同程度であり、LTPG による膜外への VLCFA 輸送が RCC 形成に必須であることがわかった。

(2) 伝達(概日時計関連遺伝子群への影響)

- (a) 概日時計の鍵転写因子 *TOC1* と *CCA1* のプロモーター-LUC レポーターラインに VLCFA 阻害剤処理を施し、その発現リズムを LUC 発光により定量した。両レポーターライン共に VLCFA 阻害剤処理により、有意に周期長が短くなった。さらに、VLCFA 合成酵素である *KCS1* 遺伝子の変異株に *pTOC1::LUC* と *pCCA1::LUC* を導入した植物を作成した。その植物を用いてそれぞれの LUC 発光を定量したところ、VLCFA 阻害剤処理と同様に、周期長が短くなることがわかった。さらに、この周期変動は VLCFA 処理によって元に戻ることもわかった。以上の結果から、VLCFA 量の低下は概日リズムを短周期化することを発見した。
- (b) 概日時計変異株の側根数を測定したところ、いくつかの概日時計変異株で側根の発達速度に影響が出ることがわかった。現在、詳細な解析を進めており、今後の解析から概日時計のどの時間帯に関わる因子が、側根発達に重要か明らかにできる。VLCFA 合成変異株 *kcs1* での概日時計遺伝子の発現を qPCR で解析したところ、LUC レポーターアッセイと同様に *TOC1* や *CCA1* の発現が野生型株と比べ変動していた。しかし、今回の解析では、時間分解能が低く、詳細な発現変動解析ができていない。今後は、サンプリングする時間数を増やし、時計遺伝子と VLCFA の量の変化が与える影響を詳細に解析する必要がある。

以上の結果から、VLCFA 量の変化が概日リズムに影響を与えることがわかった。そこで、VLCFA 量の低下が遺伝子発現に与える影響を網羅的に調べるために、*kcs1* 変異株を用いた RNAseq 解析を行っ

た。約 100 個の遺伝子が *kcs1* 変異株で野生型と比べ有意な発現変動を示した。Gene Ontology (GO) 解析を進めたところ、転写に関わる GO が有意に濃縮されており、実際に側根発達に関わるものが推定される数個の転写因子遺伝子が含まれていた。それら転写因子を VLCFA responsive transcription factor (VRTF) と名づけ、(3)の項目の研究に含めた。

(3) 出力(脱分化・再分化・分化のどのステージか)

- (a) 項目(2)で同定した VRTF の一つ、*VRTF1* 遺伝子の変異株並びにエストラジオール誘導過剰発現株を作成し、それら形質転換体の側根発達表現型を調べた。その結果 *vrtf1* 変異株ではステージ I と II の側根原基数が減少し、ステージ IV が有意に増加した。一方で、*VRTF1* 過剰発現株では側根が出現するステージであるステージ VI の数が有意に減少していた。以上の結果から、VRTF1 が側根の出現を制御している可能性が示唆された。この表現型は *kcs1* 変異株と類似しており、*kcs1* 変異により VLCFA 量が低下し、その結果 *VRTF1* の発現が上昇することと一致している。

VRTF1 の VLCFA 応答性を詳細に qPCR によって調べた。*VRTF1* の発現は *kcs1* 変異株中では、野生型株より 2 倍以上の発現を示しているが、そこに VLCFA 処理を施すと、野生型レベルまで発現が戻る。また、C18 処理では *VRTF1* の発現は高いまま維持されることから、*VRTF1* は VLCFA 特異的に発現応答を示すことがわかった。これまでに VLCFA 特異的に発現レベルが変化する転写因子遺伝子の報告はなく、本研究から VLCFA 応答性転写因子を同定することができた。*VRTF1* の VLCFA への応答性は比較的早く、*kcs1* 変異株に VLCFA 処理を施して 3 時間後にはその発現レベルは野生型株レベルまで戻ることも見出した。

VRTF1 の下流で働く遺伝子群を同定するため、*vrtf1* 変異株の側根発達部位のみから RNA を抽出し、RNAseq 解析を行った。*vrtf1* 変異株では 88 の遺伝子の発現が野生型株より有意に高かった。これら遺伝子の GO 解析を行ったところ、細胞壁合成に関わる GO が有意に濃縮された。この結果は VRTF1 が転写抑制因子であり、細胞壁合成関連遺伝子の発現を制御することで、側根の出現を調節している可能性を示唆している。

- (b) 側根発達の解析をタイムラプスイメージングにより、連続的な定量解析が可能になるような解析システムの構築を進めた。側根発達はステージ変化が連続的に起こり、ある一定の時間のみの静止画像を捉えるだけでは、発達速度の正確な定量が不可能である。そこで、側根発達をタイムラプスイメージングで捉え、その画像を用いた定量解析を進めた。側根ステージを機械学習で画像認証させるために約 4000 枚の画像を取得し機械学習を行った。同時に、人が認証した側根ステージ分類データと機械学習データを比較したところ、人の分類と同レベルで側根ステージを判別可能な機械学習を行うことができた。このシステムを用いて、*vrtf1* 変異株や *VRTF1* 誘導過剰発現株の側根発達を定量したところ、上記項目(a)と同様に *vrtf1* 変異株では全体的な側根発達速度が上昇し、*VRTF1* 過剰発現株では後期ステージへの移行が遅延していることを定量することができた。

- (c) *VRTF1* のプロモーターレポーターラインを作成し、時空間的発現様式を共焦点顕微鏡で調べた。*VRTF1* は側根原基に覆い被さっている主根側の細胞層に特異的な発現を示した。また、その発現は側根ステージの後期になるほど強くなった。上記項目(a)および(b)の結果と合わせて、VRTF1 が側根原基発達の後期に重要な役割を果たすことが示された。また、*vrtf1* を用いた RNAseq から選抜したいくつかの VRTF1 下流の細胞壁合成関連遺伝子のプロモーター GFP レポーターラインも作成し、その発現様式を調べた。その結果、これら遺伝子も *VRTF1* とよく似た細胞種で発現していた。*VRTF1* 誘導過剰発現株でこれら細胞壁合成関連遺伝子の発現は強く抑制されており、VRTF1 がこれらの遺伝子の発現を制御することで側根の出現をコントロールしていることが強く示唆された。

以上の結果から、我々は VLCFA に発現応答を示す転写因子 *VRTF1* を同定し、その下流で細胞壁合成系遺伝子群が働き側根の出現を制御することを見出した。これまでに、VLCFA 合成系遺伝子の^{上流で働く}転写因子の報告はあるが(文献 4、5)、*VRTF1* のように VLCFA レベルに発現を変化させる転写因子の報告はない。すなわち、VLCFA がシグナルとして働き、転写因子の発現を調節することで、側根発達を制御するという VLCFA のシグナル分子としての機能を明らかにすることができた。本研究過程において、*VRTF1* とは異なる転写因子遺伝子も複数見出しており、今後これらの転写因子の解析を進めることで VLCFA シグナル伝達経路の理解が深まることが期待される。また、本研究では機械学習を用いた側根ステージ判別システムの構築に成功している。本システムの汎用性は高く、今まで見落とされていた側根発達表現型を捉えることができる。今回の機械学習をさらに進化させ、側根発達全般をより詳細に自動認識できるシステム構築を進める予定である。

以上、研究項目(1),(2),(3)のそれぞれの研究結果から、本研究目的である VLCFA をシグナルとして利用する新たな側根発達制御系の分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。VLCFA は概日リズムの変調を起こすことはわかったが、まだその分子メカニズムを明らかにすることはできていない。今後は *VRTF* 遺伝子群の役割と共に、VLCFA シグナル中で働く概日リズムの役割についてさらなる研究を進めていく。

<引用文献>

- (1) Mabuchi et al., MYB30 links ROS signaling, root cell elongation, and plant immune responses. *PNAS*, **115**, 2018, E4710-E4719.
- (2) Shang et al., Very-long-chain fatty acids restrict regeneration capacity by confining pericycle competence for callus formation in *Arabidopsis*. *PNAS*, **113**, 2016, 5101-5106.
- (3) Voß et al., The circadian clock rephases during lateral root organ initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.*, **6**, 2015, 7641.
- (4) Trinh et al., PUCHI regulates very long chain fatty acid biosynthesis during lateral root and callus formation. *PNAS*, **116**, 2019, 14325-14330.
- (5) Lv et al., MPK14-mediated auxin signaling controls lateral root development via ERF13-regulated very-long-chain fatty acid biosynthesis. *Mol. Plant*, **14**, 2021, 285-297.

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kosuke Mase, Hironaka Tsukagoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Reactive Oxygen Species Link Gene Regulatory Networks During Arabidopsis Root Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 660274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.660274	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植村優太、木村早央里、太田智通、鈴木孝征、森上敦、塚越啓央
2. 発表標題 VLCFA応答性転写因子による根の成長制御メカニズム
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村早央里、前田明里、植村優太、太田智通、間瀬皓介、小嶺雄輝、鈴木孝征、森上敦、中道範人、塚越啓央
2. 発表標題 極長鎖脂肪酸(VLCFA)受容による概日リズム変動を介した側根発達メカニズムの解析
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	志水 元亨 (Shimizu Motoyuki) (20423535)	名城大学・農学部・准教授 (33919)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中道 範人 (Nakamichi Norihito)		
研究協力者	光田 展隆 (Mitsuda Nobutaka)		
研究協力者	鈴木 孝征 (Suzuki Takamasa)		

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