

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03286

研究課題名(和文) オーキシン極性輸送の成立に不可欠な新現象「PINクラスター」形成に関する研究

研究課題名(英文) Study of the mechanisms of PIN cluster formation, a crucial phenomenon in polar auxin transport

研究代表者

榎本 悟史 (Naramoto, Satoshi)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：30612022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,300,000円

研究成果の概要(和文)：体軸形成は、生物の形態形成を支える現象である。植物の体軸は、オーキシン排出担体PINの細胞における偏在によって規定される。PINの偏在化機構としては、PINが特定部位へ小胞輸送され続けるモデルが提唱されてきた。一方、私は、PINが細胞膜上で拡散や小胞輸送されない多量体様のクラスターを形成することを見出した。また、クラスター形成因子MAB4を同定した。そこで本研究では、PINとMAB4について詳細な解析を行った。その結果、(1)両者が相互作用すること、(2)クラスター形成がPINの偏在化に重要な役割を果たすこと、(3)PINのクラスター形成は、陸上植物間で保存されていること、などを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体軸形成は、生物の形態形成を支える現象のひとつである。植物では、オーキシンの極性輸送により体軸が形成されるが、その輸送方向は、オーキシン排出担体PINの細胞における偏在によって規定されている。そのため、本研究によりPINの局在化機構を解明することは、植物の形態形成を理解する上で重要である。とりわけ、植物の多様な形態がどのように進化してきたかを明らかにすることにも繋がることから、学術上極めて重要である。また、本研究により得られる知見は、オーキシンの流路制御などの方策をもたらしうることから、植物形態のデザイン化などの農業利用の方策の礎となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Body axis formation is a phenomenon that underlies morphogenesis in living organisms. The body axis of a plant is defined by the polar localization of the auxin efflux carrier PIN in the cell, and a model in which PIN is continuously transported in vesicles to a specific site has been proposed. On the other hand, I found that PIN forms multimeric clusters which do not undergo diffusion or endocytosis. I have also identified a MAB4 protein that is responsible for the formation of PIN clusters. In this study, I performed a detailed analysis of PIN and MAB4 proteins. I discovered that PIN and MAB4 can interact with each other. I also found that PIN clustering plays an important role in the polar localization of PIN. Finally, I also found that PIN cluster formation is conserved phenomenon among land plants.

研究分野：植物発生細胞生物学

キーワード：細胞極性 体軸 オーキシン PIN

1. 研究開始当初の背景

体軸形成は、生物の形態形成を支える現象のひとつである。植物では、オーキシンの極性輸送により体軸が形成されるが、その輸送方向は、オーキシン排出トランスポーターPINの細胞における偏在(以下、極性局在)によって規定されている。そのため、PINの局在化機構を解明することは、植物の形態形成を理解する上で、重要である。

これまでPINの局在化機構としては、「小胞輸送制御因子GNOMがPINをリサイクリングエンドソームから細胞膜特定部位へリサイクルする」というモデルが提唱されてきた。申請者を含む国内外のグループから、PINの小胞輸送に関わる因子が多数報告されるとともに、重力屈性などの環境応答時に、PINの局在が小胞輸送依存的に動的に変化することなどが見いだされ、このモデルは広く支持されてきた。

一方、申請者はGNOMに関して詳細な解析を行うことで、GNOMはこれまで報告されてきたリサイクリングエンドソームではなく、ゴルジ体と細胞膜に局在することを見出した。そして、従来のリサイクリングのモデルとは異なり、PINの局在化機構の要点はむしろ、細胞膜上の小胞輸送制御にあることを示唆する結果を得た。さらには、申請者は、Kleine-vehnらとの共同研究により、PINの極性局在の確立に必要なとされる因子について数理モデルを用いて検討することで、PINの極性局在は小胞輸送系だけでは成立せず、細胞膜において「PINの流動性を制限する機構」が必須であることを示唆する結果を得た。実際に、PINが細胞膜上で拡散しない多量体様のクラスター構造を形成することを見出すとともに、クラスター形成を制御する因子として、NPH3様タンパク質MAB4を同定した。これまでPINの局在機構の研究では、小胞輸送以外の機構については、あまり進展がみられてこなかったが、本発見から、小胞輸送とは異なる新しいPINの局在化機構が存在することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、PINの細胞膜上の流動性制御という、申請者が独自に見出した新奇のPINの局在制御機構について、分子レベルで理解をすすめることを目的とする。また、ゼニゴケなどの他植物種における本機構の存在を検証することで、オーキシン極性輸送の分子的普遍性と多様性について明らかにすることも目的とする。本研究は、小胞輸送機構を中心に据えたこれまでのPINの局在制御モデルを大きく書き換え、植物細胞の極性形成機構の新しいモデルを提示するものである。

3. 研究の方法

(1) PINは細胞膜上でクラスター構造を形成する。しかしながら、PINクラスターがどのような複合体を形成するのかについては明らかになっていない。これまでに、PINとMAB4の両者は細胞表面において、多量体様のクラスター構造を形成する。また、両者は表面微小管とは排他的に共局在することを見いだしている。そこで、PINクラスターの分子実態を明らかにするために、PINとMAB4の共局在解析、相互作用解析を行った。また、PINと相互作用する因子として、これまでにリン酸化酵素D6PKなどが報告されており、この因子との関連も調べた。これらについては、イメージングを主体とした細胞生物学的解析や生化学的解析を行った。

(2) PINは発生・環境応答時に局在を変化させる。重力屈性や細胞分裂の過程では、PINの極性局在の形成、崩壊、再構築が見られる。PINクラスター形成は、これらの過程で動的に制御される可能性が考えられる。そこで本仮説を検証するために、細胞分裂や重力屈性過程におけるPINクラスター、およびPINクラスター形成因子MAB4のイメージング解析を行った。

(3) オーキシン極性輸送に関わるメカニズムの分子的普遍性と進化的多様性を明らかにするために、ゼニゴケにおけるPINタンパク質の局在解析を行った。ゼニゴケPIN-GFP発現体の作成や抗PIN1抗体の作成に着手した。また、シロイヌナズナでオーキシン極性輸送制御に関与する因子のホロモグについて、CrisprCas9の手法を用いて突然変異体の作成を行った。

4. 研究成果

(1) PIN2-mCherryとMAB4-GFP発現体を作出し、それらの細胞内局在解析を行った。その結果、PIN2とMAB4の多くは、細胞表面において共局在することが明らかになった。つづいてPIN2とMAB4が相互作用する可能性について検討した。PIN2-eYFPとMEL1(MAB4ホモログ)-eCFP発現体を作成し、acceptor bleachingによるFRET解析を行った。その結果、両者は直接相互作用することが示唆された。また、生化学的解析からPIN2とMAB4、ならびにPIN2とD6PKが直接相互作用することも示唆された。本研究成果の一部は、Curr Biol誌(Glanc et al., 2021)にて形成された。

(2) 細胞分裂過程と重力屈性過程のPINクラスターの挙動の解析を行った。その結果、細胞板

が形成され、母細胞壁に融合する一連の過程では、PINは細胞板上に集積することが明らかになった。一方、クラスター形成因子であるMAB4は、細胞板が母細胞壁に融合した直後は未だ細胞板に局在しておらず、細胞分裂後しばらくすること細胞膜に局在するようになることが明らかになった。これらのことから、細胞分裂の一連の過程ではPINは未だクラスター形成をしていないことが示唆された。なお、これら一連の過程では、分裂面に局在していたPINは、未だ極性局在をしておらず、細胞分裂が完了後、次第にPINの局在が再構築されることが報告されている(Men et al., 2008)。私は、細胞分裂後のPINの極性局在の再構築において、PINクラスター形成がどのような役割を果たしているのかを明らかにすべく、細胞分裂の一連の過程についてPINおよびMAB4のライブイメージング解析を行った。しかしながら、通常の共焦点レーザー顕微鏡では、解像度が十分ではなく、PINの極性局在の再構築過程や、クラスターの形成過程については、詳細な観察はできなかった。今後、超解像顕微鏡の観察などを行うことで、この問題に対処していきたい。

根の重力屈性過程では、PIN2タンパク質の動的なエンドサイトーシス制御が起こることが知られている(Abas et al., 2006)。MAB4はPINタンパク質のエンドサイトーシスを抑制する機能があることが知られており(Furutani et al., 2011)、重力屈性の過程において、PINクラスター形成が動的に制御される可能性が考えられる。そこで、重力刺激直後からのPIN2クラスターの変化を計時観察を行った。しかしながら、レーザー照射に伴う蛍光の退色の影響が大きく、明確な結果は得られなかった。この研究で用いた共焦点レーザー顕微鏡は旧式のものであり、スキャンスピードや感度の点において、最新の共焦点レーザー顕微鏡とは性能的に大きく劣っている。今後、最新の共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析を行うことで、この問題に対処していきたい。

(3)ゼニゴケにおいてPIN1ホモログは一つ存在する。まず最初に、ゼニゴケ *pin1* 変異体(Mppin1変異体)をCrispr/Cas9法により作出したところ、Mppin1変異体は、顕著な表現型を示すことが明らかになった。また、オーキシン極性輸送阻害剤NPAの処理により、Mppin1変異体と類似した形態形成が引き起こされることも明らかになった。これらのことから、ゼニゴケにおいても、PIN1を介したオーキシンの極性輸送が発生・成長において重要な役割を果たすことが明らかになった。つづいて、MpPIN1の局在解析に着手した。まず、Mppin1変異体にMpPIN1-GFPのプラミストを形質転換し、MpPIN1-GFPコンストラクトの機能性について調べた。その結果、Mppin1変異体の表現型の大部分が野生型と同様に回復したMpPIN1-GFP発現体を単離することに成功した。この機能的なMpPIN1-GFPの局在解析を行ったところ、維管束植物とは異なり、ほとんどの細胞では極性局在を示さないことが明らかになった。しかしながら、維管束植物と同様にクラスター様の構造を形成することが明らかになった。実際、ゼニゴケにおいて、MAB4ホモログが存在することもゲノム解析から明らかになった。これらのことから、PINを介したオーキシンの輸送やクラスター形成は、維管束植物とコケ植物の共通祖先の段階で既に獲得されていたことが示唆された。一方で、コケ植物においてPINは明確な極性局在を示さなかったことから、極性局在のメカニズムは、コケ植物と維管束植物が進化の過程で分岐した後に獲得されたものであることが示唆された。シロイヌナズナにおいてオーキシン極性輸送の制御に関わる因子が複数知られている。今後、これらの因子についても、突然変異体を用いた機能解析や局在解析を行うことで、この仮説について検証していきたい。

<引用文献>

AGC kinases and MAB4/MEL proteins maintain PIN polarity by limiting lateral diffusion in plant cells.

Glanc M, Van Gelderen K, Hoermayer L, Tan S, Naramoto S, Zhang X, Domjan D, Včelařová L, Hauschild R, Johnson A, de Koning E, van Dop M, Rademacher E, Janson S, Wei X, Molnár G, Fendrych M, De Rybel B, Offringa R, Friml J.
Curr Biol. 2021 May 10;31(9):1918-1930. e5

Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity.

Shuzhen Men 1, Yohann Boutté, Yoshihisa Ikeda, Xugang Li, Klaus Palme, York-Dieter Stierhof, Marie-Andrée Hartmann, Thomas Moritz, Markus Grebe
Nat Cell Biol. 2008 Feb;10(2):237-44. doi: 10.1038/ncb1686. Epub 2008 Jan 27.

Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism

Lindy Abas 1, René Benjamins, Nenad Malenica, Tomasz Paciorek, Justyna Wiśniewska, Jeanette C Moulinier-Anzola, Tobias Sieberer, Jiri Friml, Christian Luschnig
Nat Cell Biol. 2006 Mar;8(3):249-56. doi: 10.1038/ncb1369. Epub 2006 Feb 19.

Polar-localized NPH3-like proteins regulate polarity and endocytosis of PIN-FORMED auxin efflux carriers.

Furutani M, Sakamoto N, Yoshida S, Kajiwara T, Robert HS, Friml J, Tasaka M.
Development. 2011 May;138(10):2069-78.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7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 Glanc Matous, Van Gelderen Kasper, Hoermayer Lukas, Tan Shutang, Naramoto Satoshi, Zhang Xixi, Domjan David, Vcelarova Ludmila, Hauschild Robert, Johnson Alexander, de Koning Edward, van Dop Maritza, Rademacher Eike, Janson Stef, Wei Xiaoyu, Molnar Gergely, Fendrych Matyas, De Rybel Bert, Offringa Remko, Friml Jiri	4. 巻 31
2. 論文標題 AGC kinases and MAB4/MEL proteins maintain PIN polarity by limiting lateral diffusion in plant cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1918 ~ 1930.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.02.028	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
1. 著者名 Naramoto Satoshi, Hata Yuki, Fujita Tomomichi, Kyojuka Junko	4. 巻 34
2. 論文標題 The bryophytes Physcomitrium patens and Marchantia polymorpha as model systems for studying evolutionary cell and developmental biology in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 228 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koab218	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 Kusnandar Andree S, Itoh Jun-Ichi, Sato Yutaka, Honda Eriko, Hibara Ken-ichiro, Kyojuka Junko, Naramoto Satoshi	4. 巻 63
2. 論文標題 NARROW AND DWARF LEAF 1, the Ortholog of Arabidopsis ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1/DORNROSCHEN, Mediates Leaf Development and Maintenance of the Shoot Apical Meristem in Oryza sativa L	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 265 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab169	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 Mizuno Yohei, Komatsu Aino, Shimazaki Shota, Naramoto Satoshi, Inoue Keisuke, Xie Xiaonan, Ishizaki Kimitsune, Kohchi Takayuki, Kyojuka Junko	4. 巻 33
2. 論文標題 Major components of the KARRIKIN INSENSITIVE2-dependent signaling pathway are conserved in the liverwort Marchantia polymorpha	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2395 ~ 2411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koab106	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 -

1. 著者名 Wachananawat B, Kuroha T, Takenaka Y, Kajiura H, Naramoto S, Yokoyama R, Ishizaki K, Nishitani K, Ishimizu T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Diversity of Pectin Rhamnogalacturonan I Rhamnosyltransferases in Glycosyltransferase Family 106	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Plant Sci	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) 10.3389/fpls.2020.00997.	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 Li H, von Wangenheim D, Zhang X, Tan S, Darwish-Miranda N, Naramoto S, Wabnik K, De Rycke R, Kaufmann WA, Gutl D, Tejos R, Grones P, Ke M, Chen X, Dettmer J, Friml J.	4. 巻 229
2. 論文標題 Cellular requirements for PIN polar cargo clustering in Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytol	6. 最初と最後の頁 351-369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.16887.	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 Glanc M, Van Gelderen K, Hoermayer L, Tan S, Naramoto S, Zhang X, Domjan D, Vcelarova L, Hauschild R, Johnson A, de Koning E, van Dop M, Rademacher E, Janson S, Wei X, Molnar G, Fendrych M, De Rybel B, Offringa R, Friml J.	4. 巻 -
2. 論文標題 AGC kinases and MAB4/MEL proteins maintain PIN polarity by limiting lateral diffusion in plant cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr 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) 10.1016/j.cub.2021.02.028.	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 Mizuno Y, Komatsu A, Shimazaki S, Naramoto S, Inoue K, Xie X, Ishizaki K, Kohchi T, Kyojuka J.	4. 巻 -
2. 論文標題 Major components of the KARRIKIN INSENSITIVE2-dependent signaling pathway are conserved in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell	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) 10.1093/plcell/koab106.	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
オーストリア	IST Austria			
オランダ	Leiden University			
ベルギー	VIB Ghent University			
チェコ	Charles University			