

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15826

研究課題名（和文）重力シグナル伝達因子のリン酸化を介した局在制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidating the plasma membrane localization mechanism of a key gravity signaling factor via its phosphorylation

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：植物の重力に対する応答は、葉や茎が天に向けて、根が地中に向かって成長する様に、植物の形づくりの礎であり、地上に進出した植物は重力の感受機構を発達させてきた。重力の感受は、アミロプラストと呼ばれる高い比重をもったオルガネラを内包する細胞において行われ、アミロプラストは細胞内で重力方向へ沈んでいる。この物理的变化が生物化学的な情報へと変換される過程はこれまで明らかでなかったが、本研究ではLZY蛋白質群がその実行分子である事を明らかにした。本研究の成果は、長らく不明であった命題の解決に終止符を打つものであり、その意義は大きい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物にとって重力の感受は、自らの形づくりを左右する最も重大な感覚の一つである。重力感受が損なわれると植物の形態は著しく変化し、地上部では枝が垂れたり、根の深さが影響を受ける。時に園芸学的な魅力をもたらす一方で、根の深さは作物の生産性に影響を与える。このように植物の重力応答は植物の形態と深く関わり、それを理解するために長く研究が行われてきた。本研究は、長らく不明であった重力感受機構の実行分子とその役割を明らかにした。故に、その学術的意義や園芸・農業分野へ応用展開された際の波及効果は大きい。

研究成果の概要（英文）：Plants have evolved the ability to sense the direction of gravity via statoliths as gravitropism is a fundamental process for plant growth and development. Sensing of gravity is performed in specialized cells which have mobile, high-dense organelles, amyloplasts, as statoliths. Such a physical change must be transduced into biochemical change(s) for signaling in the cells. However, the transduction machinery has remained unclear. We here demonstrated that LZYS execute the transduction process by transferring its localization from the amyloplast to the plasma membrane.

研究分野：植物生理学

キーワード：シロイヌナズナ 重力感受 細胞膜 アミロプラスト リン酸化

1. 研究開始当初の背景

地中に根を下ろした植物は、一生を同じ場所で過ごす。光、温度、湿度、風雨や病害虫など、植物を取り巻く環境は刻一刻と変化するため、植物はそれらの変化を敏感に感じ取り、適応する仕組みを発達させてきた。重力はその力の方向と大きさが一定の特殊な環境要因であるが、根は重力方向に成長し、茎葉は重力と逆方向に成長する様に、地球の重力環境下で進化を遂げてきた植物にとって、重力の認識はその形作りの基礎となっている。

植物は重力の方向の変化に極めて鋭敏に応答する機構を有している。重力を感受する細胞の中には、アミロプラストと呼ばれる高い比重をもったオルガネラが存在し、細胞内において重力方向へ沈んでいる。この物理的变化を感受細胞が認識し、生物化学的な情報へと変換する過程、即ち細胞内シグナル伝達の初期過程を理解する事が重要である。しかしながら、この初期過程で働く因子は特定されていなかった。これまで私たちが行った研究から、*LAZY1* 遺伝子ファミリーに属する *LAZY1-like (LZYs)* 遺伝子群が重力感受細胞において発現し、その欠損変異体ではアミロプラストの沈降に影響を与えずに重力応答に異常を示す事を明らかにしている (Taniguchi ら, *Plant Cell* 2016)。さらに、根の重力応答において主要な役割をもつメンバーの1つである *LZY3* が、側根の重力感受細胞において、重力方向側の細胞膜に局在する事を見出している (Furutani ら, *Nat Commun* 2018)。これらの事は *LZY* がアミロプラストの沈降の重力シグナル伝達に関与する事を示唆し、その役割の解明に価値がある事を示している。

LZY3 の蛋白質蓄積量は、コルメラ細胞において低いレベルで保たれているが、リン酸化酵素阻害剤やプロテアソーム阻害剤の処理は *LZY3* 蛋白質の蓄積量を増加させ、*LZY3* が重力方向側の細胞膜だけでなく細胞膜全体で検出されるようになる(当研究室,未発表)。以上の事は、*LZY3* の重力方向側の細胞膜への局在が、リン酸化や蛋白質分解を介し制御される事を示唆する。

2. 研究の目的

背景で述べた内容を受けて、本研究では *LZY* 遺伝子群に着目しその重力シグナル伝達における役割の解明を目指した。特に、*LZY* の局在変化が如何なる機構により制御されるかを知る事は、重力シグナル伝達の理解する上で大きな命題と言え、本研究はその制御機構の解明を主な目的とした。また、申請時時点において最も有力な制御機構の一つとして *LZY* 蛋白質のリン酸化に注目し、その解析を行った。

3. 研究の方法

(1) *LZY* の細胞膜局在機構に関する解析

LZY の細胞膜局在機構に焦点を当てるため、*LZY* の2次構造やアミノ酸組成に注目した。シロイヌナズナには7つの *LZY* メンバーが存在するが、予測プログラムを用いるといずれにも膜貫通領域は見出されない。細胞膜蛋白質には細胞膜に結合するタイプのものが存在し、そのような蛋白質には塩基性側鎖と疎水性側鎖に富んだ領域が見出される。そのような領域を介して細胞膜を構成する負電荷をもつ脂質と静電的相互作用し、細胞膜に局在すると考えられている。そこで本研究では、このような塩基性側鎖と疎水性側鎖に富んだ領域の探索を公表されているアルゴリズム BH-search (Brzeska ら, *JBC* 2010) により行なった。その結果に基づき、アミノ酸置換変異体を作製し、*LZY* の細胞内局在や重力応答への影響を調べた。

(2) *LZY* のリン酸化に関する解析

重力応答に関与する既知のリン酸化酵素により *LZY3* がリン酸化され得るかを調べ、そのリン酸化部位の同定を行なった。また、MS 解析によりそのリン酸化部位を探索するため、mCherry を融合させた *LZY3* 蛋白質を植物体からの精製を試みた。

4. 研究成果

(1) *LZY* の細胞膜局在機構に関する解析

LZY 蛋白質内における細胞膜との結合に関わる領域の探索を行なった結果、すべての *LZY* メンバーにおいて BH スコアの高い領域が1から数ヶ所見出された(図1A)。この BH スコアが高い領域 (threshold = 0.6) が、細胞膜と結合する性質をもつ事が予想される領域である。次に、*LZY3* 蛋白質において塩基性アミノ酸残基 (K/R) を静電的にニュートラルな側鎖をもつグルタミン残基 (Q) に置換し、BH スコアの分布を調べたところ、グルタミンへの置換は顕著な BH スコアの低下を導く事がわかった(図1B)。次に、これらの置換が *LZY3* の細胞膜局在と重力応答に与える影響を調べた。*LZY* の多重欠損変異体は重篤な重力応答異常を示すが、野生型 *LZY3* に蛍光蛋白質 mCherry を融合させたものをコルメラ細胞で発現させると、その表現型は完全に相補される(図2)。この系を利用し上記の置換変異体を発現させたシロイヌナズナ植物系統を

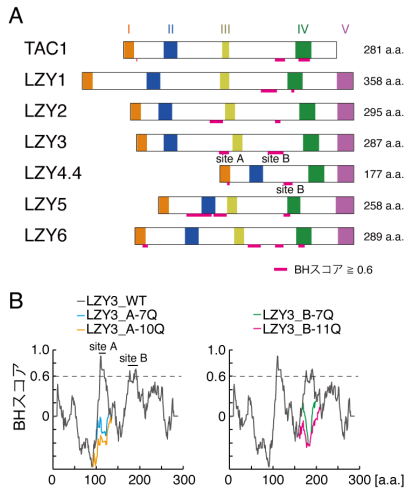


図 1. LZY 蛋白質における細胞膜結合に関わる推定領域と BH スコアへのアミノ酸置換の影響.

を引き起こさない一方で、B-7Q 変異を背景を持つ場合には軽度な重力応答異常を示した。これらの事は、上述の LZY3 蛋白質の細胞膜局在性の低下と重力応答異常には強い関連がある事を示し、LZY3 の細胞膜局在が重力シグナル伝達に必要である事を示唆する。

LZY3-mCherry の観察結果から、LZY3 は細胞膜だけでなく、アミロプラストの外包膜と想定される領域にも局在している事が明らかとなった(図 2 A)。この事は、LZY3 が重力方向側の細胞膜に局在する分子機構を、アミロプラストの沈降で説明できる事を意味する。

LZY3 は静電的相互作用を介して細胞膜を構成する負電荷をもつ脂質群と結合すると予想されるが、それらの脂質は重力の影響を受けないのであろうか？この疑問を明らかにするため、脂質の分布を可視化するバイオセンサーを用いて、コルメラ細胞における負電荷をもつ脂質群の細胞内分布を調べた。その結果、PI(4,5)P₂を除き、調べた限りいずれの脂質もコルメラ細胞の細胞膜に殆ど均一に分布している事が明らかとなった(図 3 A)。PI(4,5)P₂についても、重力刺激を与えてもアミロプラスト沈降が成立する期間ではその分布パターンは変化しなかった(図 3 B)。

以上の結果は、「重力方向の変化に応じたアミロプラストの移動に伴い LZY3 は重力方向側の細胞膜近傍へと運ばれ、負電荷をもった脂質との相互作用を介して細胞膜上へ移行する」事が、アミロプラストの沈降という物理的情報が生物的・化学的情報へ変換される過程の本質である事を示している(図 4)。ダーウィンが植物の重力応答を記述して以来、植物細胞内で沈降する性質をもつアミロプラストが重力応答へ関与する事が示され、植物ホルモンであるオーキシン

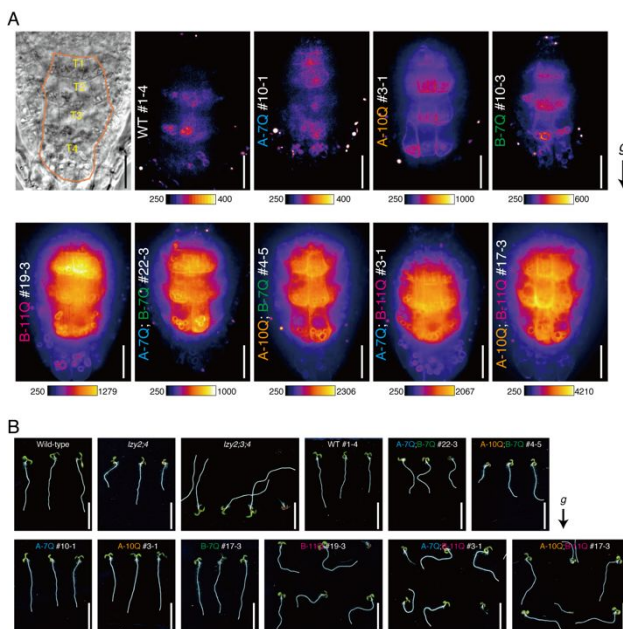


図 2. 細胞膜結合に関わる領域へのアミノ酸置換変異がコルメラ細胞内での LZY3-mCherry の局在(A)と重力応答表現型(B)へ与える影響.

作製した。LZY3_A-7Q および B-7Q 変異体では野生型 LZY3 と同様に微弱な蛍光シグナルしか観察されなかったが、LZY3_A-10Q 変異体では細胞膜上のシグナルが有意に増加し、LZY3_B-11Q 変異体では細胞質領域の蛍光シグナルが増加し、相対的に細胞膜上のシグナルは低かった(図 2 A)。さらに、単独では LZY3 の局在性に影響を与えなかった A-7Q と B-7Q の多重置換変異体を作製すると、B-11Q と同様に細胞質の蛍光シグナルの増加が観察された(図 2 A)。また、B-7Q と細胞膜上のシグナル増加が見られた A-10Q との多重置換変異体においても、細胞質中のシグナルが増加する結果を得た。これらの事は、LZY3 蛋白質の存在する 2 つの領域 A 及び B が重複して細胞膜への結合に働く一方で、領域 B が主要な役割を持ち、領域 A が補佐的な役割を持つ事を示唆する。さらに、領域 A、B とその周辺領域が、LZY3 蛋白質の細胞膜上或いは細胞質での安定性にそれぞれ寄与する事を示唆する。

上述の変異が重力応答に与える影響を明らかにするため、播種後 5 日目の主根の重力方向に対する成長方向を調べた(図 2 B)。その結果、B-11Q 変異をもつ LZY3-mCherry を発現する系統は、顕著な重力応答異常を引き起こす事がわかった。一方で、領域 A への変異は単独では重力応答異常

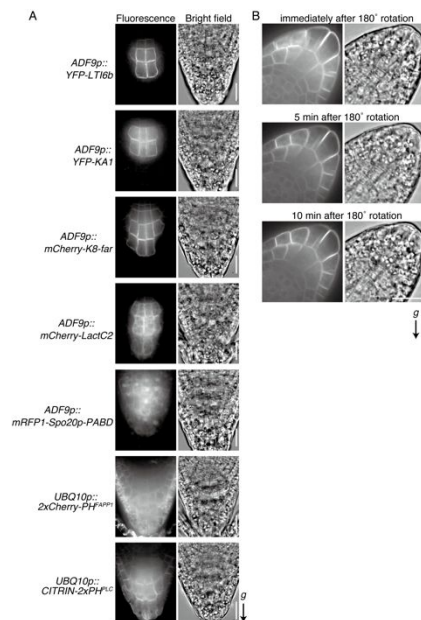


図 3. 負電荷をもつ脂質バイオセンサーのコルメラ細胞内での分布(A)と重力刺激時における PI(4,5)P₂ バイオセンサーの挙動(B)。

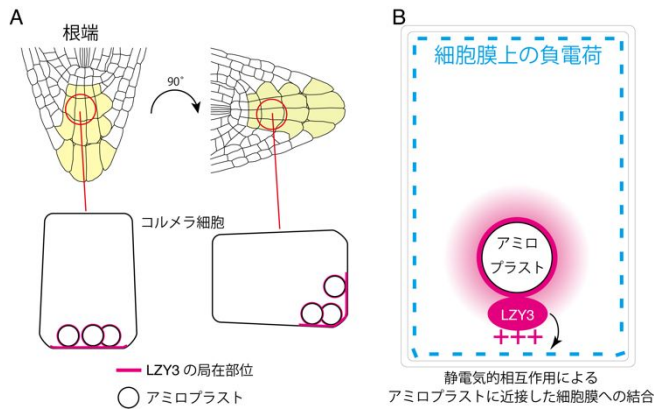


図 4. 重力感受を担うコルメラ細胞における LZY3 の細胞内局在 (A) とその局在を支える分子機構 (B)。

(2) LZY のリン酸化に関する解析

重力応答に関与する既知のリン酸化酵素として、AGC キナーゼ群が知られる。これらにより LZY3 がリン酸化されるかを、大腸菌において調製したリコンビナント蛋白質を用いて *in vitro* キナーゼアッセイにより調べた。その結果、図 5 に示すようにキナーゼ 2 ではなく、キナーゼ 1 によって LZY3 がリン酸化される事が明らかとなった。このリン酸化部位を同定するため、予測リン酸化部位にアミノ酸置換を導入し、再度キナーゼアッセイを行った。その結果、キナーゼ 2 によってリン酸化される部位は 2 ヶ所ある事が明らかとなった。これらのアミノ酸置換を導入した LZY3-mCherry を植物体において発現させ、重力応答への影響や細胞内局在への影響を調べたが、明確な影響を見出す事は出来なかった。今後は、より詳細な研究を進めていく。

次に、質量分析解析により生体内に存在する LZY3 のリン酸化部位を探索するため、LZY3-mCherry 蛋白質を植物体から精製する事を試みた。しかしながら、シロイヌナズナの根において LZY3 は主に根端のごく限られた領域 (コルメラ細胞) で発現しており、イムノプロットによる検出に十分な LZY3-mCherry 蛋白質量を、播種後 5 日目の植物体から確保する事は極めて困難であった。そこで種々の検討を行なった結果、播種後 14 日目の植物体の根 (根系が十分に発達している) を利用する事で、LZY3-mCherry 蛋白質をイムノプロットにより検出する事に成功した (図 6)。さらに、その蛋白質抽出液からアフィニティ精製により LZY3-mCherry 蛋白質を精製する事ができた。LZY の研究を進めていく上で、このような生化学的アプローチが可能となった意義は大きく、今後は (1) で確立した変異体系統や薬剤処理を組み合わせる事により、LZY3 のリン酸化部位やその他の翻訳後修飾の存在や生理的意義を調べていく予定である。これにより、LZY のアミロプラスト局在や蛋白質分解の機構の理解に繋がると期待する。

の偏差分布が器官の屈曲を駆動し、その分布の制御に関わる因子群も同定されてきた。しかしながら、アミロプラストの沈降がどのように重力感受細胞内で情報変換されているかは長らく不明であった。本研究は、この情報変換機構を明らかにした。故に、植物科学の歴史において非常に大きな意味を持つと考える。今後明らかにされるべき事として、LZY のアミロプラストへの局在化機構、アミロプラストからの解離機構、LZY の蛋白質分解機構が挙げられる。これらを明らかにする事で、植物のもつ重力環境への臨機応変な適応戦略が露わになると期待する。

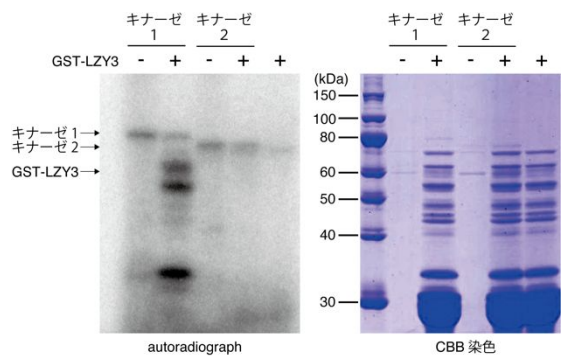


図 5. LZY3 と重力応答に関与するリン酸化酵素のリコンビナント蛋白質を用いた *in vitro* キナーゼアッセイ。

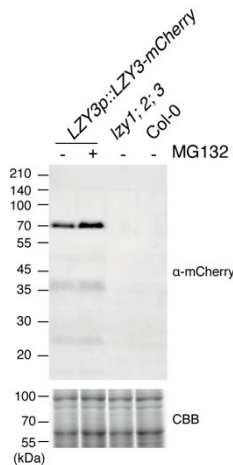


図 6. 播種後 14 日目の植物体の根からの粗蛋白質抽出液を用いた LZY3-mCherry のイムノプロット解析. MG132 は LZY3-mCherry 蓄積量を増加させるが、処理せずとも検出が可能である事がわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 四方明格、森田（寺尾）美代
2. 発表標題 LZY3の細胞膜局在は根における重力シグナル伝達に不可欠である
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 森祥伍，中村守貴，押田龍一郎，四方明格，西村岳志，古谷将彦，桧垣匠，森田(寺尾)美代
2. 発表標題 重力感受細胞におけるLZYタンパク質のライブイメージング
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自然科学研究機構基礎生物学研究所植物環境応答研究部門 http://www.nibb.ac.jp/perhp/en/research/

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
---------	---------