

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05068

研究課題名(和文)植物の極性分泌における細胞膜上の極性場形成機構の役割の解明

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of polarity establishment on the plasma membrane for polar secretion in Plants.

研究代表者

佐藤 雅彦 (Sato, Masa H.)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：20283575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：FAB1による細胞膜上の“極性場”の形成機構の解明を中心に、オーキシンなど上流のシグナル伝達系からの情報の入力から下流の細胞骨格系、膜交通系など情報出力系までの複数の分子システムを有機的に統合することで、細胞の極性確立とそれに伴う極性分泌のメカニズムを総合的に理解することを目指した。結果として、PI(3,5)P2を特異的に標識する蛍光マーカーを開発し、共焦点レーザー顕微鏡による解析によって伸長中の根毛のPI(3,5)P2の動態解析を世界で初めて成功した。更に、根毛においてFAB1と特異的に結合する低分子量GTPase, ROP10を同定し、根毛の側面形成時における役割の解明に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、申請者が発見した二種類のイノシトールリン脂質の細胞膜上の偏在性に注目し、極性分泌制御の観点から植物細胞の形態形成の基本原則を明らかにしようとする挑戦的な研究である。植物にとっての極性分泌現象は、クチクラや根における金属キレート物質の分泌、蜜腺での蜜の分泌、ワックスの分泌などにも必須の現象である。今回明らかになったFAB1およびPI(3,5)P2による細胞の極性分泌メカニズムの理解は、応用的には、農作物や花きなどの形の制御による品種改良、細胞壁やクチクラ、ワックス層の増強による病害性抵抗性増強などにつながる基盤技術になると考えている。

研究成果の概要(英文)：Root hairs elongate by tip growth and simultaneously harden the shank by constructing the inner secondary cell wall layer. Here we show that PI(3,5)P2, the enzymatic product of FAB1, is involved in the hardening of the shank in root hairs in Arabidopsis. FAB1 and PI(3,5)P2 localize to the plasma membrane along the shank of growing root hairs. By contrast phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases 3 (PIP5K3) and PI(4,5)P2 localize to the apex of root hair where they are required for tip growth. Reduction of FAB1 function results in the formation of wavy root hairs while wild type are straight. The localization of FAB1 in the plasma membrane of root hair shank requires the activity of Rho-related GTPases from plants 10 (ROP10) and localization of ROP10 requires FAB1 activity. Computational modelling of root hair morphogenesis successfully reproduces the wavy root hair phenotype. Taken together, these data demonstrate that the root hair shank hardening requires PI(3,5)P2/ROP10 signaling.

研究分野：植物分子生物学, 細胞生物学

キーワード：ホスホイノシチド 極性確率 膜交通 根毛形成 シロイヌナズナ

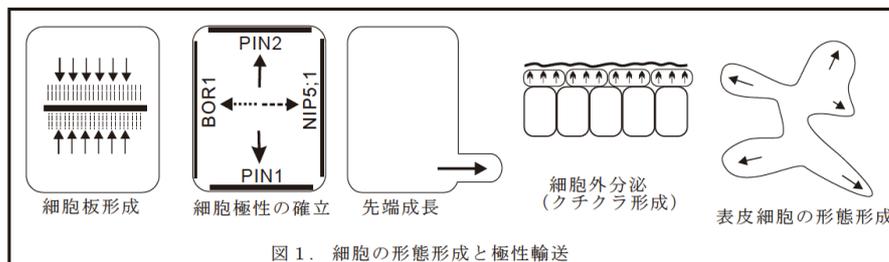
1. 研究開始当初の背景

1-1. 植物細胞の形作りには、細胞膜上の“極性場”形成が重要である。

植物細胞には、動物細胞のタイトジャンクションのような細胞膜上の区切り構造がない。それにもかかわらず、植物細胞には、頂端、基部、外側面、内側面といった明確な極性が存在し、各領域に特定の膜タンパク質や細胞壁などの細胞外物質を極性輸送により分泌する。植物細胞がこのような極性を決定するためには、細胞膜が位置情報いわゆる“極性場”を持つことが必要であるが、植物細胞が極性場を形成するための中心制御因子の実体については不明な点が多い。

1-2. 植物の形作りにおける極性分泌の重要性

植物における細胞膜上や細胞外の特定の領域への分子の輸送(極性分泌)は、細胞分裂、細胞の極性確立、根毛、花粉管の先端成長、細胞外への物質の分泌、無機塩類など栄養の吸収、シグナルの授受、病原菌に対する耐性反応、屈性発現など多様な生理反応を司る極めて重要な機構である(図1)。この極性分泌は、極性を持った膜交通網(極性輸送)によって行われている。近年の研究により、細胞膜タンパク質の極性輸送機構における微小管、アクチンなど細胞骨格系と後期膜交通網および情報伝達系との関わり的重要性が明らかになりつつある。



1-3. イノシトールリン脂質シグナリングの膜交通網における重要性

イノシトールリン脂質(PI)には、イノシトール環の3, 4, 5位の炭素にリン酸基が様々なバリエーションで結合した7種類が存在し、真核生物において、様々なシグナリング経路の調節に機能している。本研究で扱うPI(3,5)P₂は、PI3P 5-kinase, FAB1によって、PI(3)Pより合成され、真核生物において、液胞やリソソームでのタンパク質の分解、酸性化、オートファジーなど多くの生理機能を有することが知られている。

1-4. 申請者の発見「イノシトールリン脂質は細胞極性場形成の中心制御因子である」

申請者は、シロイヌナズナ FAB1 の機能解析を進めた結果、FAB1 は、「後期エンドソームの成熟に関与すること」、「成熟した後期エンドソームは、表層微小管に接着することで、表層微小管研究目的の配向を制御し、オーキシン排出体 PIN などの極性輸送を制御すること」、「表層微小管とエンドソームの接着は、後期エンドソームの構造維持に重要であること」を明らかにした。これらの発見は、「膜交通系と細胞骨格系のクロストークが、細胞の極性分泌に重要である。」ことを示唆している。

更に FAB1 は、分裂直後の若い細胞では、後期エンドソームに局在するが、驚いたことに、分化しつつある細胞では、細胞膜に局在性が変化する。では、なぜ、植物の FAB1

は分化過程で細胞膜上に移行するのだろうか？この謎を解くために、申請者は、PI(3,5)P₂を標識するマーカータンパク質を新たに開発し、PI(3,5)P₂が根毛の基部や、孔辺細胞の気孔側の細胞膜、表皮細胞の凹面に選択的に局在することを明らかにした。一方、PI(4,5)P₂は、細胞膜上のPI(3,5)P₂が存在しない領域に存在することも明らかにした(図2)。

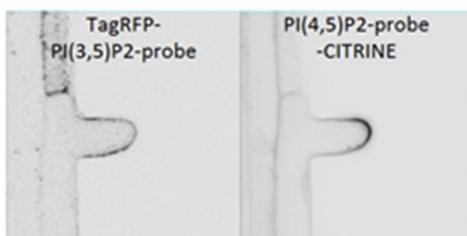


図2 . PI(4,5)P₂とPI(3,5)P₂の同時イメージング解析

PI(3,5)P₂可視化プローブ tagRFP-ML1N*2 とPI(4,5)P₂可視化プローブ CITRINE-2xPHPLC を同時発現する形質転換シロイヌナズナを用いた根毛のライブセルイメージング画像。PI(3,5)P₂は、根毛の基部、PI(4,5)P₂は、先端に局在している。

また、「FAB1の活性を阻害すると、細胞壁が薄くなり、根毛、表皮細胞の形態、気孔の開閉に異常をきたす。」ことも明らかにした。これら事実からPI(3,5)P₂とPI(4,5)P₂が排他的に細胞膜上にドメイン構造を形成し、PI(4,5)P₂領域では、アクチン制御下で、柔軟な細胞壁構造を形成し、頂端部に向かって極性分泌を行うことで、先端成長を行い、PI(3,5)P₂の領域では、微小管の制御下で、二次壁成分などを分泌し、肥厚した硬い細胞壁構造を形成する。その結果、様々な細胞の形態が形成されるという仮説を着想するに至った(図3)。この仮説は、「植物細胞のあらゆる形態形成機構を統合的に説明できる普遍的な仮説」になりうると考えている。



図3 二種類のイノシトールリン脂質による細胞形態制御仮説

2. 研究の目的

植物において方向性を持った分泌(極性分泌)は、形態形成、生理反応に必須の現象である。申請者は、ホスファチジルイノシトール3リン酸5キナーゼ(PI3P5-kinase) ,FAB1の研究からイノシトールリン脂質が、植物の極性分泌の中心制御因子であることを明らかにした。その知見を元に、本研究では、「植物の極性分泌に必要な細胞膜上の“極性場”形成機構の解明」を目指す。具体的には、FAB1およびその産物PI(3,5)P₂による細胞膜上の“極性場”の形成機構の解明を中心に、オーキシンなど上流のシグナル伝達系からの情報の入力から下流の細胞骨格系、膜交通系など情報出力系までの複数の分子システムを有機的に統合することで、細胞の極性確立とそれに伴う極性分泌のメカニズムを総合的に理解することを目指す。

3. 研究の方法

当初研究計画では、4年間の研究期間で「植物の極性分泌に必要な細胞膜上の“極性場”形成機構の解明」を目指す。具体的には、FAB1およびその産物PI(3,5)P₂による細胞膜上の“極性場”の形成機構の解明を中心に、オーキシンなど上流のシグナル伝達系からの情報の入力から下流の細胞骨格系、膜交通系など情報出力系までの複数の分子システムを有機的に統合することで、細胞の極性確立とそれに伴う極性分泌のメカニズムを総合的に理解することを目指すことを計画した。

具体的には、イノシトールリン脂質による細胞膜上の極性場の形成機構の解明を中心に、シグナル伝達系、細胞骨格系、膜交通系など複数のシステムを有機的に結合することで極性分泌機構を統合的なネットワークとして理解するために以下の実験を行った。

- (a) PI(3,5)P₂とPI(4,5)P₂のライブセルイメージングによる同時観察
- (b) FAB1 および PI(3,5)P₂相互作用タンパク質の解析
- (c) PI(3,5)P₂およびPI(4,5)P₂に制御される分泌経路の解析

4 . 研究成果

PI(3,5)P₂ を特異的に標識する蛍光マーカータンパク質 GFP(TagRFP)-ML1Nx2 を開発し, PI(4,5)P₂の蛍光マーカーである CITRINE-2xPH^{PLC}との共発現シロイヌナズナ形質転換体を作成することにより, 共焦点レーザー顕微鏡によるライブイメージング解析によって伸長開始時と伸長中の根毛のPI(3,5)P₂とPI(4,5)P₂の動態解析を世界で初めて成功した (1-3)。更に, 根毛において FAB1 と特異的に結合する低分子量 GTPase, ROP10 を同定し, 根毛の側面形成時における役割の解明に成功した。また, 細胞膜への輸送系の一部が PI(3,5)P₂ によって制御されていることを明らかにし (9), 根毛特異的 SNARE である SYP123 が PI(3,5)P₂ 制御下で後期エンドソームの SNARE である VAMP727 と相互作用することにより根毛側面へのキシランなど二次細胞壁成分の分泌に関わっていることを明らかにした (論文準備中)。

上記のように, 「イノシトールリン脂質による極性場の形成機構の解明を中心に, シグナル伝達系, 細胞骨格系, 膜交通系など複数の分子システムを有機的に結合することで極性分泌機構を統合的なネットワークとして理解する」という当初の目的を3年間でほぼ完全に達成し, 2017, 2018 の2年間で共同研究も含め *Nature Plants*, *Proc Natl Sci USA*, *Dev Cell* など原著論文 9 報を出版した。

これらの研究成果は, FAB1/PI(3,5)P₂ が ROP を介した表層微小管の形成制御と極性分泌の制御の中核因子であることを明確に示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Park Misoon, Krause Cornelia, Karnahl Matthias, Reichardt Ilka, El Kasmi Farid, Mayer Ulrike, Stierhof York-Dieter, Hiller Ulrike, Strompen Georg, Bayer Martin, Kientz Marika, Sato Masa H., Nishimura Marc T., Dangl Jeffery L., Sanderfoot Anton A., Jørgens Gerd	4. 巻 44
2. 論文標題 Concerted Action of Evolutionarily Ancient and Novel SNARE Complexes in Flowering-Plant Cytokinesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 500 ~ 511.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2017.12.027	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 Zhang Wei-Tong, Li En, Guo Yan-Kui, Yu Shi-Xia, Wan Zhi-Yuan, Ma Ting, Li Sha, Sato Masa H., Hirano Tomoko, Zhang Yan	4. 巻 177
2. 論文標題 Arabidopsis VAC14 is critical for pollen development through mediating vacuolar organization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1529-1538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1104/pp.18.00495	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 Selote Devarshi, Matthiadis Anna, Gillikin Jeffrey W., Sato Masa H., Long Terri A.	4. 巻 41
2. 論文標題 The E3 ligase BRUTUS facilitates degradation of VOZ1/2 transcription factors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 2463 ~ 2474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/pce.13363	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 Hirano Tomoko, Konno Hiroki, Takeda Seiji, Dolan Liam, Kato Mariko, Aoyama Takashi, Higaki Takumi, Takigawa-Imamura Hisako, Sato Masa H.	4. 巻 4
2. 論文標題 PtdIns(3,5)P2 mediates root hair shank hardening in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 888 ~ 897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-018-0277-8	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 Hirano T, Munnik T, *_Sato MH	4. 巻 58
2. 論文標題 Inhibition of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate production has pleiotropic effects on various membrane trafficking routes in Arabidopsis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 120-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcx011	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 Hirano T, Stecker K, Munnik T, Xu H, _Sato MH_	4. 巻 58
2. 論文標題 Visualization of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate dynamics by tandem ML1N-based fluorescent protein probe in Arabidopsis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1185-1195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcx011	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 Koguchi M, Yamasaki K, Hirano T, _Sato MH_	4. 巻 12
2. 論文標題 Vascular plant one-zinc-finger protein 2 is localized both to the nucleus and stress granules under heat stress in Arabidopsis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Signal Behav.	6. 最初と最後の頁 e1295907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2017.1295907.	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 Nagelel MK, Kalinowska K, Vogel K, Reynolds GD, Wu Z, Anzenberger F, Ichikawa M, Tsutsumi C, *_Sato MH_*, Kuster B, Bednarek SY, Isono E.	4. 巻 114
2. 論文標題 Arabidopsis SH3P2 is an ubiquitin-binding protein that functions together with ESCRT-I and the deubiquitylating enzyme AMSH3.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 E7197-E7204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1710866114	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 Minsoon Park, Cornelia Krause, Matthias Karnahl, Ilka Reichardt, Farid El Kasmi, Ulrike Mayer, York-Dieter Stierhof, Ulrike Hiller, Georg Strompen, Martin Bayer, Marika Kients, *Masa H. Sato*, Marc T. Nishimura, Jeffery L. Dangl, Anton A. Sanderfoot, Gerd Juergens	4. 巻 44
2. 論文標題 Concerted action of evolutionarily ancient and novel SNARE complexes in flowering-plant cytokinesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev. Cell	6. 最初と最後の頁 500-511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2017.12.027	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 Koguchi M, Yamasaki K, Hirano T, Sato MH.	4. 巻 4
2. 論文標題 Vascular plant taone-zinc-finger protein 2 is localized both to the nucleus and stress granules under heat stress in Arabidopsis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Signal Behav.	6. 最初と最後の頁 e1295907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1080/15592324.2017.1295907.	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 Hirano T, Stecker K, Munnik T, Xu H, Sato MH.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Visualization of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate dynamics by tandem ML1N-based fluorescent protein probe in Arabidopsis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 pcx011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi. 10.1093/pcp/pcx011	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 Hirano T, Munnik T, Sato MH.	4. 巻 58
2. 論文標題 Inhibition of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate production has pleiotropic effects on various membrane trafficking routes in Arabidopsis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 120-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcw164	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 Hirano T, Sato MH.	4. 巻 2
2. 論文標題 Overexpression of FAB1A-GFP recruits SNX2b on the endosome membrane in snx1-1 mutant in Arabidopsis.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Plant Signal Behav.	6. 最初と最後の頁 e1110663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2015.1110663.	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12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤雅彦
2. 発表標題 Development of Ab-GALFA method, a novel assay method for analyzing molecular mechanisms underlying the gall formation process using a model plant, Arabidopsis thaliana.
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 出呂町祐典, 西村浩二, 清野正子, 浦口晋平, 佐藤雅彦, 平野朋子
2. 発表標題 ヒ素輸送体ArsBとオルガネラターゲティング技術を利用したヒ素耐性植物の作成
3. 学会等名 第36回日本植物分子細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野朋子, 佐藤雅彦, 山本美奈
2. 発表標題 SYP123は, 根毛の二次細胞壁合成のために輸送を行う
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤雅彦, 岡本彩花, 木村成介, 齊藤悠馬, 田中玲帆, 武田征士, 大島一正, 平野朋子
2. 発表標題 モデル植物シロイヌナズナを用いた虫こぶ形成機構の分子生物学的解析
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会金沢大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤雅彦, 岡本彩花, 大島一正, 木村成介, 平野朋子
2. 発表標題 Ab-GALFA法;モデル植物シロイヌナズナを用いた虫こぶ形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第35回日本植物細胞生物学会(さいたま)大会(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平野朋子, 武田征士, 加藤真理子, 青山卓史, 桧垣匠, 今村寿子, 佐藤雅彦
2. 発表標題 イノシトールリン脂質が制御する根毛の形態形成
3. 学会等名 第35回日本植物細胞生物学会(さいたま)大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 出呂町祐典, 西村浩二, 佐藤雅彦, 平野朋子
2. 発表標題 ヒ素輸送体ArsBとオルガネラターゲットング技術を利用したヒ素耐性植物の作成
3. 学会等名 第35回日本植物細胞生物学会(さいたま)大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大坪憲弘, 佐藤雅彦
2. 発表標題 植物の潜在能力を引き出す『虫こぶ』の魅力
3. 学会等名 第49回 植物バイテクシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤雅彦
2. 発表標題 Development of Ab-GALFA method, a novel assay for analyzing molecular mechanisms underlying the gall formation process using a model plant, Arabidopsis thaliana.
3. 学会等名 第59回 日本植物生理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高口美早紀, 山崎加奈子, 平野朋子, 佐藤雅彦
2. 発表標題 シロイヌナズナV0Z2タンパク質は, 熱ストレス条件下において, 核とストレス下流の両者に局在する
3. 学会等名 第58回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大坪憲弘, 武田征士, 木村成介, 佐藤雅彦, 大島一成
2. 発表標題 「虫こぶ」プロジェクト: 植物の形態や代謝を制御する新たな技術開発に向けて
3. 学会等名 第58回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ayaka Okamoto, Tomoko Hirano, Akihisa Hamatani, Issei Ohshima, Seisuke Kimura, Masa H. Sato
2. 発表標題 Ab-GALFA: Development of a novel bioassay for dissecting of gall formation mechanism using Arabidopsis thaliana.
3. 学会等名 第58回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2017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