

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0170

研究課題名(和文)植物細胞形態形成における平面内極性の確立機構

研究課題名(英文) Establishment of planar polarity for plant cell morphogenesis

研究代表者

青山 卓史 (Aoyama, Takashi)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：80202498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの根毛形成過程では、バルジ形成のための平面内極性の確立においてROP2やPIP5K3などのシグナル因子がフィードフォワードループを形成することが予想される。本研究では、その分子機構を解明するために、in silicoにおけるフィードフォワードループモデルのシミュレーションとともに、in plantaにおける構成的検証実験を行なった。蛍光タンパク質と融合したROP2およびPIP5K3を根表皮の非根毛細胞で共発現させたところ、両者間の局在性における相互作用は見られなかった。一方、ROP2とPI(4,5)P2の相互作用については、それらの細胞膜上での共局在性を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根毛や花粉管、コケ類の原系体や仮根などの細胞先端成長においては、伸長極性の確立・維持機構として Localization Enhancing Network Self-sustaining (LENS) というものが提唱されている。根毛バルジ形成のために確立された平面内極性は先端成長極性として維持されることから、本研究は細胞先端成長の基盤となるLENSの実態解明につながるものと期待される。また、本研究のフィードフォワードループモデルにおけるPI(4,5)P2の直接的または間接的なROPのリクルートの可能性は、動物細胞系における同様の作業仮説の設定において有用な情報であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：During root hair development of *Arabidopsis thaliana*, signaling factors including ROP2 and PIP5K3 are assumed to be involved in the mechanism that establishes the planar polarity for bulge formation. In this study, to elucidate the molecular basis of the mechanism, we performed in silico simulation of a model, in which ROP2, PIP5K3 and PI(4,5)P2 constitute a feedforward loop, and in planta constructive experiments for its validation. We expressed fluorescence protein-fused ROP2 and PIP5K3 using the GL2 promoter, which is active specifically in atrichoblasts. When they were expressed separately, they did not show local accumulation patterns like that observed in trichoblasts. Moreover, their co-expression did not influence their localization patterns to each other. As for interaction between ROP2 and PI(4,5)P2, co-localization of the ROP2 fusion protein with PI(4,5)P2 on the plasma membrane was suggested.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：細胞極性 細胞形態形成 植物細胞 リン脂質シグナル PIP5K PIP2 低分子Gタンパク質 ROP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は自然界において様々な造形を現す。それらは植物体の構成要素である細胞の集合状態だけでなく、それら細胞の形態によっても規定されている。また、個々の細胞に関して、葉や花器官の表皮細胞のように、それぞれが果たす細胞機能を反映した複雑かつ精緻な形態をもつものが多い。このような植物細胞の形態形成過程はどのように制御されているのであろうか。細胞壁で囲まれた植物細胞の形態形成過程は不可逆的に進行することから、常に厳密な制御が必要とされる。中でも細胞極性の確立は植物細胞の多様な形態を生み出すために欠かせない過程であり、その厳密な制御が複雑かつ精緻な細胞形態へとつながっていると考えられる。

このような植物細胞形態形成のモデル系として、シロイヌナズナの根毛形成過程が集中的に研究されてきた。シロイヌナズナは遺伝学的な研究資源が整備されており、ほとんどの遺伝子に対して変異体の入手が可能であり、すでにその表現型解析が行われているものも多い。また、根毛細胞を含む根の表皮細胞は蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡による観察に適しており、長時間の連続観察中も正常な細胞分化過程を継続させることができる。さらに、シロイヌナズナの根の表皮では根毛細胞と非根毛細胞がそれぞれ細胞列を成し、細胞列の根端から基部へと細胞分化過程の進行に沿った段階の細胞が並ぶことから(図1参照)、時系列的解析が容易に行える。

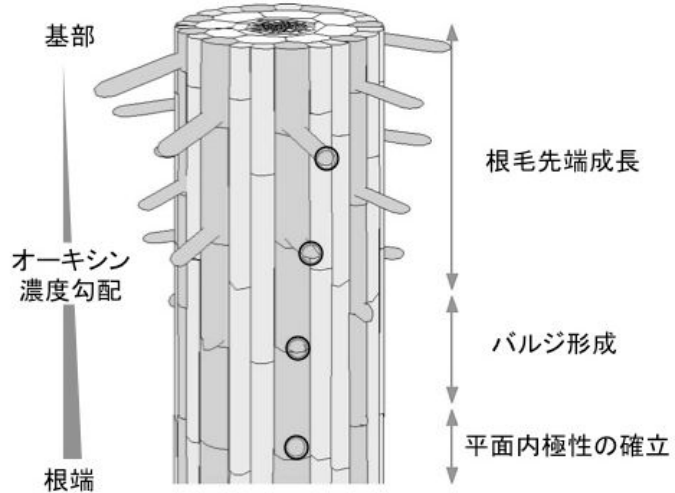


図1 シロイヌナズナの根毛形成過程 シロイヌナズナ根表皮の根毛細胞列では、細胞表面の根端付近にバルジが形成され、それが先端成長により伸長し根毛となる。○印はバルジ形成のための平面内極性が確立され、先端成長において維持される位置を示す。

根毛は根の表皮細胞の表面の一部が先端成長することにより生み出される構造体である。その発生過程では最初にバルジと呼ばれる突起が形成されるが、そのバルジ形成の位置は表皮細胞外表面の根端側の縁から少し手前に定まっている(図1参照)。根表皮ではオーキシンの極性輸送により根端をピークとするオーキシンの濃度勾配が形成されており、バルジ形成の表皮細胞上の位置もその勾配に依存することが知られている。しかし、オーキシンの濃度は一細胞の範囲では緩やかな勾配を形成しているだけであり、バルジ形成の位置をピンポイントで定めるための位置情報としては不十分と考えられる。そこで、緩やかなオーキシン濃度の勾配から尖頂なシグナル強度分布を生み出すために、自律的かつ頑強な平面内極性確立機構が存在すると考えた(図2参照)。

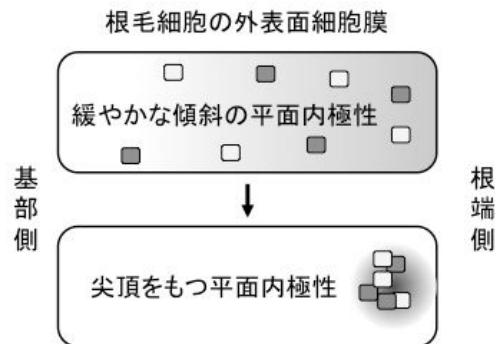


図2 バルジ形成のための平面内極性確立のモデル上: 根毛細胞の外表面では、初め根端側から基部側へのシグナルの緩やかな濃度勾配が存在し、細胞膜上の複数の因子がそれに従って局在する。下: それらの因子は適当な拡散自由度をもつとともに、それらの間のフィードフォワード相互作用により自律的に集積し、最終的に尖頂をもつ極性が形成される。

これまでの研究から、バルジ形成以前にその予定位置付近には、植物 Rho ファミリー-G タンパク質(ROP)の ROP2 および ROP4、ホスファチジルイノシトール 4,5 二リン酸(PI(4,5)P₂) 生成酵素であるホスファチジルイノシトール 4 リン酸 5 キナーゼ(PIP5K)の PIP5K3、NADPH オキシダーゼの一種である RHD2 などのシグナル因子が集積することが知られている。申請者らの研究グループでは、それらシグナル因子の中で ROP2 と PIP5K3 に関して、それらの過剰発現が一つの表皮細胞から複数のバルジを形成するなど共通の表現型を示すことを見出ししている。さらに、*in vitro* 系において PIP5K3 と ROP2 が特異的に結合すること、それらは伸長中の根毛において先端の細胞膜上で共同すること、それらの高発現は根毛の伸長を促進することなどの知見を得ている。以上から、ROP、PIP5K、および PI(4,5)P₂ がバルジ形成位置を決定するための平面内極性確立機構の構成因子として働くという着想を得た。

根毛や花粉管、およびコケ類の原糸体や仮根などの先端成長においては、共通性の高い伸長極性の確立・維持機構として Localization Enhancing Network Self-sustaining (LENS) というものが提唱されている。しかし、先端成長過程には小胞輸送や細胞膜や細胞壁の合成など

の複雑な物質循環が伴うため、LENSの実態も複雑でありその解析も困難であることが予想される。それに対してバルジ形成以前の平面内極性の確立過程ではシグナル因子以外の物質移動は少ないと想定され、比較的単純化した解析が可能であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、モデル植物シロイヌナズナの根毛形成過程の初期において根毛細胞外表面で起こる平面内極性の確立という比較的単純化できる現象に焦点を当て、その分子機構の中心として働く細胞膜上のシグナル因子間の相互作用を明らかにすることにより、真核細胞に共通する頑強な形態形成過程の基盤原理の理解を目指す。また、根毛バルジ形成のために確立された平面内極性は先端成長極性として維持されることから、それら確立と維持の機構の間には共通性があると考えられており、細胞先端成長の基盤となるLENSの実態の解明にもつなげる。

3. 研究の方法

本研究課題ではROP、PIP5K、PI(4,5)P₂が中心となるフィードフォワードループが平面内極性確立機構において中心的な役割を果たすという作業仮説を立てる。そして、まずその機構が緩やかなオーキシン濃度の勾配から尖頂な平面内極性を確立できることをコンピュータ(*in silico*)によるシミュレーションで検証する。次に、シロイヌナズナの形質転換植物系の利点を活かして、生長中の植物の根表皮(*in planta*)で構成的検証実験を行う。さらに、検証実験の結果を踏まえてフィードフォワードループモデルの改訂および最適化を行う。これによりバルジ形成における平面内極性確立機構の概容を明らかにする。具体的には、ROPによるPIP5Kの直接的なリクルート、PI(4,5)P₂による直接的または間接的なROPのリクルートなどの可能性の検証を試みる。

4. 研究成果

(1) *in silico* シミュレーション

まずROP、PIP5K、PI(4,5)P₂を中心とするフィードフォワードループのモデルを構築した(図3参照)。さらに、このモデルでは以下の条件が想定された。1) 新規に合成されたROPはGTP型として緩やかなオーキシン濃度勾配に従って細胞膜上に分布する、2) GTP型ROPは一定の速度でGDP型となる、3) GTP型およびGDP型ROPは細胞膜上で拡散する、4) GTP型のみ、またはGTP型とGDP型の両方のROPはPIP5Kを細胞質からリクルートする、5) GTP型ROPはPIP5Kを活性化する、6) GDP型ROPはROP-GDIの作用により細胞質へと移動する、7) PIP5Kは細胞膜上に豊富に存在するPI4Pを基質としてPI(4,5)P₂を生成する、8) PI(4,5)P₂はROPよりも速く細胞膜上で拡散する、9) PI(4,5)P₂は一定の速度で分解される、10) PI(4,5)P₂は直接的または間接的に細胞質からROPをGTP型として細胞膜上にリクルートする。

次に *in silico* で平面内極性確立におけるフィードフォワードループモデルのシミュレーションを上記1)~10)の条件を当てはめ

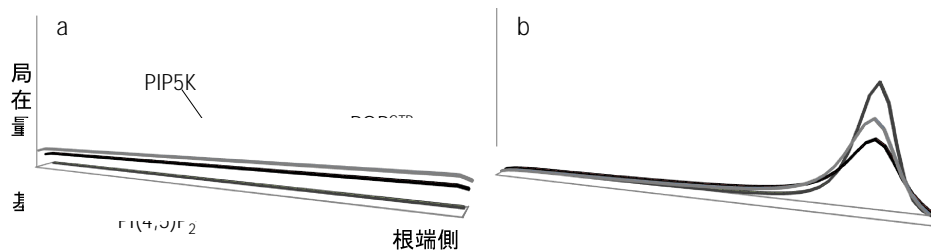


図4 平面内極性確立のシミュレーション 本文中および図3のモデルに従いROP^{GTP}、PIP5K、PI(4,5)P₂の局在を一次元に単純化してシミュレーションした結果を示す。フィードフォワードループが働く前の状態(a)、およびフィードフォワードループが働いた後の状態(b)を示す。

て行った。細胞膜平面を基部-根端の一次元に簡略化した結果を図4に示す。適当なパラメータを用いてGTP結合型ROP、PIP5K、PI(4,5)P₂の局在をシミュレートした結果、フィードフォワードループを働かせた後に根端近くに尖頂なピークをもつパターンが出現した。二次元の系を用いたシミュレーションにおいても同様の結果が得られた。このことから、バルジ形成における平面内極性の確立機構として、ROP、PIP5K、およびPI(4,5)P₂を中心とするフィードフォワードループが機能する可能性が示された。

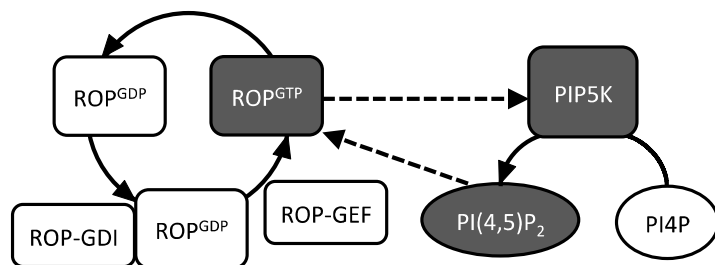


図3 平面内極性確立のためのシグナリングモデル ROP、PIP5K、PI(4,5)P₂間の制御についての作業仮説を示す。ROPはPIP5Kを細胞膜上にリクルートし、PIP5Kにより生成されたPI(4,5)P₂は細胞質中のROP-GDIとの複合体からROPを細胞膜上にリクルートする。

(2) *in planta* 構成的検証実験

図3に示した平面内極性確立のためのフィードフォワードループモデルを検証するため、シロイヌナズナの根表皮において構成的実験を行った。図1に示すようにシロイヌナズナの根表皮には根毛細胞列と非根毛細胞列がある。非根毛細胞列においては転写因子 *GL2* が特異的に発現し、根毛形成に必要な遺伝子群の転写を抑制するために根毛が発生しない。そこで、非根毛細胞列において、根毛形成に関与する PIP5K および ROP を異所的に発現させ、フィードフォワードループが形成されることによりそれらのタンパク質の局所的な集積が起こるかを調べることにした。PIP5K3 および ROP2 のそれぞれを蛍光タンパク質で標識した PIP5K3-YFP および mCherry-ROP2 を *GL2* 遺伝子プロモーターにより発現する組換え遺伝子を作製し、それぞれを野生型シロイヌナズナへと導入し、それら形質転換植物の根端の表皮細胞を観察した。

まず、PIP5K3-YFP および mCherry-ROP2 をそれぞれ単独で発現させた場合の細胞内局在パターンを図5に示す。PIP5K3-YFP は一部が細胞膜上に見られるものの、主に核および細胞質に局在した。一方、mCherry-ROP2 は主に細胞膜上に見られ、特に頂端側および根端側の細胞膜に強く局在した。根表皮細胞の頂端側および根端側の細胞膜には PIP5K1 および PIP5K2 によって生成される PI(4,5)P₂ が高い密度で存在することが知られており、PI(4,5)P₂ と ROP2 の共局在性が示唆された。

次に、これら PIP5K3-YFP および mCherry-ROP2 を発現する植物体を掛け合わせるにより両方の融合タンパク質を共発現する形質転換植物体を作製し、根表皮細胞における PIP5K3-YFP と mCherry-ROP2 の細胞内局在性を観察した。その結果を図6に示す。共発現された両蛍光タンパク質の細胞内局在パターンはそれぞれを単独で発現させたときのものとは有意には変わらず、お互いの局在性への影響も見られなかった。図6では根端の細胞増殖領域の表皮細胞での結果を示すが、細胞伸長領域および細胞分化領域の表皮細胞においても、PIP5K3-YFP と mCherry-ROP2 お互いの局在性への影響は見られなかった。

mCherry-ROP2 が細胞膜に PIP5K3-YFP が細胞質に存在するにも拘らず、PIP5K3-YFP が細胞膜にリクルートされなかった理由として、1) ROP の GTP 型のみが PIP5K をリクルートできるのに対して、異所的に発現された mCherry-ROP2 は主に GDP 型であった、2) PIP5K3-YFP が他の因子に強くトラップされて細胞膜にリクルートされなかった、などの可能性が考えられる。これらの問題を解消するためには、1) ROP-GDI や ROP-GEF も同時に共発現させる、2) *GL2* 遺伝子以外のプロモーターを用いて別の細胞種での共発現を行うなどの試みが必要である。一方、mCherry-ROP2 については PI(4,5)P₂ との共局在性を示唆する結果が得られた。このことは、PI(4,5)P₂ は直接的または間接的に細胞質から ROP を細胞膜上にリクルートするというフィードフォワードループモデルと一致する。今後、植物細胞内における PI(4,5)P₂ 結合タンパク質との競合実験などを行い、PI(4,5)P₂ による ROP2 のリクルートについてさらに検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Kato, M., Tsuge, T., Maeshima, M., and Aoyama, T. (2019) *Arabidopsis* PCaP2

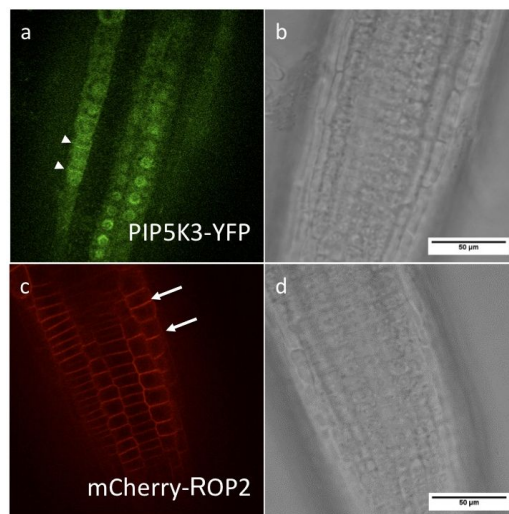


図5 *GL2* 遺伝子プロモーターにより発現された PIP5K3-YFP (a) および mCherry-ROP2 (c) の細胞内局在パターン。(a) および (c) は蛍光像、(b) および (d) はそれぞれの明視野像。(a) の矢頭は、一部の PIP5K3-YFP の細胞膜への局在を示す。(c) の矢印は、mCherry-ROP2 が強く局在する頂端および根端の細胞膜を示す。

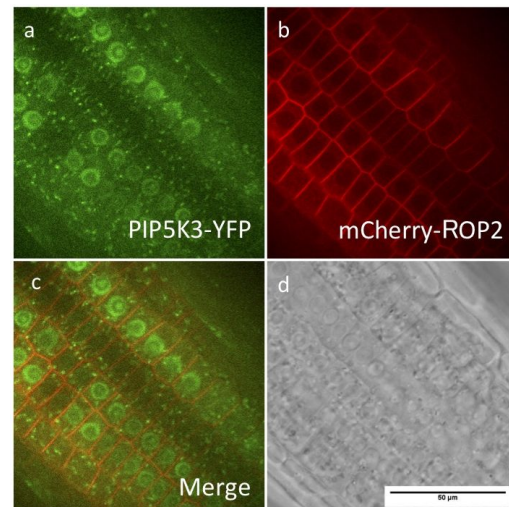


図6 *GL2* 遺伝子プロモーターにより共発現された PIP5K3-YFP (a) および mCherry-ROP2 (b) の細胞内局在パターン。(a) および (b) はそれぞれの蛍光像、(c) は両蛍光の重ね合わせ像、(d) は明視野像。

modulates the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signal on the plasma membrane and attenuates root hair elongation. *Plant J.* in press

<https://doi.org/10.1111/tpj.14226>

Hirano, T., Konno, H., Takeda, S., Dolan, L., Kato, M., Aoyama, T., Higaki, T., Takigawa-Imamura, H., Sato, M.H. (2018) PtdIns(3,5)P₂ mediates root hair shank hardening in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* 4: 888-897.

<https://doi.org/10.1038/s41477-018-0277-8>

Tanaka, N., Uno, H., Okuda, S., Gunji, S., Ferjani, A., Aoyama, T., and Maeshima, M. (2017) SRPP, a cell wall protein is involved in development and protection of seeds and root hairs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 58: 760-769.

<https://doi.org/10.1093/pcp/pcx008>

〔学会発表〕(計17件)

日本植物生理学会・2019年度年会、2019年3月13-15日、(名古屋大学、名古屋)「PtdIns(4,5)P₂産生酵素をコードするPIP5K遺伝子は花粉の発達過程において機能する」加藤真理子、巨真知子、藤原崇志、青山卓史

日本植物生理学会・2019年度年会、2019年3月13-15日、(名古屋大学、名古屋)「シロイヌナズナの根毛形成における平面内極性確立機構の解明」岸本太地、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史

日本植物生理学会・2019年度年会、2019年3月13-15日、(名古屋大学、名古屋)「シロイヌナズナにおけるPIP5K7とPIP5K8の機能解析」黒田凌、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史

第31回植物脂質シンポジウム、2018年11月30日-12月26日、(高知大学、高知)「シロイヌナズナPIP5K7およびPIP5K8の機能解析」黒田凌、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史

The 29th International Conference of Arabidopsis Research, June 25-29, 2018 (Turku, Finland), “Genetic analysis of type B PIP5Ks in plant cell morphogenesis”, Machiko Watari, Mariko Kato, Tomohiko Tsuge, Takashi Aoyama

The 23rd International Symposium on Plant Research, July 8-13, 2018 (Yokohama, Japan), “Function of *Arabidopsis* type-B phosphatidylinositol phosphate 5-kinase genes in plant growth and development”, Mariko Kato, Machiko Watari, Ryo Kuroda, Taichi Kishimoto, Hiroaki Kusano, Tomohiko Tsuge, Blanc-Mathieu Romain, Hiroyuki Ogata, Takashi Aoyama

日本植物生理学会・2018年度年会、2018年3月28-30日、(札幌コンベンションセンター、札幌)「シロイヌナズナPCaP2はPI(4,5)P₂シグナルを調節することにより根毛の伸長を減衰する」加藤真理子、柘植知彦、前島正義、青山卓史

日本植物生理学会・2018年度年会、2018年3月28-30日、(札幌コンベンションセンター、札幌)「シロイヌナズナにおけるPIP5K7とPIP5K8の機能解析」黒田凌、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史

日本植物生理学会・2018年度年会、2018年3月28-30日、(札幌コンベンションセンター、札幌)「BタイプPIP5Kの遺伝学的解析」巨真智子、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史

日本植物生理学会・2018年度年会、2018年3月28-30日、(札幌コンベンションセンター、札幌)「シロイヌナズナPLDz1およびPLDz2の細胞内局在」島村亮太、谷口(山本)幸美、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史

日本植物生理学会・2017年度年会、2017年3月16-18日、(鹿児島大学、鹿児島)“Biological function of type-B phosphatidylinositol phosphate 5-kinase genes of *Arabidopsis thaliana*” Takashi Aoyama, Mariko Kato, Yukika Wada, Machiko Watari, Tomohiko Tsuge, Blanc-Mathieu Romain, Hiroyuki Ogata, Hiroaki Kusano

日本植物生理学会・2017年度年会、2017年3月16-18日、(鹿児島大学、鹿児島)“Distinct localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate controls root hair morphogenesis in *Arabidopsis*” Tomoko Hirano, Mariko Kato, Seiji Takeda, Takashi Aoyama, Yalovsky Shaul, Masa H. Sato

日本植物生理学会・2017年度年会、2017年3月16-18日、(鹿児島大学、鹿児島)「細胞壁タンパク質SRPPは種子形成と根毛伸長に重要な機能を果たしている」田中奈月、鶴野裕、奥田祥平、郡司玄、Ali Ferjani、青山卓史、前島正義

日本植物生理学会・2017年度年会、2017年3月16-18日、(鹿児島大学、鹿児島)「シロイヌナズナPLDz1のT-DNA挿入変異体の新規な表現型」島村亮太、安齋尚子、加藤真理子、青山卓史

日本植物生理学会・2017年度年会、2017年3月16-18日、(鹿児島大学、鹿児島)「配偶子形成と胚発生におけるPIP5K2とPIP5K4の機能解析」巨真智子、和田悠貴香、柘植知彦、加藤真理子、青山卓史

第29回植物脂質シンポジウム、2016年11月25-26日、(大阪大学、豊中)「PI(3,5)P₂とPI(4,5)P₂の排他的領域形成モデル」平野朋子、青山卓史、Shaul Yalovsky、武田征士、佐藤雅彦

第 29 回植物脂質シンポジウム、2016 年 11 月 25-26 日、(大阪大学、豊中)「シロイヌナズナのシグナス PLD の細胞内局在性」、島村亮太、谷口(山本)幸美、加藤真理子、青山卓史

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

出願状況

なし

取得状況

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~molbio/植物形態形成.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：加藤 真理子

ローマ字氏名：KATO Mariko

研究協力者氏名：安田 啓子

ローマ字氏名：YASUDA Keiko

研究協力者氏名：亙 真智子

ローマ字氏名：WATARI Machiko

研究協力者氏名：岸本 太地

ローマ字氏名：KISHIMOTO Taichi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。