

令和元年6月11日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15140

研究課題名(和文)長時間イメージングによる植物の根冠細胞層の空間的な分化制御機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms of cell differentiation in the Arabidopsis root cap revealed by long-term time-lapse imaging

研究代表者

郷 達明 (GOH, Tatsuaki)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：80511419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの根冠は、数層の細胞層から構成されており、位置に応じて異なる機能を担う。根冠の分化や成熟過程のタイムラプス観察を行った結果、重力感受細胞として機能していた中間層が最外層に押し出されるのに伴い、アミロプラストの縮小や細胞の液胞化が進行するという細胞内構造の劇的な変化を見出した。さらに、細胞内膜輸送の制御因子の機能抑制により、細胞内構造変化が抑制され、根冠の成熟と剥離に影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに分子遺伝学的解析から根冠の分化や機能を制御する変異体や遺伝子が明らかにされてきたが、根冠の細胞層がどのようにして多様な機能を発揮しているのかは未解明なままであった。本研究において、長時間の連続観察から、根冠の細胞層が位置に応じて、構造と機能を大きく転換していることが明らかになった。このことは根冠機能の発現メカニズムについての理解を深めることに大きく貢献した。

研究成果の概要(英文)：The root cap consists of several layers of central columella and lateral root cap, and maintains its shape by balanced proliferation of proximal stem cells and autonomous release of distal mature cells. Time-lapse observation revealed dynamic subcellular rearrangements (vacuolization and shrinkage of amyloplasts) were operated in the outermost root cap layer during maturation and detachment. We also found that regulator protein of membrane traffic was involved in the subcellular rearrangement and root cap detachment.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：根冠 細胞内膜輸送 タイムラプスイメージング シロイヌナズナ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

維管束植物の根の先端には、根冠と呼ばれるキャップ状の組織が存在している。根冠は、分裂組織の保護や重力感受、土壌粒子との摩擦軽減などを通して根の成長を支える重要な組織である。モデル植物のシロイヌナズナの根冠は、根端の側部を覆う側部根冠と、先端部を覆うコルメラの2種類の細胞群からなり、これらはそれぞれ5-6層の細胞層で構成されている。根冠を構成する細胞層は、最内層の始原細胞の同調的な分裂により供給され、新たな層の形成に従って順次外側へ移行しながら分化・成熟する。そして最外層に達した細胞層は根から自発的に剥離する。研究代表者の研究により、シロイヌナズナの根冠が特定の周期で細胞層の新生と剥離を繰り返し、細胞層をターンオーバーさせていることが示唆されている。

根冠の分化や剥離は、NAC転写因子である *SOMBRERO (SMB)*、*BEARSKIN1 (BRN1)*、*BRN2* により制御される(Bennett et al., 2010)。*SMB* は根冠全体で発現し、始原細胞の規則的な分裂や側部根冠の細胞死を制御する。一方、*BRN1* と *BRN2* は根冠の外層で特異的に発現しており、これらが細胞壁分解酵素をコードする遺伝子の転写を直接活性化することで、根冠細胞層の剥離が促進される(Bennett et al., 2010; Kamiya et al., 2016)。

根冠細胞は、位置に応じて異なる機能を担っている。特に、根冠中央部のコルメラでは、細胞層の位置に応じた機能の違いが顕著である。コルメラの内層は、アミロプラストの沈降方向を認識することで、重力感受細胞として機能する。一方、最外層は土壌との摩擦軽減や微生物との相互作用などの機能を果たすために、粘液質（ムシレージ）を分泌し、細胞剥離を行う。細胞層が内側から外側へと押し出されるのに伴い、重力感受を担う内層の細胞は、分泌・剥離を行う外層の細胞へと、明らかに異なる細胞内構造をもつ細胞に分化する。このような位置に応じた細胞機能の転換は、根冠の多様な機能を調節する上で重要と考えられるが、その制御機構は不明なままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、根冠細胞層の機能転換に伴う細胞内構造の変化を詳細に観察するとともに、根冠分化を制御する転写因子の下流因子の中から、その制御に関わる因子を探索し、機能解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

第一に、水平光軸型動体トラッキング顕微鏡をもちいて、根冠細胞層の成熟と剥離過程を長時間タイムラプスイメージングし、細胞内構造の変化を観察した。また、アミロプラストや液胞膜などの可視化ラインをもちいて、共焦点レーザー顕微鏡による詳細な観察を行った。

第二に、根冠の分化および剥離を制御する NAC 型転写因子 *SMB*、*BRN1/2* の下流因子候補の中から、細胞内構造変化に関与する可能性のある遺伝子を抽出した。細胞内膜輸送に関わる可能性から *Rab GTPase* に着目して解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 長時間タイムラプスイメージングによる根冠細胞層の成熟と剥離過程における細胞内構造変化の解析

根冠の細胞層は、最内層における細胞分裂により、外側へと押し出されるのに伴って、連続的に分化・成熟が進行する。そのため、細胞層の分化や成熟過程を理解するためには、経時的な観察が必要である。しかし、植物の根の先端は成長とともに位置を変えるために、成長中の根の根端

を高倍率で経時的に観察することはこれまで不可能であった。そこで、独自に開発した水平光軸型動体トラッキング顕微鏡をもちいて、根冠細胞層の観察を行った。この新しい顕微鏡システムは、根端を追尾することによって、約5日間にわたって、成長する根の先端を連続的に観察することが可能である。これまでに、20倍の対物レンズを用いて、剥離様式の観察を行い、周期的に細胞層が剥離することを明らかにしてきた。本研究では、細胞内構造を高解像で観察するために、40倍対物レンズをもちいた観察を行った。20倍の対物レンズと比較して、視野が狭くなり、焦点ずれも起こりやすくなることから、当初はトラッキングに失敗することが多かった。しかし、撮影間隔を調整し、焦点ずれ補正システムを導入することによって、40倍対物レンズをもちいた長時間連続撮影が可能になった。

この観察から、根冠細胞層は内層から最外層へとなるのに伴って、劇的に細胞内構造が変化することが明らかになった。根冠中央部コルメラの内層は、デンプンを蓄積したアミロプラストを持ち、それが平衡石としての役割を果たし、重力感受細胞として機能する。タイムラプス観察から、最外層の剥離に伴い、それまで内層にあった細胞が最外層へと位置を変化させると、重力方向へと沈降していたアミロプラストが細胞中央へと位置を変化させ、その後、徐々にサイズが小さくなっていく様子が観察された。また、同時に、液胞が著しく肥大化することが明らかになった。より詳細な観察を行うために、蛍光マーカーをもちいて、アミロプラストと液胞の変化を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。発芽後の異なるタイミングで観察をした結果、タイムラプス観察と同様に、アミロプラストの縮小と、液胞の著しい肥大化が観察された(図1)。このことから、野生型では根冠細胞層の成熟に伴って、細胞内構造が劇的に変化することが明らかになった。

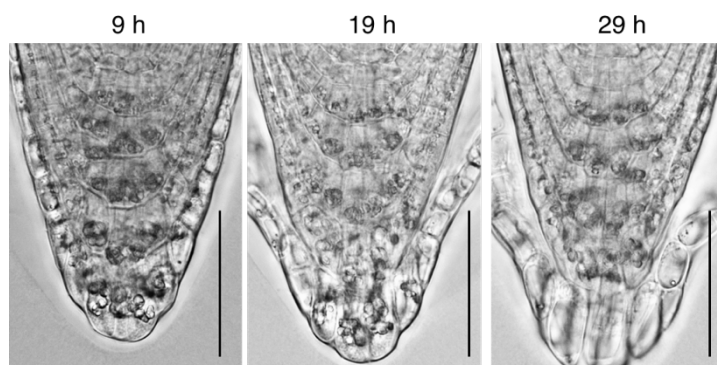


図1 高倍率対物レンズによる根冠細胞層の成熟と剥離過程のタイムラプス観察。内層ではアミロプラストが発達しているが、最外層ではアミロプラストが縮小し、液胞の肥大化が進み、細胞内構造が変化する。

次に、根冠細胞の分化制御に関わるNAC型転写因子である *SMB*, *BRN1*, *BRN2* の機能欠損変異体を用いて、野生型と同様の方法で細胞内構造を解析した。アミロプラストに関しては、いずれの変異体でも、野生型と同様の局在変化や縮小が観察された。一方で、液胞形態に関しては、*smb* 変異体において液胞の肥大化が抑制されるなど、根冠細胞層の液胞形状の制御に *SMB*, *BRN1/2* が関わる可能性が示唆された。

## (2) *BRN1* により制御される細胞内膜輸送の制御因子の探索と機能解析

タイムラプス観察から、根冠細胞層の機能転換に伴い、劇的な細胞内構造変化が起こることが示唆された。特に、液胞形状の変化は顕著であり、内層では折り畳まれたようにコンパクトな形状であったが、最外層へと位置を変えるのに伴って、細胞全体へと急激に肥大化した。このような液胞形態の変化には、細胞内膜輸送が関わると考えられた。そこで、根冠分化を制御する転写因子である *SMB*, *BRN1/2* の制御下にある遺伝子の中から、細胞内膜輸送の制御に関わるものを探索した。先行研究において実施していた *BRN1* のクロマチン免疫沈降(ChIP-seq)の解析結果を参照したところ、細胞内膜輸送の制御因子である Rab GTPase が、8 遺伝子見出された。本研究では、

根冠で発現していることが既存のデータベースにより示唆された RabD2b について解析を進めた。

RabD2b は、細胞外への分泌経路に関連すると推定されるサブファミリーに属する。自身のプロモーター制御下で RFP との融合タンパク質を発現させたところ、RabD2b は根冠の最外層で比較的強く発現しており、ゴルジ体や TGN と思われるドット状のオルガネラに局在した(図 2)。根冠における RabD2b の機能を解析するために、Rab GTPase のヌクレオチドとの相互作用や GTPase 活性に関わるアミノ酸に変異を導入した恒常的不活性型と活性型の RabD2b を発現する植物体を作成した。恒常的不活性型の RabD2b は液胞膜に、不活性型の RabD2b は細胞質に局在していたことから、期待通りに機能改変されていることが示唆された。この植物体を持ちいて、根冠細胞層の成熟や剥離における RabD2b の機能改変の影響をタイムラプス観察により解析した。野生型では最外層が層状構造を保ったまま剥離するが、恒常的不活性型の RabD2b を発現する植物体では、最外層の細胞が層状構造を保てず、個別に脱離することが明らかになった(図 2)。さらに、液胞形状を観察すると、野生型では細胞全体に液胞が肥大化していたが、恒常的不活性型の RabD2b を発現する植物体では、液胞の肥大化が強く抑制されていた。このことから、根冠における RabD2b の機能が、細胞の機能転換に伴う細胞内構造変化に重要であり、根冠細胞層の成熟と剥離の制御に関わることが示唆された。

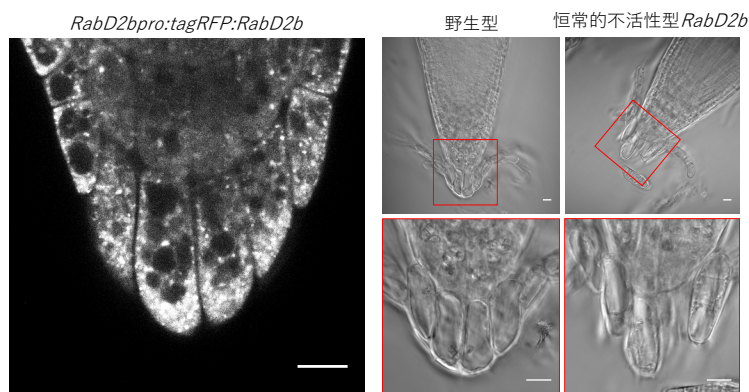


図 2 RabD2b が根冠における細胞内構造に関与する

RabD2b は根冠において、ドット状のオルガネラに局在する(左)。また、恒常的不活性型 RabD2b の異所発現により、根冠剥離が異常になった(右)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. \*Toyokura K, \***Goh T**, Shinohara H, Shinoda A, Kondo Y, Okamoto Y, Uehara T, Fujimoto K, Okushima Y, Ikeyama Y, Nakajima K, Mimura T, Tasaka M, Matsubayashi Y, Fukaki H. (**\*equal contribution**)

“Lateral inhibition by a peptide hormone-receptor cascade during *Arabidopsis* lateral root founder cell formation”

*Developmental Cell*, 2019, 48:64-75.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2018.11.031., 査読有

2. **Goh T**.

“Long-term live-cell imaging approaches to study lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*.”

*Microscopy*, 2019, 68(1):4-12. doi: 10.1093/jmicro/dfy135., 査読有

3. Orosa-Puente B, Leftley N, von Wangenheim D, Banda J, Srivastava AK, Hill K, Truskina J, Bhosale R, Morris E, Srivastava M, Kumpers B, **Goh T**, Fukaki H, Vermeer JEM, Vernoux T, Dinneny JR, French AP, Bishopp A, Sadanandom A, Bennett MJ.

“Root branching toward water involves posttranslational modification of transcription factor

ARF7”

*Science*, 2018, 362(6421):1407-1410. doi: 10.1126/science.aau3956., 査読有

4. Takemoto K, Ebine K, Askani JC, Krüger F, Gonzalez ZA, Ito E, **Goh T**, Schumacher K, Nakano A, Ueda T.  
“Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in *Arabidopsis*”  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(10):E2457-E2466. doi: 10.1073/pnas.1717839115., 査読有
5. Morris EC, Griffiths M, Golebiowska A, Mairhofer S, Burr-Hersey J, **Goh T**, von Wangenheim D, Atkinson B, Sturrock CJ, Lynch JP, Vissenberg K, Ritz K, Wells DM, Mooney SJ, Bennett MJ.  
“Shaping 3D Root System Architecture”  
*Current Biology*, 2017, 27(17):R919-R930. doi: 10.1016/j.cub.2017.06.043., 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 郷達明, 上野皓輝, 宮島俊介, 中島敬二  
「シロイヌナズナ根冠細胞の剥離過程における周期的な細胞挙動の解析」  
第 60 回日本植物生理学会年会, 2019 年
2. Imizu K, Miyashima S, **Goh T**, Nakajima K  
“Unravelling temporally coordinated cell divisions in the *Arabidopsis* root meristem by a motion-tracking microscope system”  
第 60 回日本植物生理学会年会, 2019 年
3. 郷達明, 小堤彩水, 小園紗希, 金鍾明, 遠藤高帆, 宮島俊介, 中島敬二  
「根冠細胞の分化過程における細胞内膜輸送経路の役割」  
日本植物学会第 82 回大会, 2018 年
4. 阪本薫, 郷達明, 中島敬二  
「根冠細胞の成熟と剥離におけるオートファジーの役割」  
JANPER2018, 2018 年
5. 郷達明, 上野皓輝, 宮島俊介, 中島敬二  
「長時間連続観察によるシロイヌナズナ根冠細胞の周期的な剥離様式の解析」  
第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年
6. 郷達明, 宮島俊介, 上野皓輝, 中島敬二  
「長時間連続観察による根冠細胞の剥離様式の解析」  
日本植物学会第 81 回大会, 2017 年

7. Goh T, Ueno K, Kamiya M, Miyashima S, Nakajima K

“Mechanisms of root cap maturation and cell detachment in Arabidopsis”

Bilateral Closure Symposium of GDRI Integrative Plant Biology Network Program, 2017年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。