

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15238

研究課題名（和文）植物の根毛伸長を支えるリン脂質シグナルの解明

研究課題名（英文）Studies on phosphoinositide signal involved in root hair elongation

研究代表者

加藤 真理子 (KATO, Mariko)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：90736646

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）：根毛は、根の表皮から発生し細胞の伸長が先端のみで起こる先端成長によって形成される円筒状の細胞性構造体である。その結果もたらされる根毛の細長い形態は、水・無機栄養素の吸収、植物体の土壌への固定、土壌微生物との相互作用といった根毛機能を支える重要な組織である。本研究は根毛の伸長促進に関わる分子機構を解明するため、伸長促進への関与が示唆されるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸（PI(4,5)P₂）に着目し、PI(4,5)P₂シグナルを調節する機構を解析した。その結果、根毛伸長過程においてPI(4,5)P₂シグナルを負に制御し根毛伸長を減衰する機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根毛をより長く伸長させることにより根毛の表面積を拡張させることができれば任意のタンパク質などを量的に多く発現させることも可能となることから、伸長促進機構を明らかにすることは重要である。本研究では根毛伸長を負に制御する機構の一端を明らかにしたが、根毛機能を強化した高機能性植物体の作出のための基礎的知見を得ることができたと考えている。

研究成果の概要（英文）：Root hairs is important for water and nutrient uptake, anchoring plants to soil, microbe interactions. To reveal the mechanisms in which involved in root hair elongation, we focused on the function of PCaP₂ via PI(4,5)P₂-binding activity on the plasma membrane, and investigated its role in root hair elongation. Resulting data revealed that PCaP₂ functions as a negative modulator of the PI(4,5)P₂ signal on the plasma membrane and attenuates root hair tip growth, and exist the mechanisms in which attenuate PI(4,5)P₂ signal.

研究分野：農芸化学

キーワード：植物細胞形態形成 ホスホイノシチド

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

1. 研究開始当初の背景

根毛は、根表皮の根毛細胞から発生し、細胞の伸長が先端のみで起こる「先端成長」によって形成される円筒状の細胞性構造体である。その結果もたらされる根毛の細長い形態は、水・無機栄養素の吸収、植物体の固定、土壌微生物との相互作用といった根毛機能を支えるために重要である。これまで根毛の形成機構について精力的に研究がなされ、転写因子、細胞骨格、膜輸送、細胞壁関連分子など、根毛形成過程に関わる多くのタンパク質群が同定されてきた。しかし、根毛の伸長促進に関わる分子機構は未だよく分かっていない。根毛をより長く伸長させることにより根毛の表面積を拡張させることができれば、膜輸送体タンパク質などを量的に多く発現させることなども可能となり、根毛機能を強化した高機能性植物体の作出に応用できると考えられる。本研究では、根毛の伸長促進に関わる分子機構を解明するため、根毛の伸長促進への関与が示唆されるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PI(4,5)P₂) を調節する機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

PI(4,5)P₂ はグリセロリン脂質の一種であり、イノシトール環をもつホスホイノシチドである。植物細胞内においては PI(4,5)P₂ はごく微量に存在し、主に細胞膜に蓄積する。PI(4,5)P₂ は単なる細胞膜を構成する脂質ではなく、生体膜上で位置情報をもつシグナル分子として機能し、細胞骨格、エンドサイトーシスやエキソサイトーシス、低分子量 GTPase を介したシグナルの制御を介して、さまざまな細胞機能の調節に関わることが知られている。根毛においては、伸長中の根毛細胞の先端の細胞膜上に PI(4,5)P₂ が局所的に蓄積し、伸長を停止するとすみやかに消失することが観察されている。また、PI(4,5)P₂ 生成酵素をコードする *PIP5K* 遺伝子を過剰発現したシロイヌナズナは根毛伸長を著しく促進することから (Kusano et al., *Plant Cell*, 2008)、PI(4,5)P₂ が根毛伸長を正に制御する因子であると示唆されている。本研究では、PI(4,5)P₂ を制御する機構を解明するため、PI(4,5)P₂ 結合能をもつ PCaP2 に着目した。PCaP2 は細胞膜結合性 Ca²⁺ 結合タンパク質 (Plasma membrane associated Ca²⁺-binding protein 2) として報告された分子で、Ca²⁺ に加え、PI(4,5)P₂ を含むホスホイノシチドおよび Ca²⁺/カルモジュリンと結合する (Kato et al., *Plant Cell Physiol.*, 2010)。PCaP2 遺伝子を欠失したシロイヌナズナ変異体は野生株より根毛が長くなり、PCaP2 の PI(4,5)P₂ 結合ドメインを過剰発現すると根毛の伸長が著しく抑制される (Kato et al., *Plant J*, 2013)。さらに、PCaP2 分子内の PI(4,5)P₂ 結合領域を過剰発現したシロイヌナズナに観察される根毛の伸長阻害は PI(4,5)P₂ 生成酵素遺伝子である *PIP5K* を発現させることにより野生株と同等に回復したことから、PCaP2 が PI(4,5)P₂ を介したシグナル伝達に関与し、根毛伸長過程に関与することが推測された。しかしその詳細は不明である。そこで本研究は、根毛の伸長促進に関わる分子機構を明らかにすることを目的に、PI(4,5)P₂ の調節機構に関わると推測される PI(4,5)P₂ 結合能をもつタンパク質 PCaP2 に着目し、根毛伸長過程における PCaP2 の生理的意義について調べた。

3. 研究の方法

(1) PCaP2 の遺伝学的解析

根毛形成過程における PCaP2 の遺伝子機能を調べるため、PCaP2 の T-DNA 挿入破壊株を用いた変異体解析を行い詳細に解析した。また PI(4,5)P₂ 生成酵素をコードする *PIP5K3* 遺伝子の変異体と *pcap2* 変異体を掛け合わせて *pcap2 pip5k3* 二重変異体を作製し、作製した二重変異体についても表現型を詳細に解析した。

pcap2 変異体内における PI(4,5)P₂ の蓄積を可視化するため、PI(4,5)P₂ を特異的に認識する分子プローブ CITRINE-PH^{PLC8} を *pcap2* 変異体内で発現するシロイヌナズナを作製し、その蛍光を観察した。

(2) 根毛伸長過程における PCaP2 の動態

根毛伸長過程における PCaP2 タンパクの動態を調べるため、PCaP2 の自プロモーターの下流に PCaP2 と緑色蛍光タンパク (GFP) の融合タンパク質を接続した DNA コンストラクトを発現するシロイヌナズナを作製した。作製した植物体の根毛を用いて、根毛が伸長し停止するまで、共焦点レーザー顕微鏡下で経時的に観察した。また、根毛伸長過程における PI(4,5)P₂ の挙動を可視化するため PI(4,5)P₂ プローブを発現する植物体を作製し、前述の PCaP2-GFP 発現株と掛け合わせて両蛍光タンパク質を同時に発現する植物体を作製し、作製した植物体の根毛を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

(3) *in vivo* における PCaP2 と PI(4,5)P₂ の相互作用

これまでに PCaP2 は PI(4,5)P₂ に加えて PI(3,4)P₂、PI(3,5)P₂、PI(3,4,5)P₃ といったホスホイノシチドと結合することが大腸菌組換え PCaP2 タンパクを用いた *in vitro* 結合アッセイにより明らかにされている (Kato et al., *Plant J*, 2013)。植物細胞の細胞膜上において実際に PCaP2 と PI(4,5)P₂ が結合することを明らかにするため、PCaP2 および PI(4,5)P₂ 結合タンパク質を植物細胞膜上において過剰に発現させ、細胞膜上に存在する PI(4,5)P₂ との競合実験を行った。

(4) 根毛伸長過程における PCaP2 の生理的意義

PCaP2 と PI(4,5)P₂ の結合が根毛伸長過程においてどのような役割をもつのが明らかにするため、PCaP2 を過剰に発現する植物体を作製し、その影響を調べた。

4. 研究成果

(1) PCaP2 の遺伝学的解析

PCaP2 遺伝子の機能が根毛伸長においてどのような役割を担うのか調べるため、PCaP2 の発現量が低下した *pcap2* 変異体の根毛を詳細に解析した。その結果、*pcap2* 変異体の根毛は、形態は野生株と同様であったが、野生株よりも長い根毛をもつことが分かった(図1)。根毛の発生位置と長さを測定したところ、発生位置は野生株と同様に根の根端からおよそ2 mm の位置から観察されたが、*pcap2* 変異体の根毛は野生株よりも伸長速度が早いことが分かった。発芽後10日目における野生株と *pcap2* 変異体の主根の長さは同様であることから、*pcap2* 変異体の長い根毛は野生株よりも伸長速度が早いことに起因すると考えられた。また、*pcap2* 変異体の表現型は、PCaP2-GFP を PCaP2 プロモーターの下流に接続した DNA コンストラクトを導入したシロイヌナズナでは野生株と同等に回復したことから(図1、*pcap2* 相補株)、*pcap2* 変異体に観察されるこれらの表現型は PCaP2 を原因として引き起こされたことが確認できた。以上の結果から、PCaP2 遺伝子の発現量の低下は根毛の伸長速度を増加させることが明らかとなり、PCaP2 は根毛伸長を減衰する役割をもつことが示唆された。

次に *pcap2 pip5k3* 二重変異体を作製し根毛の形態と長さを測定した。*pip5k3* 変異体は野生株よりも短い根毛をもつことが報告されていたが(Kusano et al., *Plant Cell*, 2008) 野生株よりも伸長速度が遅いことが分かった。興味深いことに、*pcap2 pip5k3* 二重変異体は *pip5k3* 変異体に観察される根毛の表現型が抑制され、その根毛は *pip5k3* 変異体と野生株の中間の長さをもつことが明らかとなった(図1)。

つづいて、*pcap2* 変異体内における PI(4,5)P₂ の蓄積を可視化するため、PI(4,5)P₂ を特異的に認識する分子プロ

ープ CITRINE-PH^{PLCδ} を *pcap2* 変異体内で発現する植物体を作製し、その蛍光を観察した。その結果、CITRINE-PH^{PLCδ} の局在は *pcap2* 変異体と野生株で変わらなかったことから、*pcap2* 変異体内における PI(4,5)P₂ の蓄積は野生株と変わらないことが明らかとなった。

以上の結果から、PCaP2 は PI(4,5)P₂ の量や局在パターンに影響を与えるのではなく、PI(4,5)P₂ によるシグナルを負に調整する可能性が示唆された。

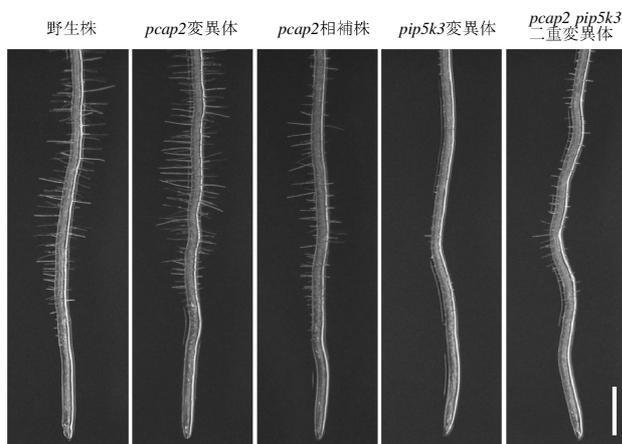


図1 シロイヌナズナ野生株および変異体の根毛 Bar = 1 mm

(2) 根毛伸長過程における PCaP2 の動態

根毛が伸長し停止するまでの間、PCaP2 および PI(4,5)P₂ がどのような動態を示すのか調べるため、PCaP2-GFP 融合タンパク質と PI(4,5)P₂ プローブを同時に発現する植物体を作製し、その根毛を経時的に観察した。既に報告にあるように、伸長中の根毛細胞では PI(4,5)P₂ プローブは根毛の先端領域の細胞膜上に観察された。このとき、根毛の先端領域の細胞膜上では PCaP2-GFP 蛍光は観察されないが、根毛先端から少し後方の側方領域において PCaP2-GFP 蛍光は細胞膜上に観察され PI(4,5)P₂ プローブと共局在した。根毛が伸長を停止すると、PI(4,5)P₂ プローブの先端への局在は徐々に薄れ、一方 PCaP2-GFP 蛍光は先端を含む細胞膜全体に局在した。伸長中の根毛先端では、細胞膜や細胞壁成分を先端へ運ぶため先端に向かってエキソサイトーシスが活発に起きることが知られている。一方、根毛の先端から少し後方の側方領域の細胞膜ではエンドサイトーシスが活発であることが観察されており、PI(4,5)P₂ は細胞膜上でエンドサイトーシスの制御に関わることが報告されている。これらのことから、PCaP2 は伸長中の根毛の側方領域において PI(4,5)P₂ と共局在することにより PI(4,5)P₂ の制御するエンドサイトーシスに関与する可能性が示唆された。

(3) in vivo における PCaP2 と PI(4,5)P₂ の相互作用

PCaP2 は PI(4,5)P₂ を含むホスホイノシチドと結合する(Kato et al., *Plant Cell Physiol.*, 2010)。しかし、植物の細胞膜上において PCaP2 が PI(4,5)P₂ と結合するかについては不明である。そこで、in vivo において PCaP2 が PI(4,5)P₂ と結合することを調べるため、競合実験を行った。エストラジオール転写誘導系を用いて PCaP2-GFP をシロイヌナズナ根において過剰に発現させ、細胞膜上に蓄積する PI(4,5)P₂ 結合タンパク質と競合するか調べた。PI(4,5)P₂ 結合タンパク質には、ラット PLC の PI(4,5)P₂ 結合ドメインである PH ドメインに赤色蛍光タンパク質 (mCHERRY) を付加した融合タンパク質 (PH-mCHERRY) を用いた。その結果、PCaP2 の転写誘導前は PI(4,5)P₂ 結合タンパク質である PH-mCHERRY はシロイヌナズナ根の分裂領域において細胞膜

上に局在するが、PCaP2 の転写誘導後は PCaP2-GFP が細胞膜上に蓄積し PH-mCHERRY はサイトゾルに蓄積した (図 2)。このことは、PCaP2 タンパクが細胞膜上の PI(4,5)P₂ と結合していた PH-mCHERRY と競合し、その結果、PCaP2 タンパクが細胞膜上の PI(4,5)P₂ と結合し PH-mCHERRY は細胞膜から脱離したことを示している。PCaP2 分子内の PI(4,5)P₂ 結合領域であるアミノ末端領域を欠失した改変 PCaP2 を同様に転写誘導系で発現させたところ、このような競合は観察されず、PI(4,5)P₂ 結合タンパク質は改変 PCaP2 の発現に関わらず、細胞膜上に局在した。また、PI(4,5)P₂ と同じく細胞膜に局在するホスホイノシチドであることが知られる PI(4)P について、同様に PI(4)P 結合タンパク質である FAPP1 タンパクを用いた競合実験を行ったが、PCaP2-GFP と PI(4)P 結合タンパク質には競合は見られなかった。以上の結果から、PCaP2 は細胞膜上の PI(4,5)P₂ と結合することが植物細胞において示された。

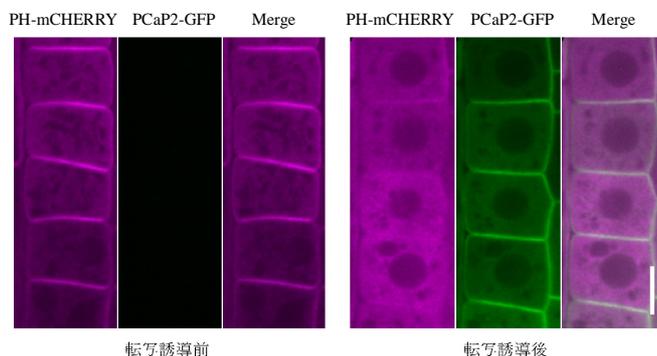


図 2 PCaP2タンパクとPI(4,5)P₂結合タンパクとの競合実験 Bar = 10 μm

(4) 根毛伸長過程における PCaP2 の生理的意義

伸長中の根毛細胞において、PCaP2 はエンドサイトーシスが起る根毛の側方領域の細胞膜上に蓄積し PI(4,5)P₂ と共存すること、および PCaP2 は細胞膜上の PI(4,5)P₂ と結合することが明らかとなった。根毛伸長過程における PCaP2 の生理的意義をさらに解析するため、転写誘導系を用いて PCaP2 を根毛細胞において過剰に発現させ、その影響を調べた。その結果、PCaP2 を過剰に発現する根毛細胞ではエンドサイトーシスが抑制されることが明らかとなった。これは PCaP2 分子内の PI(4,5)P₂ 結合領域であるアミノ末端領域を欠失した改変 PCaP2 を発現させた根毛細胞では見られなかった。これらの結果から、PCaP2 は PI(4,5)P₂ と結合することにより PI(4,5)P₂ に依るところのエンドサイトーシスを阻害することが明らかとなった。

以上の (1) ~ (4) の実験から、PCaP2 は根毛細胞の側方領域の細胞膜上で PI(4,5)P₂ と結合し PI(4,5)P₂ シグナルを負に制御すること、および根毛伸長を減衰する役割をもつことが明らかとなった。本研究により、これまで分かっていなかった根毛伸長を負に制御する機構の一端を明らかとなり、根毛機能を強化した高機能性植物体の作出のための基礎的知見を得ることができた。

< 引用文献 >

Kusano H, Testerink C, Vermeer JE, Tsuge T, Shimada H, Oka A, Munnik T and Aoyama T. The Arabidopsis phosphatidylinositol phosphate 5-kinase PIP5K3 is a key regulator of root hair tip growth. *The Plant Cell*, 20, 367-80 (2008).

Kato M, Nagasaki-Takeuchi N, Ide Y and Maeshima M. An Arabidopsis hydrophilic Ca²⁺-binding protein with a PEVK-rich domain, PCaP2, is associated with plasma membrane and interacts with calmodulin and phosphatidylinositol phosphates. *Plant Cell Physiology*, 51, 366-79 (2010).

Kato M, Aoyama T and Maeshima M. The Ca²⁺-binding protein PCaP2 located on the plasma membrane is involved in root hair development as a possible signal transducer. *The Plant Journal*, 74, 690-00 (2013).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Kato M, Tsuge T, Maeshima M and Aoyama T. Arabidopsis PCaP2 modulates the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signal on the plasma membrane and attenuates root hair elongations. *The Plant Journal*, in press (2019). doi: 10.1111/tpj.14226, 査読有

Hirano T, Konno H, Takeda S, Dolan L, Kato M, Aoyama T, Higaki T, Takigawa-Imamura H and Sato MH. PtdIns(3,5)P₂ mediates root hair shank hardening in Arabidopsis. *Nature Plants*, 4, 888-97 (2018). doi: 10.1038/s41477-018-0277-8, 査読有

[学会発表] (計 8 件)

Mariko Kato, Machiko Watari, Takashi Fujiwara, Takashi Aoyama; Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase genes, the PtdIns(4,5)P₂ producing enzyme, are responsible for pollen development in *Arabidopsis*. 第 60 回日本植物生理学会年会 (2019)

Taichi Kishimoto, Mariko Kato, Tomohiko Tsuge, Takashi Aoyama; Elucidation of the mechanism by which planar polarity is established for root hair development in *Arabidopsis thaliana*. 第 60 回日本植物生理学会年会 (2019)

Ryo Kuroda, Mariko Kato, Tomohiko Tsuge, Takashi Aoyama; Functional analysis of PIP5K7 and PIP5K8 in *Arabidopsis thaliana*. 第 60 回日本植物生理学会年会 (2019)

Tom Tsuge, Xiaojuan Zhang, Mika Nomoto, Marta Garcia-Leon, Naoki Takahashi, Mariko Kato, Masaaki Umeda, Vicente Rubio, Yasuomi Tada, Tsuyoshi Furumoto, Takashi Aoyama; Understanding CSN-mediated regulation through its interaction with RNA processing factors. 第 60 回日本植物生理学会年会 (2019)

加藤真理子, 柘植知彦, 前島正義, 青山卓史, 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, 第 59 回日本植物生理学会年会 (2018)

巨真智子, 加藤真理子, 柘植知彦, 青山卓史, B タイプ PIP5K の遺伝学的解析, 第 59 回日本植物生理学会年会 (2018)

黒田凌, 加藤真理子, 柘植知彦, 青山卓史, シロイヌナズナにおける PIP5K7 と PIP5K8 の機能解析, 第 59 回日本植物生理学会年会 (2018)

島村亮太, 谷口 (山本) 幸美, 加藤真理子, 柘植知彦, 青山卓史, シロイヌナズナ PLDζ1 および PLDζ2 の細胞内局在, 第 59 回日本植物生理学会年会 (2018)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~molbio/index.html>

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):

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。