

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03254

研究課題名（和文）重力シグナル伝達における鍵因子LZYの細胞内局在制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of intracellular localization of LZY, a key factor for gravity signaling in gravitropism

研究代表者

森田 美代 (Morita, Miyo)

基礎生物学研究所・植物環境応答研究部門・教授

研究者番号：10314535

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）：植物の重力屈性において、重力感受細胞における細胞内情報伝達すなわち重力シグナリングは、平衡石として働くアミロプラストの位置の認識から、オーキシン輸送の調節を繋ぐ重要なプロセスである。その分子機構は長い研究の歴史にもかかわらず、大きな謎として残されている。我々は、LAZY1-LIKE (LZY) family タンパク質とその相互作用因子RLDが、重力感受細胞内で機能し重力シグナリングの中核に関わることを示してきた。本研究では、LZYの細胞内局在制御と量的制御とに着目し、その制御メカニズムを追究することで、重力情報をPIN制御系に繋げる重力シグナリングの最上流の分子機構の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球上のすべての生物は重力の下で進化してきた。ほとんどの生物が重力を感知し、何らかの応答をしていると考えられている。植物は重力を感知して成長方向を制御する重力屈性を示す。長い歴史を持つにもかかわらず、植物の重力の感知と情報伝達の分子機構は解明されていない。重力屈性は、根を水分や栄養分が豊富な地中へ、地上部を光合成や生殖に有利な上方へと配置する役割を持つ。そして、他の環境要因と共に植物の生産性に関与するプラントアーキテクチャの制御を行うことから、育種の観点からも注目される形質である。重力屈性の分子機構の解明には、以上のような学術的・社会的意義が考えられる。

研究成果の概要（英文）：In plant gravitropism, intracellular signaling, or gravity signaling, in gravity-sensing cells is an important process that links the recognition of sedimentation of amyloplasts, which act as statoliths, to the regulation of polar auxin transport. The molecular mechanism remains unknown despite a long history of research. We have shown that LAZY1-LIKE (LZY) family proteins and their interacting factor RLD function in gravity-sensing cells and play a central role in gravity signaling. LZY protein is polarly localized to the plasma membrane of the lower side of the sensing cell upon gravi-stimulation. Meanwhile, LZY recruits RLD proteins to the plasma membrane from cytoplasm, leading to regulation of auxin transport. In this study, we investigated the molecular mechanisms of the subcellular localization and of quantitative regulation of LZY protein to understand the gravity signaling process.

研究分野：植物生理学

キーワード：重力屈性 重力感知 シロイヌナズナ シグナル伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物の重力屈性において、重力感受細胞における細胞内情報伝達すなわち重力シグナリングは、平衡石として働くアミロプラストの位置の認識から、オーキシン輸送の調節を繋ぐ重要なプロセスである。その分子機構は長い研究の歴史にもかかわらず、大きな謎として残されていた。我々は近年、LAZY1-LIKE (LZY) family タンパク質が、根、茎、胚軸すべての器官の重力感受細胞内において重力シグナリングの鍵因子として働くこと、また根の重力感受細胞においては LZY が相互作用因子 RLD とともに膜交通制御やオーキシン排出輸送体 PIN の制御を介してオーキシン極性輸送を調節する可能性が高いことを見出した。

### 2. 研究の目的

LZY3p::LZY3-mCherry は変異体の表現型を相補するが蛍光の検出はできず、タンパク質レベルが極めて低いか、代謝回転が早いことが推測された。この形質転換体の根端を固定・透明化して観察を行ったところ、根の重力感受細胞であるコルメラ細胞において、非常に弱い蛍光ではあるが細胞膜にシグナルが観察された。細胞膜上の LZY3-mCherry の蛍光は重力側に極性を持って配置しており、根を反転させて重力刺激を与えると 30 分以内に新たな重力方向への極性局在が確認された。また、LZY3-mCherry を重力感受細胞で過剰発現させると細胞膜に均等に局在して極性が失われ、重力屈性は異常となったことから、LZY の適切な量の制御が LZY の極性局在に重要であることが示唆された。そこで本研究では、重力方向によって極性が変化する LZY3 の細胞内局在制御機構と、LZY3 の量的制御機構を明らかにすることで、重力シグナリングの最上流の分子機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) LZY の細胞膜局在化機構の解明

LZY3 タンパク質には、膜貫通領域等の明確な膜局在化ドメインは存在しないが、リジンリッチな正電荷をもつと予想される領域やパルミトイル化を受ける可能性があるシステインが複数存在する。これらの領域に変異を導入し、細胞内局在と機能への影響を確認することで、細胞膜局在の責任ドメインを調べる。また、LZY と結合する細胞膜脂質を明らかにし、感受細胞内での当該脂質の分布について脂質マーカーを用いて調べる。

#### (2) LZY の細胞内局在制御機構の解析

LZY3-mCherry の重力感受細胞でのライブイメージングは、形質転換体を慎重に選抜し、高感度の EM-CCD カメラを搭載した垂直ステージ共焦点顕微鏡下でようやく微弱な蛍光の検出が可能になった。LZY3-mCherry は細胞膜に加えアミロプラストの周辺にも確認された。重力刺激を与えると LZY3-mCherry は、アミロプラストの移動とともに新たな重力側に移動し、やがて新たな重力側の細胞膜に移行するような挙動が観察されたが、蛍光が微弱であるため再現性が低く、すぐに消光するため短時間しか観察できなかった。そこで LZY3 以外の重力シグナリングに関わる LZY family タンパク質でもこのような挙動が確認されるかを調べるために、機能的な LZY 可視化形質転換体の確立を目指した。可視化システムを用いて、ライブイメージングを行い、アミロプラスト局在や、細胞膜局在の重力応答が観察できるかどうかを確認する。また、LZY の細胞内局在に関連する要因を探るために、薬理的解析を行う。更に、アミロプラストに影響を与える重力屈性関連遺伝子の変異体背景で、LZY の細胞内局在への影響を調べる。

#### (3) LZY の量的制御機構の解析

LZY3p::LZY3-mCherry はプロテアソーム阻害剤 MG-132 の添加により蛍光が検出できることから、通常は早い代謝回転によりタンパク質量が低く抑えられている可能性が示唆された。感受細胞特異的プロモーター制御下で発現するエストラジオール誘導系を用いた解析から、LZY3-mCherry が過剰量になると重力側への極性局在が失われ、根の伸長方向が乱れることが分かっている。そこで、LZY3 はプロテアソーム依存的タンパク質分解による量的制御を受け、この制御は LZY3 の細胞内局在にも影響を与えるという作業仮説を立てた。LZY のユビキチン化について生化学的解析を行う。

根の重力屈性に関わるユビキチン E3 リガーゼとして WAVY GROWTH 3 (WAV3) family 遺伝子が報告されている。WAV3 の機能欠損変異体では重力屈性能が亢進するが、family 遺伝子の多重変異体では根の伸長方向がランダムになることが報告されている。従って、ユビキチン-プロテアソーム系で機能する WAV3 family が LZY の量を負に調節する因子として植物の重力シグナリングに関わるという作業仮説が考えられた。そこでまず、WAV3 family 遺伝子の機能欠損が LZY の量に与える影響を調べる。

### 4. 研究成果

#### (1) LZY の細胞膜局在化機構の解明

## プロトプラストを用いた解析

LZY3-mCherry について変異導入を行なった。LZY3 には 2 箇所の正電荷領域が認められ、これら領域のリジン及びアルギニンをグルタミンに置換したシリーズを作成した。細胞内局在への影響を調べるために、簡易な実験系としてプロトプラストでの一過性発現系を用いた。その結果、貢献度に差はあるものの、いずれの領域も細胞膜局在に一定の役割を持つことが示唆された。なお、プロトプラスト作出に葉肉細胞を用いたため葉緑体存在下での局在試験となったが、LZY3-mCherry が葉緑体周縁部に局在する様子はほとんど観察されなかった。この結果は、LZY が葉緑体にターゲットされる機構あるいは葉緑体が LZY を集積する機構が、葉肉細胞には存在しないことを示唆しているのかもしれない。またこの結果から、LZY がアミロプラスト周縁部に局在するための責任領域を調べるには、プロトプラストは系として適さないことも示している。

## LZY3p:LZY3-mCherry/lzy1 lzy2 lzy3 を用いた解析

上述の変異 LZY3-mCherry を *lzy* 変異体に形質転換し、全てについて形質転換体の作出を行った。得られた形質転換体を用いて、コルメラ細胞での細胞膜局在を調べるとともに、変異 LZY3-mCherry が変異体表現型を相補し得るかを調べた。系統確立前の予備的な結果ではあるが、2 箇所の内 C 端側の領域に変異を導入した場合、細胞膜局在が失われるとともに、根の伸長方向に異常が見られたことから、この領域が細胞膜局在の主な責任領域であること、細胞膜局在は LZY3 の機能に重要な役割を持つ可能性が示唆された。N 端側の領域は、単独では細胞膜局在に大きな影響を与えないようだが、補助的な役割を持つことが示唆された。また、N 端側の領域に変異導入を行なった LZY3-mCherry の蛍光強度が上昇していたことから、この領域にタンパク質の量的制御に関係する配列が存在する可能性が示唆された。

## コルメラ細胞における PIP の局在解析

*in vitro* 試験から、LZY3 が 2 種のホスホイノシチド (PIP) と結合することを見出した。これらの PIP を検出する蛍光マーカーを発現するシロイヌナズナを取り寄せ、コルメラ細胞を観察したところ、おそらくサイレンシングの影響と思われるが、蛍光観察が困難であった。観察しにくい状況ではあるが、この系統を用いた場合、これら PIP は細胞膜に局在が見られ、重力刺激に影響を受けることは無さそうであった。より明確な蛍光像を得るため、コルメラ細胞特異的のプロモーターを用いてこれらマーカーを改めて作成し、野生型背景の形質転換体の確立を進めている。

## (2) LZY の細胞内局在制御機構の解析

花茎内皮細胞で機能する LZY1、根のコルメラ細胞で機能する LZY4 について、自身のプロモーターの制御下で mClover, mScarlet を融合したタンパク質をそれぞれ発現する形質転換体を作成した。

LZY1 に関しては、開始コドン上流でのプロモーターとの連結に制限酵素部位を導入することで、変異体表現型の相補能を失うこと、N 末端および C 末端に蛍光タンパク質を融合すると相補能を失うことなどが、形質転換体作成により明らかになり、相補系統の作出に困難を極めた。ゲノム断片を用いた相補性試験には成功していることから、この断片を用いてゲノムコンテキストでの融合タンパク質作成を試みた。Yoshihara らによって報告された機能的 LZY1-GFP の GFP 挿入部位を参考に、タンパク質内部に mClover を挿入し、相補株を得ることができた。しかしながら、地上部重力感受細胞である内皮細胞で蛍光は検出できなかった。おそらく、分解制御によりターンオーバーが早く、タンパク質量が非常に低く抑えられていると推測される。

一方、LZY4p:LZY4-mScarlet は順調に形質転換体の作成が進み、系統確立を行い変異体表現型の相補能も確認した。若干過剰相補の様子を示したが、コルメラ細胞での蛍光観察の可能な系統を複数確立することができた。この LZY4p:LZY4-mScarlet の形質転換体を用いて、垂直ステージ共焦点顕微鏡を用いたコルメラ細胞における LZY4 のライブイメージングに成功した。LZY4-mScarlet の蛍光は、アミロプラスト周縁部を縁取るような円形のシグナルと、アミロプラストが近接している (即ち重力側) 細胞膜上のシグナルとして観察された。蛍光強度は必ずしも高くはないが、LZY3-mCherry での観察よりもはるかに明瞭なシグナルが観察され、タイムラプス観察も可能であった。重力刺激後、アミロプラストが約 5 分で新たな重力側に沈降すると、アミロプラストに近接する新たな重力側の細胞膜上に LZY4-mScarlet のシグナルが 10 分以内には明確に出現した。ほぼ同時に、元の重力側の細胞膜上の LZY4-mScarlet のシグナルは消失した。この間、アミロプラスト上の LZY4-mScarlet のシグナルのパターンおよび強度には大きな差は見られなかった。アミロプラストは重力センシングに平衡石として極めて重要な役割を持つこと、アミロプラストの移動と LZY4-mScarlet の極性形成がほぼ同時期に起こることから、LZY はアミロプラストの位置情報を細胞膜に伝達する情報分子そのものである可能性が高い。この作業仮説を検証するために、光変換蛍光タンパク質を用いて LZY4p:LZY4-FP の動態を更に詳細に解析することを目指し、形質転換体の確立を進めている。また、この解析に必要な垂直ステージ共焦点顕微鏡に装着可能な光照射装置を導入し、観察条件の検討を進めている。

LZY の細胞内局在に影響を与える細胞内要素を概観するために、LZY3p:LZY3-mCherry の根に、細胞骨格、タンパク質脂質修飾、タンパク質リン酸化、タンパク質分解等の阻害剤を作用させ、LZY3-mCherry への影響を調べた。効果が見られたいくつかの薬剤に関しては、今後薬剤処理濃度、時間、重力刺激の有無などを更に検討する。

*pgm*, *mar1*, *mar2*, *sgr9* はアミロプラストに影響を与える重力屈性関連遺伝子の変異体である。観察の容易な LZY4p:LZY4-mScarlet をこれら変異体背景に導入し、LZY の細胞内局在への影響を調べる目的で、交配及び系統確立を進めている。*pgm* については先行して観察ができた。*pgm* は phosphoglucomutase の欠損変異体で色素体にデンプンを蓄積できないため、アミロプラストが十分に沈降せず重力屈性が減弱する。*pgm* においてコルメラ細胞のアミロプラストは不定形であるが、変形したアミロプラスト周縁部に LZY4-mScarlet シグナルが観察された。アミロプラストは重力方向にとどまらず、個々が浮遊するような挙動を示し、細胞膜上の LZY4-mScarlet シグナルには極性が見られなかった。この結果は、LZY の極性局在には、アミロプラストが正常に沈降することが重要であることを示している。

### (3) LZY の量的制御機構

LZY3p:LZY3-mCherry の蛍光は MG132 添加により増強することから、LZY3 はユビキチン-プロテアソームによる分解によって量的制御を受けていると推測された。実際に植物体内で LZY3-mCherry がユビキチン化を受けるかを、MG132 処理後の植物抽出液を抗ユビキチン抗体や抗 mCherry 抗体を用いて濃縮し、検出することを試みた。しかし、LZY3p:LZY3-mCherry の形質転換体では検出限界以下であった。発現部位がコルメラ細胞に限定されており発現量も低いことから、検出が困難であると考えられた。そこでユビキチンに発現させる G10-90 プロモーターもしくは感受細胞特異的に発現させる ADF9 プロモーターを用いた発現誘導系により、LZY3-mCherry を過剰に発現させる形質転換体を作成し利用することにした。G10-90 による発現誘導かつ MG132 処理下で僅かに LZY3-mCherry のユビキチン化が検出されたが、再現性において問題があり、さらなる検討が必要である。

ユビキチン-プロテアソーム系で機能する WAV3 family が LZY の量を負に調節する因子として機能する可能性が考えられたため、*wav3*, *wavh1*, *wavh2*, *eda40* について単独変異体、多重変異体を作成し、LZY3p:LZY3-mCherry を交配により導入した。多重変異体は根の伸長方向や成長に明確な表現型を示したが、LZY3p:LZY3-mCherry の蛍光強度に大きな変化は無かった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 西村岳志、中村守貴、森田（寺尾）美代	4. 巻 54
2. 論文標題 重力屈性における重力感受とシグナリングのメカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 植物の成長調節	6. 最初と最後の頁 102-107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Nakamura, M., Nishimura, T., Morita, M.T.	4. 巻 52
2. 論文標題 Bridging the gap between amyloplasts and directional auxin transport in plant gravitropism.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr. Opin. Plant Biol.	6. 最初と最後の頁 54-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pbi.2019.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura, M., Nishimura, T., Morita, M.T.	4. 巻 70
2. 論文標題 Gravity sensing and signal conversion in plant gravitropism.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Exp. Bot.	6. 最初と最後の頁 3495-3506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erz158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Furutani, M., Hirano, Y., Nishimura, T., Nakamura, M., Taniguchi, M., Suzuki, K., Oshida, R., Kondo, C., Sun, S., Kato, K., Fukao, Y., Hakoshima, T., Morita, M.T.	4. 巻 76
2. 論文標題 Polar recruitment of RLD by LAZY1-like protein during gravity signaling in root branch angle control.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13729-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Furutani, M. and Morita, M.T.	4. 巻 187
2. 論文標題 LAZY1-LIKE-mediated gravity signaling pathway in root gravitropic set-point angle control.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 1087-1095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang, L., Li, D., Yang, K., Guo, X., Bian, C., Nishimura, T., Le, J., Morita, M.T., Bergmann, D., Dong, J.	4. 巻 13
2. 論文標題 Connected function of PRAF/RLD and GNOM in membrane trafficking controls intrinsic cell polarity in plants.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27748-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2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 西村岳志、古谷将彦、森田 (寺尾) 美代
2. 発表標題 オーキシン輸送制御に関わるRLDの形態形成と重力屈性における作用機構
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyo Terao Morita
2. 発表標題 LAZY1-LIKE mediated gravity signaling pathway in root gravitropic set-point angle control.
3. 学会等名 Plantae Webinar Series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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、檜垣匠、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年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森祥伍, 中村 守貴, 押田龍一郎, 西村 岳志, 古谷 将彦, 森田(寺尾)美代
2. 発表標題 The effects of LZY3 expression level on its subcellular localization and gravitropism.
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020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
研究協力者	古谷 将彦  (Furutani Masahiko)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	西村 岳志  (Nishimura Takeshi)		
研究協力者	四方 明格  (Shikata Hiromasa)		
研究協力者	森 祥伍  (Mori Shogo)		
研究協力者	中村 守貴  (Nakamura Moritaka)		
研究協力者	川本 望  (Kawamoto Nozomi)		

## 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			
米国	The State University of New Jersey	Stanford University	Howard Hughes Medical Institute	
中国	中国科学院大学	福建農林大学		
スイス	University of Lausanne			