

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23760

研究課題名(和文)道管分化誘導系を用いた細胞膜マイクロドメイン形成開始機構の解析

研究課題名(英文) Analysis on micro domain formation during xylem differentiation using in vitro differentiation system

研究代表者

藤田 智史 (Fujita, Satoshi)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・博士研究員

研究者番号：50844099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の中には、多数の微細構造物が存在しそれぞれの機能や形態が連携して細胞活性を支えている。その中でも細胞の表面は細胞膜が二次元平面を提供し多数の分子が集積しやすい状況を作っている。細胞膜上にはすべての分子が均一に存在するだけでなく、微小な領域に集積しドメインを作るが多くの場合このドメインにどれだけ多数の種類分子が集積しているのかについては不明である。本研究では、土壌から栄養や水を運搬する道管細胞の微小ドメインについて解析を試みた。現時点では材料を作成する段階でいくつかの問題が生じているが、その問題をこれまでの技術を用いることにより解決を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞には、タンパク質だけでも数千、数万種類の分子が存在し、それぞれが適切な時に、適切な場所に配置されると考えられている。これまでに数え切れない種類の分子が蛍光タグを用いて可視化することで時空間的にどのような挙動をするかが調べられてきた。そこで本研究ではproximal labeling法を適用することにより、微小空間にどのようなタンパク質が局在をしているのかを網羅的に同定することを試みた。今回は、材料を確立することに終始したが、同時に本法の適用範囲に関して深く考える必要があることが示唆された。植物細胞に新技術を適用する試みとしては意義深いものであると考えている。

研究成果の概要(英文)：In cells, numerous subcellular structures sustain cellular activities by their functions or shapes. In such contexts, the plasma membranes provide a vast area of 2D space for molecules to accumulate on the cell surfaces. Many proteins reside on the plasma membranes ubiquitously, but several specific molecules have been reported to establish microdomains on the plasma membranes. Although these microdomains attract many researchers, it is still unclear what kind of factors reside together in the specific microdomains. To approach this question, I planned to have a biochemical screen that allows us to maintain spatial information in the cells. More specifically, I focused on xylem cells which have clear microdomains on their cell surfaces. In this project, I focused on generating transgenic lines but still several issues to be overcome for comprehensive analysis.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：植物 細胞壁 リグニン マイクロドメイン

1. 研究開始当初の背景

植物の細胞壁は主にセルロースやペクチン、ヘミセルロースといった多糖のポリマー、もしくは多数のタンパク質からなる構造物で植物の細胞外空間を占める。細胞壁空間は、この構造は細胞同士をつなぐのと同時に、植物細胞の膨圧に耐えうるだけの機械的強度を細胞に与えつつ、個別の細胞の形や器官全体の発生に影響を与える。すなわち、細胞は、細胞外に蓄積する細胞壁構成物の化学的性質だけでなく物理的性質の調節も通じてその形状を調節している。細胞の形状は時にその機能と密接に関連していることが知られている。たとえば土壌から無機栄養を吸収する上で重要な根毛は根の表皮細胞が細胞のごく一部の細胞壁の性質を細胞内から制御することで先端成長を可能にしている。

細胞壁の変化は多くの場合、細胞内からの制御による。細胞壁パターンを制御する細胞内制御因子の一つとして ROP (Rho of plants) small G タンパク質がある。このタンパク質は細胞膜上にマイクロドメインを形成することで、細胞壁パターンの制御を行うことが知られている。このマイクロドメイン形成に関しては、植物の維管束を構成する道管、特に後生木部道管とよばれる細胞で研究が進んでいる。木部細胞は顕著にリグニン化される細胞であるが、生物種、または細胞種によりそれぞれ特徴的なパターンをもってリグニンの蓄積パターンをとる。シロイヌナズナにおいて後生木部道管は、表面のほとんどがリグニン化されるが、壁孔と呼ばれる部分はリグニン化を受けず、周りの道管細胞との物質移動の通路となっていると考えられている。この壁孔部分では、微小管を脱重合する因子が局所的に活性化され植物の細胞膜直下に存在する表層微小管のネットワークが排除されている。この MIDD1 の活性化範囲は ROP ドメインにより決定される。

ROP small G タンパク質による細胞膜上のマイクロドメイン形成は ROP6 およびその活性化・不活性化因子とのフィードバックループによって形成されることが遺伝学および異所的な再構築系により示されている (Oda et al.)。しかしながらこの再構築系では活性化因子は恒常的活性型を用いる必要があり、このフィードバックループを開始・維持するために何らかの上流活性化因子が必要であることを示唆している。そこで、本研究では壁孔マイクロドメインに存在するタンパク質を網羅的に同定することで壁孔形成の制御機構および壁孔の性質をより深く理解することを目指した。これまでに ROP シグナル伝達系は受容体キナーゼを活性化因子とすることが多いことから、受容体キナーゼはこのシグナル伝達系でも一つの大きな候補となる。ここでは proximal labeling 法による網羅的解析、トランスクリプトームに基づいた逆遺伝学的解析で ROP を活性化する機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、植物細胞においてマイクロドメインの形成を開始・維持するシグナル伝達機構を明らかにすることをめざした。そのためにモデルとして局所的に鮮明なマイクロドメインを形成する後生木部道管細胞をモデルとして研究を進めた。後生木部道管の壁孔は形態学的にはっきりとした特徴が染色なしに光学顕微鏡によりとらえられる一方でその壁孔の特徴を分子レベルで詳細に記述できる状態には程遠い。道管特異的に発現する遺伝子の中から MIDD1 と呼ばれる分子が壁孔ドメインに局在することが同定され、これをきっかけに ROP small G タンパク質によるシグナルが同定された。さらに道管で特異的に発現する遺伝子の一つずつ顕微鏡下で局在を確認することにより壁孔内および壁孔外に局在する遺伝子、たとえば BDR や CORD などの遺伝子が同定されてきた (Sasaki et al. Sugiyama et al.)。しかしながらこれらの分子だけでは壁孔の形成や維持、その機能を説明することはいまだ困難な状況である。そこで本研究では、後生木部道管にみられる壁孔マイクロドメインに特異的に局在するタンパク質を網羅的に同定し、このマイクロドメインを包括的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

道管の壁孔にはそのドメインの維持や機能に関わる未知の因子が多数存在すると考えられる。これらのタンパク質を網羅的に同定することは、後生木部道管における壁孔の機能を理解するだけでなく、一般にマイクロドメインの性質を理解するうえでも非常に有益であると考えた。しかしながら、道管細胞は分化後すぐに細胞死してしまうため植物個体のごくわずかな細胞のみが注目しているステージに属すると考えられるため、生化学的な網羅的解析には好適な材料とはいいがたい。この点を克服するために、今回注目する後生木部道管細胞を分化誘導系の培養細胞を使用することにより、大量に得ることを考えた。

所属研究室では、シロイヌナズナ培養細胞に VND7 (Vascular NAC domain 7) をエストロジオールにより誘導的に発現させることで高い効率で後生木部道管様細胞を得る系が確立されており、後生木部道管細胞を大量かつ高い純度で得ることが可能になっていた。これにより、生化学

の解析に十分な量の材料を得ることができると考えた。

大量の材料を得ることは分化誘導系の培養細胞を用いることにより解決できると考えられたが単純にこの分化誘導した細胞を生化学的に分画し解析を行ったとしても、それぞれの膜分画のマイクロドメインに絞り込むことは困難である。そこで、本研究では壁孔ドメインに局在するタンパク質である MIDD1 を利用して、そのドメインに局在するタンパク質を網羅的に同定することを考えた。近年になって、動物細胞や酵母では細胞膜の subdomain やオルガネラ間の接触部位など微小な領域に局在するタンパク質を同定するために proximal labeling 法が開発・改良されている。この方法は変異を導入することで基質特異性を劇的に低下させた大腸菌の biotin ligase を用い周囲 10 nm のタンパク質を非特異的にビオチン化する。その一種である TurboID (Branon et al. 2017) を壁孔のマイクロドメインに均一に局在する MIDD1 N に融合し、道管に分化誘導した培養細胞に発現させることでこのマイクロドメインに存在するタンパク質を網羅的にビオチン化することを考えた。この方法は植物においても既知の相互作用を確認できていることから、適用は可能であると考えた。さらにこの方法の利点として免疫沈降と異なり、複合体を形成せずとも周囲のタンパク質を網羅的に同定することが可能である(図1)。

この細胞を一過的にビオチンで処理し、壁孔マイクロドメインのみでタンパク質のビオチン化を誘導する。膜分画のビオチン化タンパク質に結合するストレプトアビジンビーズで濃縮させ質量分析により同定する。壁孔の対照として細胞膜全体に局在する膜タンパク SYP122 を用いることを計画した。。ここで得られた候補因子から、培養細胞及びタバコでの一過的発現系で壁孔マイクロドメインに局在するものを選抜し、個体を用いて変異体解析や局在解析を行う。

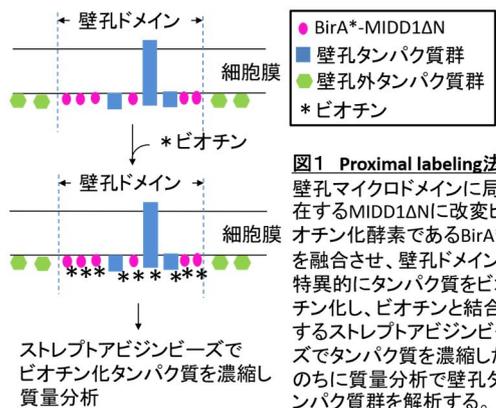


図1 Proximal labeling法
壁孔マイクロドメインに局在するMIDD1ΔNに改変ビオチン化酵素であるBirA*を融合させ、壁孔ドメイン特異的にタンパク質をビオチン化し、ビオチンと結合するストレプトアビジンビーズでタンパク質を濃縮したのちに質量分析で壁孔タンパク質群を解析する。

4. 研究成果

検討した事項

後生道管細胞における壁孔ドメインをより理解するために、そのドメインに局在するタンパク質を網羅的に同定するための材料づくりを行った。誘導的に道管細胞に分化させることができる培養細胞および植物個体の作出を試みた。ここでは上で述べた Proximal labeling によるスクリーニングを行うため、壁孔ドメインにのみ局在する MIDD1 N タンパク質に GFP-TurboID を融合させたコンストラクトを作成し、形質転換を試みた。植物個体には道管特異的なプロモーターである pIRX3 を用い、MIDD1 N(壁孔部分に存在)SYP122(細胞膜全体に局在)を GFP-TurboID に融合し、植物体に発現させた。形質転換した植物個体は後生木部細胞においては期待通りにパッチ状の局在を示し同時に、前生木部細胞においてもリグニンの蓄積と相互排他的な局在が見られた。しかしながら発現量が非常に低くまた発現する細胞が非常に限られたため(これは分化後に細胞死を起こす道管の性質に起因する)、生化学的解析には不向きであると考えられた。一方 SYP122 は細胞膜への局在も観察されたものの、一部は細胞内で凝集しているように見受けられた(図2)。

大量に材料を得るために木部に形質転換可能な培養細胞にも形質転換を試みたが、形質転換を得られなかった。培養細胞においては、UBQ10 プロモーターを用いたコンストラクトをシロイヌナズナ培養細胞に形質転換することをまず試みた。数度の形質転換にもかかわらず、非常に限られた数の細胞のみが蛍光を示し、抗生物質によって細胞選抜を行うまでに至らなかった。そこで異なる恒常的発現するプロモーターである 35S プロモーターもしくは G10-90 プロモーターを用いた誘導系を用いるコンストラクトで同様の植物の形質転換を試みた。しかしながらこれらのコン

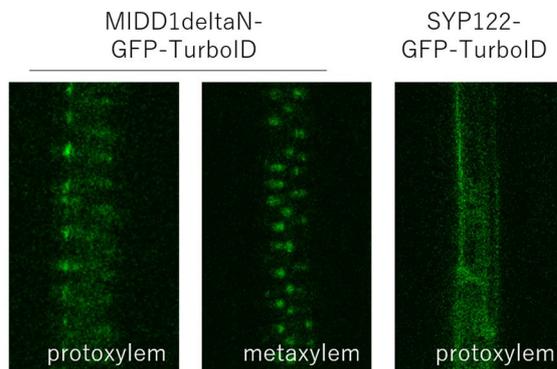


図2 TurboID 融合タンパク質の局在パターン
MIDD1deltaNは非リグニン化ドメインに局在し、SYP122は細胞膜及び細胞内に見られる。

ストラクトを用いても、形質転換培養細胞を樹立することができなかった。この時点で、培養細胞を材料とするのではなく植物体を最適化することが現時点で最適であると考えられる。

植物体で本法を適用するための一番の障害はその発現する細胞数であると考えられた。そこで現時点では、VND7 を誘導的かつ全身的に発現する植物体と掛け合わせて、発現する細胞を増やすことを考えている。

総説の執筆

以上の検討に加えてドメイン化したリグニンに関して総説を執筆した。リグニンは道管に蓄積することで植物の器官に物理的強度を与えるだけでなく、その物理化学的性質を利用して細胞外で小分子の運動を制限するバリア機能を細胞壁に与える。

植物はたとえば水分が体内に保たれるよう葉の表面にクチクラを形成する。これは細胞外バリアの一種であり、細胞外での小分子の動きを細胞外での移動を制限することで個体全体の恒常性維持に寄与する。リグニンは機能的なカスパリー線形成に必要である。この構造は受容体ペプチドシグナル伝達経路を介したシグナル伝達経路により形成が促進され、この経路は、細胞外での局所的な活性酸素の発生、および細胞壁関連遺伝子の転写変化を介して、局所的かつ連続的なリグニンの蓄積を引き起こす。Leucine-rich repeat receptor like kinase である SGN3 受容体が硫酸化ペプチドである CIFs を受容したのち、細胞質キナーゼである SGN1 を介して活性酸素の発生および、転写変化を活性化する。活性酸素発生亢進は、SGN1 が NADPH oxidase である SGN4 をリン酸化することにより活性化し、カスパリー線近傍のみで引き起こされることにより適切な範囲でのリグニン蓄積を可能にしている。また核へのシグナルは MAPK cascade を通じて引き起こされ、このシグナルにより足場タンパク質である CASPs の転写を活性化することでカスパリー線の連続性を保証すると同時に様々な細胞壁関連の遺伝子を制御することで正常で機能的なカスパリー線の形成を達成する。

このように、根の内皮細胞は SCHENGEN 経路を通じてカスパリー線に局所的にリグニンを蓄積する。本研究課題で特に着目している道管とはリグニンが蓄積する仕組みとは全く異なる仕組みでリグニンを蓄積していると考えられている。しかしながら、リグニン化ドメインに小胞を輸送する仕組みは一部共通の仕組みを使っていることが複数の論文から示唆されている。今回執筆した総説の中で、その仕組みを比較しながら論じた。カスパリー線形成は膜タンパク質である CASP タンパク質を足場として起こると考えられている。このリグニン化されるドメインの正常な形成には EX070A1 と呼ばれる exocyst 複合体の機能が必須であるが、この複合体は同時に道管のリグニン化にも必要とされる。道管の場合、この複合体が表層微小管をターゲットとしていることが示されているが、カスパリー線の場合は未だ不明な点が多い。本科研費に関連して、この点についても総説の中で議論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okuda Satoshi, Fujita Satoshi, Moretti Andrea, Hohmann Ulrich, Doblas Veronica G., Ma Yan, Pfister Alexandre, Brandt Benjamin, Geldner Niko, Hothorn Michael	4. 巻 117
2. 論文標題 Molecular mechanism for the recognition of sequence-divergent CIF peptides by the plant receptor kinases GS01/SGN3 and GS02	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 2693 ~ 2703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1911553117	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 Doll N. M., Royek S., Fujita S., Okuda S., Chamot S., Stintzi A., Widiez T., Hothorn M., Schaller A., Geldner N., Ingram G.	4. 巻 367
2. 論文標題 A two-way molecular dialogue between embryo and endosperm is required for seed development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 431 ~ 435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aaz4131	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 Fujita Satoshi, De Bellis Damien, Edel Kai H, Koster Philipp, Andersen Tonni Grube, Schmid Siegert Emanuel, Denervaud Tendon Valerie, Pfister Alexandre, Marhavy Peter, Ursache Robertas, Doblas Veronica G, Barberon Marie, Daraspe Jean, Creff Audrey, Ingram Gwyneth, Kudla Jorg, Geldner Niko	4. 巻 39
2. 論文標題 SCHENGEN receptor module drives localized ROS production and lignification in plant roots	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019103894	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 Rojas-Murcia Nelson, Hematy Kian, Lee Yuree, Emonet Aurelia, Ursache Robertas, Fujita Satoshi, De Bellis Damien, Geldner Niko	4. 巻 117
2. 論文標題 High-order mutants reveal an essential requirement for peroxidases but not laccases in Casparian strip lignification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 29166 ~ 29177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2012728117	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田智史、Niko Geldner
2. 発表標題 極性をもったSGN1の局在が細胞外空間でのROS産生領域を限定する
3. 学会等名 第83回植物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田智史、Niko Geldner
2. 発表標題 局所的なリグニン蓄積の分子機構
3. 学会等名 細胞壁ネット研究会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------