

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05962

研究課題名(和文) 表層微小管重合と二次細胞壁成分分泌におけるFAB1の新機能の解明

研究課題名(英文) Novel function of FAB1 in secondary cell wall element secretion and cortical microtubule polymerisation

研究代表者

平野 朋子 (Tomoko, Hirano)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：20724496

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、花粉管、トライコーム、気孔と表皮細胞など複雑で特殊な形態をもつ植物細胞の形態形成のために必須な三大要素は、細胞骨格である「アクチン」と「表層微小管」の配向、及び「二次細胞壁」の形成である。我々は、「表層微小管の重合」と「二次細胞壁成分の分泌」の両者を同時に制御する分子がホスファチジル3リン酸5キナーゼ、FAB1であることを突き止めた。しかし、「FAB1が、どのように表層微小管の重合を助けているか？」そして、「FAB1が形成するエンドソームに積み荷された二次細胞壁成分がどのように運ばれているか？」が不明であった。本研究により、我々は、二次細胞壁成分の分泌機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の細胞壁のうち、すべての細胞に存在する一次細胞壁は、柔軟性を持ち、細胞が成長する過程で拡大・伸長し、細胞のかたち作りを様々な機構で制御している。これに対し、二次細胞壁は、植物や植物細胞の形を維持したり、硬さや頑強さを与えたりする役割をもつ。したがって、植物の細胞分裂や形態形成において中心的に働く微小管の生成機構や、植物に頑強さを与え、かつ、伸長抑制に働くことで、形態形成を担う二次細胞壁の形成過程・機構を理解することは、真に植物の成長を理解することである。また、我々が資源としている木質バイオマスの大半が二次細胞壁に由来するため、本研究は、応用的側面にも大きな意義も持つ。

研究成果の概要(英文)：The three essential elements for the complex and specialised morphogenesis of plant cells such as root hairs, pollen tubes, trichomes, stomata and epidermal cells are the orientation of the cytoskeleton 'actin' and 'cortical microtubules', and the formation of 'secondary cell walls'. We found that phosphatidyl 3-phosphate 5-kinase, FAB1, is a molecule that simultaneously regulates both the polymerisation of cortical microtubules and the secretion of secondary cell wall components. However, "how does FAB1 assists in the microtubule polymerisation?" and "how the secondary cell wall components are secreted by the FAB1-endosomes?" remained unknown. This study elucidates the secretion mechanism of secondary cell wall components.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：FAB1 根毛 二次細胞壁成分の輸送 後期エンドソーム 表層微小管

## 1. 研究開始当初の背景

FAB1 は、表層微小管の重合と二次細胞壁成分の分泌の両者を同時に制御する。

植物細胞は、根毛、花粉管、トライコーム、気孔と表皮細胞など複雑で特殊な形態を形成することによって、単細胞でも器官を形成することができる。このように、多様で複雑な植物細胞の形態形成のために必須な三大要素は、細胞骨格である「アクチン」と「表層微小管」の配向、及び「二次細胞壁」の形成である(図1)。すなわち、アクチン繊維は細胞内で活発に重合することによって、細胞膜を外側に突き出す力を生み出す。一方、表層微小管は、細胞膜直下に細胞の伸長方向と垂直に並び、細胞に“たが”をはめて成長を抑制する。細胞ドメインの伸長の促進と抑制の組み合わせによってできた細胞形態は、抑制ドメインに、堅さを与える二次細胞壁が肥厚することによって維持され、その結果、複雑な細胞の形が決定される。表層微小管がセルロース合成酵素の配置を決めることでセルロース繊維の配向が決まり、セルロース繊維の間に、ゴルジ体で合成されるリグニンやキシランなどが細胞外に分泌されることによって、二次細胞壁が形成されることが知られている。しかし、どのように分泌されるかについては不明であった。

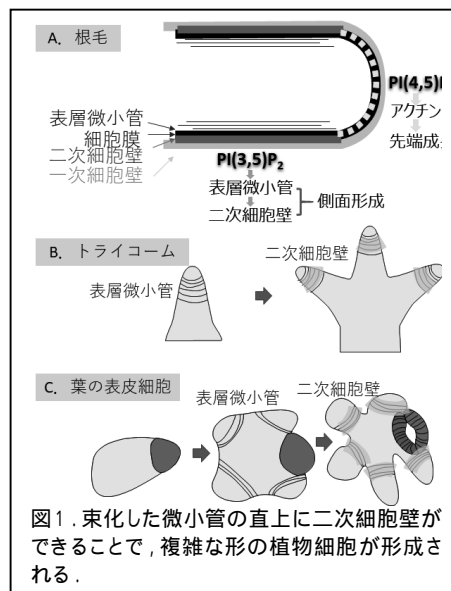


図1. 束化した微小管の直上に二次細胞壁ができることで、複雑な形の植物細胞が形成される。

表層微小管がセルロース合成酵素の配置を決めることでセルロース繊維の配向が決まり、セルロース繊維の間に、ゴルジ体で合成されるリグニンやキシランなどが細胞外に分泌されることによって、二次細胞壁が形成されることが知られている。しかし、どのように分泌されるかについては不明であった。

我々は、ホスファチジル 3 リン酸 5 キナーゼである FAB1 は、ホスファチジルイノシトール三リン酸[PI3P]から PI(3,5)P<sub>2</sub> を合成することで (Hirano et al., *Plant Physiol.* 2011), 前期エンドソームから後期エンドソームに成熟させ (Hirano T, Sato MH. *Plant Signal Behav.* 2011), 後期エンドソームの一つである FAB1 エンドソームに積み荷したキシランやリグニンが微小管のレールを伝って細胞

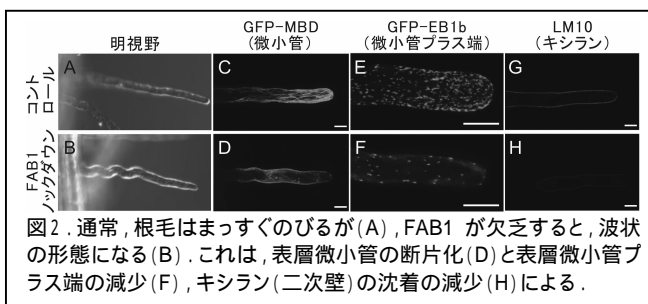


図2. 通常、根毛はまっすぐのびるが(A), FAB1 が欠乏すると、波状の形態になる(B)。これは、表層微小管の断片化(D)と表層微小管プラス端の減少(F)、キシラン(二次壁)の沈着の減少(H)による。

膜に行きつき、細胞外に分泌されることを見出した (Hirano et al., *Plant Physiol.* 2015)。また、FAB1/PI(3,5)P<sub>2</sub> が欠乏すると、後期エンドソームが形成されず、二次細胞壁の沈着が減少するだけでなく、表層微小管のプラス端が消失し、表層微小管繊維が破壊されたまま構築できず、根毛のチューブ状の形態形成に異常が生じることから、「FAB1/PI(3,5)P<sub>2</sub> が後期エンドソーム、二次細胞壁の形成、表層微小管を同時に制御することで、植物細胞の形態形成を司っている」ことを明らかにした(図2, Hirano et al., *Nat Plants.* 2018.)。

## 2. 研究の目的

「FAB1 がどのように表層微小管形成と二次細胞壁形成を同時に制御するのか？」という問いを解くため、次の(A)、(B)の2つを目的とした。

### (A) 【FAB1が制御する微小管重合】

我々は、先行研究において、FAB1/PI(3,5)P<sub>2</sub> の欠乏によって、表層微小管が断片化すると共に、微小管プラス端集積因子 EB1-GFP で標識される微小管のプラス端が極端に減少したことから、FAB1 は、分子スイッチとして働く植物 Rho Small GTPase, ROP10 と協働で、微小管を制御することを示した (Hirano et al., *Nat Plants*. 2018) . また、FAB1/PI(3,5)P<sub>2</sub> と相互作用する微小管結合タンパク質を免疫沈殿・質量解析法により複数同定し(未発表), そのうち、FAB1 が、微小管そのものと結合するだけでなく、微小管のフォールディングのためのコファクター Prefoldin (PFD) や微小管のプラス端に局在するアダプタータンパク質 EB1 と結合し、また、PFD は ROP10 と、ROP10 は微小管とも結合することを確認している(未発表). これらのデータは、微小管の重合において、FAB1 が役割を持っていることを示唆している. そこで、目的は、(i)「FAB1 はどのように微小管重合に関わっているか?」という問いを解くことにある.

すなわち、仮説「FAB1による新生チューブリンのフォールディング」モデル;「新生 Tubulin は PFD 複合体によって、FAB1 に渡され、FAB1 はシャペロニンとして働き、 $\alpha$ -Tubulin、 $\beta$ -Tubulin をフォールディングする.  $\alpha/\beta$ -Tubulin は、安定化因子(TBCA/B/C/D)に渡される.

Small GTPase(ROP10)が作用して、GDP-Tubulin となる. GDT-Tubulin は、GTP-Tubulin になる(既知). GTP-Tubulin が重合して、微小管が形成される(既知). 微小管のプラス端に局在する EB1 がアダプタータンパク質となって、PFD, FAB1, ROP10などを集合させて、- の反応が起きる.」の検証を目的とする.

### (B) 【FAB1が制御する二次細胞壁成分の分泌】

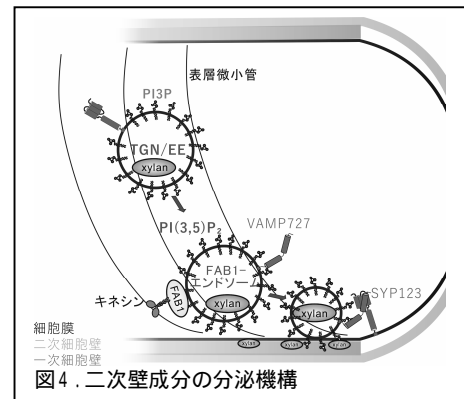
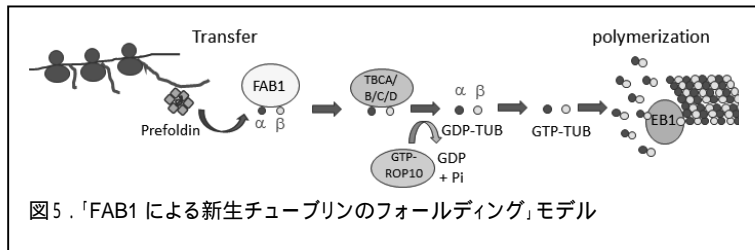
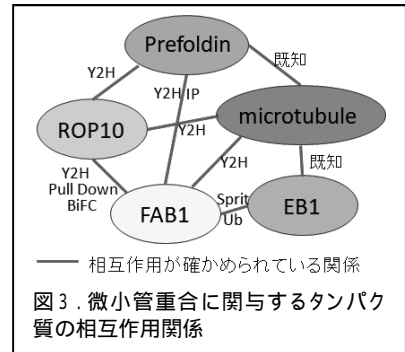
我々は、すでに、「硬さを与えるキシランなどの二次細胞壁成分は、ゴルジ体で合成され、トランスゴルジネットワーク/前期エンドソーム(TGN/EE)に運ばれた後、FAB1 エンドソームに積み荷されて表層微小管上を移動し、細胞膜に達すると(Hirano et al., *Plant Physiol*. 2015), FAB1 エンドソーム膜に存在する VAMP727 タンパク質と細胞膜に局在する SYP123 タンパク質とが結合して後期エンドソームと細胞膜の膜融合が起きることで「分泌される」ことを明らかにしている(未発表). そこで、目的は、(ii)「FAB1 エンドソームがどのように微小管上を運ばれ、二次細胞壁成分を細胞壁側へ分泌されるか?」という問いを解くことにある.

すなわち、「FAB1 エンドソームを微小管のレールに乗せて細胞膜まで運ぶキネシンの実体を同定するとともに、「SYP123 と VAMP727 によって、二次細胞壁成分が細胞壁に分泌される分子機構」の詳細を調べることである.

## 3. 研究の方法

### (1) 【FAB1が制御する微小管重合】

- (FAB1-GFP/PFD3-TagRFP/EB1b-Cypet) 共発現ラインを使って、三者のダイナミクスを観察すると共に、FAB1特異的阻害剤であるYM201636の処理でPI(3,5)P<sub>2</sub>欠乏時の三者のダイナミクスを経時的に観察する.



- [FAB1-GFP/PFD3-TagRFP/EB1b-Cypet] 共発現ラインに、微小管重合阻害剤オリザリン処理をして微小管を断片化させてから、オリザリンを抜いた後、微小管の重合が再生する過程において、三者のダイナミクスを経時的に観察する。
- 精製FAB1と精製PFD1/2/3/4/5/6複合体の存在条件で、PUREシステムを使ってin vitroで合成したチューブリン(蛍光標識する)によって微小管重合反応を行い、微小管重合が促進されるか観察によって確かめる。

(2) **【FAB1が制御する二次細胞壁成分の分泌】**

- 微小管標識タンパク質Cypet-TUB6と 2xCitrine-KINESIN12AとFAB1A-TagRFPとが共発現し、可視化できるライン(2xCitrine-KINESIN12A/FAB1A-TagRFP/Cypet-TUB6)を用いて、FAB1と KINESIN12の共局在性を確かめた上、共局在するオルガネラが表層微小管上をどのように動くか経時的に細胞内ダイナミクスを観察する。
- KINESIN12Aが、FAB1だけでなく、PI(3,5)P2とも結合するか調べるため、BiFCアッセイ、イースト・ツー・ハイブリッド、脂質-タンパク質結合アッセイであるリポソームアッセイを行う。

#### 4. 研究成果

FAB1の機能不全は、表層微小管が断片化し、二次細胞壁成分の分泌ができなくなる。  
FAB1は、チューブリンやKINESIN12と結合した。

蛍光標識した合成チューブリン、精製FAB1と精製PFD1/2/3/4/5/6を用いて、微小管重合反応を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。数秒、数分の間観察すると、微小管重合反応は、チューブリン、精製PFD1/2/3/4/5/6、精製FAB1の存在下で起こったが、これらどれかが欠けると起こらなかった。

微小管標識タンパク質Cypet-TUB6と 2xCitrine-KINESIN12AとFAB1A-TagRFPとが共発現し、可視化できるライン(2xCitrine-KINESIN12A/FAB1A-TagRFP/Cypet-TUB6)を用いて観察したところ、FAB1と KINESIN12は部分的に共局在した。

*kinesin12*変異体では、ゴルジ体やトランスゴルジネットワーク/前期エンドソームに異常は見られなかったが、FAB1-endosomeは存在しなかった。

*kinesin12*変異体では、表層微小管が正常だった。

SYP123は、SYP132によって根毛の側面細胞膜に配置された。

SYP123とVAMP727は、FAB1の阻害剤により局在が変化した。

SYP123とVAMP727は、細胞膜上で共局在し、互いに結合した(図5)。

SYP123とVAMP727が、伸長中の根毛において、二次細胞壁を最もよく分泌する部位は、先端と基部の間のサブアピカルだった(図5)。

*syp123*変異体や*vamp727*変異体では、根毛の二次細胞壁成分の分泌機構に欠陥があり、形のいびつで太く、柔らかい根毛を形成するが、表層微小管は正常だった(図6)。

上記の結果から、微小管と二次細胞壁成分の分泌における分子機構について、次のことが明らかになった。

「FAB1は、チューブリンやPFD1/2/3/4/5/6と結合して、表層微小管の重合を促進する。FAB1が微小管上にあるKINESIN12と結合することにより、キナーゼとしての機能が活性化し、FAB1-endosome が形成される。FAB1-endosomeは細胞膜直下まで移動すると、FAB1-endosomeの表面に局在するVAMP727と細胞膜に局在するSYP123が結合(キスアンドラン)することで、FAB1-endosome中に含まれる二次細胞壁成分が細胞壁側に分泌される。」

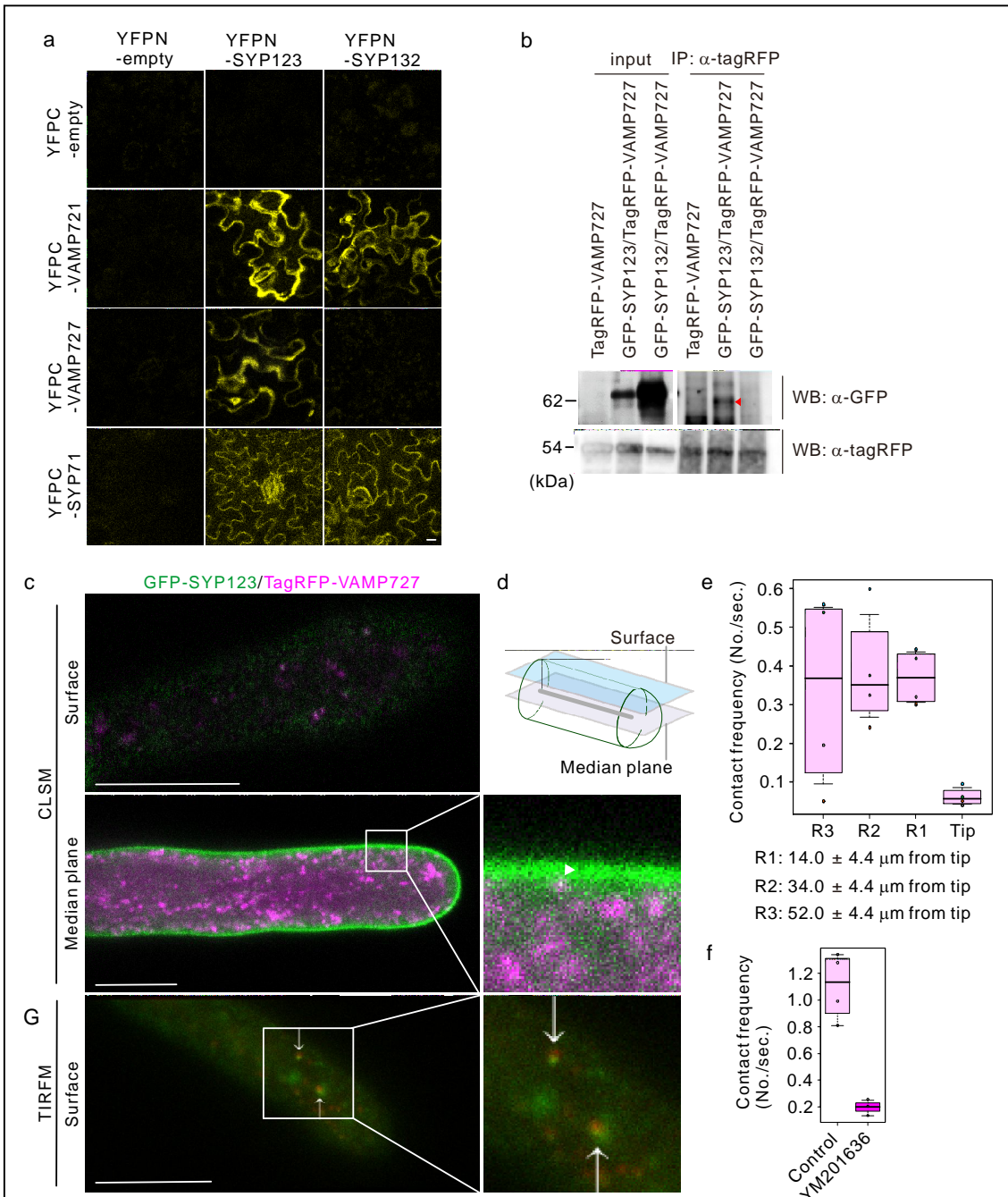


図5 . SYP123 と VAMP727 は結合し(a, b) , 根毛のサブアピカル部位の細胞膜上でキスアンドランした(c, d, e, f, G)

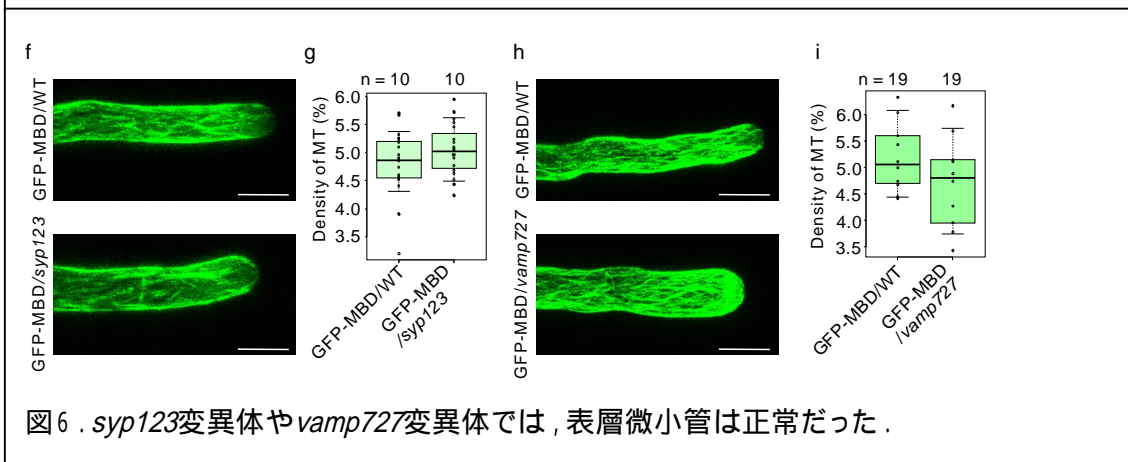


図6 . *syp123*変異体や*vamp727*変異体では , 表層微小管は正常だった .

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takeda S, Hirano T, Ohshima I, Sato MH.	4. 巻 22
2. 論文標題 Recent Progress Regarding the Molecular Aspects of Insect Gall Formation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 9424-9435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22179424.	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 Hirano T, Kimura S, Sakamoto T, Okamoto A, Nakayama T, Matsuura T, Ikeda Y, Takeda S, Suzuki Y, Ohshima I, Sato MH.	4. 巻 11:471
2. 論文標題 Reprogramming of the Developmental Program of Rhus javanica During Initial Stage of Gall Induction by Schlechtendalia chinensis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.00471.	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 Shikanai Y, Yoshida R, Hirano T, Enomoto Y, Li B, Asada M, Yamagami M, Yamaguchi K, Shigenobu S, Tabata R, Sawa S, Okada H, Ohya Y, Kamiya T, Fujiwara T.	4. 巻 182(4)
2. 論文標題 Callose Synthesis Suppresses Cell Death Induced by Low-Calcium Conditions in Leaves	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 2199-2212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.19.00784.	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 Hirano T, Okamoto A, Oda Y, Sakamoto T, Takeda S, Matsuura T, Ikeda Y, Higaki T, Kimura S, Sato MH.	4. 巻 13
2. 論文標題 Ab-GALFA, A bioassay for insect gall formation using the model plant Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-29302-8.	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野朋子
2. 発表標題 おいしい家をつくる 虫のすごい能力を探る
3. 学会等名 新自然史科学創成センターシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野朋子
2. 発表標題 昆虫が植物を改変させて起こす 寄生・共生現象「虫こぶ」の謎に迫る
3. 学会等名 日本共生生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野朋子
2. 発表標題 「虫こぶ」形成の謎は解明しつつある
3. 学会等名 日本植物生理学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野朋子
2. 発表標題 どのように「虫こぶ」形成が起こるか？
3. 学会等名 第24回デジタル進化生物セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野朋子
2. 発表標題 虫こぶ形成における昆虫と植物のコミュニケーション
3. 学会等名 ERATO共生進化機構先端セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野朋子
2. 発表標題 昆虫はどうやって植物に「虫こぶ」をつくらせるか？
3. 学会等名 日本植物学会一般向け講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野朋子
2. 発表標題 ゴール形成昆虫の植物の操り方
3. 学会等名 ERATO公開シンポジウム「延長された表現型の機構解明」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野朋子
2. 発表標題 虫こぶ形成のしくみ；ホルモン分析からのヒント
3. 学会等名 日本植物生理学会の関連集会・植物ホルモンワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2023年



〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 植物幹細胞誘導作用及び植物病害抵抗性誘導作用を有するペプチド	発明者 佐藤雅彦, 平野朋子, 大島一正, 木村成介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-001	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------