

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02505

研究課題名（和文）植物細胞形態形成におけるホスホイノシチドシグナルの役割

研究課題名（英文）Roles of phosphoinositid signaling in plant cell morphogenesis

研究代表者

青山 卓史（Aoyama, Takashi）

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：80202498

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞膜における主要な脂質シグナル分子であるPI(4,5)P₂の役割に焦点を当て、シロイヌナズナの花粉、根毛細胞などの植物細胞を対象に細胞形態形成における制御機構の解明を目指した。シロイヌナズナの9つのPI(4,5)P₂生成酵素遺伝子に対して変異体および形質転換体を用いた解析を行った結果、PIP5K1および2はオーキシンの極性輸送に関わる細胞極性の形成に、PIP5K2および3は根毛形態形成に、PIP5K4, 5, および6は花粉の発芽および花粉管伸長に、PIP5K7, 8, および9は根の高浸透圧ストレス応答に、それぞれ重複的に関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PI(4,5)P₂シグナルは、細胞骨格形成や膜交通など真核細胞内で部位特異的に起こる現象において重要な役割を果たす。本研究の結果、シロイヌナズナのPIP5K1-6はオーキシン極性輸送に関わる細胞極性、根毛伸長極性、花粉発芽および花粉管伸長における極性など、様々な細胞極性の確立に関与することが示された。一方、PIP5K7-9は高浸透圧などの環境ストレスに対する細胞内シグナル伝達に関与することが示された。これらの知見は植物における脂質シグナルの多様な機能を明らかにするとともに、根毛や花粉における脂質シグナルの改変を利用した新たな有用作物品種の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on PtdIns(4,5)P₂, one of the major lipid signaling molecules on the eukaryotic plasma membrane, and tried to elucidate the regulatory mechanisms for morphogenesis of plant cells including pollen and root hair cells of *Arabidopsis thaliana*. Genetic and reverse genetic analyses of 9 phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) genes revealed that PIP5K1 and 2, PIP5K2 and 3, PIP5K4-6, and PIP5K7-9 function redundantly in the cell polarity for polar auxin transport, root hair morphogenesis, pollen germination and pollen tube elongation, and the root response to high osmolality stress.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：脂質シグナル 細胞形態形成 細胞極性 PI(4,5)P₂ PIP5K

1. 研究開始当初の背景

ホスホイノシチドなどのリン脂質は、真核細胞において生体膜を構成するだけでなく、特定の膜領域に局在することにより細胞内位置情報をもつシグナルとして働き、細胞骨格形成や膜交通など細胞内で部位特異的に起こる現象において重要な役割を果たすことが知られている。例えば、アクチン細胞骨格形成の制御タンパク質の大部分はホスファチジルイノシトール4,5-ニリン酸 [PI(4,5)P₂] に結合し何らかの調節を受けるし、膜交通に関わる制御タンパク質の多くも PI(4,5)P₂ を含むホスホイノシチドとの結合活性をもつ。また、動物上皮細胞では PI(4,5)P₂ が頂端細胞膜に、PI(3,4,5)P₃ が側底細胞膜に局在することによって組織形成のための細胞極性の確立・維持に関与することが知られている。

近年植物分野においても、細胞内位置情報をもつシグナル分子としてのホスホイノシチドの役割が明らかになりつつある。その中で PI(4,5)P₂ は、種々の細胞の細胞膜上に極性をもって分布し(図1)細胞極性の確立や膜サブドメインの形成などに関わることが明らかになりつつある。伸長中の根毛や花粉管では、その先端の細胞膜に PI(4,5)P₂ が局在することにより先端成長極性の制御が行われると考えられている。気孔孔辺細胞では、その対向面の細胞接合部の細胞膜に PI(4,5)P₂ が強く局在する。根端増殖細胞では、PI(4,5)P₂ が上端および下端面の細胞膜に局在し、クラスリン依存性のエンドサイトーシスを介してオーキシンの極性輸送に関わることが報告されている。これらのことから、PI(4,5)P₂ を中心とするホスホイノシチドシグナルは植物においても様々な細胞極性の確立や膜サブドメインの形成において重要な役割を果たすことが考えられる。

一方、高等植物では、脂質代謝経路が複雑であることに加え、代謝酵素遺伝子の重複性が高いことから、ホスホイノシチドシグナル関連遺伝子の遺伝学的解析、およびそれらがコードするタンパク質の生物学的機能解析は進んでいない。また、植物では PI(4,5)P₂ などホスホイノシチドの存在量が動物に比べて一桁少なく、細胞自体の自家蛍光が強い。そのため、植物細胞内で有効に働く蛍光分子マーカの開発が遅かったこともあり、ホスホイノシチドシグナルの植物細胞内の動態に関しても不明な点が多い。

2. 研究の目的

細胞壁で囲まれた植物細胞の形態形成過程は不可逆的に進行することから、常に厳密な制御が必要とされる。中でも細胞膜上での極性の確立やサブドメインの形成は植物細胞の多様な形態を生み出すために欠かせない過程である。そのような植物細胞内位置情報に関するシグナルの伝達制御はどのようになされているのであろうか。特に、細胞膜上の位置決定のために、どのようなシグナル因子による相互作用が行われているのであろうか。本研究ではこれら問題点の解明を目指し、細胞膜上の主要なシグナル分子である PI(4,5)P₂ およびその生成酵素ホスファチジルイノシトール4-リン酸5-キナーゼ(PIP5K)の役割を中心として研究を進めた。

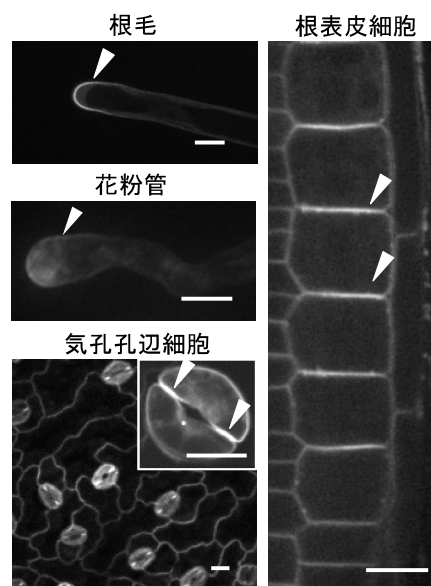


図1 シロイヌナズナの種々の細胞において蛍光分子マーカを用いて観察された PI(4,5)P₂ の局在性 Bar = 10 μm

3. 研究の方法

PI(4,5)P₂の時空間的な局在は主にその生成酵素であるPIP5Kを中心とする代謝系によって制御されるが、高等植物では、Type Bと呼ばれる植物特異的なPIP5Kが多数の遺伝子によってコードされており(図2)、それらの重複性のためにPIP5K機能の遺伝学的解析は容易ではない。しかし、PIP5Kのように細胞の生存に不可欠な機能を含む多様な機能を有するものの場合、多重変異の組合せ次第では致命的な影響を及ぼさず特定の機能に

関する表現型を抽出できる可能性がある。そこで、モデル植物シロイヌナズナの遺伝学上の利点を活用し、Type B PIP5K 遺伝子群 *PIP5K1-9* に対して多重変異体を用いた遺伝学的解析を行うこととした。図2に示す Type B PIP5K の *PIP5K1-3*、*PIP5K4-6*、および *PIP5K7-9* の3つのクレードは高等植物で保存されており、それらのクレードごとに分化した機能を持つと考えられるので、それぞれの三重変異体を用いた解析を中心に行った。

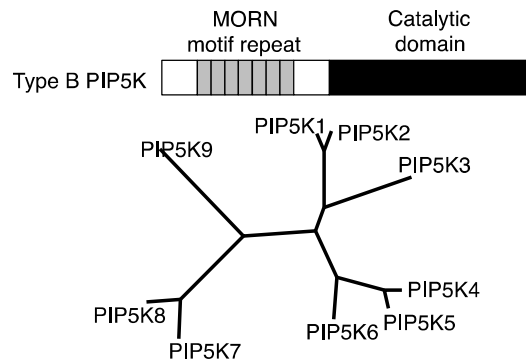


図2 植物特異的なType B PIP5Kの構造、およびシロイヌナズナのType B PIP5Kの分子進化系統樹

4. 研究成果

(1) *PIP5K1-3* 遺伝子に関する解析 (Watari *et al.* 2022, Plant Cell Physiol.)

PIP5K1-3 遺伝子それぞれのプロモーターに対して GUS レポーター遺伝子を用いた組織化学的解析を行った結果、*PIP5K1* のプロモーターは植物体全体の維管束および増殖組織で、および *PIP5K3* のプロモーターは根毛細胞で、*PIP5K2* のプロモーターはその両方で活性が見られた。

また、*PIP5K1* と *PIP5K3* との間にはプロモーター活性がある組織に共通性は見られなかった。次に、これら遺伝子の機能欠損変異体、*pip5k1*、

pip5k2、および *pip5k3* の表現型解析を行った。その結果、*PIP5K1* と *PIP5K2* が重複的に植物体全体の成長に関与し、*PIP5K2* と *PIP5K3* が重複的に根毛伸長に関与することが示された。また、*pip5k1pip5k2pip5k3* 三重変異体は *pip5k1pip5k2* 二重変異体の矮性の表現型を強めることはなかった。さらに、*PIP5K3* プロモーターを用いて異所的に発現した *PIP5K1* は *pip5k3* の短い根毛の表現型を完全に回復させたのに対し、*PIP5K1* プロモーターを用いて異所的に発現させた *PIP5K3* は *pip5k1pip5k2* 二重変異体の矮性の表現型を部分的にしか回復できなかった。被子植物の Type B PIP5K の分子系統樹解析およびアミノ酸配列のアライメント解析を行った結果、*PIP5K3* オルソログはいくつかの植物種で失われていること、*PIP5K3* オルソログの配列は *PIP5K1/2* オルソログのものと比較して保存性が低いことが示された。以上の知見により、*PIP5K1-3* 遺伝子の機能はプロモーターに依存する発現パターンにおいて分化するとともに、それらがコードするタンパク質の機能においても分化していることが明らかにされた。また、*PIP5K3* が根毛伸長に機能を特化した結果、*PIP5K1/2* に保存されているタンパク質分子機能の一部を失ったことが示唆された。

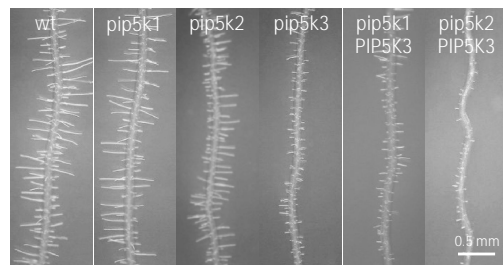


図3 根毛伸長における *PIP5K*、*PIP5K3* の機能重複 *pip5k3* 変異体の短い根毛の表現型は *pip5k1pip5k3* 二重変異体では変化がないが、*pip5k pip5k3* 二重変異体ではより強くなる。

(2) PIP5K4-6 遺伝子に関する解析 (Kato *et al.* 2024, Plant J.)

PIP5K4-6 遺伝子のそれぞれについて、これまで報告されている機能欠損変異体 *pip5k4* および *pip5k5* の花粉発芽および花粉管伸長の低下について確認するとともに、新たに得られた機能欠損変異体 *pip5k6* についても同様の表現型を見出した。また、それらの表現型は *pip5k4pip5k5*、*pip5k5pip5k6*、および *pip5k4pip5k6* 二重変異体において強められること、および *pip5k4pip5k5pip5k6* 三重変異体の花粉は

不稔であることが示された。さらに、三重変異体の花粉では花粉全体が膨潤し発芽における細胞極性が喪失していることが分かった。三重変異体の花粉については、PIP5K4-YFP、PIP5K5-YFP、または PIP5K6-YFP を発現させることによって稔性を回復することができた。それら YFP 融合タンパク質および PI(4,5)P₂ 蛍光分子マーカーを観察した結果、それらはいずれも花粉の発芽以前に発芽予定位置の細胞膜上に存在することが示された。以上の知見より、花粉発芽における細胞極性の確立には PIP5K4、PIP5K5、PIP5K6 によって重複的に細胞内局所的に産生される PI(4,5)P₂ のシグナル機能が必要であることが明らかとなった。

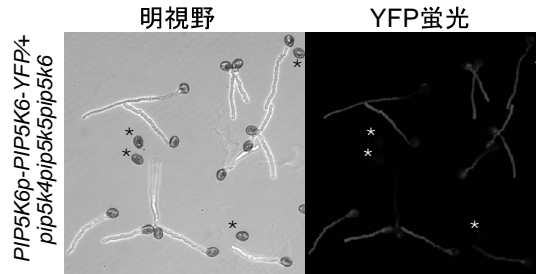


図4 花粉の発芽におけるPIP5K4、PIP5K5、PIP5K6の機能重複 *pip5k4pip5k5pip5k6* 重変異体の花粉 (* で示したものは発芽しないのに対して、PIP5K6-YFPを発現する 重変異体の花粉(YFP蛍光が観られるものは発芽する)。

(3) PIP5K7-9 遺伝子に関する解析 (Kuroda *et al.* 2021, Plant J.)

PIP5K7-9遺伝子それぞれのプロモーターに対してGUSレポーター遺伝子を用いた組織化学的解析を行った結果、それらすべては主に維管束を含む分裂組織で活性を持つことが示された。さらに、PIP5K7、PIP5K8およびPIP5K9の細胞内局在性をYFPとの融合タンパク質を用いて解析した結果、それらは根端分裂組織の表皮細胞において細胞膜に均一に局在することが示された。これら遺伝子の機能欠損変異体、*pip5k7*、*pip5k8*、および*pip5k9*が単離され、それらの多重変異体が作製された。

それらを通常生育条件下で観察したところ、各単一変異体のみならず多重変異体においても明確な表現型を見出すことが出来なかった。一方、高浸透圧ストレス条件下では、*pip5k7pip5k8pip5k9*三重変異体の主根の伸長が野生型と比較してより抑制されており、根端分裂組織も縮小していた。さらに、三重変異体では根端分裂組織表皮細胞での高浸透圧ストレスにตอบสนองするエンドサイトーシスが遅延していた。細胞内局在性の解析においては、PIP5K7-YFP、PIP5K8-YFPおよびPIP5K9-YFPが高浸透圧ストレスにตอบสนองして細胞膜付近で粒状に局在することが示された。PI(4,5)P₂ 蛍光分子マーカーを用いた解析においては、細胞膜上のPI(4,5)P₂の量が三重変異体では野生型に比べて有意に少ないことが示された。以上の知見から、PIP5K7、PIP5K8、およびPIP5K9は重複して根端分裂組織表皮細胞の細胞膜上でPI(4,5)P₂を産生し、高浸透圧ストレス下においてエンドサイトーシスを促進させることで主根の伸長に寄与することが明らかと

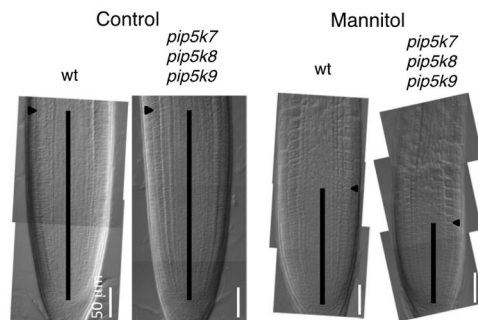


図5 高浸透圧ストレス応答におけるPIP5K7、PIP5K8、PIP5K9の機能重複 高浸透圧条件下 (mannitol添加)では、*pip5k7pip5k8pip5k9*三重変異体の根端増殖組織(黒線で示した部分)は野生型 (wt)のものに比べて小さく、根の伸長速度も遅い。

なった。このことにより、陸上植物において保存性の高い*PIP5K7-9*オルソログ遺伝子群の機能が、細胞分化や細胞形態形成に関わるものではなく、むしろ環境応答に関わるものである可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato, M., Watari, M., Tsuge, T., Zhong, S., Gu, H., Qu, L.-J., Fujiwara, T., Aoyama, T.	4. 巻 117
2. 論文標題 Redundant function of the Arabidopsis phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase genes PIP5K4-6 is essential for pollen germination.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant J.	6. 最初と最後の頁 212-225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tbj.16490	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 Akagi, C., Kurihara, Y., Makita, Y., Kawaguchi, M., Tsuge, T., Aoyama, T., Matsui, M.	4. 巻 136
2. 論文標題 Transcriptional activation of ribosome-related genes at initial photoreception is dependent on signals derived from both the nucleus and the chloroplasts in Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Plant Res.	6. 最初と最後の頁 227-238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-022-01430-8	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 -
1. 著者名 Watari, M., Kato, M., Blanc-Mathieu, R., Tsuge, T., Ogata, H., Aoyama, T.	4. 巻 63
2. 論文標題 Functional Differentiation among the Arabidopsis Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase Genes PIP5K1, PIP5K2 and PIP5K3. Plant Cell Physiol. 63:635-648.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 635-648
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcac025	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 Zhang, X., Nomoto, M., Garcia-Leon, M., Takahashi, N., Kato, M., Yura, K., Umeda, M., Rubio, V., Tada, Y., Furumoto, T., Aoyama, T., Tsuge, T.	4. 巻 63
2. 論文標題 CFI 25 Subunit of Cleavage Factor I is Important for Maintaining the Diversity of 3' UTR Lengths in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 369-383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcac002	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 Shimamura, R., Ohashi, Y., Yamamoto, Y. Y., Kato, M., Tsuge, T., and Aoyama, T.	4. 巻 108
2. 論文標題 Arabidopsis PLD 1 and PLD 2 localize to post-Golgi membrane compartments in a partially overlapping manner.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 31-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-021-01205-0	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 Kuroda, R., Kato, M., Tsuge, T., and Aoyama, T.	4. 巻 106
2. 論文標題 Arabidopsis phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase genes PIP5K7, PIP5K8, and PIP5K9 are redundantly involved in root growth adaptation to osmotic stress.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant J.	6. 最初と最後の頁 913-927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.15207	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 -

1. 著者名 Aki, S., Yura, K., Aoyama, T., and Tsuge, T.	4. 巻 134
2. 論文標題 SAP130 and CSN1 interact and regulate male gametogenesis in Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Plant Res.	6. 最初と最後の頁 278-289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-021-01260-0	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加藤真理子、巨真智子、柘植知彦、Sheng Zhong、Hongya Gu、Li-Jia Qu、藤原崇志、青山卓史
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール4,5-ニリン酸は花粉の発芽に必須である
3. 学会等名 日本植物生理学会・2024年度年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shahrzad Haghiri, Takashi Aoyama
2. 発表標題 Identification and characterization of target genes for an Arabidopsis bHLH transcription factor LRL1 in root hairs
3. 学会等名 日本植物生理学会・2024年度年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 張曉娟、Lukasz Szewe、Mateusz Bajczyk、David Bielewicz、由良敬、大土井美郁、加藤真理子、Marta Garcia Leon、Vicente Rubio、野元美佳、多田安臣、古本強、Zofia Szwejkowska-Kulinska、Dorothee Staiger、青山卓史、Artur Jarmolowski、柘植 知彦
2. 発表標題 AtCFIはpre-mRNAの3'UTR切断部位の多様性を担保する
3. 学会等名 日本植物生理学会・2024年度年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 張曉娟、Lukasz Szewe、野元美佳、Marta Garcia Leon、加藤真理子、由良敬、Vicente Rubio、多田安臣、古本強、青山卓史、柘植知彦
2. 発表標題 Cleavage Factor Iはpre-mRNAにおける3'UTR切断部位の多様性に不可欠である
3. 学会等名 日本植物生理学会・2023年度年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島村亮太、大橋洋平、谷口(山本)幸美、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史
2. 発表標題 リン脂質加水分解酵素PLD 1およびPLD 2の細胞内局在
3. 学会等名 第34回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤真理子、巨真智子、青山卓史
2. 発表標題 花粉の発芽に関わるホスホイノシチドの研究
3. 学会等名 第34回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張曉娟、野元美佳、Marta Garcia Leon、高橋真紀、加藤真理子、由良敬、梅田正明、Vicente Rubio、多田安臣、古本強、青山卓史、柘植知彦
2. 発表標題 mRNA 3'UTRnお長さを制御するAtCFI25の機能解析
3. 学会等名 日本植物生理学会・2022年度年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤木千佳、栗原志夫、蒔田由布子、河内正治、柘植知彦、青山卓史、松井南
2. 発表標題 シロイヌナズナ脱黄化における翻訳効率の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会・2022年度年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島村亮太、大橋洋平、谷口(山本)幸美、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史
2. 発表標題 シロイヌナズナPLD 1とPLD 2は根においてそれぞれトランスゴルジネットワークとゴルジ後のコンパートメントに局在する
3. 学会等名 日本植物生理学会・2022年度年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 巨真智子、Romain Blanc-Mathieu、加藤真理子、柘植知彦、緒方博之、青山卓史
2. 発表標題 シロイヌナズナ BタイプPIP5K 遺伝子の機能分化について
3. 学会等名 日本植物生理学会・2021年度年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安喜史織、由良敬、青山卓史、柘植知彦
2. 発表標題 花粉形成におけるCOP9シグナロソームの機能解析
3. 学会等名 日本植物生理学会・2021年度年会
4. 発表年 2021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			
フランス	University of Grenoble Alpes			
スペイン	Centro Nacional de Biotecnolog			
英国	University of Cambridge			