

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06216

研究課題名（和文）植物孔辺細胞における極性形成および形態構築制御機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism controlling polarity and morphogenesis of guard cells in plant

研究代表者

中川 強（Nakagawa, Tsuyoshi）

島根大学・学術研究院農生命科学系・教授

研究者番号：30202211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：MUS受容体型キナーゼは孔辺母細胞分裂前に発現して孔辺細胞の極性確立に働くことが推察されている。本研究課題では、MUS受容体型キナーゼ信号伝達系構成因子の探索を行い、信号伝達分子機構の解明を進めた。ロイシンリッチリピート（LRR）受容体型キナーゼが他のLRR受容体タンパク質と複合体を形成して働く例が知られているため、シロイヌナズナLRR受容体タンパク質遺伝子について、プロモーター：レポーターを用いた半網羅的発現解析を行い、気孔系譜で発現を示す遺伝子の探索を行った。その結果、AtExLRR1、AtExLRR3、AtExLRR9と名付けた遺伝子が気孔系譜で発現していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球環境にとって植物による光合成は重要な意味を持つ。光合成における植物内外のガス交換は気孔を通じて行われている。気孔形成、つまり葉の表面に孔をあけるためには、孔辺細胞が特殊な形となり、さらに2つの孔辺細胞が対称的に配置されなければならない。そのため孔辺細胞形態構築メカニズムの理解は植物発生分野における学術的意義に加え、地球環境にも深く関わる社会的意義を持つものである。本研究で着目しているMUS受容体型キナーゼ信号伝達系は、細胞板という植物に特有な分裂面形成を利用した巧妙な仕組みが使われている。生命活動の多様性の理解につながることから社会的意義を持つものである。

研究成果の概要（英文）：The MUS receptor-like kinase is expressed prior to division of guard mother cells and thought to function in establishing the polarity of guard cells. In this project, we explored the components of the MUS receptor-like kinase signaling pathway to understand the molecular mechanisms of signal transduction. Since it is known that leucine-rich repeat (LRR) receptor-like kinases function by forming complexes with other LRR receptor proteins, we conducted a semi-comprehensive expression analysis of Arabidopsis LRR receptor protein genes using promoter-reporter assay to identify genes expressed in the stomatal lineage. As a result, we discovered that the genes named AtExLRR1, AtExLRR3, and AtExLRR9 are expressed in the stomatal lineage.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：気孔 孔辺細胞 孔辺母細胞 受容体型キナーゼ 細胞極性 シロイヌナズナ ロイシンリッチリピート

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

気孔は2個の孔辺細胞で作られる表皮の小孔で、二酸化炭素吸収や蒸散の通路として植物の成長に欠かせない重要な役割を果たしている。孔辺細胞はメリステモイドから分化した孔辺母細胞の対称分裂によって生じ、それぞれの細胞は対称分裂面を挟んで背腹(外側が背、孔側が腹)の極性を確立する。その後、背腹極性に従って孔辺細胞が対称に湾曲し、分裂面の細胞壁がはがれて気孔が形成される。また、分裂面(孔側=腹側)にはクチクラレッジという2次細胞壁が発達し、膨圧によって気孔を開閉させるための機械的な仕組みとなっている。

我々は顕微鏡スクリーニングにより孔辺細胞の対称的な湾曲が阻害されたシロイヌナズナ *mustaches (mus)* 変異体を単離し、原因遺伝子 MUS 受容体型キナーゼを同定した。次いで発現・局在解析を行ったところ、興味深いことに MUS 受容体型キナーゼはメリステモイドから孔辺母細胞の時期に発現して周囲の細胞膜(背側)に存在し、分裂面(腹側)が形成される頃には発現が減少して分裂面での局在は観察されなかった。この結果より応募者らは MUS 受容体型キナーゼの特異な局在パターンが孔辺細胞の背腹極性の制御に関わっていると考え、局在パターンを変化させることを試みた。その結果、発現タイミングを調節することで MUS 受容体型キナーゼを人為的に分裂面に局在させることに成功し、局在パターンの変化に伴って孔辺細胞の背腹性が逆転するという重要な知見を得た。このことより MUS 受容体型キナーゼが背側の信号を発することで背腹の極性を作り出す因子であることが示された。

2. 研究の目的

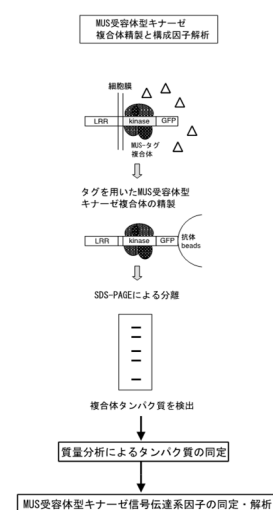
研究当初の背景で述べたように MUS 受容体型キナーゼが孔辺細胞背腹極性を決定する信号伝達系の鍵因子であることは疑いようがないが、どのように働いているかそのメカニズムは不明である。MUS 受容体型キナーゼはシロイヌナズナに200種類以上存在するロイシンリッチリピート(LRR)受容体型キナーゼの一つであり、他の多くのLRR受容体型キナーゼと同様に細胞外LRR部分でリガンドを認識し、細胞内キナーゼドメインによるリン酸化へと信号伝達を行っていることが推察される。また、他のタンパク質と複合体を形成して協調的に働くことも考えられる。そこで本研究は、我々が見出した MUS 受容体型キナーゼを端緒として孔辺細胞の極性形成機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 植物LRR受容体型キナーゼについて、LRR受容体タンパク質と共同して働く例が知られている。そこでMUS状態型キナーゼと共同して働くLRR受容体タンパク質をあきらかにするため、シロイヌナズナゲノム配列よりLRR受容体タンパク質を検索し、それらの上流域(プロモーター)配列を取得してPromoter:GUS、Promoter:GFPコンストラクトを構築した。これらをシロイヌナズナに導入してレポーター活性をモニターし、気孔系譜で発現するLRR受容体タンパク質遺伝子を半網羅的に探索した。気孔系譜での発現が観察されたLRR受容体タンパク質遺伝子についてはT-DNA遺伝子破壊株の表現型解析を行った。

(2) 複合体形成因子の探索のため、MUS-GFP融合体をシロイヌナズナに導入し、タンパク質抽出後抗GFP抗体による複合体精製、電気泳動による分離と質量分析による解析を行った(図)。

(3) リガンド、リン酸化標的の存在について検証するため、細胞外LRRのアイランドドメインを欠失させたMUS受容体型キナーゼクローン、細胞内キナーゼドメインを欠失させたMUS受容体型キナーゼクローンを構築し、これらクローンをシロイヌナズナ孔辺母細胞で発現させて孔辺細胞形成への効果を調べた。



4. 研究成果

(1) シロイヌナズナゲノムより約70個のLRR受容体タンパク質遺伝子を探索し、それぞれ上流域約2kbpの断片を増幅してプロモーター断片として使用した。Promoter:GUSおよびPromoter:GFPの構築には我々が開発したDual Promoter:reporterのシステムを使用し、2つのレポーターユニットをひとつのバイナリベクターに搭載したPromoter:GUS-Promoter:GFPのバイナリコンストラクトを構築した。これらをシロイヌナズナ野生株に導入し、得られた形質転換体について各発達段階の各器官でGUS染色およびGFP蛍光観察を行った。その結果、多様な発現パターンが観察され() それらのうちAtExLRR1、AtExLRR3、AtExLRR9と名付けたLRR受容体タンパク質遺伝子が気孔系譜で発現していることがわかった() AtExLRR1は主に孔辺細胞

胞で、AtExLRR3 は孔辺母細胞から孔辺細胞にかけて発現が観察された。また、MUS 受容体型キナーゼは根端部でも発現するため、根の GUS 染色・GFP 蛍光を調べたところ、AtExLRR1 と AtExLRR3 が根端部でも発現していることがわかった(2)。以上のように AtExLRR1 と AtExLRR3 の発現部位が MUS 受容体型キナーゼ発現部位と一致していたため、これらを MUS 受容体型キナーゼと協調して働く因子の候補と考え、機能解析を行うことにした。発現パターンからは、孔辺母細胞で発現する AtExLRR3 の方が共同因子である可能性が高いと考えられるが、今回は AtExLRR1 について T-DNA 遺伝子破壊株を調製し気孔や根を調べた。その結果、野生株との差は観察されなかった。今後 AtExLRR3 の T-DNA 破壊株表現型観察、AtExLRR1 と AtExLRR3 の二重破壊株表現型観察、AtExLRR1 と MUS 受容体型キナーゼの 2 重破壊株表現型観察、や AtExLRR3 と MUS 受容体型キナーゼの 2 重破壊株表現型観察、AtExLRR1 と AtExLRR3 と MUS 受容体型キナーゼの三重破壊株表現型観察を行うことによって、AtExLRR1 や AtExLRR3 が MUS 受容体型キナーゼと協調して働く因子であるかどうか検証を行う。

(2) MUS 受容体型キナーゼと複合体を形成する因子の探索として共沈殿実験を行った。MUS-GFP 融合体コンストラクト形質転換体を作出し、気孔存在部位である葉を集めてタンパク質画分を調製した。抗 GFP 抗体で免疫沈降を行い、電気泳動展開後にゲルを切り出し、質量分析を行った。その結果グルタチオン S トランスフェラーゼが検出されたが、MUS 受容体型キナーゼとの複合体形成については今後検証が必要である。他のゲルバンドについてはタンパク質同定に至らなかった。

(3) リガンド探索の準備として、LRR のアイランドドメインを欠失させた MUS 受容体型キナーゼクローンを作製し、孔辺母細胞分裂期に発現させた。野生型の MUS を孔辺母細胞分裂期に発現させると分裂面に局在して孔辺細胞の背腹逆転がおこる。一方アイランドドメインを欠失させた MUS 受容体型キナーゼでは分裂面への局在はおこるが、孔辺細胞の逆転は観察されなかった。このことより、アイランドドメインで受容されるリガンドが存在することが示唆された。また、リン酸化標的タンパク質探索の準備として、細胞内キナーゼドメインを欠失させた MUS 受容体型キナーゼクローンを作製し、孔辺母細胞分裂期に発現させた。その結果、孔辺細胞の背腹逆転は観察されなかったが、孔辺細胞同士の位置関係が以上になる表現型が観察された。野生型とキナーゼドメイン欠失 MUS 受容体型キナーゼが 2 量体を形成することで、標的タンパク質のリン酸化が阻害されていると考えられた。このことより、MUS 受容体型キナーゼ自身が 2 量体を形成すること、キナーゼドメインによりリン酸化される何らかの標的タンパク質が存在することが示された。

以上のように MUS 受容体型キナーゼと共同で働く因子の探索、リガンド存在可能性の検証、リン酸化標的タンパク質存在可能性の検証、を主に行った。AtExLRR1 と AtExLRR3 が共同して働く LRR 受容体型タンパク質である可能性が示され、今後の解析が待たれる。また、LRR 受容体型タンパク質遺伝子の半網羅的 Promoter:reporter 解析を進めた結果、特異的発現を示す遺伝子が多数見出された(2)。これら LRR 受容体型タンパク質が特異部位の発達に関与している可能性が示された。

Md. Firose Hossain, Mst Montaz Sultana, Ai Tanaka, Amit Kumar Dutta, Takushi Hachiya, Tsuyoshi Nakagawa. Expression analysis of plant intracellular Ras-group related leucine-rich repeat proteins (PIRLs) in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry and Biophysics Reports* 30:121241 (2022)

Amit Kumar Dutta, Mst Montaz Sultana, Ai Tanaka, Takamasa Suzuki, Takushi Hachiya, Tsuyoshi Nakagawa. Expression analysis of genes encoding extracellular leucine-rich repeat proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 88:154-167 (2024)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Hossain Md. Firose, Dutta Amit Kumar, Suzuki Takamasa, Higashiyama Tetsuya, Miyamoto Chiharu, Ishiguro Sumie, Maruta Takanori, Muto Yuki, Nishimura Kohji, Ishida Hideki, Aboulela Mostafa, Hachiya Takushi, Nakagawa Tsuyoshi	4. 巻 257
2. 論文標題 Targeted expression of bgl23-D, a dominant-negative allele of ATCSLD5, affects cytokinesis of guard mother cells and exine formation of pollen in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Planta	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) 10.1007/s00425-023-04097-0	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 Hossain Md. Firose, Sultana Mst Momtaz, Tanaka Ai, Dutta Amit Kumar, Hachiya Takushi, Nakagawa Tsuyoshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Expression analysis of plant intracellular Ras-group related leucine-rich repeat proteins (PIRLs) in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101241 ~ 101241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101241	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 Dutta Amit Kumar, Sultana Mst Momtaz, Tanaka Ai, Suzuki Takamasa, Hachiya Takushi, Nakagawa Tsuyoshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Expression analysis of genes encoding extracellular leucine-rich repeat proteins in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 154 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbad171	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

〔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 T. Nakagawa, M. Aboulela, Y. Yamada, S. Ishiguro, T. Hachiya, H. Tsukagoshi
2. 発表標題 Development of a vector system (Boost Gateway vector system) that facilitates the preparation of GAL4/UAS constructs and enhancement of expression with various promoter
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会（仙台大会）
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 Md. Firose Hossain, Takushi Hachiya, Tsuyoshi Nakagawa
2. 発表標題 Expression analysis of Leucine-Rich Repeats Receptor-Like Kinases (LRR-RLKs) under different abiotic stresses in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
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