

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891013

研究課題名(和文) 根毛形態形成における細胞内局所的なカルシウムーリン脂質シグナル変換機構と分子基盤

研究課題名(英文) Visualization of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and dynamics of the Ca<sup>2+</sup>-binding protein during root hair elongation in Arabidopsis

研究代表者

加藤 真理子 (Kato, Mariko)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：90736646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：根毛は細胞の伸長が先端のみでおこる「先端成長」によって形成され、環境に応答して可塑的にその形態をかたちづくることから、植物細胞の形態形成を理解するためのモデルとして研究されてきた。本研究では根毛の形成過程において、イノシトールリン脂質(PI(4,5)P<sub>2</sub>)を制御する分子機構の解明を目指した。その結果、PI(4,5)P<sub>2</sub>結合能をもつカルシウム結合タンパク質が、根毛の伸長から停止までの過程において、PI(4,5)P<sub>2</sub>の細胞内局在性の維持に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Root hair is a tubular-shaped cell that emerges from a specific root epidermal cell and contributes to water absorption, nutrient uptake and root anchoring. As well as these important functions, root hair has been intensively studied with regard to its characteristic morphogenesis. It has been reported that multiple signals mediated by calcium, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>), reactive oxygen species and Rho-related GTPases are essential for the root hair tip growth. Of these, PI(4,5)P<sub>2</sub> is thought to promote root hair elongation. However, molecular mechanisms that control PI(4,5)P<sub>2</sub> signal during tip growth is poorly understood. Here, I visualized the dynamics of Arabidopsis PI(4,5)P<sub>2</sub>/calcium-binding protein PCaP2 and PI(4,5)P<sub>2</sub> signal using a live-cell imaging technique. I found that PCaP2 is involved in spatio-temporal localization of PI(4,5)P<sub>2</sub> signal on plasma membrane to control root hair tip growth.

研究分野：分子生物

キーワード：植物細胞形態形成 細胞内シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

根毛は、根の表皮細胞から発生し、水分や養分の吸収、植物体の土への固着、土壤微生物との相互作用に寄与する根系組織である。また、根毛は細胞の伸長が先端のみでおこる「先端成長」によって形成されることから、植物細胞の形態形成を理解するためのモデルとして研究されてきた。

先端成長は根毛や花粉管に特徴的な成長様式であり、細胞の一部に極性が形成され、その部分においてのみ細胞膜や細胞壁成分が付加されることにより細胞が局所的に伸長する。この過程において、イノシトールリン脂質の一種であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (以下 PI(4,5)P<sub>2</sub>)、カルシウム、活性酸素種および低分子量 GTPase といった細胞内情報伝達因子が細胞の先端部分に局所的に蓄積することが知られている。これらの局在が乱れると、細胞内に形成される極性も攪乱され、根毛の分岐や風船のような膨張など細胞の形態異常がおこる。したがって、先端成長を達成する上で、これら情報伝達因子の細胞内局在性の制御が非常に重要である。

先端成長に重要な役割を担うこれら因子のうち、PI(4,5)P<sub>2</sub> は細胞膜上で位置情報をもつセカンドメッセンジャーとして機能することが知られている。これまでに、PI(4,5)P<sub>2</sub> 産生酵素 PIP5K をコードする遺伝子の解析から、PIP5K が伸長中の根毛において先端の細胞膜に局所的に局在し、伸長を停止すると速やかに細胞膜から消失すること、PIP5K を過剰発現したシロイヌナズナは根毛伸長を促進することが明らかにされており、PI(4,5)P<sub>2</sub> が先端成長における正の制御因子であると考えられている。しかし、伸長中の根毛細胞の先端では細胞膜の拡張が急速に起こるため、先端で合成された PI(4,5)P<sub>2</sub> は新たに合成された細胞膜成分の付加により後方へと押し流されることが考えられるが、PI(4,5)P<sub>2</sub> の局在がどのようにして伸長中の根毛先端の細胞膜上に維持されるのかは明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

これまでの研究により、PCaP2 は N-ミリスチル化を介して細胞膜に結合すること、そしてその N 末端領域において PI(4,5)P<sub>2</sub> を含むイノシトールリン脂質および Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリンと結合し、N 末端以降の領域において Ca<sup>2+</sup> と結合することを明らかにしている。さらに、PCaP2 の T-DNA 挿入ノックダウン株は野生株より長い根毛をもち、PCaP2 分子内の PI(4,5)P<sub>2</sub> 結合領域である N 末端領域を過剰発現させたシロイヌナズナは根毛伸長が著しく抑制されることから、PCaP2 が PI(4,5)P<sub>2</sub> との結合を介して根毛の伸長や発達に関与すると考えられる。しかし、PCaP2 が PI(4,5)P<sub>2</sub> と相互作用することの生理的意義や具体的な機序については分かっていない。そこで本

研究では、PCaP2 が PI(4,5)P<sub>2</sub> と結合することにより先端成長においてどのような役割を担うのか明らかにすることにより、PI(4,5)P<sub>2</sub> の局在性維持に関わる機構の理解を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) PI(4,5)P<sub>2</sub> と PCaP2 の可視化

PI(4,5)P<sub>2</sub> シグナルを可視化する分子プローブを作製するため、ホスホリパーゼ C の PI(4,5)P<sub>2</sub> 結合ドメイン PH に赤色蛍光タンパク質を接続し、CaMV35S プロモーター制御下で発現する植物体を作製した。PCaP2 については、自プロモーター制御下で PCaP2-GFP 融合タンパク質を発現する植物体を作製した。そして、PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブ発現株と PCaP2-GFP 発現株を掛け合わせて得た植物体を用いて PCaP2-GFP 蛍光と PI(4,5)P<sub>2</sub> シグナルの局在を示す赤色蛍光を共焦点レーザー顕微鏡下で観察し、根毛が伸長し停止するまでの間、PI(4,5)P<sub>2</sub> および PCaP2 がどのような挙動を示すのかを調査した。

### (2) PI(4,5)P<sub>2</sub> シグナルの局在性維持への関与

PCaP2 T-DNA 挿入株における PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブの局在を調査した。

さらに、PCaP2 の発現が PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブの局在性に影響を及ぼすことを検証するため、エストラジオール転写誘導系 XVE を用いて PCaP2 タンパク質あるいは PCaP2 と GFP との融合タンパク質を発現する植物体を作製し、前述の PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブ発現株と掛け合わせた。PCaP2 が相互作用分子と結合する PCaP2 分子内領域についても前述の誘導系を用いて発現する植物体を作製し、同様に調査した。

### (3) Ca<sup>2+</sup> シグナルとの関連

PCaP2 は、その N 末端領域において PI(4,5)P<sub>2</sub> および Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン複合体 (以下 Ca<sup>2+</sup>/CaM と記す) と結合し、N 末端以降の領域においては Ca<sup>2+</sup> と直接結合する。リコンビナント PCaP2 タンパク質を用いた *in vitro* の解析において、PCaP2 と PI(4,5)P<sub>2</sub> を含むイノシトールリン脂質との相互作用は、Ca<sup>2+</sup>/CaM 存在条件下において阻害される。このことから、PCaP2 が Ca<sup>2+</sup>/CaM との結合により細胞膜から脱離すると仮説を立てた。そこで、サイトゾル Ca<sup>2+</sup> 濃度を人為的に変化させた。PCaP2-GFP と PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブを共発現する植物体に、Ca<sup>2+</sup> チャンネルの阻害剤として用いられる塩化ランタンまたは塩化ガドリニウムを投与しサイトゾル Ca<sup>2+</sup> 勾配を人為的に破壊し、PCaP2-GFP 蛍光と PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブの挙動の変化を、経時的に観察した。

また、PCaP2 の N 末端領域には CaM 結合モチーフ 1-8-14 に類似した配列が含まれることから、この領域のアミノ酸に点変異を導入した改変 PCaP2 を作製した。改変 PCaP2 と

GFP との融合タンパク質を発現させた植物体を用いて、細胞内局在、表現型および PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブの局在について調査した。

#### 4. 研究成果

(1) 伸長中の根毛先端では、PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブが先端の細胞膜に局所的に蓄積する様子が観察された。このことは、これまでに報告された PI(4,5)P<sub>2</sub> 産生酵素遺伝子をコードする PIP5K3 の局在性および PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブの局在性と一致した。一方、PCaP2-GFP 蛍光は先端の細胞膜を除く細胞膜上に局在した (図 1 上段) PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブおよび PCaP2-GFP のこのような局在は根毛の伸長中は保たれていた。根毛が伸長を停止すると、PCaP2-GFP 蛍光は根毛先端を含む細胞膜上に局在し、PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブは速やかに消失した (図 1 下段) このことから、PCaP2 と PI(4,5)P<sub>2</sub> シグナルは根毛の伸長から停止までの間にダイナミックな挙動を示し、相反的に局在することが明らかとなった。

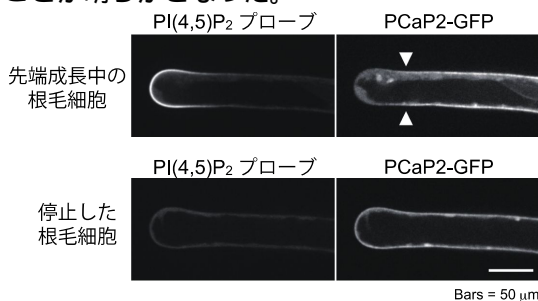


図1. 根毛細胞における PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブと PCaP2-GFP 蛍光。先端成長中の根毛細胞において、PCaP2-GFP 蛍光は矢印より先端側では細胞膜から脱離し、基部側では細胞膜に観察された。

(2) 本研究の過程で、PCaP2 の N 末端領域と GFP との融合タンパク質は伸長中の根毛先端においても細胞膜に局在することを発見した。そこで、PCaP2 の N 末端領域について エストラジオール転写誘導系を用いてシロイヌナズナに発現させ、PCaP2 が伸長中の根毛先端の細胞膜に発現することが PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブの先端局在性にどのような影響を及ぼすかを調査した。その結果、根毛先端の細胞膜における PCaP2 の発現は、PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブの先端局在性を攪乱した。さらに、根毛発生位置の異常や根毛細胞の形態異常などの細胞内極性の乱れが観察された。PCaP2 の N 末端領域は PI(4,5)P<sub>2</sub> を含むイノシトールリン脂質と結合する領域であることを考慮すると、伸長中の根毛先端の細胞膜上では、PCaP2 タンパク質が PI(4,5)P<sub>2</sub> の生理機能を妨げないために積極的に細胞膜からサイトゾルへと脱離することが強く示唆された。

さらに、発芽の段階から PCaP2 タンパク質の発現を誘導した植物体は、根毛の著しい伸長阻害に加えて、主根の伸長についても阻害されることが分かった。このような表現型は、PI(4,5)P<sub>2</sub> 産生酵素 PIP5K の遺伝子破壊株と類

似していた。PCaP2 の N 末端領域が PI(4,5)P<sub>2</sub> と結合能をもつことを考えると、これら表現型もまた PCaP2 が PI(4,5)P<sub>2</sub> の生理機能を妨げたことによるものと考えられる。

(3) 研究(1)において、伸長中の根毛先端において PCaP2-GFP 蛍光が細胞膜から脱離する様子が観察された。そこで、PCaP2 が細胞膜から脱離する仕組みとして、カルシウムシグナルに着目した。伸長中の根毛細胞では、根毛の先端をピークとしたサイトゾル Ca<sup>2+</sup> 濃度勾配が形成される。このことと PCaP2-GFP の細胞内局在を合わせると、Ca<sup>2+</sup> 濃度の高い根毛先端の領域では PCaP2 が何らかの Ca<sup>2+</sup> シグナルによって細胞膜から脱離する可能性が考えられた。そこで、Ca<sup>2+</sup> チャンネルの阻害剤として用いられる塩化ランタンまたは塩化ガドリニウムを投与することによりサイトゾル Ca<sup>2+</sup> 勾配を人為的に壊し、PCaP2-GFP 蛍光と PI(4,5)P<sub>2</sub> プローブの挙動を経時的に観察した。しかし、薬剤処理によって PCaP2 の局在が変化の様子は観察されなかった。そこで、Ca<sup>2+</sup> 濃度を人為的に上昇させる Ca<sup>2+</sup> イオノフォアを投与した時に、PCaP2-GFP 蛍光が細胞膜から脱離するか、根毛以外の細胞を用いて調査した。PCaP2-GFP は根の表皮細胞に発現し、伸長中の根毛細胞の先端を除くすべての細胞においては細胞膜に一樣に局在する。そこで PCaP2-GFP 蛍光が細胞膜に観察される細胞に Ca<sup>2+</sup> イオノフォアを投与し、経時的に観察した。しかし、PCaP2-GFP 蛍光が細胞膜からサイトゾルへと脱離する様子を観察することはできなかった。

つづいて、Ca<sup>2+</sup>/CaM との相互作用に関連するアミノ酸に点変異を導入した。Ca<sup>2+</sup>/CaM と結合できない変異 PCaP2 について、GFP との融合タンパク質を用いてその局在を可視化した。その結果、変異型 PCaP2-GFP 蛍光は野生型 PCaP2-GFP 蛍光と同様に伸長中の根毛細胞においては細胞膜から脱離した。PCaP2 の細胞内局在を制御する機構としてカルシウムシグナルを推測していたが、より複雑な分子機構によって PCaP2 の局在が制御される可能性が示された。

以上(1)~(3)の実験より得られた知見から、PCaP2 が伸長中の根毛細胞において PI(4,5)P<sub>2</sub> の局在の維持に関与する分子であることが明らかとなった。また、根毛先端の細胞膜における PCaP2 の異所的な発現が、細胞膜上の PI(4,5)P<sub>2</sub> の局在を攪乱することも明らかとなった。先端成長中の根毛細胞において、先端の細胞膜では PCaP2 が細胞膜から脱離することにより PI(4,5)P<sub>2</sub> シグナルを根毛先端においてのみ露出し、一方、先端以外の細胞膜上では PCaP2 が細胞膜に局在することによりその場に存在する PI(4,5)P<sub>2</sub> と結合し PI(4,5)P<sub>2</sub> の生理機能を抑える働きをする。PCaP2 のこのような働きにより、PI(4,5)P<sub>2</sub> の局在性が先

端成長中に維持されるものと考えられた。

また本研究の過程で、PCaP2のN末端領域を過剰発現させた植物体は、PI(4,5)P<sub>2</sub>産生酵素遺伝子 *PIP5K* の多重破壊株に観察された表現型と類似した表現型を示すことを発見した。このことから、PCaP2のN末端領域を利用して、植物体内のPI(4,5)P<sub>2</sub>の生理機能を阻害するツールとして利用できる可能性を示すこともできた。

これまで、植物細胞におけるPI(4,5)P<sub>2</sub>シグナルの先行研究は、PI(4,5)P<sub>2</sub>代謝関連酵素遺伝子を中心とした分子遺伝学的な解析が主であった。本研究は、PCaP2という植物のみに保存されたCa<sup>2+</sup>結合タンパク質が、PI(4,5)P<sub>2</sub>との結合を介して根毛の先端成長におけるPI(4,5)P<sub>2</sub>シグナルの制御に関与することを初めて明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### [雑誌論文](計2件)

Nagata, C., Miwa, C., Tanaka, N., Kato, M., Suito, M., Tsuchihira, A., Sato, Y., Segami, S., Maeshima, M. (2016) A novel-type phosphatidylinositol phosphate-interactive, Ca-binding protein PCaP1 in *Arabidopsis thaliana*: stable association with plasma membrane and partial involvement in stomata closure. *J. Plant Res.*, 129: 539-550, DOI: 10.1007/s10265-016-0787-2, 査読有  
Lin, Q., Ohashi, Y., Kato, M., Tsuge, T., Gu, H., Qu, L.J., Aoyama, T. (2015) GLABRA2 directly suppresses basic helix-loop-helix transcription factor genes with diverse functions in root hair development. *Plant Cell*, 27: 2894-2906, DOI: 10.1105/tpc.15.00607, 査読有

### [学会発表](計9件)

Watari, M., Romain, B.M., Kato, M., Tsuge, T., Ogata, H., Aoyama, T. Regulation Roles of PIP5K Genes in Plant Cell Morphogenesis and Their Redundancy, 第57回日本植物生理学会年会, 2016年3月18~20日, 岩手大学(岩手県・盛岡市)  
Shimamura, R., Taniguchi, Y. Y., Kato, M., Tsuge, T., Aoyama, T. Cell Biological Function of *Arabidopsis* PLD $\zeta$ 2, 第57回日本植物生理学会年会, 2016年3月18~20日, 岩手大学(岩手県・盛岡市)  
Kato, M., Tsuge, T. and Aoyama, T. Visualization of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and dynamics of the Ca<sup>2+</sup>-binding protein PCaP2 during root hair elongation in *Arabidopsis*. Institute for Chemical Research International Symposium 2016 (ICRIS'16)-Research Network Based on ICR MOU-, 2016年3月7日, 京都大学

(京都府・宇治市)

齊藤涼, 和田悠貴香, 加藤真理子, 柘植知彦, 青山卓史, PIP5K3と他のタイプB PIP5K 遺伝子との機能重複に関する解析, 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16~18日, 東京農業大学(東京都・世田谷)

加藤真理子, 柘植知彦, 前島正義, 青山卓史, シロイヌナズナ根毛におけるCa<sup>2+</sup>結合タンパク質PCaP2とホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の細胞内動態, 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16~18日, 東京農業大学(東京都・世田谷)

島村亮太, 谷口(山本)幸美, 谷口雅俊, 加藤真理子, 柘植知彦, 林謙一郎, 青山卓史, 側方根冠におけるシロイヌナズナ PLD $\zeta$ 2の役割, 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16~18日, 東京農業大学(東京都・世田谷)

和田悠貴香, 草野博彰, 巨真智子, 齊藤涼, 加藤真理子, 柘植知彦, 青山卓史, シロイヌナズの根毛伸長におけるPIP5K 遺伝子の役割, 第27回植物脂質シンポジウム, 2014年11月28日, 静岡市産学交流センター(静岡県・静岡市)

島村亮太, 谷口(山本)幸美, 谷口雅俊, 加藤真理子, 柘植知彦, 青山卓史, シロイヌナズナの側方根冠におけるPLD $\zeta$ -PAシグナルの役割, 第27回植物脂質シンポジウム, 2014年11月28日, 静岡市産学交流センター(静岡県・静岡市)

加藤真理子, 柘植知彦, 前島正義, 青山卓史, 根毛伸長時におけるシロイヌナズナCa<sup>2+</sup>結合タンパク質PCaP2とホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の細胞内動態, 第27回植物脂質シンポジウム, 2014年11月28日, 静岡市産学交流センター(静岡県・静岡市)

### [図書](計1件)

Kusano, H., Tominaga, R., Wada, T., Kato, M., and Aoyama, T. (2014) Phosphoinositide signaling in root hair tip growth. in "*Plant Cell Wall Patterning and Cell Shape*" (ed., Fukuda, H.: Wiley-Blackwell), 239-268, DOI: 10.1002/9781118647363.ch9

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 真理子 (KATO, Mariko)  
京都大学・化学研究所・助教  
研究者番号: 90736646