

研究終了報告書

「根冠の組織形成が創発する根の防御応答の時空間制御とその動態」

研究期間: 2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者: 宮島 俊介

1. 研究のねらい

土壌環境に炭素源をもたらす根では、その周囲に多種多様な病害微生物が集合し、感染や細胞破壊を通じ植物個体から炭素源を搾取する。根冠は根の成長を駆動する根端分裂組織を覆う層状組織で、内層に位置する幹細胞からの細胞新生と最外層の細胞除去による継続的なターンオーバーを繰り返すという特異な発生動態を示す（図 1）。これまで、根冠の周辺部と構成する側部根冠は、根圏に生息する多様な病害微生物の攻撃から根を保護する機能を担っていると考えられているが、その具体的な機や分子機構は未解明である。さらに、シロイヌナズナを含むアブラナ科植物では、側部根冠が、その最外層での細胞除去過程において、自発的なプログラム細胞死を遂げるという固有の発生過程を経る。この細胞死による側部根冠の除去は、アブラナ科植物が特有の機能を発するために独自に進化させた発生機構であると推察されるが、その発動原理や生理機能は不明であった。

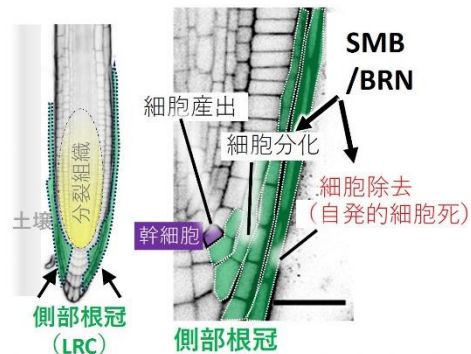


図 1 シロイヌナズナの側部根冠の組織形成

本研究では、研究代表者の先行研究の成果を基に、側部根冠の組織形成と防御二次代謝との時空間連動に着目し、根冠が発動する病害抵抗反応の発動動態を明らかにすることを目的とした。そのために、第一に、細胞レベルでターンオーバーを繰り返す側部根冠において、トリプトファン由来防御二次代謝産物の代謝段階を空間的に分離する“スイッチ”の仕組みを分子のレベルで解読をすすめた。また第二に、防御二次代謝を駆動する酵素複合体メタボロンを生体内で検出する新たな生体イメージング技術を確認し、病害微生物の攻撃に応じたメタボロンの構築ダイナミクの解読に挑戦した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、上記の研究のねらいに沿って、**[研究項目 1] 病害抵抗反応を駆動する側部根冠細胞の位置依存的な機能転換とその制御機構の解明**および**[研究項目 2]側部根冠における防御二次代謝産物合成メタボロンの構築動態の解明**の 2 つの研究項目について遂行していた(図 2)。

層構造を構成する側部根冠では、内層および最外層で、病害微生物に対する異なる応答を示す。すなわち、内層の側部根冠(In-LRC)では、病害微生物に応じてトリプトファン由来

防御二次代謝経路が活性する。また最外層 (Out-LRC)では、転写因子 SMB 機能依存的に、細胞死直前にトリプトファン由来防御二次代謝産物グルコシノレート(GSL)を加水分解し抗菌性物質を作り出すミロシナーゼ TGG4/TGG5 が細胞壁に蓄積し、Out-LRC の残渣と共に根の表面に TGG4/TGG5 が沈着する。本研究では、これら研究代表者の独自の先行研究の成果を基に研究計画を立案した。

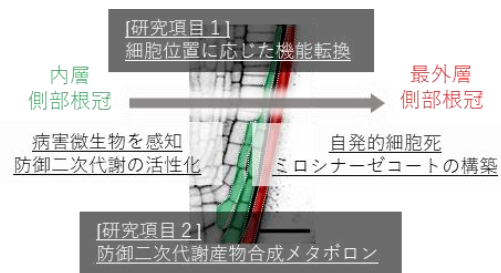


図2 研究の全体像

研究項目 1 に関しては、内層および最外層の側部根冠の病害応答を制御する分子機構の解明、および、その細胞位置に応じた機能転換の仕組みを解析した。その結果、In-LRC での、微生物の認識から酵素遺伝子群の発現に至る細胞シグナル経路の同定を達成した。また、最外部での細胞死が、細胞内に蓄積し

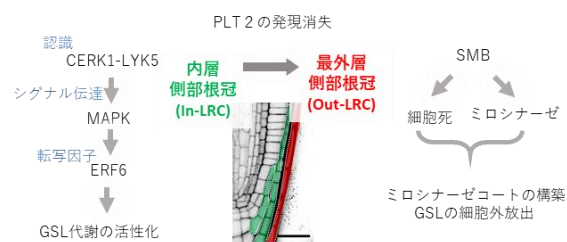


図3 研究項目 1 の成果の概要

た GSL の細胞外へと放出に機能することを見出している。加えて、転写因子 PLT の発現変化が内層-最外層の細胞機能の転換の要因となっていることを明らかにした (図 3)。

また、研究項目 2 では、FRET-FLIM によるトリプトファン由来防御二次代謝経路の酵素遺伝群の酵素複合体メタボロンの形成の可視化に取り組んだ。その結果、トリプトファン由来防御二次代謝経路の初発酵素である CYP79B2/B3 を中心とした酵素複合体メタボロンの病害微生物に応じた構築の変化を見出す事に成功した (図 4)。

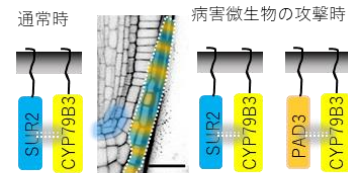


図4 研究項目2の成果の概要

これらの上記の成果は、シロイヌナズナを題材に、これまでほとんど明らかにされていなかった根冠が駆動する免疫応答の分子自体を解き明かすことが達成された。

(2) 詳細

[研究項目 1] 病害抵抗反応を駆動する側部根冠細胞の位置依存的な機能転換とその制御機構の解明

植物の病害抵抗性の発揮には、植物種固有の病原体誘導性二次代謝産物が中心的な機

能を有することが知られており、シロイヌナズナでは、グルコシノレート(GSL)やカマレキシンなどのトリプトファン由来の二次代謝産物がこれにあたる。中でも、GSL はミロシナーゼ酵素により加水分解されることで、初めて抗菌物質へと変換される事など、その代謝経路および病原体誘導性を担う分子の同定が進め

られてきた。一方、根の「どの細胞が病害微生物を認識し」、局所的かつ偶発的に発生する病原微生物の攻撃に対し、「いつ、どこで防御二次代謝産物を介した抵抗反応の駆動するのか」という植物防御応答の時空間制御系についての理解が乏しかった。

そこで第一に、シロイヌナズナの主要な防御二次代謝であるトリプトファン由来防御二次代謝経路に着目し、その酵素遺伝子群の網羅的発現解析から、病原性糸状菌に応じた代謝経路の活性化の空間パターンを検証した。その結果、GSL およびカマレキシンの合成に至る経路遺伝子群は、通常時、根の中心部での遺伝子発現を示すのに対し、病原性糸状菌の接種後、根冠、特に、内層にある In-LRC 細胞でそれら遺伝子発現が誘導されることを見出した(図5)。

次に根冠でのトリプトファン由来防御二次代謝の活性化の免疫応答での重要性を検証した。トリプトファン由来防御二次代謝の初発酵素である CYP79B2/B3 の二重機能欠損体(*cyp79b2b3*)に対し、根冠特異的に CYP79B3 遺伝子を発現する形質転換体は、*cyp79b2b3* と比較し有意に病原性糸状菌に対する抵抗性が回復した。以上の結果は、根冠でのトリプトファン由来防御二次代謝経路の活性化が、病害微生物に対する抵抗性寄与に機能することを示す。

さらに、トリプトファン由来防御二次代謝の活性化に至る分子制御系の解明を行った。病原性糸状菌の細胞壁成分であるキチンは MAMP としてシロイヌナズナ CERK1-LYK5 共受容体により認識されることが知られている。発現解析から、CERK1 は根の全体で発現する一方、LYK5 は In-LRC で特異的な発現を有



図5 病原性糸状菌に応じたトリプトファン由来防御二次代謝経路活性化の空間パターン

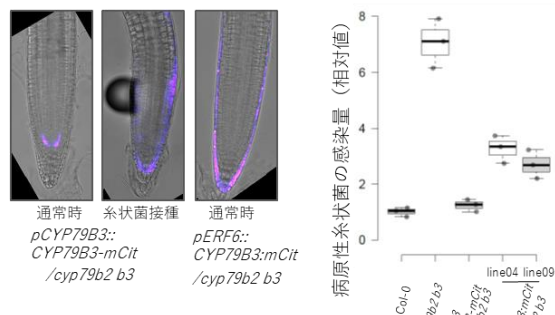


図6 病害微生物に応答した根冠でのトリプトファン由来防御二次代謝

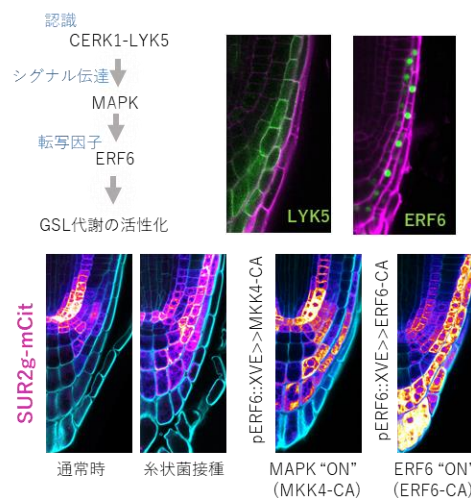


図7 トリプトファン由来防御二次代謝の活性化機構

すること、すなわち、CERK1-LYK5 共受容体が In-LRC において構築されることを見出した(図 7)。ただし、糸状菌由来の MAMP であるキチン処理では、病原性糸状菌の接種時にみられる In-LRC でのトリプトファン由来防御二次代謝の酵素遺伝子の発現誘導は観察されなかった。一方、病原性糸状菌による植物細胞壁分解産物として発生する DAMP セルビオースとともに、キチンを添加した場合、病原性糸状菌接種と同様に、In-LRC での遺伝子発現誘導が観察され、また、このキチンとセルビオースによる相乗的な効果には CERK1-LYK5 機能が必須であることを実証した。これらの結果から、根冠による病原性糸状菌の認識には、MAMP であるキチンおよび細胞障害により発生する DAMP セルビオースの 2 つの分子種の認識が関与していることが考えられる。

病原性糸状菌の認識後、MAPK 経路の活性化とその下流転写因子のリン酸化により、防御応答遺伝子の発現が誘導されることが知られている。in silico 解析から、既知の MAPK 標的転写因子である ERF6 が In-LRC 特異的に発現することを見出した。また、リン酸化模倣変異を導入した ERF6 (ERF6-CA) の発現誘導は、トリプトファン由来防御二次代謝経路の酵素遺伝子の発現を誘導した。以上の結果から、In-LRC での病原性糸状菌からトリプトファン由来防御二次代謝酵素の発現誘導に至る分子経路を見出すことができた (図 7)。

最外層側部根冠 (Out-LRC) は、転写因子 SMB 依存的にプログラム細胞死を経て細胞が除去される。この SMB と冗長的な機能を有する BRN/2 の三重機能欠損体 (*smb brn1 brn2*) は、Out-LRC が根の表面に残存すると共に、病原性糸状菌に対する抵抗性が著しく低下する。SMB の下流因子の探索から、

GSL を加水分解し抗菌性物質を産生する酵素ミロシナーゼ TGG4/TGG5 が、SMB 依存的に細胞死直前の Out-LRC で発現し、細胞壁に蓄積したのち、Out-LRC の残渣と共に根の表面に沈着するミロシナーゼコートを構築することを見出していた(図 8)。

そこで、病原性糸状菌への抵抗性発揮における TGG4/5 の機能を確認するため、CRISPR/Cas9 により *tgg4 tgg5* 二重機能欠損体を作成したが、有意な抵抗性の低下は見出されなかった。一方、TGG4 および TGG5 の発現が消失する *smb brn1 brn2* 変異体背景において、根冠での TGG4 の発現を回復した植物体 (*pSMB::TGG4-mScarlet/smb brn1 brn2*) は、*smb brn1 brn2* の病原性糸状菌に対する抵抗性を一部回復した(図 8)。これらの結果は、TGG4 および TGG5 は、SMB BRN1 BRN2 の下流で病原性糸状菌に対する抵抗性反応に機能するものの、さらなる機能冗長性をもつミロシナーゼが存在することを示唆する。

上記の成果は、側部根冠細胞が、内層-最外層という細胞位置に応じて、病害応答における機能を転換していることを意味している。そこで、この位置依存的な機能転換の仕組みを解析

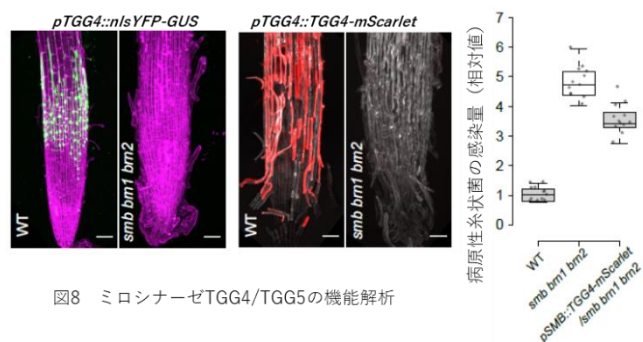


図8 ミロシナーゼTGG4/TGG5の機能解析

するため、根の幹細胞性の維持に機能するPLT2転写因子に着目した。PLTは静止中心とその周囲にある幹細胞で高い発現を示すが、Out-LRCにおいてPLT2の発現が消失することを発見した。PLT2のOut-LRCでの発現誘導は、自発的細胞死の阻害を引き起こしたことら、

PLT2の発現消失が起因となり、Out-LRCの自発的細胞死が誘導されることが示唆された(図9)。また、自発的細胞死の阻害は、GSLの過剰蓄積を引き起こすこと、さらには、同様のGSLの過剰蓄積が*smb brn1 brn2*変異体でも生じていることから、自発的細胞死によりGSLが細胞外へ放出されている可能性が考えられる。実際、PLT2による自発的細胞死の阻害は、*smb brn1 brn2*変異体同様に、病原性糸状菌に対する抵抗性の低下が観察された(図9)。

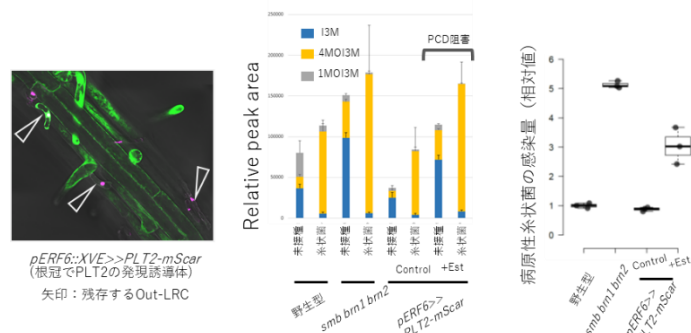


図9 PLT2の発現消失が誘発する自発的細胞死とGSLの細胞外放出

これら研究結果から、シロイヌナズナの根冠では、病害発生に応答したGSL代謝の活性化を担う内層の側部根冠細胞と、ミロシナーゼコートの構築およびGSLの放出を担う最外部の側部根冠細胞が連動することで、免疫応答の高度な時空間制御を構築していることを見出した(図10)。その中で、このPLT2の発現消失は、細胞機能の転換を担う重要な因子であることを突き止めている。今後、このPLT2の発現制御に着目し、側部根冠細胞の位置依存的な機能転換のさらなる仕組みの解明を進める。

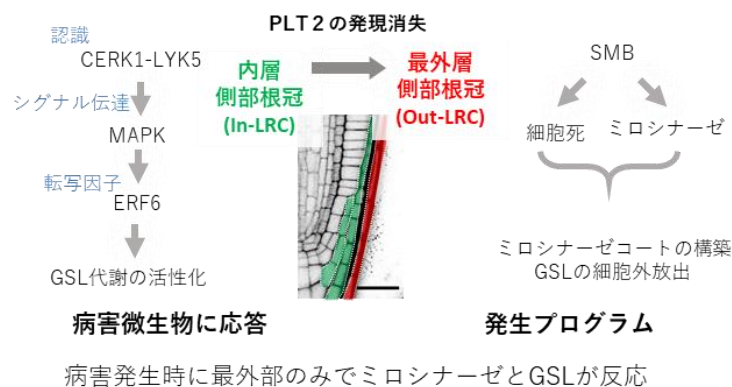


図10 研究項目1の成果まとめ

[研究項目2] 側部根冠における防御二次代謝産物合成メタボロンの構築動態の解明

In-LRCでは、病害誘導的にGSLを含むトリプトファン由来の防御二次代謝産物の合成が誘導されると考えられる。この二次代謝産物の産生に関しては、生体内でその中間産物が検出されないことから、一連の酵素タンパク質の複合体であるメタボロンが構築されることで、代謝経

路の効率化および迅速化が起きていると推定されているが、これまで、実際のシロイヌナズナ生体内で可視化した研究成果はない。また、この代謝経路により、GSL を含め、カマレキシンや 4-ヒドロキシインドール-3-カルボニルニトリル (4-OH-ICN) など、複数の最終産物が生まれるが、それらはすべて共通してERにアンカーするCYP79B2/B3を初発酵素とし、異なる下流 P450/CYP 酵素の組み合わせにより、生み出される最終産物が多様化している。すなわち、病害微生物の攻撃に 応 答 し、LRC 細胞において CYP79B2/B3 を基軸として、細胞内で多様なメタボロンがダイナミックに構築されていると考えられる。

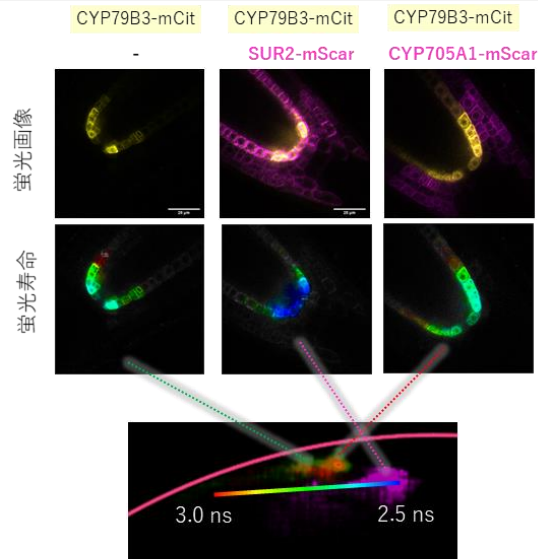


図11 CYP79B3とSUR2の選択的な相互作用

異なる蛍光タンパク質を付加した P450 間の相互作用を指標に、FRET-FLIM 解析から、生体内での酵素複合体メタボロンの可視化を試みた。トリプトファン由来防御二次代謝経路の初発酵素にあたる CYP79B3 にドナー蛍光タンパク質となる mCitrine を、また、GSL 経路の P450 酵素である SUR2 にアクセプター蛍光タンパク質となる mScarlet を付加し、シロイヌナズナ植物体でそれぞれの機能欠損体を相補させたうえで、これら 2 酵素の相互作用を確認した。その結果、病原体非接種時においては、これら酵素が発現する静止中心付近の細胞において、有意な mCitrine の蛍光寿命の退縮、すなわち、CYP79B3 と SUR2 の相互作用が検出された(図 11)。一方、トリプトファン由来防御二次代謝経路に存在しない P450 である CYP705A1 に関しては CYP79B3 との相互作用が検出されなかった(図 11)。この結果は、P450 のメタボロンの構築には酵素選択性があることが示唆される。また、GSL 経路の細胞質局在酵素である UTG78B1 と SUR2 に関しても FRET-FLIM により相互作用が検出されたことから、P450 だけでなく細胞質局在酵素も含めた GSL 経路の酵素複合体メタボロンが構築されていることが示唆された。

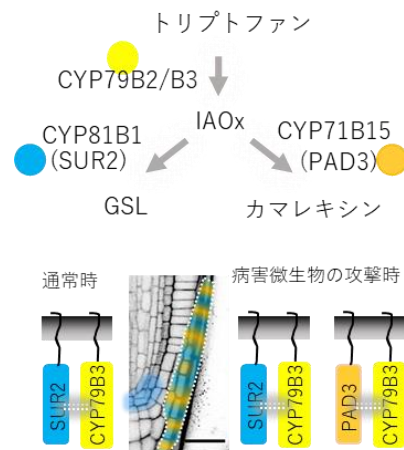
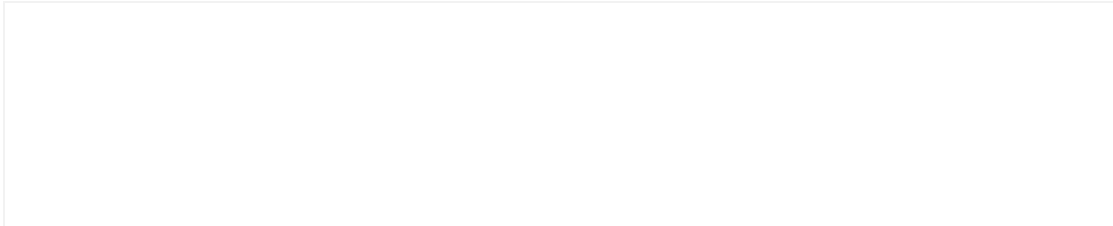


図12 研究項目2の成果のまとめ

また、病原性糸状菌の接種においては、側部根冠で CYP79B3-SUR2 に加え、側部根冠での発現誘導されたカマレキシン経路酵素 PAD3 と CYP79B3 との相互作用も観察された。これらの結果は、側部根冠細胞において、トリプトファン由来防御二次代謝経路の活性化に伴い、異なるタイプの酵素複合体メタボロンが構築されることを示唆する。



3. 今後の展開

本研究では、シロイヌナズナの細胞死という特異な根冠発生形質と、固有の防御二次代謝の連動による病害抵抗反応の分子機構の解明を達成してきた。根冠は植物の根に共通して存在する組織である一方、根冠の発生形質、特に、その最外部での細胞除去形質に関しては、植物種間で多様性が存在する。この、根冠の組織発生の多様性は、植物のもつ多様な土壌適応機構の基盤となっている可能性が考えられる。今後、シロイヌナズナに加え、様々な植物種を研究材料として加えることで、根冠の発生形質の多様性に着目し、植物の土壌適応機構の進化に迫る研究を推進する。

4. 自己評価

本研究によりシロイヌナズナの根冠が発動する病害抵抗反応の分子機構の解明が大きく進展した。その点に関しては、研究計画の順調な遂行が行えたと考えられる。また、生体内での機能的な酵素複合体メタボロンの検出は非常に新奇性の高い成果と考えられる。一方、病害抵抗反応の動的変化、特に、メタボロンの構築動態については、研究期間内に成果をあげることができなかった。その理由の1つに蛍光タンパク質を用いた場合のFRET-FLIMでは、蛍光退色や時間分解能の低さなど、技術的な限界が存在する。今後、SNAP-tag など新たな蛍光標識によるFRET-FLIM 解析技法の構築が必要であると考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 件

1. “Patterned proliferation orients tissue-wide stress to control root vascular symmetry in Arabidopsis” Motohiro Fujiwara, Miyu Imamura, Katsuyoshi Matsushita, Pawel Roszak, Takafumi Yamashino, Yoichiroh Hosokawa, Keiji Nakajima, Koichi Fujimoto, Shunsuke Miyashima Current Biology 10.1016/j.cub.2023.01.036
2.
3.

(2) 特許出願

研究期間全出願件数：件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

1	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	
	概 要	
2	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	
	概 要	

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

[1] 根冠の組織形成が創発する根の防御応答の時空間制御とその動態

宮島俊介 第 65 回 日本植物生理学会年会 神戸 2024

[2]「根冠が駆動する多様な土壌環境応答とその動態」

宮島俊介 第 87 回 日本植物学会年会 北海道 2023

[3]「蛍光寿命イメージングが明らかにするシロイヌナズナ根冠機能とその発動」

宮島俊介 中島敬二 第 86 回 日本植物学会年会 京都 2022

[4]「蛍光寿命イメージングによる根の対微生物応答の時空間ダイナミクスの解明」

宮島俊介 第 63 回 日本植物生理学会年会 筑波、オンライン 2022

[5]「シロイヌナズナの根におけるキチン応答の組織特異性とその病害抵抗性における機能」

岩井雅斗、宮島俊介、中島敬二 第 85 回 日本植物学会年会 オンライン 2021

[6]「土壌微生物の動態を制御する根冠の細胞形態形成と防御機構との統御系」

宮島俊介 第 62 回 日本植物生理学会年会 (松江 オンライン)2021

プレスリリース

[1] 植物は細胞を"寿司詰め"にして形を整える！ 細胞を対称に配置するタンパク質を特定

～植物の形や成長を促す技術に期待～ 2023 年 2 月 14 日