

45. LZY を起点とした重力応答するオーキシン輸送の動的制御機構

自然科学研究機構基礎生物学研究所 教授 森田（寺尾） 美代

概要

植物の重力屈性における重力感知機構は、植物生理学における長年の謎であった。我々はその分子メカニズム解明のための鍵因子 LAZY1-LIKE (LZY) を同定した。重力感受細胞である根のコルメラ細胞において重力側細胞膜への極性局在を示す LZY は、オーキシン輸送に関与する RLD を細胞膜にリクルートする機能を持つ。RLD と相互作用する膜交通関連因子や、同因子により局在を制御されるオーキシン輸送促進機能を有するキナーゼが明らかにされている。従って、重力側細胞膜上で LZY-RLD を核として、オーキシン輸送制御複合体が形成されることが推測される。本研究では、オーキシン輸送制御複合体実体解明を目指した解析を行った。その結果、新たな LZY の相互作用因子の候補リストを得ることができた。また、この解析に必要な形質転換体の作成を進めた。LZY はアミロプラスト近傍の重力側の細胞膜上に集積すると共に、アミロプラストが離れると細胞膜からは消失することによって、常に重力側へ極性示す。本研究では、LZY タンパク質の分解制御がこの性質に重要であることを示した。

背景および目的

地球上のほとんどの生物は、地球上で唯一不変の環境シグナルである重力ベクトルを方位の認識に利用している。重力方向に沈降する平衡石は、多くの生物の重力感知に利用されている。植物は、重力屈性により自身の体を地面に固定するとともに、資源取得や繁殖を有利にする方向へと器官を伸長させる。重力屈性においては、デンプンを高度に蓄積したプラスチドの一種（アミロプラスト）を平衡石として利用し、重力方向を感知するというデンプン平衡石仮説が 100 年以上前に提唱され広く受け入れられてきたが、重力感知の分子機構は不明であった(1)。根では、根端にある重力感受細胞（コルメラ細胞）に重力方向に沈降するアミロプラストが存在する。そして重力方向に植物ホルモンであるオーキシンをより多く輸送し、器官内にオーキシンの濃度勾配を形成することで偏差成長を促し屈曲する。我々は、*Arabidopsis thaliana* のコルメラ細胞で働く重力情報伝達の鍵因子である LAZY1-LIKE (LZY) family タンパク質が、アミロプラストから近接する細胞膜（即ち重力方向）へと移行すると共に、アミロプラストから遠位となった細胞膜からは消失することで、常に重力側の細胞膜へ極性を持って局在することを明らかにした(2)。さらに、LZY はオーキシン輸送制御に関わる RLD タンパク質を細胞膜上に呼び込むことを示した(3)。これにより、動的に変化するアミロプラストの位置情報を LZY 分子の移動により細胞膜へ伝え、オーキシン輸送制御に反映させるという、全く新しい重力感知・情報伝達モデルを提示した(2)。本研究ではこのモデルに基づき、LZY の集積部位に形成される動的なオーキシン輸送制御反応場の形成機構の理解を目指し、1) LZY-RLD を核として細胞膜上に形成されるオーキシン輸送制御複合体、2) アミロプラストが移動後に細胞膜上の LZY が消失する機構、に着目した研究を行った。

方法

本研究で使用する実験系には、コンストラクトの作成、形質転換体の確立、交配等を数多く遂行する必要がある、時間を要することから進行中のものが多い。ここでは、期間内で一定の結論が得られかつ公開可能な項目に絞って報告する。

1) LZY-RLD を核として細胞膜上に形成されるオーキシン輸送制御複合体

①オーキシン輸送制御複合体の構成因子の単離

LZY の C 端に位置する RLD との相互作用領域(CCL)にミリストイル化配列を付加した Myr-CCL に近位依存性ビオチン化酵素 TurboID を融合し、自身のプロモーター制御下で発現する形質転換体を用いて、ビオチン標識されたタンパク質を回収し、質量分析による候補因子のスクリーニングを行った。

②根表皮細胞を用いた解析系の確立

LZY 依存的オーキシン輸送制御複合体形成の解析を高い時空間解像度で行う目的で、CCL 領域を用いて、任意のタイミングで細胞膜に RLD を呼び込む系の作成を目指した。FKBP にミリストイル化サイトを付加して細胞膜上に係留しておき、FRB-CCL をラパマイシン依存的に細胞膜へ移行させることを目的としたコンストラクトを作成し、シロイヌナズナプロトプラストおよびタバコ葉を用いた一過的発現系での確認を行った。

2) アミロプラストが移動後に細胞膜上の LZY が消失する機構

LZY に存在する PEST 様配列に変異を導入し、LZY の存在量、細胞内局在、重力屈性に与える影響を調べた。生化学的手法により、LZY のユビキチン化について調べた。

結果および考察

1) LZY-RLD を核として細胞膜上に形成されるオーキシン輸送制御複合体

Myr-CCL-TurboID によりビオチン化修飾されたタンパク質のリストを作成した。現在候補因子の絞り込みを進めている。

FKBP-FRB を利用した系の一過性発現系により、Myr-FKBP、FRB-CCL がそれぞれの概ね期待される細胞内局在を示すことを確認したが、FRB-CCL のラパマイシン添加依存的細胞膜局在を確認できなかった。リンカー長を最適化するなどの更なる条件検討が必要だと思われる。

2) アミロプラストが移動後に細胞膜上の LZY が消失する機構

プロテアソーム依存的タンパク質分解に関連することが期待される PEST 様配列を欠損させた LZY-mCherry は、野生型よりも高い蛍光輝度を示した。また細胞膜において強い蛍光シグナルが確認されたが、重力方向への極性は失われていた。このような LZY(Δ PEST)-mCherry を *lzy* 変異体背景に導入すると、垂直方向を保って発芽・生育させた植物の主根や側根伸長方向は野生型を導入した場合と大きな差は見られなかった。一方、傾斜刺激に対する主根の応答能を比較したところ、変異型導入植物は重力方向へと伸長方向を変化させるのにより長い時間を要しており、重力応答能の低下が確認された。

コルメラ細胞における LZY-mCherry の蛍光輝度は非常に弱い、プロテアソーム阻害剤の存在下では細胞膜上に非常に高い輝度が確認されるようになった。抗 mCherry 抗体を用いた免疫沈降によって LZY-mCherry を回収し、ウェスタン解析を行ったところ、プロテアソーム阻害剤処理によりタンパク質量が増加することを明らかにした。更に、同試料の高分子量側に、抗ユビキチン抗体で検出されるスミアが確認されたことから、LZY-mCherry はユビキチン化を受けることが示された。

以上の結果から、コルメラ細胞において LZY はユビキチン-プロテアソーム系による量的制御を受け、タンパク質量が低く保たれることが分かった。また、細胞膜上の LZY がその制御を受けやすく、重力側細胞膜への極性局在の維持には、このタンパク質量の制御が寄与していると考えられる。また、この制御は急激な傾斜刺激への素早い重力屈性応答を可能にしていると推測された。

最後に、本助成により LZY 動態の解析に必須の高感度 EM-CCD カメラの更新が実現し、本研究はもちろん今後の研究の推進が可能となったことに、深く感謝申し上げます。

(完)

発表論文

- 1) Morita, M.T., Nishimura, T., Shikata, H. (2026) Gravity sensing for gravitropism. *Ann. Rev. Plant Biol.* 77, doi. 10.1146/annurev-arplant-070225-032745

引用文献

- 1) Moirita, M.T. (2010) Directional gravity sensing in gravitropism. *Ann. Rev. Plant Biol.* 61, 706-720.
- 2) Nishimura, T., Mori, S., Shikata, H., Nakamura, M., Hashiguchi, Y., Abe, Y., Hagihara, T., Yoshikawa, H.Y., Toyota, M., Higaki, T., Morita, M.T. (2023) Cell polarity linked to gravity sensing is generated by LZY translocation from statolith to the plasma membrane. *Science*, 381, 6661, 1006-1010.
- 3) Furutani, M., Hirano, Y., Nishimura, T., Nakamura, M., Taniguchi, M., Suzuki, K., Oshida, R., Kondo, C., Sun, S., Kato, K., Fukao, Y., Hakoshima, T., Morita, M.T. (2020) Polar recruitment of RLD by LAZY1-like protein during gravity signaling in root branch angle control. *Nat. Commun.* 11, 76.