

シロイヌナズナにおける *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の機能解析

2021年度

京都大学大学院 理学研究科 生物科学専攻

黒田 凌

目次

目次	1
要旨	2
略語一覧	3
序論	4
PIP5K の機能	4
植物の PIP5K	6
植物の PIP5K の機能解析	11
PIP5K と環境ストレス	13
高浸透圧ストレスと PIP5K によるエンドサイトーシスの促進	14
まとめ	15
結果	16
<i>PIP5K7, PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> のプロモーター活性	16
<i>PIP5K7, PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> の細胞内局在	20
<i>PIP5K7, PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> の T-DNA またはトランスポゾン挿入変異体	22
<i>pip5k7, pip5k8</i> および <i>pip5k9</i> の表現型と高浸透圧ストレス	25
高浸透圧ストレスによる <i>PIP5K7, PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> の発現量と局在の変化	37
高浸透圧ストレスでの <i>PIP5K7, PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> のエンドサイトーシス	42
<i>PIP5K7, PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> が産生する PI(4,5)P ₂ の局在	45
考察	49
<i>PIP5K7, PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> の組織特異的な発現パターン	49
<i>PIP5K7, PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> の細胞内局在パターン	50
<i>PIP5K7, PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> の機能欠損変異体	50
高浸透圧ストレスでの <i>PIP5K7, PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> の機能欠損変異体の表現型	51
高浸透圧ストレスにおける <i>PIP5K7, PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> の役割	52
まとめ	54
材料と方法	56
植物の生育条件と材料	56
導入遺伝子の作製と形質転換植物	60
GUS 染色	66
共焦点レーザー走査顕微鏡	67
定量的リアルタイム RT-PCR	68
根端分裂組織における細胞数と長さの測定	72
謝辞	73
参考文献	74

要旨

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ(PIP5K)はリン脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸[PI(4,5)P₂]を産生する。PI(4,5)P₂は細胞膜上でシグナル分子として働き、植物の成長、発生、環境応答などに重要な役割を担っている。シロイヌナズナには B タイプの PIP5K が 9 個存在し、アミノ酸配列から PIP5K1-3, PIP5K4-6 および PIP5K7-9 の 3 つのサブグループに分けられる。これらの中で PIP5K7-9 の遺伝子は陸上植物において広く保存されているため、*PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* は陸上植物に共通の重要な機能を保持していると考えられる。そこで、私はシロイヌナズナの *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* に着目し、それらに重複する生物学的機能を明らかにするため研究を行った。まず、*PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の組織特異的な発現パターンを調べるため、これらのプロモーター活性を解析した。その結果、これらのプロモーターは主に分裂組織と維管束で活性を示した。さらに、*PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の細胞内での局在パターンを調べるために蛍光タンパク質を用いて観察した結果、これらは主根の根端分裂組織における表皮細胞の細胞膜に局在していた。次に、*PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の機能欠損変異体 *pip5k7*, *pip5k8* および *pip5k9* を単離した。単離した単一変異体から多重変異体を作製し、*PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の発現、局在パターンを元に表現型を観察した。その結果、通常生育条件下において単一変異体だけでなく多重変異体は顕著な表現型を示さなかった。しかし、高浸透圧ストレス条件下において、*pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体は野生型と比較して主根の伸長が抑制され、根端分裂組織の大きさが減少していた。さらに、*pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体では主根の根端分裂組織における表皮細胞での高浸透圧ストレスによるエンドサイトーシスの促進が野生型より遅延していた。一方、主根の根端分裂組織における表皮細胞での蛍光タンパク質を用いた観察から、*PIP5K7*, *PIP5K8*, *PIP5K9* および PI(4,5)P₂ は高浸透圧ストレスにより細胞膜付近で粒状の局在を示した。また、*pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体では通常生育条件下において野生型より細胞膜に局在する PI(4,5)P₂ が有意に少なく、高浸透圧ストレスによる細胞膜付近での PI(4,5)P₂ の粒状の局在も減少していた。これらの結果から、シロイヌナズナの *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* は重複して根端分裂組織の細胞膜で PI(4,5)P₂ を産生し、高浸透圧ストレス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機能することが明らかとなった。また、これらの結果は陸上植物における根の地中環境適応に意義を示すと考えられる。

略語一覽

ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
ACT2	Actin 2
BFA	brefeldin A
CINV1	cytosolic invertase 1
GFP	green fluorescent protein
GUS	β -glucuronidase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MORN	membrane occupation and recognition nexus
MS	Murashige and Skoog
OSIMS	osmotic stress-induced membrane structures
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PIN	PIN-FORMED
PIP5K	phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase
PI4P	phosphatidylinositol 4-monophosphate
PI(4,5)P ₂	phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
RNAi	RNA interference
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
WT	wild type
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide
YFP	yellow fluorescent protein

序論

PIP5K の機能

植物は自然環境で生存していくために細胞内シグナル伝達や遺伝子発現制御を介して環境に適応している。植物における典型的な細胞内シグナル伝達物質としてホスホイノシチドなどのリン脂質がある。ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP5K)はリン脂質であるホスファチジルイノシトール 4-リン酸(PI4P)を基質とし、PI4Pのイノシトール環の 5 位をリン酸化することでホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 [PI(4,5)P₂]を産生する(Divecha *et al.*, 1995; Rameh *et al.*, 1997; Elge *et al.*, 2001; Mueller-Roeber and Pical, 2002; Weernink *et al.*, 2004)(図 1)。PI(4,5)P₂は真核細胞における生体膜の構成成分であるだけでなく、特定の膜領域に局在することによって細胞内プロセスを制御するシグナル伝達物質である(Di Paolo and De Camilli, 2006; Michell, 2008)。特に、PI(4,5)P₂は細胞膜またはその膜サブドメインに局在し、膜交通、イオン膜輸送、細胞骨格ダイナミクスなどに関わる調節タンパク質と物理的に相互作用することが知られている(Krauss and Haucke, 2007a; Sun *et al.* 2013; Kolay *et al.*, 2016)。PI(4,5)P₂の局在パターンは細胞の種類によって大きく異なり、基本的にはホスホイノシチド代謝酵素による産生と分解によって決定され、その中でも PIP5K はPI(4,5)P₂の局在パターンの重要な決定因子である(Loijens *et al.*, 1996; Oude Weernink *et al.*, 2004; Krauss and Haucke, 2007b; van den Bout and Divecha, 2009; Colin and Jaillais, 2020)。高等植物ではホスホイノシチド代謝酵素遺伝子の重複性が高いことやリン脂質代謝経路が複雑であることなどから、リン脂質シグナル伝達機構については未だに不明な点が多く残っている。

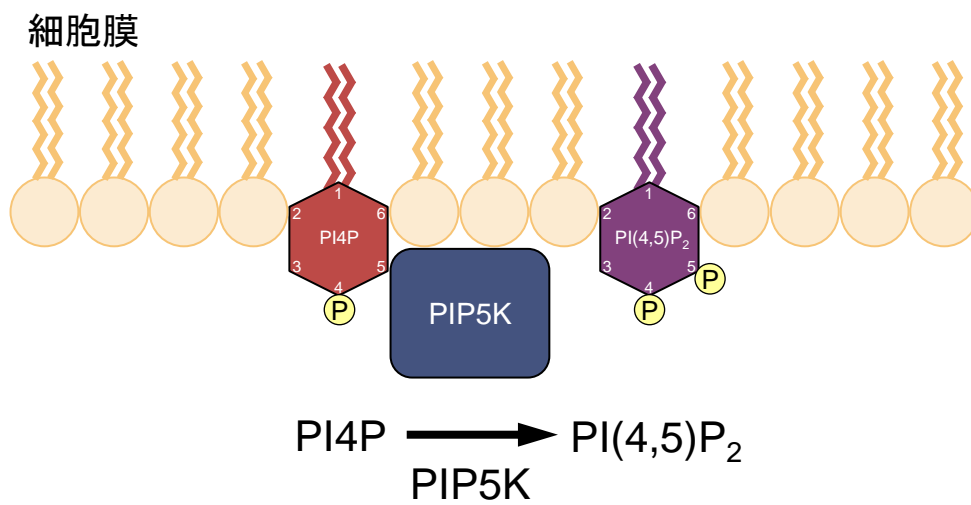


図1. PIP5Kの機能

細胞膜上におけるPIP5Kの機能を示した。PIP5Kを青、PI4Pを赤、PI(4,5)P₂を紫、P(リン酸)を黄色で示している。

植物の PIP5K

高等植物のゲノムは酵母や動物のゲノムと比較して多数の PIP5K の遺伝子をコードしている(Mueller-Roeber and Pical, 2002; Zhang *et al.*, 2020)。高等植物のモデル植物であるシロイヌナズナには PIP5K 触媒ドメインをもつタンパク質をコードする遺伝子が 11 個存在している(Mueller-Roeber and Pical, 2002)(図 2)。N 末端の membrane occupation and recognition nexus (MORN) モチーフの有無に基づいて、PIP5K1-9 は B タイプ、PIP5K10 と PIP5K11 は A タイプのサブグループに分けられる(Mueller-Roeber and Pical, 2002)(図 2)。B タイプの PIP5K1-9 は N 末端に酵母の PIP5K(ScMss4p)やヒトの PIP5K(HsPIP1b, HsPIP1b)には存在しない MORN モチーフをもち、C 末端には酵母やヒトの PIP5K に保存されている触媒ドメインをもっている(Mikami *et al.*, 1998)(図 2)。MORN モチーフをもつ PIP5K 以外のタンパク質はジャンクトフィリンと呼ばれており MORN モチーフを介して細胞膜に結合することが知られている(Takeshima *et al.*, 2000)。このことから、植物の PIP5K は MORN モチーフを介して細胞膜に結合し、細胞質側に触媒ドメインを出すことによって細胞膜直下で PI(4,5)P₂ を産生していると考えられている(Mueller-Roeber and Pical, 2002)。また、B タイプの PIP5K1-9 はアミノ酸配列の類似性から PIP5K1-3, PIP5K4-6 および PIP5K7-9 の 3 つのサブグループに分類される(Mueller-Roeber and Pical, 2002)(図 3)。PIP5K1 と PIP5K2、PIP5K4 と PIP5K5、PIP5K7 と PIP5K8 はそれぞれアミノ酸配列の相同性が高いため、比較的近い過去に遺伝子重複が起きたと考えられている(Mueller-Roeber and Pical, 2002)。すべての被子植物のゲノムに A タイプの PIP5K の遺伝子が含まれているわけではない一方で、被子植物は B タイプの 3 つのサブグループにそれぞれ少なくとも一つの PIP5K の遺伝子を保持している(Zhang *et al.*, 2020)。これは B タイプの 3 つのサブグループが被子植物間で保存された重要な機能を保持することを示唆している(Zhang *et al.*, 2020)。

MORNモチーフ

1 2

		1	2		
AtPIP5K1	-MSDSEE-DEEEEEEASEVILSSVVQKKKKKLNRFGEVEERRDGLVLLAQSTPMVRSR	SQGTTRRVTPTP-LVDVEKPLNGDL	YGSFSGGFPHSGSKYLWKDGGCIYEGDWK 109		
AtPIP5K2	NMRPLVSEEEEEATEVLLVEKTKLCKRRGDEE-KTEERRDLALLAL-TPMVRSK	SQGTTRRVTPTPPPVDVEKPLNGDL	YMGTFSGGFPHSGSKYLWKDGGCIYEGDWK 110		
AtPIP5K3	-MQETVFLFTEENLNKEQSLGVKQKSSR	RVPVMTSCE	VSDTAAEIR IVEKVLKNGDL	YNGGLSAGVPHGTGKYLWSDGGCIYEGDWK 86	
AtPIP5K4	MSKEQSCVLKAWEVTVRKTQQAQKRANSIFG	TVSVAPQTDDATTTTEENDEETSNRSS	IGELYHAERILLPNGDYTTGQWYDSFPHGHGKYLWTDGCIYEGDWY 105		
AtPIP5K5	MSKDQSYVLKAWEVTVRKTQQAQKRANSVFG	TVSVAPHTDND-TTTDDNDETTNRSLSLEFYHAERVL	PNGDYTTGQWYDSFPHGHGKYLWTDGCIYEGDWY 103		
AtPIP5K6		MSVAHADDA	DYSRPTGES YHAEKALPSGDFYTGQRN	LDLPHGHGKYLWTDGCIYEGDWH 60	
AtPIP5K7		MDMRSG	DREFPNGDFYSGEVKGI	PNHGKGYAWSDGTIYEGDWD 44	
AtPIP5K8		METRPA	ERVFSGDYVSGQLKGLT	PHGKGYAWPDGTIYEGDWE 44	
AtPIP5K9	-MSGLDVRGAVFAERTKSDALTKKEILSA	LNSGEVSETS	EDARFRVR	ELVLPDGESYSGSLLDG	VNVEPGKYLWSDGGCIYEGDWR 86
AtPIP5K10				0	
AtPIP5K11				0	
酵母 ScMss4p		MSVLSRQPPSVVPLHLLTTSTRKTEQEPSLLHSAI	IERHQDLSPVNSNPNDSNHR	IKKDRNHTSYHSSSNSESNME 78	
ヒト HsPIP1b				0	
HsPIP1Ib				0	

	2	3	4	5	6	7					
AtPIP5K1	RGKASGKGF	SWP	SGATYEGEFKSGRM	EGFTTGADGDTYRGTWVADRKHGHGQKR	-YANGDFYEGTWRRLQDGRG	YVWRNGNQYTG	EWRSGVI	SGKGLL	VWPNGIRYEGGLWEN 225		
AtPIP5K2	RGKASGKGF	SWP	SGATYEGEFKSGRM	EGFTTGADGDTYRGTWVADRKHGHGQKR	-YANGDYEGTWRRLQDGRG	YVWRNGNQYTG	EWRNGVI	CGKGLV	LAMPNGIRYEGQWEN 226		
AtPIP5K3	RGKASGKGRF	SWP	SGATYEGQFKDGRMD	EGFTTIGIDGTYRGNLWGRKHGYPEKR	-YANGDYQGNW	KANLDGNGR	YVWSDGNEVYG	EWKNGVI	SGKGLM	WANGIRYDGLWEN 202	
AtPIP5K4	NGKTMGRGKGF	WSP	SGATYEGEFKSGYMDGVGLY	TGSPGDTYKQWVWNLKHGHG	IKR-FANGDYDGEWR	RGLQEAQKGYQWRD	GSYYMG	EWKNTI	CGKGTI	WTDGNRYDGFWD 221	
AtPIP5K5	NGKTMGNGKGF	WSP	SGATYEGEFKSGYMDGI	GTGTGSPGDYKQWVWNLKHGHG	VKS-FANGDAYDGEWR	RGLQEAQKGYQWRD	GSYYIYG	EWKNTI	CGKGSF	WITNGIRYDGFIDE 219	
AtPIP5K6	RGKTMGRGKGRF	SWP	SGATYEGDFKNGYMDGKGT	YIDSSGDLYRGSWVWNLRHGGQ	TKS-YVNGD	CDYDGEWR	RGLQDGHGRYQWK	NENHYIYG	QWKNGL	MWNGTMI	WSDGNRYDGSWED 176
AtPIP5K7	EGKI	SGKGL	IWSSGAKYEGDFSGGL	HGFGLTSPDES	VYSGAWRMINVRHGLGRKE	-YCNGLYDGL	WKEGLQDGRG	SYWITNGIRYIYG	NWKKGK	MGERGVI	WENGDLYDGFILN 160
AtPIP5K8	EGKI	SGRGL	IWSSGAKYEGDFSGGL	HGFGLTSPDGS	VYAGAWRMINVRHGLGRKE	-YCNSDYDGS	WRGLQDGS	SYWYNGIRFIYG	NWKKGK	MGRGVI	WANGDLFNGFILN 160
AtPIP5K9	RGMRHG	I	GNRWASGAS	YDGEFSGGYMHGSGTYVDANKL	TYKGRWRLNLKHGLG	QYV-YPNG	DVFE	GSWI	QGLGEG	PGKYT	WANKVYVLYG 202
AtPIP5K10											0
AtPIP5K11											0
酵母 ScMss4p	SPRLSDGESSTPTS	I	EELNPTINN	SRLVKRNYSISIDPLH	NNSNNNTDDHPNTITSPRPN	STSNKEMQKYSFPEGKESKKIT	TTPSLNS	NNGLDL	DNSSLV	HTDYSIQD	LNDHILLNKR 198
ヒト HsPIP1b										MSAAENG	EAAP 12
HsPIP1Ib											0

	7	8																												
AtPIP5K1	GIPKNGVFTWSDGSSCVGAWNES	-NIMRSFFNGVEKND-LIVGNRKR	SSVDSGAGSLGGEKVFPRIGI	WESDGE	EAGDITC		DIIDN-VEASM 314																							
AtPIP5K2	GVPKGSVFTWADGSSWI	GSWNESS-NLMRNFFDGI	EKNE-LIVATRKR	SSVDSGAGSLGGEKIFPRIGI	WESDGE	EAGDITC	DIVDN-VEASV 316																							
AtPIP5K3	GAPVGKGLVSWGEEKSYNGWGRK		SKKKDE-EIVQNHKLS	SVET-LSANTN	FPRIGI	SELEDTGVDH	VEASPYTS	ESDTS	GGGEQE 287																					
AtPIP5K4	GFPRNGTTFKWADGSFY	GHWSKDP	PEEMNGTYTPSGDDGS	PEWDPKD	VFT-NLSEYK	ICSG	ERVPLPSQKK	LSVWNSS	KRVEKPR	RSV 310																				
AtPIP5K5	GFPRNGTTFKWADGSFY	GHWSKDP	PEEMNGTYTPSGNEGN	LEWDPKD	LFN-NLSEYTI	ICSG	ERVPLPSQKK	LSVWNSS	KRIEKP	RRTSV 308																				
AtPIP5K6	GAPKNGTTFRWSDGSFY	GVWSKDP	KEQNGTYTPSTSSGN	FDWQ	QVQFYVDL	SECVV	TCQRI	VPVLP	PSQMP	VWY	GASEQS	SSGNRT	KNSER	RRRSV 275																
AtPIP5K7	GFPHGSGVYKFADGGLYY	GTW	SRGLKDGKGV	FYPA	GTKQPSL	KKWGR-SLEYDD	GKFL	SRS-ASV	NVEELRS	LNTV	TSLSV	TKTSAG	ETTC	PPRDFTC 259																
AtPIP5K8	GLRHGSGVYKYADGGLYY	GTW	SRGLKDGSGV	FYPAG	SKHPSL	KKWHR-HFYD	DTGN	FLLSHN-ST	I	IDLRT	SKAV	RSLS	LETT	SGL	TRTSERY	PDY	WSTSD	PPRDFM 272												
AtPIP5K9	GMMHGVGVYTWSDGGCYV	TWTRGLKDGKGS	FYSAGTRV	VPVQ	EFYLNAL	RKGRV	LDPMRR	QVASSV	NENLRV	GNR	NKLSK	GSLIN	LEQS	RNR	GVSLERR	W	SL	EV	IK	VI	G 318									
AtPIP5K10																					0									
AtPIP5K11																					0									
酵母 ScMss4p	VSRSSRI	SAVTATSTT	IKQRNTQ	SNL	PNIPFH	ASHKHSQ	ILP	MDSD	SVI	IKLAN	GDTS	MKPN	SATKI	SHM	TS	SLPLHPL	QPS	QKQY	H	MSKS			T	SL	P	P	END	H	Y	306
ヒト HsPIP1b	GKQNEEK	TKYK	TV	K																										28
HsPIP1Ib																														0

図2. PIP5Kのアミノ酸配列の比較

シロイヌナズナの11個のPIP5K(AtPIP5K1-11)、酵母のPIP5K(ScMss4p)、ヒトの2個のPIP5K(HsPIP1b, HsPIP1Ib)のアミノ酸配列をClustalWを用いてアライメントした。BタイプであるAtPIP5K1-9を青、AタイプであるPIP5K10とPIP5K11は赤で示した。青緑の線で示した配列は8回繰り返されたMORNモチーフである。

AtPIP5K1	IYRDRIS-----VDRDGRFRQFKNP---CWFN-GEAKKPGQTISKGHKKYDLMLNLQLGIRYSVGGKASIVR-DLKQTDPDFKEKFWTRF 394
AtPIP5K2	IYRDRIS-----IDKDGFRFRQFKNP---CDFS-GEAKKPGGETISKGHKKYDLMLNLQHGIRYSVGGKASVVR-DLKQSDPDFSEKFWTRF 396
AtPIP5K3	WARSPLL-----LESGGAMSVQSQP---RWLDEGDVKKPGHTVTAGHKNYDLMLNLQLGIRYSVGGKASLLR-ELRHSDFDPKDKQWTRF 368
AtPIP5K4	DGRVSVGVDRAFKEMNMGTESGEAAIDISTTRRDLDAEMNRLEAEGIQSLRSPAPMRLPRAGRKQGETISKGHRNYELMLNLQLGIRIHAVGQAPVVSLLDKHSAFDPKEKVVTRF 430
AtPIP5K5	DGRVSVGVDRAFKEMNMGNEIEGEGADM---KELDAELMRLDAEG-LQSLKSSPVNKLKPKAGRKQGETISKGHRNYELMLNLQLGIRHSVGRGAPASLDLKPASFDPKDKIWRFR 423
AtPIP5K6	DGRVSN---EMELRSNGSG-----YLQVDNAESTRSSLGPLRIPA-KKQGGTISKGHKNYELMLNLQLGIRHSVGRPAPATSLDKASAFDPKEKLVTKF 369
AtPIP5K7	HGPVSKSARFSGSGQSEGDKNRIVYEREYMQG---VLIKERIMSS-VDRSHKIKPPNRPREVRA---SLMTFLRGEHNYLMLNLQLGIRYTVGKITPVPRREVRSDFGKNARTKMMFF 373
AtPIP5K8	HGPSSKSARSVDGQSEIRDKNPIVYEREYMQG---VLIKERIMSS-IDMSHRARPLNLTKEVTVS---ACVSFLGGKNNHYLMLNLQLGIRYTVGKITPVPRREVRSDFSERARIMMFF 386
AtPIP5K9	HGYSDLSTAVLDSGSSVQYKANIPILEREYMQG---VLISELVNNGFSRTSRAKRKHRLVKEAKKPGEVVIKGRHSYDLMLSLQLGIRYTVGKITPQRQRVTRADFGRASFWMTF 435
AtPIP5K10	-----MELRATVENRIRY 13
AtPIP5K11	-----MFTREITAKDVKATEKNRIRY 21
ScMss4p	QHISGTNHNHANAANAANNNTTAAAAATGLKRSEASATAIKKMRQSLHKREMKRKRKTLVDDDRVLI GNKVSEGHVNFIIAYNMLTGI RIVAVSRCSGIMK-PLTPADFRFTKKLAFDY 425
HsPIP1b	-----QILSRLPKIPCTIQAWTNTEMI TLLACYFYSRVSSTASSAIKGAIGIYGVYVNTSKPERDLMDQDFYVVE---VFL 105
HsPIP11b	-----MSSNCTSTAVAVAPLSASKTKTKKGFVCGKVKLFRASEPILSVLMMGVNHTINELSNVPVPMMLPDDFKAYSKI 77
AtPIP5K1	PPEGTKTPPHQSVDFRWKDYCPVFRRLRELQVDPADYKMLAICGNDAELRELSPPGKSGSFFYLTDQDRFMIKTVKKSEVKKVLLRMLPSYKHYCQYEN-SLTVRFYGVHCVPKVG--- 510
AtPIP5K2	PPEGSKTTPPHLSDVFRWKDYCPVFRRLRELQVDPADYMLAICGNDAELRELSPPGKSGSFFYLTDQDRFMIKTVKKSEVKKVLLRMLPSYKHYCQYEN-TLTVRFYGVHCIPKVG--- 512
AtPIP5K3	PPEGSKTTPPHLSAEFKWKDYCPVFRRLRDLFAIDQADYMLAICGNESLREFASPGKSGSAFYLTQDERYMIKTMKSEIKVLLKMLPNYEHVSKYKQ-SLTVKFFGVHCVPKVG--- 484
AtPIP5K4	PPEGTKYTPPHQSSEFKWKDYCPVFRSLRKLKVDPADYMLAICGNDAELRELSPPGKSGSFFYLTNDDRYMIKTMKSETKVLRLMLAAYNHVRAFEN-TLVI RYFGVHCVKLTGP I- 548
AtPIP5K5	PREGTKYTPPHQSSEFKWKDYCPVFRSLRKLKVDPADYMLAICGNDAELRELSPPGKSGSFFYLTNDDRYMIKTMKSETKVLRLMLAAYNHVRAFEN-SLVI RYFGVHCVKLTGP I- 541
AtPIP5K6	PSEGSKYTPPHQSSEFKWKDYCPVFRSLRKLKVDADYMLAICGNDAELRELSPPGKSGSFFYLTNDDRYMIKTMKAETKVLRLMLPAYNHVRAFEN-TLTVKFFGVHCVKLTGTA- 487
AtPIP5K7	PRGDSNFTPPHKSVDVFRWKDYCPVFRNLKQMFKLDAAEYMSICGDDGLTEISSPGKSGSIFYLSDDRFVIKTLKSELQVLLRMLPYEYHVGDHEN-TLITKFFGVHRIKLKWN- 489
AtPIP5K8	PRGDSQYTPPHKSIDVFRWKDYCPVFRNLKQMFKLDAAEYMSICGDDGLTEISSPGKSGSIFYLSDDRFVIKTLKSELQVLLRMLPRYEHVGDHEN-TLITKFFGVHRIKLKWN- 502
AtPIP5K9	PRAGTMTTPPHSEDFKWKDYCPVFRNLKQMFKLDAAEYMSICGDDGLTEISSPGKSGSFFYLTNDDRFMIKTLKSELQVLLRMLPDYHHVKTAYEN-TLITKFFGVHRIKPS- 551
AtPIP5K10	STKHIKHLPPISTEFVFRWKDYCPVFGFLIQELEGIDHDYLLSICDETLLKISS-GKIGNVFIHSDNRFLIKILRKSEIKVLEMLPRYRHINHYRS-SLFRTRIFGAHSVPLG- 128
AtPIP5K11	SSKHIKHLPPISTEFVFRWKDYCPVFGFLIQELEGIDHDYLLSICDETLLKISS-GKIGNVFIHSDNRFLIKILRKSEIKVLEMLPRYRHINHYRS-SLFRTRIFGAHSVPLG- 136
ScMss4p	HGN---ELTPSSQYAFKFDYDQPEVFRRLRALFGLDADYVLSYSKYILSELNSPGKSGSFFYSRDYKI IKTIIHSEHILHRKHIEQYNNHVDRNPN-TLICOFYGLHRVKMPSIFQ 541
HsPIP1b	PSEGSNLTAAHYVDFRFTYAPLAFRYFRELFGIKPDYLYSICS-EPLIELSNPAGASLFFVTSDEFFI KTVQKAEAEFLQKLLPGYVNNLNQNP- TLLPKFYVCGMSGG- 220
HsPIP11b	KVDNHLFNKENLPSRFKKEYCPVFRNLKQMFKLDGDDYQNSVTRSAPI NSDSQ-GRCGTRFLTYDRRFVIKTVSSEDAEMHNLKKYHQFIVECHGNTLLPQFLMYRLTVDG- 193
AtPIP5K1	---GQKTRFIVMGNLFCSEYRIQRRFDLKGSSHGRTAKPEGEIDET---TTLKDLNL---FSFRLQRNMYQELMQLIKRDCFELEAERIMDYSLLVGVHFRDNTGEKMGLSPPV 618
AtPIP5K2	---GQKTRFIVMGNLFCSEYRIQRRFDLKGSSHGRTYKPEGEIDET---TTLKDLNL---FAFRLQRNMYQELMQLIKRDCFELEAERIMDYSLLVGVHFRDNTGDKMGLSPFV 620
AtPIP5K3	---GQKTRFIVMGNLFCSEYRIHRRFDLKGSSHGRTIDKDEGEIDET---TTLKDLNL---YVFRLETSMQAFINQIDLDCFELEAERIMDYSLLVGHFRASVAGELIP- 589
AtPIP5K4	---QKVRVIVMGNLFCSEYSIHRRFDLKGSSLGRITDKPESEINSN---TTLKDLNL---FIFRLQKAMYQEFIRQVDKCEFELEGERIMDYSLLVGHFRASVAGELIP- 652
AtPIP5K5	---QKVRVIVMGNLFCSEYSIHRRFDLKGSSLGRITDKPESEIDSN---TTLKDLNL---FIFRLQKAMYQEFIRQVDKCEFELEGERIMDYSLLVGHFRASVAGELIP- 645
AtPIP5K6	---QKVRVIVMGNLFCGHSIHRRFDLKGSSHGRLTTKPESEIDPN---TTLKDLNL---FAFRLQKAMYQEFIRQVDKCEFELEGERIMDYSLLVGHFRASVAGELIP- 592
AtPIP5K7	---GKVRVIVMGNMFCTELKIHRRYDLKGSQGRYTEK---IKIYK---TTLKDLNL---YEFHMDKLLREALFKQIYLDGCFLESNLIDYSLLVGHFRAPQGLNLTLEPPNA 595
AtPIP5K8	---GKVRVIVMGNMFCTELKIHRRYDLKGSQGRYTEK---IKIYK---TTLKDLNL---YEFHMDKLLREALFKQIYLDGCFLESNLIDYSLLVGHFRAPQGLNLTLEPPNA 608
AtPIP5K9	---GQKFRVIVMGNMFTDLRIHRRFDLKGSSLGRSADK---VEIDEN---TTLKDLNL---YSFFLETSMWREGLLRQLEIDSKFLEAQNIMDYSLLVGHFRAPQGLNLTLEPPNA 657
AtPIP5K10	---GVKTYFVMSNMLHSTIFVNKLYDLKGSQGRSNKK---IEVRNT---TVLKDIDFD---FCFYVDSLARHRLIKQTKLDCELLEEGIMDYSLLVGLQSKGSGSGLDGLNPVY 234
AtPIP5K11	---GVKTYFVMSNMLHSTIFVNKLYDLKGSQGRSNKK---IKVRDK---TTLKDLNL---FCFYVDSLARHRLIKQTKLDCELLEEGIMDYSLLVGLQSKGSGSGLDGLNPVY 242
ScMss4p	NKIKHRKIYFLVMNNLFPPLDHIITYDLKGSQGRFVTLNLDKERLAKDRSYPVMDLNNLE-EGQKIKFGLPKKKTFLTLQKKDVELLAKNLTMDYSLLVGHFRAPQGLNLTLEPPNA 659
HsPIP1b	---INIRIVMNNVLPMSRMHFTYDLKGSQGRSRRKEREKSNP---TFKDLDFLDQMHGELYFDTEYNALMKTLDQRDRVLESPKIMDYSLLVGHFRAPQGLNLTLEPPNA 328
HsPIP11b	---VETYVYVTRNVSRLTVHRKYDLKGSQGRVAREASD---KEKAKDL---PTFKDNDFLN-EGQKLVGEEKKNFLKLDKRDVEFLAQLKIMDYSLLVGHFRAPQGLNLTLEPPNA 301

図2続き. PIP5Kのアミノ酸配列の比較

シロイヌナズナの11個のPIP5K(AtPIP5K1-11)、酵母のPIP5K(ScMss4p)、ヒトの2個のPIP5K(HsPIP1b,HsPIP11b)のアミノ酸配列をClustalWを用いてアライメントした。

AtPIP5K1	L	RSGRIDSYQNEKFMRCGRFLEAELQDMDRILAGRK-PSIRLGNMMPAKAERMARRSDFDQYSSGGASYPESHG	E 691
AtPIP5K2	L	RSKGIESYQSEKFMRCGRFLEAELQDMDRILAGRK-PLIRLGNMMPARAERMARRSDYDQYSSGGTNYQSHG	E 693
AtPIP5K3		I GRRD-QEDKLMRGY-NSL.PNMDCVTQTCNGPLMRLGESTPAKAEQVSRFEETWEEDAIDNSNPKGT	RKE 658
AtPIP5K4		SGARTPIGEFEDESAPRLSRADVQGL-LSDPTRWASIRLGNMMPARAERTMRRSDCEFLQVG	EPTG 718
AtPIP5K5		SGARTPIGESEESGPRLSRAEVDL-LSDPSRWASIRLGNMMPARAERTMRKNDSELQVG	EPTG 711
AtPIP5K6		SGARTPTGNSE-TRLSRAEMDRF-LLDASKLASIKLGNMMPARVERTARRSDCENQVG	DPTG 654
AtPIP5K7		MSDQES-VSSVDVGLTQHSIPPKGLLLVTHEPNSVNTAPGPHIRGSTLRAFVSGEVEVDLILPGTARLRVQLGVNMPAQAHKLI EDKEESATIELF	E 693
AtPIP5K8		MSDQESDVSQVSVNLPREPSIPPKGLLMVTHEPNSVNTAPGPHIRGSTLRAFVSGEVEVDLILPGTARLRVQLGVNMPAQAHKLI GDNEESGTVLFL	E 708
AtPIP5K9		ITTDALLESVAEDDT-IEDDMLSYHEGLVLPVR-GSENTVTPGPHIRGSRLLRASAVGDEEVDLLPGTARLQIQQGVNMPARA-ELIPGREDKKQILH	D 752
AtPIP5K10		GSFAPPSFKSNSTKSMKTAASSPDRSSVAMVSCSPDRSDVENEMSMITIQSVTSNSAS-SETNILATLSDLFHNSSNINFGMKIPARARRVTR	ETGEE 333
AtPIP5K11		DSFTSRGSDVSNSSKFMKTAASNSPDRSSSTMYSCPTPSRISVDSENSVNIQSVASISPSPAQTNASDPSYESLVSKTNLTNIFQNSSTNFGMKIPGRARRVGRGESVGVKQSGREGGEE	362
ScMss4p		ASIEEQPQTQGPVRTGTGTVRHFREFEGGIRASDQFN	N 699
HsPIP1b		QNVPAKRTGMQVLYSTAMESIQGPGKSGDGIITENPDTMGGIPAKSHRGE	380
HsPIP11b		AEDEECENDGVGGNLLCSYGTTPDPSGNLLSFRPFFGPGGFDPVSDVYAMKSHES	S 357

触媒ドメイン

AtPIP5K1		MYEVVLYFGVIDILQDYDITKKIEHAYKSLQADP-ASISAVDPKLYSRFRDFISRI FIEEG	752
AtPIP5K2		VYEVVLYFGVIDILQDYDITKKIEHAYKSLQADP-ASISAVDPKLYSRFRDFISRI FIEDG	754
AtPIP5K3		AVEVILYFGVIDILQDYDITKKIEHAYKSLHADP-ASISAVDPKLYSRFRDFINKIFIEDK	719
AtPIP5K4		FYEVVMIFGVIDILQDYDITKKIEHAYKSLQYDP-TSISAVDPRLYSRFRDFIFKVFTEFN	779
AtPIP5K5		FYEVVMIFGVIDILQDYDITKKIEHAYKSLQYDP-SSISAVDPQYSRFRDFIFKVFTEFN	772
AtPIP5K6		FYDVIVYFGVIDILQDYDITKKIEHAYKSLQYDP-TSISAVDPKQYSRFRDFIFRVFVEDA	715
AtPIP5K7		VYDVVYVMGVIDILQDYDITKKIEHAYKSLQYDP-MITISVTEPSTYSRFRDFIFKVFTEFN	754
AtPIP5K8		VYDVVYVMGVIDILQDYDITKKIEHAYKSLQYDP-MITISVTEPSTYSRFRDFIFKVFTEFN	769
AtPIP5K9		CGDVVLYLGIIDILQDYDITKKIEHAYKSLHFDL-LSISAVDPTFYQRFLFIFKVFTEFN	815
AtPIP5K10		WYVWVLYIGIVDTFQDYGKRRLEHCYKSLQYNS-NSISTVHPKIYSSRFQDFVSNIFLPHDDLLSSKY	401
AtPIP5K11		WYDVVLYLGIIDILQDYDITKKIEHAYKSLQYNS-NSISTVHPKIYSSRFQDFVSNIFLPHDDLLSSKY	427
ScMss4p		DVDLIYYVGIIDFLTNYSVMKLETFWRSRLRHD-KLVSAIPPRDYANRFYEFIEDSDVPLPKKTKQSSYRDDPNQKNYD	779
HsPIP1b		-KLLLFTGVIDILQDYDITKKIEHAYKSLQYNS-NSISTVHPKIYSSRFQDFVSNIFLPHDDLLSSKY	497
HsPIP11b		PKKEVYFMAIDILTPYDTKKAAHAAKTVKHGAGAEISTVNPQYKSRFNEFMSNILT	416

AtPIP5K1	752
AtPIP5K2	754
AtPIP5K3	719
AtPIP5K4	779
AtPIP5K5	772
AtPIP5K6	715
AtPIP5K7	754
AtPIP5K8	769
AtPIP5K9	815
AtPIP5K10	401
AtPIP5K11	427
ScMss4p	779
HsPIP1b	HRPDLVPSTPSLFEAASLATTISSSLLYVNEHYPHDRPTLYSN 540
HsPIP11b	416

図2続き. PIP5Kのアミノ酸配列の比較

シロイヌナズナの11個のPIP5K(AtPIP5K1-11)、酵母のPIP5K(ScMss4p)、ヒトの2個のPIP5K(HsPIP1b, HsPIP11b)のアミノ酸配列をClustalWを用いてアライメントした。橙色の線で示した配列は触媒ドメインである。

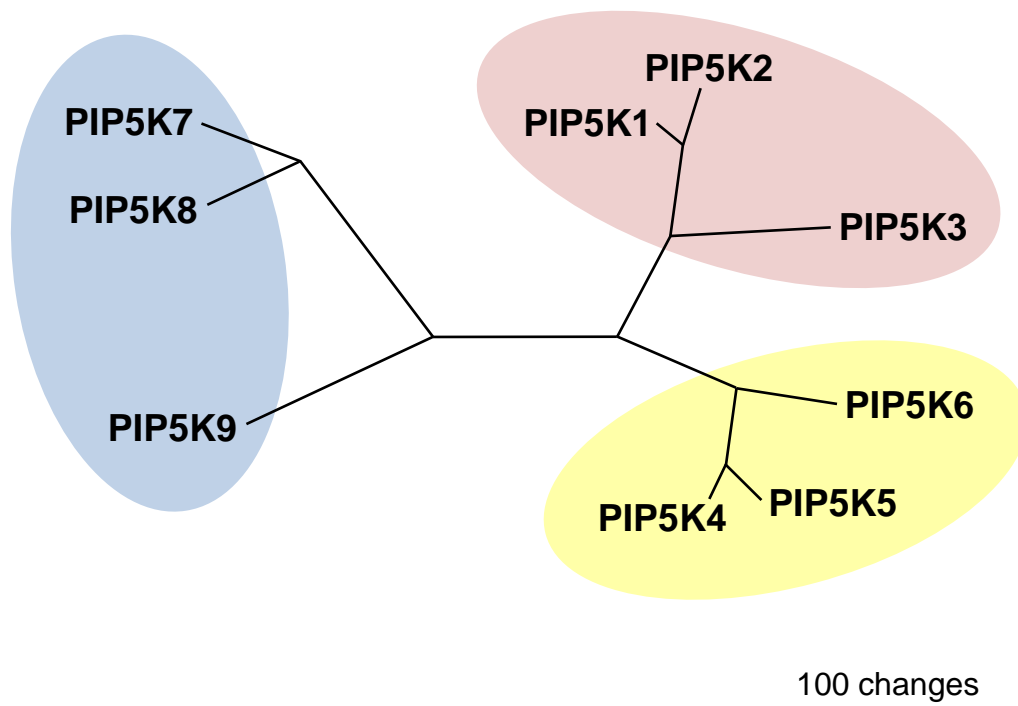


図3. シロイヌナズナにおけるBタイプのPIP5Kの分子系統樹

シロイヌナズナのBタイプのPIP5Kのアミノ酸配列に基づいて分子系統樹を作成した。赤丸はPIP5K1-3サブグループ、青丸はPIP5K4-6サブグループ、黄丸はPIP5K7-9サブグループを示した。

植物の PIP5K の機能解析

シロイヌナズナにおける遺伝学的研究により、PIP5K や PI(4,5)P₂ が植物の成長と生存の根底にあるさまざまな細胞内プロセスにおいて重要な役割を担うことが明らかとなった(Heilmann 2016; Gerth *et al.*, 2017)。PIP5K1 と PIP5K2 については、*pip5k1pip5k2* 二重変異体は矮小化と不稔を示す(Mei *et al.*, 2012; Ischebeck *et al.*, 2013; Tejos *et al.*, 2014; Marhava *et al.*, 2020)。また、PIP5K1 と PIP5K2 が産生した PI(4,5)P₂ はクラスリンを介した膜交通と細胞膜ドメインのパターン形成を促進し、PIP5K1 と PIP5K2 は PIN-FORMED (PIN) オーキシントランスポーターの極性に関与することから、それらは PI(4,5)P₂ の機能を介して重複して極性オーキシン輸送に関与し植物の成長と発生に機能している(Camacho *et al.*, 2009; Mei *et al.*, 2012; Ischebeck *et al.*, 2013; Tejos *et al.*, 2014; Marhava *et al.*, 2020)。PIP5K3 については、*pip5k3* 単一変異体では根毛の長さが短く PIP5K3 誘導的過剰発現体では根毛の長さが長くなる(Kusano *et al.*, 2008; Stenzel *et al.*, 2008)。また、蛍光タンパク質である yellow fluorescent protein(YFP)を融合した PIP5K3 が伸長している根毛の先端と根毛のバルジ形成予定位置の細胞膜に局在することから、PIP5K3 は根毛の先端成長の正の制御因子として働き、細胞内極性の確立と維持に重要な役割を担っている(Kusano *et al.*, 2008; Stenzel *et al.*, 2008; Hirano *et al.*, 2018)。PIP5K4 は光によって誘発される気孔の開口に関与し(Lee *et al.*, 2007)、リン欠乏条件下で *pip5k3pip5k4* 二重変異体の根毛伸長が抑制されることから、PIP5K3 と PIP5K4 はリン欠乏条件下での根毛の伸長に機能している(Wada *et al.*, 2015)。さらに、*pip5k4pip5k5* 二重変異体では花粉の発芽率が低く花粉管の長さが短いため、PIP5K4 と PIP5K5 は重複して花粉の発芽と花粉管の伸長に関与すると考えられている(Ischebeck *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2008)。PIP5K6 についてはまだ機能欠損変異体を用いた解析が行われていないが、RNA interference(RNAi)による PIP5K6 の発現抑制は花粉管伸長を抑制し(Zhao *et al.*, 2010)、過剰発現体では花粉管が枝分かれをする(Stenzel *et al.*, 2012; Hempel *et al.*, 2017)。最近の研究において、花粉管で発現する mitogen-activated protein kinase(MAPK)MPK6 が PIP5K6 をリン酸化し、in vitro で PIP5K6 の酵素活性を抑制することが示されたことから、MPK6 による PIP5K6 の非対称抑制が花粉管伸長の方向性に寄与するという仮説が導かれた(Hempel *et al.*,

2017)。これらの結果から、PIP5K4-6 サブグループの遺伝子は花粉管の先端成長において重複して機能している。また、PIP5K1-6 の遺伝子はさまざまな組織で発現し、根系の形態形成の制御機構、根毛伸長や花粉管伸長などの先端成長の制御機構において重要な役割を担うことが示唆される。一方、A タイプの PIP5K の遺伝子である *PIP5K10* および *PIP5K11* は花粉で発現し、*pip5k10pip5k11* 二重変異体の花粉管はアクチン重合の阻害剤であるラトランクリン B に対して高感受性を示したため、*PIP5K10* および *PIP5K11* はアクチン細胞骨格の再編成を通じて花粉管の伸長に関与すると考えられている(Ischebeck *et al.*, 2011)。

PIP5K7-9 サブグループの遺伝子に関しては、*PIP5K9* は機能欠損変異体を用いた解析は行われておらず、機能獲得変異体を用いて解析されている(Lou *et al.*, 2007)。*PIP5K9* の機能獲得変異体では、PIP5K9 と cytosolic invertase 1(CINV1) との間の相互作用による CINV1 の抑制により主根の長さが短く、糖分解酵素の活性が低下することから、*PIP5K9* は主根の伸長を抑制的に制御し、糖シグナル伝達に関与することが示唆された(Lou *et al.*, 2007)。最近の研究において、*PIP5K7* および *PIP5K9* がポリアミンによって引き起こされる根の PI(4,5)P₂ の増加とそれに伴った K⁺ 流出の活性化に関与しており、*pip5k7pip5k9* 二重変異体の主根の伸長がポリアミンと KCl に高感受性を示すことが報告された(Zarza *et al.*, 2020)。これらの結果は、PIP5K7-9 サブグループの遺伝子がストレス条件下において主根伸長の制御に関与することを示唆している。また、植物における PIP5K の分子系統樹では、裸子植物 (*Ginkgo biloba*) とコケ植物 (*Physcomitrella patens*) の PIP5K が PIP5K7-9 サブグループに含まれている(Zhang *et al.*, 2020)。これは、PIP5K7-9 サブグループの遺伝子が陸上植物に保存される重要な機能を持っていることを示唆している。植物の成長と生存における PIP5K7-9 サブグループの機能を解明するにはそれらの遺伝子の包括的な解析が必要である。

PIP5K と環境ストレス

シロイヌナズナの B タイプの PIP5K の遺伝子は環境刺激による細胞応答時の発現から環境ストレスや植物ホルモンに対する特異的な機能をもち(Lin *et al.*, 2004)、PI(4,5)P₂ は通常生育条件下での基本的な細胞内プロセスと同様に環境ストレスによる細胞応答のセカンドメッセンジャーとして働くことが示唆されている(Munnik and Nielsen, 2011; Heilmann and Heilmann, 2015; Morales *et al.*, 2019)。シロイヌナズナのいくつかの PIP5K の遺伝子は環境刺激に応答して転写が活性化されるが(Mikami *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2004)、それぞれの環境刺激にどの PIP5K が応答して PI(4,5)P₂ の量を調節しているかは不明である。最近の研究において、PIP5K6 の酵素活性は MAPK カスケードを介した pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) のシグナル伝達によって抑制される(Menzel *et al.*, 2019)ことや PI(4,5)P₂ の量が少ない *pip5k1pip5k2* 二重変異体では病原菌の発生が阻害されることが明らかとなった(Qin *et al.*, 2020)。これらは生物的ストレス応答における PIP5K の遺伝子の潜在的な役割を示唆している。

一方で、植物の細胞での PI(4,5)P₂ の量は高浸透圧ストレス、塩ストレス、高温ストレスなどのさまざまな非生物的ストレスに応答して調節されることも報告されている(Pical *et al.*, 1999; DeWald *et al.*, 2001; van Leeuwen *et al.*, 2007; König *et al.*, 2008; Darwish *et al.*, 2009; Mishkind *et al.*, 2009; Simon *et al.*, 2014)。これらの環境ストレスの中でも、高浸透圧ストレスにより細胞内の PI(4,5)P₂ が増加することが多数報告されており、シロイヌナズナにおいて NaCl や sorbitol 溶液に浸した植物はストレスを受けていない植物と比較して PI(4,5)P₂ の量が数十倍増加する(Heilmann *et al.*, 1999; Pical *et al.*, 1999; DeWald *et al.*, 2001; Heilmann *et al.*, 2001; König *et al.*, 2007; van Leeuwen *et al.*, 2007; König *et al.*, 2008; Menzel *et al.*, 2019)。また、最近の研究において、KCl を含んだ培地で生育した *pip5k7pip5k9* 二重変異体は野生型と比較して主根の伸長が抑制されることが報告され、PIP5K7 および PIP5K9 が高浸透圧ストレスに関与していることが示唆された(Zarza *et al.*, 2020)。しかし、高浸透圧ストレスにおいてどの PIP5K が PI(4,5)P₂ を増加させ、どのような分子機構で高浸透圧ストレスに応答しているかは未だよく分かっていない。

高浸透圧ストレスと PIP5K によるエンドサイトーシスの促進

植物にとって高浸透圧ストレス応答は成長と生存のために重要であり、植物が高浸透圧ストレスに曝されると、細胞内の水の流出と細胞の膨圧の喪失が引き起こされ、その直後に植物はエンドサイトーシスによって過剰な膜領域を小胞に取り込ませ細胞表面積全体を減少させることで細胞の膨圧を回復させる(Baral *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019)。そのため、植物の細胞は高浸透圧ストレスに応答して小胞の形成を増加させ、エンドサイトーシスを促進させる(König *et al.*, 2008; Zwiewka *et al.*, 2015; Baral *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019)。興味深いことに、高浸透圧ストレスにより小胞に存在する PI(4,5)P₂が増加する(König *et al.*, 2008)。これらのことから、高浸透圧ストレスにおける PI(4,5)P₂とエンドサイトーシスとの関与が示唆されている。

一方、通常生育条件下において *pip5k1pip5k2* 二重変異体では green fluorescent protein(GFP)を融合した PIN によってマークされた brefeldin A(BFA) body の数が減少していたことから、PIP5K1 および PIP5K2 は PIN のエンドサイトーシスを促進することが知られている(Mei *et al.*, 2012; Ischebeck and Werner *et al.*, 2013; Tejos *et al.*, 2014)。PIN はオーキシンの排出輸送体として機能し、表皮細胞の細胞膜上に極性を持って局在している(Muller *et al.*, 1998; Geisler *et al.*, 2005)。また、PIN は細胞膜と内膜コンパートメントの間をエンドサイトーシスによって循環していることが知られている(Steinmann *et al.*, 1999; Geldner *et al.*, 2001; Vieten *et al.*, 2007; Dhonukshe *et al.*, 2007)。PIP5K1 および PIP5K2 だけでなく、PIP5K6 もまたシロイヌナズナとタバコにおいてクラスリンに依存したエンドサイトーシスを促進していることが報告されており、花粉管の先端領域におけるクラスリンに依存したエンドサイトーシスに PI(4,5)P₂が関与することが示唆されている(Zhao *et al.*, 2010)。これらのことから、PIP5K は PI(4,5)P₂を介してエンドサイトーシスを制御することで植物の成長、発生、環境応答において重要な役割を担うことが示唆された。

まとめ

PIP5K はリン脂質である PI(4,5)P₂ を産生し、植物の成長、発生、環境応答などに重要な役割を担っている。植物の PIP5K の分子系統樹において、PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 はサブグループを構成しており、陸上植物において広く保存されているため *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* は陸上植物が共有する重要な機能を保持していると考えられた。

陸上植物にとって高浸透圧ストレス応答は成長と生存のために重要であり、植物は高浸透圧ストレスにより細胞内の PI(4,5)P₂ と小胞の形成を増加させ、エンドサイトーシスを促進させることで高浸透圧ストレスに応答する。一方、シロイヌナズナのいくつかの PIP5K は PI(4,5)P₂ を介してエンドサイトーシスを促進している。これらのことから、高浸透圧ストレスにおいて PIP5K が PI(4,5)P₂ を介してエンドサイトーシスを促進することが示唆されるが、どの PIP5K の遺伝子がどのような分子機構で高浸透圧ストレス応答に寄与しているかは不明である。

そこで、本研究において私はシロイヌナズナの *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* が高浸透圧ストレスにおいて PI(4,5)P₂ を介してエンドサイトーシスを促進しているのではないかと考え、植物の成長、発生、環境応答の観点から *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* に重複した高浸透圧ストレス応答における分子機構の解明を目指した。

結果

PIP5K7, PIP5K8 および *PIP5K9* のプロモーター活性

PIP5K7, PIP5K8 および *PIP5K9* の組織特異的な発現パターンを調べるため、 β -glucuronidase(GUS)染色を用いて組織化学的にそれらの遺伝子の上流領域のプロモーター活性を解析した。*PIP5K7, PIP5K8* および *PIP5K9* の上流領域をそれぞれ GUS レポーターベクターに導入し、作製したレポーター *PIP5K7p-GUS, PIP5K8p-GUS* および *PIP5K9p-GUS* を遺伝子形質転換により野生型シロイヌナズナに導入した。それぞれの発芽後 5 日間の幼苗を用いて GUS 染色を行った。*PIP5K7p-GUS* および *PIP5K9p-GUS* を有する幼苗は主に茎頂分裂組織、根端分裂組織、葉や根の維管束組織で活性を示した(図 4a-d, i-l)。*PIP5K8p-GUS* を有する幼苗は同じ GUS 染色の条件(反応時間 1 時間)を用いた場合には GUS 染色を検出できなかったが、反応時間を長める(反応時間 24 時間)ことで *PIP5K7p-GUS* および *PIP5K9p-GUS* を有する幼苗と似た GUS 染色パターンが観察された(図 4e-h)。しかし、根端分裂組織において、*PIP5K8* プロモーターの活性は *PIP5K7* および *PIP5K9* プロモーターの活性と比較して局所的であった(図 4d, h, l)。また、5 週齢の花序を用いて GUS 染色を行った結果、*PIP5K7, PIP5K8* および *PIP5K9* プロモーターは花分裂組織、花卉や花糸の維管束で活性を示し、*PIP5K8* および *PIP5K9* プロモーターは発達中の柱頭で活性を示した(図 5)。*PIP5K7, PIP5K8* および *PIP5K9* は、程度は異なるが主に細胞活性の高い分裂組織と維管束で発現していた。

根における *PIP5K8* の局所的な GUS 染色の結果は、*PIP5K8* の転写レベルが *PIP5K7* および *PIP5K9* の転写レベルと同等であるという以前の結果と矛盾していた(Wada *et al.*, 2015)。したがって、*PIP5K7* および *PIP5K8* に対してゲノミック融合 YFP レポーターシステムを用いた別の遺伝子発現解析を行った。この際、上流の遺伝子間領域とタンパク質コード配列の 3' 末端までの転写領域を含むゲノミック DNA の後に YFP コード配列がインフレーム方式となるように接続した。作製したレポーター遺伝子 *PIP5K7g-YFP* および *PIP5K8g-YFP* は野生型シロイヌナズナに導入した。植物の自家蛍光が *PIP5K8-YFP* の弱い YFP 蛍光の検出を妨げたが(図 6l, v; YFP 用の励起光 60mW)、その蛍光強度は *PIP5K7-YFP* の蛍光強度よりも弱く(図 6b; YFP 用の励起光

30mW)、明らかに YFP 蛍光が根端分裂領域で観察された(図 6b,g,l,v)。GUS と YFP の2つのレポーター遺伝子の結果は *PIP5K7*,*PIP5K8* および *PIP5K9* が分裂組織および維管束組織で主に発現していることを示している。また、これらの *PIP5K7*,*PIP5K8* および *PIP5K9* の似た発現パターンは *PIP5K7*,*PIP5K8* および *PIP5K9* が機能重複している可能性を示唆している。

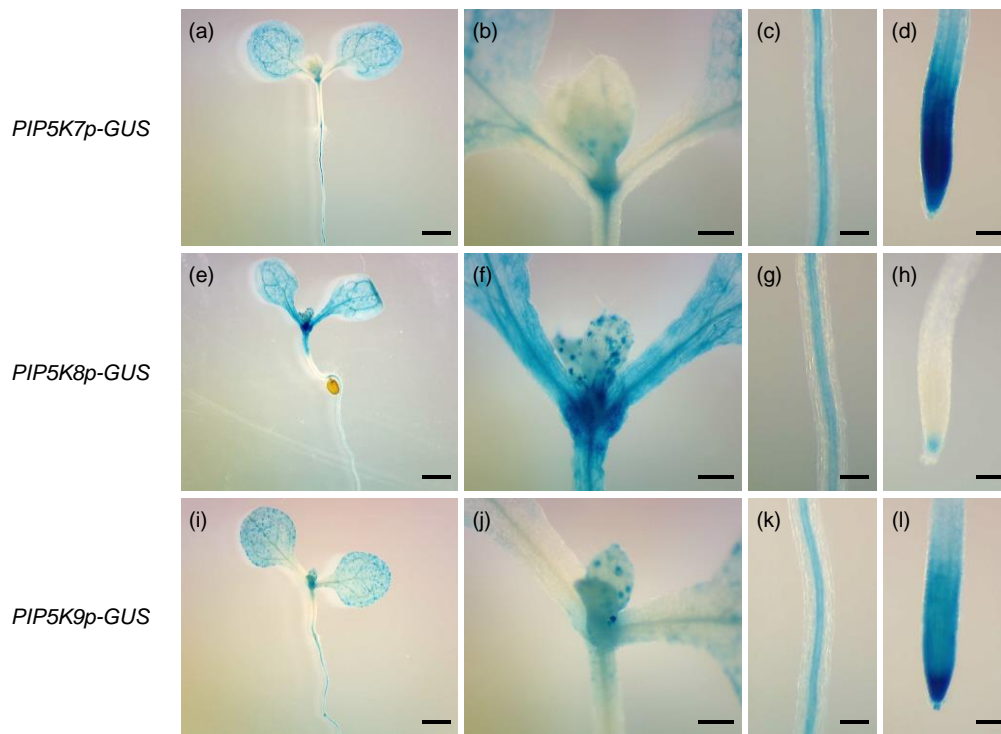


図4. 幼苗における *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* のプロモーター活性

発芽後5日間の幼苗を用いて *PIP5K7p-GUS* (a–d), *PIP5K8p-GUS* (e–h) および *PIP5K9p-GUS* (i–l) のプロモーター活性を組織化学的に解析した。GUS反応時間は *PIP5K7p-GUS* と *PIP5K9p-GUS* は1時間(a–d, i–l)、*PIP5K8p-GUS* は24時間(e–h)で行った。幼苗(a, e, i)、頂端分裂組織(b, f, j)、成熟領域の主根(c, g, k)、根端分裂組織(d, h, l)を示した。スケールバーは1mm(a, e, i)、250 μ m(b, f, j)、100 μ m(c, d, g, h, k, l)である。

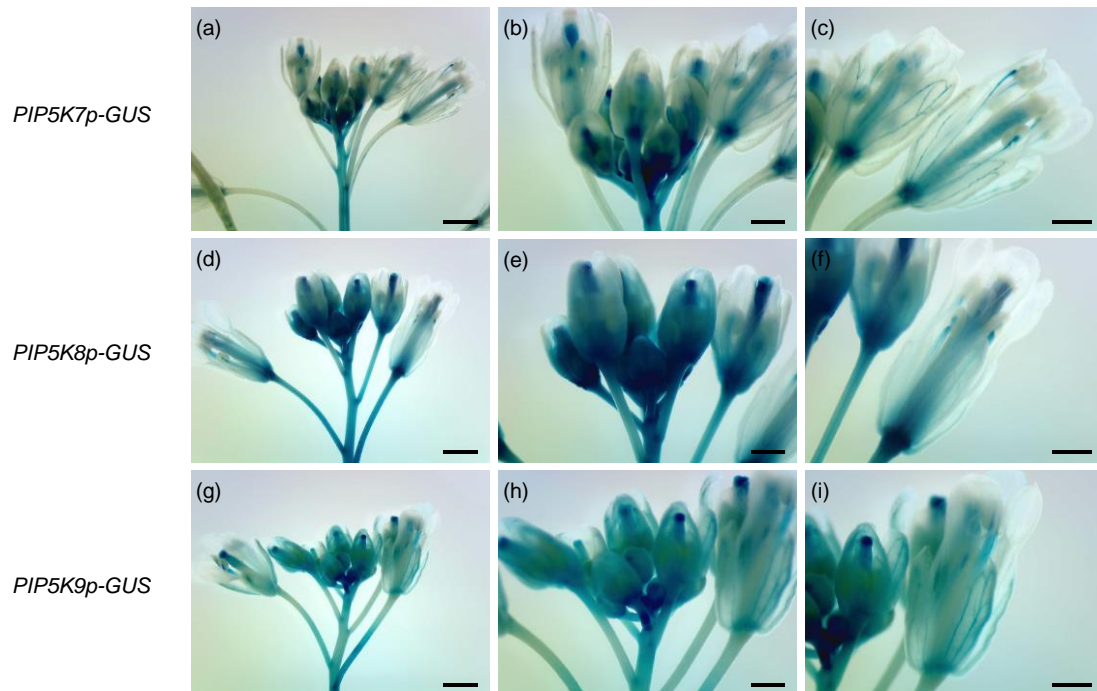


図5. 花序における *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* のプロモーター活性

5週齢の花序を用いて *PIP5K7p-GUS* (a–c), *PIP5K8p-GUS* (d–f) および *PIP5K9p-GUS* (g–i) のプロモーター活性を組織化学的に解析した。GUS 反応時間はすべて24時間で行った。花序(a,d,g)、花芽と花(b,e,h)、成熟した花(c,f,i)を示した。スケールバーは1mm (a,d,g)、500µm (b,c,e,f,h,i) である。

PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 の細胞内局在

次に、PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 の細胞内局在パターンを調べるため、それらの YFP 融合タンパク質を発現する形質転換植物を用いて解析した。PIP5K7 および PIP5K8 には、それぞれ *PIP5K7g-YFP* および *PIP5K8g-YFP* を有する形質転換植物を使用した。PIP5K9 には、上流の遺伝子間領域の後に PIP5K9-YFP のコード配列を接続したレポーター遺伝子を構築し、野生型シロイヌナズナに導入した。それぞれの発芽後 6 日間の幼苗を用いて根端分裂組織における YFP 蛍光を観察した。PIP5K8-YFP および PIP5K9-YFP の観察には、PIP5K7-YFP と比較して明確な細胞内局在パターンを得るために、PIP5K7-YFP (30mW) の 2 倍の強度 (60mW) の励起光を使用し他の条件は同じように設定した。すべての YFP 融合タンパク質が発現した根端分裂組織の表皮細胞では、それらは主に細胞膜に局在し、明らかな極性はなく、細胞膜を染色する親油性色素 FM4-64 の蛍光と共局在していた (図 6c-e, m-o, r-t)。また、PIP5K7-YFP の蛍光強度 (図 6c; YFP 用の励起光 30mW) は他よりも比較的高かった (図 6m, r; YFP 用の励起光 60mW)。PIP5K8-YFP および PIP5K9-YFP の画像では FM4-64 で染色されていない粒状の蛍光が観察されたが (図 6m-o, r-t)、PIP5K8-YFP および PIP5K9-YFP と同じ観察条件で野生型の表皮細胞にも同様の粒状の蛍光が観察されたことから、これらを植物の自家蛍光と見なした (図 6w-y)。

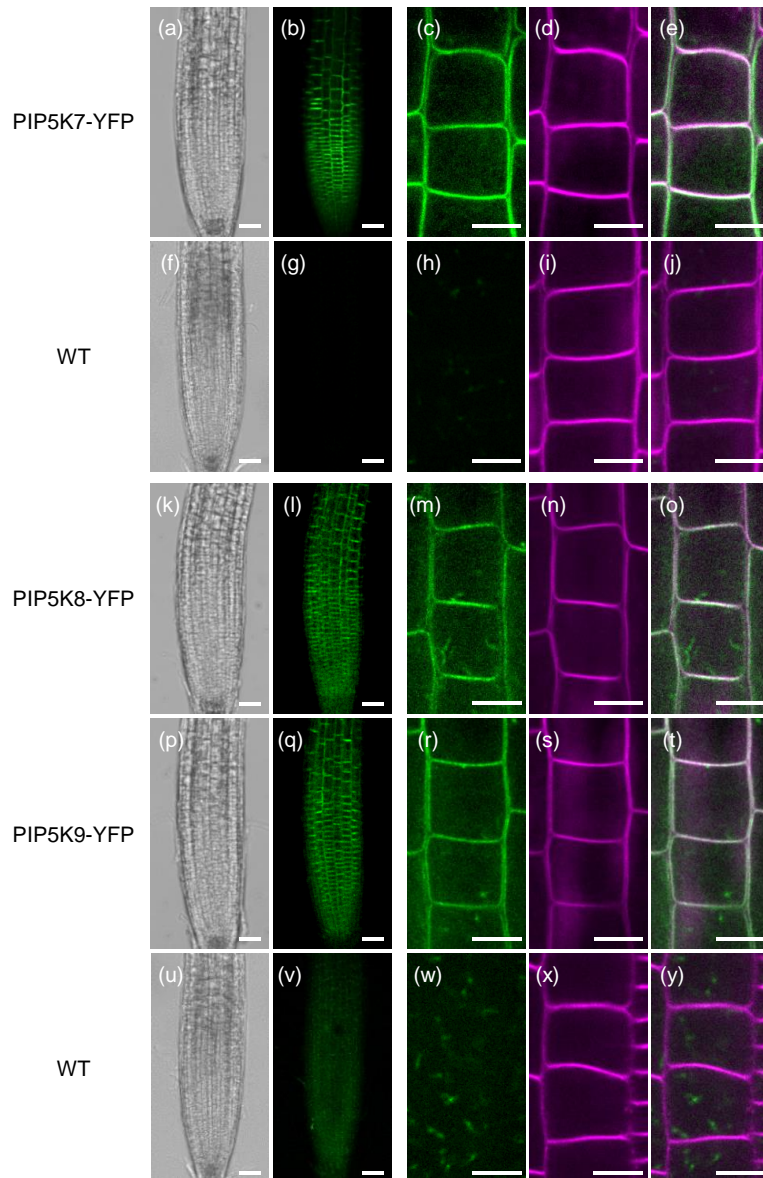


図6. 主根の根端分裂組織におけるPIP5K7, PIP5K8およびPIP5K9の細胞内局在
 発芽後6日間の主根の根端分裂組織におけるPIP5K7-YFP(a-e), PIP5K8-YFP(k-o)およびPIP5K9-YFP(p-t)の局在パターンを共焦点顕微鏡を用いて観察した。レーザー強度は30mW(b,c,g,h)と60mW(l,m,q,r,v,w)を使用した。野生型(WT)は植物の自家蛍光の参考のために観察した(f-j,u-y)。主根を5分間2 μ M FM4-64で処理した。Bright-field(a,f,k,p,u)、YFP(緑; b,c,g,h,l,m,q,r,v,w)、FM4-64(マゼンタ; d,i,n,s,x)、merged (e,j,o,t,y)を示した。スケールバーは50 μ m (a,b,f,g,k,l,p,q,u,v)、10 μ m(c-e,h-j,m-o,r-t,w-y)である。

PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 の T-DNA またはトランスポゾン挿入変異体

PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 の生物学的機能を遺伝学的に解析するため、Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から各遺伝子に T-DNA またはトランスポゾンの挿入が予想される変異体の種子を取得した。これらの変異体を用いて T-DNA またはトランスポゾンが挿入された領域のジャンクションの配列を決定することにより T-DNA またはトランスポゾンの挿入位置を決定した(図 7)。その結果、SALK_151429(*pip5k7-1*)と SALK_107796(*pip5k7-3*)ではそれぞれ PIP5K7 の第 6 エキソンと第 9 エキソンに T-DNA が挿入されていることが分かった(図 8a)。SAIL_630_B03(*pip5k8-1*)、SALK_040023(*pip5k8-3*)、SAIL_561_F09(*pip5k8-4*)ではそれぞれ PIP5K8 の第 6 イントロン、第 6 エキソン、第 3 エキソンに T-DNA が挿入されていることが分かった(図 8c)。WiscDsLox434B6(*pip5k9-1*)と SM_3_39157(*pip5k9a*)ではそれぞれ PIP5K9 の第 7 イントロンに T-DNA が挿入され、第 5 エキソンにトランスポゾンが挿入されていることが分かった(図 8e)。

次に、ホモ接合体の *pip5k7*, *pip5k8* および *pip5k9* 変異体を用いて、リアルタイム reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析により発現量を調べた。各遺伝子の発現量は 5' 末端と 3' 末端のコード領域、挿入位置を横切る部分の 3 つの異なる部分でリアルタイム RT-PCR を行い、野生型と変異体の転写産物を相対的に比較した(図 8a, c, e)。 *pip5k7-1*, *pip5k8-1*, *pip5k9-1* および *pip5k9a* では、挿入位置を横切る部分の転写産物は検出されなかった(図 8b, d, f)。全ての変異体で 3' 末端のコード領域の発現量は野生型と比較して有意に低下したが、 *pip5k7-3*, *pip5k8-4* および *pip5k9a* では 5' 末端のコード領域の発現量は野生型と同等だった(図 8b, d, f)。これらの結果に基づいて、 *pip5k7-1*, *pip5k8-1* および *pip5k9-1* を機能欠損変異体と判断し、以下の遺伝子解析ではそれぞれ *pip5k7*, *pip5k8* および *pip5k9* と呼称した。

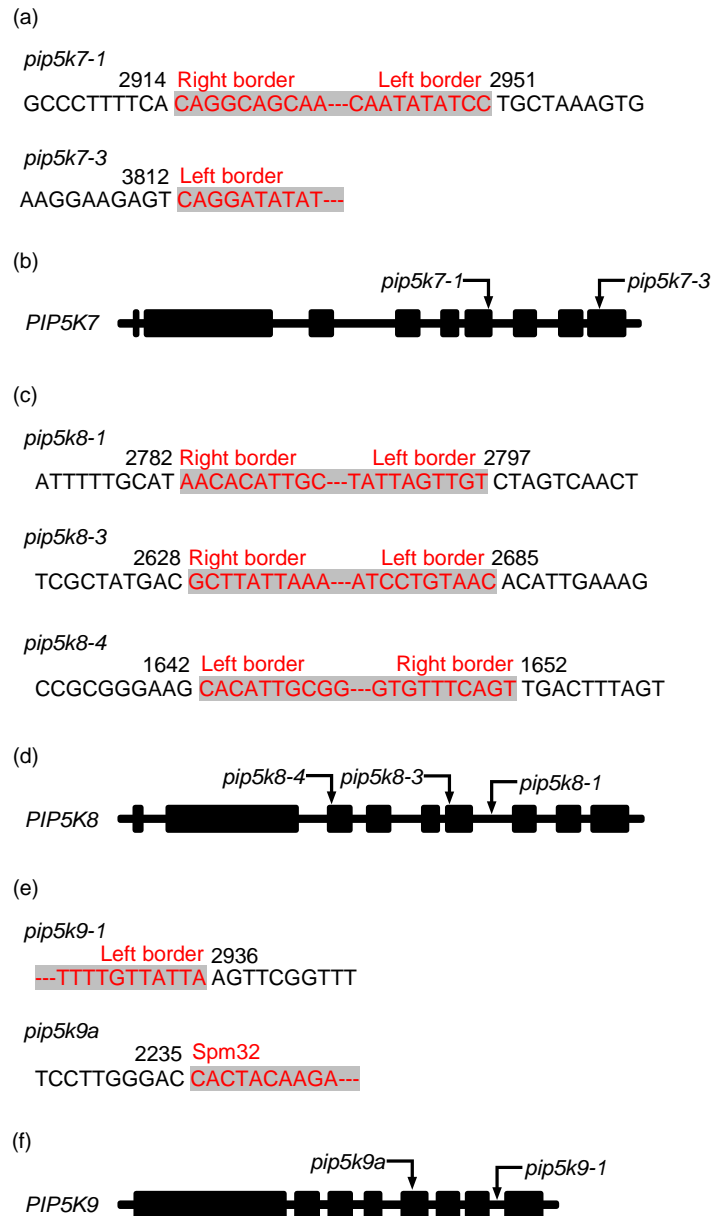


図7. *pip5k7*,*pip5k8*および*pip5k9*のT-DNAまたはトランスポゾンの挿入位置と塩基配列

(a,c,e) *pip5k7*(a),*pip5k8*(c)および*pip5k9*(e)におけるT-DNAまたはトランスポゾンの挿入位置のジャンクションの配列を示した。黒と赤の文字はそれぞれゲノムとT-DNAまたはトランスポゾンの挿入に由来する配列を示した。ゲノム配列の上の数字はタンパクのコード配列の開始位置から数えたT-DNAまたはトランスポゾンとのジャンクションの塩基の位置を示している。

(b,d,f) *pip5k7*(a),*pip5k8*(c)および*pip5k9*(e)における*PIP5K7*(b),*PIP5K8*(d)および*PIP5K9*(f)上のT-DNAまたはトランスポゾンの挿入位置を模式的に示した。黒四角はエクソン、黒線はイントロンを示している。縦向きの矢印はT-DNAまたはトランスポゾンの挿入位置を示している。

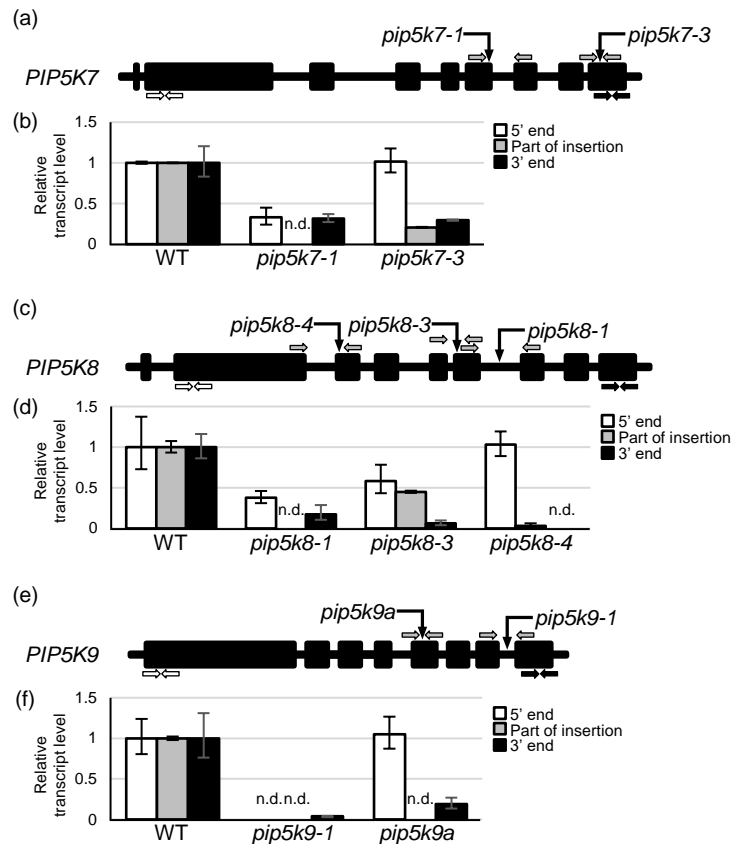


図8. *pip5k7*, *pip5k8* および *pip5k9* の T-DNA またはトランスポゾンの挿入位置と発現量

(a, c, e) *pip5k7*, *pip5k8* および *pip5k9* における *PIP5K7* (a), *PIP5K8* (b) および *PIP5K9* (c) 上の T-DNA またはトランスポゾンの挿入位置を模式的に示した。黒四角はエクソン、黒線はイントロンを示している。縦向き矢印は T-DNA またはトランスポゾンの挿入位置を示している。5' 末端、3' 末端、挿入位置を挟んだ位置に記された向かい合った矢印はリアルタイム RT-PCR (b, d, f) で使用したプライマーセットを示している。

(b, d, f) *pip5k7*, *pip5k8* および *pip5k9* における *PIP5K7* (b), *PIP5K8* (d) および *PIP5K9* (f) の発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。発芽後 6 日間の野生型 (WT) と変異体から RNA を抽出した。白四角は 5' 末端、黒四角は 3' 末端、灰四角は挿入位置での発現量を示している。リアルタイム RT-PCR は *ACT2* の発現量を用いて標準化した。*pip5k7*, *pip5k8* および *pip5k9* の値 (平均値 ± SD; n = 3) は対応する WT の転写量を 1 とし、相対的な発現量を示した。n.d. は発現量が検出できないことを示している。示されているデータは少なくとも 3 回の実験において同様の結果だった。

pip5k7, pip5k8 および *pip5k9* の表現型と高浸透圧ストレス

PIP5K7, PIP5K8 および *PIP5K9* の生物学的機能を明らかにするため、これらの発現、局在パターンを元に *pip5k7, pip5k8* および *pip5k9* 単一変異体の表現型を観察した。しかし、通常生育条件下において、これらの変異体は顕著な表現型を示さなかった(図 9)。そこで、*pip5k7, pip5k8* および *pip5k9* 単一変異体を交雑させることにより *pip5k7pip5k8, pip5k7pip5k9, pip5k8pip5k9* 二重変異体および *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体を作製し表現型を観察した。しかしながら、通常生育条件下において、二重変異体、三重変異体も顕著な表現型を示さなかった(図 9)。これらの結果から、*PIP5K7, PIP5K8* および *PIP5K9* が通常生育条件下において他の B タイプの PIP5K の遺伝子と機能重複している可能性を考え、通常生育条件下における *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体での PIP5K1-6 の遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。その結果、通常生育条件下において、*pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体では PIP5K1-6 の遺伝子の発現量は野生型と比較してほとんど変化がなかった(図 10)。このことから、通常生育条件下において *PIP5K7, PIP5K8* および *PIP5K9* が PIP5K1-6 の遺伝子と機能重複している可能性は低いと判断した。

先行研究において、高浸透圧ストレスや塩ストレスにより細胞内の $PI(4,5)P_2$ が増加することが報告されている(Pical *et al.*, 1999; DeWald *et al.*, 2001; van Leeuwen *et al.*, 2007; König *et al.*, 2008)。そこで、高浸透圧ストレスと塩ストレス条件下における *pip5k7, pip5k8* および *pip5k9* の多重変異体の表現型を観察した。垂直に立てた 1/2MS 培地で発芽後 4 日間生育した幼苗を新しい 1/2MS 寒天培地に置きかえさらに 7 日間生育した(control)。高浸透圧ストレスと塩ストレス条件下での生育として、それぞれ 300mM mannitol または 100mM NaCl が含まれた新しい 1/2MS 寒天培地に置きかえた。通常生育条件下において、単一変異体だけでなく多重変異体は野生型と比較して主根の伸長に変化がなかった(図 11a,b)。mannitol と NaCl 処理条件下において、野生型の主根の伸長は通常生育条件下と比較してそれぞれ約 30%と約 45%に減少し、3 つの単一変異体および *pip5k8pip5k9* 二重変異体の主根の伸長は野生型と同程度であった(図 11c-f)。しかし、これらのストレス条件下で、*pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体では野生型と比較して主根の伸長が有意に抑制され、*pip5k7pip5k8* および

pip5k7pip5k9 二重変異体は野生型と *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の中間だった(図 11c-f)。また、mannitol と NaCl 処理条件下における *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の高感受性の表現型は PIP5K7-YFP を発現する導入遺伝子により完全に相補され、PIP5K8-YFP と PIP5K9-YFP では部分的に相補された(図 12)。これらの結果から、mannitol や NaCl 処理条件下において *PIP5K7, PIP5K8* および *PIP5K9* は重複して主根の伸長を促進することが明らかとなった。また、これらのなかで *PIP5K7* が主に機能していることが示唆された。

mannitol と NaCl 処理条件下における *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の高感受性の表現型をより詳細に解析するため、高浸透圧ストレスや塩ストレスが根端分裂組織の活性を通して主根の伸長に影響を与えることが知られていることから(West, *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016; Cajero-Sanchez *et al.*, 2019)、微分干渉顕微鏡を用いて野生型と *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の主根の根端分裂組織における細胞数と根端分裂組織の長さを計測した。通常生育条件下において、皮層細胞列での根端分裂組織における細胞数と根端分裂組織の長さは野生型と *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体との間に差がなかった(図 13a,b)。しかし、mannitol と NaCl 処理条件下において、*pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体では野生型より根端分裂組織における細胞数と根端分裂組織の長さが大幅に減少していた(図 13c-f)。また、mannitol と NaCl 処理条件下における *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の根端分裂組織での大きさの減少は PIP5K7-YFP により完全に相補され、PIP5K8-YFP と PIP5K9-YFP では部分的に相補された(図 14)。これらの結果は、mannitol や NaCl 処理条件下において *PIP5K7, PIP5K8* および *PIP5K9* が重複して根端分裂組織の活性を通じて主根の伸長を促進することを示している。

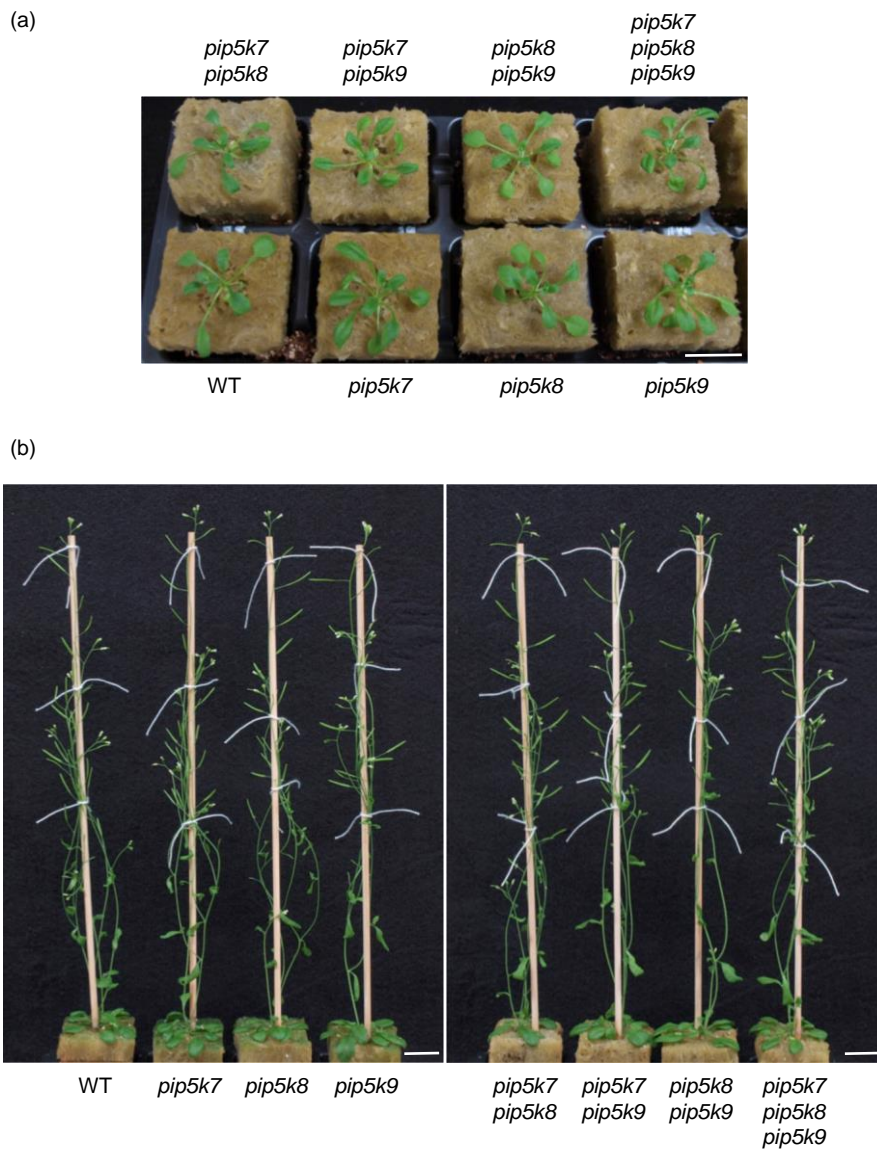


図9. 通常生育条件下での*pip5k7*,*pip5k8*および*pip5k9*の多重変異体の表現型
 野生型(WT)、単一変異体(*pip5k7*,*pip5k8*および*pip5k9*)、二重変異体
 (*pip5k7pip5k8*,*pip5k7pip5k9*および*pip5k8pip5k9*)、三重変異体
 (*pip5k7pip5k8pip5k9*)は22°Cの全日条件下で生育した。3週齢(a)、5週齢(b)
 の植物を示した。スケールバーは2cmである。

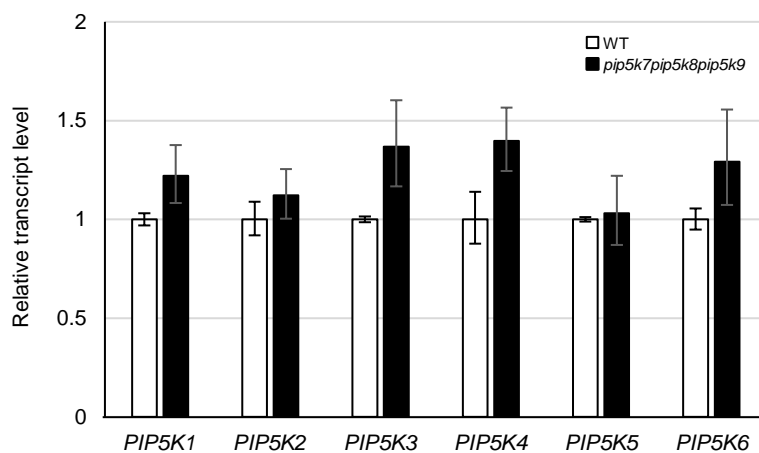


図10. 通常生育条件下での *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体における *PIP5K1-6* の発現量

野生型(WT)と *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体における *PIP5K1-6* の発現量をリアルタイムRT-PCRを用いて解析した。白四角はWT、黒四角は *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体での発現量を示している。リアルタイムRT-PCRは *ACT2* の発現量を用いて標準化した。 *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の値(平均値±SD; n = 3)は対応するWTの転写量を1として相対的な発現量を示した。示されているデータは少なくとも3回の実験において同様の結果だった。

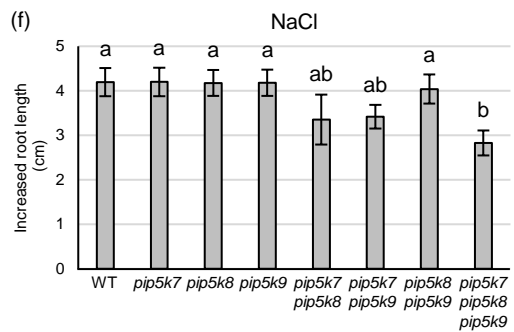
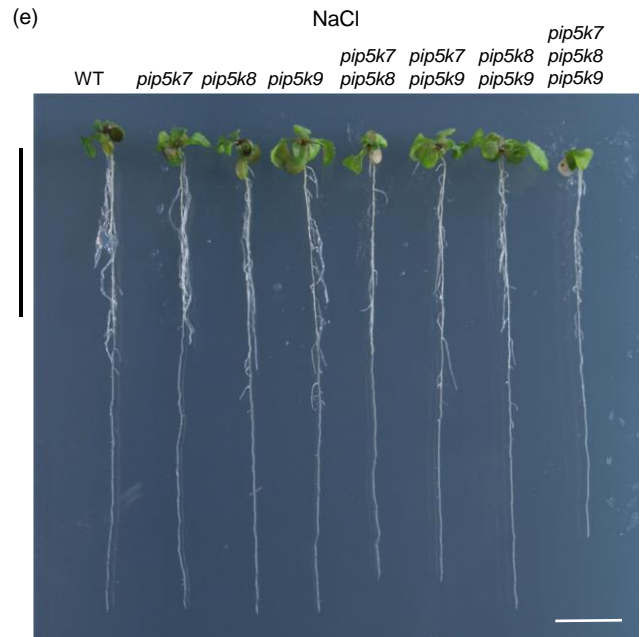
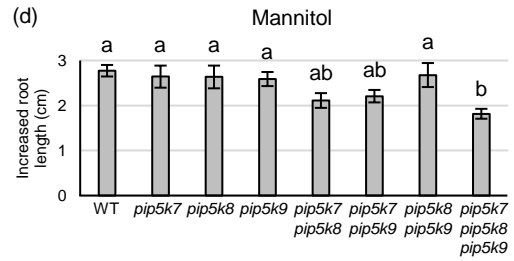
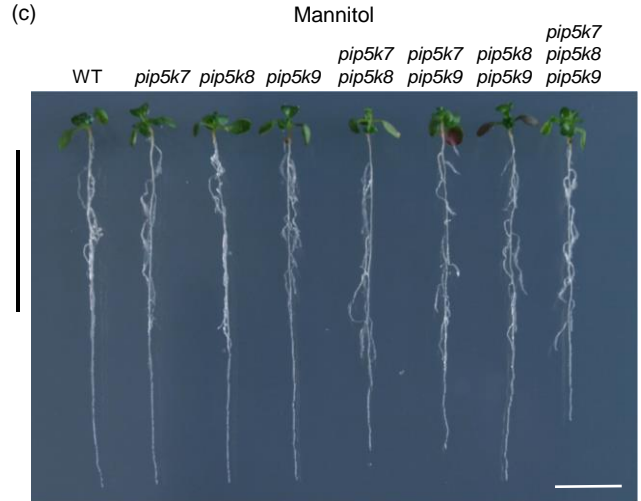
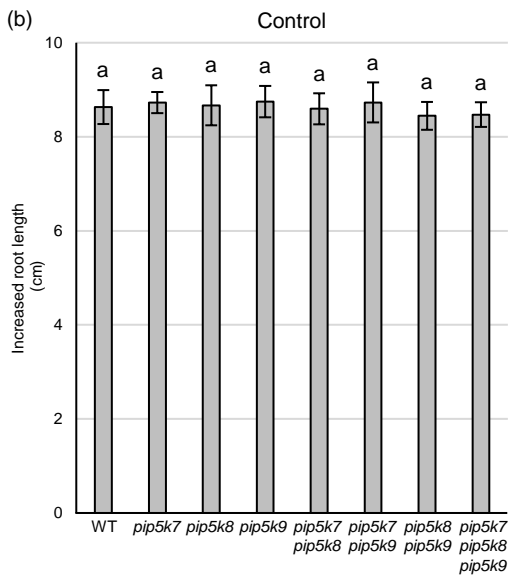


図11. 高浸透圧ストレスにおける *pip5k7*, *pip5k8* および *pip5k9* の多重変異体の表現型

(a,c,e)野生型(WT)、単一変異体(*pip5k7*, *pip5k8* および *pip5k9*)、二重変異体 (*pip5k7pip5k8*, *pip5k7pip5k9* および *pip5k8pip5k9*)、三重変異体 (*pip5k7pip5k8pip5k9*) の通常生育条件下(control)(a)、mannitol 処理条件下(c)、NaCl 処理条件下(e)における主根の伸長を測定した。発芽後4日間の主根の長さが 2.5 ± 0.1 cm の幼苗を 300mM mannitol または 100mM NaCl が含まれた新しい 1/2MS 寒天培地に置きかえた。control では 300mM mannitol または 100mM NaCl が含まれていない新しい 1/2MS 寒天培地に置きかえた。その後7日間生育し、主根の長さの測定し写真を撮影した。写真の左にある縦向きの黒線は置きかえた直後の主根の位置を示している。

(b,d,f)撮影した写真を用いて伸長した主根の長さを測定した。control(b)、mannitol(d)、NaCl(f)におけるそれぞれのラインの伸長した主根の長さを示した(平均値 \pm SD; n=6)。異なる文字は統計的に有意な違いを示した ($P < 0.01$; ANOVA and Tukey's test)。示されているデータは少なくとも3回の実験において同様の結果だった。スケールバーは1cmである。

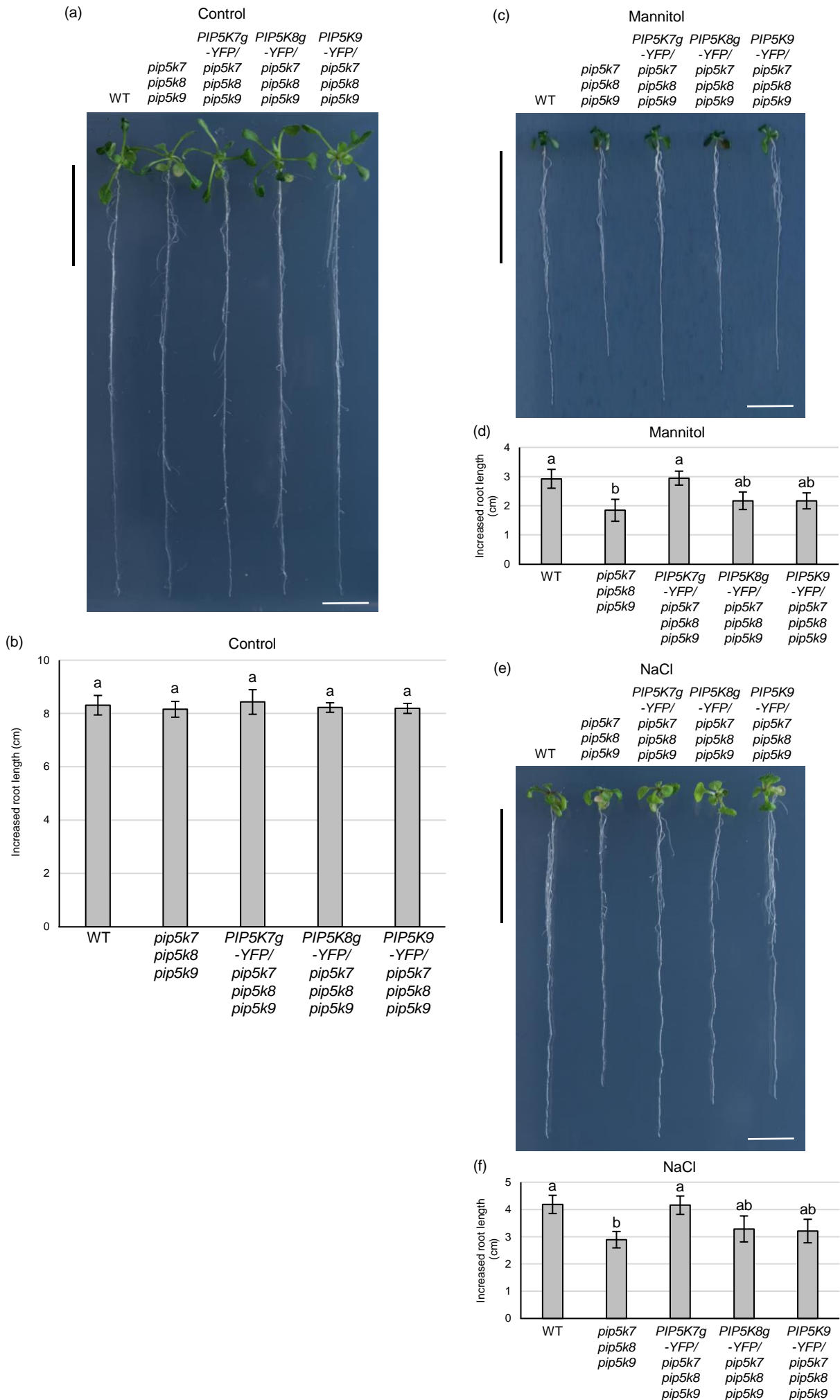


図12. 高浸透圧ストレスにおける機能相補変異体の表現型

(a,c,e)野生型(WT)、三重変異体(*pip5k7pip5k8pip5k9*)、機能相補変異体(*PIP5K7g-YFP/pip5k7pip5k8pip5k9*, *PIP5K8g-YFP/pip5k7pip5k8pip5k9*, および *PIP5K9-YFP/pip5k7pip5k8pip5k9*)の通常生育条件下(control)(a)、mannitol処理条件下(c)、NaCl処理条件下(e)における主根の伸長を測定した。発芽後4日間の主根の長さが 2.5 ± 0.1 cmの幼苗を300mM mannitolまたは100mM NaClが含まれた新しい1/2MS寒天培地に置きかえた。controlでは300mM mannitolまたは100mM NaClが含まれていない新しい1/2MS寒天培地に置きかえた。その後7日間生育し、主根の長さの測定し写真を撮影した。写真の左にある縦向きの黒線は置きかえた直後の主根の位置を示している。

(b,d,f)撮影した写真を用いて伸長した主根の長さを測定した。control(b)、mannitol(d)、NaCl(f)培地におけるそれぞれのラインの伸長した主根の長さを示した(平均値 \pm SD; n=6)。異なる文字は統計的に有意な違いを示した(P< 0.01; ANOVA and Tukey's test)。示されているデータは少なくとも3回の実験において同様の結果だった。スケールバーは1cmである。

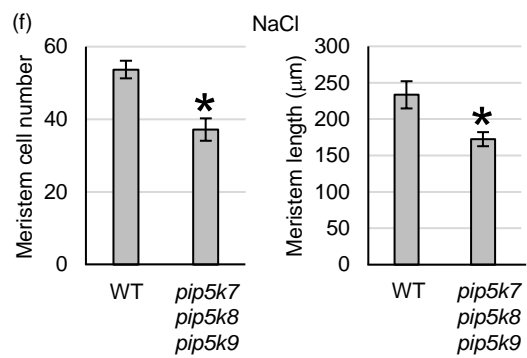
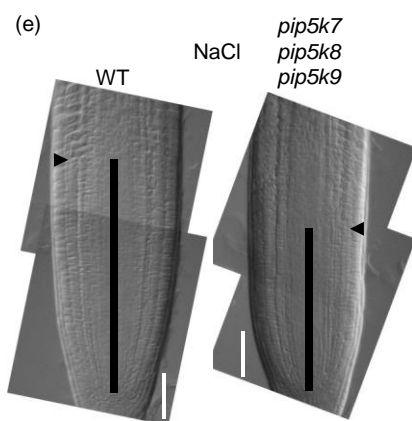
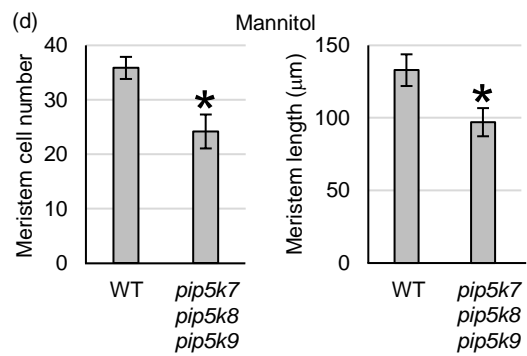
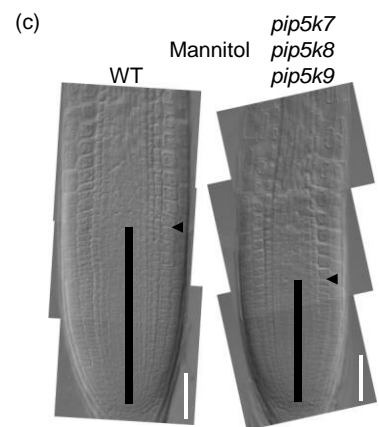
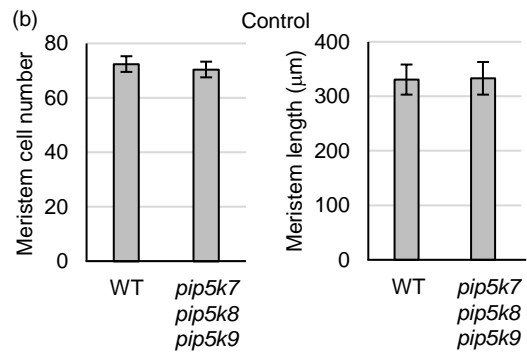
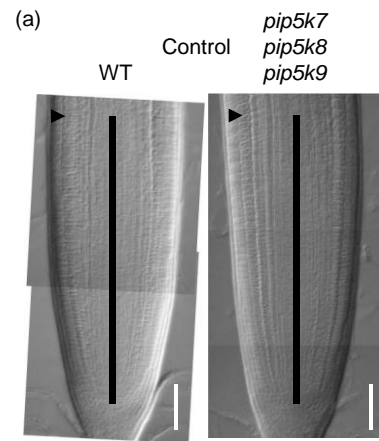


図13. 高浸透圧ストレスにおける *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の根端分裂組織の大きさ

(a,c,e)図11においてcontrol(a)、mannitol(c)、NaCl(e)培地に置き換えた後、7日間生育した野生型(WT)および*pip5k7pip5k8pip5k9*三重変異体を微分干渉顕微鏡を用いてそれらの主根の根端分裂組織(静止中心と伸長を開始している細胞の間の領域)における細胞数と根端分裂組織の長さを計測した。各画像において、矢頭は皮層細胞列での伸長を開始している細胞の下端を示し、垂直の黒い線は静止中心と伸長を開始している細胞の間の長さを示している。

(b,d,f)撮影した写真を用いて根端分裂組織における細胞数と長さを測定した。

control(b)、mannitol(d)、NaCl(f)培地におけるそれぞれのラインの値を示した(平均値 \pm SD; n=6)。アスタリスクは野生型と比較した有意な違いを示している(Student's t-test; $P < 0.001$)。示されているデータは少なくとも3回の実験において同様の結果だった。スケールバーは50 μ mである。

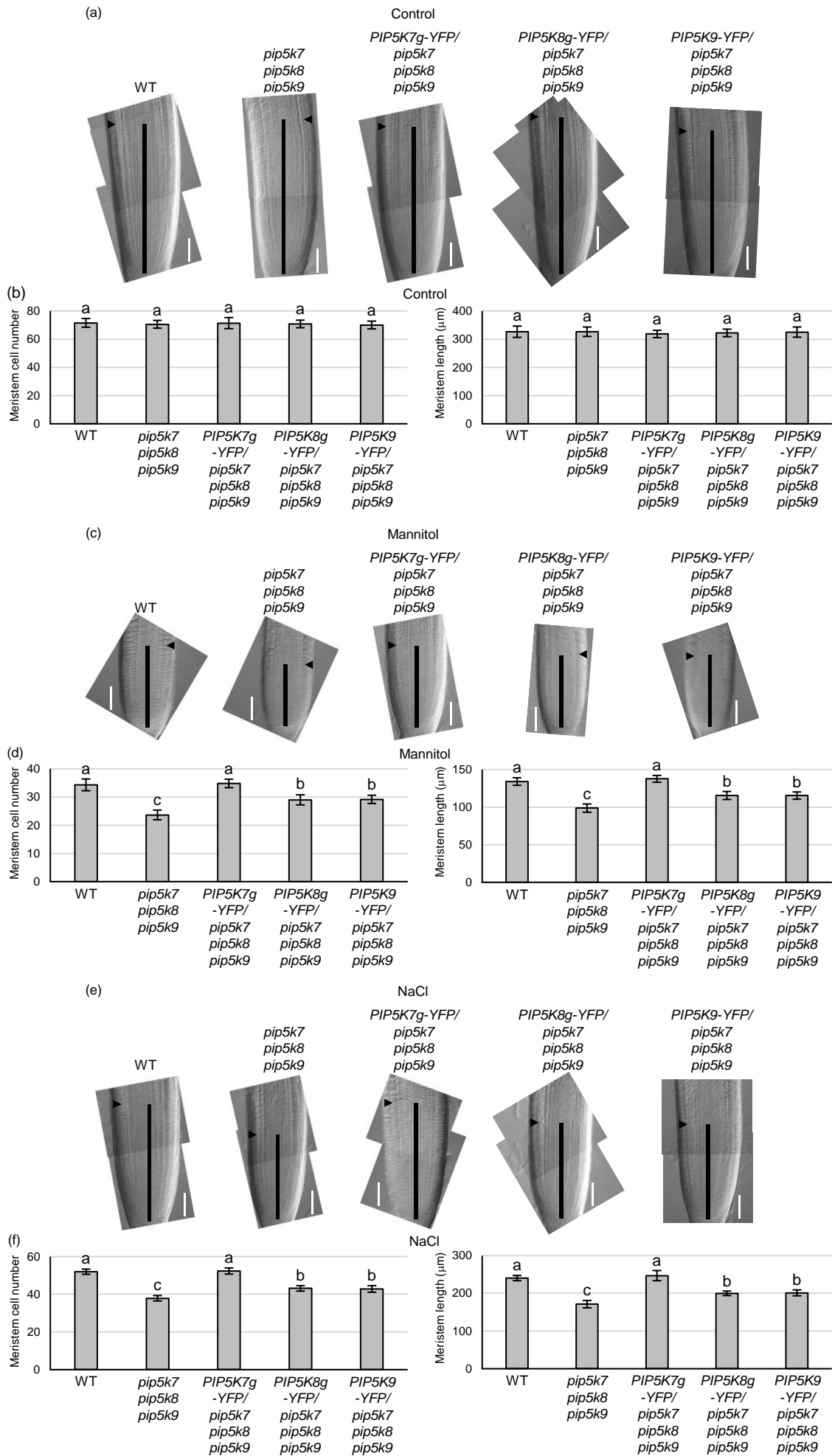


図14. 高浸透圧ストレスにおける機能相補変異体の根端分裂組織の大きさ

(a,c,e)図12においてcontrol(a)、mannitol(c)、NaCl(e)培地に置き換えた後、7日間生育した野生型(WT)、三重変異体(*pip5k7pip5k8pip5k9*)、機能相補変異体(*PIP5K7g-YFP/pip5k7pip5k8pip5k9*, *PIP5K8g-YFP/pip5k7pip5k8pip5k9*, および *PIP5K9-YFP/pip5k7pip5k8pip5k9*)を微分干渉顕微鏡を用いてそれらの主根の根端分裂組織における細胞数と根端分裂組織の長さを計測した。各画像において、矢頭は皮層細胞列での伸長を開始している細胞の下端を示し、垂直の黒い線は静止中心と伸長を開始している細胞の間の長さを示している。

(b,d,f)撮影した写真を用いて根端分裂組織における細胞数と長さを測定した。control(b)、mannitol(d)、NaCl(f)培地におけるそれぞれのラインの値を示した(平均値±SD; n=6)。異なる文字は統計的に有意な違いを示した(P< 0.01; ANOVA and Tukey's test)。示されているデータは少なくとも3回の実験において同様の結果だった。スケールバーは50µmである。

高浸透圧ストレスによる *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の発現量と局在の変化

mannitol や NaCl 処理条件下において *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* が重複して主根の根端分裂組織の大きさに伴って主根伸長を促進することから、シロイヌナズナにおける高浸透圧ストレスによる *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の発現量と局在の変化を解析した。まず、野生型のシロイヌナズナにおいて高浸透圧ストレスにより *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の発現量が変化するか調べた。300mM mannitol を 1 時間処理した野生型のシロイヌナズナでは control 条件下と比較して *PIP5K7* は約 1.5 倍、*PIP5K8* は約 2.2 倍、*PIP5K9* は約 1.7 倍に発現量が増加していた(図 15)。この結果から、シロイヌナズナは *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の発現量を増加させることで高浸透圧ストレスに応答することが示唆された。次に、野生型のシロイヌナズナの主根の根端分裂組織において *PIP5K7*-YFP, *PIP5K8*-YFP および *PIP5K9*-YFP の細胞内局在が mannitol 処理によりどのように変化するか観察した。control 条件下での主根の根端分裂組織における表皮細胞では *PIP5K7*-YFP の蛍光は細胞膜でのみ観察されたが、300mM mannitol を 1 時間処理した後では細胞膜の蛍光に加えて細胞膜付近に粒状の蛍光が観察された(図 16a,f)。また、mannitol 処理条件下における細胞膜付近に存在するほとんどの *PIP5K7*-YFP の粒状の蛍光は FM4-64 の蛍光と共局在した(図 16f)。これらのことから、mannitol 処理条件下におけるこれらの粒状の蛍光はエンドサイトーシス経路を介して細胞膜から輸送される膜構造であると示唆された。同様に、*PIP5K8*-YFP および *PIP5K9*-YFP は control 条件下で粒状の蛍光が観察されなかったが、mannitol 処理条件下では粒状の蛍光が観察され FM4-64 の蛍光と共局在した(図 16c,d,h,i)。また、各表皮細胞あたりの FM4-64 で染色された mannitol 処理による粒状の蛍光の数は *PIP5K7*-YFP, *PIP5K8*-YFP および *PIP5K9*-YFP でほとんど同程度だった(図 16k)。*PIP5K8*-YFP および *PIP5K9*-YFP の control 条件下で検出された植物の自家蛍光と考えられる FM4-64 で染色されていない粒状の蛍光(図 16c-e; YFP 用の励起光 60mW)は mannitol 処理によりそれらの数と強度が増加し(図 16h-j; YFP 用の励起光 60mW)、それはまた mannitol 処理条件下の *PIP5K7*-YFP においても少し検出された(図 16f,g; YFP 用の励起光 30mW)。これらの結果から、野生型のシロイヌナズナにおける主根の根端分裂組織では、mannitol 処理により *PIP5K7*, *PIP5K8* お

よび PIP5K9 が細胞膜付近に粒状に局在するといった変化が生じ、これがシロイヌナズナの根における高浸透圧ストレスの応答に関与していることが示唆された。

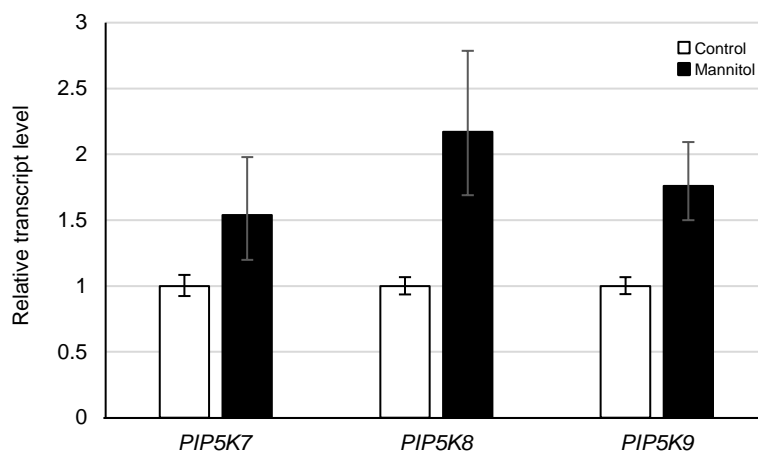


図15. 高浸透圧ストレスにおける *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の発現量

野生型(WT)において高浸透圧ストレスによる *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の発現量の変化をリアルタイムRT-PCRを用いて解析した。白四角はcontrol、黒四角はmannitol(300mM mannitolを1時間処理)での発現量を示している。リアルタイムRT-PCRは *ACT2* の発現量を用いて標準化した。mannitolの値(平均値±SD; n = 3)は対応するcontrolの転写量を1として相対的な発現量を示した。示されているデータは少なくとも3回の実験において同様の結果だった。

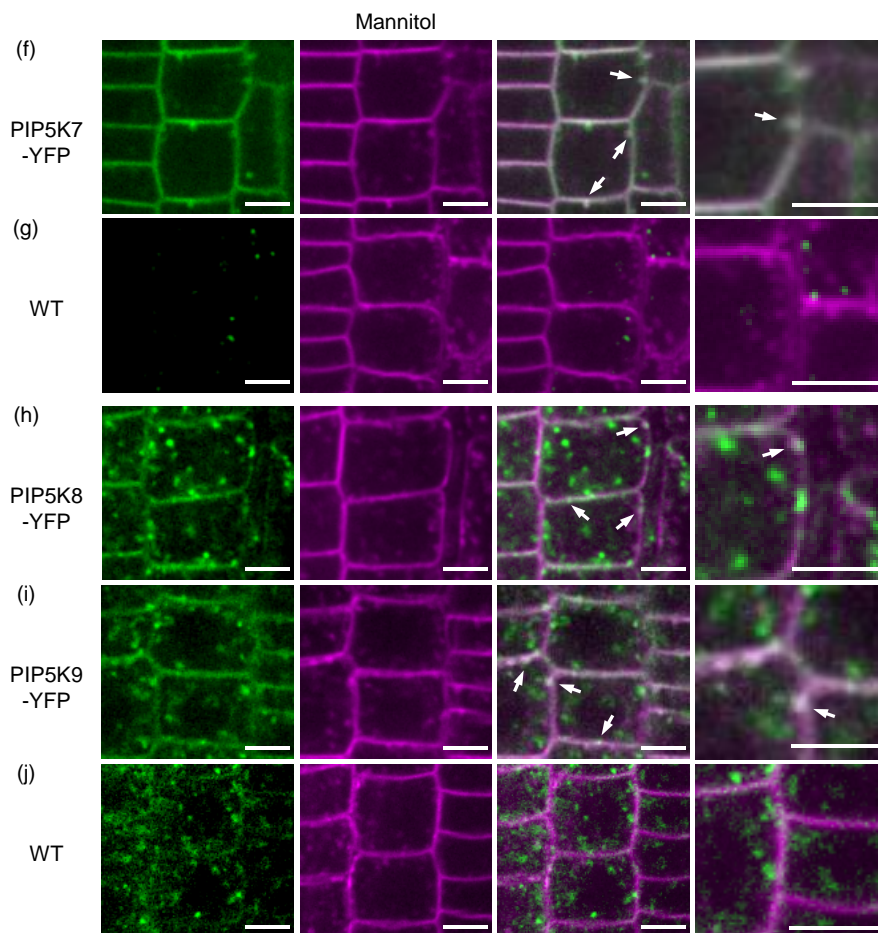
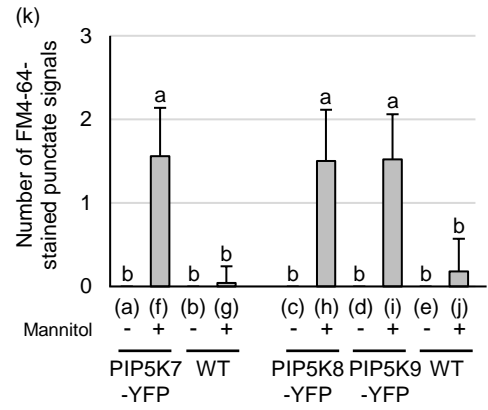
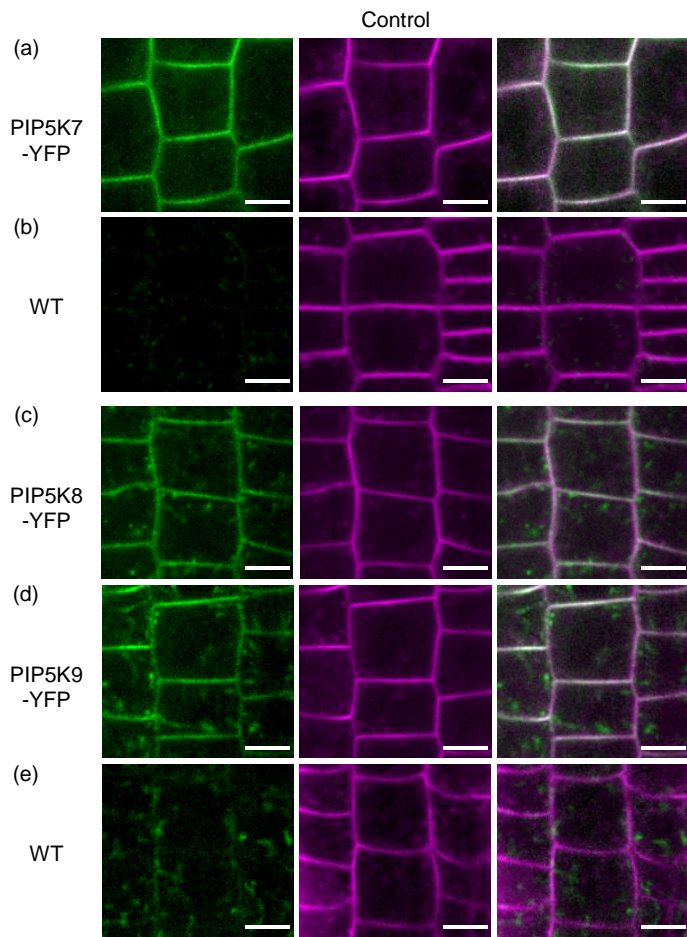


図16. 高浸透圧ストレスにおけるPIP5K7, PIP5K8およびPIP5K9の細胞内局在 (a-j)発芽後6日間の主根の根端分裂組織におけるPIP5K7-YFP(a,f), PIP5K8-YFP(c,h)およびPIP5K9-YFP(d,i)の局在パターンを共焦点顕微鏡を用いて観察した。野生型(WT)は自家蛍光の参考のために観察した(b,e,g,j)。レーザー強度は30mW(a,b,f,g)と60mW(c-e,h-j)を使用した。それぞれの主根を1時間2 μ M FM4-64(a-e)または2 μ M FM4-64, 300mM mannitol(f-j)で処理した。YFP(緑)、FM4-64(マゼンタ)、mergedを示した。(f-j)で拡大した画像を示した。(f,h,i)での矢印は代表的なFM4-64で染色された粒状の蛍光を示し、(f)での矢頭は代表的なFM4-64で染色されていない粒状の蛍光を示した。(k)1細胞あたりのFM4-64で染色された粒状の蛍光数を定量化した(平均値 \pm SD; n=50)。WTは植物の自家蛍光の参考のために定量化した。異なる文字は統計的に有意な違いを示した(P< 0.01; ANOVA and Tukey's test)。示されているデータは少なくとも3回の実験において同様の結果だった。スケールバーは10 μ mである。

高浸透圧ストレスでの PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 のエンドサイトーシス

高浸透圧ストレスは根端分裂組織の細胞内でのエンドサイトーシスを促進することが先行研究で明らかとなっているため (Zwiewka *et al.*, 2015)、高浸透圧ストレスにおける野生型と *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体での BFA body の形成を解析した。BFA body の形成はエンドサイトーシスによる膜交通の障害によって影響を受ける。野生型の根端分裂組織における表皮細胞では、FM4-64 で染色された BFA body の数は 30 分間 mannitol と BFA の処理の方が BFA のみでの処理よりも有意に多く観察された (図 17a,b,g)。これは以前報告されたように、高浸透圧ストレス条件下でエンドサイトーシスが促進されることと一致している (Zwiewka *et al.*, 2015)。しかし、mannitol の有無にかかわらず 30 分間処理した *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の BFA body の数は mannitol 未処理の野生型と同程度だった (図 17d,e,g)。1 時間 mannitol と BFA で処理した野生型の BFA body の数は 30 分間の処理と同程度であったが、1 時間 mannitol と BFA で処理した *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の BFA body の数は大幅に増加し 30 分または 1 時間処理した野生型と同程度にまで達した (図 17c,f,g)。これらの結果は、*pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体では高浸透圧ストレスにより BFA body の形成が遅延したことを示している。

PIN2 は膜交通のリサイクリングによって細胞膜と内膜コンパートメントの間を移行し (Dhonukshe *et al.*, 2007)、高浸透圧ストレスによって PIN2 のエンドサイトーシスが促進されることが知られている (Zwiewka *et al.*, 2015)。そこで、高浸透圧ストレスにおいて PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 が BFA body の形成に及ぼす影響を PIN2 の GFP 融合タンパク質 (PIN2-GFP) を用いて解析した。FM4-64 で観察された結果と同様に、野生型では PIN2-GFP によってマークされた BFA body の数が 30 分間の mannitol 処理に応じて有意に増加したが、*pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体では 1 時間の mannitol 処理のみに応じて増加し野生型と同程度にまで達した (図 18)。これらの結果から、高浸透圧ストレスにおいて PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 がエンドサイトーシスを促進することが明らかとなった。

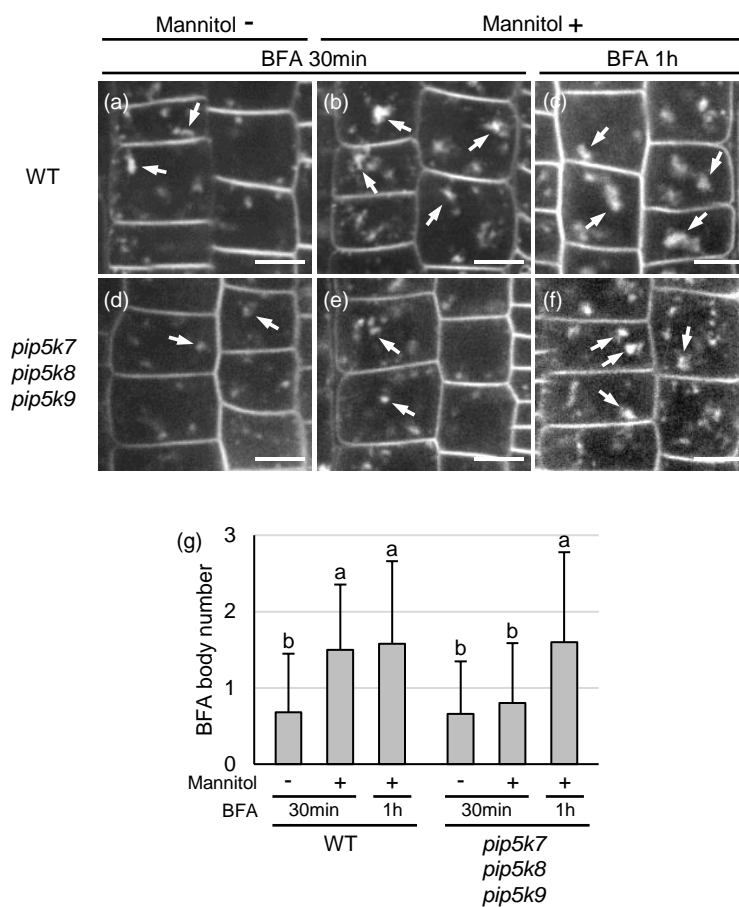


図17. 高浸透圧ストレスにおける *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の BFA body の形成

(a–f) 発芽後6日間の野生型(WT; a–c)および *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体(d–f)を用いて、主根の根端分裂組織での表皮細胞におけるFM4-64で染色されたBFA bodyの形成パターンを観察した。それぞれの主根を25 μ M BFA, 2 μ M FM4-64(a, d)または25 μ M BFA, 2 μ M FM4-64, 75mM mannitol(b, c, e, f)で30分間(a, b, d, e)または1時間(c, f)処理した。矢印は代表的なFM4-64で染色されたBFA bodyを示している。

(g) 1細胞あたりのFM4-64で染色された直径2.0 μ m以内のBFA bodyを定量化した(平均値 \pm SD; n=50)。異なる文字は統計的に有意な違いを示した(P < 0.01; ANOVA and Tukey's test)。示されているデータは少なくとも3回の実験において同様の結果だった。スケールバーは10 μ mである。

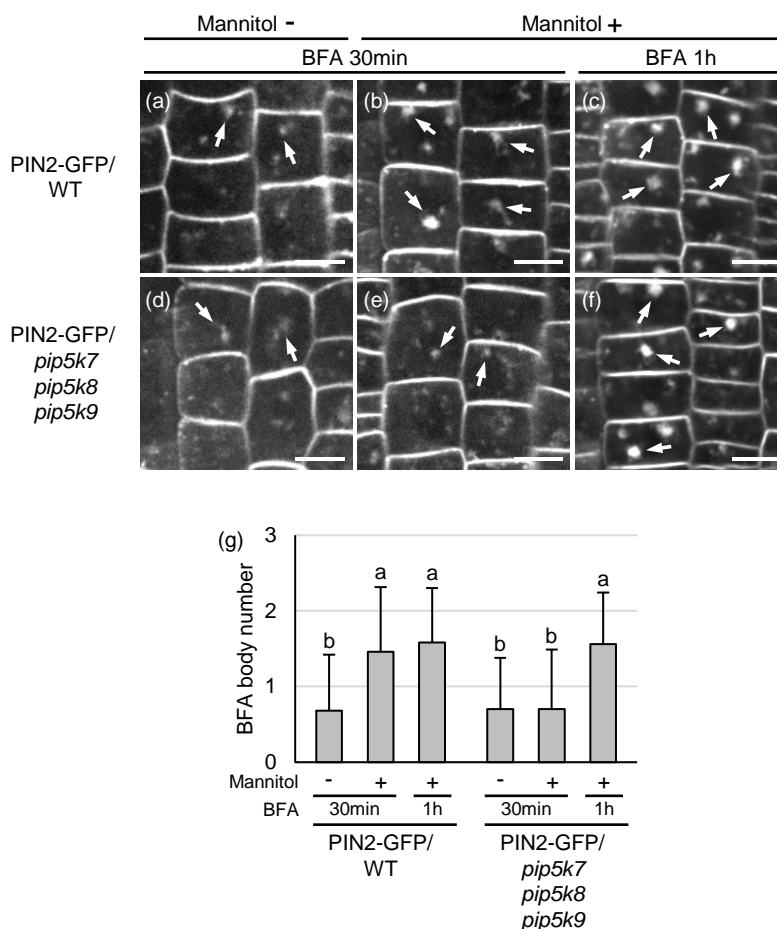


図18. 高浸透圧ストレスでの *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の PIN2 のエンドサイトーシス (a-f) 発芽後6日間の PIN2-GFP を発現している野生型 (WT; a-c) および *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体 (d-f) バックグラウンドを用いて、主根の根端分裂組織での表皮細胞における GFP 蛍光の BFA body の形成パターンを観察した。それぞれの主根を 25 μ M BFA, 2 μ M FM4-64 (a, d) または 25 μ M BFA, 2 μ M FM4-64, 75mM mannitol (b, c, e, f) で30分間 (a, b, d, e) または1時間 (c, f) 処理した。矢印は代表的な GFP 蛍光の BFA body を示している。

(g) 1細胞あたりの直径2.0 μ m以内の GFP 蛍光の BFA body を定量化した (平均値 \pm SD; n=50)。異なる文字は統計的に有意な違いを示した (P< 0.01; ANOVA and Tukey's test)。示されているデータは少なくとも3回の実験において同様の結果だった。スケールバーは10 μ mである。

PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 が産生する PI(4,5)P₂ の局在

PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 が産生する PI(4,5)P₂ の細胞内局在を調べるため、PI(4,5)P₂ の蛍光マーカータンパク質 P24Y (Simon *et al.*, 2014) の細胞内局在パターンをそれぞれ野生型と *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体のバックグラウンドで観察した。通常生育条件下において、以前に報告されたように (Simon *et al.*, 2014)、P24Y は野生型の根端分裂組織での表皮細胞において細胞膜全体に局在し、特に細胞膜の頂底に多く局在していた (図 19a, h)。一方、*pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の根端分裂組織での表皮細胞では、P24Y は主に細胞内に拡散し、細胞膜の頂底にのみ局在していた (図 19d, k)。これは、根端分裂組織の表皮細胞における細胞膜上の PI(4,5)P₂ が主に PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 によって産生されることを示唆している。また、mannitol 処理は野生型の根端分裂組織での表皮細胞における P24Y の細胞膜局在パターンを弱めた (図 19b, c, i, j)。さらに、mannitol 処理 30 分後に植物の自家蛍光とは異なる P24Y の粒状の蛍光が現れ、1 時間後にはその数が増加した (図 19b, c, g, 図 20a, b)。mannitol 処理された *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体における P24Y は細胞膜での局在がほとんど観察されず、粒状の蛍光は時間が増加するにつれて増加するが野生型よりも有意に少なかった (図 19e, f, g, l, m, 図 20c, d)。

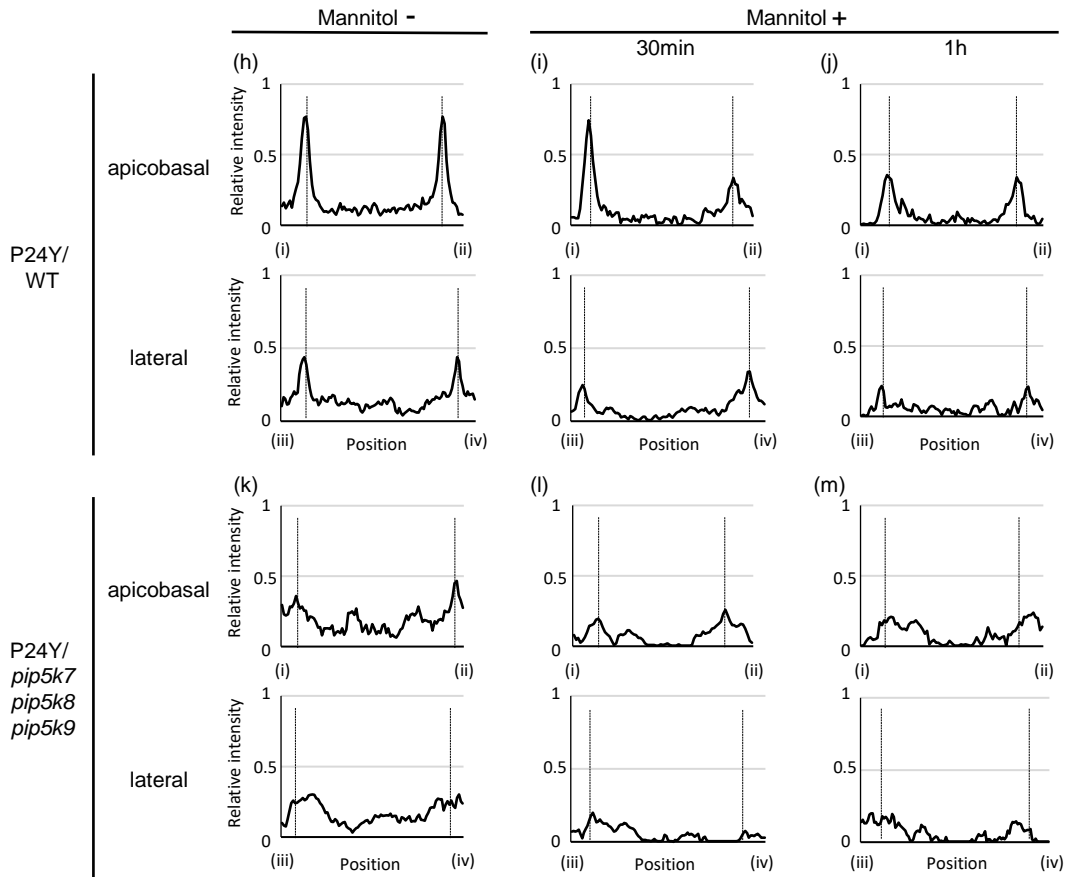
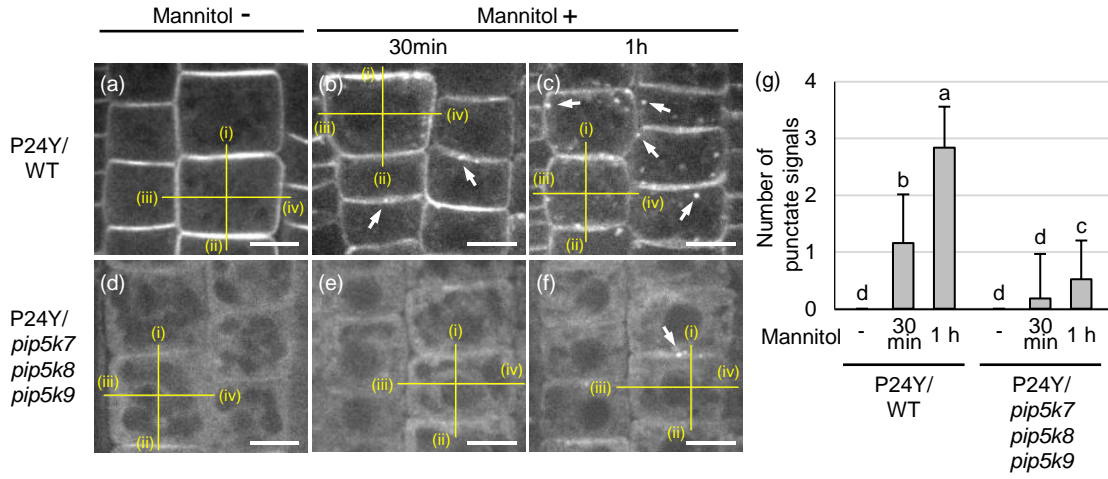


図19. PI(4,5)P₂マーカーP24Yの細胞内局在

(a-f)発芽後6日間のPI(4,5)P₂マーカーP24Yを発現している野生型(WT; a-c)および*pip5k7pip5k8pip5k9*三重変異体(d-f)バックグラウンドを用いて、主根の根端分裂組織での表皮細胞におけるP24Yの局在パターンを観察した。それぞれの主根をmannitol未処理(Mannitol-; a,d)または300mM mannitolで30分間(b,e)または1時間(c,f)処理した。矢印は代表的なP24Yの粒状の蛍光を示している。スケールバーは10μmである。

(g)1細胞あたりのP24Yの粒状の蛍光数を定量化した(平均値±SD; n=50)。異なる文字は統計的に有意な違いを示した(P< 0.01; ANOVA and Tukey's test)。示されているデータは少なくとも3回の実験において同様の結果だった。

(h-m)主根の根端分裂組織での表皮細胞における細胞膜上のP24Yの局在を示した。蛍光画像(a-f)に示されている線(i)-(ii)(頂底)および(iii)-(iv)(側方)に沿った相対的な蛍光強度をそれぞれ示した。破線は推定される細胞膜の位置を示している。

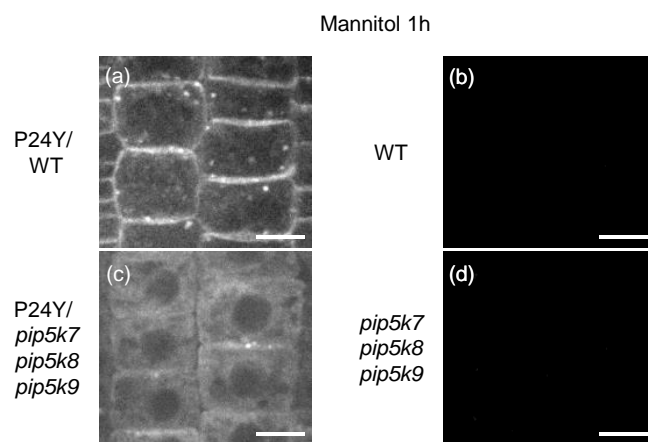


図20. 高浸透圧ストレスにおける植物の自家蛍光

発芽後6日間のPI(4,5)P₂マーカーP24Yを発現している野生型(WT; a)および*pip5k7pip5k8pip5k9*三重変異体(c)バックグラウンドと野生型(b)および*pip5k7pip5k8pip5k9*三重変異体(d)を1時間300mM mannitol処理し、主根の根端分裂組織での表皮細胞における植物の自家蛍光を比較した。スケールバーは10μmである。

考察

本研究では、シロイヌナズナにおける *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の生物学的機能について包括的に解析した。*PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* は陸上植物において広く保存されているため、これらの遺伝子は陸上植物が共有する重要な機能を保持していると考えられた。また、植物にとって高浸透圧ストレス応答は成長と生存のために重要であり、植物は高浸透圧ストレスにおいて細胞内の $PI(4,5)P_2$ を増加させる。したがって、私はシロイヌナズナの *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* が高浸透圧ストレスにおいて陸上植物に共通の重要な機能を保持していると仮説を立て、これらの遺伝子の重複的な機能に着目し、植物の成長、発生、環境応答の観点から機能解析を行った。

PIP5K7, *PIP5K8* および *PIP5K9* の組織特異的な発現パターン

GUS レポーター解析では、*PIP5K7* および *PIP5K9* の上流の遺伝子間領域はシュート、根、花序の分裂組織および維管束組織で主にプロモーター活性を示した(図 4,5)。このパターンは、基本的に以前報告された *PIP5K7* および *PIP5K9* の発現パターンと一致している(Bauby *et al.*, 2007; Lou *et al.*, 2007; Zarza *et al.*, 2020)。*PIP5K9* の発現パターンに関しての先行研究において(Lou *et al.*, 2007)、*PIP5K9* の上流領域は根端分裂組織でプロモーター活性を示さなかったが、この不一致は解析に用いた上流領域(先行研究は 1.1kb、本研究は 3.5kb)の違いに起因する可能性がある。本研究の GUS レポーター解析に用いた *PIP5K8* の 7.5kb の上流領域は *PIP5K7* および *PIP5K9* の上流領域よりも幼苗で弱いプロモーター活性を示した。一方、*PIP5K8*-YFP は根端分裂組織において *PIP5K9* プロモーターによって発現する *PIP5K9*-YFP と同程度の蛍光強度を示した(図 6l,q)。しかし、これらの蛍光強度は *PIP5K7*-YFP の蛍光強度よりも弱かった(図 6b,l,q)。先行研究での根における B タイプの *PIP5K* の遺伝子の発現量解析結果を考慮すると(Wada *et al.*, 2015)、*PIP5K8* を含む *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* は根端分裂組織で発現しており、転写活性化のシスエレメントは *PIP5K8* の転写領域に存在する可能性がある結論付けた。

PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 の細胞内局在パターン

PIP5K7-YFP, PIP5K8-YFP および PIP5K9-YFP は主に主根の根端分裂組織における表皮細胞の細胞膜に一様に局在していた(図 6)。PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 の似た組織特異的発現パターンと細胞内局在パターンはこれらの遺伝子が機能重複していることと相関がある。また、PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 が細胞膜に一様に局在していた結果は、PIP5K1-6 が細胞内で極性をもって局在していることとは対照的であり(Kusano *et al.*, 2008; Stenzel *et al.*, 2008; Ischebeck *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010; Ischebeck and Werner *et al.*, 2013; Tejos *et al.*, 2014)、PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 が PIP5K1-6 とは異なる役割を持つことが示唆された。PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 は細胞内に極性をもたらすのではなく、PI(4,5)P₂ を常に産生することに必要なのかもしれない。

野生型の細胞でも観察される FM4-64 で染色されていない粒状の蛍光は植物の自家蛍光であると考えられたが、mannitol 処理後に観察された FM4-64 で染色可能な粒状の蛍光は野生型の細胞でははるかに少ないためほとんどが YFP 融合タンパク質の蛍光であると考えている(図 16)。細胞膜付近に局在する FM4-64 で染色された PIP5K7-YFP, PIP5K8-YFP および PIP5K9-YFP の粒状の蛍光数がほぼ同程度であったことから(図 16k)、それらは細胞膜に由来する同じ膜コンパートメントに局在する可能性がある。

PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 の機能欠損変異体

pip5k7, *pip5k8* および *pip5k9* の T-DNA またはトランスポゾンの挿入位置の決定とリアルタイム RT-PCR によりそれらのホモ接合体の発現量解析を行った。(図 7,8)。リアルタイム RT-PCR による発現量解析の際、それぞれの遺伝子の 5' 末端と 3' 末端の領域でプライマーを設計し部分的な転写産物の有無を解析することで、部分的かつ機能的な転写産物が産生されるラインをなるべく排除しようとした。*pip5k7-1*, *pip5k8-1* および *pip5k9-1* では全長の転写産物が産生されないことに加え、部分的なかつ機能的な転写産物が全長タンパク質の機能を相補する可能性が最も低いと考えられたため、これらを選択し使用した。PIP5K7-9 サブグループが陸上植物間で共有される重要な

機能を保持していると仮定すると、これらの機能欠損変異体を使用した遺伝子解析で少なくとも *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体では植物の成長、発生、環境刺激に対する応答での表現型の変化が予想された。そこで、単離した *pip5k7,pip5k8* および *pip5k9* 単一変異体から *pip5k7pip5k8,pip5k7pip5k9* および *pip5k8pip5k9* 二重変異体、*pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体を作製しそれらの表現型を観察した。しかし、通常生育条件下において、これらの単一変異体も *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体を含むそれらの複数の多重変異体も明らかな表現型の変化を示さなかった(図 9,11a,b,13a,b)。通常生育条件下では膜交通もまた野生型と *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体で差が見られなかった(図 17a,d,g,18a,d,g)。さらに、通常生育条件下において *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の根端分裂組織における表皮細胞では、PI(4,5)P₂ 蛍光マーカータンパク質 P24Y(Simon *et al.*, 2014)は PIP5K1 と PIP5K2 が PI(4,5)P₂ を産生すると考えられている細胞膜の頂底のサブドメインでのみ局在し(Ischebeck *et al.*, 2013; Tejos *et al.*, 2014)、野生型では P24Y は細胞膜全体に局在していた(図 19a,d,h,k)。この PI(4,5)P₂ の局在パターンの劇的な変化は、PIP5K7,PIP5K8 および PIP5K9 が通常生育条件下において細胞膜上で PI(4,5)P₂ を産生しており、通常生育条件下ではそれらがなくても表現型や膜交通には影響がないことを示唆している。

高浸透圧ストレスでの *PIP5K7,PIP5K8* および *PIP5K9* の機能欠損変異体の表現型

pip5k7pip5k8pip5k9 三重変異体は通常生育条件下においては顕著な表現型を示さなかったが、mannitol や NaCl 処理により *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の主根の伸長は野生型に比べて有意に感受性が高かった(図 11)。また、mannitol や NaCl 処理条件下での *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体における根端分裂組織の大きさの減少は(図 13c-f)、mannitol や NaCl 処理による *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の主根伸長抑制の原因かもしれない。mannitol は高浸透圧ストレスのみを引き起こすが、NaCl がもつ塩ストレスは高浸透圧ストレスとイオンストレスの両方を同時に引き起こす(Hasegawa *et al.*, 2000; Munns and Tester, 2008)。そのため、イオンストレスに対しても高感受性であるかどうかは不明であるが、少なくとも *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体は高浸透圧ストレスに対しては高感受性であると考えられる。また、PIP5K や PI(4,5)P₂

は高浸透圧ストレスと塩ストレス以外に低温ストレス、高温ストレス、乾燥ストレス、アブジン酸、免疫応答に関与することが知られている(Mikami *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2004; Lou *et al.*, 2007; Mishkind *et al.*, 2009; Menzel *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2020)。これらのことから、イオンストレスを含めた他のストレスにおいても *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* が関与している可能性が示唆される。

pip5k7pip5k8pip5k9 三重変異体が通常生育条件下で主根の伸長に影響を及ぼさなかったことを考慮すると、*PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* は根端分裂組織での高浸透圧ストレスへの応答に重複して役割を果たしていると考えられる。*pip5k7pip5k8* および *pip5k7pip5k9* 二重変異体は高浸透圧ストレス条件下において野生型と *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体との中間的な主根伸長の表現型を示したが、*pip5k8pip5k9* 二重変異体は野生型と同程度であった(図 11c-f)。さらに、高浸透圧ストレス条件下での *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の表現型は *PIP5K7*-YFP を発現する導入遺伝子によって完全に回復し、*PIP5K8*-YFP や *PIP5K9*-YFP を発現する導入遺伝子によって部分的に回復した(図 12,14)。これらの結果は、高浸透圧ストレス条件下での主根伸長における *PIP5K7* の寄与が *PIP5K8* と *PIP5K9* よりも大きいことを示しており、*PIP5K7*-YFP レポーター遺伝子の発現量が *PIP5K8*-YFP と *PIP5K9*-YFP よりも高かったという事実と一致している(図 6)。

高浸透圧ストレスにおける *PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* の役割

PIP5K7, *PIP5K8* および *PIP5K9* の機能重複性は主根の根端分裂組織における遺伝子の共発現と一致している(図 4)。根端分裂組織における表皮細胞では、*PIP5K7*-YFP, *PIP5K8*-YFP および *PIP5K9*-YFP は細胞膜で共通の細胞内局在をしており(図 6)、重複的な機能が細胞膜で影響を及ぼしていることを示唆している。また、これらの YFP 融合タンパク質はすべて mannitol 処理により細胞膜付近で粒状に局在した(図 16)。真核生物において、 $PI(4,5)P_2$ は細胞膜での小胞の出芽過程に関与することが知られている(Milosevic *et al.*, 2005; Vicogne *et al.*, 2006)。そのため、*PIP5K7*, *PIP5K8* および *PIP5K9* は高浸透圧ストレス条件下において細胞膜付近に局在して $PI(4,5)P_2$ を産生することで小胞の出芽過程で働き膜交通を促進しているかもしれない。この予想

に基づくと、高浸透圧ストレス条件下で PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 が細胞膜で粒状に局在しているのは出芽する小胞に取り込まれた可能性が考えられる。また、これらの粒状の局在は osmotic stress-induced membrane structures (OSIMS) に似ており、OSIMS は高浸透圧ストレス処理後に一時的に現れることが報告されており、高浸透圧ストレスによる過剰な膜成分を表すと想定されている (Korver *et al.*, 2020)。しかし、OSIMS に関連するクラスリンが見つからなかったため (Korver *et al.*, 2020)、PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 の OSIMS に似た局在が以下に説明する推定の分子機構に関連しているかどうかは不明である。

高浸透圧ストレスはシロイヌナズナの根端分裂組織の細胞におけるクラスリンを介したエンドサイトーシスを促進し (Zwiewka *et al.*, 2015)、タマネギの表皮細胞の細胞膜でクラスリンと PI(4,5)P₂ の共局在を誘導し小胞の形成を増加させることが報告されている (König *et al.*, 2008)。これらの報告と一致して、mannitol 処理条件下において細胞膜の PI(4,5)P₂ が大幅に減少している *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の根端分裂組織での表皮細胞で BFA body の形成が遅延され、エンドサイトーシスの促進が抑制されていた (図 17, 18, 19)。また、PIP5K7-YFP, PIP5K8-YFP, PIP5K9-YFP および P24Y の mannitol による粒状の蛍光から (図 16, 19)、高浸透圧ストレスに応答するクラスリンを介したエンドサイトーシスにおける PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 によって産生される PI(4,5)P₂ の役割が示唆された。植物の細胞は高浸透圧ストレスに応答してエンドサイトーシスを促進し、細胞膜の過剰な膜成分を内在化させる (Baral *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019)。PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 によって産生される PI(4,5)P₂ はクラスリンを介したエンドサイトーシスを促進し、高浸透圧ストレス条件下での植物の環境適応を向上させる可能性がある。最近の研究では、PIP5K7 と PIP5K9 によって産生された PI(4,5)P₂ が根の細胞のポリアミンへの応答中に K⁺ の流出を活性化することが明らかになり、PI(4,5)P₂ が細胞膜上のイオンチャネルを直接活性化するという PI(4,5)P₂ シグナル伝達機構の別の様式が示唆されている (Zarza *et al.*, 2020)。PI(4,5)P₂ シグナル伝達のさまざまな下流の経路は環境ストレスに応答して協調的に作用すると考えられる。

まとめ

本研究において、シロイヌナズナの PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 は重複して主根の根端分裂組織における表皮細胞の細胞膜で PI(4,5)P₂ を産生し、高浸透圧ストレスにおいてエンドサイトーシスの促進を介して主根伸長を制御することで高浸透圧ストレスに応答することを解明した(図 21)。また、PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 は陸上植物で保存されているにもかかわらず、通常生育条件下での植物の正常な成長と発生に必須ではないことを明らかにした。では、なぜ PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 は通常生育条件下においても PI(4,5)P₂ を産生しているのか？私は、研究室のような栄養が豊富な環境で *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体を生育した場合は顕著な表現型を示さないが、土壌のような自然環境では *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の根の表現型は異なるかもしれないと考えている。陸上植物にとって不利な地中環境に適応することは陸上植物の成長と生存に必要な不可欠な要素である。地中環境は微視的に不均一であり、地中の浸透圧は深さや位置によって異なる。そのため、植物の根が地中を進む際には、成長する根端が浸透圧ストレスを含むさまざまな環境ストレスに次々と遭遇する。したがって、陸上植物は不利な地中環境に対して根の適応を促進する精巧な分子機構を備えており、PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 が根端分裂組織で作用するような分子機構に寄与している可能性がある。植物の根が地中環境を進む際、PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 が常に PI(4,5)P₂ を産生することによって異なる浸透圧ストレスに即座に応答できるよう備えているのかもしれない。また、PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 はそれらが発現している他の組織においても環境ストレスに対する応答に関与している可能性がある。PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 の生物学的機能の全体的な特徴を解明するにはそれらの単一変異体および多重変異体でのさまざまな環境ストレスの影響を解析する必要がある。

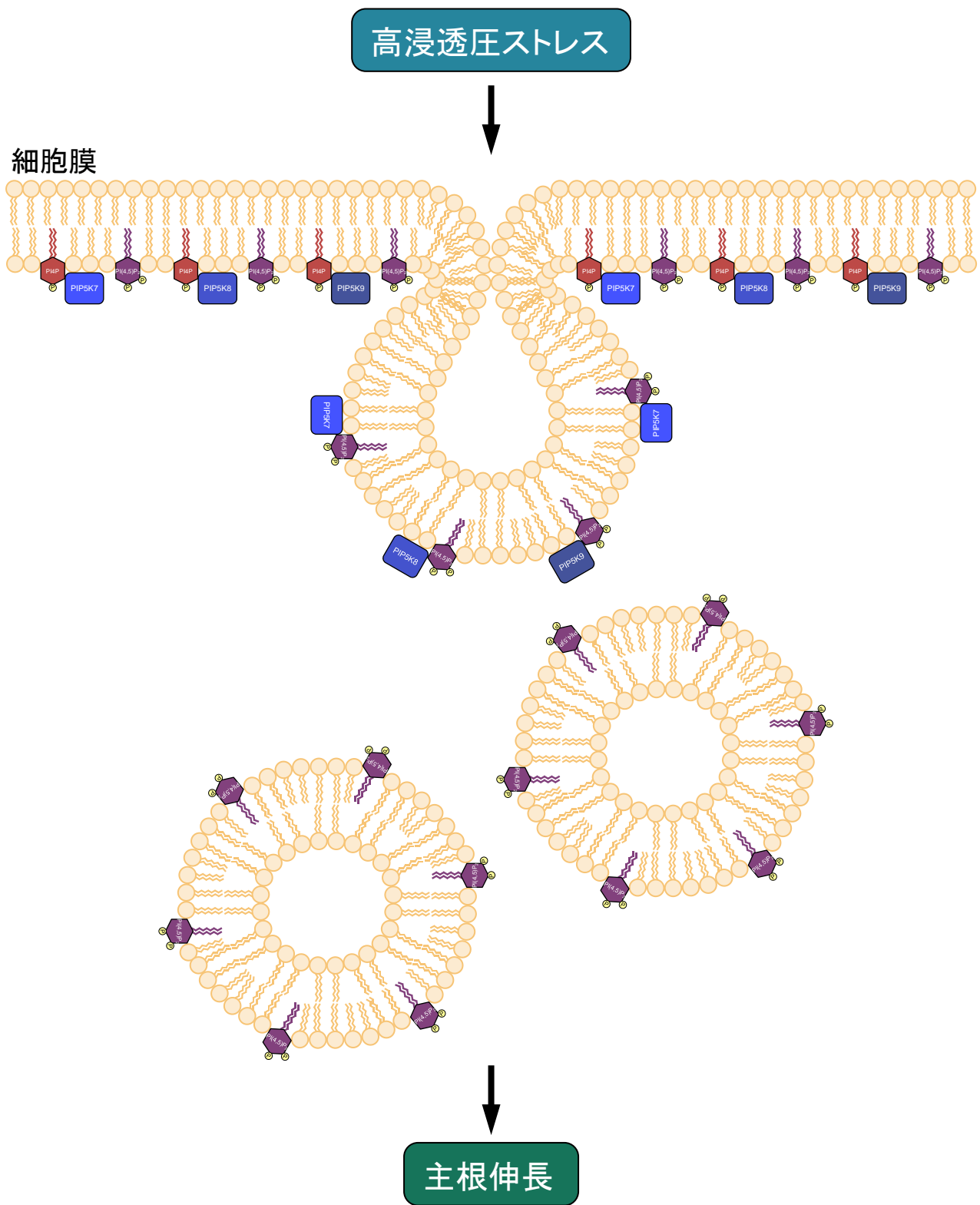


図21. 高浸透圧ストレスにおけるPIP5K7,PIP5K8およびPIP5K9の役割

PIP5K7,PIP5K8およびPIP5K9は重複して根端分裂組織における細胞膜でPI(4,5)P₂を産生し、高浸透圧ストレスにおいてエンドサイトーシスの促進を介して主根伸長を制御することで高浸透圧ストレスに応答する。これは陸上植物における根の地中環境適応に意義を示すと考えられる。

材料と方法

植物の生育条件と材料

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の Ecotype Columbia-0 を野生型(wild type; WT)として使用した。植物の生育については、種子を 70%エタノールにより 5 分間表面殺菌した後、滅菌液(5%ブリーチ-1%SDS)で 5 分間転倒混和して滅菌した。その後、滅菌水を用いて 3 回洗浄した。種子滅菌後、4°C暗条件にて 2 日間春化处理を行った。その後、1/2 Murashige and Skoog (MS) 寒天培地 [1% Agar (伊那食品工業)] (Murashige and Skoog, 1962) に無菌的に播種した。播種後は 22°C 全日条件下で生育した。高浸透圧ストレス条件下での生育として、垂直に立てた 1/2MS 寒天培地で発芽後 4 日間生育した幼苗を 300mM mannitol または 100mM NaCl が含まれた新しい 1/2MS 寒天培地に置きかえさらに 7 日間生育した。control では 1/2MS 寒天培地から新しい 1/2MS 寒天培地に置きかえた。その後、写真を撮影し ImageJ を用いて主根の長さの測定を行った。PIP5K7, PIP5K8 および PIP5K9 それぞれに T-DNA またはトランスポゾンの挿入が予想される変異体の種子 SALK_151429(*pip5k7-1*)、SALK_107796(*pip5k7-3*)、SAIL_630_B03(*pip5k8-1*)、SALK_040023(*pip5k8-3*)、SAIL_561_F09(*pip5k8-4*)、WiscDsLox434B6(*pip5k9-1*)、SM_3_39157(*pip5k9a*)を ABRC から取得した。T-DNA またはトランスポゾンの挿入が予想される領域を挟むようにそれぞれプライマーを設計し、PCR によってホモ接合体を選抜した。それぞれの変異体に用いたプライマーセットと PCR 条件を下記に示している。

1/2MS 寒天培地

ムラシゲ・スコーグ培地用混合塩類(日本製薬)	1 袋
スクロース(ナカライ)	20g
MES(同人化学)	0.5g
1000×B5 ビタミンストック	1ml
1N KOH	pH5.7 に調整

滅菌水

Total 2L

1000×B5 ビタミンストック

ミオイノシトール(ナカライ)	10g
チアミン塩酸塩 (和光純薬工業)	1g
ピリドキシン塩酸塩(ナカライ)	0.1g
ニコチン酸(ナカライ)	0.1g

滅菌水

Total 100ml

目的	プライマーの配列
<i>pip5k7-1</i> の T-DNA の検出	Fw 5' - GGTACGCTTTGTAGTCATGG -3' Rv 5' - GTATCCGCTTGAAACACTGG -3' LB 5' - TGGACCGCTTGCTGCAACT -3' RB 5' - GGTTCTGTCAGTTCCAAACG -3'
<i>pip5k7-3</i> の T-DNA の検出	Fw 5' - CGCTTACAATCTCTTGGAGC -3' Rv 5' - CTGACACCACGTCTTGTATC -3' LB 5' - TGGACCGCTTGCTGCAACT -3'
<i>pip5k8-1</i> の T-DNA の検出	Fw 5' - TGTTGCCTAGGTACTATGAAC -3' Rv 5' - CTGCCATGTGGGAAACAAAG -3' LB 5' - ACGCCATTTTCGCCTTTTCAG -3' RB 5' - GAGCTTGGATCAGATTGTCG -3'
<i>pip5k8-3</i> の T-DNA の検出	Fw 5' - TGTGCTTCTCTGACAGGTAC -3' Rv 5' - CAACCGAACCAACTATCAC -3' LB 5' - TGGACCGCTTGCTGCAACT -3' RB 5' - GGTTCTGTCAGTTCCAAACG -3'
<i>pip5k8-4</i> の T-DNA の検出	Fw 5' - AACCTCCAACCTCGGTATCAG -3' Rv 5' - GCAGCTTGGTTTAGTCATATC -3' LB 5' - ACGCCATTTTCGCCTTTTCAG -3' RB 5' - GAGCTTGGATCAGATTGTCG -3'
<i>pip5k9-1</i> の T-DNA の検出	Fw 5' - ATCGAGCTCCACAGCACTTA -3' Rv 5' - CTCTGTA CTCAATTCTCTGTC -3' LB 5' - CGTCCGCAATGTGTTATTAAG -3'
<i>pip5k9a</i> のトランスポゾンの検出	Fw 5' - TCGCAGGATGATCGGTTTCAT -3' Rv 5' - GCCAAGAAGTCTCCAAGAAG -3' Spm32 5' - AAGAGCGTCCATTTTAGAGTG -3'

PCR 反応液

DNA template (<100ng)	1 μ l
10 μ M Primer 1	0.5 μ l
10 μ M Primer 2	0.5 μ l
2.5mM dNTPs	0.8 μ l
10 \times Standard Buffer	1 μ l
Taq DNA polymerase (BioAcademia)	0.05 μ l

滅菌水

Total	10 μ l
-------	------------

PCR サイクル

94°C 2:00

↓

94°C 0:15

↓

60°C 0:30

↓

72°C 1:00

↓

72°C 3:00

↓

25°C ∞

40 サイクル

導入遺伝子の作製と形質転換植物

The Arabidopsis Information Resource(TAIR)とリンクしている Sequence Viewer を用いて各遺伝子のゲノミック DNA 配列を入手した。GUS レポーター遺伝子の作製については、*PIP5K7*,*PIP5K8* および *PIP5K9* それぞれの開始コドンの上流にある遺伝子間配列 3491-bp,7509-bp および 3497-bp を含む DNA フラグメントを野生型のシロイヌナズナのゲノミック DNA を鋳型に PCR によって増幅した。PCR には KOD-Plus-を用いた。電気泳動により目的のバンドを確認後、アガロースゲルから切り出し、増幅 DNA フラグメントを精製した。それぞれの PCR フラグメントは pEYFP(Clontech, Mountain View, CA, USA)の Sse8387I サイトと SmaI サイトの間に導入した。作製したプラスミドは Inoue 法により大腸菌 DH5 α 株に形質転換し、YT 培地[1.5% Bacto Agar (BD)]で生育した。クローニングした DNA フラグメントをそれぞれ pBI121(Clontech, Mountain View, CA, USA)の Sse8387I サイトと SmaI サイトの間に移行し、*PIP5K7p-GUS*,*PIP5K8p-GUS* および *PIP5K9p-GUS* を構築した。YFP 融合遺伝子の作製については、*PIP5K7* および *PIP5K8* の開始コドンから終止コドンまでの 4018-bp および 4044-bp を含むゲノミック DNA フラグメントと *PIP5K9* の開始コドンから終止コドンまでの 2488-bp を含む cDNA フラグメントをそれぞれ PCR によって増幅した。それぞれの PCR フラグメントは *PIP5K7*,*PIP5K8* および *PIP5K9* の開始コドンの上流にある遺伝子間配列を含んでいる pEYFP の *PIP5K7* および *PIP5K8* は XhoI サイトと AgeI サイトの間、*PIP5K9* は SmaI サイトと AgeI サイトの間に導入した。そのため、PIP5K のコード配列は YFP のコード配列とインフレーム様式で融合されている。作製した YFP 融合遺伝子の DNA フラグメントはそれぞれ *PIP5K7* および *PIP5K8* は pHPT121(Kusano *et al.*, 2008)、*PIP5K9* は pBI121 の Sse8387I サイトと SacI サイトの間に移行し、*PIP5K7g-YFP*,*PIP5K8g-YFP* および *PIP5K9p-PIP5K9-YFP* を構築した。作製したコンストラクトはエレクトロポレーション法(Dower, 1990)により *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株に導入し、YEB 培地 [1.5% Bacto Agar (BD)]で生育した。得られた形質転換アグロバクテリウムを用いて、減圧浸潤法(Clough and Bent, 1998)により野生型のシロイヌナズナへ導入した。得られた形質転換植物 T1 世代の種子を *PIP5K7p-GUS*,*PIP5K8p-GUS*,*PIP5K9p-GUS* および *PIP5K9p-PIP5K9-YFP* は 30 μ g/ml Kanamycin(ナカライテスク)、*PIP5K7g-YFP*

および *PIP5K8g-YFP* は 30 μ g/ml Hygromycin B Gold(InvivoGen)を含む選択培地に播種し、形質転換に用いたプラスミド由来の薬剤耐性遺伝子を有する植物を選抜した。得られた植物体を自家受粉させて得られた T2 世代の種子を選択培地に 64 粒ずつ播種し、約 2 週間観察して薬剤耐性を持つ個体数と薬剤感受性を持つ個体数の比率が約 3:1 となるラインをゲノムの一ヶ所に遺伝子挿入が起きた形質転換植物体であると判断した。薬剤耐性を持つ個体を自家受粉させて T3 世代の種子を得た。この T3 世代の種子を再び選択培地に 64 粒ずつ播種して約 2 週間観察し、全ての個体が薬剤耐性を持つラインを導入遺伝子のホモ接合体であると判断し解析に使用した。導入遺伝子の作製に使用したプライマーセット、PCR 条件、ジャンクションの配列を下記に示している。

コンストラクト プライマーの配列

PIP5K7p-GUS Fw 5' - GGCCTGCAGGTGTTTTTCGAGCTAACCGA -3'

Rv 5' - CCCCCCGGGCTGGGATTAGCTTTTGGTGAT -3'

PIP5K8p-GUS Fw 5' - GGCCTGCAGGCCACTTGTGATCTCTTCTC -3'

Rv 5' - GGGCCCCGGGTCTTCAACTCAGATCTTCATA -3'

PIP5K9p-GUS Fw 5' - CCCCTGCAGGCGAAATTTCCACCTTTTGAGAAGACCTCCC -3'

Rv 5' - CCCCCCGGGTAAATCTCCAAAGAAGCTAAAGCAGAAACGCTC -3'

PIP5K7g-YFP Fw 5' - AATCTGATCCTGGACGGTGT -3'

Rv 5' - GGGACCGGTGCCCTTTCTTCTGGGAACACC -3'

PIP5K8g-YFP Fw 5' - TGCTGTCGGTTCTTCACATC -3'

Rv 5' - GGGACCGGTGCTGCTTTTTCTGGGAATACC -3'

PIP5K9-YFP Fw 5' - CCCCCCGGGCATGTCTGGCCTTGACGTACGAGGAGC -3'

Rv 5' - CCCACCGGTGATTTGTTGTTCTGTGGAAATACTTTCTTG -3'

PCR 反応液

DNA template (1~50ng)	1 μ l
10 μ M Fw Primer	1.5 μ l
10 μ M Rv Primer	1.5 μ l
25mM MgSO ₄	2 μ l
2mM dNTPs	5 μ l
10×PCR Buffer	5 μ l
KOD-Plus-(TOYOBO)	1 μ l

滅菌水

Total	50 μ l
-------	------------

PCR サイクル

94°C 2:00	
↓	
94°C 0:15	30 サイクル
↓	
60°C 0:30	
↓	
68°C 1:00/kb	
↓	
68°C 12:00	
↓	
25°C ∞	

コンストラクト ジャンクションの配列

PIP5K7p-GUS 5' - TGCCTGCAGGTGTTTTTTCG -3' (*PIP5K7p*の上流ジャンクション)
5' - CTAATCCCAGCCCGGGTGGT -3' (*PIP5K7p*の下流ジャンクション)

PIP5K8p-GUS 5' - TGCCTGCAGGCCACTTGTGA -3' (*PIP5K8p*の上流ジャンクション)
5' - GAGTTGAAGACCCGGGTGGT -3' (*PIP5K8p*の下流ジャンクション)

PIP5K9p-GUS 5' - TGCCTGCAGGCGAAATTTCC -3' (*PIP5K9p*の上流ジャンクション)
5' - TGGAGATTTACCCCGGGTGGT -3' (*PIP5K9p*の下流ジャンクション)

PIP5K7g-YFP 5' - TGCCTGCAGGTGTTTTTTCG -3' (*PIP5K7p*の上流ジャンクション)
5' - AGAAGAAAGGGCACCGGTTCG -3' (*PIP5K7*と *YFP*のジャンクション)
5' - TAAAGCGGCCCTCGAATTTC -3' (*YFP*の下流ジャンクション)

PIP5K8g-YFP 5' - TGCCTGCAGGCCACTTGTGA -3' (*PIP5K8p*の上流ジャンクション)
5' - AGAAAAAGCAGCACCGGTTCG -3' (*PIP5K8*と *YFP*のジャンクション)
5' - TAAAGCGGCCCTCGAATTTC -3' (*YFP*の下流ジャンクション)

PIP5K9-YFP 5' - TGCCTGCAGGCGAAATTTCC -3' (*PIP5K9p*の上流ジャンクション)
5' - AGATTTACCCGGGCATGTCT -3' (*PIP5K9p*と *PIP5K9*のジャンクション)
5' - CAACAAATCACCGGTTCGCCA -3' (*PIP5K9*と *YFP*のジャンクション)
5' - AAATAATAGGCTCTCGAATTTC -3' (*YFP*の下流ジャンクション)

下線はベクターの配列を示している。

YT 培地

Bacto Yeast Extract	5g
Bacto Tryptone	10g
NaCl	10g
5N NaOH	pH7.0 に調整

滅菌水

Total 1L

YEB 培地

Bacto Yeast Extract	1g
Bacto Beef Extract	5g
Peptone	5g
Sucrose	5g
1M MgSO ₄ (滅菌後に加える)	2ml

滅菌水

Total 1L

GUS 染色

GUS 染色は以前谷口らによって行われた方法を基に行った(Taniguchi *et al.*, 2010)。植物の幼苗や花を氷冷した 90%アセトンに 30 分間氷上で浸した。100mM sodium phosphate buffer (pH7.0)で二度洗った後、GUS 反応液に浸け 30 分間減圧処理した。その後、37°Cで1~24 時間緩やかに振盪した。反応停止のために 70%エタノールで数回洗い、その後観察した。調製した GUS 反応液の組成を下記に示している。

GUS 反応液の組成

100mM sodium phosphate buffer (pH7.0) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

10mM EDTA-Na

0.1% (w/v) Triton X-100

0.5mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

0.5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$

20% (v/v) methanol

2mM X-Gluc: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide

共焦点レーザー走査顕微鏡

蛍光画像は confocal laser-scanning unit (CSU-X1, Yokogawa, Tokyo, Japan)を設置した顕微鏡(Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を使用して撮影した。GFP と YFP には 488nm、FM4-64[*N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(8-(4-(diethyl-amino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)には 561nm の励起光を使用した。それぞれ GFP には 505-550nm、YFP には 520-555nm、FM4-64 には 580-630nm の検出バンドを使用した。蛍光画像は ImageJ を用いて解析した。化合物処理条件下の観察については、垂直に立てた 1/2MS 寒天培地で発芽後 6 日間生育した幼苗を化合物(2 μ M FM4-64、25 μ M BFA、75 または 300mM mannitol)の有無が異なる 1/2MS 液体培地に浸した。FM4-64 で染色された粒状の蛍光の定量化を行うため、ImageJ の Find Maxima プロセスを使用し 15.0 のプロミネンスパラメーターで YFP と FM4-64 の画像に粒状の蛍光の位置をマークした。YFP と FM4-64 の両方の画像に現れ、対応する位置が 0.5 μ m 以内にマージした粒状の蛍光をカウントした。BFA body 形成の定量化の方法は以前加藤らが行ったように (Kato *et al.*, 2019)、ImageJ を使用して蛍光画像の蛍光強度レベルを 0 から 255 までの間で 100 を閾値強度として設定することによって概略化し、主軸の長さが 2.0 μ m を超える BFA body を各細胞においてカウントした。P24Y の粒状の蛍光は ImageJ の Find Maxima プロセスを使用し 15.0 のプロミネンスパラメーターでカウントした。

定量的リアルタイム RT-PCR

total RNA の抽出は、発芽後 6 日間の幼苗を液体窒素で凍結させ、1.5ml のエッペン
ドルフチューブにサンプルと直径 3mm のステンレス製ビーズ 3 粒を入れビーズ細胞破
砕装置 Shake_Master NEO(バイオメディカルサイエンス)にセットして 1000rpm で 1 分
間破碎した後、ISOGEN(Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて付属のマニュアルに従
って行った。抽出した 2 μ g の total RNA から SuperScript III First-Strand Synthesis
System for RT-PCR(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)と付属の Oligo dT
primer を用いてマニュアルに従い cDNA を合成した。合成した cDNA は
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて定量的リアルタイム
RT-PCR に使用した。発現量の比較は $\Delta \Delta$ Ct 法を用いて行った。*Actin 2*(*ACT2*)を
internal control として相対定量を行った。リアルタイム RT-PCR の用いたプライマーセ
ットと PCR 条件は下記に示している。

目的	プライマーの配列
<i>PIP5K7</i> の5'末端の転写産物の検出	Fw 5'- GGATATGAGGTCTGGAGATAG -3' Rv 5'- GTTCCATCTGACCATGCATAC -3'
<i>PIP5K7</i> の3'末端の転写産物の検出	Fw 5'- TGGTTGTGTACATGGGAATCA -3' Rv 5'- AGTAGAAGGTTTCGGTCACAG -3'
<i>pip5k7-1</i> の挿入領域の転写産物の検出	Fw 5'- TATGGACAAGCTGTTACGGG -3' Rv 5'- TGTAGTCAATGATGTTTCAGCG -3'
<i>pip5k7-3</i> の挿入領域の転写産物の検出	Fw 5'- CAAGGCTGCGGGTACAATTA -3' Rv 5'- TGATTCCCATGTACACAACCA -3'
<i>PIP5K8</i> の5'末端の転写産物の検出	Fw 5'- CCTGCAGAGAGAGTATTCTC -3' Rv 5'- CCCTCATAAATGATACCATCAGG -3'
<i>PIP5K8</i> の3'末端の転写産物の検出	Fw 5'- TAGTGTTGGTTCGGTTGACG -3' Rv 5'- TGCTTCCTCTGATGTGAGGA -3'
<i>pip5k8-1</i> の挿入領域の転写産物の検出	Fw 5'- ATATGGACAAGCTGCTGCCA -3' Rv 5'- GACATTTTCATTGGGAGGCTC -3'
<i>pip5k8-3</i> の挿入領域の転写産物の検出	Fw 5'- GCTTTGTGGTCATGGGGAAT -3' Rv 5'- TCGCAGCAGCTTGTCATAT -3'
<i>pip5k8-4</i> の挿入領域の転写産物の検出	Fw 5'- GCTTGTGTGAGCTTTCTAGG -3' Rv 5'- TCTGGCTCTTTCACTAAAGTC -3'
<i>PIP5K9</i> の5'末端の転写産物の検出	Fw 5'- GGAGCAGTTTCTTTTGCTGAAAG -3' Rv 5'- CTAGCATCCTCAGAAGTTTCG -3'
<i>PIP5K9</i> の3'末端の転写産物の検出	Fw 5'- GAGTACAACATGACCAAGAAG -3' Rv 5'- GAATGTTGGATCAACGGCTG -3'

<i>pip5k9-1</i> の挿入領域の転写産物の検出	Fw 5' - ATCAGAGGCAGCAGATTACG -3' Rv 5' - ACTCCTTGCTGTATCTGCAG -3'
<i>pip5k9a</i> の挿入領域の転写産物の検出	Fw 5' - ACAGATCTAAGAATCCATCGG -3' Rv 5' - TCGTGTTCTCGTCTATCTCG -3'
<i>ACT2</i> の転写産物の検出	Fw 5' - TCCCTCAGCACATTCCAGCAGATG -3' Rv 5' - AACGATTCCTGGACCTGCCTCATC -3'

PCR 反応液

cDNA template	0.5 μ l
10 μ M Fw Primer	0.4 μ l
10 μ M Rv Primer	0.4 μ l
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix	5 μ l

滅菌水

Total	10 μ l
-------	------------

PCR サイクル

95°C 1:00

↓

95°C 0:15

↓

60°C 0:45

↓

95°C 0:15

↓

55°C 0:15

↓

95°C 0:15

40 サイクル

根端分裂組織における細胞数と長さの測定

根端分裂組織(静止中心と伸長を開始している細胞の間の領域)における細胞数と根端分裂組織の長さの測定には、垂直に立てた 1/2MS 寒天培地で発芽後 4 日間生育した幼苗を 300mM mannitol または 100mM NaCl が含まれた新しい 1/2MS 寒天培地(control では mannitol または NaCl を含まない)に置きかえ、さらに 7 日間生育し使用した。植物体の主根の根端分裂組織における細胞数と根端分裂組織の長さを測定するため、80g 抱水クロラールと 10ml グリセロール、30ml 滅菌水の混合液を用いて微分干渉顕微鏡(Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)で植物体を観察し写真を撮影した。撮影した写真上の根端分裂組織における細胞数と長さは ImageJ を使用してそれぞれの皮層細胞列において測定した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究環境を与えてくださり研究における考え方から論文執筆に至るまであらゆる場面で御指導、御鞭撻いただいた京都大学大学院理学研究科、青山卓史教授に深く感謝致します。

また、研究の方向性や表現方法など多くの場面で御助言いただいた加藤(藤原)真理子助教の温かいお心遣いに感謝致します。

そして、実験結果の解釈に関する御助言や実験操作の御指導をしていただいた島村亮太様、藤原崇志様、亘真智子様、張暎娟様に心より感謝致します。

本研究を行うにあたり、PI(4,5)P₂ マーカーのコンストラクトを供与していただいたYvon Jaillais 博士(ENS de Lyon)およびPIN2-GFP の種子を供与していただいた古谷将彦博士(Haixia Institute of Science and Technology)に感謝致します。

私が本研究を遂行可能であったのは、いつも御支援、御協力をしてくださいました青山研究室の柘植知彦准教授、安田敬子様、寺本日出美様、赤木千佳様、Haghir Shahrzad 様、後藤翔様、岸本大地様、山田鴻様、いつも温かく接してくれる同期の学友、先輩、後輩の皆様、お世話になった生物科学専攻の先生方のおかげです。この場を借りて感謝を表明させていただきたいと思います。

最後に、いつも心身ともにそばで支えてくれていた家族に心から感謝します。

参考文献

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J. et al. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653–657.

Baral, A., Shruthi, K.S., and Mathew, M.K. (2015) Vesicular trafficking and salinity responses in plants. *Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life*, **67**, 677–686.

Bauby, H., Divol, F., Truernit, E., Grandjean, O., and Palauqui, J.-C. (2007) Protophloem differentiation in early *Arabidopsis thaliana* development. *Plant Cell Physiol.* **48**, 97–109.

Cajero-Sanchez, W., Aceves-Garcia, P., Fernández-Marcos, M., Gutiérrez, C., Rosas, U., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E.R., Sánchez, M.D., and Garay-Arroyo, A. (2019) Natural root cellular variation in responses to osmotic stress in *Arabidopsis thaliana* Accessions. *Genes*. **10**, 983.

Camacho, L., Smertenko, A.P., Perez-Gomez, J., Hussey, P.J., and Moore, I. (2009) *Arabidopsis* Rab-E GTPases exhibit a novel interaction with a plasma-membrane phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J. Cell Sci.* **122**, 4383–4392.

Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743.

Colin, L.A. and Jaillais, Y. (2020) Phospholipids across scales: lipid patterns and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **53**, 1–9.

Darwish, E., Testerink, C., Khalil, M., El-Shihy, O., and Munnik, T. (2009) Phospholipid signaling in salt-stressed rice leaves. *Plant Cell Physiol.* **50**, 986–997.

DeWald, D.B., Torabinejad, J., Jones, C.A., Shope, J.C., Cangelosi, A.R., Thompson, J.E., Prestwich, G.D., and Hama, H. (2001) Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**, 759–769.

Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D.G., Mravec, J., Stierhof, Y.D., and Friml, J. (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **7**, 520–527.

Di Paolo, G. and De Camilli, P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* **443**, 651–657.

Divecha N., Truong, O., Hsuan, J.J., Hinchliffe, K.A., and Irvine, R.F. (1995) The cloning and sequence of the C isoform of PtdIns4P 5-kinase. *Biochem J.* **309**, 715–719.

Dower W.J. (1990) Electroporation of bacteria: a general approach to genetic transformation. *Genet. Eng.* **12**, 275–295.

Elge, S., Brearley, C., Xia, H.J., Kehr, J., Xue, H.W., and Mueller-Roeber, B. (2001) An *Arabidopsis* inositol phospholipid kinase strongly expressed in procambial cells: Synthesis of PtdIns(4,5)P-2 and PtdIns(3,4,5)P-3 in insect cells by 5-phosphorylation of precursors. *Plant J.* **26**, 561–571.

Geisler, M., Blakeslee, J.J., Bouchard, R., Lee, O.R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards, and E.L. (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.* **44**, 179–194.

Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jurgens, G., and Palme, K. (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*. **413**, 425–428.

Gerth, K., Lin, F., Menzel, W., Krishnamoorthy, P., Stenzel, I., Heilmann, M. and Heilmann, I. (2017) Guilt by Association: A phenotype-based view of the plant phosphoinositide network. *Annu. Rev. Plant Biol.* **68**, 349–374.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 463–499.

Heilmann, I., Perera, I.Y., Gross, W., Boss, W.F. (1999) Changes in phosphoinositide metabolism with days in culture affect signal transduction pathways in *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol.* **119**, 1331–1339.

Heilmann, I., Perera, I.Y., Gross, W., and Boss, W.F. (2001) Plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels decrease with time in culture. *Plant Physiol.* **126**, 1507–1518.

Heilmann, I. (2016) Phosphoinositide signaling in plant development. *Development*, **143**, 2044–2055.

Heilmann, M. and Heilmann, I. (2015) Plant phosphoinositides—complex networks controlling growth and adaptation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 759–769.

Hempel, F., Stenzel, I., Heilmann, M., Krishnamoorthy, P., Menzel, W., Golbik, R., Helm, S., Dobritzsch, D., Baginsky, S., Lee, J., Hoehenwarter, W., and Heilmann, I. (2017) MAPKs influence pollen tube growth by controlling the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in an apical plasma membrane domain. *Plant Cell*, **29**, 3030–3050.

Hirano, T., Konno, H., Takeda, S., Dolan, L., Kato, M., Aoyama, T., Higaki, T., Takigawa-Imamura, H., and Sato, M.H. (2018) PtdIns(3,5)P₂ mediates root hair shank hardening in *Arabidopsis*. *Nat. Plants*, **4**, 888–897.

Ischebeck, T., Stenzel, I., and Heilmann, I. (2008) Type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases mediate *Arabidopsis* and *Nicotiana tabacum* pollen tube growth by regulating apical pectin secretion. *Plant Cell*, **20**, 3312–3330.

Ischebeck, T., Stenzel, I., Hempel, F., Jin, X., Mosblech, A., and Heilmann, I. (2011) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate influences Nt-Rac5-mediated cell expansion in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* **65**, 453–468.

Ischebeck, T., Werner, S., Krishnamoorthy, P., Lerche, J., Meijón, M., Stenzel, I., Löffke, C., Wiessner, T., Im, Y.J., Perera, I.Y., Iven, T., Feussner, I., Busch, W., Boss, W.F., Teichmann, T., Hause, B., Persson, S., and Heilmann, I. (2013) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate influences PIN polarization by controlling clathrin-mediated membrane trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **25**, 4894–4911.

Jiang, K., Moe-Lange, J., Hennen, L., and Feldman, L.J. (2016) Salt stress affects the redox status of *Arabidopsis* root meristems. *Front Plant Sci.* **7**, 81.

Kato, M., Tsuge, T., Maeshima, M., and Aoyama, T. (2019) Arabidopsis PCaP2 modulates the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signal on the plasma membrane and attenuates root hair elongation. *Plant J.* **99**, 610–625.

Kolay, S., Basu, U., and Raghu, P. (2016) Control of diverse subcellular processes by a single multi-functional lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P₂]. *Biochem. J.* **473**, 1681–1692.

König, S., Mosblech, A., and Heilmann, I. (2007) Stress-inducible and constitutive phosphoinositide pools have distinctive fatty acid patterns in *Arabidopsis thaliana*. *FASEB J.* **21**, 1958–1967.

König, S., Ischebeck, T., Lerche, J., Stenzel, I., and Heilmann, I. (2008) Salt-stress-induced association of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. *Biochem. J.* **415**, 387–399.

Korver, R.A., van den Berg, T., Meyer, A.J., Galvan-Ampudia, C.S., ten Tusscher, K.H.W.J., and Testerink, C. (2020) Holotropism requires phosphoripase D ζ 1-mediated modulation of cellular polarity of auxin transport carriers. *Plant Cell Environ.* **43**, 143–158.

Krauss, M. and Haucke, V. (2007a) Phosphoinositides: Regulators of membrane traffic and protein function. *FEBS Lett.* **581**, 2105–2111.

Krauss, M. and Haucke, V. (2007b) Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between membrane traffic and cell signaling. *EMBO Rep.* **8**, 241–246.

Kusano, H., Testerink, C., Vermeer, J.E., Tsuge, T., Shimada, H., Oka, A., Munnik, T., and Aoyama, T. (2008) The *Arabidopsis* Phosphatidylinositol Phosphate 5-Kinase PIP5K3 is a key regulator of root hair tip growth. *Plant Cell*, **20**, 367–380.

Lee, Y., Kim, Y.W., Jeon, B.W., Park, K.Y., Suh, S.J., Seo, J., Kwak, J.M., Martinoia, E., Hwang, I., and Lee, Y. (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is important for stomatal opening. *Plant J.* **52**, 803–816.

Lin, W.H., Ye, R., Ma, H., Xu, Z.H., and Xue, H.W. (2004) DNA chip-based expression profile analysis indicates involvement of the phosphatidylinositol signaling pathway in multiple plant responses to hormone and abiotic treatments. *Cell Res.* **14**, 34–45.

Liu, W., Li, R.J., Han, T.T., Cai, W., Fu, Z.W., and Lu Y.T. (2015) Salt stress reduces root meristem size by nitric oxide-mediated modulation of auxin accumulation and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **168**, 343–356.

Loijens, J.C., Boronenkov, I.V., Parker, G.J., and Anderson, R.A. (1996) The Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase family. *Adv. Enzyme Regul.* **36**, 115–140.

Lou, Y., Gou, J.Y., and Xue, H.W. (2007) PIP5K9, an *Arabidopsis* phosphatidylinositol monophosphate kinase, interacts with a cytosolic invertase to negatively regulate sugar-mediated root growth. *Plant Cell*, **19**, 163–181.

Marhava, P., Aliaga Fandino, A.C., Koh, S.W.H., Jelínková, A., Kolb, M., Janacek, D.P., Breda, A.S., Cattaneo, P., Hammes, U.Z., Petrášek, J., and Hardtke, C.S. (2020) Plasma membrane domain patterning and self-reinforcing polarity in *Arabidopsis*. *Dev. Cell*, **52**, 223–235.e5.

Mei, Y., Jia, W.J., Chu, Y.J., and Xue, H.W. (2012) *Arabidopsis* phosphatidylinositol monophosphate 5-kinase 2 is involved in root gravitropism through regulation of polar auxin transport by affecting the cycling of PIN proteins. *Cell Res.* **22**, 581–597.

Menzel, W., Stenzel, I., Helbig, L.M., Krishnamoorthy, P., Neumann, S., Eschen-Lippold, L., Heilmann, M., Lee, J., and Heilmann, I. (2019) A PAMP-triggered MAPK cascade inhibits phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate production by PIP5K6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **224**, 833–847.

Michell, R.H. (2008) Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 151–161.

Mikami, K., Katagiri, T., Iuchi, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998) A gene encoding phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase is induced by water stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **15**, 563–568.

Milosevic, I., Sorensen, J.B., Lang, T., Krauss, M., Nagy, G., Haucke, V., Jahn, R., and Neher, E. (2005) Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J. Neurosci.* **25**, 2557–2565.

Mishkind, M., Vermeer, J.E.M., Darwish, E., and Munnik, T. (2009) Heat stress activates phospholipase D and triggers PIP₂ accumulation at the plasma membrane and nucleus. *Plant J.* **60**, 10–21.

Morales, J.A., Gonzalez-Kantun, W.A., Rodriguez-Zapata, L.C., Ramón-Ugalde, J., and Casteno, E. (2019) The effect of plant stress on phosphoinositides. *Cell Biochem. Funct.* **37**, 553–559.

Mueller-Roeber, B. and Pical, C. (2002) Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol.* **130**, 22–46.

Muller, A., Guan, C.H., Galweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., and Palme, K. (1998) AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J.* **17**, 6903–6911.

Munnik, T. and Nielsen, E. (2011) Green light for polyphosphoinositide signals in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 489–497.

Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 651–681.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.

Oude Weernink, P.A., Schmidt, M., and Jakobs, K.H. (2004) Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 87–99.

Pical, C., Westergren, T., Dove, S.K., Larsson, C., and Sommarin, M. (1999) Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 38232–38240.

Qin, L., Zhou, Z., Li, Q., Zhai, C., Liu, L., Quilichini, T.D., Gao, P., Kessler, S.A., Jaillais, Y., Datla, R., Peng, G., Xiang, D., and Wei, Y. (2020) Specific Recruitment of Phosphoinositide Species to the Plant-Pathogen Interfacial Membrane Underlies Arabidopsis Susceptibility to Fungal Infection. *Plant Cell*, **32**, 1665–1688.

Rameh, L.E., Tolias, K.F., Duckworth, B.C., and Cantley, L.C. (1997) A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*, **390**, 192–196.

Simon, M.L., Platre, M.P., Assil, S., van Wijk, R., Chen, W.Y., Chory, J., Dreux, M., Munnik, T., and Jaillais, Y. (2014) A multi-colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in Arabidopsis. *Plant J.* **77**, 322–337.

Sousa, E., Kost, B., and Malhó, R. (2008) *Arabidopsis* phosphatidylinositol-4-monophosphate 5-kinase 4 regulates pollen tube growth and polarity by modulating membrane recycling. *Plant Cell*, **20**, 3050–3064.

Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Galweiler, L., Palme, K., and Jurgens, G. (1999) Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*, **286**, 316–318.

Stenzel, I., Ischebeck, T., König, S., Holubowska, A., Sporysz, M., Hause, B., and Heilmann, I. (2008) The type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 3 is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **20**, 124–141.

Stenzel, I., Ischebeck, T., Quint, M., and Heilmann, I. (2012) Variable regions of PI4P 5-kinases direct PtdIns(4,5)P₂ toward alternative regulatory functions in tobacco pollen tubes. *Front. Plant Sci.* **2**, 114.

Sun, Y., Thapa, N., Hedman, A.C., and Anderson, R.A. (2013) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate: target production and signaling. *Bioessays*, **35**, 513–522.

Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Lino, M., and Kangawa, K. (2000) Junctophilins: A novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol. Cell*, **6**, 11–22.

Taniguchi, Y.Y., Taniguchi, M., Tsuge, T., Oka, A., and Aoyama, T. (2010) Involvement of *Arabidopsis thaliana* phospholipase D ζ 2 in root hydrotropism through the suppression of root gravitropism. *Planta*, **231**, 491–497.

Tejos, R., Sauer, M., Vanneste, S., Palacios-Gomez, M., Li, H., Heilmann, M., van Wijk, R., Vermeer, J.E., Heilmann, I., Munnik, T., and Friml, J. (2014) Bipolar Plasma Membrane Distribution of Phosphoinositides and Their Requirement for Auxin-Mediated Cell Polarity and Patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **26**, 2114–2128.

van den Bout, I. and Divecha, N. (2009) PIP5K-driven PtdIns(4,5) P_2 synthesis: regulation and cellular functions. *Journal of Cell Science*, **122**, 3837–3850.

van Leeuwen, W., Vermeer, J.E., Gadella, T.W Jr., and Munnik, T. (2007) Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* **52**, 1014–1026.

Vicogne, J., Vollenweider, D., Smith, J.R., Huang, P., Frohman, M.A., and Pessin, J.E. (2006) Asymmetric phospholipid distribution drives in vitro reconstituted SNARE-dependent membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 14761–14766.

Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P.B., and Friml, J. (2007) Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.* **12**, 160–168.

Wada, Y., Kusano, H., Tsuge, T., and Aoyama, T. (2015) Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase genes respond to phosphate deficiency for root hair elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **81**, 426–437.

West, G., Inze, D., and Beemster, GTS. (2004) Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiol.* **135**, 1050–1058.

Woody, S.T., Austin-Phillips, S., Amasino, R.M., and Krysan, P.J. (2007) The WiscDsLox T-DNA collection: an arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *J. Plant Res.* **120**, 157–165.

Zarza, X., Van Wijk, R., Shabala, L., Hunkeler, A., Lefebvre, M., Rodriguez-Villalón, A., Shabala, S., Tiburcio, A.F., Heilmann, I., and Munnik, T. (2020) Lipid kinases PIP5K7 and PIP5K9 are required for polyamine-triggered K⁺ channel efflux in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* doi: 10.1111/tpj.14932.

Zhang, L., Xing, J., and Lin, J. (2019) At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *New Phytol.* **224**, 1479–1489.

Zhang, Z., Li, Y., Huang, K., Xu, W., Zhang, C., and Yuan, H. (2020) Genome-wide systematic characterization and expression analysis of the phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases in plants. *Gene*, **144915**,1–10.

Zhao, Y., Yan, A., Feijó, J.A., Furutani, M., Takenawa, T., Hwang, I., Fu, Y., and Yang, Z. (2010) Phosphoinositides regulate clathrin-dependent endocytosis at the tip of pollen tubes in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell*, **22**, 4031–4044.

Zwiewka, M., Nodzyński, T., Robert, S., Vanneste, S., and Friml, J. (2015) Osmotic stress modulates the balance between exocytosis and Ccathrin-mediated endocytosis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*. **8**, 1175–1187.