

博士論文

植物免疫制御因子による根毛形成とリン枯渇応答の制御

岡田 健太郎
奈良先端科学技術大学院大学
先端科学技術研究科
バイオサイエンスプログラム

主指導教員：西條 雄介 教授
植物免疫学研究室 (バイオサイエンス領域)

令和 3 年 1 月 18 日提出

目次

要旨	4
第1章 シロイヌナズナのダメージ誘導性 Pep ペプチドによる根毛形成と防御応答の 制御	6
1-1 序論	7
1-1-1 パターン誘導性免疫	7
1-1-2 根における Pep 応答	8
1-1-3 根毛細胞の分化機構	8
1-1-4 本章の概要	9
1-2 材料と方法	13
1-2-1 植物材料と栽培方法	13
1-2-2 細胞タイプ特異的に PEPR2 が発現する形質転換植物体の作製	13
1-2-3 根毛密度の測定	13
1-2-4 主根長の測定	14
1-2-5 マーカー遺伝子の発現部位と根毛形成部位の観察	14
1-2-6 RNA 抽出及び qRT-PCR 解析	14
1-3 結果	20
1-3-1 Pep1 ペプチドは根毛形成を誘導する	20
1-3-2 Pep1 誘導性の根毛形成は PEPR2、BAK1、BKK1、BIK1 および PBL1 に 依存する	20
1-3-3 Pep1 誘導性の根毛形成はエチレン、オーキシンを必要とする	21
1-3-4 Pep1 は中心柱・根端分裂組織で PEPR2 の発現を誘導する	21
1-3-5 PEPR2 発現を根毛に限定すると、Pep1 による防御応答が主根伸長の抑制 無しに誘導できる	22
1-4 考察	35
1-4-1 Pep1 誘導性の根毛の役割	36
1-4-2 Pep1 誘導性の根毛形成と主根の伸長抑制の制御	36
1-4-3 PEPR2 による根毛形成と主根の伸長抑制の細胞非自律的制御	37
1-4-4 免疫応答の空間的制御	37

1-4-5 第1章のまとめ	39
第2章 シロイヌナズナのカロース合成酵素 PMR4 によるリン枯渇環境への適応...	42
2-1 序論.....	43
2-1-1 リン枯渇環境.....	43
2-1-2 植物のリン枯渇応答.....	43
2-1-3 カロース蓄積の役割と蓄積制御	44
2-1-4 病原菌感染時のカロース合成酵素 PMR4 (GSL5) の役割.....	45
2-1-5 本章の概要.....	46
2-2. 材料と方法	49
2-2-1 植物材料と栽培方法.....	49
2-2-2 カロース蓄積の観察.....	49
2-2-3 根毛密度の測定	49
2-2-4 主根長並びに根系面積の測定	49
2-2-5 アントシアニン蓄積量の測定	50
2-2-6 無機態リン酸濃度の測定.....	50
2-3 結果.....	53
2-3-1 PMR4 (GSL5) は根毛でのリン枯渇誘導性のカロース蓄積に必要である	53
2-3-2 PMR4 はリン枯渇環境で根の形態変化に寄与する	54
2-3-3 PMR4 はアントシアニンの蓄積を抑制し SA 依存的に生育の保持に寄与す る.....	55
2-3-4 PMR4 はリン枯渇環境における地上部の Pi 濃度の保持に寄与する	55
2-4 考察.....	66
2-4-1 PMR4 によるカロースの蓄積.....	66
2-4-2 PMR4 による地上部の Pi 濃度の保持.....	66
2-4-3 PMR4 は免疫応答とリン枯渇環境への適応に機能する.....	67
2-4-4 第2章のまとめ	68
本研究の総括.....	72
謝辞.....	74
参考文献	75

先端科学技術研究科 博士論文要旨

所属研究室 (主指導教員)	植物免疫学研究室 (西條 雄介 教授)		
		提出	令和 3年 1月 18日
氏名	岡田 健太郎		
題目	植物免疫制御因子による根毛形成とリン枯渇応答の制御 Immune regulator-mediated control of root hair formation and phosphate starvation responses in plants		
<p>第1章 シロイヌナズナのダメージ誘導性 Pep ペプチドによる根毛形成と防御応答の制御</p> <p>植物の根は生物学的また非生物学的ストレスによって傷害をうけやすく、根の形態変化や免疫を調節することは土壌環境に適応する上で重要である。しかし、両者の関係性やその調節・統合メカニズムに関する知見は乏しい。植物は傷害を受けると、細胞ダメージシグナル (damaged-associated molecular patterns : DAMPs) を発現・産出する。本研究では、植物の代表的な DAMPs である Pep1 ペプチドが根で誘導する形態変化と防御応答に着目して、免疫制御因子による根の免疫と形態変化の調節・統合メカニズムに迫ることを目的とした。</p> <p>Pep1 はパターン認識受容体の PEPR1 および PEPR2 で感知され、一連の防御応答を誘導することで植物免疫を亢進する。シロイヌナズナへの Pep1 投与は防御応答に伴う主根の伸長抑制に加えて、根毛形成を誘導する。Pep1 誘導性の根の形態変化の制御遺伝子基盤に関して、逆遺伝学的解析により、PEPR 複合体並びに根毛形成因子の役割を調べた。Pep1 誘導性の根毛形成は主根の伸長抑制と同様に、PEPR2 とその共受容体 BAK1 および BKK1、その下流でリン酸化を受ける受容体様細胞質キナーゼ BIK1 および PBL1 が必要であった。一方、根毛形成因子は Pep1 誘導性の根毛形成に必要であることが確かめられたが、主根の伸長抑制に不要であった。よって、PEPR2 による根毛形成は、主根の伸長抑制と独立に誘導され得ることが示唆された。</p> <p>Pep1 刺激の非存在下では、根の PEPR2 の発現は中心柱において強かった。根毛形成など様々な Pep1 応答を誘導する上で重要となる機能部位を明らかにするため、PEPR2 を <i>pepr1 pepr2</i> 二重変異体背景で細胞タイプ特異的に発現させて、その影響を調べた。その結果、PEPR2 を中心柱以外の組織で発現させた植物体でも、Pep1 により、根毛形成および主根の伸長抑制、防御関連遺伝子の発現は野生型植物 (野生型) と同等に誘導された。興味深いことに、分化領域の根毛細胞で特異的に PEPR2 を発現させた場合、Pep1 による根毛形成と主根の伸長抑制無しに防御関連遺伝子の発現を促進した。したがって、PEPR2 が根で防御関連や形態変化を誘導するシグナルの細胞非自律性が示唆されるとともに、少なくとも防御関連遺伝子の発現を誘導するには特定の細胞タイプで発現する必要がないことも示唆された。また、PEPR2 を分化領域の根毛細胞特異的に発現させることで、Pep1 応答に伴う成長抑制を緩和しながら防御応答を誘導できることから、Pep1 による根毛形成は防御を固めながら根系を拡張する役割を持つ可能性が考え</p>			

られた。

第2章 シロイヌナズナのカロース合成酵素 PMR4 (GSL5) によるリン枯渇環境への適応

リンは植物にとって必須多量元素であるが、利用可能な無機態リン酸 (Pi) は土壤中で限定的であり、成長の制限要因になっている。そのため、リン枯渇環境での Pi 吸収や Pi 利用の効率改善に寄与する分子機構は植物の環境適応において重要な役割を担っている。また、その解明は作物生産の安定化に向けても重要である。植物はリン枯渇環境へ適応する上で、転写因子 PHR1 および PHL1、フェロキシダーゼ LPR1 および LPR2 を介した二つの主要制御経路によって、根系の形態変化や Pi トランスポーターの活性化といったリン枯渇応答 (phosphate starvation responses: PSRs) を誘導することが知られている。加えて、リン枯渇環境では根端分裂組織にカロース (β -1,3 グルカンポリマー) の蓄積が誘導され、PSR の一つである主根の伸長抑制との間で高い相関性が報告されている。私は、同条件で根毛においてもカロース蓄積が誘導されること、さらには根毛でのカロース蓄積が PHR1・PHL1 経路並びに LPR1・LPR2 経路に依存しないことを見出した。そこで、根毛でのカロース蓄積に着目し、その生理的役割の検証とともに新規 PSR 経路の解明を進めた。

まず、カロース合成酵素の欠損変異体を用いた逆遺伝学的解析と EMS 変異体集団を用いてカロース蓄積低下変異体のスクリーニングを行った。その結果、シロイヌナズナのカロース生合成酵素遺伝子ファミリーの 12 分子種中で、免疫応答に伴うカロース生合成に働く PMR4 (GSL5) がリン枯渇時のカロース蓄積に必要であることがわかった。さらに、スクリーニングで選抜されたカロース蓄積低下変異体系統においても、PMR4 (GSL5) 配列にアミノ酸非同義置換変異が確認された。このことから、PMR4 (GSL5) は、根毛でのカロース蓄積を誘導する制御因子として同定された。

次に、リン枯渇環境での PMR4 (GSL5) 依存的なカロース蓄積の役割を明らかにするために、*pmr4* 変異体を用いて PSR に関連した表現型を解析した。*pmr4* 変異体の根系では、野生型と比較して主根の伸長が抑制された (本来、野生型では PSR に伴い主根伸長は抑制される)。また、地上部では、野生型より地上部生重量が低かった。さらに、*pmr4* 変異体の Pi 濃度を調べたところ、根では野生型と同程度である一方、地上部では野生型より顕著に低かった。このことから、PMR4 は地上部の Pi 濃度の維持に寄与する新規 PSR 制御因子であると示唆された。先行研究で、*pmr4* 変異体では病原菌感染など生物ストレス条件においてサリチル酸 (SA) シグナルが活性化されることが示されている。そこで、SA 生合成酵素 SID2 の欠損変異体背景でも調べたところ、*pmr4 sid2* 二重変異体は *sid2* 変異体と比較して、地上部生重量の差はなくなったものの、地上部における Pi 濃度の低下は維持されていた。したがって、PMR4 欠損による植物の地上部重量の低下は SA 依存的であるものの、地上部の Pi 濃度の保持は SA かつ根系面積に非依存的であることが示唆された。以上より、PMR4 は、Pi の吸収または根からの地上部への Pi の輸送を介して地上部の Pi 濃度の保持に寄与し、リン枯渇環境への適応に貢献すると考えられた。

第 1 章

シロイヌナズナのダメージ誘導性 **Pep** ペプチドによる 根毛形成と防御応答の制御

1-1 序論

1-1-1 パターン誘導性免疫

植物は病原菌に対する抵抗性を発揮するために免疫機構を発達させてきた。病原菌感染に対する初期免疫機構として、パターン認識受容体 (pattern recognition receptor: PRR) に基づいた応答がある。植物は、微生物の構成成分 (microbe-associated molecular patterns: MAMPs) や植物自身の細胞ダメージシグナル (damage-associated molecular patterns: DAMPs) を細胞膜上のPRRで認識すると、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生、MAPK (mitogen-activated protein kinase) カスケードの活性化、カロース蓄積、防御関連遺伝子の発現等の一連の防御応答を誘導する (図1-1-1; Couto & Zipfel, 2016; Saijo *et al.*, 2018)。これら一連の防御応答はパターン誘導性免疫 (pattern-triggered immunity: PTI) と呼ばれ、病原菌の感染や増殖に対する抵抗性を高める。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において最もよく研究されているDAMPsとして内生のPepペプチドが知られている (Huffaker *et al.*, 2006; Tintor *et al.*, 2013)。Pepペプチドは、前駆体であるPROPEPのC末端近傍に位置する。PROPEPペプチドの発現は病原菌感染や傷害、並びにMAMPsやDAMPsによって誘導され、細胞傷害に伴い細胞外へ放出される (Huffaker & Ryan, 2007; Yamaguchi & Huffaker, 2011; Yamada *et al.*, 2016; Hander *et al.*, 2019)。Pepは、細胞膜に存在しているleucine-rich repeat (LRR) - receptor kinase (RK) のPEPR1およびPEPR2によって認識される (Yamaguchi *et al.*, 2006; Krol *et al.*, 2010)。シロイヌナズナでは、PROPEP1-PROPEP8 (Pep1-Pep8) の8種類の分子種が同定されており、PEPR1およびPEPR2はそれぞれPep1-Pep6とPep1-Pep2を認識する (Huffaker *et al.*, 2006; Krol *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2010; Bartels *et al.*, 2013; Bartels & Boller, 2015)。PEPR1およびPEPR2はリガンドと結合すると、共受容体であるLRR-RKのBRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 (BAK1) と複合体を形成する。この複合体は、受容体様細胞質キナーゼ (receptor-like cytoplasmic receptor kinases: RLCKs) のBOTRYTIS-INDUCED KINASE 1 (BIK1) およびPBS-LIKE KINASE 1 (PBL1) のリン酸化を介して、細胞内へシグナル伝達を行う (Liu *et al.*, 2013; Yamada *et al.*, 2016)。PEPRは、BAK1の欠損時でもシグナル機能を保持しており、これはBAK1に類似する他のSERK (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE) ファミリー分子種BAK1-LIKE 1 (BKK1) 等と協働できるためであると考えられている (Roux *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2016)。PEPRによるシグナル伝達は、さらなるPROPEPの発現を誘導する自己フィードバックにより、防御応答を増強する働きがある (Liu *et al.*, 2013; Tintor *et al.*, 2013)。

代表的なMAMPとして、細菌の鞭毛構成タンパク質フラジェリンのN末端領域22アミノ酸残基のflg22エピトープがあり、LRR-RKのFLAGELLIN SENSING 2 (FLS2) によって認識される。FLS2などによるMAMPシグナル系はPROPEP2やPROPEP3の発現

を誘導し、PEPRシグナル系を活性化することで防御応答が増幅されることが示されており (Ma *et al.*, 2012; Tintor *et al.*, 2013)、効果的な病害抵抗性の発動にはMAMP-DAMP受容体のシグナル連携が鍵をにぎると考えられている (Saijo *et al.*, 2018)。実際に、これらPRRやPRRシグナル制御因子の機能欠損変異体では宿主適合型及び非適合型の病原菌の感染・増殖が増すことから、それぞれ基礎抵抗性及び非宿主抵抗性においてPTIが重要な役割を果たすことが示されている (Macho & Zipfel, 2014; Couto & Zipfel, 2016; Saijo *et al.*, 2018)。

1-1-2 根における Pep 応答

植物の根は、土壌微生物との相互作用の場である。植物は病原・共生微生物からの分泌物やこれら微生物との接触によって、主根の伸長抑制、側根形成、根毛形成といった根の形態変化を誘導する (Zamioudis *et al.*, 2013; Dovana *et al.*, 2015; Pečenková *et al.*, 2017)。しかしながら、根の形態変化が免疫制御に果たす役割については未解明な点が多い。

PROPEPの発現は幼植物や地上部で、flg22などのMAMP応答や病原菌接種によって誘導され、根においてもflg22やPep1処理によって表皮細胞や中心柱で誘導されることがわかっている (Huffaker *et al.*, 2006; 久保田 修士論文 2016; Yamada *et al.*, 2016)。根は土壌との物理的接触や微生物の侵入によってダメージを受けやすく、PROPEPの発現は往々にして誘導されうると推測される。シロイヌナズナにおいて根へのPep1ペプチドの投与はROS産生やMAPKの活性化といった防御応答を誘導し (Poncini *et al.*, 2017)、Pepシグナル系は根においても葉と同様に免疫制御の役割を担っている (Huffaker *et al.*, 2006)。さらに、Pep1投与は主根の伸長抑制に加えて根毛形成を誘導することが本研究と並行して報告されている (Krol *et al.*, 2010; 久保田 修士論文 2016; 岡田 修士論文 2018; Jing *et al.*, 2019)。しかし、根の形態変化と防御応答との関係性やその制御メカニズムについてはよくわかっていない。Pep1ペプチドにより誘導される根の免疫活性化と形態変化の意義や仕組みを紐解くことで、根の免疫制御メカニズムについて理解が深められると期待される。

1-1-3 根毛細胞の分化機構

根毛は表皮細胞の一部から筒状突起が外部へ伸長して形成される (Grierson *et al.*, 2014; Shibata & Sugimoto, 2019)。根毛形成パターンは植物種によって異なるが、モデル植物のシロイヌナズナでは、根毛形成パターンが表皮細胞とその内側にある皮層細胞との位置関係によって決定される (図 1-1-2; Dolan *et al.*, 1994; Grierson *et al.*, 2014)。2つの皮層細胞と接する表皮細胞は根毛細胞に、1つの皮層細胞と接する表皮細胞は非根毛細胞に分化する (図 1-1-2; Dolan *et al.*, 1994)。非根毛細胞では、非根毛細胞への分化運命を決定する MYB 転写因子 WEREWOLF (WER)、bHLH 転写因子 GLABRA

3 (GL3) および ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3)、WD-40 リピートタンパク質の TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1) からなる複合体が、HD-Zip 転写因子 GLABRA 2 (GL2) 遺伝子や Myb 様タンパク質 CAPRICE (CPC) 遺伝子の発現を誘導する (Masucci & Schiefelbein, 1996; Lin *et al.*, 2015)。CPC は、非根毛細胞から根毛細胞に移動する (Wada *et al.*, 1997; Kurata *et al.*, 2005)。移動した CPC は、WER に代わって GL3、EGL3 および TTG1 と複合体を形成する (Wada *et al.*, 1997; Lee & Schiefelbein, 2002)。根毛形成開始の主要制御因子である bHLH 転写因子 ROOT HAIR DEFECTIVE 6 (RHD6) は CPC 複合体によって誘導され、根毛形成を開始する (Menand *et al.*, 2007; Vissenberg *et al.*, 2020)。一方、非根毛細胞では、RHD6 の発現が GL2 によって抑制され、根毛が形成されない (Lin *et al.*, 2015)。根毛の伸長には、RHD6 に加えて RHD6 が直接制御する RSL2 や RSL4 の発現が必要である (Yi *et al.*, 2010)。RSL2 や RSL4 の発現は、RHD6 欠損植物においてもエチレンやオーキシンの投与によって誘導されることから (Feng *et al.*, 2017; Mangano *et al.*, 2017; Bhosale *et al.*, 2018)、エチレン・オーキシンは RHD6 とは独立な経路を介して RSL2 や RSL4 の誘導に働くというモデルが考えられている。さらに、リン枯渇環境における根毛形成は、維管束組織において TARGET OF MONOPTEROS 5 (TMO5) および LONESOME HIGHWAY (LHW) 転写因子複合体の誘導により生合成されたサイトカイニンの移動に依存しているとの報告がある (Wendrich *et al.*, 2020)。すなわち、根毛形成は、表皮細胞と皮層細胞の位置関係だけではなく、維管束組織からの組織間シグナル制御も重要であることが明らかである。

Pep1 による根毛形成は、根の移行領域におけるオーキシンの局所的な蓄積に依存していると考えられている (Jing *et al.*, 2019)。Pep1 投与により、表皮細胞の細胞膜上のオーキシントランスポーター PIN2 の発現量が低下して求基的オーキシン輸送が阻害される一方で、PIN3 の発現量が増大して中心部から表皮細胞へのオーキシンの側方輸送が促進される。その結果、Pep1 によるオーキシンの輸送方向の変化は、移行領域の表皮細胞や皮層細胞でのオーキシン蓄積を導くと考えられている。オーキシン受容体 TIR1 ファミリーの欠損変異体を用いた解析により、Pep1 によるオーキシンの分布変化は同受容体ファミリーによって感知され、その下流で、主根の伸長抑制、表皮細胞の膨張、根毛形成が引き起こされると推察されている (Jing *et al.*, 2019)。

1-1-4 本章の概要

植物の成長は、免疫の活性化に伴って抑制されることが多い (Huot *et al.*, 2014; Lozano-Duran & Zipfel, 2015)。Pep ペプチドは、MAMPs よりも根における免疫活性化能が高いとの報告もある (Poncini *et al.*, 2017)。上述した通り、Pep1 は植物の免疫活性化のみならず、主根の伸長抑制に加えて根毛形成を誘導することが明らかになっている。そこで、根において Pep1 による主根の伸長抑制と根毛形成、防御応答との

関連性を明らかにすることを目的として、それぞれのアウトプットに重要な遺伝子と、根の Pep1 応答に必要な PEPR2 の機能部位を調べた。

初めに、既知の PEPR 複合体の構成因子並びに根毛形成の制御因子の関与について逆遺伝学的解析を進めた。その結果、PEPR2 は、Pep1 による根毛形成と主根の伸長抑制に必要であることを確認した。Pep1 誘導性の根毛形成には、BAK1 および BKK1 などの PEPR 複合体に加えて、植物ホルモンの関与が確認された。BAK1 と BKK1 の要求性は、主根の伸長抑制と根毛形成とは異なっていた。また、Pep1 による主根の伸長抑制は、既知の主根の伸長抑制に反して、エチレン・オーキシンといった植物ホルモンなどの根毛形成因子に非依存的であった。これらの結果から、Pep1 による根毛形成と主根の伸長抑制はともに PEPR2 を必要とし、共受容体やエチレン・オーキシンの要求性が異なることが示された。よって、PEPR2 の機能部位が異なるか、または受容体下流でシグナル経路が分岐することが予想された。

次に、根における PEPR2 の発現部位を調べたところ、PEPR2 は主に中心柱で発現し、Pep1 投与により根端分裂組織に発現が拡大することがわかった。そこで、根の様々な細胞タイプに特異的に PEPR2 を発現させた植物体を用いて Pep1 応答を調べた。その結果、Pep1 誘導性の防御応答は PEPR2 を発現する異なる細胞タイプでも活性化された。さらに、根毛形成ならびに主根の伸長抑制は、分化後の根毛を除いて、PEPR2 を発現させた異なる細胞タイプでほぼ同様に誘導されたことから、細胞非自律的に制御されることが示唆された。興味深いことに、分化領域の根毛細胞特異的に PEPR2 を発現させた場合、根の成長抑制なしに防御応答が活性化された。したがって、根毛において PEPR2 を機能させると、Pep1 応答に伴う成長抑制を回避・緩和しながら根の免疫を活性化できると考えられた。本研究(第1章の大部分)は、*New Phytologist* 誌 (Okada *et al.*, 2020, *New Phytol*, doi: 10.1111/nph.17064.) において報告済みである。

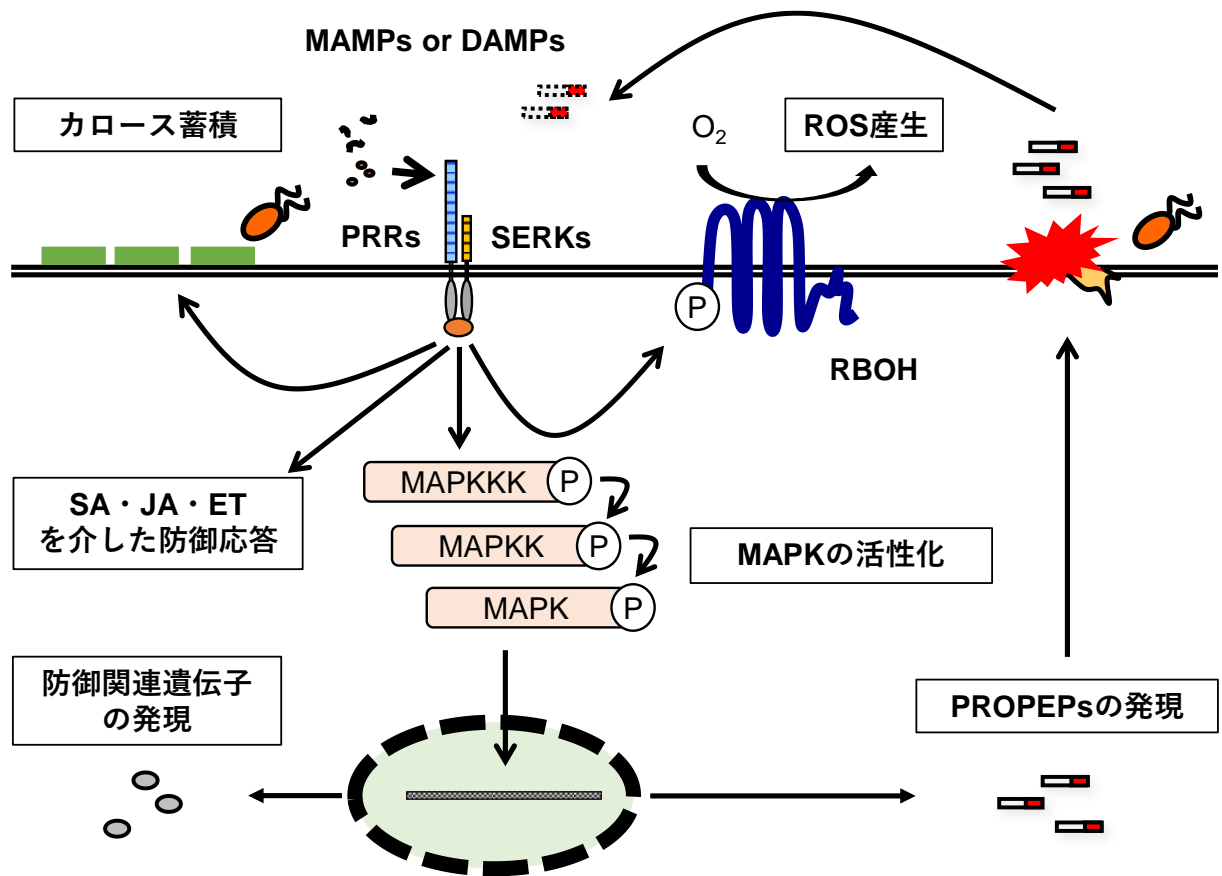


図 1-1-1 パターン誘導性免疫

PRRs が MAMPs または DAMPs を認識すると、カロース蓄積や ROS 産生、MAPK カスケードの活性化およびサリチル酸 (SA) ・ジャスモン酸 (JA) ・エチレン (ET) 依存的な防御応答を活性化する。MAPK カスケードの活性化は、遺伝子の発現変化を誘導し、防御関連遺伝子や、PROPEP (Pep 前駆体) など DAMPs の発現が誘導される。PRR によるこれら一連の防御応答はパターン誘導性免疫 (pattern-triggered immunity: PTI) と呼ばれる。

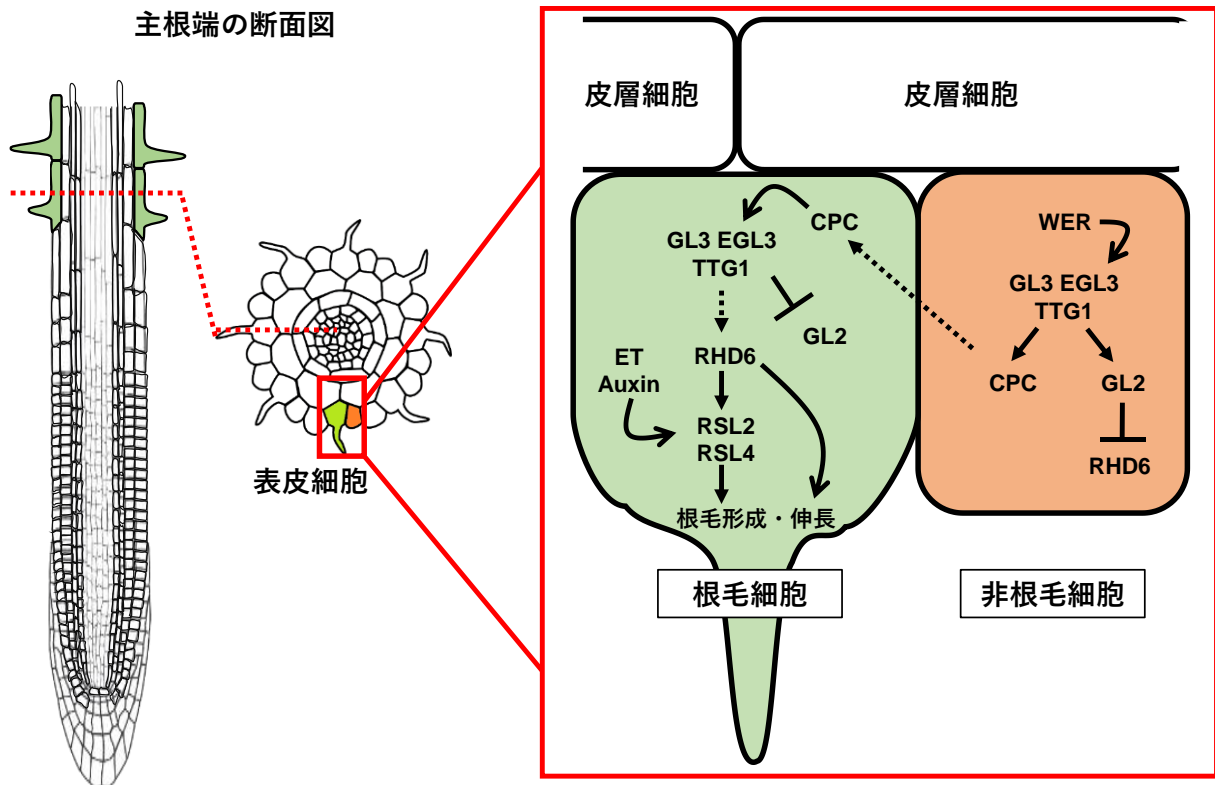


図 1-1-2 根毛細胞の分化機構

(左から) シロイヌナズナの根端縦断面図、横断面図、根毛形成シグナル経路を示す。非根毛細胞では、WER が GL3、EGL3 および TTG1 との複合体を形成し、CPC や GL2 の発現を誘導する。GL2 は、根毛形成開始を主に制御する RHD6 の発現を抑制する。CPC は非根毛細胞から根毛細胞へ移行する。根毛細胞では、移行した CPC が WER の代わりに、GL3、EGL3 および TTG1 と複合体を形成し、GL2 の発現を抑制し RHD6 の発現を促進する。エチレン (ET) およびオーキシン (Auxin) は RHD6 と独立して、根毛細胞への分化や根毛伸長に寄与する RSL2 や RSL4 の発現を誘導する。

1-2 材料と方法

1-2-1 植物材料と栽培方法

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の種子を、6%次亜塩素酸ナトリウムおよび0.2% Triton X-100 の混合溶液で15分間滅菌処理した後、滅菌水で3回洗浄し、4°Cの暗所で1-2日間静置した。その後、0.8% Agar・25 mM Sucrose を含む1/2×Murashige & Skoog (1/2MS) 寒天培地 (pH5.7) に播種し、明期12時間、暗期12時間、22°Cに設定したグロースチャンバーで培地を垂直に静置した。記述がない限り、植物体は上記の条件で成育した播種後7日目の植物体を試験に用いた。本研究では、シロイヌナズナ標準系統である Col-0 および各種変異体を用いて実験を行った (表 1-1)。

1-2-2 細胞タイプ特異的に PEPR2 が発現する形質転換植物体の作製

pPEPR1::PEPR1、pPEPR2::PEPR2 および各細胞タイプ特異的プロモーター:: PEPR2 配列を、Gateway クローニング法 (Invitrogen) を用いて pGWB604 ベクター (Nakagawa *et al.*, 2007) に導入した。作製したプラスミドをアグロバクテリウム (GV3010) へ形質転換し、アグロバクテリウム法により *pepr1 pepr2* 二重変異体に形質転換を行い、pPEPR1::PEPR1-GFP 植物体、pPEPR2::PEPR2-GFP 植物体、各細胞タイプ特異的プロモーター制御下で PEPR2-GFP が発現する植物体を作製した (表 1-2、図 1-2-1)。

各配列の増幅は以下の方法で行った。pPEPR1::PEPR1 と pPEPR2::PEPR2 の塩基配列はそれぞれ、Col-0 のゲノム DNA を鋳型として、pPEPR1 Fw プライマーと PEPR1 Rv プライマー、pPEPR2 Fw プライマーと PEPR2 Rv プライマー、PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase を用いて PCR により増幅した。各遺伝子プロモーターと PEPR2 の塩基配列は、各細胞タイプ特異的に発現する遺伝子のプロモーター配列と PEPR2 の cDNA 配列を同様に増幅した後に融合して作製した。コンストラクトの作製に用いたプライマーを表 1-3 に示す。

1-2-3 根毛密度の測定

本研究で使用したペプチド (表 1-4) を PEPMIC (China) に依頼し、合成した。Pep1 ペプチドとして、Col-0 の PROPEP1 配列由来の C 末端領域 23 アミノ酸残基のペプチドを用いた (表 1-4)。生育7日目の植物体を、1/2MS 液体培地 (pH5.7) に移し替え、0.5 μM の Pep1 または flg22 ペプチドを24時間または4日間処理した。オーキシン阻害剤による根毛形成への影響を調べるために、生育7日目の植物体に30 μM の PEO-IAA を処理し、2時間後にペプチド処理を行った。倒立型顕微鏡 DMI 6000B (Leica) を用いて、根の画像を取得した。根毛密度の計測領域は、野生型標準系統である Col-0 において、Pep1 による根毛形成が顕著である根端 0.5-1.5 mm の範囲とした。画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて、この領

域において伸長が誘導されている根毛数を計測して根毛密度を求めた (図 1-2-2)。計測個体数は各 8-14 個体で、2 回繰り返した。

1-2-4 主根長の測定

生育 7 日目の植物体を 1/2MS 液体培地 (pH5.7) に移し、0.5 μ M の Pep1 または flg22 ペプチドを 5 日間処理した。その後、根全体の画像をデジタルカメラ DC-FZ85 (Panasonic) で撮影し、Image J を用いて主根長を測定した。計測個体数は各 8-10 個体で、2 回繰り返した。

1-2-5 マーカー遺伝子の発現部位と根毛形成部位の観察

生育 7 日目の植物体および Pep1 処理 12 時間後の植物体を 20 μ M Propidium Iodide (PI) (ナカライテスク) で 5 分間染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV1000 (オリンパス) または SP8 (Leica) を用いて観察した。PI の蛍光は、HeNeG レーザー (543nm) を用いて、励起波長 543 nm、蛍光波長 555-655 nm で観察し画像を取得した。GFP の蛍光は、Ar レーザー (488 nm) を用いて、励起波長 488 nm、蛍光波長 500-530 nm で観察し画像を取得した。GFP と PI による相互干渉を避けるために、シーケンシャル走査方式で画像を取得した。根の断面画像は、焦点面を 1 μ m 間隔で撮影した 95-105 枚の画像から再構成した。根毛形成部位の観察には、根を 4% paraformaldehyde で固定し、ClearSee 溶液 (Kurihara *et al.*, 2015) で処理し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 C2⁺ (Nikon) で解析した。

1-2-6 RNA 抽出及び qRT-PCR 解析

凍結させたサンプルをホモジナイザー (ヴァーダー・サイエンティフィック社) で破碎し、PureLinK® Plant RNA Reagent (invitrogen) を用いて RNA を抽出した。その後、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara) を使用して逆転写反応より cDNA を合成した。qRT-PCR には SYBR Green (life technologies) と任意のプライマー、Thermal Cycler Dice® (Takara) を使用した。解析に用いたプライマーの一覧を表 1-5 に示す。

表 1-1 本章で用いた変異体一覧

変異体名	背景	文献
<i>bak1-3</i>	Col-0	Chinchilla <i>et al.</i> , 2007
<i>bak1-5</i>	Col-0	Schwessinger <i>et al.</i> , 2011
<i>bak1-5 bkk1</i>	Col-0	Roux <i>et al.</i> , 2011
<i>bik1 pbl1</i>	Col-0	Zhang <i>et al.</i> , 2010
<i>ein2-1</i>	Col-0	Alonso <i>et al.</i> , 1999
<i>pepr1-1</i>	Col-0	Bartels <i>et al.</i> , 2013
<i>pepr2-3</i>	Col-0	Bartels <i>et al.</i> , 2013
<i>pepr1-1 pepr2-3</i>	Col-0	Ross <i>et al.</i> , 2014
<i>rhd6</i>	Ws-2	Massuci & Schiefelbein, 1994
<i>slr-1</i>	Col-0	Fukaki <i>et al.</i> , 2002

表 1-2 作製した形質転換植物体の一覧

形質転換植物体/ <i>pepr1 pepr2</i>	発現部位	発現領域
<i>pPEPR1::PEPR1-GFP</i>	中心柱以外	根全体
<i>pPEPR2::PEPR2-GFP</i>	中心柱	根全体
<i>pEXPA7::PEPR2-GFP</i>	根毛細胞	分化
<i>pWER::PEPR2-GFP</i>	表皮細胞	分裂
<i>pMGP::PEPR2-GFP</i>	内鞘、皮層、内皮細胞	分裂
<i>pPEP::PEPR2-GFP</i>	内皮細胞	分裂、移行、伸長
<i>pGL2::PEPR2-GFP</i>	非根毛細胞	根全体

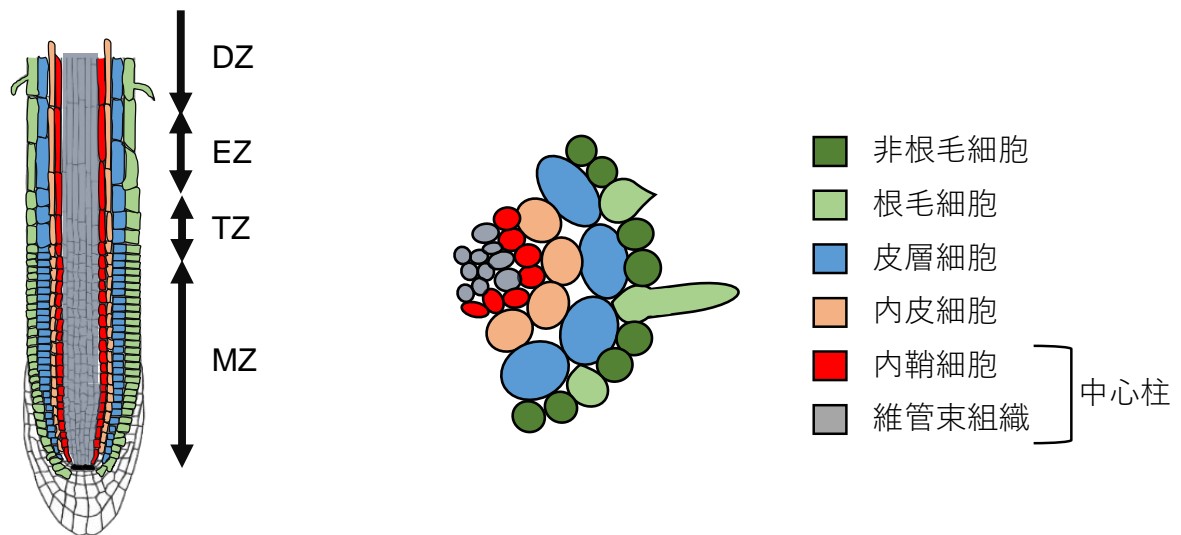


図 1-2-1 根の領域・細胞タイプ

シロイヌナズナの根端の各領域 (DZ: 分化領域, EZ: 伸長領域, TZ: 移行領域, MZ: 分裂領域) と各組織 (細胞タイプ) を示す。

表 1-3 コンストラクト作製に用いたプライマーの一覧

コンストラクト名	プライマー名	5'→3' 配列
<i>pPEPR1::PEPR1</i>	pPEPR1 Fw	CACCAGAGAAGGAAAACAACCATG
	PEPR1 Rv	AAGCTGCTCCTCTGATTCAGTTCGG
<i>pPEPR2::PEPR2</i>	pPEPR2 Fw	CACCAGTTTGAGATGGAGTTGCATTG
	PEPR2 Rv	GTGAACTGAACCCGAAGTGCTTCTT
<i>pEXPA7::PEPR2</i>	pEXPA7 Fw	CACCTTCTCCCGCGTTGCACATAT
	pEXPA7 P2 Rv	CCCAAGATTCCTCATTCTAGCCTCTTTT
	pEXPA7-P2 Fw	GAAAAAGAGGCTAGAATGAGGAATCTTGG
<i>pWER::PEPR2</i>	pWER Fw	CACCGACCTATGCTATTTTGGACCAG
	pWER P2 Rv	GTAACCCAAGATTCCTCATTCTTTTTGTTTCTTTGA
	pWER P2 Fw	TCAAAGAAACAAAAGAATGAGGAATCTTGGGTTAC
<i>pMGP::PEPR2</i>	pMGP Fw	CACCGCAATTGGAGACGATATATGATGA
	pMGP P2 Rv	GTAACCCAAGATTCCTCATGTCTTCTTCTTGGACAA
	pMGP P2 Fw	TTGTCCAAGAAGAAGACATGAGGAATCTTGGGTTAC
<i>pPEP::PEPR2</i>	pPEP Fw	CACCCTACTGCACCAACCACGCCATTG
	pPEP P2 Rv	GTAACCCAAGATTCCTCATGGCTAATGTG
	pPEP P2 Fw	CACAATCACATTAGCCAAAACCATGAGGAATCTTG
<i>pGL2::PEPR2</i>	pGL2 Fw	CACCACACGTTTGGCTTTTAGCGTGAG
	pGL2 P2 Rv	GTAACCCAAGATTCCTCATTCTTTCTTCTTAATATTG
	pGL2 P2 Fw	CGAATATTAAGAAGAAAAATGAGGAATCTTGGGTTAC

表 1-4 本研究で用いたペプチド

ペプチド名	アミノ酸配列
flg22	QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA
Pep1	ATKVKAKQRGKEKVSSGRPGQHN

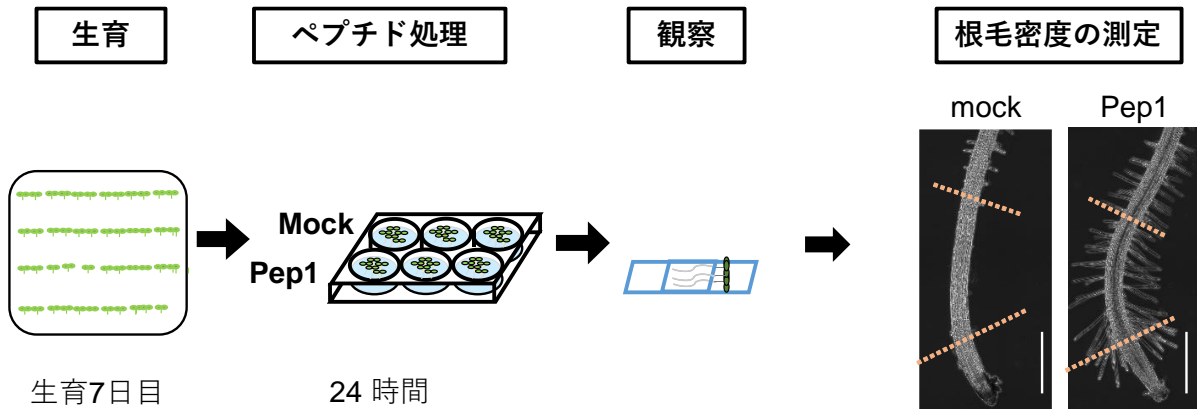


図 1-2-2 根毛密度の定量化

生育 7 日目の植物体を、0.5 μ M Pep1 で 24 時間または 4 日間処理した後に、根端から 0.5-1.5 mm の領域（破線間）の根毛数を計測した。Bar は 500 μ m を示す。

表 1-5 qRT-PCR 分析に用いたプライマーの一覧

プライマー名	5'→3' 配列
ACTIN2 Fw	ACCTTGCTGGACGTGACCTTACTGAT
ACTIN2 Rv	GTTGTCTCGTGGATTCCAGCAGCTT
PEPR2 Fw	AAGAAGATGGCTTAATGCTG
PEPR2 Rv	CAGTTGTGCCAGTAACAGTG
CYP71A12 Fw	GATTATCACCTCGGTTCT
CYP71A12 Rv	CCACTAATACTTCCCAGATTA
PAD3 Fw	TTCCTCTGTTTCCTCGTCCT
PAD3 Rv	ATGATGGGAAGCTTCTTTGG
CYP81F2 Fw	ATTGTCCGCATGGTCACAGGGAG
CYP81F2 Rv	GTAGCCGTGTCCGAACACTTTAAG
FRK1 Fw	CTTGACCCCGAGTACTATTCGAC
FRK1 Rv	CCTGACATGATCACTTATATGCACCT

1-3 結果

1-3-1 Pep1 ペプチドは根毛形成を誘導する

Pep1 処理後に根毛形成がどのように誘導されるかについて検証した。Pep1 処理後 24 時間目の植物体では、対照区 (mock 処理区) と比較して、主根の伸長抑制、分裂領域の細胞数の減少および根毛形成の誘導が確認された (図 1-3-1)。根毛形成は根端から 0.5-1.5 mm の移行領域・分化領域において顕著に誘導された (図 1-3-1 a)。Pep1 による根毛形成は、各根毛細胞で 1 本ずつであり、非根毛細胞列では異所的に誘導されず、根毛細胞列に限定される形で根毛密度が増加した (図 1-3-2)。一方で、*flg22* 処理 24 時間後には、対照区と比較して、主根の伸長抑制及び分裂領域の細胞数の減少は認められたものの、顕著な根毛密度の増加は検出されなかった (図 1-3-1)。*flg22* 処理 4 日後においても根毛密度に有意な差は見られなかった (図 1-3-3)。Pep1 処理 4 日後では、分裂領域の表皮細胞でも根毛形成が誘導された (図 1-3-3)。よって、Pep1 は、分裂領域や移行領域にある根毛細胞から根毛伸長を顕著に促進した結果、根毛密度が増加したと考えられる。分裂活性や細胞伸長の抑制は Pep1 および *flg22* どちらの処理区においても同程度誘導されたにも関わらず、根毛形成は Pep1 特異的であったことから、Pep1 による根毛形成の誘導は必ずしも、伸長抑制に伴う応答ではないことが示唆された。

1-3-2 Pep1 誘導性の根毛形成は PEPR2、BAK1、BKK1、BIK1 および PBL1 に依存する

Pep1 誘導性の根毛形成と主根の伸長抑制を制御する分子基盤を明らかにするために、Pep1 受容体の PEPR および PEPR 複合体構成因子の機能欠損変異体を用いた逆遺伝学的解析を行った。

シロイヌナズナにおける Pep1 受容体である PEPR1 と PEPR2 のうち、*pepr1* 変異体は根毛形成ならびに主根の伸長抑制を維持した一方で、*pepr2* 変異体および *pepr1 pepr2* 二重変異体ではこれらの応答が失われた (図 1-3-4)。この結果は、これまで根における Pep1 応答を調べた先行研究と一致し、PEPR2 が根における主要な Pep1 受容体であることが確認された (Krol *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2010; Jing *et al.*, 2019)。PEPR は Pep1 認識時に、共受容体 BAK1 並びに同じ SERK ファミリーに属する BKK1 と相互作用し、細胞質キナーゼ BIK1 および PBL1 のリン酸化などを経て細胞内へシグナル伝達を行う (Liu *et al.*, 2013, Yamada *et al.*, 2016)。そこで、根毛形成における BAK1 の役割を調べるために、複数の BAK1 変異体 (*bak1-3* 変異体および *bak1-5* 変異体) を用いて検証した。BAK1 の T-DNA 挿入変異体である *bak1-3* では、根の成長抑制および複数の PTI 防御応答が野生型植物と同様もしくはそれ以上に誘導される (Yamada *et al.*, 2016)。*bak1-5* は、BAK1 のキナーゼ部位の変異により、多様な BAK1

機能のうち PTI シグナル制御機能が特異的に欠損した変異体である (Roux *et al.*, 2011; Schewssinger *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2016)。 *bak1-3* 変異体では、野生型植物と同様に、Pep1 による根毛形成促進および主根の伸長抑制が見られた (図 1-3-5)。一方で、 *bak1-5* 変異体では、主根の伸長抑制は見られなかったものの、根毛形成の誘導は部分的に保持されていた (図 1-3-5)。このことから、PEPR2 による根毛形成は、BAK1 キナーゼ活性の低下または不活型 BAK1-5 タンパク質による他の SERK メンバーの機能阻害に対して一定の抵抗性を有すると考えられた。そこで、 *bak1-5* 背景で BKK1 も同時に欠損させた *bak1-5 bkk1* 二重変異体を調べたところ、根における 2 種類の Pep1 応答が完全に失われた (図 1-3-5)。また、PEPR と BAK1 の下流で働く BIK1 とそのホモログ PBL1 の二重欠損変異体においても、両 Pep1 応答が失われた (図 1-3-5)。以上のことから、Pep1 誘導性の根毛形成は、PEPR2、BAK1、BKK1、BIK1 および PBL1 を必要とすることがわかった。

1-3-3 Pep1 誘導性の根毛形成はエチレン、オーキシンを必要とする

根毛の形成は、根毛細胞への分化を促進する転写因子 RHD6 に加えてエチレン、オーキシんに依存している (Massuci & Schiefelbein, 1994; Vissenberg *et al.*, 2020)。また、Pep1 投与は根の移行領域におけるオーキシンの蓄積を誘導する (Jing *et al.*, 2019)。そこで、Pep1 による根毛形成メカニズムに迫る第一歩として、*rh6* 変異体、エチレン非感受性(エチレン情報伝達因子)変異体 *ein2*、オーキシン低感受性変異体 *slr-1 (iaa14)* において Pep1 誘導性の根毛形成を調べた。*slr-1* 変異体は、オーキシン伝達因子 IAA14 の機能獲得変異によりオーキシン応答性が低下した側根欠失変異体である (Fukaki *et al.*, 2002)。さらに、オーキシン受容体阻害剤 (PEO-IAA) による影響も調べた。

上記の 3 つの変異体に Pep1 を処理した結果、主根の伸長抑制は野生型植物同様に誘導される一方で、根毛形成はほとんど誘導されなかった (図 1-3-6 a-c)。また、PEO-IAA を前処理した野生型植物では、Pep1 処理による根毛形成は誘導されなかった (図 1-3-6 d, e)。したがって、Pep1 による根毛形成は、転写因子 RHD6、エチレン、オーキシんに依存しており、既知の根毛形成機構を介していることが示された。

1-3-4 Pep1 は中心柱・根端分裂組織で PEPR2 の発現を誘導する

pepr1 pepr2 二重変異体に導入した *pPEPR2::PEPR2-GFP* の機能性を確認したところ、Pep1 による根毛形成並びに主根の伸長抑制を回復した (図 1-3-7)。次に、根において Pep1 応答への要求性が異なる PEPR1 と PEPR2 について発現部位を比較した。無処理区では、PEPR2-GFP は特に根の維管束組織の一部で顕著に発現が認められた (図 1-3-8)。一方、PEPR1-GFP は全組織にわたって幅広く検出され、これらの結果は先行研究とも一致していた (Ortiz-Morea *et al.*, 2016)。興味深いことに、Pep1 処理 12 時間後には、PEPR2-GFP の発現は根の維管束組織に限定されず、内鞘細胞を含む中心柱

に加えて根端分裂組織にまで拡大した（図 1-3-9 a）。

1-3-5 PEPR2 発現を根毛に限定すると、Pep1 による防御応答が主根伸長の抑制無しに誘導できる

根の flg22 感受性は、受容体 FLS2 の発現組織に関わらず野生型植物同様に維持されていた (Wyrsh *et al.*, 2015)。そこで、PEPR2 を細胞タイプ特異的に発現させた際に、Pep1 誘導性の根の形態変化と防御応答に与える影響について調べた。*pepr1 pepr2* 二重変異体背景で、細胞タイプ特異的プロモーター制御下で PEPR2-GFP を発現させた形質転換植物体を作製した（表 1-2, 図 1-3-10 a）。*EXPA7*、*WER* および *GL2* プロモーターの活性は、分化領域の根毛細胞（根毛）、分裂領域の表皮細胞および非根毛細胞にそれぞれ特異的である (Singh *et al.*, 2008; Brady *et al.*, 2007; Marquès-Bueno *et al.*, 2016)。*MGP* プロモーターの活性は 分裂領域の内鞘、内皮細胞、皮層細胞に特異的である (Miyashima *et al.*, 2009)。*PEP* プロモーターの活性は皮層細胞に特異的である (Brady *et al.*, 2007; Mustroph *et al.*, 2009)。これらのプロモーターによって発現した PEPR2-GFP の発現部位は、先行研究のプロモーター活性領域と一致することを確認した（図 1-3-10 a）。通常の生育条件下では、これらの系統において根の発生並びに成長に影響する顕著な変化は観察されなかった。

Pep1 誘導性の根毛形成と主根の伸長抑制をこれらの形質転換植物を用いて調べたところ、*pWER::PEPR2-GFP*、*pGL2::PEPR2-GFP*、*pMGP::PEPR2-GFP* および *pPEP::PEPR2-GFP* 形質転換植物体では、Pep1 による根毛形成および主根の伸長抑制が野生型植物と同様に見られた（図 1-3-11）。この結果は、導入した PEPR2-GFP が、それぞれの細胞タイプでも機能することを示唆している。また、これらの植物体において、検出限界以下で異なる細胞タイプで発現している PEPR2-GFP が Pep1 応答性を保持する可能性を否定できないものの、少なくとも Pep1 による根の形態変化は特定の組織における受容体の発現を必要としないことが示唆された。つまり、根のどこかで PEPR2 が機能するならば、根全体としての Pep1 応答には十分である可能性が考えられた。

しかしながら、興味深いことに、*pEXPA7::PEPR2-GFP* 形質転換植物体では Pep1 投与により根毛形成ならびに主根の伸長抑制は誘導されなかった（図 1-3-11）。同系統では、根全体における PEPR2 の mRNA 発現レベルは野生型植物及び他の系統と比較してそれぞれ 17 倍、3-10 倍高かったことから（図 1-3-10 b）、受容体の発現レベルが低いためではないと考えられる。*EXPA7* プロモーターは根毛細胞において根毛伸長開始以降に活性化されることから (Cho & Cosgrove, 2002)、*pEXPA7::PEPR2-GFP* 形質転換植物体では、分裂領域から伸長領域の根毛伸長前の細胞で PEPR2 が発現されていないと考えられる。同植物体において、*pEXPA7* の制御下にある PEPR2-GFP の発現は Pep1 処理後においても分化領域の根毛細胞のみで限定されていた（図 1-3-9 b）。

他の細胞タイプで PEPR2 発現が誘導されても、*pEXPA7* の制御下にしか GFP はないので、他の細胞タイプの GFP は検出不可である。そのため、*pEXPA7* の活性部位は Pep1 処理前後で変化しないといえる。よって、分化後の根毛細胞において PEPR2 が活性化されても新たな根毛形成の誘導や主根の伸長抑制には不十分であると考えられる。つまり、根毛細胞由来の PEPR2 シグナルは、根毛形成や細胞分裂停止が誘導される移行領域や分裂領域に伝達されていない可能性が考えられる。

次に、これらの形質転換植物体において Pep1 による防御応答について検証した。その指標として、防御関連遺伝子 *CYP71A12*、*PAD3*、*CYP81F2*、*FRK1* の根全体における発現量を RT-qPCR で調べた。*CYP71A12*、*PAD3*、*CYP81F2* は、カマレキシンやインドールグルコシノレートといった抗菌物質の産生に必要なトリプトファン由来の代謝経路で機能する、シトクロム P450 酵素モノオキシゲナーゼをコードする (Glawischnig *et al.*, 2004; Nafisi *et al.*, 2007; Bednarek *et al.*, 2009; Millet *et al.*, 2010; Pfalz *et al.*, 2011)。*FRK1* は PTI 誘導性の受容体キナーゼをコードする (Boudsocq *et al.*, 2010)。一連の細胞タイプ特異的プロモーターの支配下で PEPR2-GFP を発現させた植物において、これらの防御関連遺伝子の発現量は Pep1 処理により有意に上昇した (図 1-3-12)。興味深いことに、*pEXPA7::PEPR2-GFP* 形質転換植物体においても、Pep1 による *CYP71A12*、*PAD3*、*CYP81F2*、*FRK1* の発現が顕著に増大した (図 1-3-12)。特に、*CYP71A12* と *CYP81F2* の誘導レベルは他の系統と比較しても著しく高かった。以上より、本研究で調べた防御関連遺伝子の発現は、PEPR2 の発現部位に関わらず Pep1 投与により強く誘導されることが示された。また、PEPR2 シグナルが分化領域の根毛細胞から伝達された場合、主根の伸長抑制や根毛形成無しに防御応答を誘導できることが示唆された。

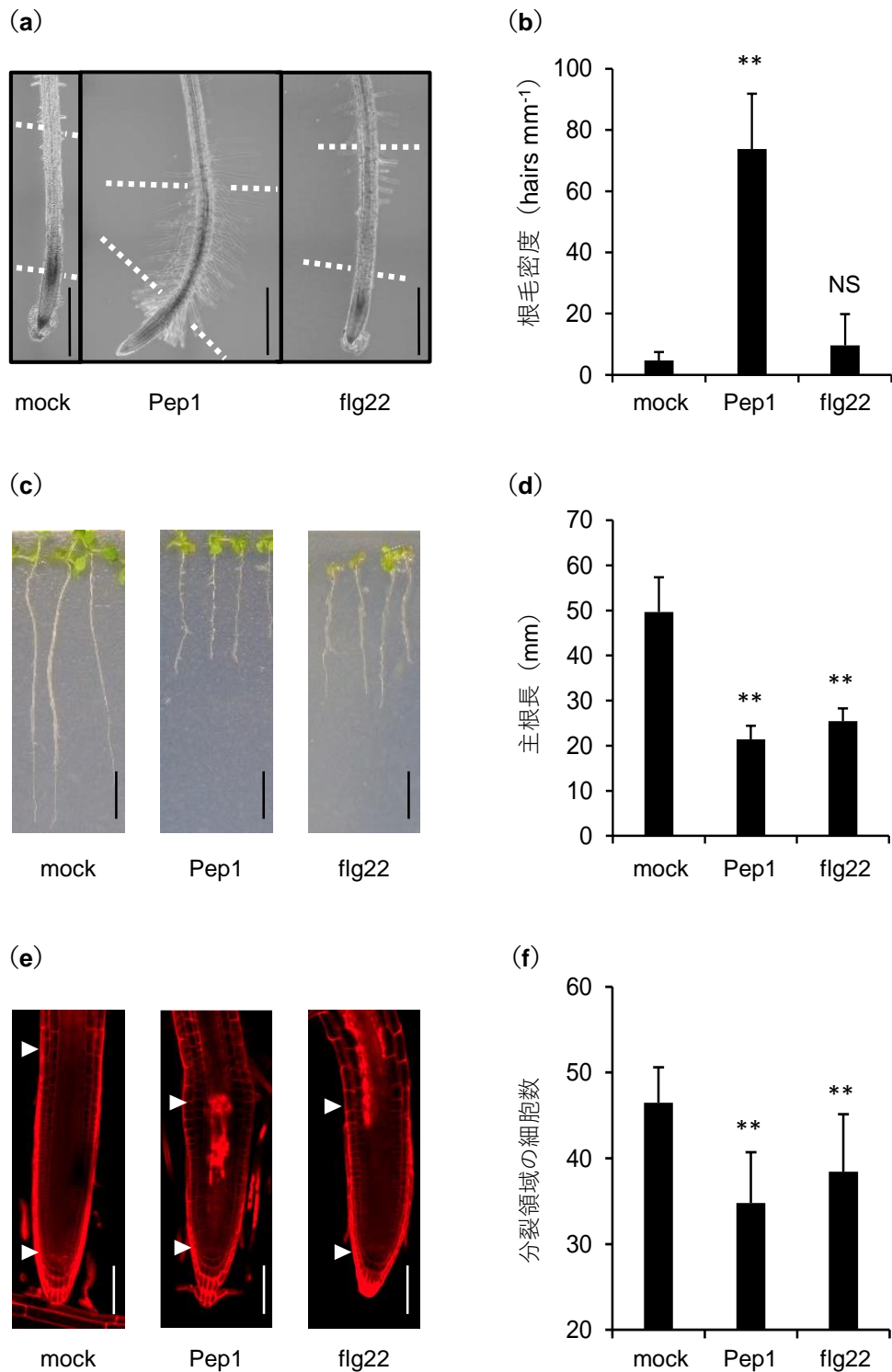


図 1-3-1 Pep1 は根毛形成を誘導する。

(a, c, e) 生育 7 日目の野生型植物に 0.5 μM Pep1 または flg22 を 24 時間 (a, e) または 5 日間 (c) 処理した。Bar は 500 μm (a)、10 mm (c)、100 μm (e) を示す。(a) 白破線は根毛密度の測定領域で、根端から 0.5 mm-1.5 mm を示す。(e) 白三角は分裂領域の端から端を示す。(b, d, f) 根毛密度 (a)、主根長 (c)、分裂領域の細胞数 (e) をそれぞれ定量化した。データは平均値 ± 標準偏差 (SD) を示す。(n=9-10, Student's *t*-test, ** *P* < 0.01; NS, not significant)。

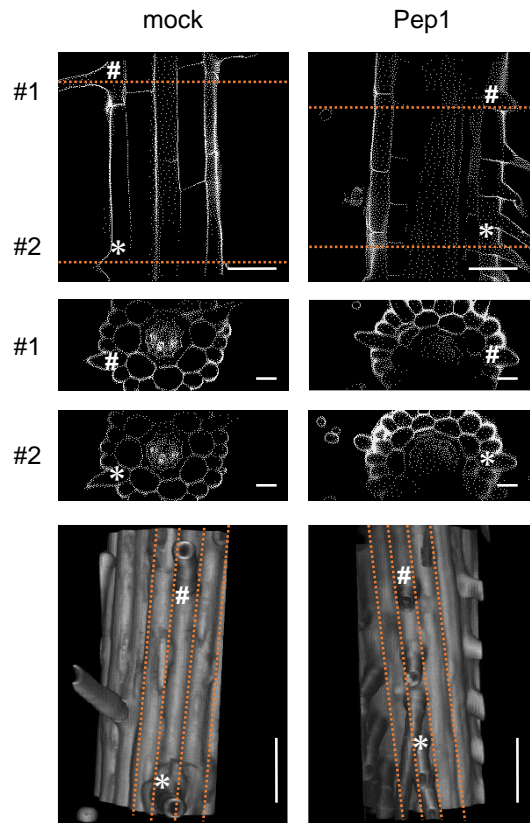


図 1-3-2 Pep1 誘導性の根毛は根毛細胞列で形成される。

生育 7 日目の植物体に 0.5 μM Pep1 を 24 時間処理した。細胞壁を 0.02% SCRI Renaissance 2200 で染色した。破線 (top) は断面画像 (middle) の位置を示す。アスタリスクやナンバーサインは処理区ごとに同一の根毛を示す。破線 (bottom) は表皮細胞の各細胞列を示す。Bar は 50 μm (top, bottom) 、 20 μm (middle) を示す。

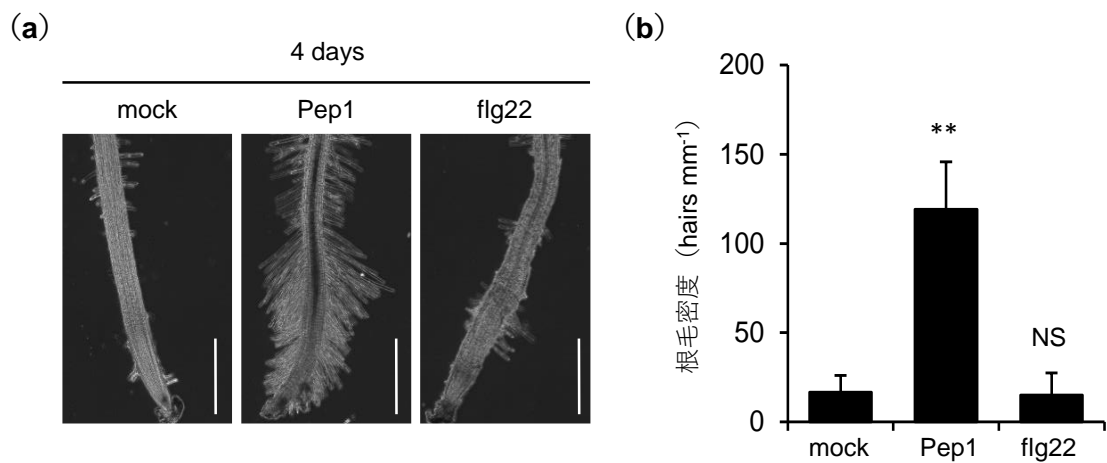


図 1-3-3 Pep1 ペプチドは持続的に根毛形成を誘導する。

(a) 生育 7 日目の植物体に 0.5 μ M Pep1 または flg22 を 4 日間処理した。Bars は 500 μ m を示す。(b) 根毛密度 (a) を定量化した。データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) を示す (n=7-10; Student's *t*-test, ** $P < 0.01$; NS, not significant)。

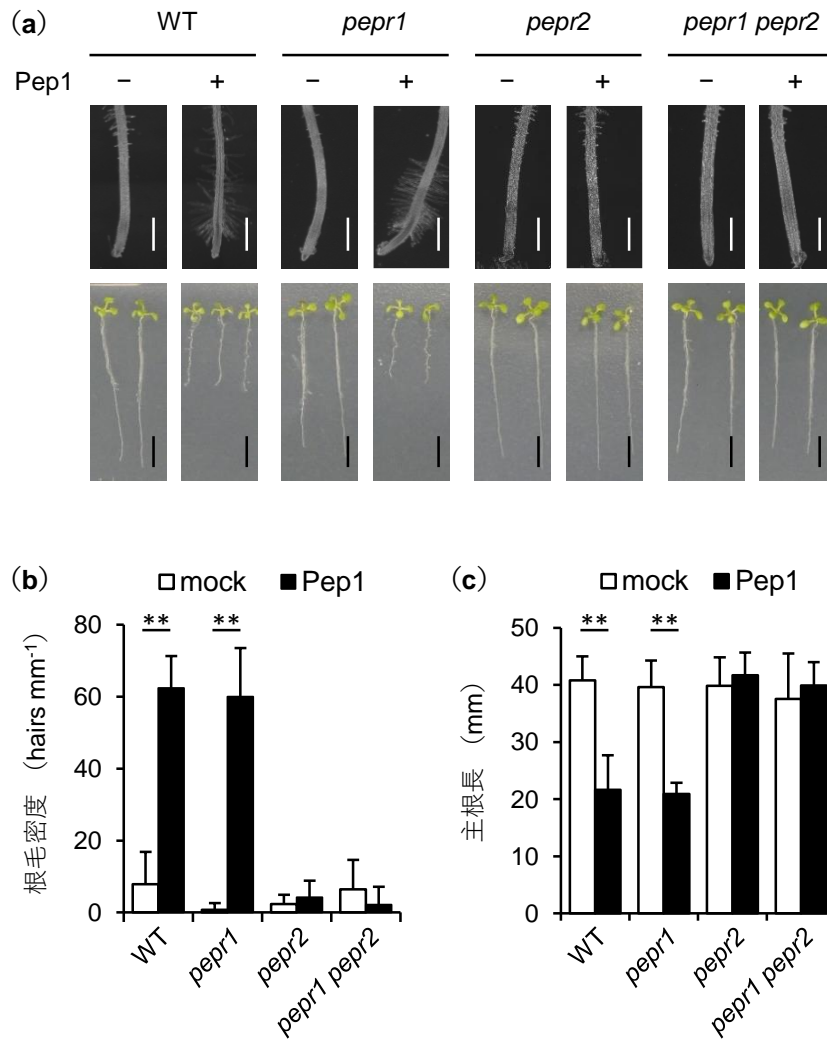


図 1-3-4 PEPR2 は、根における主要な Pep1 受容体である。

(a) 生育 7 日目の植物体 (WT: 野生型植物) に 0.5 μ M Pep1 を 24 時間 (top; 根毛密度) または 5 日間 (bottom; 主根長) 処理した。Bar は 500 μ m (top) または 10 mm (bottom) を示す。(b, c) 根毛密度 (a, top)、主根長 (a, bottom) を定量化した。データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) を示す (n=8-14; Student's *t*-test, ** $P < 0.01$)。

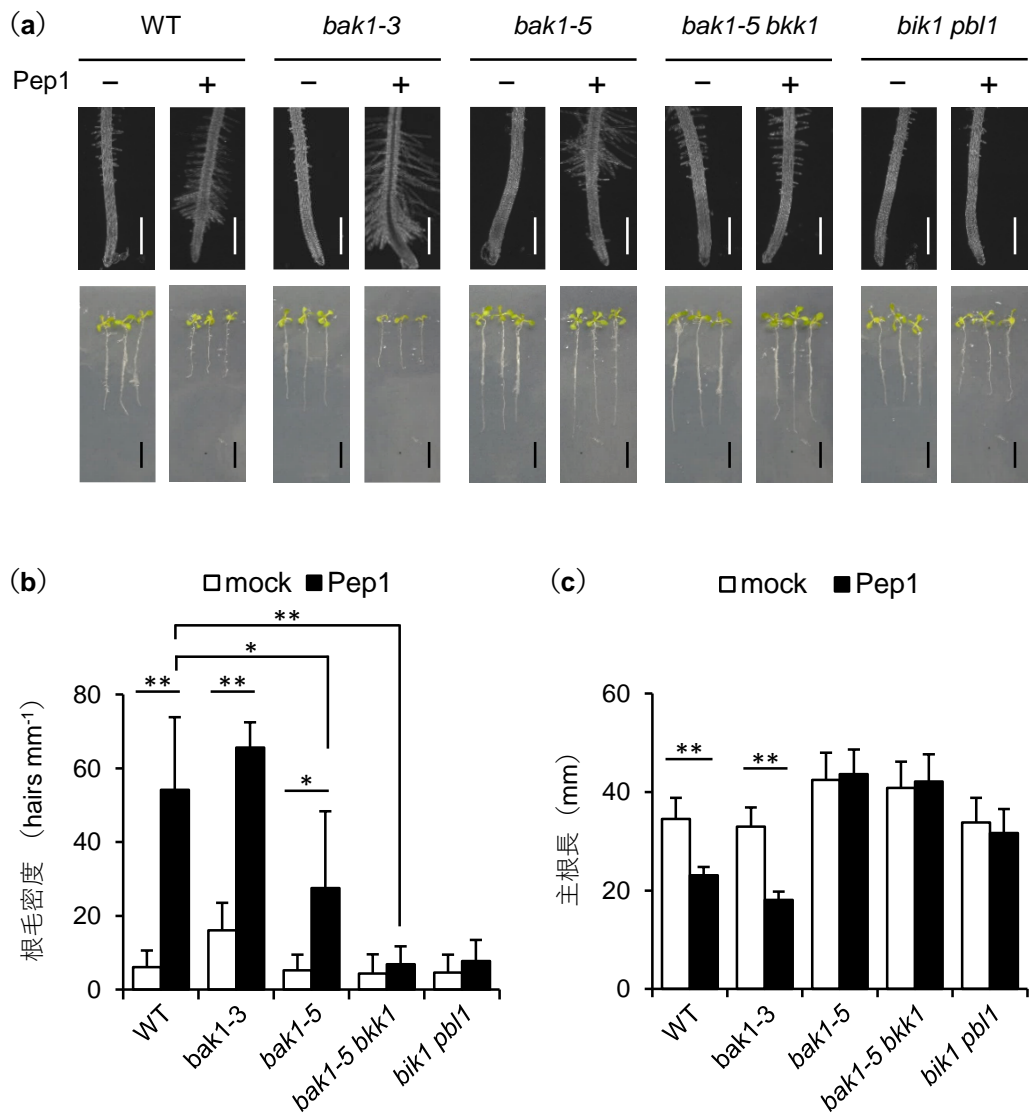


図 1-3-5 Pep1 誘導性の根毛形成は、PEPR2、BAK1、BKK1、BIK1 および PBL1 を必要とする。

(a) 生育 7 日目の植物体 (WT: 野生型植物) に 0.5 μ M Pep1 を 24 時間 (top; 根毛密度) または 5 日間 (bottom; 主根長) 処理した。Bar は 500 μ m (top) または 10 mm (bottom) を示す。(b, c) 根毛密度 (a, top)、主根長 (a, bottom) を定量化した。データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) を示す (n=8-14; Student's *t*-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

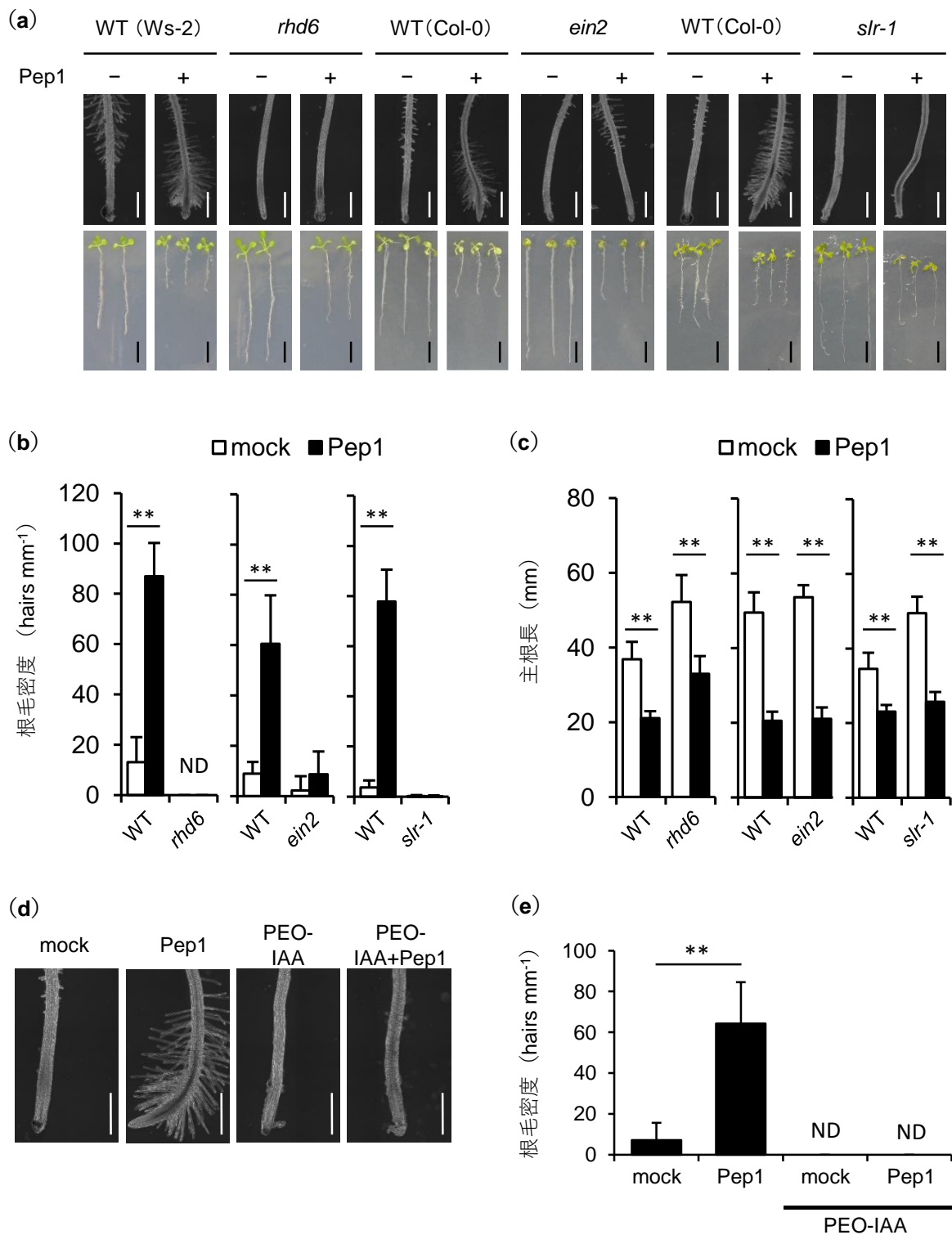


図 1-3-6 Pep1 誘導性の根毛形成は転写因子 RHD6、エチレン、オーキシシンに依存する。

(a) 生育 7 日目の植物体 (WT: 野生型植物) に $0.5 \mu\text{M}$ Pep1 を 24 時間 (top; 根毛密度) または 5 日間 (bottom; 主根長) 処理した。Bar は $500 \mu\text{m}$ (top) または 10 mm (bottom) を示す。

(b, c) 根毛密度 (a, top)、主根長 (a, bottom) を定量化した。(d) 生育 7 日目の植物体に $30 \mu\text{M}$ PEO-IAA を 2 時間処理した後に、PEO-IAA、PEO-IAA+Pep1 を 24 時間処理した。Bar は $500 \mu\text{m}$ を示す。(e) 根毛密度 (d) を定量化した。(b, c, e) データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) を示す (n=9-14; Student's *t*-test, ** $P < 0.01$; ND, not detected)。

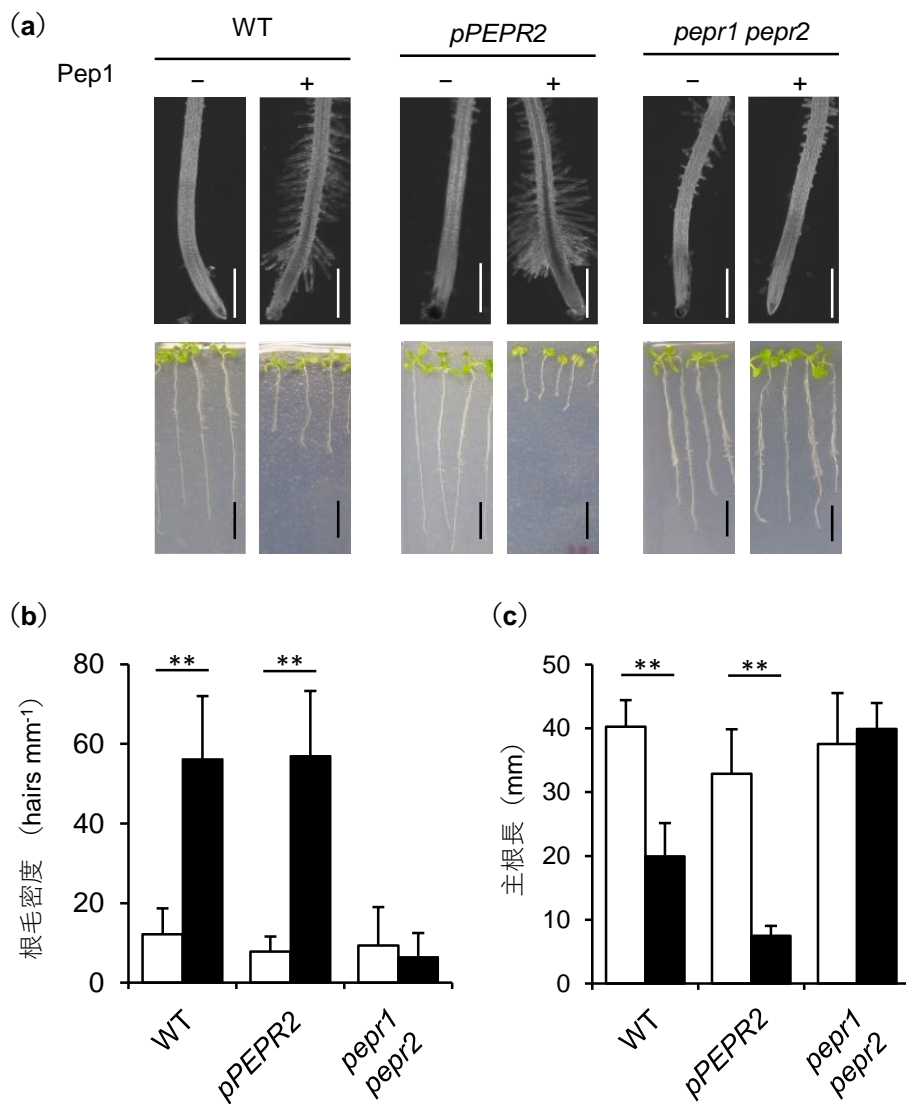


図 1-3-7 *pepr1 pepr2* 二重変異体背景に導入した PEPR2 は、Pep1 による根毛形成と主根の伸長抑制を誘導する。

(a) 生育 7 日目の野生型植物 (WT) と *pepr1 pepr2* 二重変異体背景で *pPEPR2::PEPR2-GFP* を発現させた形質転換植物体に 0.5 μ M Pep1 を 24 時間 (top; 根毛密度) または 5 日間 (bottom; 主根長) 処理した。Bar は 500 μ m (top) または 10 mm (bottom) を示す。(b, c) 根毛密度 (a, top)、主根長 (a, bottom) を定量化した。(b, c) データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) を示す (n=9-14; Student's *t*-test, ** $P < 0.01$)。

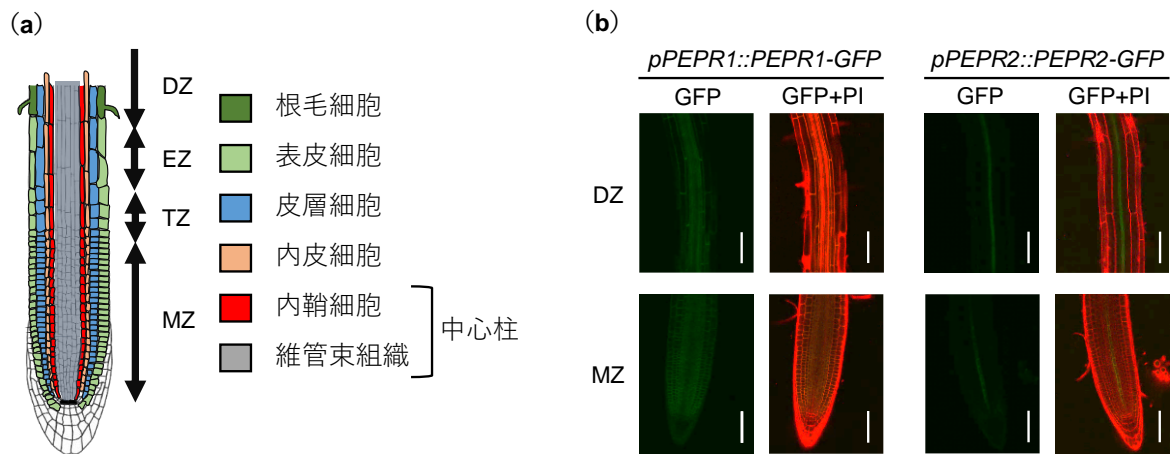


図 1-3-8 PEPR1 と PEPR2 の発現部位

(a) シロイヌナズナの根端縦断面図であり、各組織と各領域 (DZ: 分化領域, EZ: 伸長領域, TZ: 移行領域, MZ: 分裂領域) を示す。(b) *pepr1 pepr2* 二重変異体背景で *pPEPR1::PEPR1-GFP*、*pPEPR2::PEPR2-GFP* を発現させた形質転換植物体の根における PEPR1 と PEPR2 の発現部位を示す。Bar は 100 μm である。根は 20 μM PI (propidium iodide) で染色した。

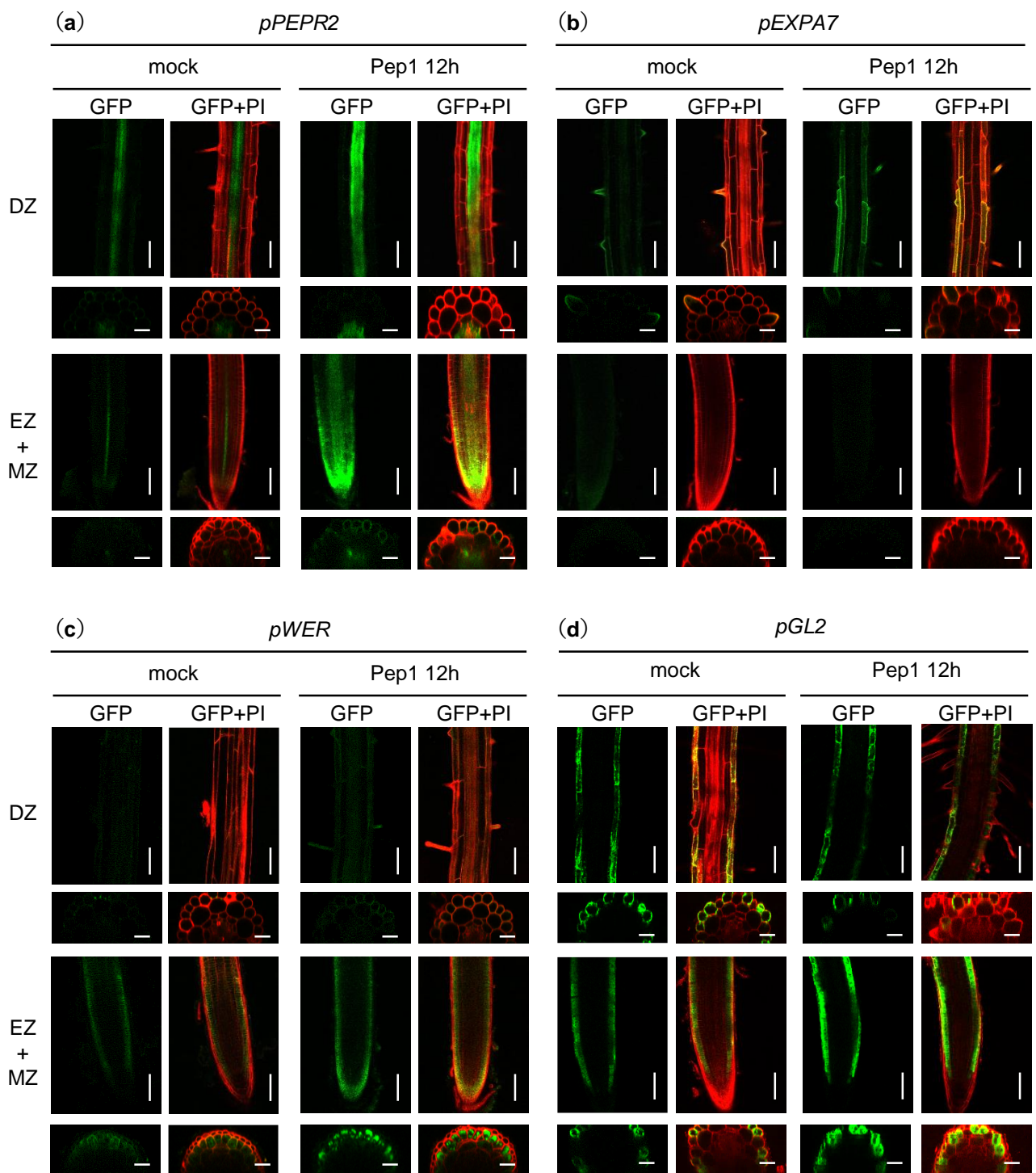


図 1-3-9 Pep1 処理後の PEPR2-GFP の発現パターン

生育 7 日目の *pPEPR2::PEPR2-GFP* 植物体 (a) または細胞タイプ特異的に PEPR2-GFP を発現させた植物体 (b-d) に、0.5 μM Pep1 を 12 時間処理した後の PEPR2-GFP の発現部位を示す。DZ: 分化領域、EZ: 伸長領域、MZ: 分裂領域を示す。植物体の根は 20 μM PI (propidium iodide) で染色した。Bar は 50 μm (top)、20 μm (bottom) である。

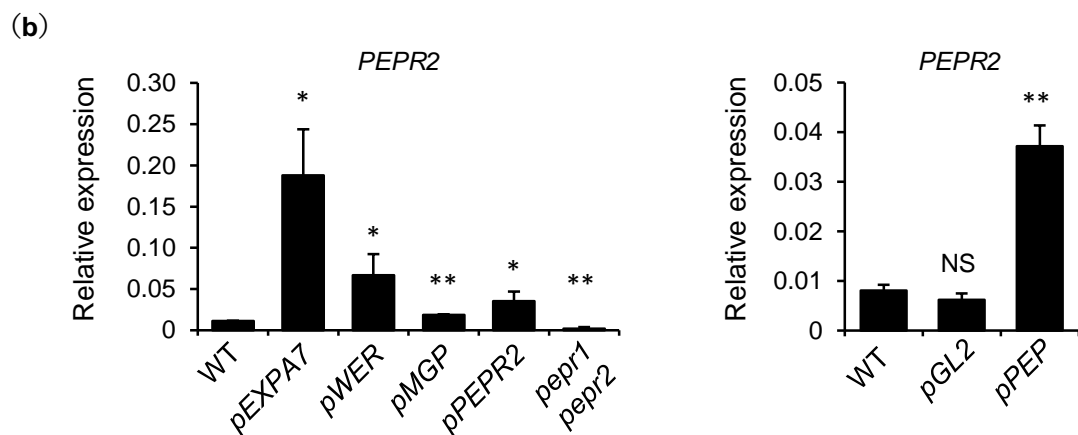
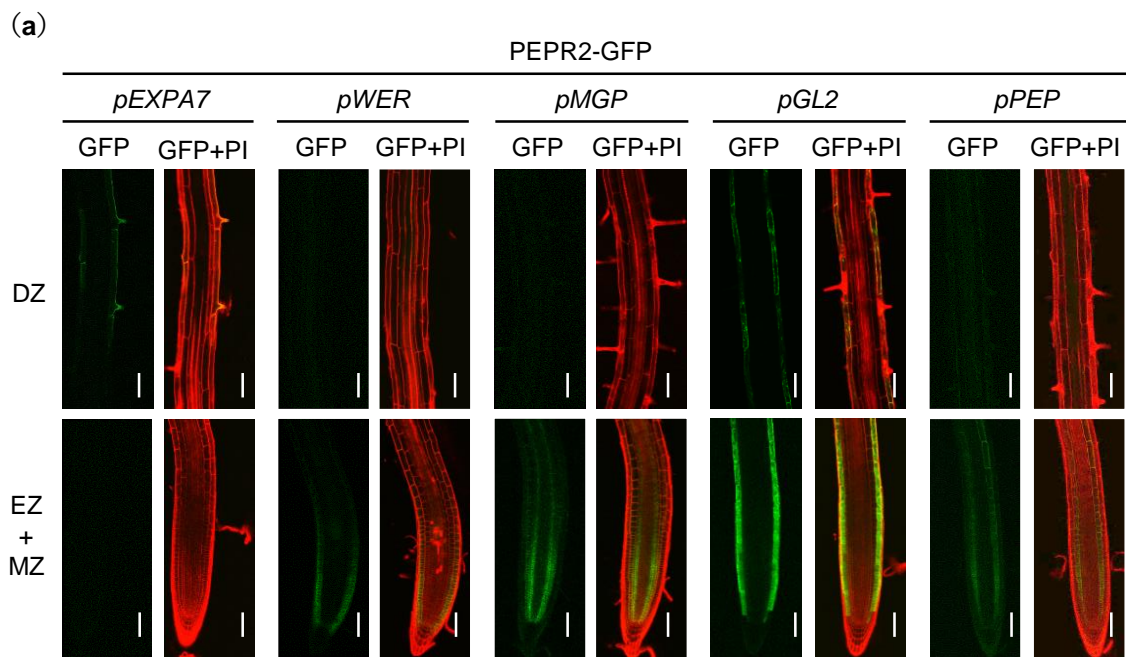


図 1-3-10 細胞タイプ特異的プロモーターによる PEPR2-GFP の発現

(a) 細胞タイプ特異的プロモーター制御下での PEPR2-GFP の発現部位を示す。Bar は 100 μm である。植物体の根は 20 μm PI (propidium iodide) で染色した。DZ: 分化領域、EZ: 伸長領域、MZ: 分裂領域を示す。(b) 根における PEPR2 の発現量を ACTIN2 に対する相対値で示す。データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) を示す (n=3; Student's *t*-test results compared with WT, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NS, not significant)。

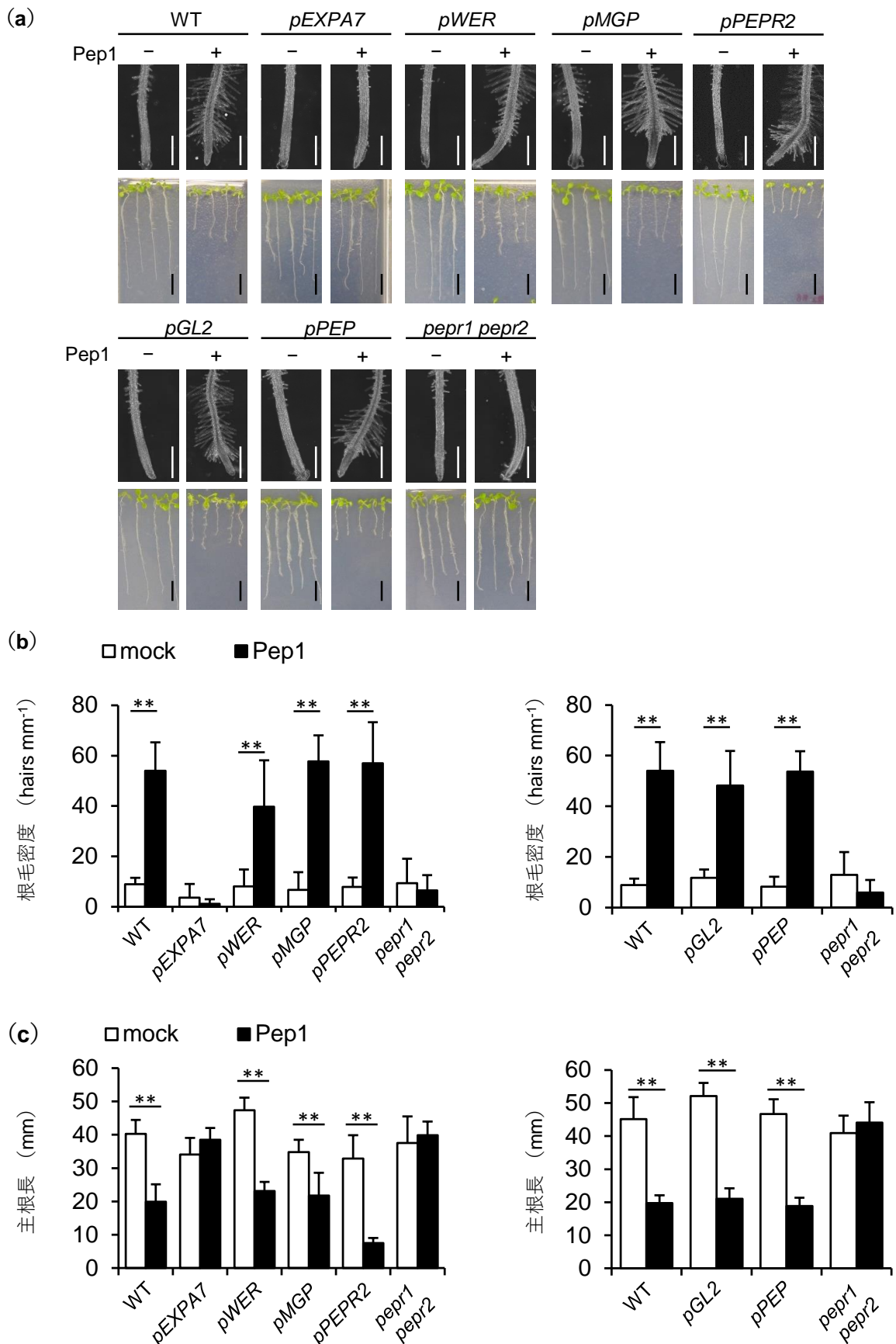


図 1-3-11 Pep 誘導性の根の形態変化は、組織特異的に PEPR2-GFP を発現させた植物で回復する。

(a) 生育 7 日目の植物体 (WT: 野生型植物) に 0.5 μ M Pep1 を 24 時間 (top; 根毛密度) または 5 日間 (bottom; 主根長) 処理した。Bar = 500 μ m (top) または 10 mm (bottom) である。(b) 根毛密度 (a, top) を定量化した。(c) 主根長 (a, bottom) を定量化した。(b, c) データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) を示す (n=8-14; Student's *t*-test, ** $P < 0.01$)。

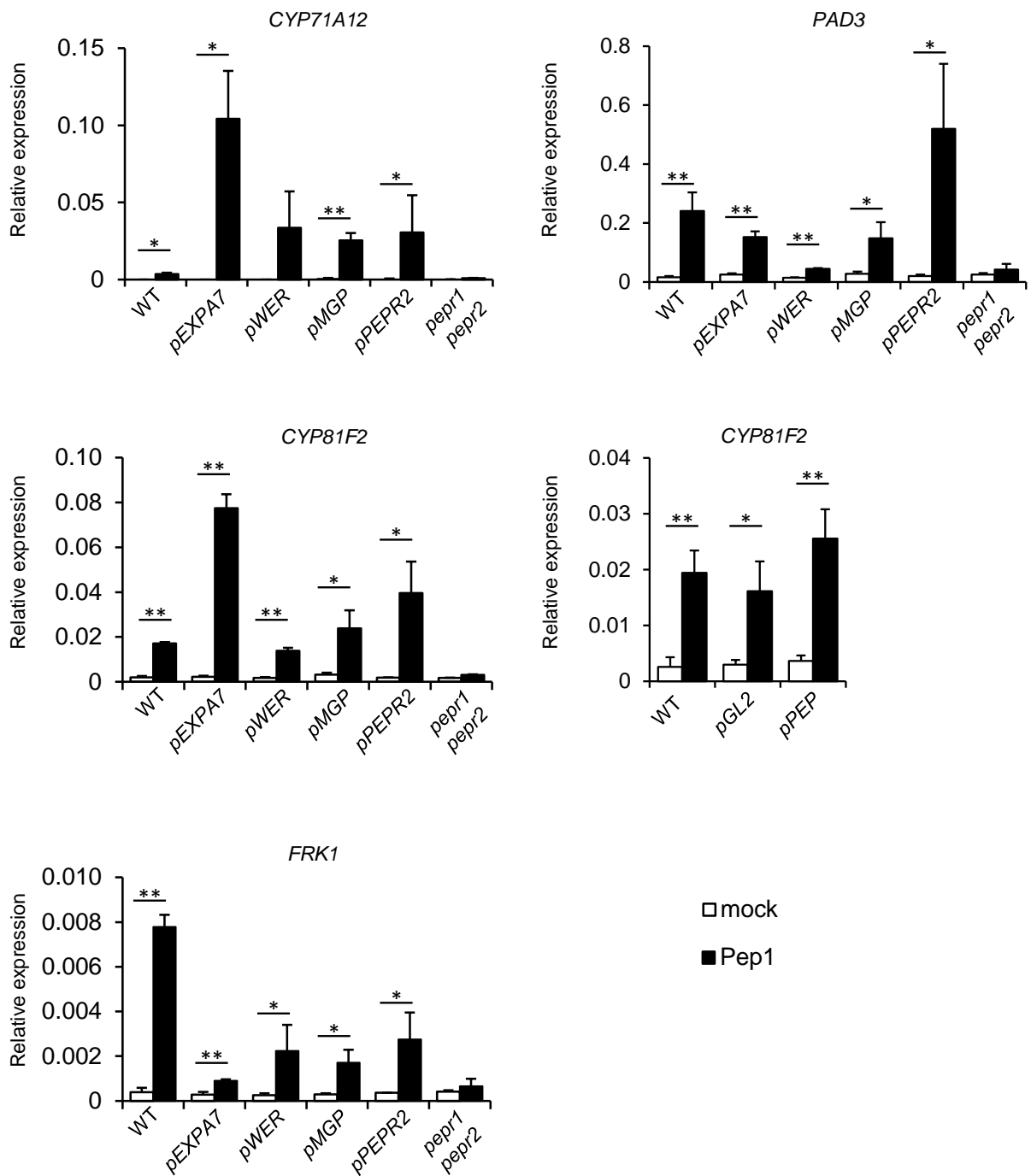


図 1-3-12 細胞タイプ特異的に発現する *PEPR2-GFP* 系統の防御関連遺伝子の発現量
 生育 7 日目の野生型植物体および形質転換植物体に、Mock または $0.5 \mu\text{M}$ Pep1 を 12 時間
 処理し、防御関連遺伝子の発現レベルを解析した。*pEXPA7*、*pWER*、*pMGP*、*pGL2*、*pPEP*
 および *pPEPR2* はそれぞれ、各種プロモーター制御下における *PEPR2-GFP/pepr1 pepr2* 系
 統を示す。遺伝子発現量を *ACTIN2* に対する相対値で示す。データは平均値 \pm 標準偏差 (SD)
 を示す (n=3 except *pepr1 pepr2*, Student's *t*-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

1-4 考察

1-4-1 Pep1 誘導性の根毛の役割

ダメージ誘導性 Pep ペプチドが微生物の認識や細胞傷害に応じて発現・産生されることから (Huffaker & Ryan, 2007; Yamaguchi & Huffaker, 2011; Yamada *et al.*, 2016; Hander *et al.*, 2019)、Pep1 による根毛形成も、微生物や環境ストレスに応じて誘導される可能性が推測される。シロイヌナズナにおいて、病原菌や植物成長促進菌の中には根毛形成を誘導するものが知られている (Zamioudis *et al.*, 2013; Pecenková *et al.*, 2017)。これらの微生物による根毛形成は、本研究で示した Pep1 による根毛形成と同様にエチレンやオーキシンを必要とする (図 1-3-6; Zamioudis *et al.*, 2013; Pecenková *et al.*, 2017)。ただし、微生物感染に伴う根毛形成の意義についてはよくわかっておらず、根毛細胞における免疫シグナル制御の特性を示唆する結果は興味深い。

Pep1 による根毛形成が微生物による根毛形成に関与しているかどうかや栄養吸収や根圏微生物叢の調節に寄与しているかは現時点では不明である。根毛形成はリン枯渇環境においても誘導され (Bustos *et al.*, 2010)、根毛形成不全変異体はリン枯渇環境下で地上部の Pi 濃度やバイオマス量が低下する (Tanaka *et al.*, 2014)。なお、予備的知見ながら、リン枯渇条件において *pepr1 pepr2* 二重変異体は野生型植物と同様に根毛形成を誘導したため (図 1-4-1)、現時点で Pep1-PEPR による根毛形成とリン枯渇応答との間に関係性は見いだせていない。また、オオムギの根毛形成低下変異体は、滲出物の分泌量が野生型植物の 3 分の 1 程度に低下し、微生物叢の多様性も減少するとの報告がある (Robertson-Albertyn *et al.*, 2017; Holz *et al.*, 2018)。根毛は根圏微生物叢の構築に重要であり、Pep1 によって密に形成された根毛が根の滲出物 (量) ひいては微生物叢に与える影響についても調査が望まれる。その際、Pep1 による防御応答の活性化が微生物叢に与える影響も予想されるため、両者を分離した上で Pep1 誘導性の根毛の役割を検証する必要がある。

1-4-2 Pep1 誘導性の根毛形成と主根の伸長抑制の制御

根毛形成は、主根の伸長抑制との相関性が報告されている (Salazar-Henao *et al.*, 2016; Vissenberg *et al.*, 2020)。BAK1 キナーゼ活性が低下した *bak1-5* 変異体では、Pep1 による防御応答の大部分や主根の伸長抑制が阻害される一方で、根毛形成とエチレン産生は部分的に誘導される (図 1-3-5; Roux *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2016)。しかし、同時に BAK1 パラログである BKK1 を欠損した *bak1-5 bkk1* 二重変異体では、これらの Pep1 応答はほぼ完全に欠損する (図 1-3-5; Roux *et al.*, 2011)。この結果は、Pep1 による根毛形成がエチレン産生と同様に BAK1 キナーゼ活性の低下に対して比較的ロバストであることを示唆する。Pep1 による根毛形成がエチレン依存的であることを考慮すると (図 1-3-6 a, b)、Pep1 によるエチレン産生の誘導が根毛形成を引き起こ

す可能性も考えられる。エチレンはオーキシン合成や局所的なオーキシン分布を誘導することで、主根の伸長を抑制することが知られている (Růžicka *et al.*, 2007)。しかし、Pep1 による主根の伸長抑制は、*bak1-5* 変異体ではほぼ誘導されず、*ein2* 変異体では誘導されたことから (図 1-3-5, 1-3-6)、主根の伸長抑制は Pep1 で産生されるエチレンとは異なる経路を介して誘導されると考えられる。また、シロイヌナズナのアクセッションを用いた自然変異解析においても、Pep1 による根毛形成と主根の伸長抑制との間に正の相関は検出されなかった (岡田 修士論文 2018)。したがって、Pep1 による根毛形成と主根の伸長抑制は互いに独立しており、両者の特異的な制御は、PEPR2 の発現部位というよりは PEPR2 の下流でのシグナル分岐によるものと予想される。

1-4-3 PEPR2 による根毛形成と主根の伸長抑制の細胞非自律的制御

本研究では、根の分裂領域から伸長領域において、PEPR2が細胞タイプに関わらず Pep1処理による根毛形成と主根の伸長抑制を誘導できる一方で、分化領域の根毛細胞では、Pep1処理によるこれらの応答を誘導しなかった (図1-3-10, 1-3-11)。このことから、PEPR2による根毛形成や主根の伸長抑制は細胞非自律的に制御されると推測される。Pep1による根毛形成は、移行領域 (TZ) の表皮細胞や皮層細胞におけるオーキシンの局所的な蓄積によって誘導されると考えられている (Jing *et al.*, 2019)。また、主根の伸長抑制は、根端分裂組織での細胞分裂および伸長領域の細胞伸長の低下と正の相関関係にあり (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009)、これらの応答にもオーキシンの蓄積が関与する (Růžicka *et al.*, 2007)。そのため、PEPR2の発現部位の違いがオーキシンの蓄積部位に影響するかについて今後調べることで、分化領域の根毛細胞における PEPR2シグナルの制御について検証できると考えられる。

1-4-4 免疫応答の空間的制御

PEPR2 の発現部位は維管束組織の一部であり (図 1-3-8)、Pep1 処理後には中心柱や根端分裂組織に拡大した (図 1-3-9)。一方、Pep1-Pep3 前駆体 PROPEP1-PROPEP3 のプロモーター活性は刺激がない環境では非常に低く (Bartels *et al.*, 2013)、Pep1 や flg22 処理によって発現が根端分裂組織および中心柱や表皮細胞で誘導される (久保田 修論 2016)。外部から投与した Pep1 は根の表面から中心組織へ移行することから (Ortiz-Morea *et al.*, 2016)、根の中心で発現する PEPR2 は Pep1 を認識でき、そこから他の組織における PEPR2 の発現を誘導すると考えられる。また、Pep1 が MAMP よりも免疫応答に関して応答性が強いことから (Poncini *et al.*, 2017)、PEPR2 が維管束の一部で発現する意味は、過剰な免疫応答を回避するためだと推測される。これは、PEPR2 を恒常的異所的に発現する植物体が Pep1 処理により枯死に近い状態になることから支持される (岡田 修論 2018)

本研究では、PEPR2を本来その発現レベルが低い部位に限定して発現させても根全体ではPep1による防御応答を通常レベルで誘導できることを示した（図1-3-12）。根における防御応答の誘導部位を明らかにしていないが、地上部においては、Pep1が局所的に防御応答を誘導するのみならず、システミックにSA・JA応答性遺伝子の発現を誘導する（Ross *et al.*, 2014）。根においても、Pep1は分裂領域、移行領域、分化領域でSA関連遺伝子の発現を誘導する（Poncini *et al.*, 2017）ことから、局所的なPep1応答は根全体で防御応答を誘導すると推測される。これについては、PEPR2を細胞タイプ特異的に発現する形質転換植物体を用いて、誘導部位が既知である防御関連遺伝子の発現・誘導部位を調べることで今後検証する。したがって、根の一部でダメージシグナルとしてPep1を感知すれば、根全体に免疫シグナルを誘導する上で十分である可能性が考えられる。これは、病原体感染に伴うダメージに対する応答としては理にかなっており、このような機能性は上述の全身抵抗性をもたらす上でも寄与していると予想される（Ma *et al.*, 2012; Tintor *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 2014; Yamada *et al.*, 2016; Hander *et al.*, 2019）。

FLS2を異所的に発現した場合も、根全体では、活性酸素種の産生、MAPKおよび防御関連遺伝子の活性化などのflg22応答が保持されている（Wyrsh *et al.*, 2015）。そのため、PEPR2の異所的発現データ（図1-3-10, 1-3-12）は、FLS2の異所的な発現に関する研究と合わせて、FLS2やPEPR2以外のPTIシグナル制御因子が根の異なる細胞タイプで共通して存在し、受容体の発現のみで応答性を付与できることを示唆する。FLS2など他のPRRを根毛特異的に発現させた場合にも、PEPR2と同様に主根の伸長抑制を回避しながら防御応答を活性化できるか、あるいはそれはPEPR2に特異的なのか、今後の解明が待たれる。

細菌侵入に対して根全体でPTIを早期に活性化させた場合、植物は病原菌の増殖を抑制するのに有利に働く一方で、植物成長や有益な微生物との共生に悪影響が出る可能性がある。実際に、FLS2の発現は根では通常低く抑えられているが、傷害部位の隣接細胞で誘導され、MAMP誘導性免疫を傷害部位周辺で増強する（Beck *et al.*, 2014; Wyrsh *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2020）。このようなMAMP受容体の空間的な発現制御は、微生物共生に際してPTIの過度の活性化を回避するために有効であると考えられる（Beck *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2020）。維管束組織を介して感染・増殖する病原菌も存在することから（Iven *et al.*, 2012; Ralhan *et al.*, 2012）、病原菌の中心柱内部への侵入・感染を抑制することも重要であると考えられる。PROPEP3の発現は未処理時に観察されなかったものの、Pep1投与により中心柱や根端分裂組織で増大した（久保田 修士論文 2016）。Pep1投与時のPEPR2やPROPEP3の発現部位は中心柱で共通することから、根のダメージに応じて維管束組織においてPep1応答性が強まると推察される。ただし、PROPEPの発現はPep1以外の他の刺激によっても誘導されることから、PEPR2の発現には根の中心におけるPep1認識が必ずしも必要であるとは限らない。上記の

様々な細胞タイプにおけるPEPR2の機能性と合わせて考えると、PEPRシグナル系は、根のどこでダメージシグナルを感知しても維管束系における免疫増強に寄与していることが示唆される。

1-4-5 第1章のまとめ

本研究では、Pep1誘導性の根毛形成を制御する因子を探求する中で、BAK1のキナーゼ部位に変異がある*bak1-5*変異体が主根の伸長抑制を誘導せずに根毛形成を誘導することを見出した。さらに、PEPR2の発現部位を細胞タイプ特異的に限定することで、根の成長阻害を回避して防御応答を誘導することに成功した。以上のことから、Pep1誘導性の主根の伸長抑制・根毛形成・防御応答について、PEPR複合体の構成要素やPEPRの発現部位を調節することで、これらの応答を分けて調節できることを明らかにした(図1-4-2)。上記の応答の調節が内生Pepによって誘導されるかについては、内生PROPEPが発現しうる条件で今後検証する。

有益な共生菌や病原菌を含む土壌微生物に常にさらされている根系においては、成長と免疫のどちらかを増強させるのではなく、それらのバランスを取りながら生育することが特に重要である。本研究では、分化領域の根毛細胞からのPEPR2シグナルが根の成長阻害を回避しながら防御応答を活性化できることを示した。これは根毛細胞の細胞特性を反映したものなのか、あるいはPEPRシグナル系の特性なのかについては、今後明らかにする必要がある。現在、flg22受容体FLS2を含むPRRを根毛細胞特異的に発現させた各植物体を作成中であり、同様の解析を行う計画である。これらの取組みを通じて、植物の環境適応の鍵を握る、成長と免疫の調節メカニズムに関する理解が深められると期待される。

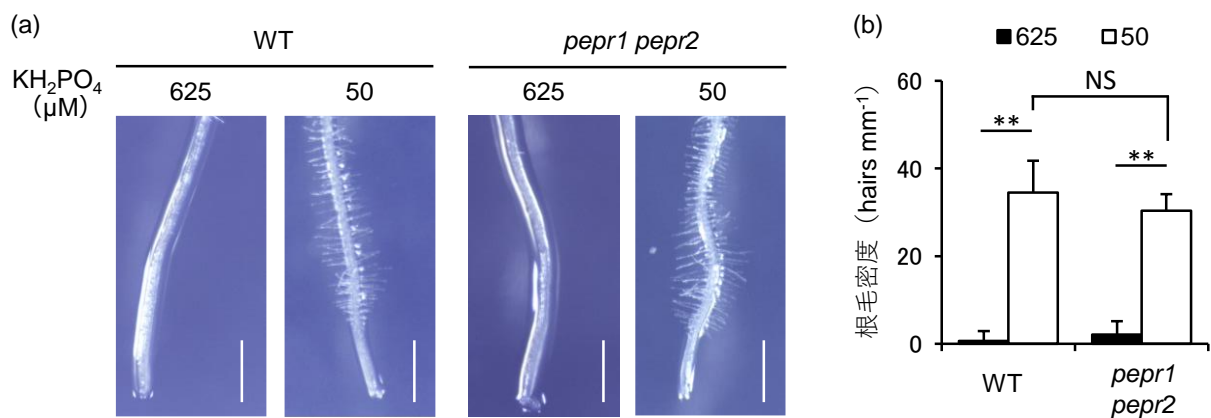


図 1-4-1 リン枯渇時の根毛形成は PEPR1 および PEPR2 に非依存的である。

(a) 生育 6 日目の植物体をリン充分 (KH₂PO₄, 625 μM) 固形培地またはリン枯渇 (KH₂PO₄, 50 μM) 固形培地に移植し、6 日間栽培した。Bar は 1 mm を示す。(b) 根端 2-3 mm の根毛密度 (a) を定量化した (n=10, 1 反復)。データは平均値±標準偏差 (Student's *t*-test, ** *P* < 0.01; NS, not significant) を示す。

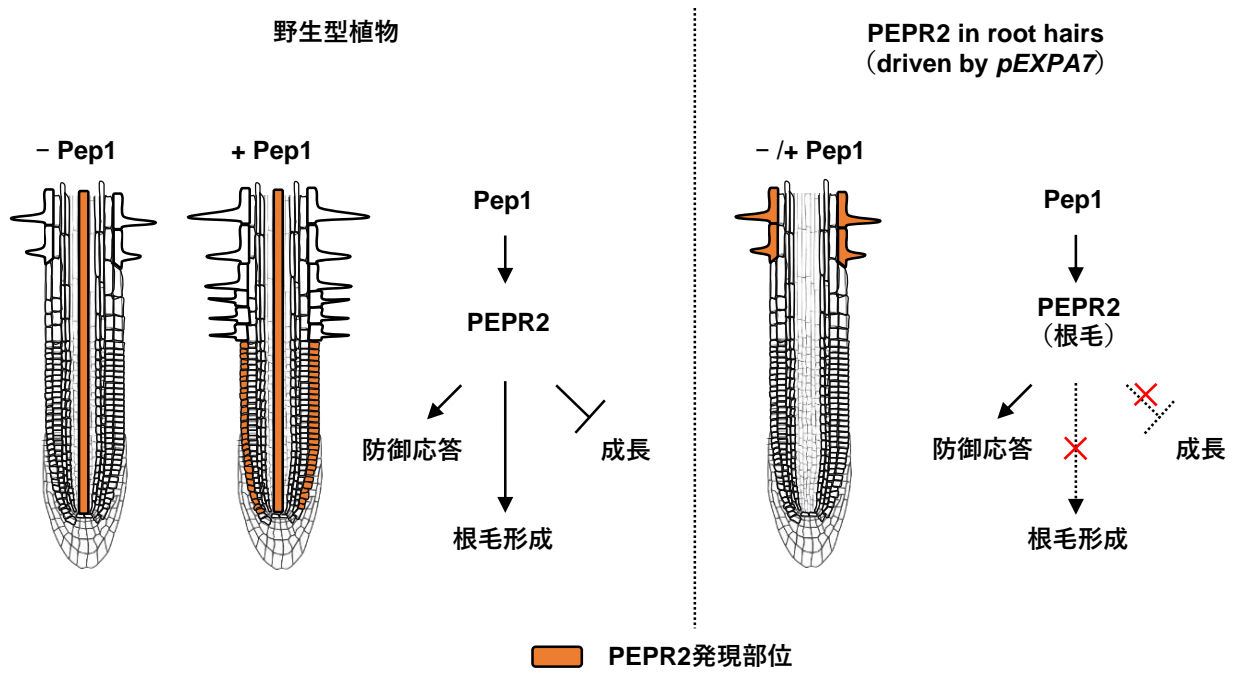


図 1-4-2 根での PEPR2 による Pep1 応答の制御モデル

野生型植物では、PEPR2 が中心柱で主に発現し、Pep1 応答時には根端分裂組織に発現が拡大する。Pep1 は防御応答、根毛形成、主根の伸長（成長）抑制を誘導する。根毛で特異的に PEPR2 を発現させた植物体 (*pEXPA7::PEPR2-GFP/pepr1 pepr2*) では、PEPR2 は Pep1 応答時に主根の成長を阻害することなく、防御応答を誘導する。

第 2 章

シロイヌナズナのカロース合成酵素 PMR4 (GSL5) によるリン枯渇環境への適応

2-1 序論

2-1-1 リン枯渇環境

リンは植物の多量必須元素として、体内の核酸、リン脂質、ATP といった有機化合物の主要構成成分であり、植物の成長・発達に重要な代謝反応に関与する。植物の利用可能なリン形態は無機態リン酸 (Pi) であるが、Pi を十分に供給できる土壌は限定的であることから (Lynch *et al.*, 2011)、Pi は作物の成長・収量の制限要因になっている (Bielecki *et al.*, 1972; Schachtman *et al.*, 1998)。リン酸肥料を土壌に施肥することにより、植物へ Pi を供給できるが、他の多量必須元素の窒素やカリウムと異なり、原料のリン鉱石は有限であり近い将来枯渇すると推測されている (Steen, 1998; Cordell *et al.*, 2009)。さらに、Fe や Al といった金属イオンや有機物を豊富に含む土壌では、施肥した肥料由来の Pi は金属イオンや有機物に吸着されて固定化されやすく、作物による Pi 吸収利用効率は低くなる (Johnston *et al.*, 2014)。そのため、安定で安全な作物生産の実現に向けて、リン枯渇環境での Pi 吸収や Pi 利用効率等の改善に寄与する分子機構の解明が必要である。

2-1-2 植物のリン枯渇応答

植物はリン枯渇環境下でリン獲得・リン利用の効率化を図るために、リン枯渇応答 (Pi starvation responses: PSRs) と呼ばれる、一連の応答を誘導する (図 2-1-1)。PSR には、リン枯渇環境感知部位での局所的な応答と、全身性のシステミックな応答が含まれる (Péret *et al.*, 2011; Chien *et al.*, 2018)。土壌中のリンは移動しにくい性質を持ち、土壌表層に不均一に分布しており、植物は、根の外部近傍の局所的な Pi 濃度変化に応じて根の形態を変化させる能力を有する (Fitter *et al.*, 2002; Péret *et al.*, 2011)。さらに、植物は体内の Pi 濃度に応じて、土壌からの Pi 吸収や地上部への Pi 輸送を調節することにより、体内の Pi の代謝バランスを調節する (Thilbaud *et al.*, 2010)。

リン枯渇環境での主根の伸長阻害は、LOW PHOSPHATE ROOT 1 (LPR1)、LPR2 および PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2 (PDR2) によって制御されている (Reymond *et al.*, 2006; Svistoonoff *et al.*, 2007; Ticconi *et al.*, 2009)。LPR1 および LPR2 はリン枯渇環境下では根端で発現しており、根端分裂組織 (root apical meristem: RAM) のアポプラストにおいて、Fe²⁺を Fe³⁺に酸化するフェロキシダーゼ活性を持つ (Reymond *et al.*, 2006; Svistoonoff *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2015)。PDR2 が根圏の低リン濃度に依存して、LPR1 を小胞体から細胞膜上に輸送することで、LPR1 はフェロキシダーゼとして機能する (Ticconi *et al.*, 2009)。リン枯渇環境では、転写因子 SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1 (STOP1) によって、リンゴ酸チャネル ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1 (ALMT1) の発現が誘導され、根端におけるアポプラストへのリンゴ酸の輸送が促進される (Balzergue *et al.*, 2017)。

輸送されたリンゴ酸がアポプラスト内の Fe^{3+} と複合体を形成し、原形質連絡 (plasmodesmata: PD) における活性酸素種の産生やカロース蓄積を引き起こす (Müller *et al.*, 2015)。リン枯渇条件での根端幹細胞ニッチ (stem cell niche: SCN) におけるカロース蓄積は、根端分裂組織の分裂に必要な転写因子 SHORT-ROOT (SHR) の中心柱から静止中心 (QC) への PD を介した移動を阻害することで、主根の伸長阻害に寄与すると考えられている (Müller *et al.*, 2015; Mora-Macías *et al.*, 2017; 図 2-1-2)。一方で、リン枯渇条件での側根形成および伸長の制御については分子レベルでの知見が乏しく、オーキシシンシグナルの関与と、PDR2 による正の制御が報告されているのみである (Ticconi *et al.*, 2004; Pérez-Torres *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2018)。

システミックなリン枯渇応答を制御する主要な制御因子としては、MYB 転写因子 PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1) およびそのパラログ PHR1-LIKE 1 (PHL1) が知られている (Rubio *et al.*, 2001; Bustos *et al.*, 2010)。PHR1 および PHL1 は多くのリン枯渇誘導性 (phosphate starvation induced: PSI) 遺伝子上流領域に存在する P1BS (PHR1-binding sequence) 領域に結合し転写を制御する。PHR1 および PHL1 によって制御されるリン栄養関連遺伝子の代表例として、Pi 輸送に関わる PHOSPHATE TRANSPORTER 1 (PHT1) および PHOSPHATE 1 (PHO1)、リン枯渇環境センシング・シグナリングに関与する *microRNA399* や *SYG1/PHO81/XPR1 (SPX1)* が挙げられる (Rubio *et al.*, 2001; Franco-Zorrilla *et al.*, 2004; Bustos *et al.*, 2010)。リン枯渇環境センサーとして機能する SPX1 と PHR1 の相互作用は Pi 濃度に依存的である (Puga *et al.*, 2014)。リン充分環境ではリン酸結合型の SPX1 が PHR1 と相互作用することにより、PHR1 の核内移行を阻害している一方で、リン枯渇環境では、SPX1 から PHR1 が解離して核内に移行し、PSR に伴う一連の遺伝子発現が活性化される (Puga *et al.*, 2014)。PHR1 および PHL1 による PSI 遺伝子の発現制御は、アントシアニンの蓄積や Pi 輸送の活性化、根毛形成の誘導などに寄与すると考えられている (Bustos *et al.*, 2010)。

2-1-3 カロース蓄積の役割と蓄積制御

植物は、病原菌感染時などの各種ストレスにさらされた際や、様々な成長・発達段階で細胞膜上に細胞壁マトリックス多糖の一種であるカロースを蓄積する (Aspinall & Kessler, 1957; Jacobs *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2003; Cui & Lee, 2016)。陸上植物が蓄積するカロースは、直鎖の β -1, 3 グルカンと少数の β -1, 6 結合による分岐から構成される (Stone *et al.*, 1984; Scherp *et al.*, 2001)。カロースは UDP-グルコースを基質として、カロース合成酵素遺伝子 *GLUCAN SYNTHASE LIKE (GSL)* によって生合成される。シロイヌナズナの *GSL* 遺伝子はこれまで 12 種類が同定されており、そのうちのいくつかについて機能が報告されている (Ellinger & Voigt, 2014; Wu *et al.*, 2018)。

GSL1 と GSL5 は、花粉母細胞の減数分裂初期に、アポプラスト領域におけるカロー

ス壁の合成を通じて、花粉母細胞の減数分裂を誘導し、花粉の成熟を助ける (Dong *et al.*, 2005; Enns *et al.*, 2005; Nishikawa *et al.*, 2005)。また、カロースは細胞質分裂時に一時的に形成される細胞板の主要な構成成分でもある (Samuels *et al.*, 1995)。GSL6およびGSL8は、細胞板でのカロース蓄積を誘導することにより、細胞質分裂を制御している (Guseman *et al.*, 2010; Seville *et al.*, 2013)。GSL6は細胞板に局在し、他の細胞板関連タンパク質である隔膜形成体およびUDP-グルコーストランスフェラーゼとの相互作用を介して、細胞板上のカロース合成酵素複合体の形成に寄与する (Hong *et al.*, 2001)。また、GSL8機能欠損変異体では細胞質分裂が阻害されていることから、GSL8による細胞板のカロース蓄積が細胞質分裂に必須であることが示唆されている (Thiele *et al.*, 2009)。

PDを介したシグナル分子の細胞間輸送は、PDにおけるカロース蓄積の増大に伴い細胞壁内部の圧力が上昇することで抑制されると考えられている (Sager & Lee, 2014; Wu *et al.*, 2018)。PDのカロース蓄積に関与するGSLとしてこれまで、GSL4、GSL7、GSL8、GSL12が報告されている (Wu *et al.*, 2018)。GSL4はH₂O₂や傷害によってカロース蓄積を誘導するが、その機能はよくわかっていない (Cui & Lee, 2016)。GSL7は、師孔 (sieve pore) でのカロース蓄積を誘導し、師部における物質輸送に関与する (Xie *et al.*, 2011; Xie & Hong, 2011)。GSL8によるPDでのカロース合成は葉の表皮細胞において気孔の分化制御に重要である (Guseman *et al.*, 2010)。また、GSL12は根の発生に寄与することがわかっている (Vatén *et al.*, 2011)。

カロース蓄積の程度は、 β -1, 3 グルカナーゼによる β -1, 3 グルカンの分解とカロース合成酵素による β -1, 3 グルカンの合成とのバランスにより調節され (Chen & Kim, 2009)、これらの調節によって植物の成長・発生、環境適応に寄与すると考えられる。

2-1-4 病原菌感染時のカロース合成酵素 PMR4 (GSL5) の役割

GSL5は上記で説明した花粉発生だけではなく、微生物構成成分 MAMP や傷害によるカロース蓄積の誘導も仲介している (Jacobs *et al.*, 2003; Millet *et al.*, 2010)。病原性糸状菌が宿主植物の葉のクチクラ層から侵入して感染を試みる際に、植物は病原性糸状菌の侵入部位において、カロース蓄積による乳頭状の突起 (パピラ) を形成する (Jacobs *et al.*, 2003)。パピラは β -1,3 グルカンを豊富に蓄積しており、病原性糸状菌に対する物理的バリアーとして働くと考えられている (Jacobs *et al.*, 2003; Chowdhury *et al.*, 2014)。しかしながら、GSL5 機能欠損変異体は、うどんこ病菌 (Powdery mildew) 感染時に侵入部位においてカロース蓄積が見られないものの、サリチル酸 (SA) 依存性的にうどんこ病菌抵抗性を示す。これは、カロース欠損に対するバックアップ防御として SA 依存性の免疫応答が活性化されたためと考えられている。その表現型にもとづき単離された *powdery mildew resistance 4* (*pmr4*) 変異体の原因遺伝子として同定されたのが GSL5 である (Vogel *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2003)。

2-1-5 本章の概要

植物のリン枯渇環境への適応機構については、主要な PSR 制御因子である PHR1・PHL1 と LPR1・LPR2 について一定の知見が得られているが、個々のリン枯渇応答の意義や制御機構の解明には至っていない。本研究に先立ち、本研究室ではリン枯渇環境で根毛にカロース蓄積が誘導されること、さらにそれが既知の PSR 制御因子に非依存的事であることを見出してきた(谷地 修士論文 2019)。よって、新規 PSR 経路の介在が期待されたため、カロース蓄積に至る新規 PSR 経路の解明を進めるとともに、その生理学的役割を調べた。

第一に、リン枯渇応答性のカロース蓄積に関与する遺伝子を同定するために、EMS 変異体集団並びにカロース合成酵素の機能欠損変異体を用いて、リン枯渇応答性のカロース蓄積が誘導されない変異体を選抜した。その結果、カロース合成酵素 PMR4 (GSL5) の変異体では根毛におけるリン枯渇誘導性のカロース蓄積が著しく低下していることを見出した。

第二に、PMR4 (GSL5) のリン枯渇環境での役割を明らかにするために、リン枯渇環境において *pmr4* 変異体の表現型を詳細に解析した。その結果、*pmr4* 変異体では、野生型植物と比較して、リン枯渇環境において根系面積が縮小し、アントシアニンの蓄積が増大していることがわかった。したがって、PMR4 によるカロース蓄積の誘導は主に根毛で観察されるものの、PMR4 が植物体全体としての PSR に促進的に作用することが示唆された。特に、*pmr4* 変異体の地上部における Pi 濃度の低下から、PMR4 が Pi 吸収や根から地上部への Pi 輸送に寄与する可能性が浮かび上がった。

以上のことから、本研究では、リン枯渇応答に関与する新規因子として PMR4 (GSL5) を同定するとともに、それが根の形態変化並びに地上部の Pi 濃度の保持に寄与することを遺伝学的に明らかにした。

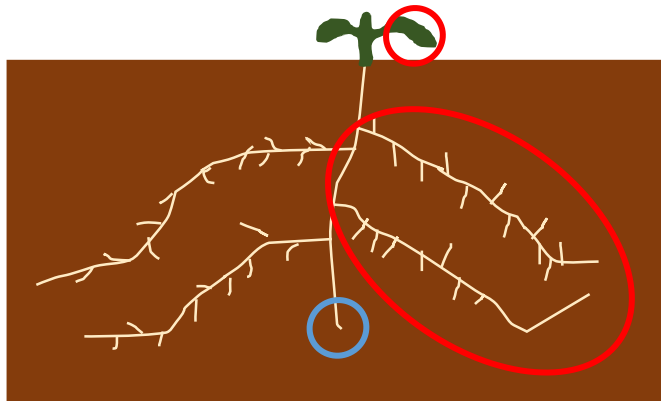
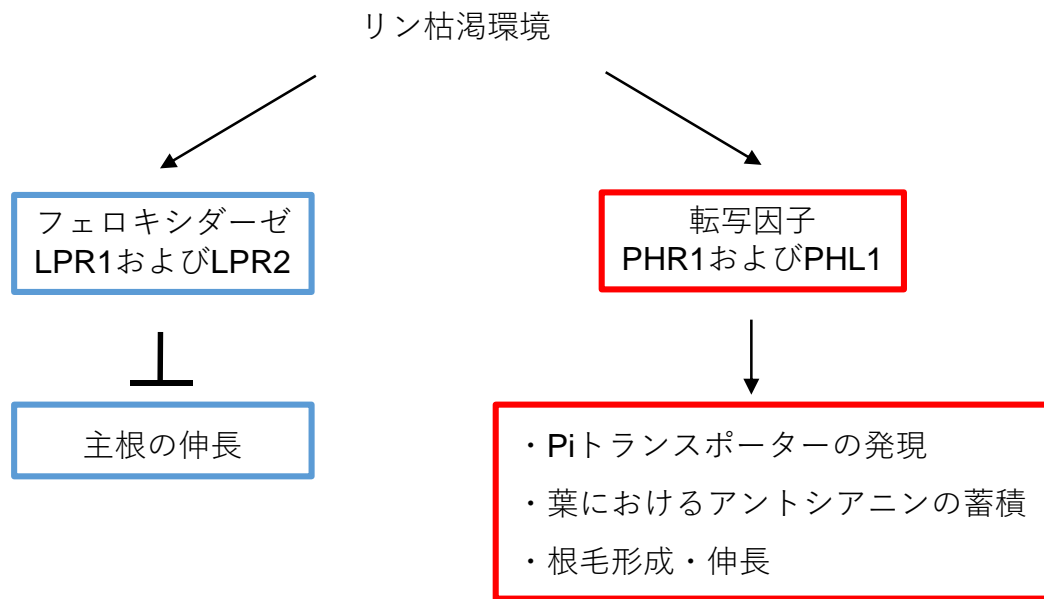


図 2-1-1 植物のリン枯渇応答

シロイヌナズナはリン枯渇環境に適応するために、リン枯渇応答（phosphate starvation response: PSR）と呼ばれる適応応答を誘導する。PSR を制御する主要な経路として、フェロキシダーゼ LPR1 および LPR2 と転写因子 PHR1 および PHL1 を介した 2 つがあげられる。LPR1 および LPR2 は局所的なリン濃度低下に伴う応答として、主根の伸長を阻害する。PHR1 および PHL1 は体内のリン濃度低下に応じてシステミックな部位での Pi トランスポーターの発現、アントシアニンの蓄積、根毛形成などの応答を誘導する。これらの応答は、根の形態変化や植物体内の Pi 代謝の調節を介して、植物の Pi 吸収・利用の効率を高める。

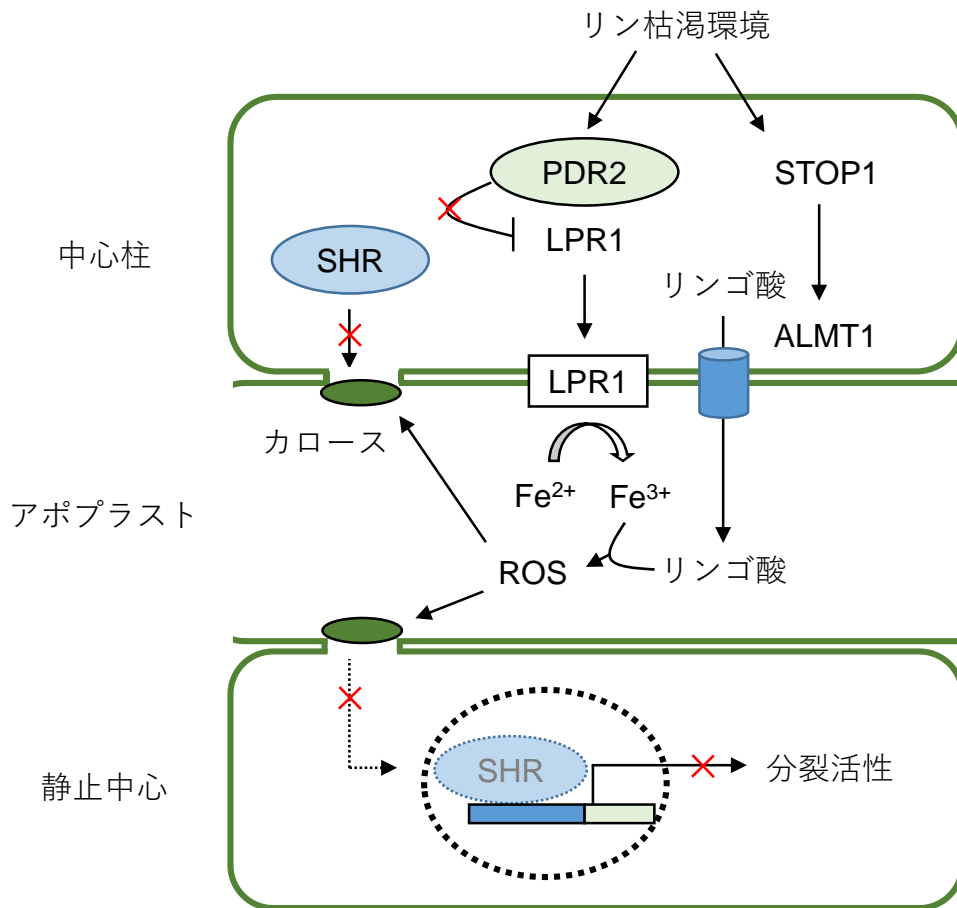


図 2-1-2 根端におけるリン枯渇誘導性のカロース蓄積のモデル図

リン枯渇環境では、LPR1 が PDR2 を介してアポプラストへ輸送され、アポプラストの Fe^{2+} を Fe^{3+} に酸化する。転写因子 STOP1 は、リンゴ酸チャネル ALMT1 の発現を誘導し、ALMT1 は根端におけるアポプラストへのリンゴ酸輸送を促進する。輸送されたリンゴ酸は Fe^{3+} と複合体を形成し、原形質連絡での ROS 産生やカロース蓄積を誘導する。根端分裂組織でのカロース蓄積は、分裂促進転写因子 SHR の中心柱から QC や内皮組織への移動を妨げることで、分裂活性を抑制し、主根の伸長阻害に寄与する。

2-2. 材料と方法

2-2-1 植物材料と栽培方法

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の種子を、6%次亜塩素酸ナトリウムおよび0.2% Triton X-100の混合液で15分間滅菌処理した後、滅菌水で3回洗浄し、4°Cの暗所で1-2日間静置した。本研究では、シロイヌナズナ標準系統であるCol-0及び各種変異体を用いて実験を行った(表2-1)。また、スクリーニングは、Col-0に0.15% EMS (Ethyl Methanesulfonate) を処理したM1世代から得られた7550粒のEMS M2世代の種子を用いた。種子滅菌後、0.8% Agar・25 mM Sucroseを含む1/2×Murashige & Skoog (1/2MS) 寒天培地 (pH5.7; 以下、1/2MS培地と記載する) に播種し、明期12時間、暗期12時間、22°Cに設定したグロースチャンバーで培地を垂直に静置して生育させた。播種後5日目または6日目の実生植物体を、リン充分培地またはリン枯渇培地に移植し試験を行った。土壌での生育試験では、リン枯渇土壌を有機質 黒土 (丸石園芸) と蝦夷砂 (小林産業) を重量比2:1で混合したものをを用いた。滅菌培地で生育した生育10日目の植物体をこれらの土壌に移植し、18日後に生重量を測定した。各試験は基本2-3反復した。詳細な試験方法は後述する。リン充分培地 (625 μ M KH_2PO_4) およびリン枯渇培地 (0 μ M, 10 μ M, 50 μ Mおよび150 μ M KH_2PO_4) はそれぞれ表2-2に示した組成で作成した。

2-2-2 カロース蓄積の観察

カロースの検出はアニリンブルー染色法 (Schenk & Schikora, 2015) を用いた。リン充分条件およびリン枯渇条件の液体培地を6 ウェルプレートの各ウェルに4 ml ずつ添加した。1/2MS 培地で5日間生育させた植物体を液体培地に移植し、3日間処理した後に植物体の脱色・固定を行った。液体培地を除き、脱色液 (エタノール: 酢酸 = 3:1) を4 ml ずつ加えて室温で一晩静置した。その後、脱色液を除き、平衡化液 (150 mM K_2HPO_4 溶液) を添加し、30分間処理した。平衡化処理を行った植物体は、アニリンブルー染色液 (0.1% アニリンブルー、150 mM K_2HPO_4) で3時間染色した後に、倒立型顕微鏡 DMI6000B (Leica) を用いて、根におけるカロース蓄積を観察した。

2-2-3 根毛密度の測定

1/2MS 培地で6日間生育させた植物体を、リン枯渇固形培地へ移植し、6日間静置した。実体顕微鏡 (Leica) を用いて根の画像を取得した。根毛密度の計測領域は、野生型標準系統である Col-0 において、リン枯渇による根毛形成が顕著である根端 2-3 mm の範囲とした。画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて、この領域において伸長が誘導されている根毛数と根毛長を計測した。

2-2-4 主根長並びに根系面積の測定

1/2MS 培地で6日間生育させた植物体を、リン充分・リン枯渇固形培地へ移植し、

10 日間栽培した。その後、根全体の画像をデジタルカメラ Lumix DC-FZ1000M2 (Panasonic) で撮影し、Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて主根長を測定した。主根の伸長阻害は、リン枯渇条件における主根の長さに対するリン充分条件の主根長の比率 (+Pi/-Pi) で求めた。根系面積として、すべての根を含む凸包の面積 (Convex hull area) を画像解析ツール RootNav (Pound *et al.*, 2013) で測定した。

2-2-5 アントシアニン蓄積量の測定

1/2MS 培地で 6 日間生育させた植物体を、リン充分・リン枯渇固形培地へ移植し、10 日間栽培した。3-4 個体分の地上部生重量を測定した後に、液体窒素により瞬間凍結させてサンプルとした。粉碎機 (ヴァーダー・サイエンティフィック社) で破碎した各サンプルに抽出液バッファー (塩酸:メタノール=1:99) を 1 ml 添加して混合し、4°Cで一晩静置した。サンプルを 13,000 rpm で 10 分間遠心し、上澄みを回収した。紫外可視分光光度計 UV-1800 (Shimadzu) を用いて、各サンプルの吸光度 (530 nm, 657 nm) を測定した。以下の計算式から、アントシアニン濃度を算出した。

$$\text{アントシアニン濃度} = (A_{530} - 0.25 * A_{657}) / \text{地上部生重量}$$

2-2-6 無機態リン酸濃度の測定

植物体の無機態リン酸 (Pi) 濃度をモリブデン青法 (Ames, 1966) に基づき測定した。1/2MS 培地で 6 日間生育させた植物体を、リン充分・リン枯渇固形培地へ移植し、10 日間栽培した。それぞれ 3-6 個体分の地上部または根の湿重量を測定し、液体窒素により瞬間凍結させてサンプルとした。粉碎した各サンプル 10 mg に対して 100 μ l の抽出液 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride pH8.0) を添加し、混合した。混合液 100 μ l に 1% 氷酢酸 900 μ l を混合し、42°Cで 30 分間静置した。遠心分離 (13,000 rpm, 10 分間) によって得られた上澄み 100-300 μ l を、700 μ l の反応液 (0.35% NH_4MoO_4 , 0.86 N H_2SO_4 , 1.4% ascorbic acid) と混合し、1 ml に足りない量をブランク溶液 (混合液:氷酢酸=1:9) で調整した。42°Cで 30 分間静置した後、分光光度計 Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf) を用いて、各サンプルの吸光度 (820 nm) を測定した。以下の計算式から、根および地上部の Pi 濃度を算出した。

Pi 濃度 (nmol P/ mg Fw)

$$= ((1.2328 * A_{820} - 0.0189) * \text{希釈倍率}) * (1000/300) * (1000/100) * (\text{抽出液量} / \text{生重量}) / 30.97$$

表 2-1 本章で用いた変異体の一覧

変異体名	背景	参考文献/public stock No.
<i>gsl3</i>	Col-0	SALK_011560
<i>gsl4</i>	Col-0	SALK_037603 / Weler <i>et al.</i> , 2016
<i>gsl5/pmr4-1</i>	Col-0	CS3858
<i>gsl6</i>	Col-0	SALK_152620 / Weler <i>et al.</i> , 2016
<i>gsl7</i>	Col-0	SALK_048921
<i>gsl8</i>	Col-0	SALK_109342 / Xiong-Yan <i>et al.</i> , 2009
<i>gsl9</i>	Col-0	SALK_009569 / Weler <i>et al.</i> , 2016
<i>gsl11</i>	Col-0	SALK_019534
<i>lpr1 lpr2</i>	Col-0	SALK_016297, SALK091930
<i>pho1</i>	Col-0	Poirier <i>et al.</i> , 1991
<i>pmr4 lpr1 lpr2</i>	Col-0	<i>pmr4-1 x lpr1 lpr2</i> (本研究)
<i>phr1 phl1</i>	Col-0	SAIL_731_B09
<i>phr1 ph1 lpr1 lpr2</i>	Col-0	<i>phr1 phl x lpr1 lpr2</i>
<i>pmr4 sid2</i>	Col-0	<i>pmr4-1 x sid2</i>
<i>rhd6</i>	Ws-2	Massuci & Schiefelbein, 1994
<i>sid2</i>	Col-0	Dewdney <i>et al.</i> , 2000

表 2-2 培地組成一覧

試薬	最終濃度				
	リン充分液体培地/固形培地 (+Pi)	リン枯渇液体培地/固形培地 (-Pi)			
MgSO ₄ -7H ₂ O	750 μM				
KH ₂ PO ₄	625 μM	0 μM	10 μM	50 μM	150 μM
NH ₄ NO ₃	10.3 mM				
KNO ₃	9.4 mM				
CaCl ₂ -2H ₂ O	1.5 mM				
CoCl ₂ -6H ₂ O	55 nM				
CuCl ₂ -2H ₂ O	53 nM				
H ₃ BO ₃	50 μM				
KI	2.5 μM				
MnCl ₂ -4H ₂ O	50 μM				
Na ₂ MoO ₄ -H ₂ O	0.5 μM				
ZnCl ₂	15 μM				
Fe-EDTA	71.5 μM				
MES pH5.5	915 μM				
KCl	0 μM	625 μM	615 μM	575 μM	475 μM
Agar (固形培地)	1% Difco bacteriological				

2-3 結果

2-3-1 PMR4 (GSL5) は根毛でのリン枯渇誘導性のカロース蓄積に必要である

リン枯渇条件において根端幹細胞ニッチ (SCN) や伸長領域 (EZ) で起こるカロース蓄積は LPR1 および LPR2 に依存している (Müller *et al.*, 2015; Balzergue *et al.*, 2017)。本研究に先立って、リン枯渇液体培地でカロースが根毛において蓄積することが示されていた (図 2-3-1; 谷地 修士論文 2019)。同条件では、LPR1 および LPR2 に依存的な SCN でのカロース蓄積と、根毛でのカロース蓄積を明確に区別可能であることから、本研究においても液体培地で栽培した植物を用いて実験を行った。

まず初めに、根毛でのカロース蓄積の、PHR1、PHL1、LPR1 および LPR2 の依存性を検証した。機能欠損変異体 *phr1 phl1* および *lpr1 lpr2* において、野生型植物同様に根毛でのカロース蓄積が見られた (図 2-3-1)。さらに、両方の機能を欠損させた *phr1 phl1 lpr1 lpr2* 四重変異体においてもカロース蓄積が野生型植物同様に起こった。このことから、リン枯渇条件において根毛では、既知の PSR 制御因子非依存的にカロース蓄積が誘導されると考えられた。そこで、その誘導に関わる新規の PSR 関連因子を同定するために、リン枯渇条件において根毛でのカロース蓄積を指標に、逆遺伝学的解析と EMS 変異体集団を用いた順遺伝学的解析によってカロース低蓄積変異体のスクリーニングを行った。

カロース合成関連遺伝子 GSL ファミリーの機能欠損変異体におけるカロース蓄積の有無を調べた結果、*gsl5/pmr4-1* 機能欠損変異体では根毛にカロース蓄積が観察されず (図 2-3-2 a)、GSL5 が必要とされることが示唆された。次に、EMS 変異体集団を用いてカロース低蓄積変異体のスクリーニングを、本研究室の修士課程学生の谷地並びに Nguyen と共同で行った (Nguyen 修士論文 2020)。リン枯渇誘導性のカロース蓄積を指標としたスクリーニングで選抜された *caps* (*callose under phosphate starvation*) *1* および *caps2* では、野生型植物と比較してカロース蓄積が顕著に低下していた (図 2-3-2 b)。これら 2 系統は、GSL5 コード領域の塩基配列にアミノ酸非同義置換が生じていた。*caps1* では、260 番目のトリプトファンコドンが終止コドンに置換し、*caps2* では、1323 番目のグルタミン酸コドンがリシンコドンに置換されていた (図 2-3-2 c)。また、*caps2* 変異体の変異箇所は、細胞質に存在するカロース合成ドメインをコードすると推測される領域に位置していた。これらの結果から、GSL5 がリン枯渇誘導性の根毛でのカロース蓄積に寄与していると考えられた。GSL5 機能欠損変異体は、うどんこ病菌 (Powdery mildew) 感染時に抵抗性を示し、*powdery mildew resistance 4* (*pmr4*) 変異体としても単離されている (Vogel *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2003)。

以上のことから、カロース合成関連酵素 GSL5/PMR4 (PMR4) は、PHR1、PHL1、LPR1 および LPR2 に依存せずに、根毛でのカロース蓄積を誘導する因子として同定された。

2-3-2 PMR4 はリン枯渇環境で根の形態変化に寄与する

リン枯渇環境への適応応答における PMR4 依存的なカロース蓄積の役割を明らかにするために、まず無菌培地条件で *pmr4* 変異体の表現型解析を行った。

pmr4 変異体は、リン枯渇条件において、野生型植物と比較して根端 2-3 mm での根毛密度が低く、根毛長が短かった (図 2-3-3)。PMR4 の欠損により、うどんこ病菌など病害ストレスに応じた SA シグナルの活性化が増大され、病害抵抗性がむしろ増強される (Nishimura *et al.*, 2003)。そこで、*pmr4* 変異体の表現型に及ぼす SA の影響を調べるために、SA 生合成酵素 SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2 (SID2) / ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 (ICS1) の機能欠損変異体 (*sid2*) 背景でも同様の解析を行った。両者の根毛密度並びに根毛長は同程度であり、*sid2* 背景では *pmr4* 変異の影響が小さくなることから、PMR4 はリン枯渇環境下で SA 依存的に根毛の発生に寄与することが考えられた。

pmr4 変異体はリン充分条件 (+Pi) およびリン枯渇条件 (-Pi) とともに、野生型植物と比較して主根長が短かった (図 2-3-4 a, b top)。そこで、PSR に伴う主根の伸長阻害の度合いを比較するために、リン枯渇条件に対するリン充分条件での主根長の比率 (+Pi/-Pi) を算出すると、*pmr4* 変異体は野生型植物と比較して同比率が顕著に高かった (図 2-3-4 b bottom)。この比率が高いほど主根の伸長阻害は強く、*pmr4* 変異体では単に主根長が短いだけでなく、リン枯渇誘導性の主根の伸長阻害が増強されることが示唆された。シロイヌナズナへの SA 処理は主根の伸長阻害を誘導することから (Pasternak *et al.*, 2019)、PMR4 の機能欠損に伴う SA による影響を調べた。リン枯渇環境において、*pmr4 sid2* 二重変異体の主根長は *sid2* 変異体より有意に短く、リン枯渇応答に伴う伸長阻害の度合いも増大されていた (図 2-3-4 a, b)。*pmr4 sid2* 変異体と *sid2* 変異体の伸長阻害の度合いの差は、*pmr4* 変異体と野生型との差と同程度であった。よって、リン枯渇環境での主根の伸長阻害が *pmr4* 変異体で増大することは、SA に依存しないことが示唆された。すなわち、PMR4 は SA とは関係なく、リン枯渇環境において主根の伸長阻害を抑える働きがあると考えられた。次に、PSR に伴う根の伸長阻害を仲介する LPR1 および LPR2 (Rubio *et al.*, 2001; Bustos *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2015) と PMR4 との関係性を検証した。*pmr4 lpr1 lpr2* 三重変異体の主根長は、リン栄養条件に関係なく、*lpr1 lpr2* 二重変異体より短かったものの、リン枯渇による主根の伸長阻害の度合いは両者で同程度であった (図 2-3-4 c, d)。すなわち、LPR1 および LPR2 欠損条件では、リン枯渇による伸長阻害への *pmr4* 変異の影響は見られなかった。したがって、PMR4 は、①リン栄養条件並びに LPR1 および LPR2 に依存しない形で主根伸長を促進する役割に加えて、②リン枯渇による LPR1 および LPR2 を介した主根の伸長阻害を制限する役割をもつことが示唆された。

pmr4 変異体の主根以外の根系の表現型を調べたところ、根系面積 (Convex hull area)

では、リン栄養条件に関わらず *pmr4* 変異体が野生型植物より小さかったものの、*pmr4 sid2* 二重変異体は *sid2* 変異体と同程度であった (図 2-3-5)。また、根系面積の比率 (+Pi/-Pi) に関して、*pmr4* 変異体が野生型植物より高かったものの、*sid2* 背景では *pmr4* の影響が見られなかった。これらの結果から、PMR4 が根系面積を正に制御する働きもつこと、並びにその SA 依存性が示唆された。

2-3-3 PMR4 はアントシアニンの蓄積を抑制し SA 依存的に生育の保持に寄与する

続いて地上部のアントシアニンの蓄積および生重量に与える *pmr4* 変異の影響を評価した。厳しいリン枯渇条件 (10 μ M KH_2PO_4) では、*pmr4* 変異体および *pmr4 sid2* 二重変異体ともに、それぞれ野生型植物および *sid2* 変異体と比較して、リン枯渇によるアントシアニン蓄積量がさらに増大した (図 2-3-6 a, b left)。このことから、PMR4 はリン枯渇環境でアントシアニンの蓄積が過度に起こるのを防ぐと考えられる。一方で、この条件下では、*pmr4* 変異体と野生型植物の地上部の生重量に違いは見られなかった (図 2-3-6 b right)。しかしながら、比較的穏やかなリン枯渇条件 (50 μ M KH_2PO_4) で長期間栽培を行った場合には、*pmr4* 変異体は野生型植物より地上部生重量が低かった (図 2-3-7 a, b)。その一方で、*pmr4 sid2* 変異体は、*sid2* 変異体と同程度に低かった。したがって、PMR4 は地上部の生育を保持するのに働き、並びにその作用は SA 依存的事であることが示唆された。リン枯渇土壌においても上記の無菌培地と同様に、*pmr4* 変異体の地上部生重量は野生型の半分ほどに低下した一方で、*pmr4 sid2* 変異体は *sid2* 変異体と同程度に低かった (図 2-3-7 a, c)。また、両条件ともに、*sid2* 変異体は野生型より地上部生重量が低かった (図 2-3-7)。SA 依存的な免疫応答が生育に負に働くにもかかわらず、リン枯渇環境においては SID2 経路または SA を介して生育に寄与する可能性も推測される。これらの結果から、PMR4 は、リン枯渇環境において SA に依存して地上部の生育の保持に寄与することが示唆された。

2-3-4 PMR4 はリン枯渇環境における地上部の Pi 濃度の保持に寄与する

PMR4 が地上部の生育の保持に寄与することから、根と地上部における Pi 濃度を測定して、PMR4 が Pi の吸収・転流に寄与する可能性を検証した。複数の KH_2PO_4 濃度条件のうち、リン枯渇をもたらす 50 μ M および 150 μ M では、*pmr4* 変異体の根の Pi 濃度は野生型と同等である一方で、地上部の Pi 濃度は低かった (図 2-3-8 a)。*sid2* 背景においても根・地上部いずれも同様の傾向にあり (図 2-3-8 b)、SA の有無にかかわらず、PMR4 が地上部の Pi 濃度の保持に働くことが示唆された。したがって、興味深いことに、PMR4 は、リン枯渇環境において SA 依存的に地上部のバイオマスを保持するとともに SA 非依存的に Pi 保持に働くことがわかった。

リン枯渇による PMR4 を介したカロース蓄積は根毛で誘導されるため (図 2-3-2)、根毛が地上部の Pi 保持に果たす役割を検証した。リン枯渇環境において、*rhd6* 変異

体において根の Pi 濃度は野生型と同等であったものの、地上部での Pi 濃度は低かった (図 2-3-9 a)。この結果は、オオムギやシロイヌナズナの根毛形成不全変異体に関する先行研究とも合致するものである (Tanaka *et al.*, 2014; Robertson-Albertyn *et al.*, 2017; Holz *et al.*, 2018)。なお、根から地上部への Pi 輸送は Pi トランスポーターPHO1 に依存しており (Stefanovic *et al.*, 2007)、*pho1* 変異体では、上記の *pmr4* や *rhd6* とは逆に、根の Pi 濃度が野生型より増大する一方で、地上部の Pi 濃度は低下することが本条件でも確認された (図 2-3-9 b)。よって、PMR4 は、少なくとも PHO1 とは異なるステップで、リン枯渇環境において地上部の Pi 保持に寄与していることが示唆された。

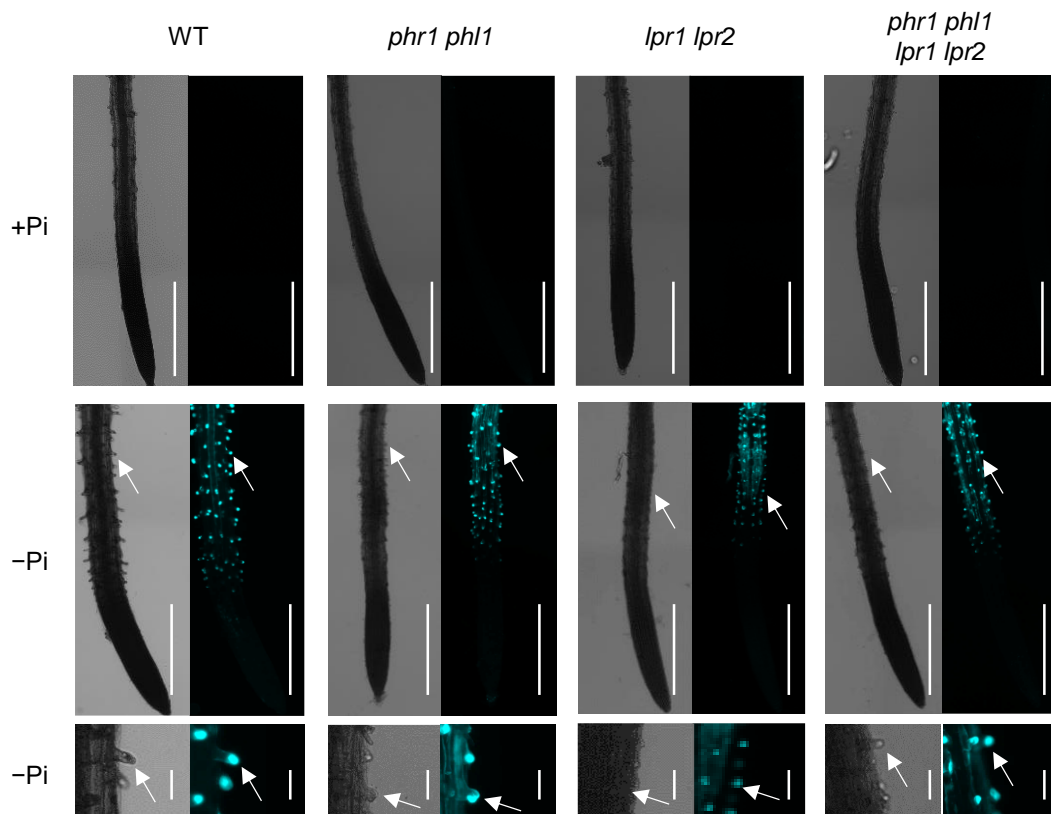


図 2-3-1 リン枯渇誘導性のカロース蓄積は PHR、PHL1、LPR1 および LPR2 に非依存的である。
 1/2MS 培地上で生育した 5 日目の植物体をリン充分 (+Pi: KH_2PO_4 , 625 μM) 液体培地 またはリン枯渇 (-Pi: KH_2PO_4 , 50 μM) 液体培地に 3 日間さらした (top, middle)。アニリンブルー染色法により、根毛におけるカロース蓄積を示した(左;明視野、右;DAPI)。白矢印はカロース蓄積部位を示す。(bottom) -Pi 液体培地 (middle) の拡大画像で、根毛でのカロース蓄積を示す。Bar は 500 μm (top, middle)、50 μM (bottom) を示す。

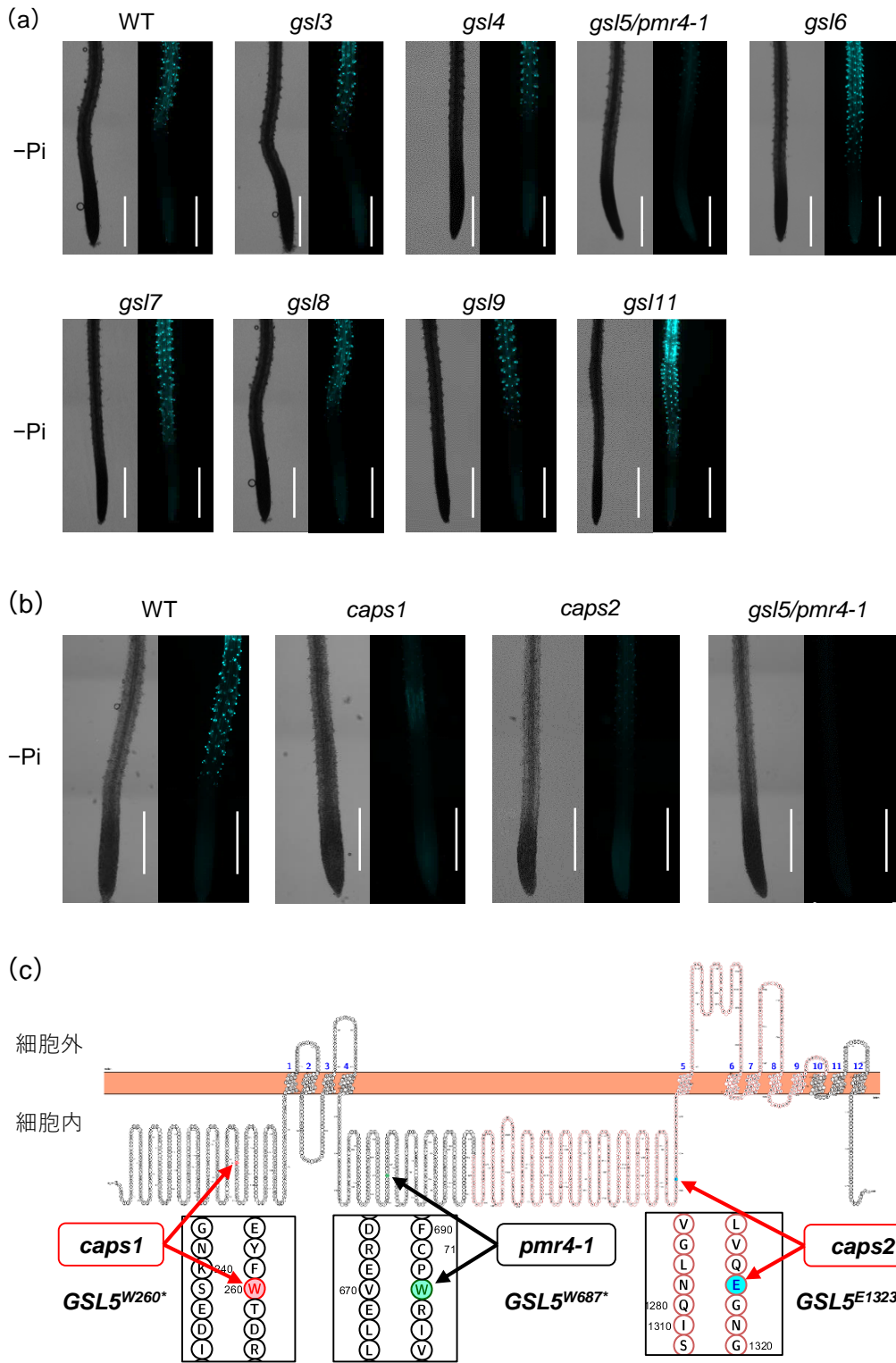


図 2-3-2 *GSL5/PMR4* はリン枯渇誘導性のカロース蓄積に必要である。

(a, b) 1/2MS 培地上で生育した 5 日目の植物体をリン枯渇 (-Pi: KH_2PO_4 , a 50 μM , b 0 μM) 液体培地に 3 日間さらした。アニリンブルー染色により、根毛におけるカロース蓄積を示した (左; 明視野、右; DAPI)。Bar は 500 μm である。(c) EMS 選抜変異体 (*caps1*, *caps2*) の *GSL5* 遺伝子座における一塩基置換部位 (Protter を用いて作成; Omasits *et al.*, 2014) を示す。

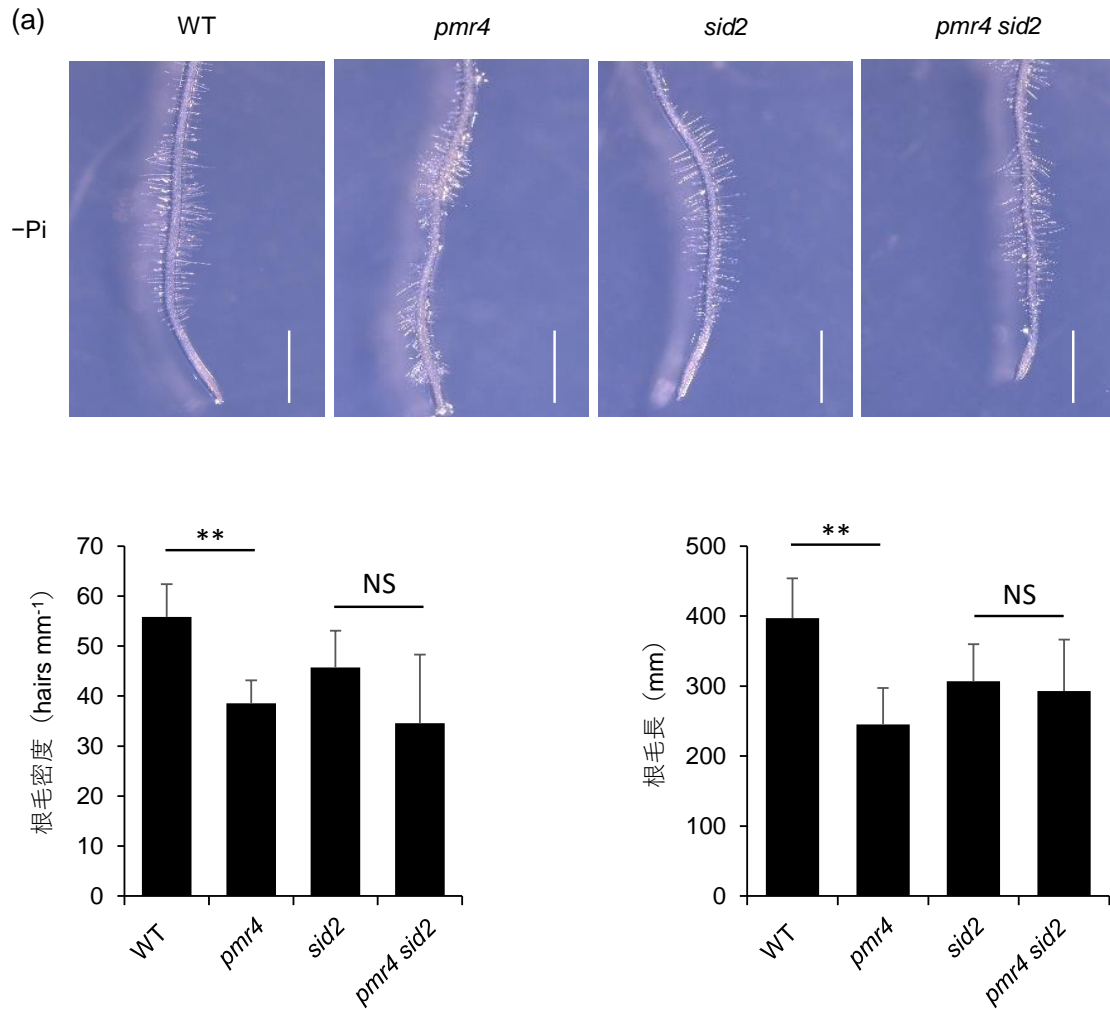


図 2-3-3 PMR4 はリン枯渇環境下で SA 依存的に根毛の発生に寄与する。

(a) 1/2MS 培地上で生育した 6 日目の植物体をリン枯渇 (-Pi:KH₂PO₄, 50 μM) 固形培地に 6 日間さらした。Bar は 1 mm を示す。(b) 根端 2-3 mm (a) の根毛密度と根毛長を定量化した。データは平均値±標準偏差 (SD) を示す (n=8-10, Student's *t*-test: ** *P* < 0.01, NS; not significant)。

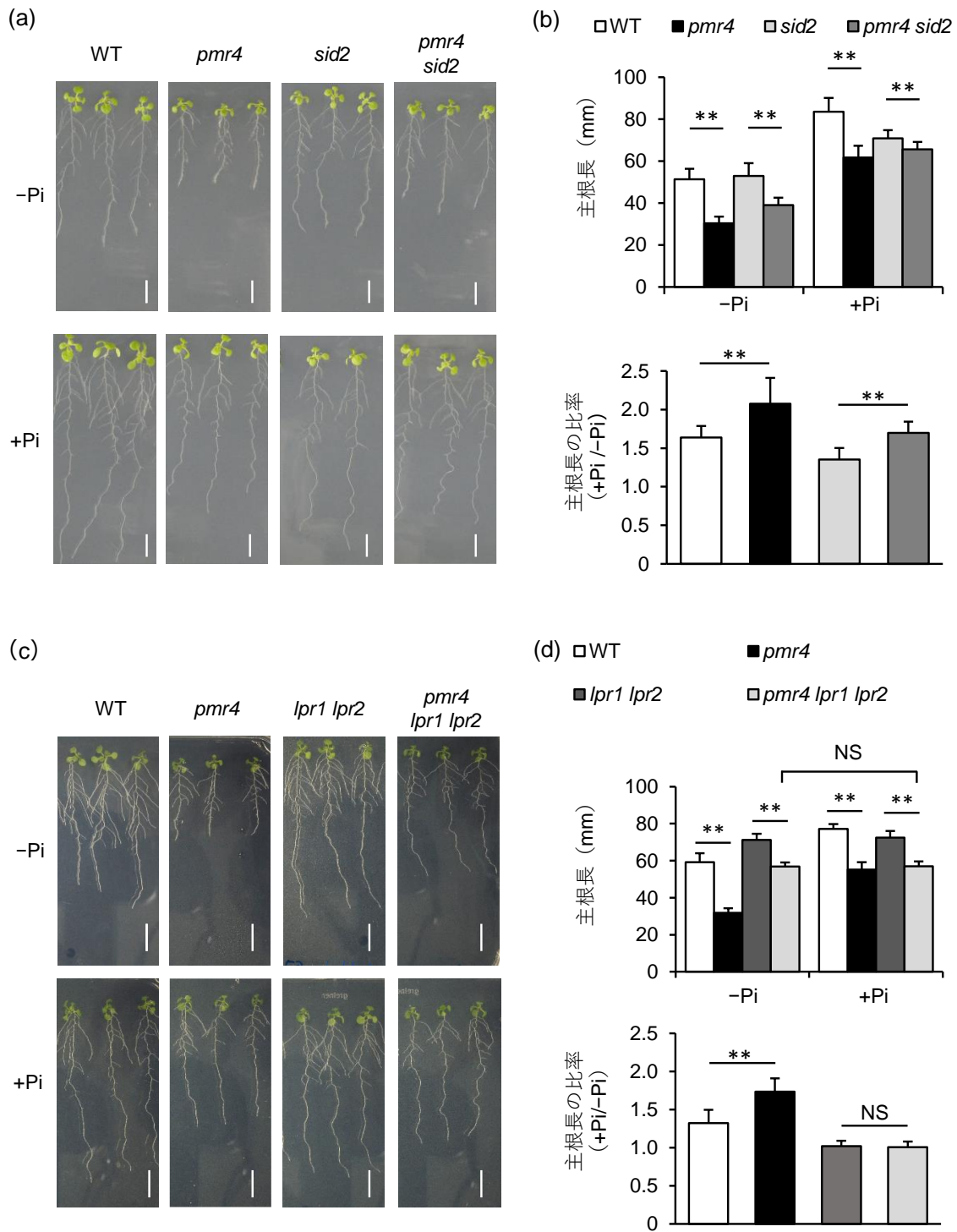


図 2-3-4 PMR4 は、リン枯渇環境で LPR1・LPR2 を介した主根の伸長阻害が過度に起こるのを防ぐ。

(a, c) 1/2MS 培地上で生育した 6 日目の植物体をリン枯渇 (-Pi: KH_2PO_4 , a 50 μM , c 150 μM) 固形培地またリン充分 (+Pi: KH_2PO_4 , 625 μM) 固形培地に移植し 6 日間生育した。Bar は 10 mm を示す。(b, d) 主根長 (a, c) を定量化した。主根の伸長阻害の度合いとして、-Pi 培地の主根長に対する+Pi 培地の主根長の比率 (+Pi/-Pi) を求めた。データは平均値±標準偏差 (SD) を示す (n=13-20, Student's *t*-test: ** $P < 0.01$; NS, not significant)。

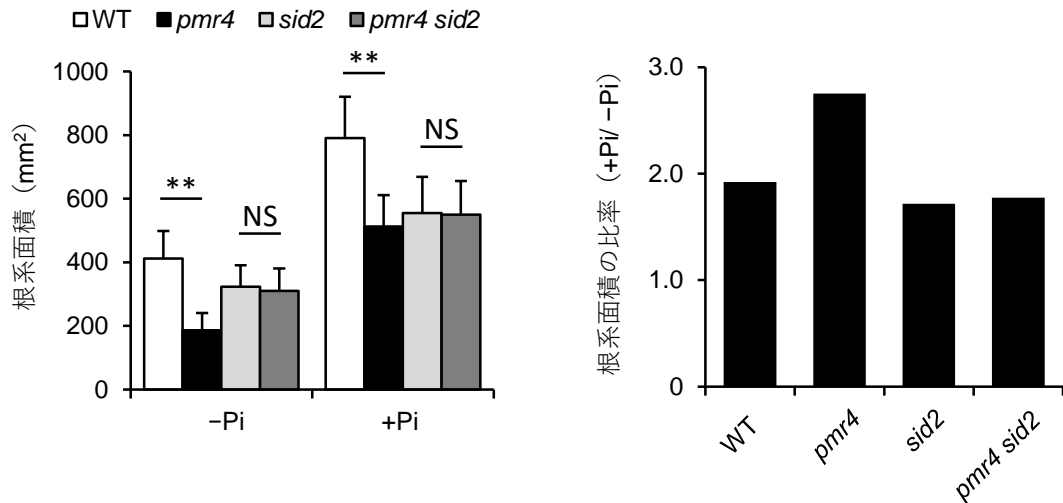


図 2-3-5 PMR4 は SA 依存的に根系の発達に寄与する。

1/2MS 培地上で生育した 6 日目の植物体をリン枯渇培地 (-Pi:KH₂PO₄, 50 μM) またリン充分栄養培地 (+Pi:KH₂PO₄, 625 μM) に移植し、6 日間さらした。根系面積を定量化した。リン枯渇による影響の度合いを -Pi 培地の根系面積に対する +Pi の根系面積の比率 (+Pi/-Pi) で求めた。データは平均値±標準偏差 (SD) を示す (n=15, Student's *t*-test: ** *P* < 0.01; NS, not significant)。

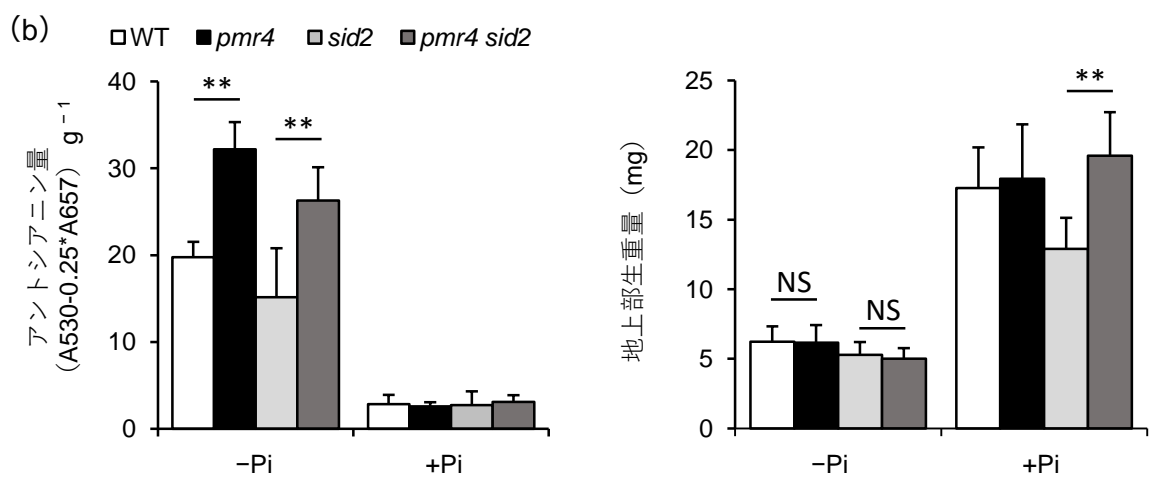
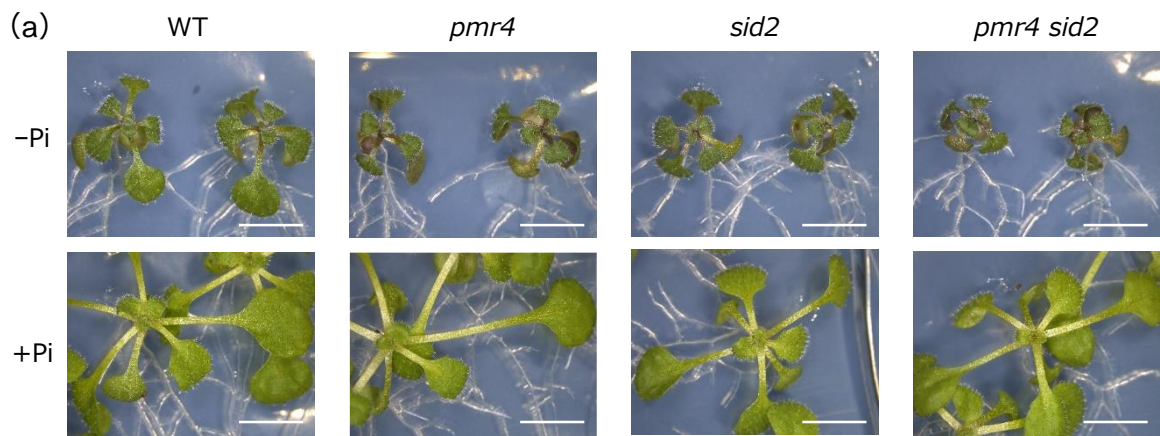


図 2-3-6 PMR4 は、リン枯渇環境でアントシアニンの蓄積が過度に起こるのを防ぐ。

(a) 1/2MS 培地上で生育した 6 日目の植物体をリン枯渇 (-Pi: KH_2PO_4 , 10 μM) 固形培地またはリン充分 (+Pi: KH_2PO_4 , 625 μM) 固形培地に移植し 10 日間生育した。Bar は 5 mm を示す。(b) アントシアニン量 (n=4) と地上部生重量 (n=13-20) を測定した (a)。データは平均値±標準偏差 (SD) を示す (Student's *t*-test: ** $P < 0.01$; NS, not significant)。

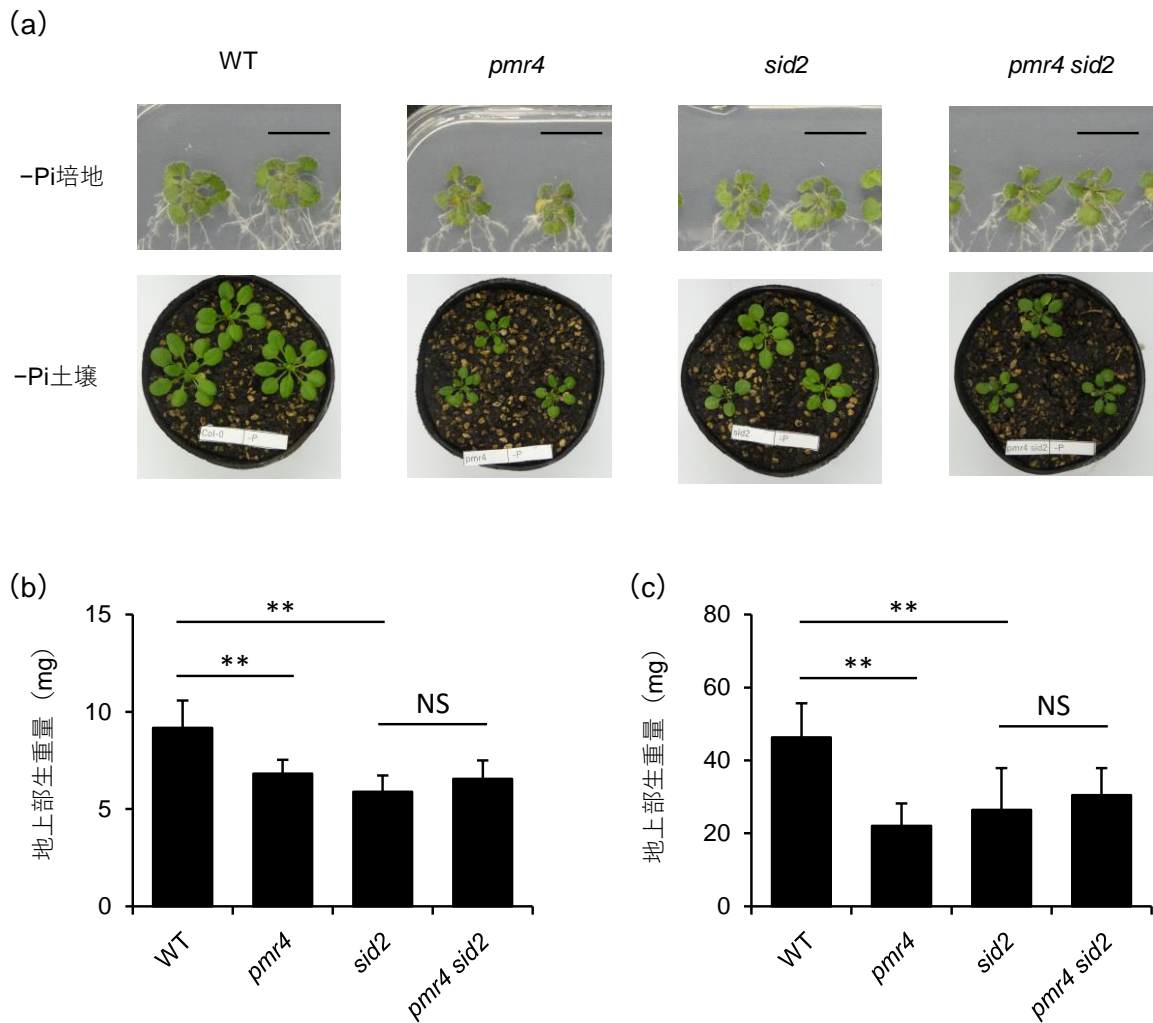


図 2-3-7 PMR4 は、リン枯渇環境において SA 依存的に生育保持に寄与する。

(a, top) 1/2MS 培地で生育した 6 日目の植物体をリン枯渇 (-Pi: KH_2PO_4 , 50 μM) 固形培地に移植して 16 日間栽培した。Bar は 10 mm を示す。(a, bottom) 1/2MS 培地で生育した 9 日目の植物体をリン枯渇土壤 (-Pi 土壤) に移植して 18 日間栽培した。(b) 地上部生重量を測定した (a, top; n=13-14)。(c) 地上部生重量を測定した (a, bottom; n=14-17, 1 反復)。(b, c) データは平均値±標準偏差 (SD) を示す (Student's *t*-test: ** $P < 0.01$; NS, not significant)。

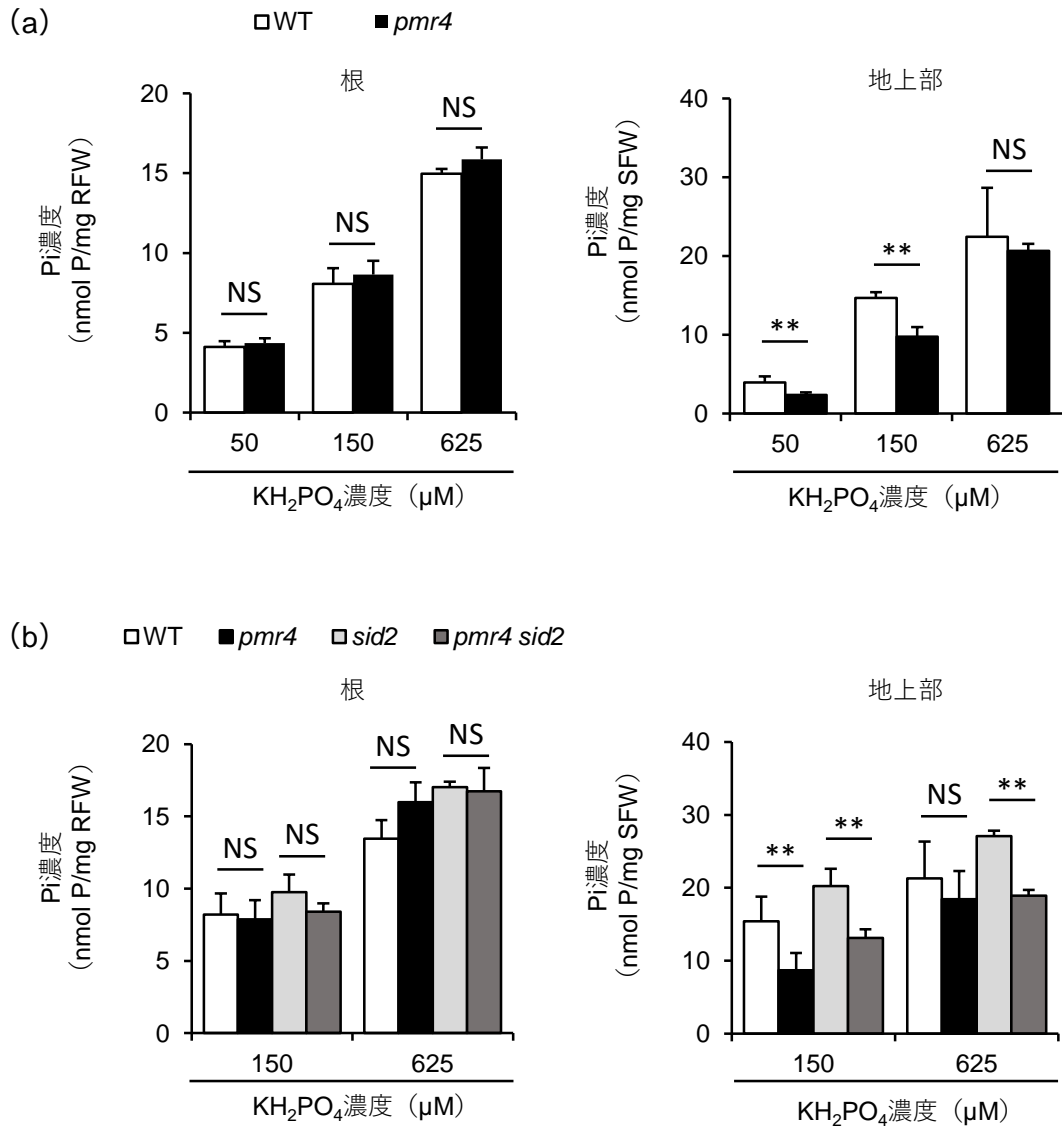


図 2-3-8 PMR4 は、リン枯渇環境において SA 非依存的に地上部 Pi 濃度の保持に寄与する。

(a, b) 1/2MS 培地上で生育した 6 日目の植物体をリン枯渇 (KH₂PO₄, 50, 150 μM) 固形培地またリン充分 (KH₂PO₄, 625 μM) 固形培地に移植し、9 日後に根と地上部に分けて、それぞれ地上部生重量 (SFW) または根生重量 (RFW) あたりの Pi 含有量を測定した。データは平均値±標準偏差を示す (n=3-4, Student's *t*-test: ** *P* < 0.01; NS, not significant)。

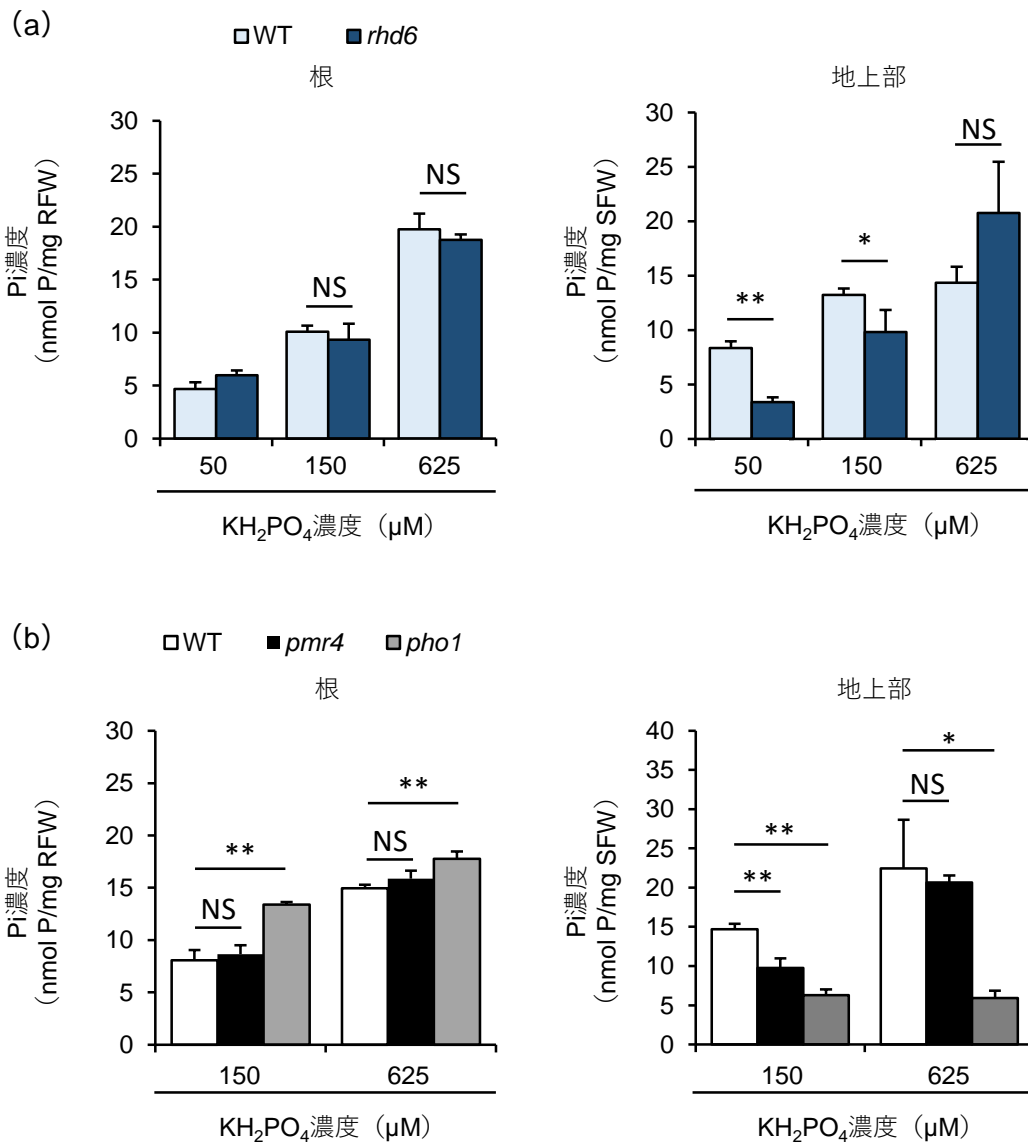


図 2-3-9 地上部 Pi の蓄積は、根毛並びにリン酸トランスポーターPHO1 に依存する。

(a, b) 1/2MS 培地上で生育した 6 日目の植物体をリン枯渇培地 (-Pi: KH_2PO_4 , 50, 150 μM) またはリン充分培地 (+Pi: KH_2PO_4 , 625 μM) に移植し、9 日後に根と地上部に分けてそれぞれ、地上部生重量 (SFW) または根生重量 (RFW) あたりの Pi 含有量を測定した (1 反復)。データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) を示す (n=3-4, Student's *t*-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NS, not significant)。

2-4 考察

2-4-1 PMR4 によるカロースの蓄積

病原菌侵入部位や花粉母細胞での PMR4 (GSL5) によるカロース蓄積は、それぞれ、病害抵抗性や花粉の発生に重要であると考えられている (Aspinall & Kessler, 1957; Enns *et al.*, 2005; Ellinger *et al.*, 2013)。花粉発生に際しては GSL5 に加えて GSL1 が冗長的に機能する一方、防御応答では GSL5 (PMR4) のみが責任酵素となっている (Jacobs *et al.*, 2003; Enns *et al.*, 2005; Ellinger & Voigt, 2014)。本研究で試験した *gsl* 単独欠損変異体のうち、根毛におけるリン枯渇誘導性のカロース蓄積が観察されなかったのは、*pmr4/gsl5* 変異体のみであった (図 2-3-2 a)。さらに、リン枯渇環境においても SA 関連遺伝子の発現や SA の蓄積が誘導されるものの (Morcillo *et al.*, 2019)、根毛でのカロース蓄積は SA 生合成を必要としない (谷地 修士論文 2019)。この点に関して、うどんこ病菌感染や MAMP により誘導されるカロースの蓄積も PMR4 依存かつ SA 非依存である (Millet *et al.*, 2010)。よって、リン枯渇により根毛で誘導されるカロース蓄積は、葉での防御応答に伴うカロース蓄積と、SA 非依存で誘導される点で共通しており、類似性が高い仕組みによって調節されていることが考えられる。

PMR4 のカロース合成活性がリン枯渇条件において高まるか、またはカロース分解酵素の活性が弱まる可能性が考えられるが、現時点では定かではない。なお、予備的知見より、PMR4 遺伝子の発現レベルはリン枯渇条件とリン充分条件で同程度であった (図 2-4-1)。また、病原菌接種時のカロース蓄積では、PMR4 と複合体を形成する GTPase の RabA4c を過剰発現させることで、カロース蓄積が促進される (Ellinger *et al.*, 2014)。そのため、リン枯渇環境においても、PMR4 の活性が複合体構成要素によって翻訳後に調節される可能性も考えられる。植物がリン枯渇を感知してから PMR4 を介してカロース蓄積を誘導する仕組みは不明な点が多いものの、少なくとも、既知の PSR 制御因子 PHR1、PHL1、LPR1 および LPR2 に非依存であり (図 2-3-1)、未知のリン枯渇センサー (PSR 経路) の介在が予想される。根毛でのカロース蓄積は、重金属ストレスおよび当研究室で行った低窒素条件や低鉄条件では誘導されていない (O'Leary *et al.*, 2018; 谷地 修論 2019)。そのため、根毛でのカロース蓄積はリン枯渇特異的シグナルによるものだと考えられる。未知のリン枯渇センサーを探索する方法としては、PSR 制御因子の四重変異体背景の EMS 変異体を用いて低カロース蓄積変異体のスクリーニングがあげられる。

2-4-2 PMR4 による地上部の Pi 濃度の保持

PMR4 は根毛でのカロース蓄積に働くとともに、全身でのリン枯渇応答にも寄与することが示唆される (図 2-3-4, 2-3-5, 2-3-6, 2-3-7, 2-3-8)。本研究では検出されなかつ

た根毛以外の部位でのカロース蓄積を介している可能性は否定できないものの、根毛形成不全変異体でも地上部での Pi 蓄積が低下すること（図 2-3-9 a）から、根毛でのカロース蓄積が根毛の機能に働きかけ、根から地上部への Pi 輸送に寄与していると考えられる。

植物体内の Pi 濃度は、Pi トランスポーターによる Pi の吸収・輸送や Pi 利用の効率化、根の形態変化による物理的変化によって調節される（Rouached *et al.*, 2010; Péret *et al.*, 2011）。リン栄養条件に関わらず、リン吸収に主として寄与している Pi トランスポーターは PHT1;1 および PHT1;4 であり、主に主根や側根の根端において機能している（Shin *et al.*, 2004; Kanno *et al.*, 2016）。

根毛の有無や長さは、根や地上部の Pi 濃度やバイオマスに影響する（Gahoonia & Nielsen, 2004; Brown *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2014）。根毛形成不全変異体では、根全体で発現する PHT1;1 や PHT1;2、中心柱で発現する PHT1;5 といった Pi トランスポーターの発現レベルもリン枯渇環境下で低下しており、これらの発現が根毛での Pi 吸収または維管束への輸送に応じたものであると考えられている（Nussaume *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2014）。*pmr4* 変異体も根毛形成不全変異体と同様に根では正常で地上部においてのみ Pi 濃度の低下が見られたことから（図 2-3-8, 2-3-9）、これらのトランスポーターの発現が低下している可能性が考えられる。

さらに、植物の全身における Pi 濃度の調整には、根から地上部へ、そしてソース組織（古い葉）からシンク組織（根や若い葉）への Pi 輸送も重要である（Chiou *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2018）。これらの Pi 輸送には、師部や木部で機能発現する PHT1;5 や PHO1 がトランスポーターとして機能している（Hamburger *et al.*, 2002; Mudge *et al.*, 2002; Nagarajan *et al.*, 2011）。根から地上部への Pi 輸送が低下した *pho1* 変異体は、根の Pi 濃度が高く、地上部の Pi 濃度が低い（Hamburger *et al.*, 2002; Stefanovic *et al.*, 2007）。*pmr4* 変異体は *pho1* 変異体と Pi 濃度バランスが逆転することから、単純に根から地上部への Pi 転流機能に支障をきたしている可能性は考えにくい（図 2-3-9 b; Stefanovic *et al.*, 2007）。PMR4 の機能部位の解明とともに、Pi の吸収や転流などどの過程に寄与しているかについても、*pmr4* 変異体における Pi の動態変化をトレースすることで明らかにする必要がある。

2-4-3 PMR4 は免疫応答とリン枯渇環境への適応に機能する

PSR 制御因子 PHR1・PHL1 は、リン枯渇環境において、微生物相互作用の制御にも寄与する（Hiruma *et al.*, 2016; Castrillo *et al.*, 2017; 田中 修士論文 2018; Lee 博士論文 2020）。リン枯渇環境における PHR1 および PHL1 の二重欠損変異体では、うどんこ病菌接種後における *pmr4* 変異体のトランスクリプトーム解析と同様に、合成微生物群集の接種後に SA 依存的な防御応答関連遺伝子の発現が野生型植物より強く誘導される（Vogel & Somerville, 2000; Nishimura *et al.*, 2003; Castrillo *et al.*, 2018）。病原性微

生物の中には、PTIに伴う PMR4 を介したカロース蓄積を阻害するエフェクターを分泌するものが知られており (Underwood *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011)、それに対するバックアップ機能として SA シグナルに基づく抵抗性の誘導があると考えられる。PHR1・PHL1 の機能低下によっても SA 生合成や応答性が高まるということは、病原性微生物が植物に感染する際に同経路を標的としており、対抗措置としてそのような免疫バックアップシステムが進化してきた可能性が推察される。

PMR4 はリン枯渇環境下で、PHR1 および PHL1 経路に依存した地上部の生育や Pi 濃度の保持に促進的に働く (図 2-3-7, 図 2-3-8) と同時に、LPR1 および LPR2 経路に依存した主根の伸長阻害には抑制的に働く (図 2-3-4)。PMR4 を介したカロース蓄積は両 PSR 経路に独立である一方で、両 PSR 経路とともに作用する働きも持つ。そのような因子はこれまでに報告されておらず、PMR4 を介したカロース蓄積は両 PSR 経路のバランス制御に働くと考えられる。また、上記の PMR4 の役割から、両 PSR 経路が互いに拮抗的に働く場面があることも推察される。

PMR4 による地上部の生育保持は、Pi 濃度と異なり、SA シグナルによる制御を受けることが示唆された (図 2-3-7, 図 2-3-8)。地上部の Pi 濃度は *sid2* 変異体背景においても PMR4 欠損により低下したことから、PMR4 による地上部 Pi 濃度の保持は SA 非依存的に働くと考えられる。SA は、防御応答の活性化に貢献することで生育に抑制的に働く一方で (Huot *et al.*, 2014; Lozano-Duran & Zipfel, 2015)、興味深いことに、リン枯渇環境においては生育に促進的に働く可能性が示唆された (図 2-3-7)。近年、SA は、SA シグナル伝達系の鍵転写補助因子の NPR1 を介して、生物学的ストレスや非生物学的ストレスに対して植物細胞の生存に寄与することが報告されている (Zavaliev *et al.*, 2020)。リン枯渇環境におけるそのメカニズムは不明であるものの、SA の蓄積や SA 関連遺伝子の発現はリン枯渇環境でも誘導されることから (Morcillo *et al.*, 2019)、PSR における SA の役割について今後の解明が待たれる。

2-4-4 第 2 章のまとめ

植物はリン枯渇環境下で、植物体内外の Pi 獲得・利用効率の調節によって、Pi 不足に起因する成長低下を緩和する (Péret *et al.*, 2011; Chien *et al.*, 2018)。植物のリン枯渇環境への適応応答は、根系の形態変化やリン吸収・転流機構といった様々な角度から生理学的なメカニズムの解明が進められてきた。その中で、本研究は、リン枯渇環境下で根毛に蓄積するカロースの誘導に関わる因子として、カロース合成酵素 PMR4/GSL5 を同定した。さらに、PMR4/GSL5 は根系の形態変化や地上部の Pi 濃度・生育を保持することから、適応応答にも寄与することを遺伝学的に明らかにした (図 2-4-2)。

今後の展望として、PMR4 によるリン枯渇環境適応機構に迫るために、根毛でのカロース蓄積の役割を明らかにしていく必要がある。根毛でのカロース蓄積の役割は未

解明であるが、本研究で得られた知見およびこれまで報告されている根毛による Pi 吸収への寄与や Pi トランスポーターによる Pi 輸送制御から、PMR4 は根毛を介した Pi 吸収または維管束組織を介した輸送に関与することが推測される。そのため、PMR4 を根毛でのみ発現させた植物体または根毛特異的にカロース蓄積を阻害する植物体を用いて、PMR4 の機能部位と PSR の解析や Pi 動態のトレースを行い、根毛でのカロース蓄積の役割を検証する。

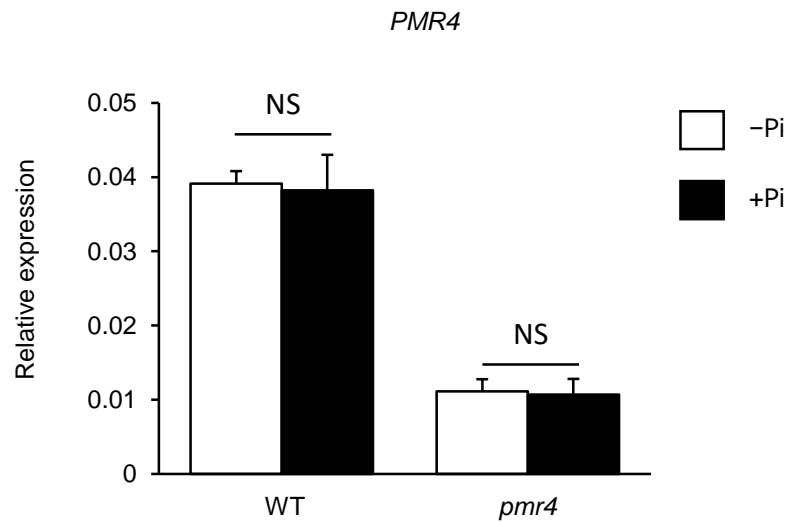


図 2-4-1 *PMR4* の発現レベルはリン枯渇環境で変化しない。

(a, b) 1/2MS 培地上で生育した 6 日目の植物体をリン枯渇培地 (-Pi: KH_2PO_4 , 50 μM) またはリン充分培地 (+Pi: KH_2PO_4 , 625 μM) に移植して 6 日後に根を回収し、RT-qPCR で解析した。*PMR4* 遺伝子発現量を *ACTIN2* に対する相対値で示す。データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) (n=3, 1 反復) を示す (Student's *t*-test: NS, not significant)。

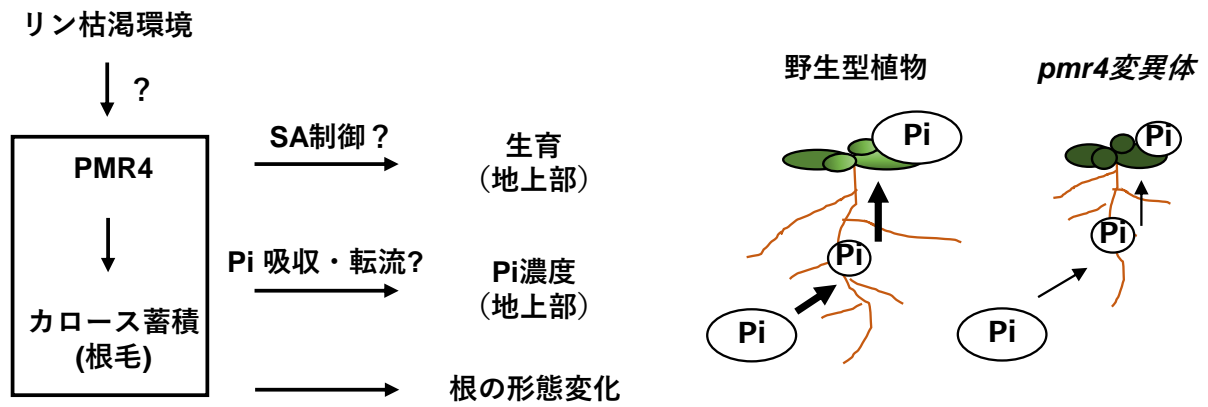


図 2-4-2 PMR4 はリン枯渇応答に作用し、リン枯渇環境への適応に寄与する。

カロース合成酵素 PMR4 は、リン枯渇環境において根毛でのカロース蓄積を誘導する。PMR4 によるカロース蓄積は、根の形態変化（主根の伸長阻害、根毛発生）に寄与する。PMR4 は根系だけでなく、地上部の生育・Pi 濃度の保持に寄与する。地上部の Pi 濃度の保持では、PMR4 による Pi 吸収・転流を介して制御されると推測される。また、PMR4 は SA シグナル依存的に生育の保持に寄与すると考えられる。以上のことから、PMR4 は、植物全体のリン枯渇応答に作用することで、リン枯渇環境への適応に寄与する。

本研究の総括

近年、植物の免疫システムが根の形態変化や環境ストレス応答に幅広い影響を及ぼすことがわかってきている (Nakaminami *et al.*, 2018; Jing *et al.*, 2019; Loo *et al.*, 2020; Saijo *et al.*, 2020)。本研究では、1) ダメージ誘導性 Pep ペプチドによる根毛形成と主根の伸長抑制および 2) カロース合成酵素 PMR4 によるリン枯渇環境におけるカロース蓄積の意義や仕組みの一端について解明を進めた。それぞれの免疫制御因子が免疫制御に限らず、根毛形成やリン枯渇環境への適応に貢献することを明らかにした。

根毛での Pep1 応答は根の形態変化を誘導することなく、病害抵抗性を誘導できると推測された。また、PMR4 はリン枯渇環境時に、根毛でのカロース蓄積に寄与するだけでなく、根または地上部を含めて Pi 動態を制御すると考えられた。両者の共通点として、根毛における免疫制御因子の応答は成長とのバランスを取りながら、システム的にストレス応答を制御している様相が浮かび上がった。つまり、免疫制御因子は環境変化に応じて根毛で作用するならば、成長抑制に関与するシグナルを根端分裂組織や伸長領域に伝達せずに、システム的な応答として防御応答の活性化や Pi 動態の制御を介して環境適応に寄与すると考えられる (図 3)。根毛は、種々の栄養や水の吸収、微生物相互作用に重要な場であり (Haling *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2013)、生物学的・非生物学的ストレスに応じた根毛の発生・伸長の調節は植物の環境適応において重要な役割を果たしている (Zamioudis *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2016; Pecenkova *et al.*, 2017)。様々なストレスに対して柔軟に根毛形成・伸長を調節することで、土壌で不均一に存在する栄養へのアクセスや微生物との相互作用の最適化が図れると考えられている (Rongswat *et al.*, 2020)。本研究は、根毛の役割に対して、免疫制御因子が根毛で作用する新たな視点を提供するものである。今後は、根毛特異的に PEPR2 または PMR4 を発現させた植物などを用いて、根毛のストレス応答制御の特異性・重要性について正確に捕捉するとともに作用メカニズムの詳細を明らかにしていく必要がある。

PEPR2 が生育阻害無しに免疫を活性化するシグナル制御機構や PMR4 によるカロース蓄積が根毛のどのような細胞生理プロセスの制御に寄与しているのか、またそれがどのようにして周囲の細胞・組織にシステム的に作用しているのか、これらの課題については今後の解明が待たれる。

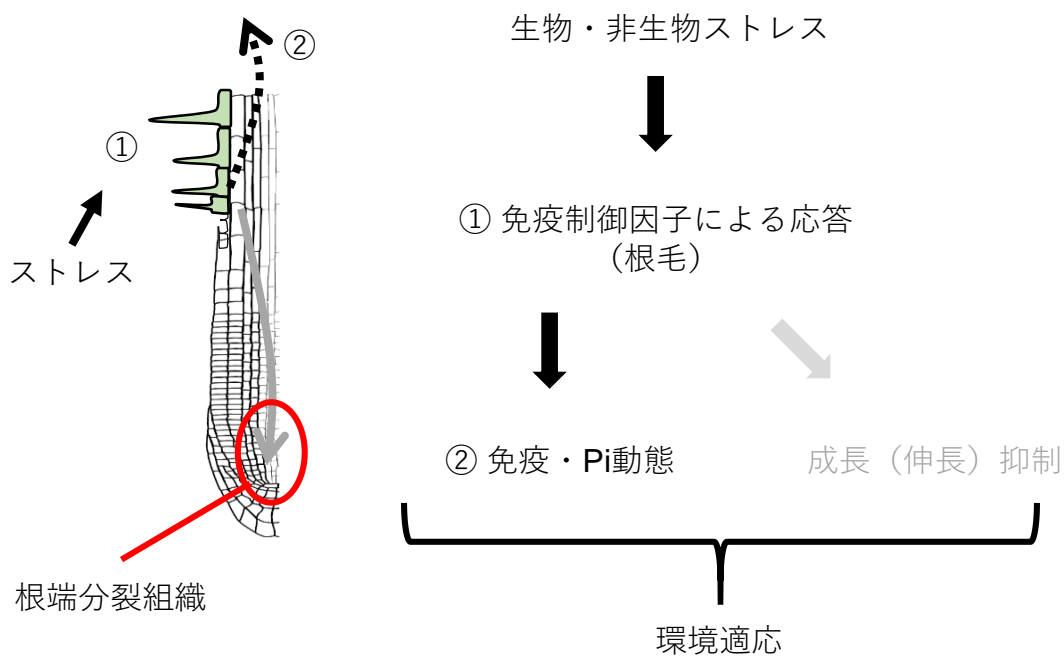


図3 本研究で推察される根毛の役割

免疫制御因子は生物・非生物ストレスといった環境変化に応じて根毛で作用する。その結果、根毛はシステミックな応答として、成長抑制に関与するシグナルを根端分裂組織に伝達せずに、免疫の活性化やPi動態の制御を介して環境適応に寄与すると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、修士課程からご指導・助言をいただきました西條雄介教授、晝間敬客員准教授、郷達明助教に心より深く感謝申し上げます。また、アドバイザーとして、研究に関してご指導いただいた中島敬二教授および梅田正明教授に深く御礼申し上げます。

形質転換植物を作製するにあたり pGWB ベクターを提供してくださった中川強博士（島根大学）、本研究で使用するに当って快く植物リソースを提供してくださった山田晃嗣博士（現・徳島大学）や津田賢一博士（現・華中農業大学）を始め、表 1-1 にまとめた各研究室の方々にお礼申し上げます。

本研究において、様々な面で助けてくださった、舘田知佳助教、田島由理博士、安田盛貴博士、平瀬大志博士、李泰洪博士、久保田裕生氏、大谷幸一氏、谷地洗映氏、Nguyen Tan Anh Nhi 氏を始め、お世話になった研究室の方々に心から感謝申し上げます。最後に、困難の多い大学院生活でしたが、多くの方々に支えられてきたことと温かく見守ってくれた両親に深く感謝し、謝辞といたします。

参考文献

- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR. 1999.** EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 2148–2152.
- Ames BN. 1966.** [10] Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods in Enzymology* **8**: 115–118.
- Aspinall GO, Kessler G. 1957.** The structure of callose from the grape vine. *Chemistry and Industry*, London.
- Balergue C, Dartevelle T, Godon C, Laugier E, Meisrimler C, Teulon JM, Creff A, Bissler M, Brouchoud C, Hagège A, et al. 2017.** Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nature Communications* **8**: 10.1038/ncomms15300.
- Bartels S, Boller T. 2015.** Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. *Journal of Experimental Botany* **66**: 5183–5193.
- Bartels S, Lori M, Mbengue M, Verk M Van, Klauser D, Hander T, Böni R, Robatzek S, Boller T. 2013.** The family of Peps and their precursors in *Arabidopsis*: Differential expression and localization but similar induction of pattern-Triggered immune responses. *Journal of Experimental Botany* **64**: 5309–5321.
- Beck M, Wyrsh I, Strutt J, Wimalasekera R, Webb A, Boller T, Robatzek S. 2014.** Expression patterns of *FLAGELLIN SENSING 2* map to bacterial entry sites in plant shoots and roots. *Journal of Experimental Botany* **65**: 6487–6498.
- Bednarek P, Piślewska-Bednarek, Mariola Svatoš A, Schneider B, Doubský J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, Molina A, et al. 2009.** A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science* **323**: 95–101.
- Berg G, Köberl M, Rybakova D, Müller H, Grosch R, Smalla K. 2017.** Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiology Ecology* **93**: 1–9.
- Bhosale R, Giri J, Pandey BK, Giehl RFH, Hartmann A, Traini R, Truskina J, Leftley N, Hanlon M, Swarup K, et al. 2018.** A mechanistic framework for auxin dependent *Arabidopsis* root hair elongation to low external phosphate. *Nature Communications* **9**: 10.1038/s41467-018-03851-3.
- Bialeski RL. 1972.** Turnover of Phospholipids in Normal and Phosphorus-deficient Spirodela. *Plant Physiology* **49**: 740–745.
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng SH, Sheen J. 2010.** Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* **464**: 418–422.
- Brady SM, Orlando DA, Lee J-Y, Wang JY, Koch J, Dinneny JR, Mace D, Ohler U, Benfey PN. 2007.** A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression Patterns. *Science* **318**: 801–806.

- Brown LK, George TS, Dupuy LX, White PJ. 2013.** A conceptual model of root hair ideotypes for future agricultural environments: What combination of traits should be targeted to cope with limited P availability? *Annals of Botany* **112**: 317–330.
- Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Pérez-Pérez J, Solano R, Leyva A, Paz-Ares J. 2010.** A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **6**: e1001102.
- Castrillo G, Teixeira PJPL, Paredes SH, Law TF, De Lorenzo L, Feltcher ME, Finkel OM, Breakfield NW, Mieczkowski P, Jones CD, et al. 2017.** Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature* **543**: 513–518.
- Chen T, Nomura K, Wang X, Sohrabi R, Xu J, Yao L, Paasch BC, Ma L, Kremer J, Cheng Y, et al. 2020.** A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. *Nature* **580**: 653–657.
- Chen XY, Kim JY. 2009.** Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling and Behavior* **4**: 489–492.
- Chen XY, Liu L, Lee EK, Han X, Rim Y, Chu H, Kim SW, Sack F, Kim JY. 2009.** The *Arabidopsis* callose synthase gene *gs18* is required for cytokinesis and cell patterning. *Plant Physiology* **150**: 105–113.
- Chien PS, Chiang CP, Leong SJ, Chiou TJ. 2018.** Sensing and Signaling of Phosphate Starvation: From Local to Long Distance. *Plant and Cell Physiology* **59**: 1714–1722.
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T. 2007.** A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500.
- Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CL. 2006.** Regulation of Phosphate Homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**: 412–421.
- Chowdhury J, Henderson M, Schweizer P, Burton RA, Fincher GB, Little A. 2014.** Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *New Phytologist* **204**: 650–660.
- Cordell D, Drangert JO, White S. 2009.** The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* **19**: 292–305.
- Couto D, Zipfel C. 2016.** Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology* **16**: 537–552.
- Cui W, Lee JY. 2016.** *Arabidopsis* callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress. *Nature Plants* **2**: 10.1038/NPLANTS.2016.34.
- Dewdney J, Lynne Reuber T, Wildermuth MC, Devoto A, Cui J, Stutius LM, Drummond EP, Ausubel FM. 2000.** Three unique mutants of *Arabidopsis* identify eds loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *Plant Journal* **24**: 205–218.
- Dolan L, Duckett CM, Grierson C, Linstead P, Schneider K, Lawson E, Dean C, Poethig**

- S, Roberts K. 1994.** Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* **120**: 2465–2474.
- Dong X, Hong Z, Sivaramakrishnan M, Mahfouz M, Verma DPS. 2005.** Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **42**: 315–328.
- Dovana F, Mucciarelli M, Mascarello M, Fusconi A. 2015.** *In vitro* morphogenesis of *Arabidopsis* to search for novel endophytic fungi modulating plant growth. *PLoS ONE* **10**: 1–18.
- Eliza P. Loo, Yuri Tajima, Kohji Yamada, Taishi Hirase, Hirotaka Ariga, Tadashi Fujiwara, Keisuke Tanaka, Teruaki Taji, Imre E. Somssich JEP and YS. 2020.** Pattern recognition receptors confer plant salt tolerance via WRKY18/WRKY40 transcription factors. *bioRxiv*: 10.1101/2020.05.07.082172.
- Ellinger D, Glöckner A, Koch J, Naumann M, Stürtz V, Schütt K, Manisseri C, Somerville SC, Voigt CA. 2014.** Interaction of the *Arabidopsis* GTPase RabA4c with its effector PMR4 results in complete penetration resistance to powdery mildew. *Plant Cell* **26**: 3185–3200.
- Ellinger D, Voigt CA. 2014.** Callose biosynthesis in *Arabidopsis* with a focus on pathogen response: What we have learned within the last decade. *Annals of Botany* **114**: 1349–1358.
- Enns LC, Kanaoka MM, Torii KU, Comai L, Okada K, Cleland RE. 2005.** Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. *Plant Molecular Biology* **58**: 333–349.
- Fitter A, Williamson L, Linkohr B, Leyser O. 2008.** Root system architecture determines fitness in an *Arabidopsis* mutant in competition for immobile phosphate ions but not for nitrate ions. *Hungarian Quarterly* **49**: 2017–2022.
- Franco-Zorrilla JM, González E, Bustos R, Linhares F, Leyva A, Paz-Ares J. 2004.** The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *Journal of Experimental Botany* **55**: 285–293.
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M. 2002.** Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the solitary-root/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **29**: 153–168.
- Gahoonia TS, Nielsen NE. 2004.** Barley genotypes with long root hairs sustain high grain yields in low-P field. *Plant and Soil* **262**: 55–62
- Glawischnig E, Hansen BG, Olsen CE, Halkier BA. 2004.** Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 8245–8250.
- Grierson C, Nielsen E, Ketelaarc T, Schiefelbein J. 2014.** Root Hairs. *The Arabidopsis Book*. e0172.
- Guseman JM, Lee JS, Bogenschutz NL, Peterson KM, Virata RE, Xie B, Kanaoka MM,**

- Hong Z, Torii KU. 2010.** Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in *Arabidopsis chorua* (*GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8*). *Development* **137**: 1731–1741.
- Haling RE, Brown LK, Bengough AG, Young IM, Hallett PD, White PJ, George TS. 2013.** Root hairs improve root penetration, root-soil contact, and phosphorus acquisition in soils of different strength. *Journal of Experimental Botany* **64**: 3711–3721.
- Hamburger D, Rezzonico E, Petétot JMDC, Somerville C, Poirier Y. 2002.** Identification and characterization of the *Arabidopsis PHO1* gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell* **14**: 889–902.
- Hander T, Fernández-Fernández AD, Kumpf RP, Willems P, Schatowitz H, Rombaut D, Staes A, Nolf J, Pottier R, Yao P, et al. 2019.** Damage on plants activates Ca²⁺-dependent metacaspases for release of immunomodulatory peptides. *Science* **363**: eaar7486.
- Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, Nakano RT, Hacquard S, Kracher B, Neumann U, Ramírez D, Bucher M, O’Connell RJ, et al. 2016.** Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell* **165**: 464–474.
- Holz M, Zarebanadkouki M, Kuzyakov Y, Pausch J, Carminati A. 2018.** Root hairs increase rhizosphere extension and carbon input to soil. *Annals of Botany* **121**: 61–69.
- Hong Z, Zhang Z, Olson JM, Verma DPS. 2001.** A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate. *Plant Cell* **13**: 769–779.
- Huang KL, Ma GJ, Zhang ML, Xiong H, Wu H, Zhao CZ, Liu C Sen, Jia HX, Chen L, Kjørven JO, et al. 2018.** The ARF7 and ARF19 transcription factors positively regulate *PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1* in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* **178**: 413–427.
- Huffaker A, Pearce G, Ryan CA. 2006.** An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 10098–10103.
- Huffaker A, Ryan CA. 2007.** Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 10732–10736.
- Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. 2014.** Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant* **7**: 1267–1287.
- Iven T, König S, Singh S, Braus-Stromeier SA, Bischoff M, Tietze LF, Braus GH, Lipka V, Feussner I, Dröge-Laser W. 2012.** Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis* roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Molecular Plant* **5**: 1389–1402.
- Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P, Fincher GB.**

- 2003.** An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *Plant Cell* **15**: 2503–2513.
- Jing Y, Zheng X, Zhang D, Shen N, Wang Y, Yang L, Fu A, Shi J, Zhao F, Lan W, et al. 2019.** Danger-associated peptides interact with PIN-dependent local auxin distribution to inhibit root growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **31**: 1767–1787.
- Johnston AE, Poulton PR, Fixen PE, Curtin D. 2014.** Phosphorus. *Its Efficient Use in Agriculture. Advances in Agronomy* (Elsevier Inc.) **123**: 177-228.
- Kanno S, Arrighi JF, Chiarenza S, Bayle V, Berthomé R, Péret B, Javot H, Delannoy E, Marin E, Nakanishi TM, et al. 2016.** A novel role for the root cap in phosphate uptake and homeostasis. *eLife* **5**: 1–16.
- Karasov TL, Chae E, Herman JJ, Bergelson J. 2017.** Mechanisms to mitigate the trade-off between growth and defense. *Plant Cell* **29**: 666–680.
- Krol E, Mentzel T, Chinchilla D, Boller T, Felix G, Kemmerling B, Postel S, Arents M, Jeworutzki E, S Al-Rasheid KA, et al. 2010.** Perception of the Arabidopsis Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor AtPEPR1 and Its Close Homologue AtPEPR2 *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **285**: 13471–13479.
- Kurata T, Ishida T, Kawabata-Awai C, Noguchi M, Hattori S, Sano R, Nagasaka R, Tominaga R, Koshino-Kimura Y, Kato T, et al. 2005.** Cell-to-cell movement of the CAPRICE protein in Arabidopsis root epidermal cell differentiation. *Development* **132**: 5387–5398.
- Kurihara D, Mizuta Y, Sato Y, Higashiyama T. 2015.** ClearSee: A rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development (Cambridge)* **142**: 4168–4179.
- Lee MM, Schiefelbein J. 2002.** Cell pattern in the Arabidopsis root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell* **14**: 611–618.
- Lin Q, Ohashi Y, Kato M, Tsuge T, Gu H, Qu LJ, Aoyama T. 2015.** GLABRA2 directly suppresses basic helix-loop-helix transcription factor genes with diverse functions in root hair development. *Plant Cell* **27**: 2894–2906.
- Liu Z, Wu Y, Yang F, Zhang Y, Chen S, Xie Q, Tian X, Zhou JM. 2013.** BIK1 interacts with PEPRs to mediate ethylene-induced immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 6205–6210.
- Lozano-Durán R, Zipfel C. 2015.** Trade-off between growth and immunity: Role of brassinosteroids. *Trends in Plant Science* **20**: 12–19.
- Lynch JP. 2011.** Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: Tools for future crops. *Plant Physiology* **156**: 1041–1049.
- Ma Y, Walker RK, Zhao Y, Berkowitz GA. 2012.** Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca²⁺ elevation and downstream immune signaling in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 19852–19857.

- Macho AP, Zipfel C. 2014.** Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell* **54**: 263–272.
- Mangano S, Denita-Juarez SP, Marzol E, Borassi C, Estevez JM. 2018.** High auxin and high phosphate impact on RSL2 expression and ROS-homeostasis linked to root hair growth in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–8.
- Marquès-Bueno MM, Morao AK, Cayrel A, Platre MP, Barberon M, Caillieux E, Colot V, Jaillais Y, Roudier F, Vert G. 2016.** A versatile Multisite Gateway-compatible promoter and transgenic line collection for cell type-specific functional genomics in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **85**: 320–333.
- Masucci JD, Schiefelbein JW. 1994.** The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiology* **106**: 1335–1346.
- Masucci JD, Schiefelbein JW. 1996.** Hormones Act Downstream of *TTG* and *GL2* to Promote Root Hair Outgrowth during Epidermis Development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* **8**: 1505–1517.
- Menand B, Yi K, Jouannic S, Hoffmann L, Ryan E, Linstead P, Schaefer DG, Dolan L. 2007.** An Ancient Mechanism Controls the Development of Cells with a Rooting Function in Land Plants. *Science* **316**: 1477–1480.
- Millet YA, Danna CH, Clay NK, Songnuan W, Simon MD, Werck-Reichhart D, Ausubel FM. 2010.** Innate Immune Responses Activated in *Arabidopsis* Roots by Microbe-Associated Molecular Patterns. *The Plant Cell* **22**: 973–990.
- Miyashima S, Hashimoto T, Nakajima K. 2009.** ARGONAUTE1 acts in *Arabidopsis* root radial pattern formation independently of the SHR/SCR pathway. *Plant and Cell Physiology* **50**: 626–634.
- Mora-Macías J, Ojeda-Rivera JO, Gutiérrez-Alanís D, Yong-Villalobos L, Oropeza-Aburto A, Raya-González J, Jiménez-Domínguez G, Chávez-Calvillo G, Rellán-Álvarez R, Herrera-Estrell L. 2017.** Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**: E3563–E3572.
- Morcillo RJ, Singh SK, He D, An G, Vílchez JI, Tang K, Yuan F, Sun Y, Shao C, Zhang S, et al. 2020.** Rhizobacterium - derived diacetyl modulates plant immunity in a phosphate - dependent manner. *The EMBO Journal* **39**: 1–15.
- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW. 2002.** Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **31**: 341–353.
- Müller J, Toev T, Heisters M, Teller J, Moore KL, Hause G, Dinesh DC, Bürstenbinder K, Abel S. 2015.** Iron-Dependent Callose Deposition Adjusts Root Meristem Maintenance to Phosphate Availability. *Developmental Cell* **33**: 216–230.
- Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJH, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J. 2009.** Profiling translomes of discrete cell populations resolves

altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 18843–18848.

- Nafisi M, Goregaoker S, Botanga CJ, Glawischnig E, Olsen CE, Halkier BA, Glazebrook J. 2007.** *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell* **19**: 2039–2052.
- Nagarajan VK, Jain A, Poling MD, Lewis AJ, Raghothama KG, Smith AP. 2011.** *Arabidopsis* Pht1;5 Mobilizes Phosphate between Source and Sink Organs and Influences the Interaction between Phosphate Homeostasis and Ethylene Signaling. *Plant Physiology* **156**: 1149–1163.
- Nakagawa T, Suzuki T, Murata S, Nakamura S, Hino T, Maeo K, Tabata R, Kawai T, Tanaka K, Niwa Y, et al. 2007.** Improved gateway binary vectors: High-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **71**: 2095–2100.
- Nakaminami K, Okamoto M, Higuchi-Takeuchi M, Yoshizumi T, Yamaguchi Y, Fukao Y, Shimizu M, Ohashi C, Tanaka M, Matsui M, et al. 2018.** AtPep3 is a hormone-like peptide that plays a role in the salinity stress tolerance of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**: 5810–5815.
- Nishikawa SI, Zinkl GM, Swanson RJ, Maruyama D, Preuss D. 2005.** Callose (β -1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biology* **5**: 1–9.
- Nishimura MT, Stein M, Hou BH, Vogel JP, Edwards H, Somerville SC. 2003.** Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* **301**: 969–972.
- O’Lexy R, Kasai K, Clark N, Fujiwara T, Sozzani R, Gallagher KL. 2018.** Exposure to heavy metal stress triggers changes in plasmodesmatal permeability via deposition and breakdown of callose. *Journal of Experimental Botany* **69**: 3715–3728.
- Ortiz-Morea FA, Savatin D V., Dejonghe W, Kumar R, Luo Y, Adamowski M, Van Begin J Den, Dressano K, De Oliveira GP, Zhao X, et al. 2016.** Danger-associated peptide signaling in *Arabidopsis* requires clathrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: 11028–11033.
- Pasternak T, Groot EP, Kazantsev F V., Teale W, Omelyanchuk N, Kovrizhnykh V, Palme K, Mironova V V. 2019.** Salicylic acid affects root meristem patterning via auxin distribution in a concentration-dependent manner. *Plant Physiology* **180**: 1725–1739.
- Pečenková T, Janda M, Ortmannová J, Hajná V, Stehlíková Z, Žárský V. 2017.** Early *Arabidopsis* root hair growth stimulation by pathogenic strains of *Pseudomonas syringae*. *Annals of Botany* **120**: 437–446.
- Péret B, Clément M, Nussaume L, Desnos T. 2011.** Root developmental adaptation to phosphate starvation: Better safe than sorry. *Trends in Plant Science* **16**: 442–450.

- Pérez-Torres CA, López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Ibarra-Laclette E, Dharmasiri S, Estelle M, Herrera-Estrella L. 2008.** Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* **20**: 3258–3272.
- Pfalz M, Mikkelsen MD, Bednarek P, Olsen CE, Halkier BA, Kroymann J. 2011.** Metabolic Engineering in *Nicotiana benthamiana* Reveals Key Enzyme Functions in *Arabidopsis* Indole Glucosinolate Modification. *The Plant Cell* **23**: 716–729.
- Poirier Y, Thoma S, Somerville C, Schiefelbein J. 1991.** A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiology* **97**: 1087–1093.
- Poncini L, Wyrsh I, Tendon VD, Vorley T, Boller T, Geldner N, Métraux JP, Lehmann S. 2017.** In roots of *Arabidopsis thaliana*, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer. *PLoS ONE* **12**: 1–21.
- Pound MP, French AP, Atkinson JA, Wells DM, Bennett MJ, Pridmore T. 2013.** RootNav: Navigating images of complex root architectures. *Plant Physiology* **162**: 1802–1814.
- Puga MI, Mateos I, Charukesi R, Wang Z, Franco-Zorrilla JM, De Lorenzo L, Irigoyen ML, Masiero S, Bustos R, Rodríguez J, et al. 2014.** SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of Phosphate Starvation Response 1 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 14947–14952.
- Ralhan A, Schöttle S, Thurow C, Iven T, Feussner I, Polle A, Gatz C. 2012.** The vascular pathogen *Verticillium longisporum* requires a jasmonic acid-independent COI1 function in roots to elicit disease symptoms in *Arabidopsis* shoots. *Plant Physiology* **159**: 1192–1203.
- Reymond M, Svistoonoff S, Loudet O, Nussaume L, Desnos T. 2006.** Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **29**: 115–125.
- Robertson-Albertyn S, Terrazas RA, Balbirnie K, Blank M, Janiak A, Szarejko I, Chmielewska B, Karcz J, Morris J, Hedley PE, et al. 2017.** Root hair mutations displace the barley rhizosphere microbiota. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1–15.
- Rongsawat T, Peltier JB, Boyer JC, Véry AA, Sentenac H. 2021.** Looking for Root Hairs to Overcome Poor Soils. *Trends in Plant Science* **26**: 83–94.
- Rouached H, Arpat AB, Poirier Y. 2010.** Regulation of phosphate starvation responses in plants: Signaling players and cross-talks. *Molecular Plant* **3**: 288–299.
- Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, Malinovsky FG, Tör M, de Vries S, Zipfel C. 2011.** The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* **23**: 2440–2455.
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J. 2001.** A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both

- in vascular plants and in unicellular algae. *Genes and Development* **15**: 2122–2133.
- Růžička K, Ljung K, Vanneste S, Podhorská R, Beeckman T, Friml J, Benková E. 2007.** Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* **19**: 2197–2212.
- Sager R, Lee JY. 2014.** Plasmodesmata in integrated cell signalling: Insights from development and environmental signals and stresses. *Journal of Experimental Botany* **65**: 6337–6358.
- Saijo Y, Loo EP iian. 2020.** Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist* **225**: 87–104.
- Saijo Y, Loo EP iian, Yasuda S. 2018.** Pattern recognition receptors and signaling in plant–microbe interactions. *The Plant Journal* **93**: 592–613.
- Salazar-Henao JE, Vélez-Bermúdez IC, Schmidt W. 2016.** The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis. *Development (Cambridge)* **143**: 1848–1858.
- Samuels AL, Giddings TH, Staehelin LA. 1995.** Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: A new model of cell plate formation in higher plants. *Journal of Cell Biology* **130**: 1345–1357.
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998.** Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology* **116**: 447–453.
- Schenk S, Schikora A. 2015.** Staining of Callose Depositions in Root and Leaf Tissues. *Bio-Protocol* **5**: 3–6.
- Scherp P, Grotha R, Kutschera U. 2001.** Occurrence and phylogenetic significance of cytokinesis-related callose in green algae, bryophytes, ferns and seed plants. *Plant Cell Reports* **20**: 143–149.
- Schwessinger B, Roux M, Kadota Y, Ntoukakis V, Sklenar J, Jones A, Zipfel C. 2011.** Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genetics* **7**.
- Sevilem I, Miyashima S, Helariutta Y. 2013.** Cell-to-cell communication via plasmodesmata in vascular plants. *Cell Adhesion and Migration* **7**: 27–32.
- Shibata M, Sugimoto K. 2019.** A gene regulatory network for root hair development. *Journal of Plant Research* **132**: 301–309.
- Shin H, Shin HS, Dewbre GR, Harrison MJ. 2004.** Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant Journal* **39**: 629–642.
- Singh SK, Fischer U, Singh M, Grebe M, Marchant A. 2008.** Insight into the early steps of root hair formation revealed by the procuste1 cellulose synthase mutant of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **8**: 1–12.
- Song L, Yu H, Dong J, Che X, Jiao Y, Liu D. 2016.** The Molecular Mechanism of Ethylene-Mediated Root Hair Development Induced by Phosphate Starvation. *PLoS Genetics* **12**: 1–29.
- Steen I. 1998.** Phosphorus availability in the 21st century: management of a non-renewable

resources. *Phosphorus & Potassium* 217: 25-31.

- Stefanovic A, Ribot C, Rouached H, Wang Y, Chong J, Belbahri L, Delessert S, Poirier Y. 2007.** Members of the *PHO1* gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *Plant Journal* 50: 982–994.
- Stone BA, Evans NA, Bonig I, Clarke AE. 1984.** The application of Sirofluor, a chemically defined fluorochrome from aniline blue for the histochemical detection of callose. *Protoplasma* 122: 191–195.
- Svistoonoff S, Creff A, Reymond M, Sigoillot-Claude C, Ricaud L, Blanchet A, Nussaume L, Desnos T. 2007.** Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics* 39: 792–796.
- Tanaka N, Kato M, Tomioka R, Kurata R, Fukao Y, Aoyama T, Maeshima M. 2014.** Characteristics of a root hair-less line of *Arabidopsis thaliana* under physiological stresses. *Journal of Experimental Botany* 65: 1497–1512.
- Thibaud MC, Arrighi JF, Bayle V, Chiarenza S, Creff A, Bustos R, Paz-Ares J, Poirier Y, Nussaume L. 2010.** Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 64: 775–789.
- Thiele K, Wanner G, Kindzierski V, Jürgens G, Mayer U, Pachl F, Assaad FF. 2009.** The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 58: 13–26.
- Ticconi CA, Lucero RD, Sakhonwasee S, Adamson AW, Creff A, Nussaume L, Desnos T, Abel S. 2009.** ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 14174–14179.
- Tintor N, Ross A, Kanehara K, Yamada K, Fan L, Kemmerling B, Nurnberger T, Tsuda K, Saijo Y. 2013.** Layered pattern receptor signaling via ethylene and endogenous elicitor peptides during *Arabidopsis* immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 6211–6216.
- Ubeda-Tomás S, Federici F, Casimiro I, Beemster GTS, Bhalerao R, Swarup R, Doerner P, Haseloff J, Bennett MJ. 2009.** Gibberellin Signaling in the Endodermis Controls *Arabidopsis* Root Meristem Size. *Current Biology* 19: 1194–1199.
- Underwood W, Zhang S, He SY. 2007.** The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 52: 658–672.
- Vatén A, Dettmer J, Wu S, Stierhof YD, Miyashima S, Yadav SR, Roberts CJ, Campilho A, Bulone V, Lichtenberger R, et al. 2011.** Callose Biosynthesis Regulates Symplastic Trafficking during Root Development. *Developmental Cell* 21: 1144–1155.
- Vissenberg K, Claeijs N, Balcerowicz D, Schoenaers S. 2020.** Hormonal regulation of root hair growth and responses to the environment in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 71: 2412–2427.

- Vogel J, Somerville S. 2000.** Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1897–1902.
- Wada T, Tachibana T, Shimura Y, Okada K. 1997.** Epidermal Cell Differentiation in *Arabidopsis* Determined by a *Myb* Homolog, CPC. *Science* **277**: 1113–1116.
- Wang F, Deng M, Xu J, Zhu X, Mao C. 2018.** Molecular mechanisms of phosphate transport and signaling in higher plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **74**: 114–122.
- Wendrich JR, Yang BJ, Vandamme N, Verstaen K, Smet W, Van de Velde C, Minne M, Wybouw B, Mor E, Arents HE, et al. 2020.** Vascular transcription factors guide plant epidermal responses to limiting phosphate conditions. *Science* **370**: eaay4970.
- Wu SW, Kumar R, Iswanto ABB, Kim JY. 2018.** Callose balancing at plasmodesmata. *Journal of Experimental Botany* **69**: 5325–5339.
- Wyrsh I, Domínguez-Ferrerías A, Geldner N, Boller T. 2015.** Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) expression in roots restores immune responses in *Arabidopsis fls2* mutants. *New Phytologist* **206**: 774–784.
- Xie B, Hong Z. 2011.** Unplugging the callose plug from sieve pores. *Plant Signaling and Behavior* **6**: 491–493.
- Xie B, Wang X, Zhu M, Zhang Z, Hong Z. 2011.** CalS7 encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *Plant Journal* **65**: 1–14.
- Yamada K, Yamashita - Yamada M, Hirase T, Fujiwara T, Tsuda K, Hiruma K, Saijo Y. 2016.** Danger peptide receptor signaling in plants ensures basal immunity upon pathogen - induced depletion of BAK 1. *The EMBO Journal* **35**: 46–61.
- Yamaguchi Y, Huffaker A, Bryan AC, Tax FE, Ryan CA. 2010.** PEPR2 Is a Second Receptor for the Pep1 and Pep2 Peptides and Contributes to Defense Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**: 508–522.
- Yamaguchi Y, Huffaker A. 2011.** Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 351–357.
- Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan CA. 2006.** The cell surface leucine-rich repeat receptor for *AtPep1*, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 10104–10109.
- Yi K, Menand B, Bell E, Dolan L. 2010.** A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nature Genetics* **42**: 264–267.
- Zavaliev R, Mohan R, Chen T, Dong X. 2020.** Formation of NPR1 Condensates Promotes Cell Survival during the Plant Immune Response. *Cell* **182**: 1093-1108.e18.
- Zamioudis C, Mastranesti P, Dhonukshe P, Blilou I, Pieterse CMJ. 2013.** Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. *Plant Physiology* **162**: 304–318.
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S, et al.**

2010. Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host and Microbe* **7**: 290–301.

Zhou F, Emonet A, Déneraud Tendon V, Marhavy P, Wu D, Lahaye T, Geldner N. 2020. Co-occurrence of Damage and Microbial Patterns Controls Localized Immune Responses in Roots. *Cell* **180**: 440-453.