

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：植物発生における細胞間シグナリング

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

岡田 清孝 (京都大学大学院理学研究科 教授)

主たる共同研究者

町田 千代子 (中部大学応用生物学部 教授)

東山 哲也 (東京大学大学院理学系研究科 助手)

鳥居 啓子 (ワシントン大学植物学部 助教授)

中西 友子 (東京大学大学院農学生命科学研究科 教授)(平成16年4月～)

3. 研究内容及び成果:

3-1. 研究内容

植物の成長や形態を調節し、必要に応じて改変する方法を確保しておくことを目的として、植物器官形成における細胞分化に関わる細胞間のシグナル伝達機構と雄性和雌性の配偶体の形成と相互認識における細胞間のシグナル伝達機構について、分子生物学、分子遺伝学、生化学、および細胞学的な解析をおこなった。

具体的には、(a)葉の表(向軸側)と裏(背軸側)の区別や左右の対称性など側生器官の基本的な構造を決定する細胞間シグナル機構について制御遺伝子を同定し、その働きをあきらかにすること(京都大学理学研究科の岡田グループと中部大学応用生物学部の町田グループが担当)、(b)器官の形成にともなう細胞の分化過程を制御する細胞間シグナル機構について制御遺伝子を同定し、その働きをあきらかにすること(中部大学応用生物学部の町田グループとワシントン大学鳥居グループが担当)、(c)受精における雌雄配偶体の間のシグナルを同定し機能を調べる実験系を開発すること(東京大学理学系研究科の東山グループが担当)の3つとした。平成16年度からは、分子遺伝学および分子生物学を中心とした研究に加えて、新たに生化学およびシステム生物学の手法を新たに導入して、新規な研究分野を立ち上げることとし、(d)茎頂分裂組織におけるペプチドリガンドの網羅的解析(京都大学理学研究科の岡田グループ担当)と(e)植物体内における物質移動の様相を観察するバイオイメージング系の開発(東京大学農学系研究科の中西グループ担当)を開始した。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

3-2. 研究成果

a) 葉の表(向軸側)と裏(背軸側)の区別や左右の対称性など側生器官の基本的な構造を決定する細胞間シグナル機構

○裏側領域で特異的に発現するFILAMENTOUS FLOWER (FIL)遺伝子のプロモーター領域を解析し、FIL遺伝子が側生器官原基の裏側領域で発現するために、二つのシス領域が必要かつ十分であることを明らかにした(岡田グループ)。-1742から-1547塩基までの約200塩基対の領域が裏側と表側の両方の領域で発現を誘導し、-1748から-1737の12塩基対が表側の領域で発現を抑制する。この両者が存在すると、裏側のみで発現することになる。(岡田グループ)

○PHABULOSA (PHB)遺伝子は表側領域で特異的に発現する。PHB遺伝子のプロモーターをマーカー遺伝子とつないで発現領域を調べると、裏側領域特異的なFIL遺伝子の発現領域と一部で重複することがわかった。しかし、PHB遺伝子はマイクロRNA165/166の標的遺伝子であり、これらのマイクロRNAが存在する細胞内では、

PHB遺伝子のmRNAが翻訳されないことから、マイクロRNA165/166の発現する領域を調べた。その結果、マイクロRNA165/166は、PHB遺伝子の発現領域が裏側に特異的なFIL遺伝子の発現領域と重複しないように限定する働きを持つことがわかった。この結果は、マイクロRNAが遺伝子の発現領域を厳密に調整していることを示す最初の例である。(岡田グループ)

○マイクロRNA165/166が関与して表側領域と裏側領域の境界を決定するプロセスは、葉原基のごく初期に見られること、胚形成の中期球状胚の段階から子葉となる領域で見られることを示した。さらに、維管束中の道管および師管細胞の連続したネットワークの形成に以上を持つ突然変異体を多数分離して解析を進めた。前駆細胞群であるプレ前形成層・前形成層の形成に必要であり、オーキシンの極性輸送システムの保持に関わる遺伝子を見出した。(岡田グループ)

○葉の左右相称的形成を支配するAS1とAS2遺伝子の機能と発現パターンを解析した。AS1遺伝子とAS2遺伝子はその機能欠損株が極めて類似した表現型をもつにもかかわらず、mRNAの蓄積パターンや細胞内局在は必ずしも一致しないが、葉の初期の原基細胞や葉の原基の中央部ではAS1とAS2が共同して機能していることを示した。さらにオーキシン応答遺伝子ETT/ARF3とARF4の蓄積を誘導し、class 1 KNOX遺伝子の発現を抑制すること、核小体に局在する新規因子やtasi-RNAの生成に関わるRDR6がas1とas2の変異の表現型を亢進することを示した。(町田グループ)

#### (b) 器官の形成にともなう細胞の分化過程を制御する細胞間シグナル機構

○表皮細胞を覆うクチクラは水分の喪失を防ぎ、カビや細菌の感染から細胞を防御している。トルイジンブルーで植物体を染色する簡便な方法を考案して、多数のクチクラ形成異常突然変異体を単離した。クチクラの合成・分泌に直接関わると推察される遺伝子の他に、受容体型プロテインキナーゼ遺伝子ACR4やALE2、ズブチリン様推定セリンプロテアーゼ遺伝子ALE1の変異体が得られたことから、ペプチド性リガンドとそれを受容する受容体キナーゼが関与する細胞間シグナリング経路が表皮特異的遺伝子発現に関与しており、それによって地上部の器官形成を促進しているモデルを提唱した。(町田グループ)

○シグナル受容体キナーゼであるERECTAが器官の伸長を制御していることを示した。また、erecta突然変異体の抑制変異体suppressor of erecta1-D (super1-D)を単離し、この突然変異体はオーキシン合成酵素遺伝子YUCCA5が過剰発現したものであることから、ERECTA受容体キナーゼを介したシグナル伝達経路とオーキシンを介した経路は、共に器官伸張を促進し、どちらかが欠損してももう一方の経路を過剰に活性化することにより、植物の正常な器官伸張が起こることを示した。(鳥居グループ)

○さらに、ERECTAと相乗的に作用する2つの受容体 ERECTA-LIKE1 (ERL1)とERL2を見出し、ERECTAと機能的に相同な受容体キナーゼであること、erecta/erl1/erl2三重変異体が極端な矮性と花器官の発生異常を示したことから、3つの受容体キナーゼは細胞分裂を協調的に促進させる機能を持つと考察した。また、ERECTAとERL1とERL2のERECTAファミリー受容体キナーゼは、気孔の分化とパターン形成を制御すること、すなわち、原表皮細胞の非対称分裂を抑制するとともにERL1とERL2は気孔の前駆細胞(メリステモイド細胞)の孔辺母細胞への分化の抑制することを明らかにした。(鳥居グループ)

#### (c) 受精における雌雄配偶体間のシグナルの解析

○雌性配偶体が珠皮から露出しているトレニアを用いて花粉管伸長と受精を顕微鏡下で観察できるユニークなin vitro系を独自に開発し、この系を用いて、雌性配偶体が花粉管ガイダンス物質を分泌することを示した。また、レーザー細胞除去実験により花粉管ガイダンス物質が卵細胞の隣にある2つの助細胞から分泌されることを証明した。さらに、近縁のトレニア属異種やアゼトウガラシ属を用いることで、花粉管ガイダンス分子には強い種の特異性が存在することを示した。(東山グループ)

○助細胞のcDNAライブラリーを作製し、Low-molecular-weight Cysteine-rich Protein (LCR)ファミリーの遺伝子が助細胞で特異的に発現していることを示し、このタンパク質が花粉管ガイダンス物質の有力な候補であることを明らかにした。さらに、助細胞を取り囲む胚珠の2n組織から、花粉管に作用してガイダンス分子に対する応答能力を付与するタンパク質AMORが分泌されることを証明した。(東山グループ)

#### (d) 茎頂分裂組織におけるペプチドリガンドの網羅的解析

○分裂組織周辺に存在するペプチド性シグナル分子を網羅的に同定するために、二つの系を開発した。その一つは、若い花序と花芽の巨大な塊であるカリフラワーの花蕾から表層組織を集め、細胞間隙に存在するタンパク質を抽出する方法である。二次元電気泳動法で低分子タンパク質を検出してLC-MS/MSによって部分的なアミノ酸配列を決定して、44個のタンパク質を同定した。さらに、シロイヌナズナのカリフラワー様突然変異体の花蕾から同様に細胞間隙に存在するペプチドを単離して、ゲル濾過により分画し、LC-MS/MSによってアミノ酸配列を調べ、シロイヌナズナのゲノムデータベースと照らし合わせてペプチドの前駆体タンパク質と遺伝子を推定した(ショットガン解析)。1299個のペプチドを同定し、その中から細胞外分泌性のシグナルペプチド配列を持つものを24種同定した。また、細胞外に分泌されるペプチドのプロセッシングを触媒するプロテアーゼ(subtilase)を8種類同定した。(岡田グループ)

○第二の系は、生理活性を有するペプチドを探索するための生物検定法の開発である。分画したペプチドを加えた培地の中でシロイヌナズナを発芽させ、数日間栽培した後、茎頂分裂組織や根端分裂組織、葉や根の形状を観察した。カリフラワーの花蕾の表層から得た分子量500-3000Daのペプチド画分を投与すると、本葉の発生・主根の伸長・側根の発生に異常が認められるなど、活性を持つ新規なペプチドの存在が認められた。(岡田グループ)

#### (e) 植物体内における物質移動のバイオイメーキング装置の開発

○放射性同位体元素で標識した物質を植物に与え、生じた放射線をシンチレータにより光に変換後、超高感度カメラを用いることで、2次元の位置情報を保持したままリアルタイムに解析可能なリアルタイムトレーサー装置として、組織間の物質動態を解析可能なマクロイメーキング装置と組織内での細胞間の物質動態解析を目的としたマイクロイメーキング装置の開発を行った。現在最も感度が高く解像度も良好と評価されているIPと比較して単位時間当たりの検出感度が10倍以上となり、リアルタイムで動画としてとらえることができる装置を作製した。マクロイメーキングの装置(10cm×20cm、解像度500 μm)を用いて、大豆幼植物のリン酸欠乏時およびリン酸供給時のリン酸の詳細な挙動を解析した。(中西グループ)

○マイクロイメーキング装置では、シンチレータ観察用の対物レンズを新たに作製し、ファイバープレートなどを使用することにより、細胞一層の組織切片であってもラジオアイソトープの分布をほぼ細胞レベルで検出可能となった。(中西グループ)

### 4. 事後評価結果

#### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待・口頭・ポスター		報道	特許	
国内	国外	国内	国外		国内	海外
39	73	218	87	9	6	0

○論文発表はその質・量とも高く評価できる。特に、Nature, Science, Gene & Develop.等ハインパクトな雑誌の掲載は高く評価できる。

○この課題が基礎研究を取り扱っていることを勘案すれば、工業(知的)所有権に関する成果をあまり望む必要はないと考えられる。国内出願6件には、重要な遺伝子も含まれ評価できる。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

○総合的には、「植物発生における細胞間シグナリング」という対象に対して正面から答えた、極めて妥当性の高い成果と判断できる。本研究課題は、個々のサブグループがそれまで遂行してきた研究課題を持ち寄った形で編成されているが、本CRESTの研究期間でそれぞれが大きな成功を果たした。これはCRESTによるグループ編成がその一因だと考えられる。例えば、葉の表裏の決定機構とマイクロRNA、葉の左右対称と転写因子群、気孔分化とエレクトキナーゼ、花粉管ガイダンスとシステインリッチタンパク質などいくつかの非常に優れた発見がなされている。個々のサブグループが、極めて水準の高い研究を遂行しており、サブグループの寄与度は非常に高いと判断できる。また、中間評価時点でバイオイメージングのサブグループが追加され、プロジェクト本来のミッションに対して適切な対応を行った結果、この分野においても着実な進展が認められた。

○科学技術への貢献に関しては、本研究課題でなされたいくつかの発見は、単に「植物発生における細胞間シグナリング」という枠に止まらず、植物科学全体としても高いインパクトを持っている。成果の多くが高いインパクトな雑誌に掲載されていることから明らかなように、高い独創性と新規性を持つ成果と判断できる。技術的なインパクトについては、本課題が基礎研究を対象として行っていることから、現時点でそのインパクトを評価することは困難である。

○今後の展開として、現時点でそれぞれのサブグループが高いレベルで独創的な研究を展開しており、この分野において世界をリードしている。今後ともこれらのサブグループにおける優位性は当分続くと判断され、さらなる展開に非常に大きな期待が持てる。特に気孔の分化制御や花粉管のガイダンスの分子機構の解明は、実用的にも重要である。細胞間シグナル物質の直接的な証明(同定)は、重要な研究課題ではあるが、分離、分析の限界など、今後何らかのブレークスルーが必要と思われる。またバイオイメージング装置の開発は、植物体内での物質挙動をリアルタイムで追跡できる重要なツールとなると期待する。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

○研究代表者だけでなく、サブグループとして参画した人たち、特に若手研究者がこのプロジェクト遂行の過程で大きな成果を残し、将来に飛躍できる成果を残せたことは本CRESTの成果として、特筆すべき事項と考える。

○受賞歴としては、第11回日本女子科学者の会奨励賞(鳥居啓子)の1件。