

「植物の機能と制御」

平成13年度採択研究代表者

岡田 清孝

(京都大学大学院理学研究科 教授)

## 「植物発生における細胞間シグナリング」

### 1. 研究実施の概要

植物の個体および器官の形成や受精に到る過程においては、「組織特異的な遺伝子発現」、「部域特異的な細胞の分裂と伸長」、「時間・空間的に制御された細胞の分化」、などいくつかの基本的な問題が指摘され解析が進められている。しかし、「細胞間のシグナル伝達機構が重要な役割を担っている」ことは認識されているものの、シグナルの分子の実体や受容・伝達の分子機構については、ほとんど解明されていない。本研究は、

(1) 植物器官形成における分裂組織と器官原基の間のシグナル伝達機構、(2) 器官の成長にともなう細胞分化に関わる細胞間のシグナル伝達機構、(3) 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、を取り上げ、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て、分子機構を解明し、人工的に制御する方法を見いだすことを目的としている。

研究内容は以下の2つの項目に分けられる。

#### (1) 植物器官形成と細胞分化におけるシグナル伝達機構 について

栄養成長期における植物は、茎頂分裂組織の周辺領域に葉原基を形成する。葉原基が形成される位置には規則性があり、新たに葉原基が形成される位置は、分裂組織の中央領域と既に形成された葉原基の位置によって規定されていると考えられている。葉原基は成長するにともなって、維管束のネットワークを形成し、横方向に平らに展開して裏と表の組織に分化する。これらの過程においては、葉原基が分裂組織との間の相対的な位置を認識していると考えられる。これまでに、主にシロイヌナズナからこれらの制御機構に関わる突然変異体が分離されており、その原因遺伝子も次々と同定されている。その中には、細胞間のシグナル伝達に関わると考えられる遺伝子も含まれているが、シグナル分子や伝達機構についてはほとんど解明されていない。一方、花における花器官（がく片、花弁、雄しべ、心皮）の位置は厳密に決まっており、種に特異的な対称構造がみられるので、花芽分裂組織から花器官原基が形成される過程においても同様なシステムが働いていると思われる。しかし、これらの仮想的な位置情報の分子的な実体とその伝達機構については、その重要性が認識されているにもかかわらず、これまでほとんど調べられていない。本研究では、葉の外側（裏側、abaxial side）の形成を支配するFILAMENTOUS FLOWER (FIL) 遺

伝子や、葉やがく片の周縁部の形成に必要なPRESSED FLOWER (PRS) 遺伝子 (岡田グループ)、葉の左右相称性に関わるAS1 とAS2 遺伝子 (町田グループ)、器官の伸長を担うERECTA 遺伝子とBP遺伝子 (鳥居グループ) などに着目して、これらの遺伝子の発現と機能に関わるシグナル分子や伝達機構を解析する。

(2) 雄性と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  
動物と異なり、植物の配偶体はn世代の体であって、その中の一部の細胞が配偶子となる。被子植物では、雌雄の配偶体は独立した体を作らず、2n世代の植物体の一部として成長する。この際にn世代の細胞は2n世代の細胞から栄養や水の補給の他にタンパク質や脂質の供給を受けることが知られている。このような細胞間の認識と相互作用の機構は、まだよく解明されていない。また、成熟した雄性配偶体 (花粉管) が雌しべの組織内を伸長し、誤らずに雌性配偶体 (胚嚢) に向かうように花粉管の進行方向を誘導するガイダンス機構があると考えられている。シロイヌナズナなどの雌性配偶体の形成異常突然変異体では、花粉管が正しく配偶体に向かうことができないことから、花粉管のガイダンス機構の少なくとも一部は雌性配偶体に由来することが知られている。しかし、ガイダンス機構の詳細や、受精時の雌雄配偶体の認識機構についてはほとんど不明のままである。本研究では、シロイヌナズナの雌性配偶体形成に関わるMAA3 遺伝子、雄性配偶体の形成が異常なkompeito遺伝子について解析を進める。また、東山グループは、雌性配偶体 (胚嚢) が露出したトレニアのin vitro受精系を用いて花粉管誘引の機構を詳細に解析し、配偶体内の特定の細胞を除去して誘引機能に関わる細胞を同定するとともに、誘引活性を示す分子について解析を進める。

## 2. 研究実施内容

これまでに、FIL 遺伝子が葉や花器官の背軸側 (裏側) のみで発現し、各器官の背軸側組織の分化に関与していることを明らかにしている。向背軸形成の分子機構を明らかにするために、FIL 遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、背軸側特異的発現に必要な十分な領域を単離し、背軸側発現に必要な12bpの配列を同定した。現在、酵母の1-ハイブリッド法を用いて、FIL 遺伝子の発現調節に関わる因子の同定を試みている。更に、向背軸形成に関わる新規遺伝子の単離を目的として、GFP が背軸側で発現する形質転換植物を EMS 処理し、GFP の発現パターンが変化している突然変異体のスクリーニングを行った。GFP の蛍光が本来観察されない向軸側においても観察される#2.0-07-4 突然変異体では、本葉の向軸側組織の形成異常が見られ、著しい場合にはフィラメント状になった。今後は、これらの突然変異体の原因遺伝子のクローニングを進める。

花器官は花茎から見て花原基内の一定の位置に形成されることが知られており、花器官形成の位置決定に関して花茎を中心軸とした向背軸と横軸の存在が想定されている。例えばシロイヌナズナの場合、がく片は花茎に対して向軸側、背軸側に1枚ずつ、横側に左右1枚ずつ形成される。一方、各花器官自体も花芽分裂組織を中心としてそれに近い表側 (向軸側) と遠い裏側 (背軸側)、及びその境界である周縁部 (横側) が組織学的に区別

され、各花器官の形成に関して花芽分裂組織を中心軸とした向背軸と横軸の存在が想定されている。pressed flower (prs) 突然変異体では、花茎に対して横側の2枚のがく片が欠失し、向背軸側の2枚には周縁部に特徴的な細胞が見られない。これまでの解析から、PRS 遺伝子は葉、花芽、花器官の周縁部で発現し、横軸依存的な細胞増殖に関与することが示唆されている。周縁部での発現誘導機構を調べるため、PRS 遺伝子のプロモーター解析を行っている。これまでに、花原基及び花器官の周縁部での発現と葉のそれとはプロモーター上の異なる領域により制御されることが示唆されている。周縁部特異的な発現を制御するシスエレメントを特定するため、現在より詳細なプロモーター解析を行っている。

シロイヌナズナの花器官形成においては花芽分裂組織からまず4つのがく片原基が生じ、その後に花弁、雄しべ、心皮の原基が生じる。4枚のがく片は花芽分裂組織を包むように成長し、花芽全体を覆った後に他の3つの器官が成長を始める。このことは、がく片が生殖器官を保護するために進化してきたことを支持しており、がく片が適切なタイミングで適切な大きさに成長することが、花の形成に重要であることを想像させる。f151 突然変異体はがく片の幅の減少及び長さの増加という形態異常を示す。これは、FL51 遺伝子が正常ながく片形成に必要なことを示唆している。現在、原因遺伝子のクローニングを進めている。

花弁は生殖器官の保護や花粉媒介者の誘引などの役割を持つと考えられており、種によって色や形態が様々である。花弁の形態形成機構を突然変異体を用いて解析している。rabbit ears (rbe) 突然変異体では花弁の欠失または形態異常が観察され、RBE 遺伝子が若い花芽の花弁形成予定領域で発現していることから、同遺伝子が花弁になる領域の運命決定に関与することが示唆される。RBE 遺伝子は核局在性の転写因子をコードしており、現在、その機能解析を行っている。folded petals (fop) 突然変異体は花弁が折れ曲がるというこれまでに報告のない興味深い表現型を示す。現在、原因遺伝子のクローニングを進めている。

シロイヌナズナ近縁種に対して、モデル植物シロイヌナズナの膨大な情報を適用することで、進化・生態学的な解析を行っている。種間交配を行い、花粉管を観察したところ、多くの種で花粉管の迷走などの異常が見られた。このことは、花粉管ガイダンス分子など、雌雄間相互作用を担う因子の多様化が種分化（生殖隔離の成立）に寄与したことを示唆する。また、シロイヌナズナ属ミヤマハタザオをシロイヌナズナに交配すると、F1が育つことを示し、ミヤマハタザオが異質倍数体起源であることを明らかにした。これに基づき、ミヤマハタザオの分類学的な検討を行っている。倍数体の進化について、発生生物学・分子系統学などの観点から研究を進めている。

左右相称性が壊れている変異体 asymmetric leaves2 (as2) を解析して、AS2 遺伝子は、葉身の切れ込みパターンの左右相称的発生分化、中肋維管束の明瞭な発生分化、2次維管束の左右相称的発生分化に必須であること、細胞の未分化状態を決定しているClass 1 knox ホメオボックス遺伝子の葉における発現を抑制していることを明らかにした。つまり、全能性を保持しつつ発生分化する植物のような多細胞生物の正常な発生分化には、

このようなホメオボックス遺伝子の抑制が重要である。さらに、AS2 遺伝子をクローニングし、ロイシンジッパーとシステインリピートを持つ新奇な遺伝子ファミリーのメンバーであることを示した。AS2 蛋白質は核に局在しており、なんらかの遺伝子発現に係わっていることを示唆した。

器官の縦方向のサイズが小さくなり、葉や花芽の間隔が短くなる *erecta* 突然変異体の原因遺伝子である ERECTA は、細胞外に Leucine-rich repeat、細胞内に serine/threonine kinase ドメインを持つ膜結合レセプターキナーゼをコードしている。細胞内のキナーゼドメインを欠失した ERECTA タンパク質を発現させると dominant-negative 効果を示し、*erecta* 突然変異体と同様な形質を示すことから、ERECTA によるシグナル伝達機構について新たな示唆が得られた。また、ERECTA によるシグナル機構は、CLAVATA などの他の膜結合レセプターキナーゼによる機構とは独立して働くことが明らかになった。

花粉が雌しべの柱頭に物理的に接着する過程には、種ごとに多様な花粉表面の構造が関与すると考えられている。kompeito (*kom*) 突然変異体では、花粉表面のパターンが異常になり、花粉の柱頭への接着が弱くなる。花粉表層の形成を発生段階を追って詳細に観察した。野生型では、小孢子母細胞が減数分裂を開始する直前にカロース壁が形成され、四分子期には各小孢子はカロースに覆われる。一方、*kom* では減数分裂期にカロース壁は観察されず、四分子期にはカロース壁は観察されたがその量は少なく、その後形成される花粉の表面構造が異常になっていた。KOM 遺伝子の発現を調べたところ、減数分裂期の小孢子母細胞において特異的に発現していることが明らかになった。以上から、KOM 遺伝子は減数分裂期の小孢子母細胞において、カロース壁の形成に関与していると考えている。クローニングの結果、KOM 遺伝子は膜タンパク質をコードしていると予測され、KOM タンパク質はゴルジ体に局在していることが示唆された。花粉表面の形態形成にカロース壁や KOM 遺伝子がどのように関わっているか調べる予定である。

トレニア *in vitro* 重複受精系を用いて、花粉管が雌性配偶体に内容物を放出する瞬間の様子を世界で初めて撮影した。これにより、花粉管内容物が激しく放出され始めると、わずか 0.6 秒後に卵細胞のわきにある 2 つの助細胞の片方が選択的に崩壊して内容物を受け取るという、ダイナミックな受精の様子が明らかとなった。また、マイクロレーザーによる個々の細胞を狙って破壊することにより、卵細胞のわきにある 2 つの助細胞が花粉管ガイダンス分子を分泌していることを解明した。さらに、一旦受精が起こると、助細胞が存在するにも関わらず、積極的に誘引を停止することも明らかになった。

### 3. 研究実施体制

#### 岡田グループ

- ① 研究分担グループ長：岡田 清孝（京都大学大学院理学研究科、教授）
- ② 研究項目：茎頂分裂組織の維持機構 および 花粉管ガイダンス分子の分泌機構

#### 町田グループ

- ① 研究分担グループ長：町田 千代子（中部大学応用生物学部、教授）

② 研究項目：茎頂分裂組織の維持機構

東山グループ

③ 研究分担グループ長：東山 哲也（東京大学大学院理学系研究科、助手）

④ 研究項目：花粉管ガイダンス分子の分泌機構

鳥居グループ

⑤ 研究分担グループ長：鳥居 啓子（ワシントン大学植物学部、助教授）

⑥ 研究項目：茎頂分裂組織の維持機構

#### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

##### （1）論文（原著論文）発表

- Sumie Ishiguro, Yuhko Watanabe, Natsuko Ito, Hideko Nonaka1, Norimasa Takeda, Tomoko Sakai, Hiroshi Kanaya and Kiyotaka Okada: SHEPHERD is the Arabidopsis GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *EMBO J.* 21, 898-908 (2002)
- Eiko Kanaya, Noboru Nakajima, Kiyotaka Okada: Non-sequence-specific DNA binding by the Filamentous flower protein from *Arabidopsis thaliana* is reduced by EDTA. *J. Biol. Chem.* 277, 11957-11964 (2002)
- Tokitaka Oyama, Yoshiro Shimura, Kiyotaka Okada: The IRE gene encodes a protein kinase homologue and modulates root hair growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 30, 289-299 (2002)
- Nobuyuki Takahashi, Nobuharu Goto, Kiyotaka Okada and Hideyuki Takahashi: Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216, 203-211 (2002)
- Takuji Wada<sup>1</sup>, Tetsuya Kurata<sup>1</sup>, Rumi Tominaga<sup>1</sup>, Yoshihiro Koshino<sup>1,2</sup>, Tatsuhiko Tachibana<sup>2,6</sup>, Koji Goto<sup>3</sup>, M. David Marks<sup>4</sup>, Yoshiro Shimura<sup>5</sup> and Kiyotaka Okada<sup>1,2</sup>: Role of the positive regulator of root hair development, CAPRICE, in the epidermal cell differentiation of *Arabidopsis* root. *Development* 129, 5409-5419 (2002)
- S. Schellmann, A. Schnittger, V. Kirik, T. Wada, K. Okada, A. Beermann, J. Thumfahrt, G. Jurgens and M. Hulskamp: TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 21, 5036-5046 (2002)
- Tanaka, H., Watanabe, M., Watanabe, D., Tanaka, T., Machida, C., and Machida, Y.: ACR4, a putative receptor kinase gene of *Arabidopsis thaliana* that is expressed in the outer cell layers of embryos and plants, is involved in proper embryogenesis. *Plant & Cell Physiology* 43, 419-428 (2002)
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H.,

Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C., and Machida, Y.: The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant & Cell Physiol.* 43, 467-478 (2002)

- Elena D. Shpak, Michael B. Lakeman, Keiko U. Torii: Dominant-negative receptor uncovers redundancy in the Arabidopsis ERECTA leucine-rich repeat receptor-like kinase signaling pathway that regulates organ shape. *The Plant Cell* 15, 1095-1110 (2003)
- Nishimura Y., Misumi O., Kato K., Inada N., Higashiyama T., Momoyama Y., Kuroiwa T.: An mt+ gamete-specific nuclease that targets mt- chloroplasts during sexual reproduction in *C. reinhardtii*. *Genes Develop.* 16: 1116-1128 (2002)
- Kuroiwa H., Nishimura Y., Higashiyama T., Kuroiwa T.: *Pelargonium* embryogenesis: cytological investigations of organelles in early embryogenesis from the egg to the two-celled embryo. *Sex Plant Reprod.* 15: 1-12 (2002)
- Higashiyama T., Kuroiwa H., Kuroiwa T.: Pollen tube guidance: Beacons from the female gametophyte. *Current Opinion in Plant Biology* (2003)

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：3件（研究期間累積件数：3件）