

「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。花器官（がく片、花弁、雄しべ、心皮）の形成される位置や対称構造についても同様である。しかし、これらの仮想的な位置情報の分子の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、葉や花器官の表・裏や、周縁部など領域決定、葉の左右相称性や器官のサイズと表皮組織のパターン形成などに着目して、シグナル分子や伝達機構を解析する。

(2) 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。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。花粉の発芽やガイダンス機構、受精時の雌雄配偶体の認識機構など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。本研究では、シロイヌナズナの雌性配偶体や雄性配偶体の形成の機構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、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

岡田グループは、以下の成果を得た。

1. filamentous flower (fil) 突然変異体を単離し、主に花芽分裂組織と花器官の形成と成長に異常を示し、FIL遺伝子は側生器官(子葉、葉、花器官)の裏側(外側 abaxial side)で発現する。このような領域特異的な発現の機構を探るために、プロモーターの欠失解析と、cis領域を35S coreプロモーターとつないでGFPを発現させる解析をおこない、裏側領域特異的な発現には、2つのcis領域、つまり、表側での発現を抑制する-1748から-1737までの12塩基対と、表と裏の両側での発現を促進する領域(-1736から-1547まで)、が必要十分であることがわかった。(Watanabe & Okada: Plant Cell 2003 に発表)
2. 裏側特異的な発現を示すのに十分な長さのFIL遺伝子の上流領域にGFPをつないで導入したトランスジェニック・シロイヌナズナの種子をEMSで処理し、数百のM2の中から子葉におけるGFPの発現パターンが乱れている突然変異体を多数分離した。得られた突然変異体は、2種類のタイプに大別された。一つはFIL promoter::GFPのGFPシグナルが弱まった系統(236系統)、もう一つは、GFPシグナルが本来観察されない葉の表側(adaxial side)で観察される系統である(18系統)。その中の一つである#2.0-07-4突然変異体では、葉の表側でGFPのシグナルが点状に観察される。1遺伝子座の突然変異体で、葉先が細長くなり、フィラメント化する場合もある。葉の内部構造を解析した結果、葉の表側にあたる柵状組織領域が広がっており、導管を師管が取り囲んでいたことから、この突然変異体では、葉の表側領域が拡大していると考えられる。現在、原因遺伝子の単離を試みている。(未発表)
3. 表側特異的な発現パターンを示すPHB遺伝子と裏側特異的なFIL 遺伝子にそれぞれYFPおよびGFPをつないでトランスジェニック植物を作成し、掛け合わせて二重形質転換植物を作成した。この植物の若い葉では、PHB遺伝子とFIL遺伝子の発現は葉の周縁領域で重なり合っていた。この結果は、PHB遺伝子とFIL遺伝子の発現領域の境界が一意的に決定されるものではないことを示している。(未発表)

4. *pressed flower* (*prs*) 突然変異体では、*lateral*の位置にある2枚のがく片が欠失または未発達になる。*PRS*タンパク質はホメオボックスとGln-richおよびHis-rich領域を持つ。*PRS*遺伝子は花芽分裂組織と各花器官原基の横(*lateral*)の端に位置する数個の細胞でのみ発現している。Promoter領域の欠失変異を用いて、特異的な発現に関わる領域を調べ、少なくとも4個のシス領域が関わっていることを明らかにした。(未発表)
5. 花原基における*FIL*遺伝子と*PRS*遺伝子および*PHB*遺伝子の発現パターンを解析し、Stage0-1のごく初期の花原基ではこれらの遺伝子が領域特異的に発現しているが、stage2で発現が一度低下し、stage3以降では、新たに形成される花器官の原基において発現することを示した。すなわち、Stage0-1の花芽は、花序分裂組織から生じた側生器官の原基であって、*FIL*遺伝子は原基の裏側領域、*PHB*遺伝子は表側領域、*PRS*遺伝子は横領域で発現する。しかし、Stage3以降では、*FIL*、*PHB*、*PRS*遺伝子はそれぞれがく片原基の裏側領域、表側領域、横領域で発現する。これらの発現パターンは、花芽分裂組織から見て領域特異的なパターンになっており、以前のように花序分裂組織から見た領域特異性は失われている。これらの結果は、Stage3以降の花芽は独立した分裂組織(花芽分裂組織)として働いており、Stage2はその切り替えの時期に当たることを示している。これまで、花芽が側生器官の原基として生じた後、花芽分裂組織となる時期について明確な解答がなかったが、これらの結果がその答えを示したことになる。(Watanabe & Okada: *Plant Cell* 2003 および未発表データ)
6. 花弁の形成に関わる*RABBIT EARS* (*RBE*)遺伝子を解析した。*rabbit ear-1* (*rbe-1*)突然変異体は、花弁が欠失または未発達になるが、他の花器官は正常である。この変異遺伝子をクローニングしたところ、zinc-fingerタンパク質をコードすることがわかった。*RBE*遺伝子はstage4以降の若い花弁原基で発現する。*RBE*プロモーターにdiphtheria toxinをつなぐと花弁の形成が完全に阻害される。*RBE*の発現は*ap1*や*petal less* (*PTL*)突然変異体ではみられない。また、*RBE*をectopicに発現させても余分な花弁形成はみられない。これらの結果は、*RBE*が花弁原基の形成ではなく、原基の成長分化に必要であることを示している。(Takeda et al. *Development* 2004で発表)
7. 多くのシュートを形成する突然変異体(*hyHY5-12*)を新たに分離した。この突然変異体は、茎頂分裂組織のまわりに多くの葉原基を形成し本葉の基部にそれぞれ茎頂分裂組織ができるので、多数のシュートを形成することになる。遺伝子座をマッピングするとともに、茎頂分裂組織に特異的な遺伝子の発現パターンを解析し、この遺伝子の機能を調べている。(未発表)

町田グループは、以下の成果を得た。

1. 葉の形態形成における*AS1*、*AS2*遺伝子の機能解析

ASYMMETRIC LEAVES1 (*AS1*), *ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*)は共同して機能し、葉器官が分化する過程で、茎頂メリステム及びその周辺で発現しているclass 1 *knox*遺伝子群(*BP*, *KNAT2*, *KNAT6*)の葉における発現を抑制する機能をもつ。また、*AS1*と*AS2*は、葉原基形成

において、葉の基部先端部軸、中央側方軸、向背軸にそった組織化された細胞分裂の微調整を行い、左右相称的で扁平な葉の形成に関わっていると考えられる。*AS1*遺伝子は、mybリピートをもつ転写因子様タンパク質を、*AS2*は、システインに富む領域とグリシンを含む領域、ロイシンジッパー様配列からなる植物に特徴的な新奇なドメイン構造（*AS2*ドメイン）をもつタンパク質をコードしている。*AS1*と*AS2*がどのように共同して機能しているかを調べるために、さらに詳細な発現パターンと*AS1*、*AS2*タンパク質の細胞内局在を解析した。*AS1* mRNAはP0ステージから検出されはじめ主に葉原基の中央部で、*AS2* mRNAは茎頂分裂組織と葉原基全体で弱く、向軸側の第一層で少し強く検出された。このような発現は、葉原基形成の初期に認められるが、成長した葉では次第に弱くなったことから葉の初期の原基細胞や葉の原基の中央部で*AS1*と*AS2*が共同して機能している可能性が考えられた。次に、*AS1*と*AS2*タンパク質が細胞内で共局在するかどうかを調べるために、*AS1::GFP*、*AS2::YFP*融合体を形質転換した。形質転換体において、*AS1::GFP*、*AS2::YFP*の蛍光シグナルは共に核全体に認められ、さらに核内の特定の領域に強いシグナルが塊状に認められた。*AS1::GFP*、*AS2::YFP*融合体を*as1*変異体、*as2*変異体に形質転換したところ、野生型と同じ局在を示した。このことは、*AS1*、*AS2*はお互いの核内局在には関与していないことを示している。

2. 表皮細胞分化における *ALE1*、*ACR4*、*ALE2* 遺伝子の役割

表皮細胞は、胚形成の初期に原表皮として分化する。この発生過程に関わっている遺伝子のうち、*ALE1*、*ACR4*、*ALE2* を同定し、遺伝学的、生化学的、細胞生物学的機能を研究してきた。*ALE1*はズブチリシン様セリンプロテアーゼを、*ACR4*は受容体型プロテインキナーゼを、*ALE2*は、*ACR4*とは異なる受容体型プロテインキナーゼをコードしている。このことから、*ALE1*は原表皮細胞分化に必要な何らかのペプチド性のシグナル分子の生成に関与していると推測されている。本年度は、*ALE1*と*ACR4*受容体キナーゼの遺伝学的関連性と*ACR4*タンパク質の細胞内の局在部位を調べた。*ALE1*と*ACR4*機能の遺伝学的関連性を調べるために、それぞれの単独変異体と *ale1 acr4* 二重変異体の表現型を詳細に調べた。二重変異体では、地上部の原表皮がほとんど分化していないかあるは原表皮特異的遺伝子である *ATML1*の転写がほとんど転写されていないことがわかった。このように二重変異体では表現型が著しく亢進していたことから、*ALE1*と*ACR4*は、主に異なる経路を經由して原表皮細胞分化を制御していると考えられる。*ACR4*と蛍光緑色タンパク質（*GFP*）の融合タンパク質を用いて*ACR4*の細胞内局在を調べたところ、表皮細胞の基底面と側面に存在し、外界に接している頂端面には見られなかった。これらの結果から、*ACR4*は、原表皮細胞の周囲の細胞から何らかのシグナルを受容して原表皮細胞の分化やその維持に関わっていると思われる。*ALE1*は、胚乳細胞で発現し何らかのリガンド形成に関与し、それは*ACR4*とは異なる受容体を介して原表皮細胞分化を制御していると推察される。

東山グループは、以下の成果を得た。

1. トレニア (*Torenia fournieri*) を用いて顕微鏡下で花粉管が胚珠に向かって花粉管を

伸ばし、受精するin vitro systemを確立した。この系を用いて、胚珠の中にある助細胞から花粉管をガイドする物質が分泌されること、雌しべの柱頭で発芽し、花柱の組織を通過した花粉管は胚珠に向かって伸長するが、花柱の組織を通過し、そこで「教育」されない花粉管は胚珠からのガイドに感受性を持たないこと、などの重要な成果を挙げている。平成15年度は、助細胞から分泌される花粉管活性化物質（反応性獲得促進物質（PRIM; Pollen-tube Reactivity Induction Molecule））の精製と同定を試みた。この物質は、ヤリブ試薬およびレクチンカラムに反応性を示したことなどから、成熟した胚珠組織から分泌されるアラビノガラクトタンパク質（高マンノース型Nグリカンをもつ）と考えられた。現在、精製を進めている。

2. トレニアを形質転換して受精および受精時の細胞内微細構造の動態を明らかにするために、ACT11およびTUB9プロモーターを用いたさまざまな蛍光プローブ（細胞内小器官や細胞骨格をラベルするGFP、5xGFP、mRFP、Kaedeなど）の作製を進め、マイクロインジェクション法およびパーティクルガン法による生殖細胞でのトランジェントアッセイ、ならびにステイブルな形質転換体の作製を行った。

鳥居グループは、以下の成果を得た。

1. ERECTAからキナーゼドメインを除いたタンパク質（ Δ キナーゼERECTAタンパク質）を発現させたシロイヌナズナは、花序の伸長が抑制され、花器官が短くなるなど、ERECTA遺伝子が欠損したloss-of-function突然変異体と同様の異常を示すdominant-negativeタイプの突然変異体になることがわかった。また、ERECTA遺伝子のloss-of-function突然変異体と Δ キナーゼERECTAによるdominant-negative突然変異体では、皮層組織の細胞の数が減るが、細胞は大きく配列が乱れる。また、 Δ キナーゼERECTAタンパク質は正常なERECTA遺伝子が欠損した植物細胞の中でも大きなタンパク質複合体を形成する。これらの結果から、ERECTAタンパク質は細胞の増殖と伸長を細かく制御する働きを持つことが示された。（Shpak et al. The Plant Cell 2003 に発表）

2. ERECTAタンパク質に構造が類似したレセプターキナーゼ（ERL1、ERL2）を見いだして、その機能を解析した。ERL1とERL2遺伝子の一方が機能を失った突然変異体では、形質の異常が見られないが、erecta突然変異とERL1またはERL2遺伝子欠損突然変異の二重突然変異体は、erecta突然変異をよりシビアにした形質を示すことから、ERL1タンパク質とERL2タンパク質はERECTAタンパク質と重複した機能を持つことが明らかになった。ERECTA、ERL1、ERL2の三つの遺伝子の機能を失った三重突然変異体では、細胞の増殖が抑制されるために、ひどい矮性を示し、花器官も極端に短く、雄しべや雌しべの成長と分化も不十分になる。これらの結果は、三種類の類似したレセプターキナーゼが細胞の増殖と器官の成長およびパターン形成を制御するシグナル伝達に関わっていることを強く示唆する。

3. 研究実施体制

A 岡田グループ

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）

研究項目（１）「植物器官形成と細胞分化におけるシグナル伝達機構」と

（２）「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」

B 町田グループ

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）

研究項目（１）「植物器官形成と細胞分化におけるシグナル伝達機構」

C 東山グループ

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）

研究項目（２）「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」

D 鳥居グループ

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）

研究項目（１）「植物器官形成と細胞分化におけるシグナル伝達機構」

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

- Katsunori Hatakeyama, Sumie Ishiguro, Kiyotaka Okada, Takeshi Takasaki, Kokichi Hinata: Antisense inhibition of a nuclear gene, BrDAD1, in Brassica causes male sterility that is restorable with jasmonic acid treatment. *Molecular Breeding* 11, 325-336 (2003)
- Akiko Harada, Tatsuya Sakai, Kiyotaka Okada: phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increase in cytosolic Ca²⁺ in different manners in Arabidopsis leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8583-8588 (2003)
- Tetsuya Kurata, Chie Kawabata-Awai, Eiji Sakuradani, Sakaru Shimizu, Kiyotaka Okada, Takuji Wada: The YORE-YORE gene regulates multiple aspects of epidermal cell differentiation in Arabidopsis. *Plant J.* 36, 55-66 (2003)
- Keiro Watanabe and Kiyotaka Okada: Two discrete cis elements control the abaxial side-specific expression of the FILAMENTOUS FLOWER gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 15, 2592-2603 (2003)
- Taisuke Nishimura, Etsuo Yokota, Takuji Wada, Teruo Shimmen and Kiyotaka

Okada: An Arabidopsis ACT2 dominant-negative mutation, which disturbs F-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development. *Plant & Cell Physiology* 44, 1131-1140 (2003)

- Takaaki Ishikawa, Chiyoko Machida, Yasushi Yoshioka, Hidemi Kitano, Yasunori Machida: The GLOBULAR ARREST1 gene, which is involved in the biosynthesis of folates, is essential for embryogenesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* 33, 235-244 (2003)
- Shin-ya Miyagishima, Keiji Nishida, Toshiyuki Mori, Motomichi Matsuzaki, Tetsuya Higashiyama, Haruko Kuroiwa, and Tsuneyoshi Kuroiwa: A Plant-Specific Dynamin-Related Protein Forms a Ring at the Chloroplast Division Site. *Plant Cell* 15, 655-665 (2003)
- Elena D. Shpak, Michael B. Lakeman, and Keiko U.: Dominant-Negative Receptor Uncovers Redundancy in the Arabidopsis ERECTA Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase Signaling Pathway That Regulates Organ Shape. *Plant Cell* 15, 1095-1110 (2003)
- Laurence Godiard, Laurent Sauviac, Keiko U Torii, Olivier Grenon, Brigitte Mangin, Nigel H Grimsley, Yves Marco : ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant Journal* 36, 353-365 (2003)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数 : 1件 (CREST研究期間累積件数 : 5件)