

「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

(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以下の解析をおこなった。

1. 新たな細胞間シグナル分子の探索。側生器官の先端-基部、表-裏、中央-周縁、などの軸に依存した成長と分化には、茎頂分裂組織と側生器官の原基との間の細胞間シグナル伝達にペプチド性シグナル分子が関わっている可能性がある。ペプチド性シグナル分子を調べるために、若い花序と花芽の巨大な塊であるカリフラワーの花序の表面組織を集め、細胞外空間（シンプラスト）に存在するペプチドとタンパク質を抽出した。二次元ゲル電気泳動で分画し、20kDa以下の低分子量ペプチドを約100種類同定した。現在、これらのペプチドのアミノ酸配列を調べている（岡田グループ・未発表）。
2. 細胞間シグナル機構の解析 1。側生器官の裏側組織に特異的に発現するFILAMENTOUS FLOWER (FIL) 遺伝子と表側組織に特異的に発現するPHABULOSA (PHB) 遺伝子のプロモーターにGFPまたはYFPをつなぎ、発現領域が重複するか否かを検討した。両遺伝子の発現領域は葉原基や若い葉の中央部では重複しないが、周縁部領域で重複して発現する。この領域は、葉の周縁部の細胞列形成に必要なPRESSED FLOWER (PRS) 遺伝子の発現領域と一致する。PRS遺伝子がFIL遺伝子とPHB遺伝子の発現重複領域で発現することは、Phabulosa優性突然変異体やFILの発現領域異常突然変異体を用いた解析からも支持された（岡田グループ・未発表）。
3. 細胞間シグナル機構の解析 2。側生器官の表側組織に特異的に発現するPHB遺伝子の発現制御機構として、PHB遺伝子mRNAの一部と相補的配列を持つmicro RNA (miRNA165)が裏側領域に特異的に発現し、そのためにPHB遺伝子mRNAが速やかに分解され、PHB遺伝子の発現が表側領域に限定されるとの考えが提唱されている。しかし、PHB遺伝子のプロモーターにGFPまたはYFPをつないで発現領域を調べたところ、この人工遺伝子にはmicro RNA165との相補的配列がないにもかかわらず、本来のPHB遺伝子と同様な発現パターンを示すことがわかった。この結果は、PHB遺伝子の表側組織特異的

発現にはPHB遺伝子のプロモーターに領域特異性があること、また、miRNA165は表側領域特異的な発現パターンの形成ではなく、維持に働いていることを示している（岡田グループ・未発表）。

4. 細胞間シグナル機構の解析 3。 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（岡田グループ・未発表）。
5. 細胞間シグナル機構の解析 4。 維管束中の道管および師管細胞は連続していなければ機能できない。道管および師管のパターンが掲載される際には、一続きの管として機能するように細胞間のシグナルが働いていると思われる。維管束パターンが異常になる変異体数十種類を分離し、葉脈が繋がらないものや、道管になる細胞が塊を作るものなどを選んで解析を進めている（岡田グループ・未発表）。
6. 細胞間シグナル機構の解析 5。 AS1::GFPとAS2::YFPの両遺伝子をもつシロイヌナズナ形質転換体を作製し、細胞内局在を調べた。AS2が過剰発現すると個体が枯死するのでAS2::YFPはエストロゲンで発現誘導できる誘導系を用いた。AS1::GFP単独では核内全体にドット状に散在し、AS2::YFPは、単独で核小体のまわりに塊状に局在した。AS1::GFPを発現している個体でAS2::YFPを発現誘導した場合には、AS1::GFPはAS2::YFPと共に、核小体のまわりに塊状に共局在する細胞が観察された。AS1::GFPとAS2::YFPが共局在するかどうかさらに解析する必要がある。また、*AS1*、*AS2*と遺伝学的に相互作用する因子を同定するために、エンハンサーをスクリーニングし、複数の候補を単離した（町田グループ・未発表）。
7. 細胞間シグナル機構の解析 6。 原表皮・表皮の分化に関わっている遺伝子として、*ALE1*、*ACR4*、*ALE2*を同定した。*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（Watanabe et al. Plant J. 2004）、*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（未発表）。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。遺伝学的解析により、*ALE1*は*ALE2*や*ACR4*とは独立した経路を介して原表皮細胞の形成に関わっていることが示唆された。原表皮特異的遺伝子である*FDH*及び*ATML1*のmRNAの蓄積部位を比較したところ、*ale1 ale2*二重変異体と

*acr4 ale1*二重変異体ではこれらのmRNAが胚の頂端部の最外層の細胞でほとんど蓄積していなかった。これらの二重変異体では胚の頂端部の原表皮が十分に分化していないことを示している。ACR4と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 (Watanabe et al., Plant J. 2004)。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 (町田グループ・未発表)。

8. 細胞間シグナル機構の解析 7。 シロイヌナズナの受容体キナーゼERECTAとそのパラログである ERL1 と ERL2 は植物体の器官生長を相乗的に促進する。*erecta/er11/er12*三重変異体は、細胞数の減少により極端な矮性と花器官の発生異常を示す。しかし、それだけではなく *erecta/er11/er12*三重変異体の表皮には孔辺細胞が大過剰に分化し、また多数の気孔が隣り合わせになりクラスターを作ることが解った。この表皮パターン異常は葉のみならず茎・小花柄・萼・心皮などでもみられた (図参照)。*erecta/er11/er12*各々の一重変異体および3つの組合せの2重変異体の表皮組織の表現型の詳細な解析から以下のモデルを提唱した。a. ERECTA, ERL1, ERL2 は表皮始原細胞の増殖と表皮細胞への分化を相乗的に促進し、逆に孔辺幹細胞の形成に不可欠な非対称分裂を抑制する。b. ERL1とERL2は、孔辺幹細胞から孔辺母細胞分化への最終分化を抑制する。ERファミリー遺伝子の発現パターンはこのモデルを裏付けるものであった。ERECTA, ERL1, ERL2は葉原器の表皮始原細胞で均一に強く発現し、葉の分化に伴い発現が減少した。一方、一定のステージに達し気孔形成が盛んに行われている葉表皮では、ERL1とERL2の発現が孔辺母細胞で強く認められた。これらの結果は、ERECTAファミリー受容体キナーゼが細胞増殖と器官生長のみならず表皮組織における幹細胞の発生運命の決定に重要な役割を持つことを示唆する。同一の受容体キナーゼが、複数の発生分化プロセスを制御する分子基盤を明らかにすることが今後の課題である (鳥居グループ)。
9. 細胞間シグナル機構の解析8。 花卉の形成に関わるRABBIT EARS (RBE) 遺伝子を解析した。*rabbit ear-1 (rbe-1)*突然変異体は、花卉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以降の若い花卉原基で発現する。RBEプロモーターにdiphtheria toxinをつなぐと花卉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卉形成はみられない。これらの結果は、RBEが花卉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)
10. 細胞間シグナル機構の解析 9。 オーキシン応答遺伝子ETTINおよびMPの突然変

異体では雌ずいの子房壁が短くなる。short valve (stv)突然変異体は同様に子房壁が短くなる。STVはリボソームのL24サブユニットをコードしていることがわかった。L24はポリシストロニックmRNAを翻訳する際に、下流のORFの翻訳開始に必要であることが知られている。ETTINおよびMP遺伝子はuORFを持ちポリシストロニックmRNAを転写する。Stv突然変異体の表現型は、ETTINおよびMP遺伝子の翻訳活性が低下することが原因だと考えており、この仮説を支持する実験結果を得た。(Nishimura et al. 2004に発表。その後の進展について投稿中)

11. 細胞間シグナル機構の解析 10。 茎頂分裂組織と根端分裂組織の維持ができないhalted root (h1r)突然変異体を解析した。胚形成は正常であるが、発芽後すぐに根の伸長が停止し、根端分裂組織の細胞分裂パターンが異常になって静止中心細胞マーカーの発現が消失する。地上部の異常は遅れるが、茎頂分裂組織の細胞パターンが異常になり、WUS遺伝子の発現領域が広がって、葉序も変化する。HLR遺伝子はプロテアソームのサブユニットAtRPT2をコードしており、根端分裂組織の広い領域で発現している(Ueda et al. Development 2004に発表)。その後、HLR遺伝子を根端分裂組織の中心的機能を担う静止中心細胞で発現させるとh1r突然変異体の形質が相補されることを見いだした。この結果から、静止中心細胞での効率的なタンパク質分解が根の分裂組織の維持に必要であることが明らかになった(岡田グループ・未発表)。
12. 細胞間シグナル機構の解析 11。 がく片が細くなるvajura (vaj)突然変異体を解析し、VAJ遺伝子がpre-mRNAのスプライシングに関わるEF2 familyタンパク質をコードすることを見いだした(岡田グループ・未発表)。
13. さらに、この研究目標に関連して、イメージング技術を用いたシグナル伝達および器官形成機構の解析を主として中西グループが担当した。中西グループでは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を用いて、光に変換後超高感度カメラを用いて、2次元の位置情報を保持したままリアルタイム画像を取得することにより、Auxinをはじめとする植物ホルモンや光合成産物の糖の転流、無機栄養塩類、重金属などの吸収および植物体内での移動の詳細な解析を行うことを試みた。シンチレーションを用いて放射線を蛍光に変換した際、この蛍光は非常に微弱であり、検出が極めて困難である。本年度の研究ではこの微弱光を検出するため、いくつかの光検出システムを検討した結果、シングルフォトンを検出することが可能なフォトンカウンティングカメラを用いて、P<sup>32</sup>の植物への吸収実験において、レーザーのリアルタイム検出および画像化に成功した。また本システムを用いることで植物中の物質動態解析においてより多くの物質を標識可能であるが、エネルギーが低い場合検出が困難なC<sup>14</sup>の検出にも成功した。現在、画像をより一層の高感度、高解像度で得られるように装置を改良し、さまざまな標識化合物の植物体中での動態をより詳細にリアルタイムに解析できるよう研究を進めている。

(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は、東山グループが中心となって研究をおこなった。

花粉管ガイダンス分子について、糖タンパク質（後述のPRIM）よりも強い種の特異性が示されたことから、さらに助細胞で特異的に発現する遺伝子の解析を進めることにした。誘引活性が残っていると推察された単離助細胞からcDNAライブラリーを作製するために、マイクロマニピュレーションにより助細胞を回収した（最大で1回の実験で2つの花から65個の助細胞を回収、所要時間は酵素処理開始から2時間以内）。現在ドイツのグループと共同でcDNAライブラリーを作製中である。

花粉管の反応性獲得促進物質であるPRIMが糖タンパク質である可能性が示唆されたことから、ヤリブ試薬を用いて結合性を調べた。その結果、PRIMはヤリブ試薬と特異的な結合性を示し、アラビノガラクトタンパク質（AGP）であることがわかった。各種レクチンカラムにも反応性を示したので、ヤリブ試薬とレクチンカラム（ConA）を用いて、精製を試みた。その結果、70kDaのAGPがほぼシングルバンドとして同定され、さらにそのバンドを切り出して活性を確認した。アミノ酸シーケンシングのために、13,000個の花（6,500,000個の胚珠）を使用した培養液からPRIM300ngの精製を完了し、現在N末端の配列をシーケンシング中である。

精細胞の可視化に関して、レーザーマイクロインジェクション法と花粉への高効率のパーティクルガン法など新しい遺伝子導入技術を開発するとともに、シロイヌナズナの配偶体特異的チューブリン遺伝子*TUB9*のプロモーターがトレニアの配偶体で良好にはたらくことを明らかにした。また、精細胞特異的に発現するプロモーターの候補として精細胞特異的ヒストン*H2A*のプロモーターを共同研究により得た。*ACT11*や*DUO1*プロモーターはその発現特異性や発現量に問題があったため、上記プロモーターを用いて種々のステイブルな形質転換体の作製をトレニアとシロイヌナズナで進めている。

### 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」に関連した葉の形態形成における*ASI*、*AS2*遺伝子の機能解析

（2）表皮細胞分化における*ALE1*、*ACR4*、*ALE2*遺伝子の役割の解明

#### 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」に関連した花粉管ガイダンス分子、配偶体間インターラクシヨンの動態・介在因子の解析

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」に関連した植物の器官分化を制御する細胞間シグナル伝達機構

E 中西グループ

研究分担グループ長：中西友子（東京大学大学院農学系研究科教授）

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」に関連した「ラジオアイソトープを用いた植物体中の物質のリアルタイム動態解析」

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

- Seiji Takeda, Noritaka Matsumoto, Kiyotaka Okada: RABBIT EARS encoding a SUPERMAN-like zinc finger protein regulates petal and ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131, 425-434 (2004)
- Minako Ueda, Keisuke Matsui, Sumie Ishiguro, Ryosuke Sano, Takuji Wada, Ivan Paponov, Klaus Palme, Kiyotaka Okada: The *HALTED ROOT (HLR)* gene encoding the 26S proteasome subunit AtRPT2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems. *Development* 131, 2101-2111 (2004)
- T. Nishimura, T. Wada, K. Okada: A key factor of transcription reinitiation, ribosomal protein L24, is involved in gynoecium development in *Arabidopsis*. *Biochemical Society Transactions* 32, 611-613 (2004)
- Karen Bohme, Yong Li, Florence Charlot, Claire Grierson, Katia Marrocco, Kiyotaka Okada, Miche Laloue Fabien Nogu: The *ARABIDOPSIS COW1* gene encodes a phosphatidyl-inositol transfer protein essential for root hair tip growth. *The Plant Journal*, 40, 686-698 (2004)
- 71. Susumu Mochizuki, Akiko Harada, Takuji Wada, Sumie Ishiguro, Kiyotaka Okada, Tatsuya Sakai: The *Arabidopsis WAV2* protein modulates root bending in response to environmental stimuli. *Plant Cell* 17, 537-547 (2005)
- 72. Yoshihiro Koshino-Kimura, Takuji Wada, Tatsuhiko Tachibana, Ryuji

- Tsugeki, Sumie Ishiguro, Kiyotaka Okada: Regulation of CAPRICE transcription by Myb proteins for epidermis differentiation in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* (2005 in press)
- 73. Linda C. Enns, Masahiro M. Kanaoka, Keiko U. Torii, Luca Comai, Kiyotaka Okada and Robert E. Cleland: Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. *Plant Molec. Biol.* 2005 in press.
  - Tanaka, H., Ishikawa, M., Kitamura, S., Takahashi, Y., Soyano, T., Machida, C. and Machida, Y. The *AtNACK1/HINKEL* and *STUD/TETRASPORE/AtNACK2* genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in Arabidopsis. *Genes to Cells*, 9: 1199-1211 . (2004).
  - Kitakura, S., Ueno, Y., Terakura, S., Machida, C. and Machida, Y. Mechanism of proliferation of plant cells that is induced by oncogene 6b from *Agrobacterium tumefaciens*: interaction of the 6b protein with a putative transcription factor in tobacco cells. *Endocytobiosis and Cell Research*. 15: 179-180 . (2004).
  - Watanabe, M., Tanaka, H., Machida, C., Watanabe, D, Machida, Y. The ACR4 receptor-like kinase is required for surface formation of epidermis-related tissues in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 39: 298-308 (2004).
  - Matsuzaki M., Misumi O., Shin-i T., Maruyama S., Takahara M., Miyagishima S., Mori T., Nishida K., Yagisawa F., Nishida K., Yoshida Y., Nishimura Y., Nakao S., Kobayashi T., Momoyama Y., Higashiyama T., Minoda A., Sano M., Nomoto H., Oishi K., Hayashi H., Ohta F., Nishizaka S., Haga S., Miura S., Morishita T., Kabeya Y., Terasawa K., Suzuki Y., Ishii Y., Asakawa S., Takano H., Ohta N., Kuroiwa H., Tanaka K., Shimizu N., Sugano S., Sato N., Nozaki H., Ogasawara N., Kohara Y., Kuroiwa T.: Genome sequence of the ultra-small unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428, 653 – 657 (2004)
  - Shpak, E.D., Berthiaume, C.T., Hill, E.J., and Torii, K.U.: Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls Arabidopsis organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development* 131: 1491-1501 (2004)

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：7件）