

研 究 報 告 書

「植物分裂組織の再生システム」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研 究 者：伊藤 寿朗

1, 研究のねらい

複雑な多細胞生物体の生命システムも、元々はわずかな数の幹細胞から始まる。本研究は、動物と比べて高い可塑性をもつ植物細胞を研究対象とし、その幹細胞の制御機構を理解することをねらいとして研究を進めてきた。植物は人類にとってかかせないものであるが、その生長がどのように制御されているのかー 単一細胞からの再生能、分化転換、そしてその過程における細胞間の情報伝達ーについては未だ、ほとんど明らかにされていない。これは、植物分裂組織を遺伝学および生化学の両面から解析できる実験系がなかったことにも起因している。本研究は、モデル植物シロイヌナズナにおいて蓄積している遺伝学的解析に併せて、複数の花が同調した発生過程を示すトランスジェニック植物体を用いた生化学的解析、さらには数理生物学的なアプローチも用いることで、植物分裂組織の維持・再生システムを解明することを目指した。

2, 研究成果

植物は一生を通して、常に幹細胞を維持しており、その成長は幹細胞の絶え間ない増殖と分化のバランスに支えられている。茎や根においては、幹細胞活性は常に維持されているが、一方、生殖器官である花においては、ある一定数の花器官が作られた後、幹細胞活性は抑制される。

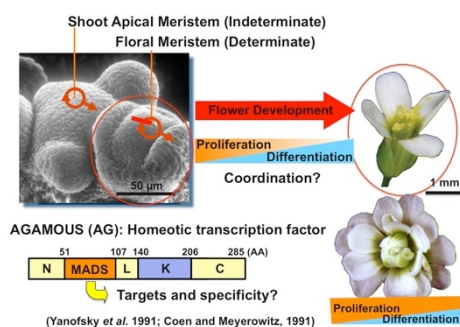


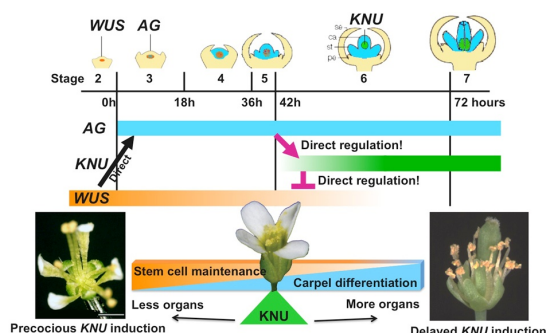
図. シロイヌナズナの花発生
野生型の花（上）とアガマスホメオティック突然変異体（下）とその原因遺伝子 *AGAMOUS (AG)*

花のマスター制御因子である *AGAMOUS (AG)* タンパク質は生殖器官の分化方向の決定および、花の幹細胞活性の抑制にかかわっており、その突然変異体は雄しべ、雌しべが多数のガク片、花弁に置き換えられるというホメオティックな変異を示す（レビュー Ito, Current Opinion in Plant Biology 2011）。*AG* は遺伝学的解析から導かれた ABC モデルの C クラス遺伝子であり、MADSドメインと呼ばれる DNA 結合領域を持つ進化的にも保存された転写因子をコードしている。しかし、遺伝学的解析からは、*AG* がどのよ

うな下流遺伝子を制御しており、さらにはどのようにして、花発生過程の増殖と分化のバランスを制御しているのかは、つい最近まで明らかにされていなかった。我々は *AG* の活性誘導系を確立し、ゲノミクス、逆遺伝学、生化学的手法を組み合わせることで、*AG* 下流の遺伝子カスケードを解明した。

1) AG による花幹細胞の制御

花発生過程において、幹細胞の増殖と分化のバランスは種特異的な花器官の数や大きさに、



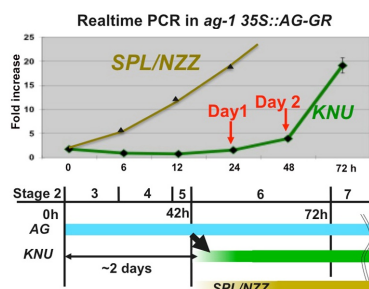
図．花発生過程における幹細胞の増殖制御にかかわる *AG*, *KNU*, *WUS* による転写カスケード。*KNU* の早期発現により花器官の数は減少し、逆に遅延により、器官数が増大する。

影響をおよぼす。近年、我々のグループでは遺伝学的、逆遺伝学的および生化学的手法により、*AG* の下流において、*KNUCKLES* (*KNU*)と呼ばれる Zinc Finger モチーフを持った核タンパク質が花幹細胞の制御において、重要な役割を果たすことを示した (Sun et al., Genes & Development 2009)。*KNU*は*AG*の直接のターゲット遺伝子であり、かつ幹細胞の決定因子であるホメオボックスタンパク質である *WUSCHEL* (*WUS*)の上流の抑制因子として機能する。さら

に、*KNU*の発現のタイミングは幹細胞の増殖と分化のバランスを適性に保つのに重要であることを示した (Sun et al., Genes & Development 2009)。

2) AG による下流遺伝子の時期特異的な制御機構

ホメオティックタンパク質の下流には数千を超える遺伝子カスケードが時空間特異的に制御さ



図．(上) *AG* 誘導系において、異なる誘導タイムコースを示す 2 つの *AG* ターゲット遺伝子 *SPL/NZZ* と *KNU* の Realtime PCR 解析
(下) 花発生過程における *AG*, *SPL/NZZ* と *KNU* の発現パターン

れていると予想されるが、実際にその特異性をもたらす機構についてはほとんど分かっていない。我々は花発生過程において同時期に誘導される *AG* の 2 つの直接のターゲット *SPL/NZZ* (Ito et al., Nature 2004) と *KNU* (Sun et al., Genes & Development 2009) が異なった機構により、誘導されることを見いだした。*SPL/NZZ* は *ag* 突然変異体バックグラウンドにおいて、本来誘導されるステージに *AG* 活性を誘導すると即座に転写が上昇したが、一方、*KNU* は *AG* 誘導後、本来のタイムラグである 2 日間を経た後、誘導された (Sun et al., Genes & Development 2009)。これは 2 つの遺伝子が *AG* により、異なった制御を受けていることを示している。*SPL/NZZ*

は *AG* 活性に非依存的にもたらされる花発生の時期特異的な「場」が必要なのに対し、*KNU* の誘導には *AG* 依存の 2 日間のタイムラグを必要とすると考えられる。

我々は、花発生の同調系を活用し、その原因遺伝子を誘導系とすることにより、発生時期に特異的な生化学的解析を行うことで、*KNU* の転写誘導タイミングの制御には、*AG* 依存的に起きるヒストンの抑制的マーク (H3K27me3) の変化が重要な役割をはたしていることを明らかにした (Sun et al., Genes & Development 2009)。さらに、細胞周期の阻害剤や細胞周期の促進効果のある植

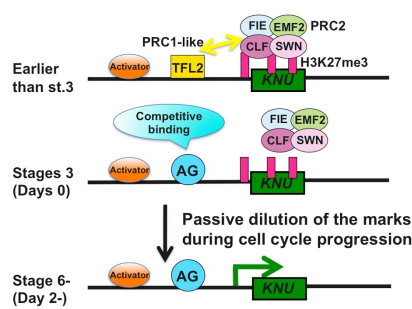


図. AG とポリコムタンパク質との競合的結合にもとづく *KNU* 遺伝子の時期特異的な発現調節機構のモデル。AG が *KNU* プロモーターに結合することによって、ポリコムタンパク質が結合できなくなり、細胞分裂を経ることにより、ヒストンの抑制的マークが希釈

物ホルモン処理による解析から、ヒストンの修飾変化には細胞周期の進行が必要であることを見出した（投稿準備中）。さらに、*KNU*発現の誘導は、ヒストン修飾の確立と維持にかかわる Polycomb repressive complex (PRC)の因子と AG との *KNU*プロモーターにおける競合的な結合により制御されているという知見を得ている（投稿準備中）。つまり、時間的制御にかかわる抑制的ヒストンマークは、AG の結合によって維持されなくなること、細胞分裂によって希釈されることにより、除去されていくと考えられる。以上、植物幹細胞における発生時間の制御には、細胞周期とヒストン修飾を用いた新しい制御機構があることを明らか

かにした。

3, 今後の展開

まずは、今回明らかにした細胞周期とヒストン修飾を用いた新しい発生時間の制御機構を別の細胞系にて再現することを目指す。具体的には、細胞周期を同調可能な動植物の培養細胞系を用いて、制御系の再構築および、イメージング解析を行う。

さらにこれまでの生化学的解析の解像度を上げることで、幹細胞とそのまわりの細胞において別々に、分子レベルでの解析を行っていきたい。これによりヒストンの修飾から個々の細胞の積み重ねによって決定される下流遺伝子の発現制御、および細胞間の情報伝達の機構、さらには組織、器官レベルでの調和の取れた形作りにいたるまでの統合的理解を目指したい。

4, 自己評価

本研究提案を行うにあたって、柱の一つとして考えていたトランスジェニックシロイヌナズナによる花再生誘導系は、継続的な試行錯誤にもかかわらず、その形質の不安定性のために、当初計画していた遺伝学的、生化学的解析に用いることが出来なかった。一方、花の幹細胞の増殖制御にかかわるホメオティック遺伝子 AGAMOUS の下流カスケードの解析を通した幹細胞制御機構の解析から、まったく新しい発生時間の制御機構を明らかにすることができた。さきがけ研究を通して、生物研究の広い分野での知見を得ることができ、さらにそこで培った人脈を通して、数理生物学的解析の共同研究も行うことが出来た。これらの新しい知見は、自分のこれまでの研究人生のマイルストーンの一つとなるべく、現在、投稿準備中である。

5, 研究総括の見解

花発生過程の花幹細胞の制御において、鍵となる遺伝子 KNUCKLES (*KNU*)を同定し、さらに、*KNU* の発現のタイミング制御に抑制的ヒストン修飾 (H3K27me3)が寄与していることを示した。生化学的解析に基づき、上流転写因子 AGAMOUS と Polycomb complex との競合的作用モデルを

提唱するなど、植物分裂組織の維持・再生システムの解明に大きな貢献をしつつある。現在の研究拠点のネットワークを活かし、国際的な視野で、研究活動の益々の進展を期待します。

6, 主な研究成果リスト

(1) 論文 (原著論文) 発表

1. Sun, B., Xu, Y., Ng, K-H. and Ito, T. (2009) “A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in Arabidopsis floral meristem.” *Genes & Development* 23: 1791-1804 (Cover issue)
2. Ng, K-H., Yu, H. and Ito, T. (2009) “AGAMOUS controls GIANT KILLER, a multifunctional determinant of reproductive organ patterning and differentiation.” *PLoS Biology* 7 (11): e1000251 (1-17, Featured image of Nov issue)
3. Das, P., Ito, T., Wellmer, F., Vernoux, T., Dedieu, T., Traas, J., Meyerowitz, E. M. (2009) “Floral stem cell termination involves the direct regulation of *AGAMOUS* by *PERIANTHIA*.” *Development* 136: 1605-1611
4. Liu, X., Huang, J., Parameswaran, S., Ito, T., Seubert, T., Auer, M., Rymaszewski, A., Jia, G., Owen, H. A., and Zhao, D. (2009) “The *SPOROCTELESS/NOZZLE* Gene Is Involved in Controlling Stamen Identity in Arabidopsis.” *Plant Physiology* 151: 1401-1411
5. Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T., Meyerowitz, E.M. and Yu, H. (2008) “A Repressor Complex Governs the Integration of Flowering Signals in Arabidopsis.” *Developmental Cell* 15: 110-120

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物等)

主要な学会発表

1. Meyerowitz’ 60th Birthday Symposium, California Institute of Technology, Pasadena, USA, Invited speech, May 23, 2011
2. Plant Development of the III Brazilian Meeting on Plant Molecular Genetics, Brazil, Keynote speech, Apr 11, 2011
3. Cold Spring Harbor Conferences Asia, From Plant Biology to Crop Biotechnology, Suzhou, China, Invited speech, Oct 26, 2010
4. FASEB Summer Research Conferences Mechanisms in Plant Development, Saxtons River, Vermont, USA, Invited speech, Aug 16, 2010
5. 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan, Invited speech, Dec 10, 2009
6. Global COE International Symposium “Explore, Exchange, Innovate-A glance at the leading researches in Bioscience-Nagoya Univ, Japan, Keynote speech, Nov 17, 2009

著作 総説

Ito, T (2011) “Coordination of flower development by homeotic master regulators.”, *Curr Opin Plant Biol*, 14: 53-59