

研究報告書

「植物表皮組織における気孔パターン形成の動的ネットワーク」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：鳥居 啓子

1, 研究のねらい

陸上植物の表皮組織に散在する気孔は、水や二酸化炭素の通気口であり、気孔口の開閉により植物の光合成や呼吸といった活動を制御している。このため、気孔のふるまいは陸上植物の繁栄、生存や、地球レベルの大気環境にも大きな影響を与えている。この気孔が正常に開閉するためには、気孔の形成段階において数、密度が適切に制御され、葉の一面に均等に散在するパターンが形成される必要がある。

モデル植物として用いられるシロイヌナズナを含めた双子葉植物では、葉など光合成器官の発生過程において、未分化な表皮細胞の一部が非対称分裂を起こすことにより気孔の形成が開始する。本さきがけ研究者らのこれまでの研究などから、気孔を形成する一連のマスター転写因子や気孔分化を抑制するシグナル伝達因子の存在が明らかになっていた。しかし、それらの因子が気孔発生時にどのような時空間制御を受けているのか、またどのような制御階層(regulatory hierarchy)により、気孔系譜となる細胞が決定されるのか解っていなかった。本研究は、葉の発生過程において未分化細胞のシートからどのようにして自律的に気孔のパターン形成が起こるのか、その分子基盤と制御ネットワークの動態を、モデル植物シロイヌナズナの実験生物学とナノ材料工学・数理モデルなど異分野融合型研究により明らかにすることをねらいとする。

2, 研究成果

1: 気孔の初期パターン形成における細胞間相互作用のダイナミクスの可視化

1-a: 気孔系譜の最初の決定プロセスと側方阻害

未分化な原表皮細胞から気孔系譜が発生するプロセスには、bHLH 型転写因子 SPEECHLESS (SPCH) および SCREAM (SCRM と SCRM2) が必要である。また、初期気孔系譜細胞(メリステモイド母細胞)は、非対称分裂を阻害するペプチドシグナル遺伝子 EPF2 を発現することが知られている。蛍光タンパク質を用いた SPCH, SCRM, EPF2 などの転写レポーターおよび翻訳レポーターを互いの変異体に導入し、遺伝子発現とタンパク質蓄積の時空間制御を解析した。さらに、クロマチン免疫共沈法や生化学的解析を行った。これらの結果を合わせると、以下の気孔のパターン形成メカニズムが考察された。葉の発生過程において、均一な未分化細胞のシートから、まず広範囲に SPCH が発現し、その後 SCRM が発現する。未分化細胞の中で、SPCH-SCRM 転写因子 2 量体をより多く蓄積したの(勝者)は、分泌ペプチドシグナル EPF2 を誘導・分泌する。EPF2 は隣接する細胞へと移動し、受容体シグナル伝達を介して SPCH-SCRM 転写因子 2 量体を分解することにより、隣接細胞(敗者)が気孔系譜に入らないよう阻害している。これは、まさに Activator-Inhibitor モデル(Turing モデル)であることが示された。

1-b: 芽生え表皮のライブイメージング法の開発と気孔をつくる転写因子の時空間動態

共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた、発芽過程における子葉の表皮組織の分化をリアルタイ

ムに観察する長期間ライブイメージング法とソフトウェアを開発した。これにより、気孔系譜がつくられる過程(すなわち気孔分化が起こる以前)におけるマスター転写因子の時空間動態を観察できるようになった。気孔系譜の開始～増殖～分化の全てのステップを司る、転写因子 SCRM タンパク質の動態を観察したところ、予想された抑制シグナルにより側方阻害が起こる前の段階では、なんらかのポジティブなシグナルにより、隣接する表皮細胞の両方の核において SCRM-GFP タンパク質が蓄積することがわかった。レーザー殺傷の予備実験から、隣接する細胞(敗者)は、気孔系譜の"バックアップ"である可能性が示唆された。

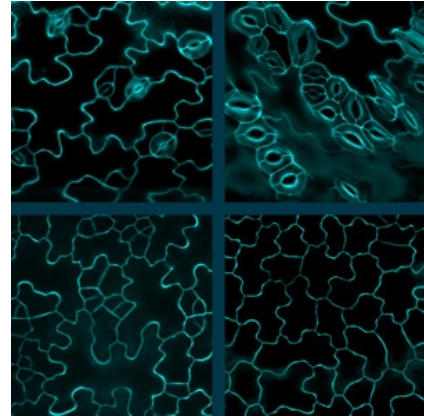


図1:大腸菌で生産した活性型 EPF1,EPF2 ペプチド、野生型(左上)、erecta ファミリー3重突然変異体(右上)、EPF1 ペプチド(左下)および EPF2 ペプチド(右下)処理した野生型芽生え

2. 気孔の数と分布を制御するペプチドシグナルの受容メカニズムと作用機作の解明

2-a:ペプチドシグナルと受容体の直接結合および受容体の二量体形成

気孔の前駆体細胞は2つの類似したペプチド EPF1 と EPF2 を分泌し、隣接する表皮細胞で発現する ERECTA ファミリー受容体キナーゼ (ERECTA, ERL1) および TMM 受容体に結合し、気孔の数と分布を調節すると考察されている。しかし、これらペプチドが本当に受容体と結合するのか、どのペプチドがどの受容体にシグナル伝達するのか、どのような生化学相互作用により気孔のパターンが生じるのかなど全く分かっていなかった。

さきがけ研究者らは、まず候補となっているペプチドホルモンと受容体が、生体中で結合するかどうか調べるために、目印を付けた3種類のシロイヌナズナ受容体 (ERECTA, ERL1, TMM) および2種類のペプチド (EPF1, EPF2) をタバコ表皮細胞に導入した。免疫共沈降法により、これらのペプチドが ERECTA 受容体と ERL1 受容体に強く結合すること、その一方で TMM 受容体への結合は限られていること発見した。

次に、大腸菌で生産したペプチドホルモン (EPF1, EPF2) を巻き戻し、活性形ペプチドの大量生産に成功した。この活性 EPF1 と EPF2 をシロイヌナズナ植物表皮に散布すると、EPF1 は気孔の前駆体細胞の分化を阻害し、EPF2 ホルモンは気孔系譜をつくる最初の非対称細胞分裂を阻害する、という生物活性を示した(図1) ペプチドホルモンと受容体の結合を生体外で詳しく解析するために、植物から精製した ERECTA 受容体、ERL1 受容体、TMM 受容体をそれぞれ固着化した「受容体バイオセンサーチップ」を開発した。水晶天秤 (QCM)・表面プラズモン共鳴 (SPR) という2つの解析技術を用いて、各々のチップ上に活性 EPF1 ホルモンと活性 EPF2 ホルモンを投与することにより、ERECTA ファミリー受容体キナーゼの EPF ペプチドとの結合動態を明らかにした。

さらに ERECTA ファミリー受容体キナーゼは、植物内でホモ2量体および TMM 受容体とのヘテロ2量体を作る一方、TMM 受容体はホモ2量体を作らないことを明らかにした。一般に ERECTA ファミリー受容体キナーゼや TMM 受容体は、ホモ2量体を形成することで活性化することから、ERECTA ファミリー受容体キナーゼが EPF の受容体であり、TMM 受容体はシグナル受容と伝達を調節する役割を持つことが示唆された。

これらの結果からEPF1とEPF2がERECTAファミリー受容体部位に直接結合することが明らかとなったが、その一方で、生体内で実際にどの受容体がどのペプチドに結合してシグナルを伝達か未知であった。そのため、さきがけ研究者らは不活性なドミナントネガティブ型のERECTA受容体とERL1受容体を発現させた植物体を作り、植物体内でそれぞれの受容体由来のシグナル伝達を選択的に阻害した。その結果、ERECTA受容体を阻害した植物はEPF2ペプチドを認識できなくなり、ERL1受容体を阻害した植物は逆にEPF1ペプチドを認識できなくなった。これらの結果から、EPF2-ERECTAそしてEPF1-ERL1という2つのリガンド-受容体のペアが、気孔形成の開始と気孔前駆細胞の分化という、2つの重要なステップをそれぞれ制御していることが判明した。

3. 植物の幹細胞：気孔の幹細胞を特徴づける遺伝子群の発見

気孔の前駆細胞であるメリステモイド細胞(図2A)は、非対称分裂・自己再生という、幹細胞(Stem Cell)としての興味深い性質を持つが、メリステモイドを特徴づける遺伝子やタンパク質の存在はよくわかっていない。メリステモイド細胞は低頻度で一過的であるため、分

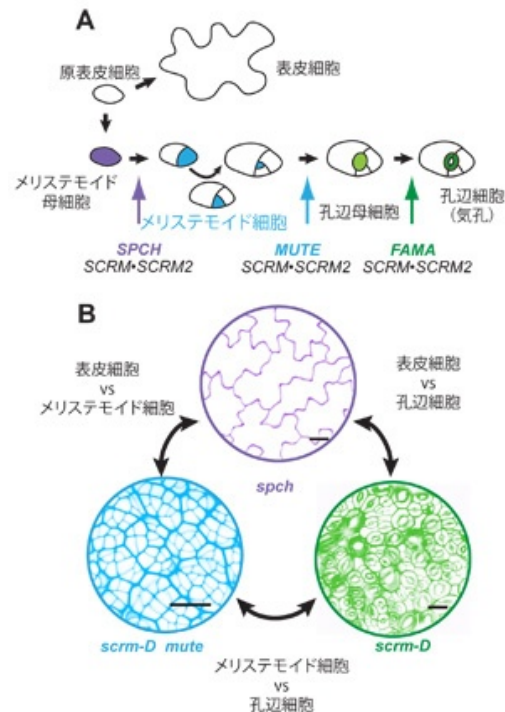


図2：(A)気孔の分化における細胞状態の遷移。メリステモイド細胞(水色)は、非対称分裂を内巻き螺旋状に繰り返す特徴を持つ。(B) 突然変異体の組み合わせを利用したメリステモイド細胞の分子プロファイリング戦略の模式図。

子プロファイリングに耐えうる十分な量の高純度なメリステモイド細胞を単離回収することは不可能だった。

さきがけ研究者らは、気孔の分化を制御するマスター転写遺伝子の突然変異体を組み合わせることにより、表皮のほぼ全てがメリステモイド細胞になる植物を作出した(図2B, *scrm-D mute*)。この芽生えと、気孔系譜ができない *spch* 突然変異体(図2B)、逆に表皮全てが気孔になる *scrm-D* 突然変異体(図2B)の3者の全転写産物を比較することにより、メリステモイド細胞に特徴的な遺伝子群を同定した。

それら遺伝子産物の解析から、新奇タンパク質 POLAR を発見した。研究成果1b

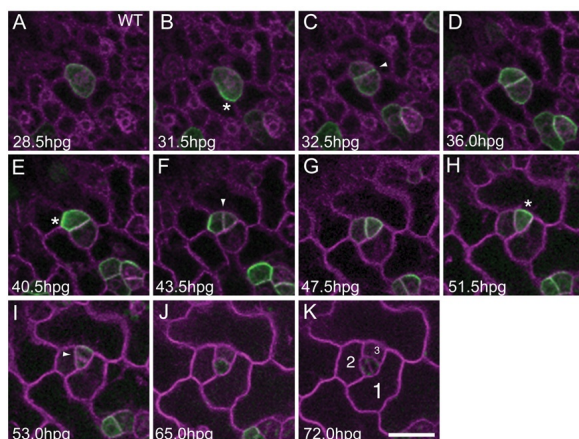


図3：気孔系譜の非対称分裂時におけるPOLAR-GFPタンパク質のダイナミックな局在。芽生え子葉の発芽後28.5-72までを示す。POLARは非対称分裂直前に分裂面の遠心端(*)に局在する。

で開発したタイムラプスムービーによって、POLAR の鮮やかな動態が明らかになった。POLAR はメリステモイドの細胞表層に均一に局在しているが、非対称分裂直前(1・2時間前)に分裂面から遠心端へと移動する(図3)。非対称分裂が正常に起こらなくなった植物体では、POLAR の極性局在も消失することから、気孔系譜の極性に深く関わっていることが示唆された。また、根端分裂組織の非対称分裂を制御する転写因子 SCZ がメリステモイド細胞にて強く発現することも判明した。

これら一連の成果から、未分化細胞から表皮気孔パターンが自己組織化するメカニズム、そして特定のペプチドホルモンが特定の受容体を介して気孔の数を制御するメカニズムが明らかになった。さらには、本研究により気孔の幹細胞であるメリステモイド細胞を特徴づける遺伝子の全貌が明らかになったと共に、今後、植物における非対称分裂の制御機構の解明への手がかりが得られた。今後、気孔形成の2つのステップを制御することが可能になると考えられ、乾燥耐性や二酸化炭素吸収に優れたバイオマス作物を開発が期待される。また、ペプチドホルモンを農薬として安価に大量生産することで、遺伝子組換えを介さない、塗布による作物の水利用効率改善などの応用への道がひらけた。

3, 今後の展開

本さきがけの成果から、各々の転写因子やシグナル因子がどう相互作用してパターン形成が起こるのか、その仕組みが明らかになってきた。今回明らかになった Activator-Inhibitor (SPCH-SCRM-EPF2)のネガティブフィードバックは、表皮上でどのくらいの距離まで働くのか。その空間制御を明らかにするために、現在、Cre-Lox 法を用いて葉表皮上の一部のみが EPF2(および EPF1)を過剰発現するキメラ植物を作出し、気孔のパターンを解析している。

その一方で、まだ解っていない問題も残されている。例えば、芽生えのタイムラプスイメージングでは、将来気孔になる細胞の隣の細胞では一過的に SCRM-GFP の発現が上昇する、という典型的な側方阻害だけでは説明できない現象が観察された。本研究課題が進行中に他グループにより発見された気孔のポジティブシグナルであるストマジェン(EPFL9)が、これら現象にどうかかわっているのか興味深い。また、DR-VISION 社(ワシントン州 ベルビュー市)と共同開発したソフト Stomatal Patterning Tracker (Ver 1.5)を使いこなす時間がなかった。今後は、各転写因子やシグナル因子のさらなる可視化と定量解析を行い、細胞間相互作用の基本原理にせまりたい。

本研究で、気孔形成を抑制するネガティブシグナルである EPF1 と EPF2 は、生体内ではそれぞれ ERECTA と ERL1 を介して、別々のプロセスで気孔の発生と分布を制御することがわかった。これらリガンド-受容体シグナル伝達経路を明らかにして、シグナルアウトプットの特異性がどうやって決まるのか解明したい。ストマジェン(EPFL9)は EPF1/2 と類似したペプチドであるが、気孔形成に正反対に作用する。その分子メカニズムも明らかにしたい。

メリステモイド細胞の分子プロファイルから得た POLAR に関しては、その局在ダイナミクスのメカニズムと細胞の非対称性への関与に関して、細胞骨格や細胞遷移との相互作用などを含め、細胞生物学的手法からせまりたい。

4, 自己評価

本研究で未分化細胞シートから均一な気孔のパターン形成が起こる制御動態の枠組みは解ってきた。しかし、既に知られている Activator-Inhibitor モデル以上の発生学的概念の提唱にはつながらなかった。一番の問題点は、当初計画した気孔系譜を決定する制御ダイナミクスの数理解析に全く切り込めなかったことである。実際問題として、現象(の普遍性と動作原理)の大枠をとらえる以前に、現象を制御している一群の分子(遺伝子・タンパク質)の同定とその制御動態を明らかにしてしまった。さきがけ研究者本人が、いったいどのような現象の予測とシミュレーションに数理モデルが有効なのか、どのような数理モデルが実験生物学に寄与するのか、きちんと理解できていなかったところが大きいと反省している。(さきがけのおかげで実際に数理モデル研究者と意見交換する機会に恵まれたのは幸いであった)。異なるリガンド受容体ペアによる気孔系譜分化の微妙な outcome の違い等、数理シミュレーションが貢献できる現象も見えてきており、今後につなげたい。

5, 研究総括の見解

未分化細胞から表皮気孔パターンが自己組織化するメカニズム、そして特定のペプチドホルモンが特定の受容体を介して気孔の数を制御するメカニズムを解明したこと、さらには、気孔の幹細胞であるメリステモイド細胞を特徴づける遺伝子の全貌が明らかにしたことなど、多くの成果を出してきたことを高く評価している。今後、共同研究により、気孔形成の制御により、乾燥耐性や二酸化炭素吸収に優れたバイオマス作物を開発への展開も期待したい。

6, 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表 (*責任著者)

1. Lee, J.S., Kuroha, T., Hnilova, M., Khatayavich, D., McAbee, J.M., Kanaoka, M.M., Sarikaya, M., Tamerler, C., and Torii, K.U. (2012) Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. **Genes & Development** 26:126-136
2. Pillitteri, L.J., Peterson, K.M., Horst, R.J., and Torii, K.U. (2011) Molecular profiling of stomatal meristemoids reveals new component of asymmetric division and commonalities among stem-cell populations in Arabidopsis. **Plant Cell** 23:3260-75
3. Guseman, J.M., Lee, J.S., Bogenschutz, N.L, Peterson, K.M., Virata, R.E., Xie, B., Kanaoka, M.M., Hong, Z., and Torii, K.U. (2010) Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in Arabidopsis *CHORUS/GLUCAN SYNTHASE-LIKE8*. **Development** 137: 1731-1741
4. Hara, K., Yokoo, T., Kajita, R., Onishi, T., Yahata, S., Peterson, K.M., Torii K.U., and Kakimoto, T. (2009). Epidermal cell density is auto-regulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR2, in Arabidopsis leaves. **Plant and Cell Physiology** 50, 1019-1031
5. Uchida, N., Lee, J.S., Horst, R.J., Lai, H.H., Kajita, R., Kakimoto, T., Tasaka, M., and Torii, K.U.* Regulation of inflorescence architecture by inter-tissue-layer ligand-receptor communication between the endodermis and phloem. **Proc Natl Acad Sci USA**; currently under revision

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件
(非公開)

(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】

- Keystone Symposium "Receptors and Signaling in Plant Development and Biotic Interactions" (Tahoe City, CA) 3/14-3/19/2010 "Cell-Cell Communication and Stomatal Patterning" 招待講演
- International Conference in Arabidopsis Research 2010 (Yokohama, Japan) (国際シロイヌナズナ学会) 6/6-6/11/2010: "Receptor signaling in Stomatal Patterning: Complexity, Challenges, and New Insights" 招待講演
- Plant Biology 2010 (Montreal, Canada) (カナダ、アメリカ植物生理学会 合同国際会議) 7/31-8/4/2010 "Take a Deep Breath, Signaling in Stomatal Patterning and Differentiation" 招待講演
- ASCB 50th Annual Meeting (Philadelphia, USA) (アメリカ細胞生物学会年会) 12/11-15/2010 "Symmetry and Asymmetry in Plant Epidermal Patterning" 招待講演
- Cold Harbor Asia Conference on Plant Cell and Developmental Biology (Suzhou China) (コールドスプリングハーバー・アジア植物細胞発生学シンポジウム) (5/31-6/4/11) "Communication, Fate, and Decision Making during Stomatal Development" 招待講演
- Society of Developmental Biologists Annual Conference (7/21-7/25/11) (米国 発生生物学会年会) "Cell-cell communication in plant organogenesis and tissue patterning" 招待講演

【受賞】

- 第5回 日本学術振興会賞「植物の気孔のパターン形成と分化のメカニズムの解明」 200/3/9
- 2010 Undergraduate Research Mentor Award, University of Washington 5/21/2010
- HHMI-GBMF Investigator '15 most innovative plant scientists in the US" 6/16/2011
- Distinguished Professor of Biology, University of Washington 10/1/2011

【著作物等】

- Pillitteri, L.J.,* and Torii, K.U.* (2012) Mechanisms of Stomatal Development. *Annual Review in Plant Biology*, Advance Online Publication [総説]
- Kanaoka, M.M. and Torii, K.U.* (2010) FERONIA as an upstream receptor kinase for polar cell growth in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 17461-17462 [コメンタリー]
- Rychel, A.L., Peterson, K.M., and Torii, K.U.* (2010) Plant Twitter: Ligands under 140 amino acids enforcing stomatal patterning. *Journal of Plant Research* 123: 275-280 [総説]
- Peterson, K.M., Rychel, A.L., and Torii, K.U.* (2010) Out of the mouths of plants: the molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. *Plant*

Cell 22: 296-306 [総説]

- Torii, K.U.* (2008) Transmembrane receptors in plants: receptor kinases and their ligands. In *Intracellular Signaling in Plants*. Eannual Plant Reviews. Ed. By ZB Yang, Wiley-Blackwell, London pp. 1-29 [著作: Book Chapter]