

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25113006

研究課題名(和文)細胞外シグナルと細胞内調節の相互作用による器官形成ロジックの多元的理解

研究課題名(英文)Organ formation logic based on mutual regulation of intercellular communication and intracellular regulation.

研究代表者

柿本 辰男(Kakimoto, Tatsuo)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：70214260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 87,300,000円

研究成果の概要(和文)：気孔と道管は共に水の通り道である。ペプチド性シグナル分子CLE9/10が受容体HSL1・共受容体SERK複合体に結合して気孔数を制御すると共に、受容体BAMに結合して道管数を調節していることを明らかにした。植物の側根原基形成の場である内鞘細胞のアイデンティティ決定のマスター転写因子も見出した。また、気孔細胞系譜の発生を調節するプログラムされた情報伝達系は、環境に応答した細胞内情報伝達からのシグナルを取り込むことにより、環境に応じた発生の調節を行っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一つのシグナル分子が細胞によって違った受容体によって受容され、別の発生過程を制御することを生物学および生化学的に示した。これは植物では初めての報告であり、発生を制御するシグナル伝達における重要な概念となった。側根原基は内鞘細胞から作られるが、その内鞘細胞のアイデンティティ決定の仕組みを明らかにした。植物は広く根系を展開するが、その元となる細胞の形成の仕組みの発見と言える。また、気孔細胞系譜を支配する情報伝達系が水供給の情報を統合して自らを調節する仕組みの解明は、遺伝学的にコードされた発生制御プログラムと環境情報の統合の仕組みの一端を明らかにしたもので、学術的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：Stomata and xylem are both water-conducting apparatus. We found that the CLE9/10 peptide bind to a receptor complex consisting HSL1 and SERK and regulate the stomatal number. This peptide also bind to other receptors, BAMs, and regulate the xylem number. We also worked on how pericycle cell identity is determined. Pericycle cells are unique in that they keep the potential to undergo auxin-induced formative cell division giving rise to lateral root primordia. We identified transcription factors that govern the identity of pericycle cells. We also found that the genetically-coded signal transduction pathway regulating stomatal development integrates environmental signal, enabling environmental adaptation of development.

研究分野：植物科学

キーワード：植物 シグナル 発生 転写因子 ペプチド 内鞘細胞 道管 気孔

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞間の情報伝達と細胞アイデンティティの決定は形態形成制御の中核である。植物において細胞間の情報伝達を担う分子としては植物ホルモンなどの低分子化合物やペプチドホルモンなどがある。植物ホルモンの合成や作用の基本的な仕組みはほぼ解明されているが、器官形成制御のための微小な領域における植物ホルモンの働きは十分にわかっているとは言えない。また、植物のペプチドホルモンの研究は盛んになっており、CLE ペプチド群などの研究も進展していた。私たちも研究開始時までに EPF1, EPF2, Stomagen などのペプチドホルモンを発見していた。しかしながら、CLE ペプチドにも多くの種類があり、冗長性も高いことから、機能解析が進んでいたのはこれらのうち一部であった。ペプチドホルモンの受容体としては、幾つかのものについて解明されており、これらが受容体キナーゼであることもわかっていた。細胞間の情報伝達などに依存して細胞が固有のアイデンティティを獲得する際には転写因子が鍵を握ることが多い。一部の細胞腫に関してはそのような転写因子についてもわかっていた。細胞の増殖や分化は遺伝的に決められた内的な調節だけではなく、環境に応答した調節も行っており、発生制御のシグナル伝達系が環境情報をどのように取り込むのかはよくわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

細胞アイデンティティ決定の仕組みは発生生物学の重要課題の一つである。多細胞生物の形態形成では正しい場所に正しい組織を形成する必要があり、そのためには細胞間情報伝達が必要である。自己組織化的側面においても細胞間情報伝達は必須であり、それらを担う分子としてオーキシンやペプチドホルモンが考えられる。また、これらの細胞間情報伝達と協調して細胞アイデンティティを支配する転写因子群が重要である。そこで、本研究においては、形態形成を制御する細胞間シグナル因子を見出し、その作用機構を明らかにすることを目的とする。また、細胞の幹細胞性や細胞系譜を支配する転写因子を見出してその機能を解明することを目的とする。さらに、発生制御のシグナル伝達系が環境情報に応答してどのように可塑的に変化し、環境に応じた成長制御を可能としているのかを解明する。

植物の発生制御において転写因子は非常に重要であるので、研究分担者である松井、光田、大島が中心となって研究領域全体の研究支援のために転写因子リソースを整備する。

### 3. 研究の方法

CLE9/10 ペプチドの生理機能の解析においては、CRISPR/Cas9 法によってペプチド遺伝子を破壊し葉の気孔と根の維管束パターンを観察した。CLE9/10 ペプチドの受容体を見出すにあたっては、多くのペプチドの受容体となっている Class XI 受容体キナーゼをコードするすべての遺伝子の変異体について、気孔形成阻害を指標に CLE9/10 ペプチドに対する感受性を調べた。これにより見出した受容体候補 HSL1 については組換えタンパク質を作成し、gel-filtration assay および Isothermal Titration Calorimetry (ITC) によって物理的相互作用を証明した。

### 4. 研究成果

1) CLE9/10 ペプチドによる気孔前駆細胞数と道管前駆細胞列数の制御。

植物は、根から葉までつながる道管と、葉の表皮にある気孔という小さな穴を使って水分を調節しており、発生過程における道管と気孔の数の制御は重要な役割を担う。根端には将来道管になる前駆細胞があり、各前駆細胞が根の長軸と直角な方向に細胞分裂することによって道管の細胞列を作り出し、最終的には細胞が中空になると共に、細胞列を作る細胞間が貫通することで道管が作られる。道管前駆細胞の数は、道管前駆細胞の縦方向の細胞分裂によって増やされるが、その制御機構は良くわかっていなかった。ペプチド性細胞間シグナル分子のうち、CLE グループのペプチドはシロイヌナズナには 32 種類存在する。発表者らは、CLE9/10 (CLE9 遺伝子と CLE10 遺伝子によって同一の CLE9/10 がコードされる) と呼ばれる 13 アミノ酸からなるペプチドが、気孔と、気孔以外の表皮細胞の数を制御していることを見出した。CLE9/10 がどのような受容体にとって認識されているのかを知るために多くの候補遺伝子の破壊株の CLE9/10 への応答性を調べ、細胞膜に存在する受容体キナーゼ HSL1 がその受容体であることを見出した。HSL1 が CLE9/10 を認識すると、SERK と呼ばれる共受容体を呼び込んで細胞内に情報を伝え、その結果、葉の幹細胞である MMC のアイデンティティを支配する転写調節因子 SPCH を分解し、気孔幹細胞の数を抑制することが明らかになった。CLE9 遺伝子は道管前駆細胞でも発現している。MMC においては CLE9/10 は HSL1 によって受容されているが、道管前駆細胞においては CLE9/10 は別の受容体キナーゼである BAM により認識されて道管前駆細胞数を制御していることがわかった。植物は多くのペプチド性細胞間シ

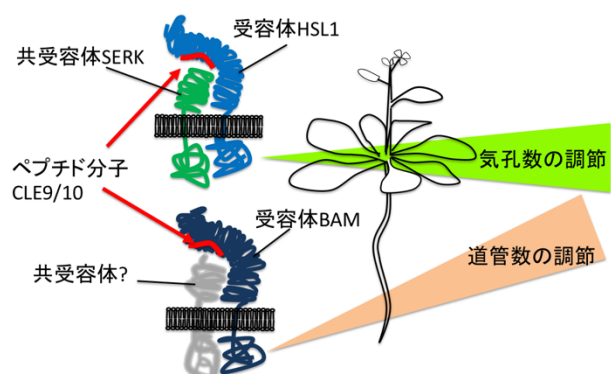


図1. ひとつのペプチド性シグナル分子が、働きかける受容体によって別の発生過程を制御する。

植物は多くのペプチド性細胞間シ

グナル分子候補と受容体キナーゼを持っている。これらは必ずしも1対1対応ではなく、1つのペプチドが違った受容体を介して違った機能を発揮する例を示したものである。ここでは、一つのペプチドが、水の通り道である道管と気孔数を、別の受容体を介して調節していることを示したものです。さらに、受容体BAMには複数のペプチドが作用することを本研究グループや他の研究者が見出しており、多くのリガンドと受容体が複雑な相互作用関係を持っていることがわかる (Nature Plants 2018)。

## 2) 内鞘細胞のアイデンティティ決定因子の同定

内鞘細胞は側根原基形成の場であり、オーキシンに応答した細胞分裂を行う能力がある幹細胞である。内鞘細胞アイデンティティ決定のマスター転写因子を見出すことを目指した。内鞘細胞で発現する多くの転写因子を候補とし、過剰発現で内鞘細胞アイデンティティを与えることができる転写因子をスクリーニングし、これを見出した。光田らの転写因子2ハイブリッド法を用いて調べたところ、2つのクラスに属する転写因子群 (PERICYCLE FACTORa 群と PERICYCLE FACTORb 群と名付ける) がヘテロダイマーを形成して内鞘細胞アイデンティティを与えていることを見出した (未発表)。

## 3) MAP キナーゼ/SPCH 気孔発生制御シグナル伝達系による環境ストレス応答シグナルの統合。

生物は、それぞれに固有の遺伝情報に基づく基本発生プログラムともいべき制御系を使って特有の形と大きさへと成長する。動物は環境にはあまり影響されずに固有の大きさに成長するのに対し、植物は、悪環境では成長を抑制することが多い。植物にとって最も大きな脅威の一つは水不足である。水が得られにくい環境では、植物は地上部の成長を抑制し、気孔の形成数も減少させる。形成初期の葉にはメリステモイド母細胞 (MMC) と呼ばれる幹細胞が存在し、これが表皮のほとんどの細胞の源となっている。メリステモイド母細胞では、SPEECHLESS タンパク質が、MMC アイデンティティを支配している。

本研究において、高浸透圧にさらすとメリステモイド母細胞の数が減少する事、さらにこの減少は MAPK 情報伝達系の阻害剤により緩和されることがわかった。

また、SPCH タンパク質に GFP を融合して観察し、高浸透圧ストレスで SPCH が減少することがわかった。さらに、植物は高浸透圧にさらされると MAPK を介して SPEECHLESS を分解し、メリステモイド母細胞が幹細胞として維持されなくなり、最終的な細胞数を減少させることを明らかにした (Plant Cell Phys, 2014)。

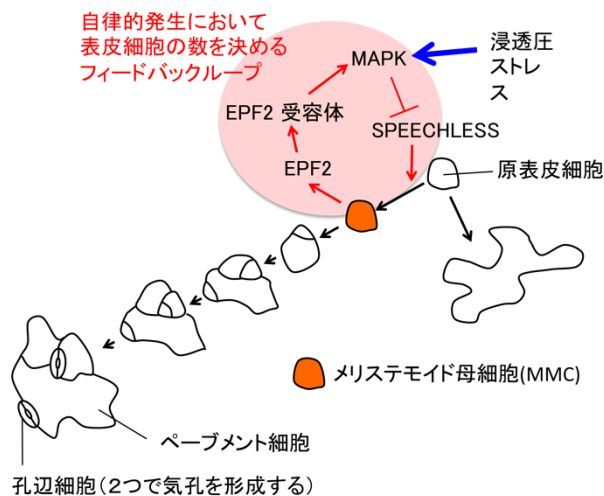


図2. 葉の幹細胞であるメリステモイドの数をフィードバック制御する自律的制御系と環境ストレスシグナルの統合。模式図の細胞パターンは、葉の発生系譜を示す。

## 4) シロイヌナズナのすべてのオーキシン受容体によるすべての AUX/IAA タンパク質のオーキシン依存的分解の解析

オーキシン感受性は植物の組織によって大きく異なっており、植物体のオーキシン応答のダイナミックレンジは広い。このオーキシン感受性の違いは何によって生み出されているのであろうか？オーキシンは、オーキシン受容体 (TIR1, AFB1, 2, 3, 4, 5) と 24 種の AUX/IAA タンパク質の相互作用を誘導して AUX/IAA タンパク質の分解に導く。AUX/IAA タンパク質はオーキシン応答の阻害因子であるので、この分解によってオーキシン情報伝達が始まる。したがって、各細胞におけるオーキシン感受性は、その細胞で発現しているオーキシン受容体と AUX/IAA タンパク質の組み合わせと、これら組み合わせにおける AUX/IAA タンパク質の分解のオーキシン感受性によって決められていることになる。そこでシロイヌナズナのオーキシン受容体と AUX/IAA タンパク質をすべての組み合わせで酵母に発現させ、AUX/IAA タンパク質分解のオーキシン感受性を調べた。これらの組み合わせによりオーキシン感受性は大きく異なっており、植物の組織によるオーキシン応答性理解に必要な情報を得ることができた (Plant Cell Physiology, 2014)。

## 5) 転写因子リソースの整備

松井、光田、大島が中心となり、シロイヌナズナのすべての転写因子 cDNA を整備し、シロイヌナズナでの過剰発現、転写抑制ドメイン融合発現体、ロボットによる酵母2ハイブリッドシステムを整備し、領域の研究と植物コミュニティーに貢献した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- (1) Qian P, Song W, Yokoo T, Minobe A, Wang G, Ishida T, Sawa S, Chai J, Kakimoto T. (2018) The CLE9/10 secretory peptide regulates stomatal and vascular development through distinct receptors. *Nat Plants*. 4(12):1071-1081. doi: 10.1038/s41477-018-0317-4 (査読有)
- (2) Pernisova M, Grochova M, Konecny T, Plackova L, Harustiakova D, Kakimoto T, Heisler MG, Novak O, Hejatko J. (2018) Cytokinin signalling regulates organ identity via the AHK4 receptor in Arabidopsis. *Development*. 145(14). pii: dev163907. doi: 10.1242/dev.163907. (査読有)
- (3) Pernisova M, Grochova M, Konecny T, Plackova L, Harustiakova D, Kakimoto T, Heisler MG, Novak O, Hejatko J. (2018) Cytokinin signalling regulates organ identity via the AHK4 receptor in Arabidopsis. *Development* 145(14). pii: dev163907. doi: 10.1242/dev.163907 (査読有)
- (4) Kurihara Y, Makita Y, Kawashima M, Fujita T, Iwasaki S, Matsui M. (2018) Transcripts from downstream alternative transcription start sites evade uORF-mediated inhibition of gene expression in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:7831-7836. doi: 10.1073/pnas.1804971115. (査読有)
- (5) Kimura T, Haga K, Shimizu-Mitao Y, Takebayashi Y, Kasahara H, Hayashi KI, Kakimoto T, Sakai T. (2018) Asymmetric Auxin Distribution is Not Required to Establish Root Phototropism in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. 59:823-835. doi: 10.1093/pcp/pcy018. (査読有)
- (6) Siddique S, Radakovic ZS, De La Torre CM, Chronis D, Novák O, Ramireddy E, Holbein J, Matera C, Hutten M, Gutbrod P, Anjam MS, Rozanska E, Habash S, Elashry A, Sobczak M, Kakimoto T, Strnad M, Schmülling T, Mitchum MG, \*Grundler FM. (2015) A parasitic nematode releases cytokinin that controls cell division and orchestrates feeding site formation in host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 12669-12674. doi.org/10.1073/pnas.1503657112 (査読有)
- (7) Randall RS, Miyashima S, Blomster T, Zhang J, Elo A, Karlberg A, Immanen J, Nieminen K, Lee JY, Kakimoto T, Blajevska K, Melnyk CW, Alcasabas A, Forzani C, Matsumoto-Kitano M, Mähönen AP, Bhalerao R, Dewitte W, Helariutta Y, Murray JA. (2015) AINTEGUMENTA and the D-type cyclin CYCD3;1 regulate root secondary growth and respond to cytokinins. *Biol Popen*. doi: 10.1242/bio.013128. (査読有)
- (8) Sugawara S, Mashiguchi K, Tanaka K, Hishiyama S, Sakai T, Hanada K, Kinoshita-Tsujimura K, Yu H, Dai X, Takebayashi Y, Takeda-Kamiya N, Kakimoto T, Kawaide H, Natsume M, Estelle M, Zhao Y, Hayashi K, Kamiya Y, Kasahara H. (2015) Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants. *Plant Cell Physiol*. 56, 1641-1654. doi: 10.1093/pcp/pcv088 (査読有)
- (9) Müller D, Waldie T, Miyawaki K, To JP, Melnyk CW, Kieber JJ, Kakimoto T, Leyser O. (2015) Cytokinin is required for escape but not release from auxin mediated apical dominance. *Plant J*. 82, 874-886. doi: 10.1111/tpj.12862. (査読有)
- (10) Kumari A, Jewaria PK, Bergmann DC, Kakimoto T. (2014) Arabidopsis Reduces Growth Under Osmotic Stress by Decreasing SPEECHLESS Protein. *Plant Cell Physiol*. 55, 2037-2046. doi: 10.1093/pcp/pcu159. (査読有)
- (11) Shimizu-Mitao Y, Kakimoto T. (2014) Auxin Sensitivities of All Arabidopsis Aux/IAAs for Degradation in the Presence of Every TIR1/AFB. *Plant Cell Physiol*. 55, 1450-1459. doi: 10.1093/pcp/pcu077. (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

- (1) Identification of Key transcription factors that determine pericycle stem cell potential in Arabidopsis. Ye Zhang, Nobutaka Mitsuda, Takeshi, Yoshizumi, Yoichi Kondo, Masaru Takagi, Minami Matsui, Tatsuo Kakimoto. 第 60 回植物生理学会 (名古屋) 2019 年 3 月 13 日
- (2) 維管束における細胞分裂方向制御機構の解析. 豊倉浩一, Jung-ok Heo, Iris Sevillem, 宮島俊介, 柿本辰男, Yrjo Helariutta. 第 59 回 日本植物生理学会第 79 回大会 (札幌) 2018 年 3 月 28 日
- (3) Roles of ROP interactive partners (RIPs) in cell division in Arabidopsis thaliana Qimuge Hasi, Tatsuo Kakimoto. 第 8 1 回植物学会 (野田) 2017 年 9 月 9 日
- (4) Analysis of the functions of RGFs in the first stage of lateral root formation. Natalia Constanza de la Tijera Fernandez, Tatsuo Kakimoto. 第 8 1 回植物学会 (野田) 2017 年 9 月 8 日



(5) Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants. Satoko Sugawara, Kiyoshi Mashiguchi, Keita Tanaka, Shojiro Hishiyama, Tatsuya Sakai, Kousuke Hanada, Kaori Kinoshita-Tsujimura, Hong Yu, Xinhua Dai, Yumiko Takebayashi, Noriko Takeda-Kamiya, Tatsuo Kakimoto, Hiroshi Kawaide, Masahiro Natsume, Mark Estelle, Yunde Zhao, Ken-ichiro Hayashi, Yuji Kamiya and Hiroyuki Kasahara. 第58回日本植物生理学会年会 2017年3月17日

(6) 師部特異的な転写因子が維管束パターンを制御する仕組み. 財前美希, 久米佐和, Ye Zhang, 光田展隆, 吉積毅, 近藤陽一, 高木優, 松井南, 柿本辰男. 第58回日本植物生理学会年会 2017年3月17日

(7) Molecular mechanisms that determine pericycle cell identity. Ye Zhang, Nobutaka Mitsuda, Chuan-Ming Yeh, Takeshi Yoshizumi, Yoichi Kondo, Masaru Takagi, Minami Matsui, Tatsuo Kakimoto. 第57回日本植物生理学会年会 2016年3月18日

(8) Transcription factors that may regulate phloem companion-cell development Miki Zaizen, Sawa Kume, Ye Zhang, Nobutaka Mitsuda, Takeshi Yoshizumi, Yoichi Kondo, Masaru Ohme-Takagi, Minami Matsui, Tatsuo Kakimoto. 第57回日本植物生理学会年会 2016年3月18日

(9) 初期器官発生における低分子量Gタンパク質の機能解析. ハスチムグ, 柿本辰男, 第57回日本植物生理学会年会 2016年3月18日

(10) シロイヌナズナの根の光屈性におけるオーキシン輸送、生合成、シグナル伝達の機能解析. 木村太郎, 芳賀健, 志水三田尾悌, 竹林裕美子, 林謙一郎, Yunde Zhao, 柿本辰男, 笠原博幸, 酒井達也. 第57回日本植物生理学会年会 2016年3月18日

(11) CLE (CLAVATA3/ESR-like) 9 controls cell proliferation in stomatal cell lineage. 銭平平, 美濃部彩子, 石田喬志, 澤進一郎, 柿本辰男. 第57回日本植物生理学会年会 2016年3月18日

(12) Molecular mechanisms that determine pericycle cell identity. Ye Zhang, Nobutaka Mitsuda, Chuan-Ming Yeh, Takeshi Yoshizumi, Yoichi Kondo, Masaru Takagi, Minami Matsui, Tatsuo Kakimoto. 日本植物学会第79回大会(新潟) 2015年9月6日

(13) Regulation of plant epidermal development in response to biotic and abiotic stresses. Pingping Qian, Archana Kumari, Tatsuo Kakimoto. 日本植物学会第79回大会(新潟) 2015年9月6日

(14) 篩部形成に関する転写因子の解析. Miki Zaizen, Sawa Kume, Ye Zhang, Nobutaka Mitsuda, Takeshi Yoshizumi, Yoichi Kondo, Masaru Takagi, Minami Matsui, Tatsuo Kakimoto. 日本植物学会第79回大会(新潟) 2015年9月6日

(15) 環境に応答した発生プログラム調節. 柿本辰男, Archana Kumari, Dominique Bergmann, Pawan Jewaria. 第55回日本植物生理学会年会 2014年3月18日

(16) Signaling components for ABA mediated decrease in epidermal cells Archana Kumari, Tatsuo Kakimoto. 第55回日本植物生理学会年会 2014年3月18日

(17) Roles of Aux/IAAs at the shoot apical meristem. Yasushi Shimizu-Mitao, Tatsuo Kakimoto. 第55回日本植物生理学会年会 2014年3月18日

[図書] (計1件)

柿本辰男 他22名, 浅見忠男, 柿本辰男(編) 新しい植物ホルモンの科学 第3版、1-3ページ、22-36ページ 2016年 講談社

[その他]

ホームページ

[http://www.bio.sci.osaka-](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/cell_physiol/sitepg/Kakimoto_Lab/homu.html)

[u.ac.jp/bio\\_web/lab\\_page/cell\\_physiol/sitepg/Kakimoto\\_Lab/homu.html](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/cell_physiol/sitepg/Kakimoto_Lab/homu.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 松井 南

ローマ字氏名: MATSUI, Minami

所属研究機関名: 国立研究開発法人 理化学研究所

部局名: 環境資源科学研究センター

職名: グループディレクター

研究者番号(8桁): 25113006

研究分担者氏名：光田 展隆

ローマ字氏名：MITSUDA Nobutaka

所属研究機関名：独立行政法人産業技術総合研究所

部局名：生物プロセス研究部門

職名：グループディレクター

研究者番号 (8桁)：80450667

研究分担者氏名：大島 良美

ローマ字氏名：OHSHIMA, Yoshimi

所属研究機関名：独立行政法人産業技術総合研究所

部局名：生物プロセス研究部門

職名：研究員

研究者番号 (8桁)：00722951