

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14547

研究課題名(和文) 茎の内皮形成機構の解明に向けた研究基盤の整備

研究課題名(英文) Development of research base to elucidate the mechanism of stem endodermis formation

研究代表者

深城 英弘 (Hidehiro, Fukaki)

神戸大学・理学研究科・教授

研究者番号：80324979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の茎の横断面には、外側から表皮・皮層・内皮などの組織が同心円状に配置する。このような組織の放射パターンは茎の先端の未分化な組織(茎頂分裂組織)で形成されるが、その形成機構はほとんど明らかにされていない。本研究は、茎の放射パターン形成の機構を理解することを大きな目標として、茎の内皮層に注目し、研究材料の工夫と近年開発された観察技術の利用を通して、茎頂分裂組織における内皮幹細胞および内皮形成に関連する遺伝子群を同定することによって、茎の内皮形成機構の解明に向けた研究基盤の整備をおこなった。

研究成果の概要(英文)：On the cross section of the stem of the plant, tissues such as epidermis, cortex and endodermis are concentrically arranged from the outside. Radial patterns of such tissues are formed from undifferentiated tissues at the tip of the stem (shoot apical meristem), but their formation mechanisms are hardly elucidated. This research aims to understand the mechanism of radial pattern formation of the stem as a major objective, focusing on endodermis layer of the stem. The research infrastructure for the elucidation of the endodermis formation mechanism of stem was improved by trying to identify the endodermis stem cells in the shoot apical meristem and the genes associated with endodermis formation, through devising research materials and using observation techniques developed recently.

研究分野：植物生理学・発生学

キーワード：維管束植物 茎 内皮 放射パターン 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

一般に種子植物の茎の横断面は、根と同様に外側から表皮・皮層・内皮・中心柱などの組織が同心円状に配置する。このような放射パターンは茎頂分裂組織 (shoot apical meristem: SAM) で形成される。表皮は SAM の L1 層から形成されることがわかっているが、それ以外の茎の内部組織が、実際に SAM の下部においてどのような機構で形成され、放射パターンが形成されるのか、ほとんど明らかにされていない (図 1: 上)。

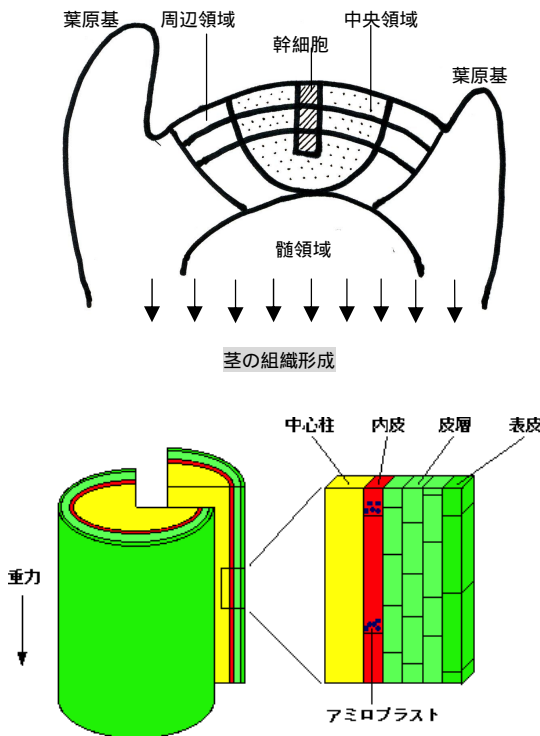


図 1. 茎頂分裂組織の構造 (上) と茎の組織 (下)

茎の基本組織のうち、内皮は皮層の内側にある一層の細胞層であり、アミロプラストを含む (図 1: 下)。これまで申請者は、シロイヌナズナにおいて内皮が茎の重力屈性に必須な組織であることを遺伝学的に証明し、茎の重力感受組織として働くことを強く示唆するとともに、根の皮層・内皮形成に必須な転写因子 SHORT-ROOT (SHR) と SCRARECROW (SCR) が、茎の内皮形成に必要なことを明らかにした (Fukaki et al. 1998, *Plant J.*)。

シロイヌナズナでは、根と胚軸の皮層・内皮が共通の皮層・内皮幹細胞から形成され、その過程に上述の SHR と SCR を介した経路が必要なことが示されている (Di Laurenzio et al., 1996, *Cell*; Helariutta, Fukaki et al., 2000, *Cell*)。しかし、一層の内皮細胞層が SAM のどの部位で、SHR と SCR を介してどのように形成されるのか、また、内皮特異的な幹細胞があるのか、などの問題は、葉や花などの側方器官を生み出す複雑な SAM 構

造が障壁となり、ほとんど研究がなされておらず、現在も全く分かっていない。申請者は 1998 年に内皮形成に必要な上記遺伝子を同定して以来、これらの問題の解明する機会を窺っていた。そして、組織の観察・解析技術が進化した今こそ、それらを利用して独自のアイデア (単純な SAM 構造もつ *pin1* 変異体を利用) で、茎の放射パターン形成機構の研究を本格的に再スタートさせる好機と考えた。

2. 研究の目的

本研究は、茎の組織形成と放射パターン形成の機構の理解を大きな目標として、茎の基本組織である内皮細胞層に注目し、未だに不明な茎頂分裂組織における内皮幹細胞の同定と内皮形成の分子機構を、研究材料の工夫と近年開発された観察手法の利用を通して明らかにすることを目指し、その研究基盤を整備する。茎形成に関する分子レベルの知見は、根、葉、花に比べて乏しい。本研究の進展により、茎形成に関する研究分野の発展が期待できる。

3. 研究の方法

植物の茎頂分裂組織 (SAM) は根端分裂組織 (root apical meristem: RAM) と異なり、分裂組織の周辺領域から側方器官として新たに葉や花原基を次々と生み出しながら、SAM の髄領域において茎の内部組織を形成する。そのため、RAM よりも構造が複雑で、茎組織の細胞系譜を同定しづらく、茎の内皮組織を生み出す幹細胞を同定することも困難である (Wysocka-Diller et al., 2000, *Development*)。以前の研究で申請者らが行った観察で、花芽を形成しない SAM を持つ *pin-formed1* (*pin1*) 変異体の花茎は、茎のオーキシン極性輸送に異常があるものの、野生型と同様に一層の内皮細胞層を形成しており、*pin1* の SAM は野生型に比べ単純な構造を持っていた (*pin* 型 SAM と呼ぶ)。さらに、この *pin* 型 SAM における *SCR* 遺伝子の発現解析から、茎の内皮層を生み出すと考えられる細胞群が、SAM 周辺領域の下部内層に存在することが示された (図 2、Wysocka-Diller et al., 2000)。

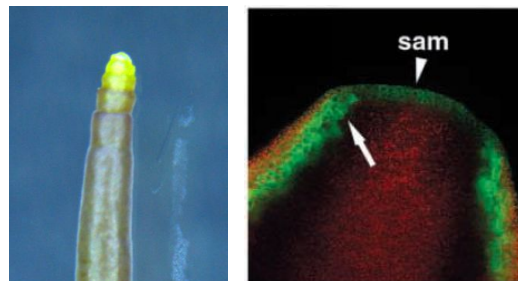


図 2. シロイヌナズナ *pin1* 変異体の茎頂 (左) および茎頂分裂組織 (sam) における *pSCR::GFP* の発現 (右) (は推定内皮幹細胞の位置)

本研究では、この *pin* 型 SAM をモデルとして、茎の内皮幹細胞の同定と、内皮形成の機構の解明に本格的に取り組む。また、野生型と *pin1* 変異体に加えて、内皮を欠失する *shr*、*scr* 変異体、および *pin1 shr*、*pin1 scr* 二重変異体を用いた SAM の遺伝子発現プロファイルの比較から、SAM で働く内皮幹細胞特異的遺伝子や内皮形成関連遺伝子を効率的に同定することが可能になる。

(1) 茎の内皮幹細胞の同定

シロイヌナズナ野生型、*shr*、*scr* 変異体の SAM 構造、および花原基を形成せず茎組織のみを形成する *pin1* 変異体、*pin1 shr*、*pin1 scr* 二重変異体の SAM 構造を、組織切片法、および SAM の高解像度ホールマウントイメージング法により観察し、内皮幹細胞を同定するとともに、内皮形成初期における SHR、SCR の役割を明らかにする。方法の詳細は、研究成果に合わせて記載した。

(2) 茎の内皮幹細胞特異的遺伝子および内皮形成関連遺伝子の探索と同定

野生型と上記変異体系統の SAM において発現する RNA プロファイルを明らかにし、内皮形成の有無での遺伝子発現プロファイルの比較、およびそれらの発現解析ト機能解析から、内皮幹細胞特異的遺伝子や内皮形成関連遺伝子の同定を目指す。方法の詳細は、研究成果に合わせて記載した。

4. 研究成果

(1) 茎の内皮幹細胞の同定

シロイヌナズナ野生型、*shr*、*scr* 変異体の SAM 構造、および花原基を形成せず茎組織のみを形成する *pin1* 変異体、*pin1 shr*、*pin1 scr* 二重変異体の SAM 構造を、組織切片法、および高解像度ホールマウントイメージング法により観察し、内皮幹細胞を同定することを試みた。花原基を形成せず茎組織のみを形成する *pin1* 変異体の茎頂部の縦断切片を観察したところ、縦断面像からは内皮層および内皮幹細胞を正確に同定することは困難であった (図3)。

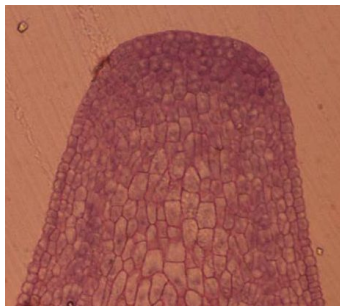


図3 . *pin1* 変異体の茎頂縦断切片像。花原基は形成されていない。

そこで、内皮細胞層で特異的に発現する SCR 遺伝子のレポーター系統として、従来の *pSCR::GFP* に加えて複数のレポーター系統 (*pSCR::GUS-GFP*、*pSCR::H2B-GFP*、

pSCR::NLS-Venus など) を野生型背景で作出し、さらにそれらを *pin1* 変異体に交配により導入した。本研究期間終了までに *pin1* 変異体への各種レポーター遺伝子の導入系統を単離した。また、比較のため、茎の内皮を欠失して SCR 遺伝子の発現が起こらない *pin1 shr* 変異体にもこれらのレポーター系統の導入を行った。これらの可視化レポーターをもつ材料が整備できたことで、今後、新たな高解像度ホールマウントイメージング法 (mPS-PI 染色) と組み合わせることで、茎頂分裂組織における内皮層を生み出す幹細胞の特定を目指すことが可能となった。

(2) 茎の内皮幹細胞特異的遺伝子および内皮形成関連遺伝子の探索と同定

花原基を形成せず茎組織のみを形成する *pin1* 変異体、*pin1 shr*、*pin1 scr* 二重変異体の SAM で発現する RNA のプロファイルをマイクロアレイによって調べた。*pin1*、*pin1 shr^{real1}*、*pin1 shr-1*、*pin1 scr-3* の SAM を含む茎頂切片から抽出した RNA をサンプルとして、Affymetrix 社製 Arabidopsis ATH1 Gene Chip を用いて、各系統における発現プロファイルを調べたところ、内皮を形成する *pin1* で発現量が高く、正常な内皮を形成しない *pin1 shr^{real1}*、*pin1 shr-1*、*pin1 scr-3* で発現量が低い遺伝子が多数見つかった。それらの中には、細胞周期関連因子、転写因子、ヒストン修飾因子、輸送体、細胞壁関連酵素、小胞輸送関連因子、細胞骨格関連因子、機能未知タンパク質など、その遺伝子機能が多岐にわたっていた。これは、*pin1* 変異体背景における *shr*、*scr* 変異の導入により、推定内皮幹細胞の分裂や娘細胞の分化だけでなく、内皮細胞層の欠失による多面的な影響を反映した可能性が考えられる。同定された内皮形成関連候補遺伝子のうち、興味深いいくつかの遺伝子 (GRAS 遺伝子ファミリーに属する複数の SCR-like 遺伝子など) について、組織特異的な発現解析や変異体の表現型解析を行うことで、それらが真の内皮幹細胞特異的遺伝子なのか、あるいは内皮形成関連遺伝子なのかを明らかにできると考えられる。また、サンプルに用いる茎頂切片をより SAM 領域に限定して調整する工夫を行う必要がある。

(3) 研究のまとめと今後の展望

根では皮層と内皮が共通の幹細胞から2回の非対称分裂によって形成される。このとき SHR 遺伝子は中心柱で転写・翻訳され、作られた SHR タンパク質が原形質連絡を通して一層外側の内皮、皮層・内皮幹細胞、静止中心に細胞間移行して SCR 遺伝子の転写を誘導し、内皮と皮層を生み出す非対称分裂を引き起こす。また SHR の働きにより内皮の性質が決定される (Di Laurenzio et al., 1996, Cell; Heraliutta,

Fukaki et al., 2000, *Cell*; Nakajima et al. 2001; *Nature*)。この仕組みは胚における幼根・胚軸の皮層・内皮形成においても同様であると考えられている (Fukaki et al., 1998, *Plant J.*; Wysocka-Diller et al. 2000, *Cell*)。この仕組みが後胚発生で形成される茎にも当てはまるかどうかは全く不明である。根と同様に茎の皮層と内皮が共通の幹細胞に由来するのか、SHR によって SCR が誘導される仕組みが存在するのか、など、解明できていない課題がまだ残されている。しかしながら、今後、本研究の成果に基づいて、根と茎の放射パターン形成の共通性と独自性について重要な知見が見いだされることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Goh, T., Toyokura, K., Wells, D.M., Swarup, K., Yamamoto, M., Mimura, T., Weijers, D., Fukaki, H., Laplaze, L., Bennett, M.J., and Guyomarç'h, S. (2016) Quiescent center establishment in *Arabidopsis* lateral root coincides with developmental phase transition to promote organ emergence. ***Development***, 143, 3363-3371. (査読有) doi: 10.1242/dev.135319

[学会発表](計 0件)

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
所属機関研究者紹介ホームページ
<http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fsci-biol/staff/h-fukaki.html>
研究室ホームページ
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-fukak>

[i/fukaki/top.html](http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fukaki/top.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

深城 英弘 (FUKAKI HIDEHIRO)
神戸大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：80324979

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

三村 徹郎 (MIMURA TETSURO)
神戸大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：20174120

石崎 公庸 (ISHIZAKI KIMITSUNE)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00452293

(4)研究協力者

郷 達明 (GOH TATSUAKI)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：80511449

豊倉 浩一 (TOYOKURA KOICHI)
大阪大学・大学院理学研究科・特別研究員 (PD)