

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07396

研究課題名(和文)植物細胞の未分化状態の解除に関わる遺伝子発現制御機構

研究課題名(英文)Studies on the mechanism of gene expression that contributes to stem cell differentiation and homeostasis

研究代表者

槻木 竜二 (Tsugeki, Ryuji)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：50303805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物の発生の特徴的な点は、胚発生の後も繰り返し器官形成を行うことにある。普段目にする植物の葉や花は、発芽後に作られたものである。器官の元になる細胞は幹細胞であるが、幹細胞らしさの実体の分子レベルでの解明にはほとんど至っていない。また、器官が作られる過程で、幹細胞らしさは失われることも必要であるが、その消失の仕組みも明らかでない。

VAH遺伝子が、幹細胞らしさにブレーキをかける新規因子であることを明らかにした。VAHタンパク質は他のタンパク質と複合体を形成し、機能していることもわかった。

葉の維管束幹細胞の発達には、局所的なオーキシン合成が重要な役割を持つ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

幹細胞の重要な性質の1つは、細胞増殖する能力を持つことである。一方、幹細胞から器官が作られる際には、その増殖能を適切に失う必要がある。例えば、増殖能を持ち続けてしまうと、不必要な細胞増殖が起きて、不具合を生じてしまうだろう。しかしながら、どのように幹細胞らしさが喪失されるのかほとんどわかっていない。幹細胞らしさの維持についての研究は多いが、消失に着目した研究はほとんどない。VAHは幹細胞らしさの消失に関わる新規な遺伝子であり、似た遺伝子がヒトにも存在する。VAHの研究は、植物幹細胞の理解だけでなく、動物幹細胞の理解にも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In plants, the meristems harboring stem cells are central to post-embryonic formation of organs and tissues. To understand plant growth and development, it is important to reveal the mechanisms that contribute to stem cell differentiation and homeostasis. Arabidopsis thaliana VAH was identified as a gene that influences stem cell differentiation and homeostasis. Present data suggest that VAH mediates negative control of stemness in the shoot and root. It appears that VAH protein forms a multi-protein complex in vivo.

A plant hormone auxin is important for stem cell differentiation and homeostasis. It has been shown that local auxin biosynthesis is important for development of vascular stem cells in leaves.

研究分野：植物分子発生学

キーワード：植物幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物では、器官の形成が胚発生に始まり、胚発生の後も一生を通じて繰り返しおこなわれる。また、器官形成などの発生プロセスは、生育環境に応じて柔軟に調節され、環境に適応した形態、性質を持つに至る。器官の元になる細胞は幹細胞であり、樹齢が数千年を越える木々であれば、数千年以上の間、器官の形成に必要な幹細胞を新生したり維持したりしつつ、葉などの器官を作り続けている。植物の幹細胞とはどういうものなのか？幹細胞の未分化な状態の実体は何であるのか？幹細胞の分化能の獲得や維持はどのように制御されているのか？また、幹細胞から生成された未分化な細胞が特定の働きを持つ細胞へと分化していく過程で遺伝子発現はどのようにリプログラミングされるのか？これらは、植物の発生を理解する上で重要な問題であるが、分子レベルでの解明にはほとんど至っていない。

(1) 多細胞生物の発生において、幹細胞から生じた細胞は、分化する過程で幹細胞らしさを正しく失う必要がある。例えば、幹細胞の増殖能を持ち続けると必要以上に増殖してしまうだろう。しかしながら、どのように幹細胞らしさが喪失されるのかほとんどわかっていない。幹細胞の未分化状態の維持についての研究は多いが、解除に着目した研究はほとんどない。

維管束幹細胞の形成領域の制限や根端幹細胞ニッチの形成領域の制限などに関わる *VASCULAR HYPERPLASIA (VAH)* 遺伝子を単離同定し、解析を進めていた。VAH 遺伝子の機能欠損変異体では、幹細胞マーカーの異所的な発現や、幹細胞領域の拡大、幹細胞の分裂能の上昇などの表現型が見られた。また、同遺伝子が、幹細胞や未分化な細胞の維持を促す複数の *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN (WOX)* ファミリー遺伝子の発現を負に制御していることを明らかにしていた。VAH 変異が、*clv3* 変異を昂進することを示唆する結果も得ていた。これらは、VAH が幹細胞らしさを負に制御する新規遺伝子であることを示唆した。

(2) 植物の幹細胞維持には、植物ホルモンであるオーキシンの生合成や極性輸送、受容、応答が必要であることが知られている。植物におけるオーキシンの依存した組織や器官の形成、細胞分化、分裂組織の幹細胞維持には、オーキシンの生合成や極性輸送、受容、応答に関わる遺伝子の適切な発現も必要だが、その発現制御についてはわかっていないことが多い。また、オーキシン合成の鍵酵素の局所的な発現による局所的なオーキシン合成の役割などについてもあまりわかっていない。

### 2. 研究の目的

(1) *WUSCHEL (WUS)* 遺伝子などの *WOX* 遺伝子の発現を負に制御する VAH 遺伝子を指標として幹細胞の未分化状態が解除される機構を解析する。VAH 遺伝子の機能を明らかにし、幹細胞の未分化状態の解除の側面から、幹細胞らしさの実体に迫りたい。VAH を介した新規転写制御機構を明らかにし、植物幹細胞の未分化状態が解除される仕組みの解明を目指す。

VAH タンパク質複合体を分子生化学的に解析し、構成タンパク質を同定・解析して、VAH タンパク質の生化学的な役割を明らかにする。

VAH 遺伝子と共に働く遺伝子や、VAH 変異体で異常な発現上昇や異所的発現の見られる遺伝子を同定し解析する。

(2) 葉脈形成におけるオーキシンの局所的な生合成の寄与と役割について明らかにする (独国フライブルグ大学 Klaus Palme 博士、Frank A. Ditengou 博士らとの共同研究)。

### 3. 研究の方法

(1) VAH 遺伝子を指標として植物幹細胞の未分化状態が解除される機構を解析する。

VAH 遺伝子を遺伝学的に解析し、VAH の植物幹細胞の分化制御における役割を明らかにする。

VAH 遺伝子と共に働く遺伝子の同定と遺伝学的解析を行う。

VAH 遺伝子の発現を解析する。

芽生えなどの植物個体では、幹細胞領域は小さく、*WUS* 遺伝子や *WOX* 遺伝子等の発現領域も小さいため、VAH タンパク質の生化学的解析には困難が伴うことが予想された。VAH の生化学的材料に適した材料の検討開発を行った。

VAH タンパク質を生化学的に解析する。VAH タンパク質複合体を精製し、VAH と相互作用する因子を同定する。すでに作製済みの *VAHp::VAH::GFP* 形質転換系統などを出発材料に、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降を行い、VAH:GFP タンパク質複合体を精製する。精製画分を質量分析に供する。VAH 複合体の構成成分を同定する。

VAH 遺伝子の機能は、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) と関連があることを示唆する結果を得ている。VAH 変異体などの表現型を分子生化学的に解析し、VAH 遺伝子と Pol II の関連を明らかにする。真核生物の Pol II の最大サブユニット RPB1 の C 末端領域には 7 アミノ酸 YSPTSPS の保存された繰り返し配列があり、同配列中のセリン残基は、転写サイクル中にダイナミックにリン酸化と脱リン酸化されることが知られている。5 番目のセリン (S5) は、転写開始後のタイミングでリン酸化され、転写伸長が進むと脱リン酸化される。一方、2 番目のセリン (S2) は転写伸長の進行に伴ってリン酸化され、転写終結の頃に脱リン酸化される。転写開始前の Pol II では、これら両セリン残基共にリン酸化されていないことも知られている。S5、S2 がリン酸化された YSPTSPS を各々特異的に認識する抗体を用いて免疫沈降を行うことで、転写開始直後

と伸長中の Pol II に大別して免疫沈降できる。野生型と *vah* 変異体などを材料に、これらの抗体を用いて共免疫沈降を行い、Pol II の動態を解析する。

(2) オーキシン生合成の鍵酵素の発現パターンの解析や、オーキシン生合成鍵酵素遺伝子の変異体の解析などを通じて、葉脈形成におけるオーキシンの局所的生合成の寄与と役割について明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) VAH 遺伝子を指標とした植物幹細胞の未分化状態が解除される機構の解析

機能欠損 *vah* 変異体の表現型解析から、VAH 遺伝子が、植物体の維管束幹細胞組織や根端分裂組織においてだけでなく、茎頂分裂組織、胚発生過程において、幹細胞らしさの抑制に貢献していることを見いだした。

VAH 遺伝子と共に働く ENHANCER OF VAH (EVAH) 遺伝子を同定している。VAH 遺伝子と EVAH 遺伝子の両方の機能が損なわれた *vah evah* 二重変異体では、茎頂分裂組織領域の拡大が観察された。VAH と EVAH は、幹細胞らしさの負の制御に関わることが示唆された。

*vah*、*evah* 変異体と、*clv3* 変異体の遺伝学的解析から、VAH と EVAH は、CLV3 の経路とは別の仕組みで茎頂領域の幹細胞に負の影響を与えることを見いだした。本研究から、VAH は、新規な幹細胞ブレーキとして働くことを提唱している。植物茎頂の幹細胞では、CLV3 経路と VAH 経路の 2 種のブレーキにより幹細胞ホメオスタシスが保たれていることが示唆された。

ショ糖が植物の成長を促進することは以前から広く知られている。ショ糖は幹細胞らしさに正の影響があることを見いだしている。ショ糖は *MUS* の発現上昇を誘導する。*clv3* の幹細胞領域肥大の表現型は、ショ糖により昂進する。ショ糖は VAH の発現上昇も誘導する。これらから、ショ糖は、幹細胞らしさに正の影響を与えるが、同時に VAH の発現を促し、VAH 幹細胞ブレーキを誘導して、幹細胞らしさの調節を行なっていると考えられる。

VAH タンパク質の生化学的解析のための実験系を確立した。芽生え等の植物体では、幹細胞を含む分裂組織領域は小さい。同様に、*MUS* や *WOX* の発現ドメイン、VAH の発現ドメインも小さく、VAH タンパク質の生化学的解析には困難が伴うと予想された。そこで、組織培養からのシュート再生の系の検討を行い、シュート再生の系が VAH タンパク質の生化学的解析の系に適していることを見出した。シュート再生の系では、複数の *MUS* 発現ドメインが形成され、複数の分裂組織が形成される。また、シュート再生の系においても、VAH が機能していることも確認した。下記の分子生化学実験には、シュート再生の系を主に用いた。

VAHp::VAH::GFP 形質転換系統などをシュート再生の系に供し、実験材料として、VAH タンパク質の分子生化学的解析を行った。その結果、VAH タンパク質は他のタンパク質と複合体を形成していることが示唆された。VAH タンパク質と相互作用する因子を複数同定した。VAH はタンパク質複合体を形成し、他の因子の機能発現に関与することが示唆された。

*vah* 変異体などをシュート再生の系に供し、*vah* 変異体の表現型を分子生化学的に解析した。Pol II サブユニット RPB1 の C 末端領域のヘプタペプチドリピート配列 (YSPTSPS) 中の 5 番目のセリンがリン酸化されたペプチドに対する特異抗体と、2 番目のセリンがリン酸化されたペプチドに対する特異抗体を用いて共免疫沈降を行った。その結果、*vah* 変異体には、Pol II に異常があることを見出した。また、Pol II と相互作用するタンパク質因子の動態にも、*vah* と野生型で違いがあることを見出した。これらは、VAH が Pol II に影響を及ぼしていることを示している。

##### (2) 葉脈形成におけるオーキシンの局所的生合成の役割について

TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS (TAA1/WEI8 や、TAR1、TAR2) と YUCCA (YUC) は、オーキシン生合成の鍵酵素である。葉脈形成におけるオーキシンの局所的生合成の寄与と役割を解析するために、TAA 遺伝子や YUC 遺伝子の発現パターンを本葉の葉脈の形成過程を追って解析した。その結果、これらオーキシン生合成鍵酵素遺伝子は、維管束幹細胞が生じる領域で、維管束形成に先立って発現していた。オーキシン生合成鍵酵素遺伝子の機能欠損変異体では、オーキシン生合成能の減少と共に、葉脈形成も減少する。このことは、葉脈の形成に正常なオーキシン生合成が必要なことを示している。しかしながら、これら変異体に外部からオーキシンを投与しても葉脈形成は回復しない。一方、これら変異体でオーキシン極性輸送を薬剤で阻害すると葉脈形成は回復した。これらの結果と、主脈形成のモデリングを行った結果、本葉の発生過程における葉脈形成に重要なのは、局所的なオーキシンの蓄積であり、その蓄積はオーキシンの極性輸送と局所的なオーキシン生合成のバランスで成り立っていることが示唆された。オーキシン極性輸送を担う PIN1 の発現はオーキシンによって誘導される。一方、解析したオーキシン鍵酵素遺伝子の発現は、オーキシンによって発現誘導されない。オーキシン鍵酵素遺伝子の発生に伴った発現は、オーキシンのキャナライゼーション仮説では説明できないと考えられる。オーキシン鍵酵素の発現が発生過程でどのように制御されているのかに興味を持たれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 榎木竜二、森仁志
2. 発表標題 幹細胞らしさに関わるタンパク質の分子生化学的同一性の試み
3. 学会等名 第61回 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎木竜二
2. 発表標題 幹細胞らしさを負に制御する遺伝子の解析
3. 学会等名 第60回 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuji Tsugeki
2. 発表標題 Genetic Analysis of Genes Influencing Stem-Cell Homeostasis in Arabidopsis
3. 学会等名 Japan-Taiwan Plant Biology 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎木竜二
2. 発表標題 幹細胞らしさの喪失に関わる遺伝子の解析
3. 学会等名 第59回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 槻木竜二
2. 発表標題 幹細胞らしさを負に制御するVAH遺伝子の解析
3. 学会等名 第58回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 槻木竜二、寺田志穂
2. 発表標題 幹細胞らしさの喪失を促す遺伝子の解析
3. 学会等名 日本植物学会第80回沖縄大会（招待講演）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学理学研究科植物学教室・年報（2019年度） <a href="http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/annual/5_iden.html">http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/annual/5_iden.html</a> 京都大学理学研究科植物学教室・年報（2018年度） <a href="http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/annual/5_iden.html">http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/annual/5_iden.html</a> 京都大学理学研究科植物学教室・年報（2017年度） <a href="http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/annual/5_iden.html">http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/annual/5_iden.html</a> 京都大学理学研究科植物学教室・年報（2016年度） <a href="http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/annual/5_iden.html">http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/annual/5_iden.html</a>
--

6. 研究組織		
氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考