

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2005-2008

課題番号：17207005

研究課題名 (和文) 葉器官形成における細胞増殖統合システムの解明

研究課題名 (英文) Elucidation of a developmental system that integrates cell proliferation pathways in developing leaves

研究代表者

堀口 吾朗 (HORIGUCHI GOROU)

立教大学・理学部・生命理学科・准教授

研究者番号：70342847

研究成果の概要：植物の葉のサイズ決定機構を明らかにするため、ある種の突然変異により、葉の細胞数が減少することによって、過剰な細胞伸長が誘導される「補償作用」と呼ばれる現象に着目した解析を行った。その結果、少なくとも3種の異なる補償作用を見いだした。これらは、補償作用を引き起こす遺伝子の種類や、誘導のタイミング、細胞伸長のカイネティクスなどの面から特徴ある性質を示す。一方、補償作用とは逆に、葉の細胞数が増え、細胞サイズが減少する変異株では、異形葉性と呼ばれる葉の形質の変化が早まることを見だし、これに関与する遺伝子も複数同定した。これらの結果は、細胞増殖と分化に伴う細胞伸長とを統合する複数の制御系が並列に働くことで、最終的な葉サイズが決定されることを示している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2006年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2007年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2008年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
年度			
総計	39,000,000	11,700,000	50,700,000

研究分野：植物発生遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ、細胞増殖、補償作用、異形葉性、OLIGOCELLULA、FUGU、リボソーム、SPL15

1. 研究開始当初の背景

葉、茎、根は植物の主要器官である。茎と根の先端部には頂端分裂組織があり、そこでは無限増殖能を有する幹細胞が保持されている。茎頂分裂組織の形成と維持に関しては、遺伝学的、分子生物学的な解析が進められており、*CLAVATA-WUSCHEL* 経路、*SHORT*

ROOT-SCARECROW 経路などの主要経路がすでに見いだされていた。これに比べ、葉における細胞増殖の制御については、ほとんど解析がなされていなかった。

モデル植物であるシロイヌナズナを始めとして、双子葉植物の葉の発生は、組織学的に詳細な解析がなされてきた。それによれば、

葉の発生は、茎頂分裂組織周辺に葉原基の始原細胞が決定され、葉原基としての隆起が生じることで始まる。それらの細胞集団ではある期間、細胞増殖能が維持され、葉身部に特徴的な平面的な構造が作り出される。その後、葉原基の先端に位置する細胞から増殖活性が失われ、細胞は分化に伴う液胞化により急速にそのサイズを肥大させる。

当時、このような有限増殖を正に制御する因子として、AINTEGUMENTA (ANT) や STRUWWELPETER (SWP) といった転写関連因子や、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) およびサイクリン等の細胞周期関連因子が知られていたが、葉の形成プログラムを包括的に理解するためには、依然として断片的な理解に留まっていた。

本研究で詳細に解析した補償作用は、1960年代にオオムギを用いた最初の報告があり、近年になってシロイヌナズナを用いた発生遺伝学的解析と共に、上述の ANT, SWP の機能欠損株あるいは、CDK のドミナントネガティブ株の解析を始めとした数々の報告例が続いた。しかしながら、これらも現象の報告に留まり、補償作用の形態形成上の意味やそれが引き起こされるメカニズムについて、不明な状態が続いた。

我々の研究室でも、*angustifolia3* (*an3*) 変異が、補償作用を示すこと、AN3 は転写コアロペクターをコードするという予備的なデータを得ており、これが補償作用の解析を進めるきっかけの一つとなった。

2. 研究の目的

本研究では、葉特有の発生様式である有限増殖性の制御機構を明らかにすること、それら細胞レベルでの制御機構が、いかにして、葉のサイズという器官レベルで働く制御機構へと統合されていくのかを、補償作用の解析を通じて明らかにすることを大きな目的とした。

3. 研究の方法

葉の細胞増殖活性が減少あるいは増加した突然変異株を単離するため、変異源処理を施したシロイヌナズナ M2 種子播種し、目視により、葉のサイズに異常 (小型化・大型化) した突然変異株を単離した。安定な系統を確立した後、それぞれの変異株について、完全展開した葉における柵状組織の細胞数および細胞サイズを測定し、表現型ごとに分類した。とりわけ、以下の表現型を示す変異株群に注目した。1) 細胞数のみが減少し、細胞サイズは正常な系統 (*oligocellula* [*oli*] と命名)、2) 細胞数が増加し、細胞サイズは正常 (*grandifolia-D* [*gra-D*])、3) 補償作用を示す (*fugu*)、4) 細胞数が増加し細胞サイズが減少 (*more and smaller cells* [*msc*])。

上記の系統について突然変異の生じた遺伝子を特定するため、遺伝学的なマッピングを行い、候補領域を数 100 kbp 程度に縮めた。さらに、候補領域内の遺伝子の塩基配列の決定、T-DNA 挿入変異株の表現型解析とアレルリズムテストを行い、最終的に原因遺伝子を特定した。

これらの遺伝子の機能を解析するため、単離された遺伝子や突然変異株の種類に応じ、以下のような実験を行った。変異株どうしの遺伝学的関係を明らかにするため、2 重変異株を作製し、それらの細胞数・細胞サイズの表現型解析を行った。クローニングされた遺伝子とそれらに関連が深い遺伝子も含め、発現レベルの解析を RT-PCR 法およびノーザン法を用いて行った。それらの遺伝子の機能を明らかにするため、RNA silencing 法による発現抑制、構成的過剰発現、改変型遺伝子の過剰発現、ゲノムコピー数の増加による発現増強を施した形質転換体を作製し (あるいは、他の研究室から分与を受け)、その葉に含まれる細胞の数とサイズを測定した。一部の突然変異株については、細胞周期の M 期をスキップし、核内倍数性を高める変則的な細胞周期である *endoreduplication* の進行を解析するために、フローサイトメーターによる核内 DNA 含量の測定を行った。

4. 研究成果

本研究では、細胞数に異常を示す様々な突然変異株から効率的に遺伝子クローニングを進めた。表現型の違いに応じ、特徴ある成果を得たので、まずそれぞれの変異株についての成果をまとめたのち、器官サイズ制御全体について総括する。

(1) *oli* 変異株の解析 (Fujikura et al., 2009)

これらの変異株は、葉の細胞数が特異的に減少するものの、細胞サイズは正常である。つまり、補償作用は示さない。7 系統得られた *oli* 変異株のうち、*oli2*, *oli5*, *oli7* の原因遺伝子は、リボソームに関連するものであった。すなわち、*OLI2* は出芽酵母のリボソーム生合成に関わる NOP2 のホモログをコードし、*OLI5*, *OLI7* はリボソームの 60S サブユニットタンパクである、RPL5 のパラログである RPL5A, RPL5B をコードしていた。

これらの変異株では、既知の補償作用を示す変異株に比べ細胞数の減少率が穏やかであった。典型的な補償作用を示す *an3* では、細胞の減少率は 70%にも達するが、これら *oli* 変異株では、わずか 30%程度であった。そこで、補償作用の誘導には大幅な細胞数の減少が必要であるという仮説を立て、検証を行った。*oli* 変異株どうしを交配し、2 重変異株を作製した所、細胞数の更なる減少とともに

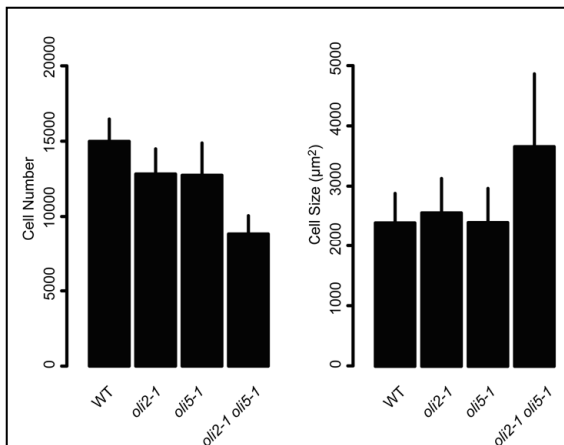


図1 野生株、*oli2*、*oli5*、*oli2 oli5*の柵状組織葉肉細胞の数とサイズ

に、補償作用が誘導された(図1)。また、AN3の発現を若干弱めたRNA silencing系統を解析したところ、軽微な細胞数の減少を示した系統では、補償作用が誘導されなかった。

*oli*変異株と*an3*によって誘導される補償作用は、細胞数の閾値依存性を示すという共通点が見いだされたため、これらの変異株の間で2重変異株を作製し、その表現型を解析した。その結果、これらの2重変異株では、細胞数が顕著に減少し、補償作用が強められる相乗的な効果が認められた。このことは、AN3とリボソームとが協調的に細胞増殖を正に制御し、それによって補償作用が抑制されていることを示唆している。

従来、補償作用は増殖中の細胞の分裂と細胞の成長の脱共役によって起きる、受動的な減少との捉え方もあった。本研究では、細胞の減少率には、補償作用の誘導に必要な閾値が存在することを示した。このことは、脱共役説を明確に否定するものであり、器官サイズ制御における、細胞増殖と細胞伸長の制御機構の複雑な側面が示された。

(2) *gra-D* 変異株の解析

gra-D 変異株は、葉の細胞数が増加し、細胞サイズは正常な優性変異株として単離された。独立に得られた3系統全てで、4番染色体の下部が重複していることが、遺伝学的あるいは、ゲノムタイリングアレイを用いた解析から明らかになった(図2)。この重複領域には、細胞増殖の正の制御因子であるANT

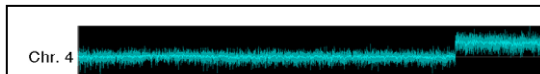


図2. ゲノムタイリングアレイを用いた*gra2-D*変異における染色体重複領域の検出野生株および*gra2-D*のシグナル比を4番染色体について示した。右側にシグナル比が高い領域が存在し、この部分が重複を起こした領域であると考えられる。

やサイクリン的一种であるCYCD3;1をコードする遺伝子が含まれていた。野生株において、これらの遺伝子の発現を同時に増強させることにより、*gra-D*表現型が再現された。しかし、これらの系統における細胞数は、*gra-D*変異株並には増加しなかったことから、染色体の重複領域に未知の細胞増殖の正の因子が含まれると考えられる。

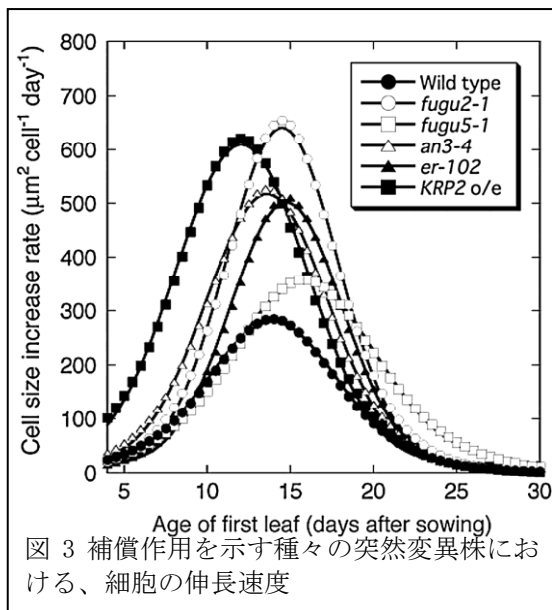
*gra-D*変異と補償作用の関係を解析するため、補償作用を示す*an3*および*erecta(er)*との2重変異株を作製した。*an3 gra-D*、*er gra-D*ともに、細胞数は、両親の中間的なレベルになったが、補償作用による異常な細胞肥大が、*an3 gra-D*では全く抑制されなかった。一方、*er gra-D*においては、補償作用が完全に抑制された。

以上の結果は、補償作用がやはり脱共役説では説明できないことに加え、補償作用の引き金となる細胞増殖の欠損が複数種存在することを、遺伝学的に示したものである。今後、これらの変異株をさらに詳しく調べることで、補償作用の実体が明確になると期待される。一方、*gra-D*変異株は染色体重複と表現型との因果関係が明確に示された希有な例であり、このような染色体のダイナミクスが進化の過程で、器官サイズに影響を与えることを示す具体例となった。

(3) *fugu2*、*fugu5* および *KRP2* 過剰発現体の解析 (Ferjani et al., 2007)

補償作用を示す突然変異株として*fugul*~*fugu5*を単離した。また、補償作用を示すことが知られている*KRP2*の過剰発現体(*KRP2* OE)も独自に作製した。これらの系統を用い、細胞数と細胞サイズの変化を葉の発生ステージに沿って解析した。その結果、*KRP2* OEは、異常な細胞肥大が増殖能を保持している細胞で既に観察されるのに対し、*fugu2*、*fugu5*、*an3*、*er*といった系統では、異常な細胞肥大は、細胞が増殖能を失って初めて観察されることが明らかになった。また、*fugu5*においては、細胞肥大の速度は野生株と同等であるが、細胞伸長を行う器官が延長されていることが明らかになった(図3)。これ以外の変異株では、細胞伸長速度が野生株に比べ高まっていた。これらの結果は、補償作用の誘導のタイミングや誘導後の作用機構においても複数の経路が存在することを示唆している。

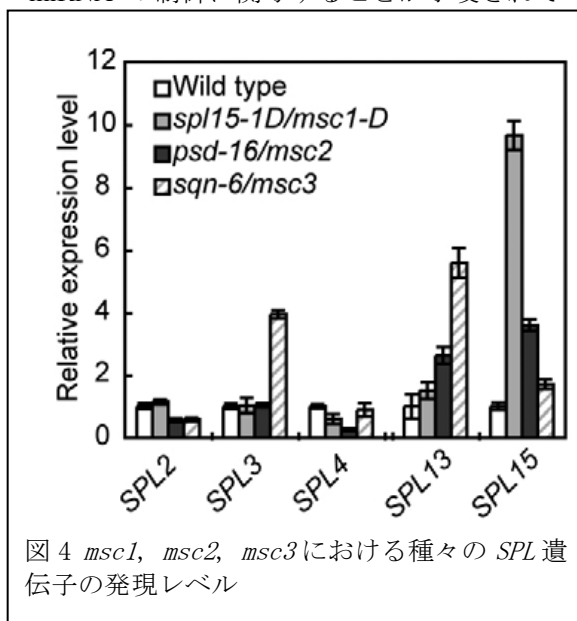
*fugu*変異株で観察される、種々の補償作用の背景にある分子機構を明らかにするため*FUGU2*および*FUGU5*のクローニングを行った。その結果、*FUGU2*はクロマチンアセンブリファクターのサブユニットの一つFAS1であることが明らかになった。このことは、DNA複製に伴うクロマチンの複製異常に由来する、細胞増殖能の低下も補償作用を引き起こす一因であることを示している。



一方、*FUGUS* は *AVPI* として知られる、液胞膜 H^+ -pyrophosphatase をコードしていることが明らかになった。液胞膜は膨圧を発生するうえで必要不可欠なことで、また pyrophosphatase の正常な代謝は細胞増殖を始めとした、細胞内機能に必須であることを踏まえると、*FUGUS* は細胞増殖と細胞伸長の調和に中心的な役割を果す因子である可能性が期待される。

(4) 異形葉性に伴う、細胞数と細胞サイズの調和 (Usami et al., 2009)

補償作用とは対照的に、葉の細胞数が増加し、細胞サイズが低下した変異株、*msc1*~*3* を単離した。このうち、*msc2*, *msc3* は表現型の類似性から、*paused* (*psd*), *squint* (*sqn*) のアレルであることが明らかになった。*psd*, *sqn* はそれぞれ、tRNA の核外輸送に関わる karyopherin, miRNA の制御に関与することが示唆されて



いる cyclophilin40 の機能欠損株である。残る *msc1* には、転写因子をコードする *SPL15* 遺伝子に miR156 耐性を付与する同義塩基置換が見いだされた。*psd*, *sqn* および、その他の *SPL* ファミリーの変異株は、異形葉性の進行が促進することが知られていた。また、*msc1*, *msc2*, *msc3* ではそれぞれ特異的な *SPL* 遺伝子が過剰発現していた (図4)。そこで、野生株において、異形葉性の進行に伴う、葉の細胞数とサイズの変化を解析したところ、高位葉ほど葉の細胞数が多く、細胞サイズが低下することが明らかになり、これら2つの形質も異形葉性によって制御されることが明らかになった。異形葉性はまた、転写因子である *ARF3*, *ARF4* によっても制御を受けている。しかし、*arf3*, *arf4*, *arf3 arf4* 変異株では、葉の細胞数とサイズは野生株とほぼ同様に变化した。従って、異形葉性には2つの制御経路があり、*SPL15*, *PSD*, *SQN* の3つの遺伝子が関与する経路は、主に細胞数と細胞サイズの制御を司ることが示された。

本研究は、異形葉性という解析の進んだ発生現象の中にあって見落とされていた形質として、細胞数と細胞サイズを発見した点、またその制御メカニズムを明らかにした点、異形葉性の制御経路を *SPL* 依存、*ARF3/4* 依存経路に明確に分けた点、さらに補償作用との関連性は認められないことを示した点で葉のサイズ制御機構の解明に大きく貢献するものである。

(5) 葉の細胞数と細胞サイズを制御する遺伝経路について

以上の結果から、葉の細胞数を正に制御する多数の因子の同定に成功した。本研究の実施期間中にも、細胞増殖を制御する因子が他のグループからも報告されている。それらの結果もあわせると、このような増殖経路の多くは遺伝学的には独立に働く場合が多い。我々は、それに加え、補償作用と異形葉性の解析から、細胞増殖制御系の多くは、細胞伸長制御系と連動していることを示した。しかし、それぞれの経路の異常によって引き起こされる補償作用はその作用機序が異なり、異形葉性と補償作用も独立な現象であった。従って、細胞の数とサイズという単純な形質であっても、非常に繊細な、多重の制御を受けていることが明らかとなった。少なくとも葉の形態形成が開始された後には、葉の器官サイズ制御系が増殖から分化を終えるまで一貫して並列に機能しているといえよう。今後は、このような制御系の個別解析に加え、これらの制御系が、その上流では、どのように葉を形成するプログラムとして統御されているのかを理解することが重要な課題である。

このような遺伝経路の発生制御上の意義はいかなるものであろうか？葉の展開は植

物が光合成を行ううえで決定的に重要なイベントであり、葉サイズの精密な制御は植物の生長に大きく影響する。仮に、葉のサイズ制御系が一極集中型の管理下におかれていたならば、その制御系の破綻は、直ちに、その個体の生存を不可能にするであろう。葉のサイズが、今回示したような複数の経路によって多重に制御されることで、安定した器官形成が可能になっていることが示唆される。

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 7 件)

- ① Fujikura, U, Horiguchi, G, Ponce, M R, Micol, J L, Tsukaya, H, Coordination of cell proliferation and cell expansion mediated by ribosome-related processes in the leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* in press, 査読有
- ② Usami, T, Horiguchi, G, Yano S, Tsukaya, H, (2009) The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty. *Development* 136, 955-964. 査読有
- ③ Ferjani, A, Horiguchi, G, Yano, S, Tsukaya, H. (2007) Analysis of leaf development in *fugu* mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant Physiol.* 144, 988-999. 査読有
- ④ Fujikura, U, Horiguchi, G, Tsukaya, H. (2007) Dissection of enhanced cell expansion processes in leaves triggered by a defect in cell proliferation, with reference to roles of endoreduplication. *Plant Cell Physiol.* 48, 278-286. 査読有
- ⑤ Horiguchi, G, Fujikura, U, Ferjani, A, Ishikawa, N, Tsukaya, H. (2006) Large-scale histological analysis of leaf mutants using two simple leaf observation methods: identification of novel genetic pathways governing the size and shape of leaves. *Plant J.* 48, 638-644. 査読有
- ⑥ Horiguchi, G, Ferjani, A, Fujikura, U, Tsukaya, H. (2006) Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 119, 37-42. 査読有
- ⑦ Horiguchi, G, Kim, GT, Tsukaya, H. (2005)

The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 43, 68-78. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 川出健介 CRE/Lox システムにより誘導したKRP2 モザイク葉における補償作用の解析. 第50回日本植物生理学会年会、2009年3月21日、名古屋大学
- ② 堀口吾朗 翻訳関連因子が葉のサイズと背腹性の制御に果たす役割. 日本植物学会第72回大会、2008年9月25日、高知大学
- ③ 宇佐見健 異形葉性に伴う葉の細胞数と細胞サイズの変化は、miR156とSPL転写因子によって制御される. 日本植物学会第72回大会、2008年9月25日、高知大学
- ④ 藤倉 潮 リボゾーム関連遺伝子が欠損した*oligocellula*変異株の補償作用促進能についての解析. 日本植物学会第72回大会、2008年9月25日、高知大学
- ⑤ Gorou Horiguchi *ANGUSTIFOLIA3* Plays a Role in the Growth and Patterning of Leaf through Nucleolar Functions. 19th International Conference on Arabidopsis Research, Jul. 23-25, 2008, Montreal, Canada
- ⑥ Ali Ferjani Effect of Sucrose on Compensated Cell Enlargement in *fugu5* mutant cotyledons. 19th International Conference on Arabidopsis Research, Jul. 23-25, 2008, Montreal, Canada
- ⑦ Eiko Kawamura Developmental analysis on the Tooth in Arabidopsis. 19th International Conference on Arabidopsis Research, Jul. 23-25, 2008, Montreal, Canada
- ⑧ Gorou Horiguchi Establishment and use of genetic resources for characterization of leaf size/shape regulation with an emphasis of compensation syndrome. *Imaging and Phenotyping in Plants*, Jul. 18, 2007, Montpellier, France
- ⑨ Ali Ferjani 補償作用で見られる細胞の大型化は複数の経路により制御される 日本植物学会第70回大会、2008年9月14日、熊本大学

⑩ 堀口吾朗 細胞増殖を促進する突然変異が *an3* における補償作用に与える影響の解析、第 48 回日本植物生理学会年会、2007 年 3 月 28 日、愛媛大学

⑪ 堀口吾朗 葉原基形成時の細胞数のモニター機構とそれが葉細胞および葉サイズ決定に果たす役割。第 47 回日本植物生理学会年会、2006 年 3 月 19 日、筑波大学

〔図書〕(計 1 件)

① Ferjani A, Yano, S, Horiguchi, G, Tsukaya, H, (2008) Control of Leaf Morphogenesis by Long- and Short-Distance Signaling: Differentiation of Leaves Into Sun or Shade Types and Compensated Cell Enlargement. In Plant Growth Signaling, B. Bögre, G. and G. Beemster Eds., Springer Berlin/Heidelberg, pp. 47-62.

〔その他〕

① 堀口吾朗、日本植物形態学会・奨励賞受賞、2006 年 9 月 13 日

② 堀口吾朗、日本植物学会・奨励賞受賞、2008 年 9 月 26 日

③ 塚谷裕一、雑誌論文②の成果の新聞報道 (2009 年 4 月 16 日、日経産業新聞; 2009 年 4 月 17 日; 科学新聞、2009 年 5 月 1 日、朝日新聞)

6. 研究組織

(1)研究代表者

2005 年度

塚谷裕一 (TSUKAYA HIROKAZU)

東京大学・大学院・理学系研究科・教授／基礎生物学研究所・客員教授

研究者番号：90260512

2006 年度～2008 年度

堀口吾朗 (HORIGUCHI GOROU)

立教大学・理学部・生命理学科・准教授

研究者番号：70342847

(2)研究分担者

2005 年度

堀口吾朗 (HORIGUCHI GOROU)

立教大学・理学部・生命理学科・准教授

研究者番号：70342847

2006 年度～2007 年度

山口貴大 (YAMAGUCHI TAKAHIRO)

基礎生物学研究所・助教

研究者番号：60450201

(3)連携研究者

2008 年度

山口貴大 (YAMAGUCHI TAKAHIRO)

基礎生物学研究所・助教

研究者番号：60450201