

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05943

研究課題名(和文) 幹細胞新生に関わる分子基盤の解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular basis for stem cell differentiation

研究代表者

下遠野 明恵 (Shimotohno, Akie)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任講師

研究者番号：70647544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は根の幹細胞形成に関わる鍵転写因子複合体のコアタンパク質を特定しており、本研究ではこの制御機構を司る新たな構成因子の同定とその作用機序の解明を行うことを目的とした。コロナ禍で予定外の長期間にわたって研究活動に対する制限があったものの、MS解析に必要な試料の準備と植物細胞からのタンパク質複合体精製の予備実験・本実験を終え、転写因子間の相互作用を生体内でとらえるツールの開発にも成功したことから、我々の概ねの目的を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物の幹細胞化に必要な不可欠な転写因子群が、生体内でどのような制御を受けているのかを示すことに成功した。今後は、これらの制御因子機能の発揮に至る分子機序を詳らかにすることによって、植物がもつ永続的な幹細胞能力の謎の解明につなげることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify a new component of regulatory factors regulating stem cell differentiation. Unexpectedly, due to the COVID-19 outbreak, our activities were unexpectedly limited. We nonetheless managed to complete the MS analysis and identify several novel regulatory factors that interact with key transcription factor components. In addition, we successfully established a tool for live cell imaging of protein dynamics in plants, thus mainly fulfilling our objectives.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：幹細胞 発生・分化 植物ホルモン 低分子タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

根は植物が水を体内に取り込むことのできる唯一の器官であり、その発達は植物の成長を大きく左右する。シロイヌナズナでは、根の先端領域にある幹細胞で構築される特殊化した微小環境（幹細胞ニッチ）を起点として根が形成される。このような分化過程は周囲の様々な要因によって制御を受けていると考えられる。これまでに申請者らによって、この幹細胞ニッチの構成に重要と考えられる転写因子複合体が単離・同定されており、この複合体の制御系を理解することは、根の発生・分化の仕組みを理解する上で重要な学術的知見をもたらすと考えられる。

シロイヌナズナでは、PLTなどの植物特異的な転写因子を異所的に発現させることで、器官を誘導・再構築できることが示されている。従って、これら植物特異的な転写因子の機能は幹細胞ニッチの形成においてとても重要な働きを持つ。申請者が手がけた研究から、PLTやSCRはさらに別の植物特異的な転写因子との結合を介して複合体を形成し、根幹細胞マーカーとして知られるホメオボックス遺伝子（WOX5）の発現を正に制御することが示されている。このような時空間的かつ高次的な制御の仕組みを明らかにすることが重要な課題の一つと考えられるが、研究開始当初では『分子生物学的に転写因子が複合体を形成し、遺伝学的にこれらの機能が根の形成に必須であることが証明された』ということまでしか明らかにされていなかった。

### 2. 研究の目的

植物には多能性幹細胞で構成される微小環境が存在し、それらが永続的な分裂能力と特定の細胞への分化能力を保持することにより、秩序だった発生・分化のプロセスと持続的な成長が保証される。動物にも多能性幹細胞は存在するが、動物の場合には実験環境下でなければ多細胞幹細胞機能が維持できない。一方植物では、根や茎の先端領域に存在するメリステムと呼ばれる特殊化した微小環境の中で、幹細胞が一生涯を通じて維持される。このことから、植物と動物の間には幹細胞とそれを取り巻く環境に明確な違いがあると考えられるが、その分子的背景は殆ど明らかにされていない。そこで、本研究では植物の幹細胞の新生と維持に中心的な役割を果たすタンパク質複合体を手掛かりとして、これらと相互作用する新たな制御因子の同定と生体内での分子間挙動を観察するための新たなツールの開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

植物発生における幹細胞の維持・形成機構に関わる新たな制御因子の同定を行うにあたり、主に下記の3点を基軸とした研究を遂行した。実験植物としては、モデル植物であるシロイヌナズナとタバコを用いた。

◆複合体解析に先立って、いくつかの予備試験を行なった。まず、複合体解析を行うためには、生体内でのタンパク質の高次構造と機能を阻害しないタグを選ぶことが必要不可欠である。そこで、シロイヌナズナの幹細胞の維持において鍵を握ると考えられている転写因子を選び、これらに複数のタグをつけて機能の保持が見られるかを検証した。検証の方法としては、植物細胞をプロトプラスト化した一過的な発現系の他に、組換えタンパク質などを用いたin vitroの系での検証も併せて行なった。最終的には当該転写因子の機能欠損変異体にこれらのコンストラクトを導入する形で相補性試験を実施し、生体内でもその構造と機能が保持されているかどうかについて検証した。

◆複合体解析を行うにあたって、サンプル調製方法の条件検討（抽出液の組成や破碎条件など）を実施した。精製条件の検討には、コントロールとして申請者が同定した植物特異的な転写因子が共沈する条件であることをベースに、MS解析が可能なレベルのサンプル量を十分確保できるように、いくつかの手法で検証した。解析に供する組織は（根の幹細胞形成に必要な制御因子を単離・同定するために）根の先端部分を用いた。

◆複合体解析によって同定した制御因子群との相互作用を生体内で可視化できるように、新たにFLIM-FRETの系の構築を試みた。植物細胞内での相互作用を観察するためには、タンパク質の

高次構造とその機能を阻害しないタグを導入する必要があることその他、観察対象とする組織や細胞内において標的となるタンパク質が十分量発現していることが必要不可欠である。最終的な解析候補因子は、酵母のツーハイブリッドの系でタンパク質間相互作用の再現性を確認後、プロトプラスト細胞内での一過的発現系においてもタンパク質相互作用が見られるかどうかを確認したものに絞り込み、それらを生体内でのFLIM-FRET解析に用いることとした。

#### 4. 研究成果

申請者はこれまでに、SCRやTCPなどで構築される、根の幹細胞形成に関わる鍵転写因子複合体を特定している。本研究ではこの鍵因子と相互作用する新たな構成因子の同定とその分子間相互作用を解析できるツールの開発を行った。

◆植物生体内での転写因子制御因子の単離・精製と相互作用を観察するための予備実験と系の確立を行なった。幹細胞の確立と機能維持に関わる未知の制御因子（群）の同定を行うために、相互作用を阻害しないようにデザインした異なるタグのバリエーションを選抜した。具体的には、精製が容易なHis-tag, Myc-tagとin vivoでの観察が併用できるGFPの三種類のタグを準備して、タグの長さや位置などを変えてSCRやTCPと連結した。これらの配列をシロイヌナズナの培養細胞系で発現させるために35Sプロモーターの制御下でin frameで連結し、一過的に発現させ、タグを使った免疫沈降が可能かどうか検証した。その結果、Hisでは細胞内での発現はみられるものの、免疫沈降では十分なサンプル量が得られなかった。一方で、MycやGFPのタグでは、発現量・免疫沈降ともに問題なく、バックグラウンドも最小限に抑えられることが明らかとなった。

◆これらのタグがタンパク質相互作用を阻害しないかを検証するために、SCRやTCPなどにMycやGFPのタグを連結させたものをシロイヌナズナの培養細胞内で一過的に発現させ、得られた細胞を回収し、GFP抗体を用いた共沈実験を行なった。その結果、いずれの組み合わせでも生体内での結合がみられたため、複合体解析には、可視化のできるGFPのタグを使うこととした。さらに、自己プロモーターの下流にGFP融合タンパク質を連結させたコンストラクトを機能欠損株に導入し、形質転換体の作出をおこなった。得られた植物体で機能相補がみられたかについても顕微鏡による観察等で検証を行なった結果、作製した複数のラインにおいて機能回復が認められたことから、それらの形質転換植物体を用いて、続くMS解析の準備にとりかかった。

◆LS-MS/MS解析に供するためのサンプル調製方法の検討を行なった。具体的には抽出液に含まれる塩濃度・界面活性剤の種類・界面活性剤の濃度・免疫沈降に要する時間などである。最終的なサンプルは根の先端部分にある微小な領域であり、これを条件検討用に使うには不向きと考え、条件検討には根の組織全体を用いた。免疫沈降後に銀染色でバンドのパターンを比較検証し、十分なサンプル量と低いバックグラウンドが得られる条件を選択した。本試験では、シロイヌナズナの幼苗体の根の先端部のみを回収し、GFP抗体で免疫沈降した画分を溶出後、MS解析を行なった。得られた結果を検証したところ、申請者がすでに報告している転写因子群のほかに、複数の植物ホルモン制御因子（未発表）や低分子タンパク質（未発表）などが含まれることが明らかとなった。これらの因子との直接的な相互作用は酵母のツーハイブリッドの系で再現性を確認した。つまりこのことは、幹細胞の形成において他のホルモン制御因子や低分子タンパク質が新たに関わっている可能性を示しており、今後、これらの因子を解析対象として研究を進めていく予定である。

◆MS解析で見出した新たな制御因子との相互作用を生体内でイメージングするために、FLIM-FRETのシステムの構築を試みた。タンパク質相互作用がみられた植物ホルモン制御因子と低分子タンパク質のコード領域にCFPあるいはYFPの蛍光標識を連結させ、幹細胞新生の過程で特異的にタンパク質結合が観察できるようにQCで発現するプロモーターの下流に連結した植物体を作製した。今後はこれらの植物体の組み合わせをつかって、幹細胞新生過程における制御因子間の分子挙動とタンパク質相互作用をライブイメージングによって詳細に解析していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akie Shimotohno	4. 巻 39
2. 論文標題 Illuminating the molecular mechanisms underlying shoot apical meristem homeostasis in plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 19-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.22.0213a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akie Shimotohno, Shiori S Aki, Naoki Takahashi, Masaaki Umeda	4. 巻 72
2. 論文標題 Regulation of the Plant Cell Cycle in Response to Hormones and the Environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annu Rev Plant Biol.	6. 最初と最後の頁 273-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1146/annurev-arplant-080720-103739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ma Dichao, Endo Satoshi, Betsuyaku Shigeyuki, Shimotohno Akie, Fukuda Hiroo	4. 巻 106
2. 論文標題 Correction to: CLE2 regulates light-dependent carbohydrate metabolism in Arabidopsis shoots	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 221-221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-021-01144-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ma Dichao, Endo Satoshi, Betsuyaku Shigeyuki, Shimotohno Akie, Fukuda Hiroo	4. 巻 106
2. 論文標題 Correction to: CLE2 regulates light-dependent carbohydrate metabolism in Arabidopsis shoots	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 221 ~ 221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-021-01144-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimotohno Akie, Aki Shiori S., Takahashi Naoki, Umeda Masaaki	4. 巻 72
2. 論文標題 Regulation of the Plant Cell Cycle in Response to Hormones and the Environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annual Review of Plant Biology	6. 最初と最後の頁 72~78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-arplant-080720-103739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ma Dichao, Endo Satoshi, Betsuyaku Shigeyuki, Shimotohno Akie, Fukuda Hiroo	4. 巻 104
2. 論文標題 CLE2 regulates light-dependent carbohydrate metabolism in Arabidopsis shoots	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 561~574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-020-01059-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akie Shimotohno and Ben Scheres	4. 巻 51
2. 論文標題 Topology of Regulatory Networks That Guide Plant Meristem Activity: Similarities and Differences	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Opin Plant Biol	6. 最初と最後の頁 74-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbi.2019.04.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Akie Shimotohno
2. 発表標題 Deceleration of cell cycle underpins a switch from proliferative- to terminal division in plant stomatal lineage
3. 学会等名 日本植物生理学会 (JSP) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下遠野明恵・福田裕穂
2. 発表標題 環境ストレスに呼応した CLEペプチドの新たな役割
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下遠野明恵・福田裕穂
2. 発表標題 環境ストレスに呼応した CLEペプチドの新たな役割
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimotohno A et al.,
2. 発表標題 A novel strategy for sensing and survival against environmental stresses in plants
3. 学会等名 Frontiers in plant environmental response research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimotohno A et al.,
2. 発表標題 Roles of CLE peptide signaling in response to environmental stimuli
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the JSPP, (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 福田裕穂, 下遠野明恵, 遠藤暁詩	4. 発行年 2020年
2. 出版社 生物の科学 遺伝	5. 総ページ数 6
3. 書名 植物の生きる知恵 5 植物の情報を伝える経路-環境メディエータとシグナル伝達の秘密に迫る	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------