

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770033

研究課題名 (和文) 分裂組織の機能を維持するシグナル因子と細胞周期制御の解析

研究課題名 (英文) Mechanisms underlying meristem maintenance and cell cycle regulation

研究代表者

奥島 葉子 (OKUSHIMA YOKO)

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：00432592

研究成果の概要 (和文)：本研究では、分裂組織においてその維持や細胞周期制御に関わる因子の解析を行った。シロイヌナズナに 7 種類存在する CDK インヒビターについて、発現様式や機能欠損変異体の解析を行った結果、分裂組織における細胞周期の制御に関わる可能性のあるメンバーを同定した。また、サイトカイニンの下流で根端分裂組織における細胞分裂の制御に関わる因子が欠損した変異体の候補を単離した。

研究成果の概要 (英文)：In this study, functional and expression analyses of cell cycle regulators were performed to elucidate the mechanisms underlying meristem maintenance and cell cycle regulation. Among seven CDK inhibitors in *Arabidopsis*, members that potentially regulate cell division in shoot and root apical meristems were identified. In addition, candidates for mutants lacking factors that mediate cell division downstream of cytokinin were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

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：細胞分裂、細胞周期、植物

## 1. 研究開始当初の背景

胚発生初期に発生運命が決定される動物とは異なり、高等植物では器官のほとんどが胚発生期に確立された分裂組織と呼ばれる特殊な組織から発芽後に形成される。分裂組織に含まれる幹細胞は、持続する分裂能力と様々な細胞への分化能力の両方を備えてお

り、植物の持続的な成長と器官形成は幹細胞が維持され続けることにより初めて可能となる。

植物での幹細胞の維持に関わる中心的な因子は、主にシロイヌナズナを用いた遺伝学的研究により同定されてきた。地上部の器官形成を行う茎頂分裂組織では、ホメオボックス

ス型転写因子をコードする *WUS* 遺伝子の機能が幹細胞の維持に必要である。*WUS* は形成中心とよばれる幹細胞に隣接した領域で発現し、幹細胞特異的な遺伝子である *CLAVATA3* (*CLV3*) の発現を正に制御する。一方、幹細胞で発現する *CLV3* は分泌性のペプチドとして機能し、その受容体である *CLV1*, *CLV2* を介した情報伝達により *WUS* の発現を抑制し、形成中心の細胞数を制限する。この *WUS/CLV* を中心としたネガティブフィードバック機構が茎頂分裂組織の維持の根幹にあると考えられているが、*WUS* が *CLV3* の発現を誘導する際に働くシグナル分子、および *CLV3* が *WUS* の発現を抑制する情報伝達経路の分子機構については不明である。

その一方で、幹細胞の維持には、細胞分裂を制御する細胞周期の厳密な制御が関わることが予想される。細胞周期の進行に中心的な役割を持つのがサイクリン依存性キナーゼ (CDK) である。CDK はサイクリンと複合体を形成することにより活性化され、様々な基質をリン酸化することにより細胞周期の進行を制御する。また、CDK-サイクリン複合体の活性は CDK インヒビター (シロイヌナズナでは KRP) の結合により抑制される。幹細胞では、低い、しかし持続的な細胞分裂が維持されているため、CDK 活性を低く保つ厳密な制御が存在することが考えられる。このことから、幹細胞での細胞分裂の制御を考える上で、KRP による CDK 活性の抑制的な制御が重要であると考えられる。従って、シロイヌナズナに存在する 7 種類の CDK インヒビターの機能と分裂組織の維持との関わりについても解析する必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

前述のような背景から、高等植物の分裂組織の維持を司る因子群の下流には、細胞周期因子の制御を通して幹細胞の分裂活性を厳密に調節する機構があると考えられる。本研究では、幹細胞の維持や形成を直接誘導するシグナル分子を同定し、さらにその分子を介した幹細胞の細胞分裂制御機構や、細胞周期制御因子が分裂組織での細胞分裂を制御する機構について解析を行うことで、分裂組織の維持機構を細胞周期制御の側面から理解することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、分裂組織の維持を可能にする幹細胞の分裂制御機構を明らかにするために、(1) シロイヌナズナ培養細胞系を用いた幹細胞誘導因子の探索、(2) 分裂組織の維持に関わる細胞周期因子の解析、(3) サイトカイニンシグナルによる細胞分裂お

よび分化の制御機構の解析、という 3 つの目標を掲げて研究を進めた。

### (1) シロイヌナズナ培養細胞系を用いた幹細胞化誘導因子の探索

最初に、幹細胞化を促進するような生理活性物質 (幹細胞化誘導因子と呼ぶ) を含むエフェクターとなる画分の調製を行う。*WUS* を誘導的に強制発現させるコンストラクトを作成し、シロイヌナズナの培養細胞 MM2d 株に導入する。誘導的に *WUS* が高発現される形質転換細胞株を確立できた後は、以下のように研究を進める計画であった。*WUS* の発現を誘導させた形質転換細胞より抽出液を得、濃縮し、これをエフェクターとする。幹細胞化誘導因子の生理活性のモニターには、幹細胞化を迅速に感度良く検出できることが知られている *CLV3* の発現をマーカーとして用いる。調製したエフェクター画分を *pCLV3::GUS* を導入した培養細胞に添加した後、*GUS* 活性の変化を経時的にモニターし、最も効率良く *GUS* 活性が誘導される処理時間を決定し、その条件をその後のアッセイで用いる。また、必要に応じて内在性の *CLV3* 遺伝子発現も RT-PCR で調べる。エフェクター画分に *CLV3* の発現を上昇させるような活性が見出せたら、幹細胞化誘導因子の精製を行う。精製に当たっては、幹細胞化誘導因子の化学的性質を検討する。明らかになった性質に応じて、適当な方法により生理活性物質画分の粗精製および濃縮を行った後、必要に応じてゲル濾過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーにより精製を進め、幹細胞化誘導因子の単離を行う。最終的に単離が出来次第、質量分析装置により構造を決定する。

### (2) 分裂組織の維持に関わる細胞周期因子の解析

細胞周期因子のうち、CDK 活性の厳密な制御に重要だと考えられる CDK インヒビター (KRP) に特に注目し、その発現領域や機能についての解析を進めた。シロイヌナズナに存在する 7 種類の KRP について、*pKRP::KRP-GUS* コンストラクトを導入した植物系統を作成して植物体における発現部位を解析すると共に、それぞれの機能欠損変異体を単離して表現型の解析を進めた。さらに、茎頂分裂組織において発現が見られるものについては、*pKRP::KRP-GUS* レポーターを茎頂分裂組織の維持に異常が見られる変異体に導入し、発現様式を観察した。

### (3) サイトカイニンシグナルによる細胞分裂および分化の制御機構の解析

分裂組織の維持にはサイトカイニンが重要な働きを持つことが報告されている。B 型 ARR である ARR1 はサイトカイニンシグナルの

初期応答を制御する転写活性化因子として機能する。レシーバドメインを欠く *ARR1* (*ARR1 Δ DDK*) に GR を付加した融合タンパク質を過剰発現させた *35S::ARR1 Δ DDK-GR* 植物体では、DEX 処理により恒常的なサイトカニン応答が引き起こされることが報告されている。そこで、*ARR1* の下流で根端分裂組織の領域決定に関与する新規因子の探索を行うため、*35S::ARR1 Δ DDK-GR* 形質転換体に対して変異原処理を行い、DEX 処理を行っても根の伸長抑制が起こらないサプレッサー変異体の単離を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) シロイヌナズナ培養細胞系を用いた幹細胞誘導化因子の探索

まず、幹細胞誘導化因子の探索に使う材料として、培養細胞系が使えるかどうかを確認するため、分裂組織の維持に関わる因子が培養細胞でも発現しているかどうかを調べた。RT-PCRを行った結果、*WUS* および *CLV3* ペプチドの受容体である *CLV1*、*CLV2* がシロイヌナズナ培養細胞でも低レベルながら発現していることを確認した。この結果から、シロイヌナズナの培養細胞系が幹細胞誘導化因子の単離を行う実験系として使用できることが示唆された。また、幹細胞化誘導因子の生理活性のレポーターとして用いる *pCLV3::GUS* を導入した培養細胞系も作成し、液体培養系の確立を行った。これらの準備を行った上で、*WUS* の下流で幹細胞化を促進するような生理活性物質（幹細胞化誘導因子）を含むエフェクターの調製法の検討を行った。試みの一つとして、*WUS* をエストロゲンの添加依存的に強制発現させるコンストラクトを作成し、シロイヌナズナ培養細胞株に導入した。しかし、作成した形質転換培養細胞株100系統以上について、エストロゲン処理に応答した *WUS* の発現量の変化をRT-PCRにより調べたが、誘導的に *WUS* を高発現する系統を単離することはできなかった。さらにデキサメタゾン誘導系など別の誘導系ベクターを用いた強制発現もいくつか試みたが、いずれの方法においても誘導的に *WUS* を高発現する細胞株は得ることはできなかった。 *WUS* を高発現する細胞株が確立できなかったことから、培養細胞系を用いて幹細胞化誘導因子を単離する方法は困難であると判断し、この計画は中止した。

##### (2) 茎頂分裂組織の維持制御因子による細胞周期制御の解析

*pKRP::KRP-GUS* レポーターラインを用いた

解析により、シロイヌナズナに7個存在するCDKインヒビターのうち、茎頂および根端の分裂組織で発現し、比較的相同性が高い因子群として、*KRP3*、*KRP4* および *KRP5* を同定した。幹細胞でのCDK活性の制御に重要だと考えられる *KRP* としてこれら3種類の *KRP* に注目し、それらの機能欠損変異体を単離したが、単一変異体に加え、二重変異体においても顕著な表現型は観察されなかった。しかし、*krp3 krp4 krp5* 三重変異体については、わずかに倍数性が上昇している可能性を示唆する結果が得られた。しかし、茎頂および根端の分裂組織の大きさについてはほとんど変化がなかったことから、*KRP3*、*4*、*5* と重複して分裂組織における機能を持つ *KRP* がまだ他に存在することが示唆される。

また、他の *KRP* についても、植物組織においてそれぞれ異なった発現様式を示すことが観察され、それぞれのメンバーが植物体で特異的な組織および時期で発現して細胞分裂を制御している可能性が示唆された。さらに、*pKRP::KRP-GUS* レポーターラインにおいて、*KRP1* - *KRP7* 全ての *GUS* 融合タンパク質の安定性が *MG132* による処理で顕著に上昇することが見出された。このことから、全ての *KRP* がプロテアソーム依存的なタンパク質分解制御を受けることが示唆された。

##### (3) サイトカニンシグナルによる細胞分裂および分化の制御機構の解析

(1) の幹細胞化誘導因子の探索を断念したことから、申請当時の研究計画には記載しなかったサイトカニンシグナルによる細胞分裂および分化の制御機構についての解析を新たに開始した。*35S::ARR1 Δ DDK-GR* 植物体では、根端における分裂領域がDEX処理依存的に縮小し、根の伸長が抑制されることを確認した。このことから、サイトカニンによる根端の分裂領域の制御には *ARR1* の下流に存在する因子が関与することが示唆された。そこで、*ARR1* の下流で根端分裂組織の領域決定に関与する新規因子の探索を行うため、*35S::ARR1 Δ DDK-GR* 形質転換ラインの種子（約8000粒）についてEMS処理を行い、DEX処理を行っても根の伸長抑制が起こらないサプレッサー変異体の単離を試みた。M2世代の植物体を用いて変異体の探索を行った結果、これまでにサプレッサー変異体の候補をいくつか単離した。現在、原因遺伝子の探索を進めている。

## 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)

(1) Uehara T, Okushima Y, Mimura T, Tasaka M, Fukaki H. Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. (2008) 49(7): 1025-38. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

(1) 奥島葉子、天野廣海、安達澄子、梅田正明

シロイヌナズナの気孔形成過程におけるCYCD4の機能解析、第51回植物生理学会年会、2010年3月18-19日、熊本

(2) 奥島葉子、稲本裕幸、清水皓平、梅田正明

シロイヌナズナの根の成長過程における細胞周期制御因子の解析、第27回日本植物細胞分子生物学会大会、2009年7月30日、藤沢

(3) Kim GT, Jun SE, Okushima Y, Cho KH, Park SC, Umeda M, Function of *KRP1* and *KRP3* genes in shoot apical meristem and leaf development, 2009年7月18日-22日、Plant Biology 2009, Honolulu

〔図書〕(計1件)

奥島葉子、梅田正明 共立出版 植物の細胞周期制御 (「植物のシグナル伝達-分子と応答 (編: 柿本辰男、高山誠司、福田裕穂、松岡 信)」中、印刷中)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥島 葉子 (OKUSHIMA YOKO)

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: 00432592