

|                              |   |
|------------------------------|---|
| 研究種目：若手研究(B)                 |   |
| 研究期間：2008～2009               |   |
| 課題番号：20770035                |   |
| 研究課題名（和文）                    | ユニークな特性を持つ uni-1D 変異体を用いた腋生分裂組織形成機構の解析  |
| 研究課題名（英文）                    | Analysis of the regulation of axillary meristem formation using uni-1D mutant |
| 研究代表者                        |   |
| 打田 直行 (UCHIDA NAOYUKI)       |   |
| 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：40467692               |   |

研究成果の概要（和文）：茎頂分裂組織と腋生分裂組織の形成と維持に関わる新たな機構を探索する目的で、両分裂組織に特徴的な異常をもつ uni-1D 変異体を利用した解析を行い、茎頂分裂組織の形成と維持に関わる仕組みにおいて、受容体キナーゼとして働く ERECTA タンパク質が重要な機能を持つことを明らかとした。また、腋生分裂組織の形成と維持に関わる機構では、複数の ERECTA ファミリータンパク質群が重要な役割を果たしていた。

研究成果の概要（英文）：Through the analysis of uni-1D mutants harboring unique phenotypes in formation and maintenance of shoot apical meristems and axillary meristems, ERECTA receptor kinase was shown to play a role in the regulation of shoot apical meristems and ERECTA family members was shown to function in the the regulation of axillary meristems.

#### 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：植物ホルモン・成長生理・全能性

#### 1. 研究開始当初の背景

植物は芽生えた後に伸長しても枝分かれをしなければ主軸が一本あるだけであるが、実際には多くの植物が枝分かれをする。その側枝は、葉が茎に接続する境界部(腋)に発生する腋生分裂組織が伸長したものであるが、この腋生分裂組織が形成される際の分子的

な機序はほとんど解析されていなかった。

一方で、植物の主軸の先端に位置する分裂組織である茎頂分裂組織に関しては、その胚発生時における形成過程とその後の維持について現在に至るまで詳細に解析が進められてきた。茎頂分裂組織はそもそも胚発生時においては一つの植物体ごとにただ一つだけ形成され、その後の植物体の地上部の全て

の器官の元になる組織であり、それを研究対象とすることは多いに意義のあることである。しかし、ここで特筆すべき点は、腋生分裂組織から生まれる側枝の先端には新たな茎頂分裂組織が形作られ、多くの植物種において枝分かれ後の側枝と元々の主軸の機能の違いがほとんどなくなることである。即ち、植物は腋生分裂組織形成を通じて、胚発生とは独立に後胚発生的に茎頂分裂組織を新たに作り出すことができるのである。このように、腋生分裂組織と茎頂分裂組織の形成の仕組みには共通点が多いと考えられるが、どのような制御がどのように共通なのか、など、解明されていない点は多かった。

また、側枝の形成は環境による影響を多大に受けることも知られており、植物の環境応答機構の研究対象としても非常に興味深い。しかし、この環境応答と側枝の形成を結び付けるような制御機構には不明な点が非常に多かった。

研究代表者は過去に、多様な植物種を用いて進化的な観点を踏まえた形で茎頂分裂組織に関する研究に関わってきた。そして、本研究の開始時において、分裂組織の研究に有効に活用できると期待されるユニークなシロイヌナズナの半優性変異体 uni-1D を最近単離した研究室に所属していた。uni-1D 変異体は、CC-NB-LRR (Coiled Coil Nucleotide Binding site Leucine Rich Repeat) 型のドメイン構造を持つUNI タンパク質が恒常的にシグナルを発するようになる機能獲得型変異を持つ。この uni-1D 変異体の形態学的特徴はおおきく二つある。ひとつは、茎頂分裂組織の活性が低下して茎頂分裂組織の維持ができず、花茎がすぐに成長を止めることである。もう1つは、通常は1つの葉に1つだけ形成される腋生分裂組織が過剰に形成されることである。

本研究においては、研究代表者の茎頂分裂組織に関する研究経験と現在の研究環境を踏まえ、腋生分裂組織が形成される際に進行する事象を、その解析に有用な特徴を持つ uni-1D 変異体を用いて、茎頂分裂組織の制御機構の解析と対比させつつ、分子生物学ならびに遺伝学を有効に活用することで明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究では以下のことを目的とした。

(1) uni-1D 変異体で茎頂分裂組織と腋生分裂組織に生じている異常に注目した解析を行うことにより、茎頂分裂組織と腋生分裂組織

で働くどのような仕組みが作動した際に、uni-1D 変異体の持つ異常に帰着するのかに関する知見を得る。

(2) (1)から明らかとなった仕組みが、uni-1D 変異体背景ではなく、野生型の背景でどのような役割を持っているのか、を解析し、茎頂分裂組織と腋生分裂組織で機能している仕組みに関わる新たな知見を得る。

## 3. 研究の方法

(1) uni-1D 変異体は、茎頂分裂組織の活性が著しく低下しているとともに、全ての葉の葉腋に異所的な腋生分裂組織を形成する。今までの報告から、これらの二つの分裂組織の制御機構は非常に似ている点が多い。そこで、まず、uni-1D 変異体の異常を回復するような uni-1D サプレッサー変異体の単離を試み、そして獲得した uni-1D サプレッサー変異体の原因遺伝子の同定をすすめる。さらに、同定された遺伝子がどのように uni-1D 変異体の異常を抑圧したのかに関しての解析を行う。

(2) 茎頂分裂組織の形成や維持に関わることがすでに知られている遺伝子群が、uni-1D 変異体で見られる異常な分裂組織において、どのような影響を受けているのか、を解析する。

(3) (2)で明らかとなってきた制御が、(1)で獲得する uni-1D サプレッサー変異体の原因遺伝子の持つ機能とどのような関わりを持つのか、を解析する。特に、uni-1D 変異体背景ではなく、野生型の背景での、uni-1D サプレッサー変異体の原因遺伝子の機能の解析を行うことで、茎頂分裂組織と腋生分裂組織で機能している仕組みに関わる新たな知見を得る。

## 4. 研究成果

(1) uni-1D 変異体はそもそも Ws 背景で単離された変異体である。この uni-1D 変異 allele を Col 背景並びに Ler 背景に移す為にそれぞれ 6 回の戻し交配を行った。Col 背景に戻し交配を行った場合は、uni-1D 変異体の表現型に変化は生じなかった。しかし、Ler 背景に戻し交配を行った場合、uni-1D 変異体の表現型のうちで、茎頂分裂組織の活性が低下して茎頂分裂組織の維持ができずに花茎がすぐに成長を止める表現型が、ほぼ抑制された。

Ler 背景のシロイヌナズナは、受容体キナーゼである ERECTA (ER) をコードする遺伝子に機能が欠失するような変異が入っていることが知られている。そこで、次に ER の機能欠損が、uni-1D 変異体の茎頂分裂組織の異常の抑圧の原因であったのかを検討するために、元々の WS 背景の uni-1D 変異体と WS 背景の ER 機能欠損変異体 (er) との二重変異体を作成したところ、やはり茎頂分裂組織の異常は抑圧された。したがって、uni-1D 変異体において見られる茎頂分裂組織の維持の異常には、ER の機能が必要であることが明らかとなった。この二重変異体において、uni-1D 変異体の他の形態学特徴である腋生分裂組織の過剰な形成は、ER の機能欠損による影響は見られなかった。

(2) uni-1D 変異体の茎頂分裂組織は活性が低下している。この活性の低下が茎頂分裂組織内で維持されている幹細胞の制御に重要な役割をもつ WUSHEL (WUS) 遺伝子の発現と相関があるのかを検討した。野生型の茎頂分裂組織では、その中心に WUS が発現している。この発現は、uni-1D 変異体の茎頂分裂組織では検出限界以下まで低下していた。(1) で示されたように、ER タンパク質の機能欠損は uni-1D 変異体の茎頂分裂組織の異常を抑圧する。そこで、この異常の解消しているような二重変異体の茎頂分裂組織において WUS の発現を確認したところ、野生型と同程度までその発現は回復していることが判明した。したがって、ER の機能は、uni-1D 変異体の茎頂分裂組織において WUS の発現が低下する現象において重要な役割を担っていると考えられる。

(3) シロイヌナズナのゲノムには ER とアミノ酸配列の相同性が非常に高いタンパク質をコードする遺伝子 ERECTA-LIKE1 (ERL1) と ERL2 が存在する。そこで、これらの ER ファミリー遺伝子群が協調して uni-1D 変異体の表現型に関わっているのかを検討する為に、uni-1D 変異体において ER ファミリー遺伝子群すべての機能が欠損しているような多重変異体を作成した。その多重変異体では、uni-1D 変異体の二つの形態学的特徴、茎頂分裂組織の活性が低下して茎頂分裂組織の維持ができないことと、腋生分裂組織が過剰に形成されること、の双方が完全に抑圧された。したがって、uni-1D 変異体で見られた全ての形態学的異常には、ER ファミリーの機能が必要であることが明らかとなった。

(4) 野生型のシロイヌナズナの分裂組織の制御の仕組みにおいて、ER あるいは ER ファミリーが重要な役割を果たしている報告はない。そこで、まず、ER が分裂組織の制御に関

わっているのかを検討した。野生型と er 変異体の茎頂分裂組織を走査型電子顕微鏡で確認したところ、違いは確認できなかった。そこで、次に ER ファミリーの機能が分裂組織の制御に関わっているのかを検討した。ER ファミリーの機能が欠損した多重変異体の茎頂分裂組織は、野生型の茎頂分裂組織と比べてその領域が拡大していた。WUS の発現パターンを解析したところ、野生型とくらべて、ER ファミリーの多重変異体では、発現の強さ自体には違いが確認できなかったものの、その発現パターンは幅広くなっており、茎頂分裂組織が拡大していた観察と合致する。このように、ER ファミリーが茎頂分裂組織の制御に関わっていることが示唆された。一方で、ER ファミリーの多重変異体において、腋生分裂組織の形成や維持に関しては、異常は観察されなかった。

(5) uni-1D 変異体の分裂組織の異常を解消する抑圧変異体をさらに複数単離し、そのなかで ER ファミリーの機能欠損変異体と遺伝学的に相互作用するものを発見した。この新規抑圧変異体自体は単独の変異体としては分裂組織に大きな変化を見せないものの、ER ファミリーに機能も同時に欠損する多重変異体を作成したところ、茎頂分裂組織と腋生分裂組織の双方に異常が観察された。したがって、ER ファミリーは(4)で観察されたように茎頂分裂組織の制御に関わるだけでなく、他の因子と協調する形で、腋生分裂組織の制御にも関わっていることが示唆された。

## 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 2 件)

- ① Uchida N, Kimura S, Koenig D, Sinha N. Coordination of leaf development via regulation of KNOX1 genes. J. Plant Res., v123, p7-14, 2010, 査読有
- ② Chung KM, Igari K, Uchida N, Tasaka M. New Perspectives on Plant Defense Responses through Modulation of Developmental Pathways. Mol. Cells, v26, p107-112, 2008, 査読無

[学会発表] (計 6 件)

- ① 打田直行, 田坂昌生 “分裂組織外での ERECTA ファミリーの機能が分裂組織に与える影響の解析” 日本植物生理学会年会第

51回大会, 2010. 3. 20, 熊本

② 打田直行, 猪狩和成, 田坂昌生  
“CC-NB-LRRの活性化が茎頂分裂組織に影響を与える機構の解析” 日本植物学会第73回大会, 2009. 9. 18, 山形

③ Uchida N “Analysis of influences of CC-NB-LRR-related signaling on meristem regulation”. Japan-German Symposium on Evolution and Development, 2009. 8. 25, Cologne, German

④ Uchida N, Igari K, Tasaka M.  
“Signaling triggered by activation of CC-NB-LRR-related UNI affects SAM activity in a non-cell-autonomous manner involving ERECTA receptor kinase.” The 20th International Conference on Arabidopsis Research, 2009. 7. 1, Edinburgh, UK

⑤ 打田直行, 猪狩和成、田坂昌生  
“CC-NB-LRR型遺伝子UNIの活性化型変異体 uni-1Dを用いた感染応答と形態形成を結ぶ機構の解析” 第50回日本植物生理学会年会, 2009. 3. 21, 札幌

⑥ Uchida N, Sinha N. “Coordination of leaf development by KNOX1 genes via evolutionarily conserved regulation.” 日本進化学会 第10回大会, 2008. 8. 23, 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

打田 直行 (UCHIDA NAOYUKI)  
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: 40467692

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし