

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20870029

研究課題名（和文） 植物器官と器官境界部形成の細胞レベルでの解析

研究課題名（英文） Cellular analysis of the plant organ and organ boundary formation

研究代表者

武田 征士 (TAKEDA SEIJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任助教

研究者番号：90508053

研究成果の概要（和文）：植物は、隣り合う器官や組織の細胞運命を分けるために、それらの間に境界部を分化させる。境界部の形成機構を細胞レベルで理解するため、蛍光タンパク質を用いた器官境界部細胞の可視化と、境界部形成に関わる CUC1 とその下流遺伝子の機能解析を行った。植物に保存された ALOG 遺伝子ファミリーに属する *LSH4* と *LSH3* は、共に CUC1 の転写ターゲットであり、分裂組織と器官境界部の形成に関与することが示唆された。また、CUC1 の機能解析から、CUC1 が器官の運命決定に関わっている可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Plants differentiate boundary cells between organs to separate their cellular fates. To understand the molecular mechanism of organ boundary formation, I performed (1) visualization of boundary cells by using the fluorescent protein and boundary-specific genes, and (2) functional analysis of a boundary determinant CUC1 and its transcriptional targets. Two members of the ALOG gene family, *LSH4* and *LSH3*, are direct transcriptional targets of CUC1, and both of them may be involved in meristem formation and organ separation. The ectopic expression of CUC1 resulted in the transformation of ovules to stigmatic tissue, suggesting that it controls organ identity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

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：シロイヌナズナ、胚発生、器官形成、器官境界部、CUP-SHAPED COTYLEDON、ALOG 遺伝子ファミリー

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の体が秩序立って作られるた

めには、器官を形成する個々の細胞の分裂や伸長などの制御と、周辺の細胞との協調した成長制御が必要である。植物細胞は体の中を

自由に動く事が出来ないで、位置に依存して細胞を分化させ、器官を作っていくと考えられる。植物の地上部器官は、茎頂にある未分化な細胞群である分裂組織から作られる。分裂組織は、自身で未分化状態を維持しながら成長し、その側方に葉や花などの器官を作っていく。この機能を維持するためには、作られた器官と分裂組織を隔てる「境界部」の形成が不可欠である。また、複数の器官が形成される花では、花器官同士を物理的に隔てる「境界部」を形成する必要がある。

シロイヌナズナの CUP SHAPED COTYLEDON1 (CUC1)、CUC2 および CUC3 は、胚の初期発生段階における茎頂の分裂組織の形成と、その後の発生過程における境界部の形成に関わっており、植物の器官形成に重要な因子であることが知られている。これら CUC 遺伝子は植物特有の NAC 型転写因子をコードしており、機能が欠損すると境界部細胞が成長してしまい、器官が融合する。加えて、芽生えでは分裂組織が欠失する。植物における分裂組織と境界部形成の分子機構を探るため、マイクロアレイを用いた網羅的解析によって、CUC1 の下流で働くと考えられる遺伝子がいくつか同定されていた。その中には、分裂組織の形成や維持に関わる SHOOT MERISTEMLESS (STM) などの既知の遺伝子がある一方で、機能が不明なものも多数含まれていた。また、CUC1 が細胞動態にどのような影響を与え、境界部細胞を分化させていくのかも不明であった。

2. 研究の目的

植物の胚において、分裂組織がどのように形成されるのか、また器官と分裂組織を隔てる境界部がどのように形成されるのかを、細胞レベルで解明する。このために、境界部で機能する主要因子である CUC1 に着目し、その機能解析を行う。また、CUC1 が転写因子であり、いくつかの下流候補遺伝子が同定されていたことから、それら遺伝子の機能解析を行う。さらに、境界部の細胞がいつどのように分化していくのかを探るため、境界部特異的に発現するタンパク質や、細胞骨格などの細胞内分子を、蛍光タンパク質を用いて可視化する。これらの研究を通して、植物の器官形成に欠かせない境界部の形成のメカニズムを、細胞・分子レベルで解明する。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナの胚において、子葉原基間の境界部細胞の動態を観察した。本研究で解析した LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS 4 (LSH4) 遺伝子と、蛍光タンパク質 GFP を用いて境界部細胞の可視化を行い、共焦点レー

ザー顕微鏡によって子葉境界部の細胞を観察した。また、細胞内の細胞骨格(アクチン、チューブリン)を可視化できる形質転換植物を入手・作製した。胚での発現には、シロイヌナズナの RIBOSOMAL PROTEIN S5A (RPS5A) のプロモーターを用いた。

(2) CUC1 転写因子の下流で機能すると考えられる遺伝子のうち、機能未知であった LSH4 及び LSH3 遺伝子の発現・機能解析を行った。発現解析には mRNA *in situ* hybridization と、プロモーター：レポーター形質転換体の作製の2つの方法を用いた。機能解析は、RPS5A プロモーターによる過剰発現株を作製することで行った。また、同じく機能未知であったレクチン様遺伝子とグルタレドキシニン様遺伝子についても、RPS5A プロモーターで過剰発現する植物体を作製した。

(3) CUC1 の機能が細胞動態にどのような影響を及ぼすのかを調べるため、CUC1 を異所的に発現する形質転換体を作製した。このために、分裂組織と器官原基で強く発現する RPS5A、分裂組織で発現する CLAVATA3 (CLV3)、器官原基で発現する ASYMMETRIC LEAVES 1 (AS1)、表皮細胞で発現する *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 (AtML1) の各プロモーターで CUC1 を発現させ、その器官形成における影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 本研究により、胚の子葉境界部で発現することが明らかになった LSH4 と GFP の融合遺伝子を、LSH4 プロモーターで発現する形質転換体 (LSH4g:GFP) を作成し、子葉の境界部細胞を蛍光で判別する系を確立した。LSH4:GFP 融合タンパク質は、ハート型胚において、胚上部の横側領域(Peripheral zone)で発現し、将来分裂組織に発達する中央領域(Central zone)には発現が認められなかった(図1)。細胞内では、融合タンパク質は核に局在した(図1)。

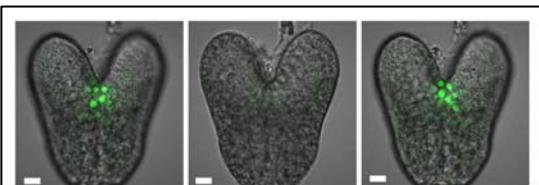


図1 LSH4g:GFPの発現・局在パターン。1つの胚で、3つの連続光学切片によって、異なる面を示している。真ん中の領域(中央領域)では発現が見られず、両側の横側領域で発現している。

胚の境界部細胞の動態をライブイメージングによって観察することを目的に、細胞膜に局在する LTI6b と GFP の融合遺伝子を、胚で強い発現を誘導する RPS5A プロモーターで発現する形質転換体を作製した。胚を観察したが、LTI6b:GFP 融合タンパク質が細胞内で

凝集してしまい、細胞の形をきれいにみることができなかつた。発現量が多過ぎることが原因と考え、RPS5A よりも弱い、胚での発現を誘導する UBI プロモーターで LTI6b:GFP 遺伝子を発現する植物を作製し、ラインの確立を行った。

胚の細胞の動態を分子レベルで観察するため、細胞骨格であるチューブリンと GFP の融合遺伝子を RPS5A プロモーターで発現する植物体を入手し、胚での観察を行った。細胞内でのチューブリンはすべての細胞で観察されたが、境界部とその他の細胞におけるチューブリンの動態に、大きな差は見られなかつた。もうひとつの細胞骨格であるアクチンと YFP の融合遺伝子を、RPS5A プロモーターで発現する形質転換体を作成し、ラインを確立した。

(2) 器官境界部で働く重要な遺伝子として、NAC 型転写因子である CUC1 が知られている。これらの分子機能を類推するため、マイクロアレイを用いた網羅的解析により CUC1 の下流遺伝子が同定された。そのうち、機能未知であった *LSH4* と、そのホモログである *LSH3* について、発現・機能解析を行った。*LSH4*、*LSH3* ともに植物細胞では核に局在した。いずれも、胚、芽生え、花では器官と器官、および器官と分裂組織の境界部細胞で発現していた。胚の子葉境界部での発現は、*cuc1 cuc2* 突然変異体ではほぼなくなっていたことから、*LSH4* と *LSH3* は共に CUC1 の下流であることが示唆された。*LSH4* を RPS5A プロモーターで異所的に発現させたところ、栄養成長期では子葉の形態異常、葉柄が短くシワのよった葉の形成などが見られた。生殖成長期になると、花器官のアイデンティティの異常、がく片の増加、花の中に別の花が形成される、めしべ先端にがく片のような器官が繰り返し作られる、などの形態異常が見られた (図 2)。



図2 *LSH4* の過剰発現体の花。1つの花から、別の花 (左図、矢尻) が形成されたり、花弁とがく片の中間の性質をもつ器官が形成されたりする (左図と中央図、矢印)。別の花では、心皮の数が増えたり (中央図、星印)、フィラメント状の器官を作る異常が見られる (中央図、矢尻)。(右図) めしべ先端が閉じずに、中にながく片のような器官を作っている (星印)。矢尻は胚珠。g, gynoeceium; se, sepal; ca, carpel.

このような花で、分裂組織の数細胞で発現する *WUSCHEL* (*WUS*) の発現を調べたところ、つぼみの中に野生型では見られない細胞塊があり、その中心の数細胞で *WUS* が発現してい

た (図 3)。がく片様の器官を異所的に作ってしまうめしべの先端においても、*WUS* や幹細胞マーカーの *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) が異所的に発現していた (図 3)。これらの発現パターンは、*WUS* 及び *STM* の茎頂や花芽の分裂組織におけるパターンと似ていることから、*LSH4* は分裂組織形成に関わることが示唆された。

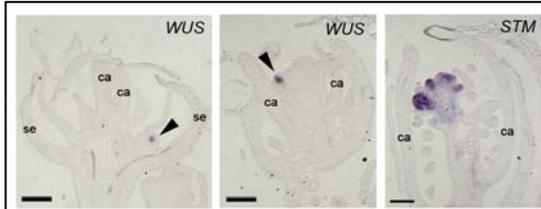


図3 *LSH4* 過剰発現体の花における、*WUS* や *STM* の発現パターン。*WUS* は花の中に異所的に作られた細胞塊 (左図)、めしべの先端の分裂組織様の組織での発現が見られる (中央図)。めしべ先端では、別の分裂組織マーカーである *STM* も発現していた (右図)。ca, carpel; se, sepal.

過剰発現株で見られたがく片の増加は、1枚のがく片に裂け目ができることが原因であり、これは異所的な器官境界部ができたからだと考えられる。すなわち、*LSH4* は分裂組織形成と器官境界部形成という、*CUC1* と同じような機能をもつということが示唆された。*LSH3* を RPS5A プロモーターで発現させると、*LSH4* と同じような形態異常が見られたことから、両者は器官形成においても似た機能を持つことが示された。

LSH4 の機能が失われた T-DNA 挿入変異体の表現型解析を行ったが、野生型との差は見られなかつた。*LSH4* 機能欠損に加え、*LSH3* の機能を人工マイクロ RNA (artificial microRNA) の技術を用いてノックダウンしたが、それでも表現型は見られなかつた。さらに、*LSH4* に EAR motif を融合させた遺伝子を発現し、*LSH4* の機能を優性的に抑制したが、表現型は見られなかつた。このことは、*LSH* ファミリー間の機能重複性と、*CUC1* の下流遺伝子間での機能重複性の2つの可能性があることを示唆している。

LSH4、*LSH3* の他に、*CUC1* の下流で機能する遺伝子で、機能が未知であったレクチン様の遺伝子と、グルタレドキシシン様の遺伝子を RPS5A プロモーターでそれぞれ発現させたところ、いずれの形質転換体でも花序の乱れが見られた。この表現型は、*CUC2* の過剰発現で見られる異常と似ていることから、*CUC1* と *CUC2* が共通の下流遺伝子を制御している可能性が考えられた。

LSH4、*LSH3* と、*CUC1* の下流因子として同定されたタンパク質の相互作用を、酵母の Two Hybrid 法を用いて検証しようとしたが、*LSH4*、*LSH3* ともに酵母内で転写活性化能を示

したため、この系では相互作用検証はできなかった。一方で、両者が核に局在し、同じ ALG ファミリーに属するイネの G1 タンパク質が転写活性可能をもつことから、LSH3 と LSH4 は転写活性因子として機能する可能性が示唆された。

(3) CUC1 の分子機能と発生における機能は明らかにされてきたが、細胞レベルでどのような影響を与えるのかは不明であった。これを調べるため、茎頂のいろいろな領域で CUC1 を発現させる形質転換体を作製し、解析した。分裂組織と器官原基で強い発現を誘導する *RPS5A* プロモーターで *CUC1* を発現させると、茎頂に未分化な細胞の蓄積が見られ、葉の形成が抑制された。これは、CUC1 が器官の分化を抑制することで、細胞を未分化状態に保ち、これによって分裂組織や境界部の形成を制御していることを示唆している。次に、茎頂分裂組織の幹細胞のみで発現する *CLV3*、器官原基でのみ発現する *ASI*、および植物体の表皮で特異的に発現する *AtML1* 各遺伝子のプロモーターで *CUC1* を発現する植物体を作製した。このうち *AtML1p:CUC1* 植物体では、めしべが短く、心皮にシワがよるという異常が見られた。そのようなめしべの中では、胚珠がめしべの柱頭に置き換わっていた (図 4)。このことは、CUC1 には器官のアイデンティティを制御する機能があることを示唆している。*CLV3p:CUC1*、*ASI1p:CUC1* 植物体では、いずれも目立った形態異常は観察されなかった。



図4 *AtML1p:CUC1* のめしべ。(左図) 心皮にシワがより、野生型のように伸長しない。(右図) 左図のさやの心皮を1枚とったところ。胚珠ができるべき場所に、柱頭の構造のようなものができている (矢尻)。

以上の研究成果から、CUC1 は器官境界部において LSH4 と LSH3 という核内因子の転写を活性化し、分裂組織や境界部形成に関わっていることを明らかにした。また、CUC1 が器官のアイデンティティを変える能力を持つことを初めて示した。CUC1 が境界部で機能することを考えると、器官を物理的に隔てるだけではなく、細胞運命 (器官のアイデンティティ) の境界形成も担っている可能性がある。胚でのイメージングは、蛍光タンパク質を用いて

可能になったものの、細胞内因子によっては蛍光タンパク質が凝集することもあり、細胞動態を詳細に観察するには、さらなる工夫が必要であると考えられる。

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)

[学会発表] (計 4 件)

① Seiji Takeda, Keiko Hanano, Yuka Tsubakimoto, Ayano Kariya, Satoko Shimizu, Masao tasaka and Mitsuhiro Aida. Functional analysis of LSH genes that are direct targets of CUC1 transcription factor controlling organ boundary formation. 20th International Conference on Arabidopsis Research 2009.6.30 ~ 2009.7.4, Edinburgh, UK.

② 武田征士、花野恵子、椿本有雅、荻谷綾乃、清水聡子、田坂昌生、相田光宏。器官境界部を作る CUC1 遺伝子の下流遺伝子 LSH4 の機能解析。第 50 回日本植物生理学会年会、2009.3.21~2009.3.24、名古屋

③ Seiji Takeda, Keiko Hanano, Yuka Tsubakimoto, Ayano Kariya, Satoko Shimizu, Masao Tasaka and Mitsuhiro Aida. Functional analysis of idrect target genes of CUC1 which controls organ boundary formation in *Arabidopsis thaliana*. 生命科学 GCOE ネットワークフォーラム 2009、2009.2.14、東京

④ Seiji Takeda, Keiko Hanano, Yuka Tsubakimoto, Ayano Kariya, Satoko Shimizu, Masao Tasaka and mitsuhiro Aida. Functional analysis of LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS of which transcription is controlled by organ boundary determinants CUP-SHAPED COTYLESON genes. The 55th NIBB conference Arabidopsis Workshop 2008, 2008.9.13 ~ 2008.9.15, 愛知県岡崎市

[その他]

ホームページ等

<http://bsgcoe.naist.jp/special-grp01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 征士 (TAKEDA SEIJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ

エンス研究科・特任助教
研究者番号：90508053

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
相田 光宏 (AIDA MITSUHIRO)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・特任准教授
研究者番号：90311787