

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14603
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22370019
 研究課題名（和文） R タンパク質が茎頂分裂組織の形成・維持におよぼす影響の解析
 研究課題名（英文） Molecular analysis of the relation between R-protein and morphogenesis in plant
 研究代表者
 田坂昌生（TASAKA MASAO）
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授
 研究者番号：90179680

研究成果の概要（和文）：恒常活性型の R タンパク質(*uni-1D*) は地上部の形態異常を引き起こす。そのサプレッサーの一つが 26S プロテアソームの構成タンパク質の一つ (RPT2a) であり、UNI タンパク質と結合した。また、得られたサプレッサーを次世代シーケンサーによる SNP 解析で同定する方法を確立した。膜貫通型レセプターカイネーゼの *ER (ERECTA)* もサプレッサーであり、サイトカニン信号伝達を介して SAM の分化に影響する。篩部のコンパニオン細胞で発現した *ERECTA* が花茎の伸長制御に重要な働きをする事も明らかにし、内皮細胞で発現する *EPFL4, EPFL6* がリガンドとして結合する事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The constitutive active R-protein, *uni-1D*, induced abnormal morphogenesis in *Arabidopsis* shoot. We have isolated suppressors of *uni-1D*. One of them encodes RPT2, which is a component of 26S proteasome and binds directly to UNI. *Erecta*, which is a receptor kinase in a plasma membrane, is also one of the suppressors. *ER* family genes expressed outside of SAM, however, affect the SAM activity. *ER* expressed in phloem affect the inflorescence stem elongation and the *EPFL4* and *6*, both of which expressed in endoderm cells, function as a ligand in this process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学・生理学

キーワード：R タンパク質, UNI, レセプターキナーゼ *ERECTA* リガンド *EPFL*

1, 研究開始当初の背景
 高等植物の基本的な体は、地上部と根を貫く
 上下軸とそれに直交する同心軸を組み合わせ

る事でうまく説明できる。そして、この 2 種
 類の軸は胚発生過程で確立し、この過程で上
 下軸にそって胚軸と幼根の先端に分裂組織

(SAM と RAM) ができる。発芽後、地上部では茎頂の分裂組織から葉と茎が次々と作られ、葉の根元に新たな分裂組織が出来る事で枝が生じ全体としての植物個体の形が出来上がる。芽生え以降の発生過程は環境の影響を大きく受けることが知られている。我々は、シロイヌナズナから多くの形態形成異常変異株を単離し、原因遺伝子を決めてその発生過程における機能を明らかにしてきた。その研究の一環として、最近 1 遺伝子の変異により地上部の形態に多大な異常を引き起こす半優性の *uni1-D* 変異株を単離した。(図 1) その原因遺伝子は、感染応答性反応における信号伝達の

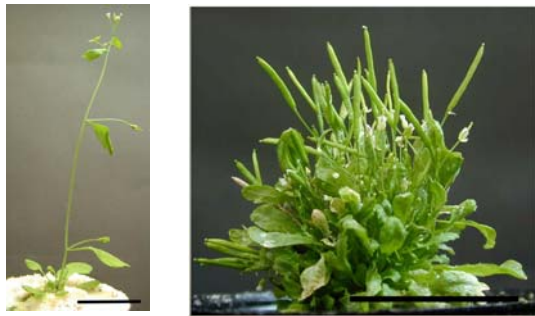


図 1 野生株と *uni1-D* ヘテロの写真。
黒いバーは 3 cm、

初期過程で重要な機能を持つ新規の (CC-NBS-LRR) R タンパク質をコードしており、この変異ではこのタンパク質が恒常的に活性化している事が明らかになった。そして、この変異株の中ではサルチル酸信号伝達系を経由した感染応答反応が恒常的に活性化しており、既に形成された SAM 活性が低下しており、異所的に多数の SAM が形成される事を明らかにした。さらに、異所的に恒常活性型の UNI タンパク質を過剰発現すると恒常活性型の優性変異を持つ *uni1-D* と同じ表現型を示す。

2. 研究の目的

植物は病原菌の感染に対応して、素早く感染応答反応と呼ばれる抵抗性応答を誘発する。しかし、植物はこの感染応答反応だけではなく、感染された枝葉を枯死させて代わりに新しい枝葉を出す形態形成を伴う反応を行っている可能性が示唆されていた。早期の感染応答反応に関する分子レベルでの解析は進んでいる。しかし、形態形成を伴う遅発性の反応は適当な実験系が無い為に分子レベルでの研究はほとんどされていない。本研究では、R タンパク質の活性化による感染応答反応と形態形成の間の分子クロストークに関するより詳細な分子遺伝学的ネットワークの解明を目指す。これにより、上記クロストークの実態がより明確になるとともに、SAM 形成やその

維持にかかわる分子ネットワークが非常に新しい観点から解明できると考えている。

3. 研究の方法

1) UNI タンパク質の相互作用因子の単離
UNI タンパク質と相互作用するタンパク質の検索を酵母 2 ハイブリッド法で行った。さらに、野生型並びに変異型 UNI タンパク質を特異的に認識する抗体を使って、免疫科学的に植物体内での相互作用の確認を行った。また同じ方法で、植物体からのタンパク質複合体の分離も行い、複合体成分の質量分析計を用いた解析も行った。

2) *uni1-D* サプレッサー変異株の解析
uni1-D 変異型遺伝子と薬剤選抜マーカーを連結して導入した形質転換植物を変異原処理し、得られた種子を薬剤選抜で行った。そして、導入遺伝子が存在する条件で形質が復帰したサプレッサー変異を得て、マップベースクローニングで原因遺伝子の同定を行った。また、次世代シーケンサーを用いた SNP 解析による原因遺伝子の同定も行った。さらに、得られたサプレッサー遺伝子の機能を解析した。

4. 研究成果

1) UNI タンパク質の CC ドメインに結合する可能性が高いタンパク質として、26S プロテアソームの構成タンパク質の一つである RPT2a を酵母 2 ハイブリッド法で同定した。*rpt2a* 変異体と *uni1-D* の 2 重変異体を作成し解析した結果、*rpt2a* 変異が *uni1-D* 変異をサプレッスする事が明らかになった。この結果から、UNI と RPT2a はタンパク質相互作用を行いつつ協調して信号伝達を行う可能性が示唆された。

2) 野生型の UNI タンパク質を過剰発現すると恒常活性型の優性変異を持つ *uni1-D* と同じ表現型を示す。これを明らかにした形質転換植物の解析から、UNI 遺伝子の 3'UTR がタンパク質の生産性の向上に関連する事も明らかになった。

3) *uni1-D* のサプレッサーの遺伝学的スクリーニングを行い新たな変異体を多数獲得した。

4) サプレッサー変異体のなかで、原因遺伝子が未同定であったものを題材に次世代シーケンサーを用いた原因変異同定を試みた。その結果、バッククロスやラフマッピングを経ずに連鎖解析と SNP 解析を同時に行う手法で原因変異の同定に成功した。

5) ERECTA (ER) 受容体キナーゼの機能欠損により *uni1-D* 変異体の SAM の異常が回復した。また、*uni1-D* 変異体の SAM の異常には SAM 外部での ER の機能が重要であった。さらに、ER

ファミリー因子群の機能をすべて欠損させると、*uni-1D* 変異体の AM の異常もまた抑圧された。これらを踏まえた解析の結果、野生型背景においても、分裂組織外での ER ファミリーの機能が分裂組織の制御に関わることが示唆された。そして、3種の ERECTA ファミリー遺伝子群が協調して花茎頂メリステムの形成・維持に関与し、その過程でサイトカニンが重要な働きをする事も明らかにした。(図 2)

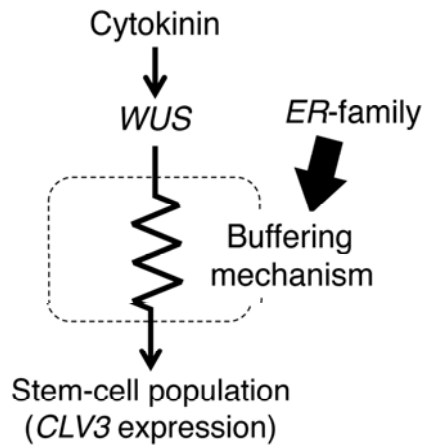


図 2 ERとサイトカニン信号伝達、幹細胞維持の関係

6) ERECTAにはファミリー遺伝子群が存在するが、篩部のコンパニオン細胞で発現した ERECTAが花茎の伸長制御に重要な働きをする事を明らかにし、このレセプターに結合するリガンドがEPFL4,EPFL6であり、これらは内皮細胞で発現する事を明らかにした。また、篩部の ER,ERL1が形成層の維持にも関わる事を明らかにし、その過程でも内皮細胞で発現する EPFL4,6がリガンドとして機能する事を明らかにした。(図 3)

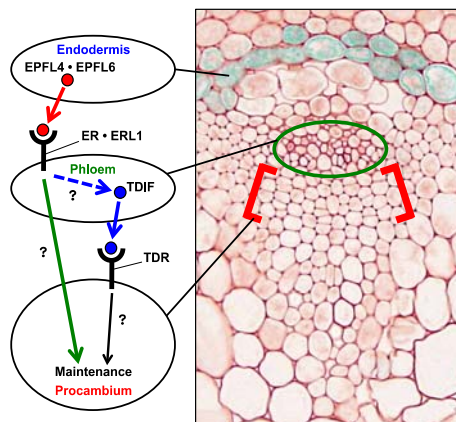


図 3 花茎の維管束系 青く染まっている内皮細胞から分泌された EPFL4/6 が篩部の ER/ERL1 に受容され、そこからの信号伝達を介して維管束幹細胞の維持に関与する。この信号伝達は篩部から分泌される TDIF が維管束幹細胞の TDR に重用されて維管束幹細胞の維持に働く経路と冗長的に機能する。また、同じ EPFL4/6 と ER の系が花茎の伸長制御に関わる。

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. Uchida N., Shimada M, Tasaka M. ERECTA-family receptor kinases regulate stem-cell homeostasis via buffering its cytokinin responsiveness in the shoot apical meristem. ERECTA-family receptor kinases regulate stem-cell homeostasis via buffering its cytokinin responsiveness in the shoot apical meristem. *Plant Cell Physiol* 54 343-361 2013 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22885615>

2. Uchida N., Lee S.J., Horst .R., Lai H., Kajita R., Kakimoto T., Tasaka M., Torii U.K. Regulation of inflorescence architecture by inter-tissue-layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem *PNAS* 100 6337-6342 2012 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22474391>

3. Uchida N., Shimada M, Tasaka M. Modulation of the balance between stem-cell proliferation and consumption by ERECTA-family genes. *Plant Signal Behav.* 7 1-3 2012 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990445>

4. Uchida N., Sakamoto T, Kurata T, Tasaka M. Identification of EMS-induced Causal Mutations in A Nonreference *Arabidopsis thaliana* Accession by Whole Genome Sequencing *Plant Cell Physiol* 52 716-722 2011 <http://pcp.oxfordjournals.org/content/52/4/716.long>

5. Uchida N., Igari K, Bogenschutz NL, Torii KU, Tasaka M. Arabidopsis ERECTA-family Receptor Kinases Mediate Morphological Alternations Stimulated by Activation of NB-LRR-type UNI proteins. *Plant Cell Physiol* 52 804-814 2011 <http://pcp.oxfordjournals.org/content/52/5/>

804.long

6. Uchida N. and Tasaka M. Regulation of NB-LRR-type UNI and its related signaling pathway *Plant Signaling & Behav.* 6 1219-1222 2011

<http://www.landesbioscience.com/journals/psb/article/16181/>

7, Chung K. and Tasaka M. RPT2a, 26S proteasome AAA-ATPase is directly involved in Arabidopsis CC-NBS-LRR protein, uni-1D-induced signaling pathways *Plant Cell Physiol* 52 1657-1664 2011
<http://pcp.oxfordjournals.org/content/52/9/1657.long>

[学会発表] (計 13 件)

1, Tasaka M. and Uchida N. ER-family genes involved in several processes of shoot development The 21th IPGSA 2013 06 Shanghai (China)

2, 打田直行, 田坂昌生 内皮・篩部コミュニケーションを介した花茎の形成層の制御 第 54 回日本植物生理学会 2013 03 岡山

3, 木村友香, 島田昌典, 田坂昌生, 打田直行 ERECTA ファミリー受容体による茎頂分裂組織の制御 第 54 回日本植物生理学会 2013 03 岡山

4, 池松朱夏, 田坂昌生, 打田直行 ERECTA ファミリー受容体による胚軸の二次成長における維管束制御 第 54 回日本植物生理学会 2013 03 岡山

5, 岡本智史, 相田光宏, 田坂昌生, 打田直行 葉の鋸歯の成長を司るリガンド・受容体ペアの解析 第 54 回日本植物生理学会 2013 03 岡山

6, Naoyuki Uchida, and Masao Tasaka Regulation of plant vascular stem cells by ERECTA-family receptor kinases The 1st European Workshop on Peptide Signalling in Plants 2013 10 Oslo (Norway)

7, Tasaka M. and Uchida N. ER-family genes involved in many processes of aerial morphogenesis The 4th NIBB-MPIPZ-TLL Symposium 2012 11 Okazaki (Japan)

8, 打田 直行 シロイヌナズナに EMS で導入した原因 SNP のゲノムシーケンスによる迅

速な同定法 高速シーケンスによる新たな研究アプローチ 2011 6. 21 奈良

9, Uchida N. Analysis of influences of CC-NB-LRR-related signaling on meristem regulation Japan-German Symposium on Evolution and Development 2009 08 Cologne Germany

10, Kwi Mi Chung, Kadunari Igari, Masao Tasaka Control mechanisms for activation of a novel CC-NBS-LRR protein, UNI-mediated signals that induce both SA-dependent defense and CK-dependent morphological signals The 20th International Conference on Arabidopsis Research 2009 07 Edinburgh UK

11, Naoyuki Uchida, Kadunari Igari, Masao Tasaka 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 07 Edinburgh UK

12, 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 第 51 回大会 2009 03 熊本

13, Naoyuki Uchida, Kadunari Igari, Masao Tasaka 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 75 回大会 2009 09 山形

[図書] (計 1 件)

Uchida N., Sakamoto T., Tasaka M., Kurata T. Identification of EMS-induced Causal Mutations in Arabidopsis thaliana by Next-Generation Sequencing. *Methods in Molecular Biology* 2013 in press

[その他]

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/keihatsu/keihatsu.html>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田坂昌生 (TASAKA MASAO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授 研究者番号：90179680

(2) 研究分担者

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

(2008 年-2009 年)