

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 4 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22570042

研究課題名（和文） 植物の器官形成における、細胞の位置認識と情報伝達機構の解明

研究課題名（英文） The system for recognition and signal transduction of the cell position information during plant organ development

研究代表者

武田 征士 (TAKEDA SEIJI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：90508053

研究成果の概要（和文）：細胞壁に囲まれていて自由に動けない植物細胞が、自分の置かれた位置をどのように認識し、周辺細胞へ伝えているのかを分子レベルで明らかにするために、シロイヌナズナの萼片間と花弁原基で機能する転写因子に着目し、イメージング解析、Yeast Two Hybrid 法を使った相互作用因子の探索、誘導系を用いた経時的遺伝子発現系の確立を行った。また、花弁伸長に関わるワックス合成様酵素をコードする遺伝子の発現機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Plant cells are not able to move around in the body due to the cell wall surrounding the cells. To understand how plant cells recognize their position transfer the positional information to the neighboring cells, we investigate the function of two *Arabidopsis* genes, PTL, expressed in sepal boundary, and RBE, expressed in petal primordia, using the fluorescent protein-based imaging technique, yeast two hybrid system, and induction system. We also analyzed the *FOP1* gene involved in petal elongation process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：植物分子機能、シロイヌナズナ、花弁

1. 研究開始当初の背景

地球上に約 25 万種あると言われている被子植物は、多様な色や形をした花をつける。多くの種では、この多様性は花弁に由来する。花弁は花器官の中でも最も色や形、匂いに多くの種類があり、花粉を媒介する虫や鳥を誘

引する役割を持つ。一方で、花の基本体制は種を問わず多くの点で共通しており、通常は外側から萼片、花弁、雄しべ、雌しべの順に器官が同心円状に配置される。各同心円状の領域は「whorl」と呼ばれており、各花器官の形成位置は、それぞれの whorl 内で茎頂分裂組織に対して相対的に決まっている。

花器官の中で最初に作られるのは通常萼片であり、モデル植物シロイヌナズナを例にとると、茎頂分裂組織に対して最も遠い側（背軸側）に1枚、近い側（向軸側）に1枚の萼片原基がまず生じ、その後向背軸に直交する形で横側に2枚の萼片原基が生じる。花弁は、萼片と萼片の間の少し内側の部分に作られ、萼片と花弁が重なって作られる事はない。このことは、「萼片間領域」から「花弁原基」へ何らの位置情報が伝わっている可能性が考えられる。このように、植物が成長する際には、細胞が置かれた位置を認識し、隣接する細胞と協調しながら器官を形成していくと考えられるが、位置情報の認識伝達機構や協調した器官形成の仕組みについては、ほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

植物細胞は、レンガによく例えられる様に堅い細胞壁に囲まれており、体の中を自由に動き回る事ができない。このため、細胞は自分の置かれた位置を認識し、周辺細胞へ伝えることで、周りとの協調して秩序だった器官を形成していると考えられるが、その分子メカニズムは明らかにされていない。

本研究では、モデル植物シロイヌナズナの萼片間と花弁原基を研究対象とし、それぞれの細胞で特異的に発現する2つの遺伝子 (*PTL* 及び *RBE*) に着目し、細胞がどのように位置情報を認識し、それを伝えて行くのか、またそれぞれの遺伝子が器官形成においてどのような機能を果たしているのかを明らかにすることを目的に研究を行った。また、器官境界部で機能する転写因子 *CUC1* の転写ターゲットの機能解析を行い、器官形成における「境界部」がもつ役割を細胞レベルで明らかにした。さらに、花弁伸長に関わる *FOP1* 遺伝子の機能発現解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 萼片間領域と花弁原基で発現する遺伝子の時空間的発現解析系の確立

萼片間で発現する *PETAL LOSS* (*PTL*)、花弁原基で発現する *RABBIT EARS* (*RBE*)、器官境界部で機能する *CUP-SHAPED COTYLEDON1* (*CUC1*)、及び *CUC2* について、それぞれ蛍光タンパク質 (*GFP* または *CFP*) とゲノム由来の遺伝子を融合させたものを作成し、アグロバクテリウムを用いて形質転換を行い、蛍光イメージングによって各遺伝子の発現パターンを時空間的に解析する系を確立した。それぞれの形質転換体をスクリーニングし、蛍光観察を確認した後、交配して複数の遺伝子発現を同時に観察できる植物体を作成した。

蛍光観察は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、3D画像再構築によって行った。また、花器官形成における *RBE* の発生学的機能を明らかにするために、花芽の中で異所的に発現させる形質転換体を作成した。

(2) Yeast Two Hybrid 法による *RBE* 相互作用因子の探索

産業総合研究所の光田展隆博士によって作成されたシロイヌナズナの転写因子ライブラリーを用いて、*RBE* と相互作用する因子の探索を行った。得られた候補因子について個別形質転換によって相互作用を確認した。また、各遺伝子機能を抑制した植物体 (*CRES-T* 法) の表現型解析を行った。

(3) 誘導系植物体の作成

PTL 遺伝子の誘導発現系を、ラットのグルココルチコイドレセプター (*GR*) を使って作成した。プロモーターには、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター及び *PTL* のプロモーターを用いた。それぞれのコンストラクトを花弁のできない *ptl-1* 変異体に導入した。得られた形質転換体について、誘導剤であるデキサメタゾンを経日処理することで、*PTL* プロモーターを用いたラインの方で花弁形成が回復することを確認した。

4. 研究成果

(1) 蛍光イメージング

PTL, *RBE*, *CUC1*, *CUC2* それぞれの発現解析を、蛍光タンパク質を使って行った。萼片間領域と花弁原基細胞は隣接しており、これらの領域が空間的に区別されているのかどうか不明であったが、*PTL* タンパク質は萼片間に、*RBE* タンパク質は花弁原基で発現し、両者は重なる事がなかった。このことから、萼片間領域と花弁原基は細胞レベルで明確に区別されること、*PTL* タンパク質は細胞間を移動せず、細胞自律的 (*cell autonomous*) に花弁原基形成を制御することが示唆された。また、*CUC1*, *CUC2* のイメージングから、これらの遺伝子は未分化な細胞で発現しており、その発現がなくなることで細胞分化が始まる事が示唆された。

(2) *RBE* の相互作用因子スクリーニング

スクリーニングにより、*RBE* と相互作用する 27 の転写因子が候補として得られた。それぞれの相互作用を酵母形質転換により確認した。各遺伝子が *CRES-T* 法により機能抑制された植物体の表現型解析を行い、花に

異常のあるものをいくつか確認した。

(3) RBE の異所的発現株作成と解析

花器官形成における RBE の役割を明らかにするため、*GFP::RBE* 融合遺伝子を *APETALA1* プロモーター、*APETALA3* プロモーター、及び *AGAMOUS* 2nd intron で発現させる形質転換体を作成した。このうち、*APETALA1* プロモーターで発現させたものは、T1 世代で花弁が萼片に、雄しべが雌しべに置き換わるホメオティックな異常が起こっていた。この原因を調べるため、茎頂部から RNA を抽出し、逆転写後 PCR によって花のホメオティック遺伝子の発現量を解析したところ、クラス B 遺伝子である *APETALA3* 及び *PISTILLATA* の発現が下がっていることが分かった。

(4) CUC1 の転写ターゲット *LSH3*, *LSH4* の発現および機能解析

器官境界部で機能する CUC1 の転写ターゲットとして同定された *LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS 4 (LSH4)* 及びその相同遺伝子である *LSH3* の発現・機能解析を行った。両者とも茎頂の分裂組織と器官の境界部で発現しており、CUC1 と同じ領域で発現することが確認できた。リボソーム遺伝子のプロモーターを使って分裂組織で異所的に発現させたところ、花の中から新たな花が形成されたり、雌しべの中に新たに花器官のようなものが分化したりする異常が見られた。*In situ hybridization* によって分裂組織マーカーである *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* や *WUSCHEL (WUS)* の発現をみると、これらの異常な器官・組織が形成される細胞群で発現が確認され、*LSH4*・*LSH3* の異所的発現により、分化した細胞から新たに分裂組織が作られる事が示唆された。

(5) 花弁伸長に関わる *FOLDED PETAL 1 (FOP1)* の解析

花弁細胞が協調して花弁をまっすぐ伸長させる仕組みを調べるために、花弁が曲がったまま開花してしまう突然変異体のひとつ、*folded petal 1 (fop1)* の解析を行った。*fop1* では、花弁原基形成と初期発生に異常はなかったが、花弁が萼片と葯の間の狭い領域を伸長する際に引っかかり、そのまま伸長が続くことで曲がってしまっていることが分かった。また、花弁表皮細胞の表層ナノリッジ構造が上から押しつぶされたようになっており、花器官の物理的な接触が花弁屈曲の原因であることが示唆された。つぼみの早い段階で萼片を除去すると、花弁はまっすぐ伸長した。ポジショナルクローニングによって FOP1

遺伝子はアシネトバクターのワックス合成酵素/ジアシルグリセロール転移酵素に似たタンパク質をコードすることを明らかにした。FOP1 タンパク質は伸長中の花弁で発現し、細胞内では細胞膜に局在していた。以上のことから、FOP1 は花弁表皮細胞でワックス系の長鎖脂肪酸合成に関わり、その産物が狭い空間をまっすぐ伸長するための潤滑油のような役割を果たしている事が示唆された。

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 3 件)

① Seiji Takeda, Akira Iwasaki, Noritaka Matsumoto, Tomohiro Uemura, Kiyoshi Tatematsu, and Kiyotaka Okada. Physical interaction of floral organs controls petal morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* (161) 1242-1250, 2013. Doi 10.1104/ppx112.212084. 査読有

② Seiji Takeda, Keiko Hanano, Kariya Ayano, Satoko Shimizu, Li Zhao, Minami Matsui, Masao Tasaka, and Mitsuhiro Aida. CUP-SHAPED COTYLEDON1 transcription factor activates the expression of LSH4 and LSH3, two members of the ALOG gene family, in shoot organ boundary cells. *Plant Journal* (66), 1066-1077, 2011. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04571.x. 査読有

③ Seiji Takeda, and Mitsuhiro Aida. Establishment of the embryonic shoot apical meristem in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Research* (124) 211-219, 2011. Doi 10.1007/s10265-010-0390-x 総説、査読有

[学会発表] (計 7 件)

① Seiji Takeda et al. Relation between sepal boundary and petal primordium in Arabidopsis thaliana. 24th International Conference on Arabidopsis Research. 2013 年 6 月 24 日～6 月 28 日、Sydney, Australia. (発表確定)

② Seiji Takeda et al. Relation between sepal boundary and petal primordium: Expression study. 第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21 日～3 月 23 日、岡山大学

③ 武田征士 他 花卉形態形成の分子メカニズム 第 24 回日本植物形態学会 (招待講演) 2012 年 9 月 14 日、兵庫県立大学

④ Seiji Takeda et al. Physical interaction of floral organs controls petal elongation. 23rd International Conference on Arabidopsis Research. 2012 年 7 月 3 日～7 月 7 日 Vienna, Austria.

⑤ 武田征士 他 花芽分裂組織形成に関わる転写因子 PUCHI の解析 第 75 回日本植物学会年会 2011 年 9 月 17 日、東京大学

⑥ 武田征士 他 シロイヌナズナの花弁伸長を制御する遺伝子とメカニズム 第 23 回日本植物形態学会年会 2011 年 9 月 16 日、日本女子大学

⑦ 武田征士 他 器官境界部で発現する ALOG ファミリー遺伝子 LSH4 の機能解析 第 52 回植物生理学会年会 (東北大地震により学会中止、要旨発表のみ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 征士 (TAKEDA SEIJI)
京都府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：90508053

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究連携者

なし

(4) 研究協力者

光田 展隆 (MITSUDA NOBUTAKA)
独立行政法人産業技術総合研究所・研究員
研究者番号：80450667

植村 知博 (UEMURA TOMOHIRO)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：90415092

浜村 有希 (HAMAMURA YUKI)
名古屋大学・GCOE ライブイメージングセンター