

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370023

研究課題名(和文) 葉と心皮の発生を制御する転写因子の機能特異性の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular analysis of CUC2 functional specificity

研究代表者

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・准教授

研究者番号：90311787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：生物の形作りは様々なタンパク質により調節される。代表的な調節タンパク質として、遺伝子のスイッチのオン・オフに関わる転写因子がある。転写因子には様々な種類があり、異なる器官の調節には異なる転写因子が関与するのが普通であるが、単一の転写因子が異なる器官の発達を調節することも多い。本研究ではアブラナ科植物のシロイヌナズナにおいて葉と果実の両方の発達を調節する転写因子CUC2の機能をしらべ、各器官でCUC2のはたき方を変化させるメカニズムの一端を明らかにした。本研究により植物の形作りの基礎的な理解が進むとともに、その成果を応用することで作物における果実や葉の質の向上にも役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Morphogenesis of organisms is regulated by various types of proteins. Among such regulatory proteins, transcription factors constitute a major class of proteins that turn on and off gene expression. CUC2 is a transcription factor required for normal development of various plant organs including leaves and fruits. We investigated the function of CUC2 in detail using the model plant *Arabidopsis thaliana* (thale cress), and found mechanisms that confer different functions in development of the two organ types.

研究分野：植物発生学

キーワード：転写因子 シロイヌナズナ 発生

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナの *CUC2* 遺伝子は NAC ドメインをもつ転写因子をコードし、機能が重複したパラログである *CUC1* とともに地上部器官の境界部で発現して茎頂分裂組織の形成、葉の分離、花器官の分離、および心皮内部の胚珠と隔壁の形成を促進する^{1,4}。また、*CUC2* は葉の周縁部にも発現し、鋸歯の形成を促進する⁵。*CUC2* タンパク質が異なる器官で異なる構造の形成を促進する分子メカニズムはよくわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では *CUC2* の機能特異性に着目し、心皮と葉で *CUC2* の機能を変化させる分子メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

CUC2 遺伝子の心皮形成における機能の詳細を分子遺伝学的に解明するとともに、心皮における *CUC2* 遺伝子機能の制御因子の同定を行った。また、*CUC2* タンパク質の標的配列の同定、葉および心皮における *CUC2* の特異的標的遺伝子の同定、*CUC2* の器官特異的相互作用因子の同定と機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 心皮形成における *CUC1* および *CUC2* の基本的な機能を明らかにした(論文)。野生型では 2 つの心皮原基境界部において *CUC1* と *CUC2* が発現する(図 1)。この部分には内側隆起とよばれる未分化組織が形成され、ここから胚珠と隔壁が形成される(図 1)。一方、*cuc1 cuc2* 二重変異体では内側隆起の形成が大きく損なわれていた(図 1)。また *CUC1* および *CUC2* の microRNA 制御配列を欠いたゲノム遺伝子の導入により、それぞれの遺伝子発現が増加・拡大し、それに伴って内側隆起の拡大が引き起こされた(図 2)。以上から、*CUC1* および *CUC2* は心皮形成過程において内側隆起の形成を促進することで胚珠・隔壁の発達を制御することが明らかになった。

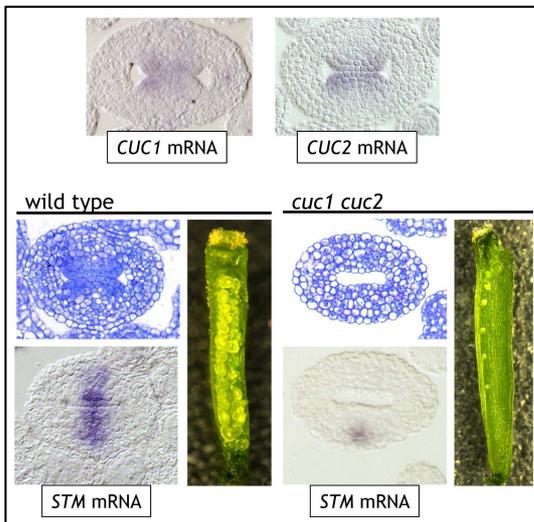


図 1 *CUC1*・*CUC2* の心皮形成における役割。上段は野生型心皮原基の横断切片における *CUC1*・*CUC2* の *in situ* ハイブリダイゼーション。下段は野生型(左)および *cuc1 cuc2* 二重変異体(右)の表現型。それぞれ心皮原基の横断切片(左上)、内側隆起マーカー *STM* の発現(左下)、および成熟した心皮の胚珠(右)を示す。論文 より改変して転載。

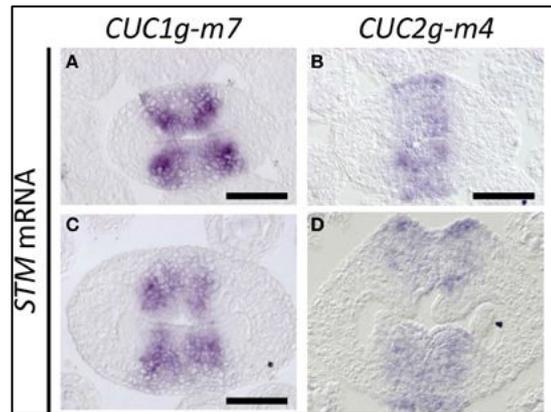


図 2 *CUC1* および *CUC2* の microRNA 制御配列を欠いたゲノム断片を導入した形質転換体 (*CUC1g-m7* と *CUC2g-m4*) のステージ 9 初期 (A,B) およびステージ 9 中期 (C,D) における *STM* 遺伝子(内側隆起マーカー)の発現。いずれの形質転換体でも内側隆起の拡大が起こるとともに、*STM* の発現部位が拡大する。論文 より改変して転載。

(2) *CUC1*・*CUC2* 遺伝子の機能を心皮形成特異的に制御する因子として bHLH 転写因子をコードする遺伝子 *SPT* を同定した(論文)。*SPT* の機能欠損により *CUC1* および *CUC2* の発現部位が拡大し、それに伴って心皮先端部の融合が阻害される(図 3)。このことから、*SPT* 遺伝子は心皮における *CUC1* および *CUC2* 遺伝子の発現を負に制御することにより、心皮の融合を促進することが明らかになった(図 4)。一方、心皮の基部においては *SPT* が *CUC1*・*CUC2* と同様に胚珠と隔壁の形成に促進的にはたらくことから、遺伝子どうしの関係が心皮の場所によって異なることも明らかになった。

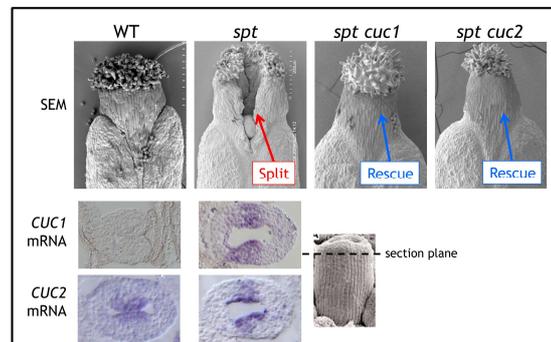


図 3 心皮先端部の発生における *SPT* と *CUC1*・*CUC2* との相互作用。上段は野生型、

spt 変異体、*spt cuc1* 二重変異体、*spt cuc* 二重変異体の成熟した心皮先端部の SEM 像。*spt* 変異体では先端部が一部開裂 (赤矢印) するが、この表現型は *cuc1* および *cuc2* 変異の導入により部分的に回復する (青矢印)。下段左はステージ 8 の心皮原基切片における CUC1 および CUC2 の *in situ* ハイブリダイゼーション、右は雌蕊原期中における切片のおよその位置を点線で示す。いずれの遺伝子も *spt* 変異体において発現部位が拡大する。論文 より改変して転載。

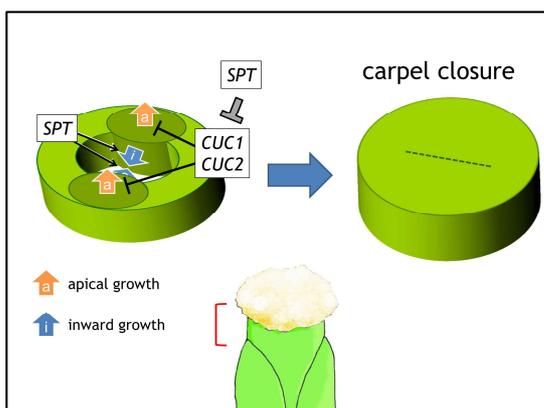


図 4 雌蕊先端部における心皮融合の制御モデル。*SPT* は *CUC1* および *CUC2* の発現を抑制することで心皮境界部の頂端方向への成長 (オレンジの矢印) を促進する一方で、*CUC1*・*CUC2* の発現とは独立に向軸方向への成長 (青の矢印) を促進する。これらの 2 方向の成長制御の組み合わせにより、心皮先端部の融合が完成し、完全に閉じた雌蕊が形成される。論文 より改変して転載。

(3) *CUC1*・*CUC2* 遺伝子の機能を心皮特異的に制御する第 2 の因子として YABBY 型転写因子をコードする *CRC* を同定した。*CRC* の機能欠損により、*CUC1* および *CUC2* プロモーターの活性上昇や活性部位の拡大がおり、それに伴って心皮先端部の融合が阻害された。また、*CRC* タンパク質は *CUC2* タンパク質と特異的に相互作用することが、酵母 Two-hybrid 法およびシロイヌナズナ培養細胞における BiFC 法により明らかになった。さらに *CRC* タンパク質は *STM* 遺伝子の Reg IV エンハンサー (後述) に対する *CUC1*・*CUC2* の活性化作用を阻害することもわかった。以上から、*CRC* が *CUC2* タンパク質との物理的相互作用を介して *CUC2* の活性を阻害する可能性が示された。

(4) 心皮形成に関わる *STM* 遺伝子のプロモーター解析を行い、*CUC1* および *CUC2* によって活性化されるエンハンサー領域を同定した。*STM* 遺伝子の 5' 上流 0.7~4.4 kb を 4 つの小領域 (Reg I, II, III, IV) に分割し、ミニマルプロモーターとルシフェラーゼレポーターにつないだコンストラクトを作製した。次に、シロイヌナズナ培養細胞を用いて各小領

域に対する *CUC1* および *CUC2* の影響を測定したところ、いずれのタンパク質も Reg IV 領域にのみ顕著な活性可能を示した。そこで Reg IV 領域をさらに分割することで、最終的に *CUC1*・*CUC2* の標的配列を 142bp の小領域にまで狭めることができた。さらに、この小領域中にエンハンサー活性に必須な 4bp の配列が 2 カ所、存在することもわかった。

(5) 心皮において発現する *LAS* 遺伝子について、種間で保存されたエンハンサー配列の一つに *CUC1*・*CUC2* の NAC ドメインが結合することが、ゲルシフトアッセイによって示された。(4) の成果と合わせて、*CUC1* および *CUC2* の標的配列の候補を得たことで、今後はこれら標的配列の生物学的な意義を明らかにし、*CUC* タンパク質による下流遺伝子制御の詳細を明らかに出来ると考えている。

(6) *CUC2* の優性変異体である *cuc2-1d* を変異原処理した集団中から、葉および心皮の表現型を抑制する変異体候補を得た。現在、これらの変異体の表現型と遺伝学的解析を進めている。

(7) *CUC2* 機能誘導型コンストラクト (*CUC2g-m4-GR*) を作製し、ラインを確立した。このコンストラクトには microRNA164 の標的配列に変異を入れており、*CUC2-GR* 融合タンパク質が心皮融合部および葉の周縁部で過剰発現するようにデザインされている。この形質転換体を用いて qPCR を行い、葉および心皮特異的に誘導される遺伝子候補を得た。

(8) 酵母 two hybrid 法により *CUC2* タンパク質と相互作用する転写因子のスクリーニングが行われ、40 の *CUC2* 相互作用因子候補が得られた。これらについて、発現パターンに基づいた候補遺伝子の絞り込みと、機能阻害実験を進めており、*CUC2* の器官特異性に関わる候補因子の同定を進めている。

< 引用文献 >

1. Takeda S, Aida M (2011). Establishment of the embryonic shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*. J Plant Res 124, 211-219. 19.
2. Takeda S, Hanano K, Kariya A, Shimizu S, Zhao L, Matsui M, Tasaka M, Aida M (2011). 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 J 66, 1066-1077.
3. Hibara K, Karim MR, Takada S, Taoka K, Furutani M, Aida M, Tasaka M (2006). *Arabidopsis* CUP-SHAPED COTYLEDON3 regulates postembryonic shoot meristem and

organ boundary formation. *Plant Cell* 18, 2946-2957.

4. Ishida T, Aida M, Takada S, Tasaka M (2000). Involvement of *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes in gynoecium and ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41, 60-67.

5. Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, and Laufs P (2006). The Balance between the *MIR164A* and *CUC2* genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 2929-2945.

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)

Kamiuchi Y, Yamamoto K, Furutani M, Tasaka M, Aida M, The *CUC1* and *CUC2* genes promote carpel margin meristem formation during *Arabidopsis* gynoecium development, *Front Plant Sci*, 査読有, 5, 2014, 165. doi: 10.3389/fpls.2014.00165

Galbiati F, Sinha Roy D, Simonini S, Cucinotta M, Ceccato L, Cuesta C, Simaskova M, Benkova E, Kamiuchi Y, Aida M, Weijers D, Simon R, Masiero S, Colombo L, An integrative model of the control of ovule primordia formation, *Plant J*, 査読有, 76, 2013, 446-455. doi: 10.1111/tbj.12309

Nahar MAU, Ishida T, Smyth DR, Tasaka M, Aida M, Interactions of *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SPATULA* genes control carpel margin development in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol*, 査読有, 53, 2012, 1134-1143. doi: 10.1093/pcp/pcs057

[学会発表](計 11件)

Aida M. シンポジウム講演 Shoot meristem formation: core mechanism and its modification. 第56回日本植物生理学会年会 シンポジウム”Ectopic meristems and developmental plasticity in plants”. 2015/03/16. 東京農業大学世田谷キャンパス (東京都世田谷区).

市川ひとみ, 岩野恵, 辻野理恵子, 高山誠司, 相田光宏. ポスター発表 表皮と表皮の出会い~心皮の後天的融合について. 植物電子顕微鏡若手ワークショップ2014. 2014/12. 理化学研究所 横浜研究所(神奈川県横浜市).

Tsujino R, Ichikawa H, Iwano M, Takayama S, Aida M. ポスター発表 Carpel closure by post-genital protodermal fusion in *Arabidopsis thaliana*. 5th NIBB-MPIPZ-TLL Symposium,

Horizons in Plant Biology. 2014/11/24-26. Max Planck Institute for Plant Breeding Research (Cologne, Germany).

Aida M, Kariya A, Tsubakimoto Y, Shimizu S, Ogisu O, Kamiya M, Taniguchi Y, Takeda S, Tasaka M. ポスター発表 Coordination of embryonic shoot meristem formation by *CUC1* and *CUC2*. 第38回 内藤コンファレンス Molecule-Based Biological Systems (生物システムの物質的基盤). 2014/10/7-10. シャトレゼガトーキングダム サッポロ(北海道札幌市).

辻野理恵子, 市川ひとみ, 岩野恵, 高山誠司, 相田光宏. 口頭発表 シロイヌナズナ心皮における後天的融合過程の解析. 日本植物学会大78回大会. 2014/9/16. 明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市).

MOST Altaf-Un-Nahar, 神内悠里, 辻野理恵子, 相田光宏. 口頭発表 どうやって袋を作るのか~心皮の発生について. 遺伝学研究所研究会「イネ分子遺伝学の未来」2013/10/18. 国立遺伝学研究所 (静岡県三島市).

Aida M. 招待講演 Meristem formation in the *Arabidopsis* shoot and its modification. 5th International PhD School. 2012/09/27. Certosa di Pontignano (Siena, Italy).

Aida M. シンポジウム企画・講演 Shoot Meristem Formation in the *Arabidopsis* Embryo. NAIST未来開拓コロキウム A New Generation of Plant Embryo Research. 2012/10/29. 奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県生駒市).

Aida M, Kariya A, Tsubakimoto Y, Shimizu S, Ogisu H, Kamiya M, Taniguchi Y, Karim MD, Takeda S, Tasaka M. 口頭発表 Coordination of Embryonic Shoot Meristem Formation by *CUC1* and *CUC2*. 第53回日本植物生理学会年会. 2012/03/16. 京都産業大学 (京都府京都市).

相田光宏. 口頭発表 メリステムでせめぎ合い 遺伝学研究所研究会「イネ分子遺伝学の飛躍」2011/11/19. 国立遺伝学研究所 (静岡県三島市).

相田光宏, 苅谷綾乃, 椿本有雅, 清水聡子, 荻巢寛之, 神谷雅子, Md. Rezaul Karim, 武田征士, 田坂昌生. 口頭発表 *CUC1*と*CUC2*による茎頂分裂組織の形成メカニズム. 日本植物学会第75回大会. 2011/09/17. 東京大学駒場キャンパスI (東京都目黒区).

[その他]
ホームページ等
<http://bsw3.naist.jp/aida/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相田 光宏 (Mitsuhiro Aida)
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

(2) 研究分担者

フェルジャニ・アリ (Ferjani Ali)
東京学芸大学・教育学部・助教
研究者番号：20530380

(3) 連携研究者

高橋 広夫 (Hiroo Takahashi)
中部大学・応用生物学部・講師
研究者番号：30454367