

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24247007

研究課題名(和文)位置価に基づく葉形・サイズの高ロニック制御機構の解明

研究課題名(英文)Studies on holonic regulation system of leaf shape/size based on positional cues

## 研究代表者

塚谷 裕一(Tsukaya, Hirokazu)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90260512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,400,000円

研究成果の概要(和文)：(1) RTFLファミリーの位置価決定機構の解析：ゼニゴケでのホモログの発現解析を進めた。またイネRTFLの、シロイヌナズナでの表現型を解析した(Guo et al. 2015)。(2)細胞分裂過程と細胞伸長過程との間の高ロニック制御：an3での補償作用を打ち消すxs変異の原因遺伝子の1つをクローニングした。(3)複葉形成の方向性の解析：ケシ科における複葉形成の方向の多様性について新解釈を提示した(Ikeuchi et al. 2013, 2014)。(4)捕虫葉の形成メカニズム：ムラサキヘイシソウの袋状葉の形成メカニズムに新たな仕組みを提唱した(Fukushima et al. 2015)。

研究成果の概要(英文)：(1) Analyses of positional cue formation by RTFL family: We cloned the homolog of RTFL from *Marchantia polymorpha* and constructed a series of transgenic lines. We also analyzed effects of a rice RTFL overexpression in *Arabidopsis* (Guo et al. 2015). (2) Holonic integration of cell proliferation and cell expansion: We cloned one of responsible genes of xs mutants that cancel compensated cell enlargement seen in an3 mutant. (3) Longitudinal leaflet formation: We proposed a new idea on the variation of direction of the leaflet formation along longitudinal axis of leaf primordia in *Papaveraceae* (Ikeuchi et al. 2013, 2014). (4) Mechanisms of pitcher leaves formation: We found that old theory on the mechanisms of pitcher leaf formation, that expect altered positioning of adaxial/abaxial borders in leaf primordia, was wrong; instead a new mechanisms was proposed for *Sarracenia purpurea* pitcher leaves (Fukushima et al. 2015).

研究分野：植物の発生・分子遺伝学

キーワード：植物発生 位置価 サイズ制御 形態形成 高ロニック制御 補償作用 背腹性 ゼニゴケ

### 1. 研究開始当初の背景

葉は植物にとって光合成器官として、あるいは花器官の基本形として最も重要な器官である。また主要なバイオマスとして、植物を利用するヒトなどの動物にとっても重要な器官である。そのため、近年、国内外で葉の形態形成メカニズムの研究は活発となってきた。

その形態形成及びサイズの制御を解析するべく、申請者は1993年より一貫して発生遺伝学的手法による研究を進めてきた。その結果として多くの重要な素過程を見だし、その主要因子も同定してきた。しかしそうした個別のパーツの謎とは別に、その間に浮かび上がってきた未解明の、しかも**根幹的な謎**がある。それは葉の形態・サイズの制御についての、**位置値に基づくホロニック制御のシステム**である。動物の発生において重要な「位置値」と「ホロニック制御」が、**葉においても確かに働いていることを示すに至ったブレイクスルーポイント**は、いずれもこれまでの申請者らの研究から得たものである。

### 2. 研究の目的

ここで目標とするところは、多細胞性の植物器官の形態形成メカニズムの理解の根幹に当たる**最も本質的な謎**であり、かつその解明の端緒を得たばかりの課題、**<葉原基の位置値に基づくホロニック制御機構の解明>**である。具体的標的は4点あり、葉原基において、**ペプチド性因子が位置値決定を制御するその仕組み、細胞分裂過程と細胞伸長過程とをつなぐ細胞間コミュニケーションの正体の解明、平面成長に関する位置値決定因子と、葉としてのアイデンティティ、胚発生における頂端側アイデンティティの決定機構の解明**である。これらを併せて解明することで、植物器官の形態形成に関する最大の謎、位置値決定と形態・サイズのホロニック制御の分子実体が理解されると期待している。

### 3. 研究の方法

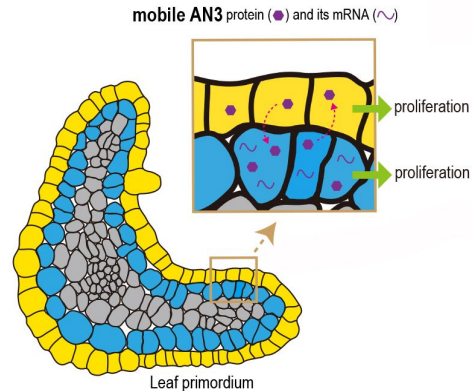
本提案では、葉原基の**位置値に基づくホロニック制御機構**の解明のため、短期集中で一気に次のステップへの移行を目指す。そのために複数の視点から解析を同時並行し進める。当初から想定していたポイントは次のようなものであった。

1. 高度に重複したRTFLファミリーについて、頂端 = 基部軸上の位置値決定の仕組みを探る。
2. *an3* における補償作用から、葉におけるホロニック制御の細胞間伝達因子を同定する。
3. 単面葉において、背腹性とは独立に葉の平面性をもたらす位置値決定因子を同定する。
4. #2047 と *an3* の二重変異体の解析から、胚に葉のアイデンティティを与えるメカニズムを解明する。

### 4. 研究成果

まず細胞分裂過程と細胞伸長過程とをつなぐ細胞間コミュニケーションに関しては、(1)細胞分裂を正に制御する転写共役因子のAN3タンパク質そのものが、細胞層間を移動し、AN3 mRNA を発現する内層と、それを発現しない**表皮組織との間の細胞分裂とホロニックに協調させている**ことを見いだした (Kawade et al. 2013 Curr. Biol: 図1)。

図1. AN3 タンパク質は葉の原基の内層でのみ翻訳され



るが、その後細胞層間を移動し、表皮を含めて葉の原基を構成する細胞層が協調的に分裂するように制御を欠ける (Kawade et al. 2013 Curr. Biol. の Graphical Abstract を一部改変)。

またこれに関連して、細胞分裂と細胞伸長を協調させるシステムの発露と考えられる補償作用について、*KRP2* 過剰発現による補償作用、*FUGU5* の機能欠損による補償作用、また *FUGU2 = FAS1* の機能欠損による補償作用のそれぞれの分子基盤を明らかにした (Ferjani et al. 2013; Ferjani et al. 2012; Hisanaga et al. 2013)。一方、細胞質要素、特に色素体の細胞当たりの数も、補償作用の影響を受けることを確認し、これが従来知られていた葉緑体の数の制御系とは異なる経路を用いていることを明らかにした (Kawade et al. 2013)。またこれらをもとに補償作用に関する総説を Darwin Review シリーズの1つとして公刊した (Hisanaga et al. 2015)。

(2)葉としての原基の位置値に関しては、ケシ科植物の複葉形成をモデルに、求頂的に発生の進む種類と求基的に発生の進む種類とを選び、それぞれ、どのような因子がこの長軸方向に沿った方向性を逆転させているのかの解析を進めた。その結果、従来の成長勾配説はあたらないこと、むしろ種ごとに異なった仕組みによってこの方向性が決まっていることが明らかとなった (Ikeuchi et al. 2013; 2014)。

また背腹性に関しては従来の知られてい

た要素の他に、リボソームなどいわゆる housekeeping 遺伝子の関与も大きいことに着目し、解析を進めると共に、現時点での理解を総説にまとめた(Horiguchi et al. 2012; Tsukaya et al. 2013)。

さらに本来は茎である側枝が葉のような形態を取るアスパラガス属について、その仮葉枝としての性質を与える遺伝メカニズムとして、背腹性の異所的な付与があることを報告した(Nakayama et al. 2012; 2013)。

(3)ペプチド性因子 RTFL については、シロイヌナズナで amiRNA の導入を進めると共に、陸上植物系統でのこのペプチドファミリーの多様性についてドメイン解析を進めた(図2)。

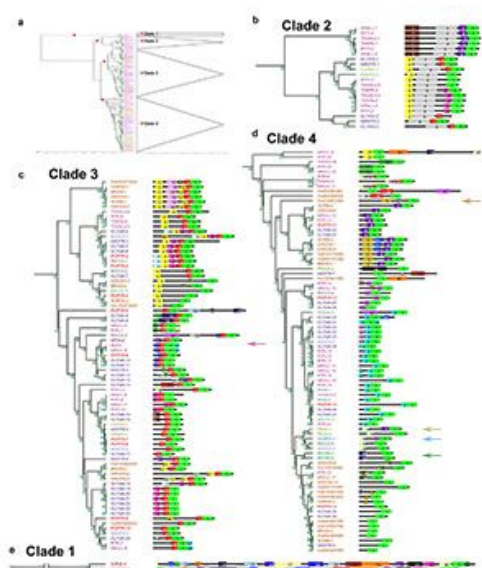


図2. 陸上植物の RTFL ファミリー構成員についてドメイン解析をした結果。被子植物では、著しいゲノム上の遺伝子重複と共にドメインの複雑化が生じており、被子植物の体制の複雑化と共に、RTFL ファミリーの間で機能の多様化が進んだことが伺えた。Guo et al. (2015) より一部改変。

またイネのホモログをシロイヌナズナで発現させたときの効果について、シロイヌナズナ ROT4 との違いを比較し、RTFL ファミリーの多様性について仮説を提唱した(Guo et al. 2015; 吉村と塚谷 2013)。

(4)さらにムラサキヘイシソウがつくる袋状の捕虫葉の形成メカニズムについて、従来は背腹性の位置情報が変更された結果として、そうした袋状の形態ができるという説があったが、背腹性のマーカーの in situ 解析より、これが誤りであることを見だし、それとは全く異なる形での、局所的な細胞増殖パターンの変更がその仕組みであることを明らかにした(Fukushima et al. 2015)。また

こうした位置情報の変化に基づく例をふくむ葉の形態形成メカニズムの多様性について、招待により総説を発表した(Tsukaya 2014)。

## 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 31 件)

- 1) Guo P, Yoshimura A, Ishikawa N, Yamaguchi T, Guo Y and Tsukaya H (2015) Comparative analysis of the RTFL peptide family on the control of plant organogenesis. *J. Plant Res.* **128**: 497-510. (査読あり)
- 2) Fukushima K, Fujita H, Yamaguchi T, Masayoshi K, Tsukaya H, and Hasebe M (2015) Oriented cell division shapes carnivorous pitcher leaves of *Sarracenia purpurea*. *Nature Commun.* **6**: 6450, doi:10.1038/ncomms7450. (査読あり)
- 3) Yorifuji E, Ishikawa N, Okada H, and Tsukaya H (2015) *Arundina graminifolia* var. *revoluta* (Arethuseae, Orchidaceae) has fern-type rheophyte characteristics in the leaves. *J. Plant Res.* **128**: 239-247. (査読あり)
- 4) Ferjani A, Hanai K, Gunji S, Maeda S, Sawa S, and Tsukaya H. (2015) Balanced cell proliferation and expansion is essential for flowering stem growth control. *Plant Sign. Behav.* **10**:3, e992755. (査読あり)
- 5) Hisanaga T, Kawade K, and Tsukaya H (2015) Compensation: a key to clarifying the organ-level regulation of lateral organ size in plants *J. Exp. Bot.* **66**: 1055-1063 (査読あり)
- 6) Ikeuchi M, Igarashi H, Okada K, and Tsukaya H. (2014) Acropetal leaflet initiation of *Eschscholzia californica* is achieved by constant spacing of leaflets and differential growth of leaf. *Planta* **240**: 125-135.
- 7) Maeda S, Gunji S, Hanai K, Hirano T, Kazama Y, Ohbayashi I, Abe T, Sawa S, Tsukaya H and Ferjani A (2014) The conflict between cell proliferation and expansion primarily affects stem organogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **55**: 1994-2007. (当該号 Cover)(査読あり)
- 8) Tsukaya H (2014) Comparative leaf development in angiosperms. *Curr. Opin. Plant Biol.* **17**: 103-109. (査読あり)
- 9) Ferjani A, Segami S, Horiguchi G, Muto Y, Maeshima M, and Tsukaya H (2014) Roles of the vacuolar H<sup>+</sup>-PPase in seed

- storage oil mobilization and plant development. *Plant Morphol.* **26**: 45-51. ( [査読あり](#) )
- 10) Ichihashi Y, Kawade K., and [Tsukaya H.](#) (2014). Leaf blade and leaf petiole of *Arabidopsis thaliana*. Pp. 194-195, In: Noguchi T, Kawano S, Tsukaya H, Matsunaga S, Sakai A, Karahara I and Hayashi Y (eds.) *Atlas of plant cell structure*, Springer, ISBN 978-4-54940-6, Tokyo, Japan. ( [査読あり](#) )
  - 11) Kawade K, [Horiguchi G](#), Usami T, Yokota M, and [Tsukaya H.](#) (2013) ANGUSTIFOLIA3 signaling coordinates proliferation between clonally distinct cells in leaves. *Curr. Biol.* **23**: 788-792. ( [査読あり](#) )
  - 12) Ikeuchi M, Tatematsu K, Yamaguchi T, Okada K, and [Tsukaya H.](#) (2013) Precocious progression of tissue maturation instructs basipetal initiation of leaflets in *Chelidonium majus* subsp. *asiaticum* (Papaveraceae). *Amer. J. Bot.* **100**: 1116-1126. ( [査読あり](#) )
  - 13) Hisanaga T, Ferjani A, [Horiguchi G](#), Ishikawa N, Fujikura U, Kubo M, Demura T, Fukuda H, Ishida T, Sugimoto K, and [Tsukaya H.](#) (2013) ATM-dependent DNA damage response acts as an upstream trigger for compensation in *fasciata1* during Arabidopsis leaf development. *Plant Physiol.* **162**: 831-841. ( [査読あり](#) )
  - 14) Ferjani A, Ishikawa K, Asaoka M, Ishida M, [Horiguchi G](#), Maeshima M, [Tsukaya H.](#) (2013) Enhanced cell expansion in a *KRP2* overexpressor is mediated by increased V-ATPase activity. *Plant Cell Physiol* **54**: 1989-1998. ( [査読あり](#) )
  - 15) Kawade K, [Horiguchi G](#), Ishikawa N, Hirai Yokota M, and [Tsukaya H](#) (2013) Promotion of chloroplast proliferation upon enhanced post-mitotic cell expansion in leaves. *BMC Plant Biol.* **13**: 143 (doi:10.1186/1471-2229-13-143). ( [査読あり](#) )
  - 16) Ferjani A, Ishikawa K, Asaoka M, Ishida M, [Horiguchi G](#), and [Tsukaya H.](#) (2013) Class III compensation, represented by *KRP2* overexpression, depends on V-ATPase activity in proliferative cells. *Plant Sig. Behav.* e27204, <http://dx.doi.org/10.4161/psb.27204> ( [査読あり](#) )
  - 17) [Tsukaya H.](#) (2013) Does ploidy level directly control cell size? Counterevidence from arabidopsis genetics. *PLOS ONE* **8**: e83729, doi: 10.1371/journal.pone.0083729 ( [査読あり](#) )
  - 18) [Tsukaya H](#), Byrne ME, [Horiguchi G](#), Sugiyama M, Van Lijsebettens M, Lenhard M. (2013) How do 'Housekeeping' genes control organogenesis? -- Unexpected new findings on the role of housekeeping genes in cell and organ differentiation. *J. Plant Res.* **126**:3-15. ( [査読あり](#) )
  - 19) 吉村麻美・塚谷裕一(2013) ROT4 とそのホモログ RTFL. *植物の生長調節* **48**: 60-66.
  - 20) [Tsukaya, H.](#) (2013) Leaf Development (2<sup>nd</sup> ed.) *The Arabidopsis Book* **11**: e0163, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi: [10.1199/tab.0072](https://doi.org/10.1199/tab.0072) ( [査読あり](#) )
  - 21) 中山北斗・山口貴大・塚谷裕一 (2013) アスパラガス属植物に見られる新奇葉状器官の獲得とその形態の多様化. *Plant Morph.* **25**: 89-94. ( [査読あり](#) )
  - 22) Nakayama H., Yamaguchi T, and [Tsukaya H.](#) (2013) Modification and co-option of leaf developmental programs for the acquisition of flat structures in monocots: Unifacial leaves in *Juncus* and cladodes in *Asparagus*. *Front. Plant Sci.* **4** : Article 248. doi. 10.3389/fpls.2013.00248 ( [査読あり](#) )
  - 23) Yamaguchi T, Ikeuchi M, and [Tsukaya H.](#) (2013) Chapter 11, ROTUNDIFOLIA4. In: "Handbook of Biologically Active Peptides (2nd edition)", Y. Matsuzaki (ed.). Elsevier, San Diego, USA. pp. 53-57. ( [査読あり](#) )
  - 24) Ferjani A, Ishikawa K, Asaoka M, Ishida M, [Horiguchi G](#), Maeshima M, and [Tsukaya H](#) (2013) Class III compensation, represented by *KRP2* overexpression, depends on V-ATPase activity in proliferative cells. *Plant Signal. Behav.* DOI: [10.1093/pcp/pct138](https://doi.org/10.1093/pcp/pct138) ( [査読あり](#) )
  - 25) Ferjani A, Segami S, [Horiguchi G](#), Sakata A, Maeshima M, [Tsukaya H.](#) (2012) Regulation of pyrophosphate levels by the H<sup>+</sup>-PPase is central for proper resumption of early plant development. *Plant Signal. Behav.* **7**: 38-42. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.7.1.18573> ( [査読あり](#) )
  - 26) Nakayama H, Yamaguchi T, [Tsukaya H](#) (2012) Acquisition and diversification of cladodes: leaf-like organs in the genus

- Asparagus*. *Plant Cell* **24**: 929-940. (査読あり)
- 27) Kanei M, Horiguchi G, Tsukaya H. (2012) Stable establishment of leaf identity during embryogenesis in *Arabidopsis* by *ANGUSTIFOLIA3* and *HANABA TARANU*. *Development* **139**: 2436-2446. (査読あり)
- 28) Nakayama H, Yamaguchi T, Tsukaya H. (2012) Cladodes, leaf-like organs in asparagus, show the significance of co-option of pre-existing genetic regulatory circuit for morphological diversity of plants. *Plant Signal. Behav.* **7**: 961-964. (査読あり)
- 29) Horiguchi G., Van Lijsebettens M, Candela H, Micol JL, and Tsukaya H (2012) Ribosomes and translation in plant developmental control. *Plant Sci.* **183**: 24-34 (査読あり)
- 30) Yamaguchi T, Nukazuka A, and Tsukaya, H. (2012) Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. *Plant Cell Physiol.* **53**: 1180-119 (査読あり)
- 31) 塚谷裕一 (2012) ようやく軌道に乗り始めた植物のエゴデボ. *遺伝* **67**: 18-19

〔学会発表〕

(平成26年度51件、平成25年度31件のうち招待講演10件分を以下に掲載)

- 1) 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (第47回日本発生生物学会) 5/27-30 (5/30) WINC AICHI  
Hirokazu Tsukaya "Logics of Leaf Development: How is the meristematic zone positioning determined?"
- 2) 25<sup>th</sup> International Congress on Arabidopsis Research (Canada: Univ. British Columbia, 7/28-8/1)  
Concurrent Session: Development II (Vegetative)  
Hirokazu Tsukaya "What factors determine the positioning of meristematic zones in leaves?"
- 3) 日本植物学会第78回大会 (2014年9月14日 公開講演会 新百合トウェンティワンホール  
塚谷 裕一 "私達の暮らしを支える植物の多様な遺伝資源 = 「ボルネオ島の多様な植物: フィールドでの探索の実際」"
- 4) シンポジウム 「植物の繁殖戦略を考える」 ~ 11名の研究者が提供する植物繁殖の最新の話 ~ 2014年11月4日 名古屋大学・野依学術交流会館1階

- 塚谷裕一 「自然界に見る種子植物のさまざまな繁殖様式」
- 5) 5<sup>th</sup> NIBB-MPIPZ-TLL Symposium Horizons in Plant Biology 11/24-26, 2014 Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne (11/24)  
Hirokazu Tsukaya "Compensation - an unknown integration system that oversees cell division and expansion in leaves"
- 6) Marchantia Workshop 2014 神戸大学 Centennial Hall 12/8-10, (12/8)  
Hirokazu Tsukaya "*Marchantia polymorpha*-a personal view from the outside"
- 7) Plant Organ Growth Symposium 2015 Ghent Univ. ベルギー 3/10-12, 2015 (3/10)  
Hirokazu Tsukaya "Compensation: a key to clarifying the organ-level regulation of lateral organ size in plants"
- 8) 東京大学理学部ホームカミングデー 2013/10/19(本郷キャンパス小柴ホール)  
塚谷裕一 「はっば博士のなるほど講演」
- 9) Temasek Life Sciences Laboratory Seminar, National University of Singapore (The Auditorium) (2/26)  
Hirokazu Tsukaya "A key player of leaf programs in *Arabidopsis*: ANGUSTIFOLIA3"
- 10) 7<sup>th</sup> APOCB Symposium (Biopolis, Singapore, 27 Feb.)  
Hirokazu Tsukaya "Control of mechanisms of meristematic activities in leaf primordia"

〔図書〕(計 7件)

- 1) 塚谷裕一、荒木崇 編著 (2015) 『改訂版 植物の科学』放送大学教育振興会 (289ページ)
- 2) Noguchi T., Kawano S., Tsukaya H., Matsunaga S., Sakai A., Karahara I. and Hayashi Y. (eds.) (2014) *Atlas of Plant Cell Structure*, ISBN: 978-4-431-54940-6, 202 pages; Tsukaya H. ed., Chapter "Meristems" pp. 187-202
- 3) 巖佐庸、斉藤成也、倉谷滋、塚谷裕一 (編) (2013) 『岩波生物学辞典』第5版、2171頁
- 4) 塚谷裕一 (2013) 「5.9 植物の発生、5.10 植物の体のつくりと働き、5.11 植物の体のつくりと植物ホルモン、5.12 植物の生殖」石川統、大森正之、嶋田正和 編 『生物学入門 第2版』東京化学同人、分担執筆

- 筆、pp.153-171.
- 5) 塚谷裕二(2013) 東京大学生命科学教科書編集委員会編『理系総合のための生命科学』第3版、羊土社、分担執筆.
  - 6) 進化学会編(2012)『進化学事典』共立出版、(齊藤成也、巖佐庸、遠藤一佳、大島泰郎、河田雅圭、倉谷滋、塚谷裕二、長谷川真理子、疋田努、深津武馬、三中信宏、矢原徹一編)975頁
  - 7) 塚谷裕二(2012)武田洋幸・田村宏治監訳『ウォルパート発生生物学』第7章「植物の発生」メディカル・サイエンス・インターナショナル、分担翻訳、pp.269-304.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/bionev2/jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

塚谷 裕一 (TSUKAYA, Hirokazu)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：90260512

### (2)研究分担者

堀口 吾朗 (HORIGUCHI, Goro)

立教大学・理学部・准教授

研究者番号：70342847