

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440133

研究課題名(和文) 茎頂分裂組織における細胞層間コミュニケーションの分子の実態解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of the inter-layer communications at the shoot apical meristem

研究代表者

阿部 光知 (Abe, Mitsutomo)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：20343238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：被子植物の茎頂分裂組織は、構造的には外衣 内体説に基づいた細胞層構造をもち、時空間的に機能が制御された細胞集団からなる細胞機能ドメインから構成されている。本研究課題では、細胞層間、細胞機能ドメイン間のコミュニケーションに注目し、その分子的理解を進めることによって、植物における茎頂分裂組織の役割についての理解を深化させることを目指した。なかでも、細胞層構造の確立・維持に必須な制御因子であるPDF2ならびにATML1の機能制御に注目した。脂質によるSTARTドメインを介した機能制御が、PDF2ならびにATML1遺伝子のL1層特異的な機能に重要であることを本研究課題では見出した。

研究成果の概要(英文)：The epidermis of shoot organs in plants develops from the outermost layer (L1) of the shoot apical meristem. In higher plants, a pair of homeobox genes, ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER1 (ATML1) and PROTODERMAL FACTOR2 (PDF2), play an essential role in regulating the expression of L1-specific genes. PDF2/ATML1 contain a START-domain, a putative lipid binding domain. In this research, we found that the outermost-cell-specific lipids are crucial for the epidermal cell differentiation by modulating the activity of key transcription factors.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：シロイヌナズナ 茎頂分裂組織 細胞層構造 ホメオボックス遺伝子

1. 研究開始当初の背景

被子植物の茎頂分裂組織は、最外層から L1 層、L2 層の二層の細胞層からなる外衣と、L3 と呼ばれる内体から構成されている。外衣の細胞は、垂層分裂のみを繰り返し、各細胞層のアイデンティティを維持している。また、茎頂分裂組織の細胞は独自のアイデンティティを獲得・維持する一方で、隣接する細胞との間で細胞間コミュニケーション・発生情報の伝達を行っている。例えば、茎頂分裂組織において側生器官を新生する際には、L1 層細胞でのオーキシン輸送方向の転換と、L2 層細胞での細胞分裂方向の変化が協調的に起こる。また、KNOTTED 1 や ANGUSTIFOLIA3 といった転写制御因子が細胞層間を移動すること (Xu et al., 2011; Kawade et al., 2013) もこれまでに報告されている。こうした細胞間コミュニケーションが成立するためには、茎頂分裂組織の厳密な層構造、機能ドメインの構築・維持が必要不可欠である。

申請者は、これまでに L1 層の構築・維持に関する先駆的な研究 (Abe et al., 1999, 2001, 2003) を行なってきた。シロイヌナズナの PROTODERMAL FACTOR2 (PDF2) と、そのパラログである ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER1 (ATML1) は、L1 層特異的に発現する CLASS IV HD-Zip 転写因子であり、両者は L1 層特異的遺伝子群の転写を制御する原表皮/表皮細胞分化のマスターレギュレーターである (Lu et al., 1996; Abe et al., 2003)。L1 層特異的な遺伝子発現制御においては、PDF2/ATML1 が結合する L1 box と呼ばれるシス配列が重要である (Abe et al., 2001)。L1 box は PDF2/ATML1 遺伝子のプロモーター上にも存在することから、PDF2/ATML1 が自らの遺伝子発現を調節するオートレギュレーションによって、L1 層特異的遺伝子群の発現が維持されている。しかしながら、一連の報告以降、細胞層のアイデンティティ確立・維持に関する大きな進展はみられていない。

また、栄養成長相から生殖成長相への転換に伴って茎頂部で生じる各種発生現象の空間的な理解についても依然として未解明な状況にある。

2. 研究の目的

被子植物の茎頂分裂組織は、構造的には外衣-内体説に基づいた細胞層構造をもち、時空間的に機能制御された細胞集団 (機能ドメイン) から構成されている。本研究課題では、茎頂分裂組織における細胞間、細胞機能ドメイン間のコミュニケーションに注目し、コミュニケーションの分子の実体の一端を明らかにすることによって、植物発生プロセスの理解をより深化させることを目指した。

3. 研究の方法

PDF2/ATML1 タンパク質は、特徴的な Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer (START) ドメインを有する。START ドメインは、生体脂質と結合するタンパク質機能ドメインであり、動物においては脂質の輸送や代謝に関わり脂質との結合を介して様々な脂質由来シグナルの伝達に関わっている (Ponting and Aravind, 1999)。本研究では、PDF2/ATML1 タンパク質がもつ START ドメインに注目した。PDF2/ATML1 が、ユニークな脂質との結合を介して L1 層細胞と L1 層以外の細胞において異なる機能制御を受ける可能性を分子遺伝学的手法によって明らかにすることを目指した。特に、ユニークな脂質種として、極長鎖脂肪酸 (VLCFA) を含むスフィンゴ脂質が原表皮/表皮細胞分化において重要なはたらきをもつ可能性があることから、PDF2/ATML1 の L1 層細胞特異的な発現制御が確立・維持される過程へのこれら脂質種の関与を詳細に検証した。

一方、栄養成長相から生殖成長相への転換に伴い、茎頂分裂組織においては細胞分裂の活性化、極性をもった細胞の伸長、花芽の形成等が協調して起こることが知られている。こうした一連の発生現象は、葉から茎頂への花成ホルモン・フロリゲン (FT タンパク質) の輸送が端緒となって開始される。FT の茎頂における受容によって始まる一連の発生現象を空間的に理解するためには、発生現象がおこる領域 (細胞機能ドメイン) を細胞レベルで可視化するイメージング手法の開発が必要である。そこで、本研究課題では、タンパク質同士の結合を *in vivo* で解析する実験手法の一つである Bi-molecular Fluorescent Complementation 法 (BiFC 法: 蛍光タンパク質再構成法) を黄色蛍光タンパク質の結晶構造解析の知見を基に改良した。それにより、茎頂部でフロリゲンが複合体を形成する細胞を *in vivo* で可視化し、茎頂分裂組織内における細胞機能ドメインの理解にむけての第一歩とした。

4. 研究成果

L1 層特異的遺伝子発現制御のマスターレギュレーターである PDF2/ATML1 と脂質との関連に注目して研究を進めた。野生型 ATML1 に GFP タンパク質を融合したタンパク質を L1 層以外の細胞も含む植物体全体で誘導したところ、GFP 蛍光は L1 層に限定されて観察された。このことは、ATML1 タンパク質が細胞層特異的な転写後調節を受けていることを端的に示している。この、転写

後調節の仕組みに細胞層特異的な脂質種が関与しているかを検討するため、PDF2/ATML1 が有する START ドメインに、構造情報を元に一アミノ酸変異を導入した変異型 ATML1 遺伝子を作成した。野生型同様に、GFP と変異型 ATML1 の融合タンパク質を全身的に誘導したところ、変異型 ATML1-GFP タンパク質は、L1 層でも発現しなくなった。一連の結果は、START ドメインを介してユニークな脂質種が ATML1 へと結合することが、L1 層特異的な転写後調節において極めて重要であることを示唆している。

次に、変異型 ATML1 タンパク質が L1 層においても不安定化する原因を理解するために、酵母ツーハイブリッド法によって変異型 ATML1 の二量体形成能を評価した。その結果、ATML1 タンパク質は、PDF2 および ATML1 と酵母細胞内で二量体を形成することができないことが明らかになった。

さらに、脂質と ATML1 との関連性を理解するため脂質生合成阻害剤に伴う ATML1 動態を観察したところ、阻害剤処理によって ATML1 および PDF2 遺伝子の転写レベルが低下することが判明した。

以上の結果を総合的に考え合わせると、PDF2/ATML1 タンパク質への START ドメインを介した脂質種の結合は、PDF2/ATML1 の二量体化に必須であり、二量体化によって安定化した PDF2/ATML1 がオートレギュレーションを介して PDF2/ATML1 自らの転写を活性化していることが強く示唆される。PDF2/ATML1 へと結合する候補脂質種は L1 層特異的であると予想されることから、L1 層以外の細胞においては上記の制御機構が不安定化し、オートレギュレーションが停止することによって表皮細胞としてのアイデンティティーが喪失すると考えられる。

また、茎頂内の機能ドメイン可視化に向けて取り組む改良型 BiFC 法は、FT-FD 複合体の可視化をモデルとして検討した。その結果、葉、もしくは維管束篩部で発現させた FT が茎頂へと輸送され、FD と複合体を形成することを *in vivo* で確認することに成功した。シロイヌナズナでの観察によると、FT-FD 複合体は L3 細胞（内体）において形成され、古典的な花芽分化誘導の観察事例から予想されるフロリゲン機能領域と一致することが示された。

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 6 件）

1. Negishi K, Endo M, Abe M, Araki T. (2018) *SODIUM POTASSIUM ROOT*

DEFECTIVE1 regulates *FLOWERING LOCUS T* expression via microRNA156-*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3* pathway in response to potassium conditions. *Plant & Cell Physiology*; 59: 404-413, DOI: 10.1093/pcp/pcx199. (査読あり)

2. Lin TF, Saiga S, Abe M, Laux T. (2016) OBE3 and WUS interaction in shoot meristem stem cell regulation. *PLOS ONE*; 11: e0155657, DOI: 10.1371/journal.pone.0155657.eCollection 2016. (査読あり)
3. Abe M, Kaya H, Watanabe-Taneda A, Shibuta M, Yamaguchi A, Sakamoto T, Kurata T, Ausin I, Araki T, Alonso-Blanco C. (2015) FE, a phloem-specific Myb-related protein, promotes flowering through transcriptional activation of *FLOWERING LOCUS T* and *FLOWERING LOCUS T INTERACTING PROTEIN 1*. *Plant Journal*; 83: 1059-1068, DOI: 10.1111/tpj.12951. (査読あり)
4. Ogawa E, Yamada Y, Sezaki N, Kosaka S, Kondo H, Kamata N, Abe M, Komeda Y, Takahashi T. (2015) ATML1 and PDF2 Play a Redundant and Essential Role in Arabidopsis Embryo Development. *Plant & Cell Physiology*; 56: 1183-1192, DOI: 10.1093/pcp/pcv045. (査読あり)
5. Kaya H, Iwano M, Takeda S, Kanaoka MM, Kimura S, Abe M, Kuchitsu K. (2015) Apoplastic ROS production upon pollination by RbohH and RbohJ in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*; 10: e989050, DOI: 10.4161/15592324.2014.989050. (査読あり)
6. Kaya H, Nakajima R, Iwano M, Kanaoka MM, Kimura S, Takeda S, Kawarazaki T, Sezaki E, Hamamura Y, Higashiyama T, Takayama S, Abe M, Kuchitsu K. (2014) Ca²⁺-activated reactive oxygen species production by Arabidopsis RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell*; 26: 1069-80, DOI: 10.1105/tpc.113.120642.

〔学会発表〕（計 17 件）

1. 永田賢司、高橋卓、阿部光知 “シロイヌナズナにおける特異的脂質による位置情報伝達機構の解析” 第 59 回日本植物生理学会年会(2018 年 3 月 28-30 日)札幌コンベンションセンター

2. 小阪真悟、阿部光知 “FLOWERING LOCUS T の細胞間移行に必要なアミノ酸残基の同定” 第 59 回日本植物生理学会年会 (2018 年 3 月 28-30 日) 札幌コンベンションセンター
3. 永田賢司、高橋卓、阿部光知 “シロイヌナズナ表皮細胞分化における鍵因子の脂質を介した機能制御機構の解明” 第 30 回植物脂質シンポジウム (2017 年 9 月 9-10 日) お茶の水女子大学
4. 阿部光知、小阪真悟、澁田未央、永田賢司、賀屋秀隆 “成長相転換時における茎頂でのフロリゲン複合体の動態” 日本植物学会第 81 回大会 (2017 年 9 月 8-10 日) 東京理科大学野田キャンパス
5. 永田賢司、高橋卓、阿部光知 “シロイヌナズナ表皮細胞分化における鍵因子の脂質を介した機能制御機構の解明” 第 58 回日本植物生理学会年会 (2017 年 3 月 16-18 日) 鹿児島大学郡元キャンパス
6. 阿部光知、小阪真悟、澁田未央、永田賢司、賀屋秀隆 “成長相転換時におけるフロリゲン複合体の動態” 第 58 回日本植物生理学会年会 (2017 年 3 月 16-18 日) 鹿児島大学郡元キャンパス
7. 永田賢司、高橋卓、阿部光知 “シロイヌナズナ表皮細胞分化における鍵因子の脂質を介した機能制御機構の解明” 第 29 回植物脂質シンポジウム (2016 年 11 月 25-26 日) 大阪大学会館
8. 永田賢司、高橋卓、阿部光知 “シロイヌナズナ表皮細胞分化における鍵因子の脂質を介した機能制御機構の解明” 日本植物学会第 80 回大会 (2016 年 9 月 16-18 日) 沖縄コンベンションセンター
9. 澁田未央、渡辺綾子、阿部光知 “CO-dependent transcriptional activation of FT by FE protein” 第 57 回日本植物生理学会年会 (2016 年 3 月 18-20 日) 岩手大学上田キャンパス
10. 阿部光知 “シロイヌナズナにおけるフロリゲン機能の制御機構の理解に向けて” 国立遺伝学研究所研究会「植物の生殖成長期の発生を制御する分子機構」(2015 年 11 月 6-7 日) 国立遺伝学研究所、招待講演
11. 澁田未央、渡辺綾子、阿部光知 “花メリステムのアイデンティティの維持に関わる制御機構の解析” 日本植物学会第 79 回大会 (2015 年 9 月 6-8 日)、朱鷺メ

ッセ：新潟コンベンションセンター

12. Shibuta M, Watanabe A, Abe M “A Myb-related transcription factor plays an important role for the FT transcription” International Conference on Arabidopsis Research, Palais des Congres, Paris, France (July 5-9, 2015)
13. 澁田未央、渡辺綾子、米田好文、阿部光知 “FT 遺伝子の転写活性化における新奇花成因子 FE の機能解析” 第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大学・世田谷キャンパス (2015 年 3 月 16-18 日)
14. 川崎正子、木村幸恵、田中啓介、坂田洋一、朽津和幸、阿部光知、土生芳樹、賀屋秀隆 “シロイヌナズナ fasciata 突然変異体の変異原処理から得られた aerial rosette leaf を形成する 138-2 突然変異体とその原因遺伝子の単離” 第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大学・世田谷キャンパス (2015 年 3 月 16-18 日)
15. Shibuta M, Kaya H, Abe M “The Analysis of a Novel Transcriptional Factor which Regulates the Timing of Flowering.” 東京大学ライフイノベーション・リーディング大学院 GPLLI Colloquium、ラフォーレ修善寺 (2014 年 10 月 18 日)
16. 澁田未央、米田好文、阿部光知 “花成ホルモン「フロリゲン」の制御における新奇花成制御因子 FE の役割” 日本植物学会第 78 回大会、明治大学・生田キャンパス (2014 年 9 月 12-14 日)
17. 澁田未央、米田好文、阿部光知 “花成ホルモン「フロリゲン」と新奇転写制御因子 FE” 第 14 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学本郷キャンパス (2014 年 4 月 26 日)

〔図書〕 (計 1 件)

1. 著者：平野博之、阿部光知
「花の分子発生遺伝学～遺伝子のはたらきによる花の形づくり～」(2018) 裳華房、214 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~iden/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 光知 (ABE MITSUTOMO)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：20343238

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし