

令和元年6月5日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26440142

研究課題名(和文)表皮分化を制御するマスター転写因子の解析

研究課題名(英文)Dissection of mechanisms regulating the outermost-cell specific gene expression

研究代表者

高田 忍 (Takada, Shinobu)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：40456992

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)：陸上植物の葉や茎は「表皮」と呼ばれる一層の細胞層に覆われている。表皮は植物を乾燥や病原菌の感染から守る重要な役割を持つが、表皮が最も外側の細胞に作られるしくみはよく分かっていない。我々は、表皮細胞を作るはたらきを持つATML1タンパク質が、一番外側に位置する細胞の核で強く蓄積することを発見した。内側の細胞でATML1タンパク質を作らせても核への局在は弱かった。また、ATML1の蓄積や核局在を抑制するのに必要なATML1内部のアミノ酸配列を見つけた。さらに、ATML1の働きを促進、抑制する作用を持つ遺伝子候補を見つけることにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生中の植物細胞はフレキシブルに細胞運命を変化させる。それぞれの細胞がその最終的な位置に応じてどの細胞タイプへと分化するかを決めるのが、植物の発生の特徴である。しかし、植物細胞がどうやって自分の位置を認識しているのかはあまり理解されていない。本研究は、細胞の置かれた位置に応じてATML1タンパク質の核への蓄積が変化することを示したものであり、植物細胞が位置を認識して分化するメカニズムの一端が解明できた。また、ATML1の活性を調節する原理が明らかになったことから、乾燥に強い多層表皮を持つ植物の作出も可能かもしれない。さらに、陸上植物が表皮を獲得した進化の過程の理解につながることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：The leaves and stems of land plants are covered with a single layer of epidermis. The epidermis plays an important role in protecting plants from drought and pathogen infection. However, molecular mechanisms promoting epidermal cell differentiation only in the outermost cells is not well understood. We found that the ATML1 protein, a master regulator of epidermal cell fate, accumulated only in the outermost cells. In addition, nuclear accumulation of ATML1 was reduced in the inner cells compared with outermost cells in transgenic plants constitutively expressing ATML1, suggesting that post-transcriptional repressions are required for the outermost-cell specific activity of ATML1. Furthermore, we have identified several amino acid sequences that are required to reduce nuclear accumulation of ATML1 in the inner cells. We have also found candidate genes that promote or suppress the activity of ATML1.

研究分野：植物発生生物学

キーワード：表皮分化 マスター転写因子 シロイヌナズナ 転写後調節

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発生中の植物細胞はフレキシブルに細胞運命を変化させる。それぞれの細胞がその最終的な位置に応じてどの細胞タイプへと分化するかを決めるのが、植物の発生の特徴である。しかし、植物細胞がどうやって自分の位置を認識しているのかはあまり理解されていなかった。植物の地上部の表皮は最外層のみに作られるため、位置依存的な細胞分化・遺伝子発現調節を理解するための良いモデルである。表皮は植物体の最外層に存在するバリアであり、植物を乾燥や病原菌の感染から守る重要な役割を持つ。しかし、最外層特異的に表皮運命を誘導する分子機構は分かっていない。転写因子をコードするシロイヌナズナの *ATML1* 遺伝子は胚発生の初期から最外層の細胞で強く転写される (Lu et al, 1996; Takada et al, 2007)。我々の発現誘導実験により、*ATML1* は表皮関連遺伝子の転写を促進し、葉肉細胞や根に、気孔の孔辺細胞や毛状突起など、地上部の表皮の性質を持つ細胞を作る能力を持つことが分かった (Takada et al, 2013)。これらの結果は、*ATML1* が地上部の表皮形成のマスター転写因子として働くという仮説を支持する。従って、*ATML1* の活性を最外層の細胞に限定する分子メカニズムを明らかにすれば、最外層特異的な表皮形成を理解できるはずである。

ATML1 のプロモーターには自身の結合配列 (L1 box) が存在し、正のフィードバックによる転写制御が予想される。正のフィードバックは誤った発現を過剰に増幅する可能性があり、*ATML1* の活性を抑制するしくみも必要だと考えられる。我々の予備的な実験から、*ATML1* は胚の内側の細胞では、表皮と比べて弱い核局在を示すことが分かった。このことは、核局在の抑制などの転写後制御が *ATML1* の過剰な蓄積や誤発現を防ぎ、最外層特異的な *ATML1* の活性や表皮分化を助けている可能性を示唆する。

2. 研究の目的

本研究は、*ATML1* の活性が転写・転写後調節により最外層の細胞に限定されるメカニズムと、その意義を明らかにすることを目的とする。*ATML1* タンパク質は機能未知のものを含む複数のドメインから構成されている (Mukherjee and Bürglin, 2006)。具体的な目標は、まず (1) *ATML1* のコード領域の中で、*ATML1* の細胞内局在や、下流遺伝子の転写に必要な領域を同定し、最外層特異的な遺伝子発現や表皮分化における役割を調べることである。また、*ATML1* の活性を正または負に調節するメカニズムを明らかにするために、(2) *ATML1* の活性に影響を与える新しい遺伝子座を同定する。さらに、(3) *ATML1* の下流遺伝子候補の一つ、*DOWNSTREAM TARGET OF ATML1 20* (*DTL20*) の解析もおこなう。*ATML1* の過剰発現体では、*DTL20* の mRNA 量が増加することが分かっているが、*ATML1* を介した表皮運命決定における *DTL20* 遺伝子の役割は不明である。*DTL20* 遺伝子が *ATML1* の上流で働くという報告もあることから、「*DTL20* がフィードフォワード制御によって *ATML1* の活性を促進する」という仮説を立て、それを検証する。

3. 研究の方法

本研究では、植物の表皮分化を制御する転写調節機構を理解するために、(1) 各ドメインを欠失した *ATML1* タンパク質の局在解析をすることで、位置依存的な核移行制御や、タンパク質の蓄積量の制御など、*ATML1* の転写後調節に必要な配列を明らかにする。そして、活性を改変した *ATML1* 遺伝子を変異体に導入することで、*ATML1* の転写後調節が下流遺伝子の発現や表皮分化に与える影響を調べる。また、(2) *ATML1* の過剰発現体のエンハンサー/サプレッサー変異体のスクリーニングをおこない、*ATML1* の活性に正または負の影響を与える遺伝子を明らかにする。さらに、(3) *ATML1* の下流遺伝子 *DTL20* について、プロモーター解析やクロマチン免疫沈降実験をおこない、*ATML1* が直接 *DTL20* プロモーターに作用するかを確かめる。そして、過剰発現体や突然変異体を用いたエピスタシス解析、多重変異体の表現型の解析をおこない、表皮運命決定における *DTL20* の役割を理解する。

4. 研究成果

(1) *ATML1* タンパク質の転写後調節に関わるドメインの同定

まず、高感度のレポーター遺伝子を用いて、野生型のシロイヌナズナ胚で、*ATML1* mRNA の転写活性と *ATML1* タンパク質の局在を可視化した (図 1)。*ATML1* の転写活性は胚の最外層で強いが、内側の細胞でも弱く検出された。それに対し、*ATML1* タンパク質は胚の一番外側の細胞でのみ検出された。*ATML1* タンパク質は、核と細胞質の両方に存在しており、表皮細胞が並層分裂をすると内側の娘細胞では *ATML1* タンパク質の核局在が低下することが分かった。また、誘導系を用いて GFP-*ATML1* タンパク質を胚全体で作らせたところ、胚の内側の細胞では最外層の細胞と比べて核局在が弱いことが分か

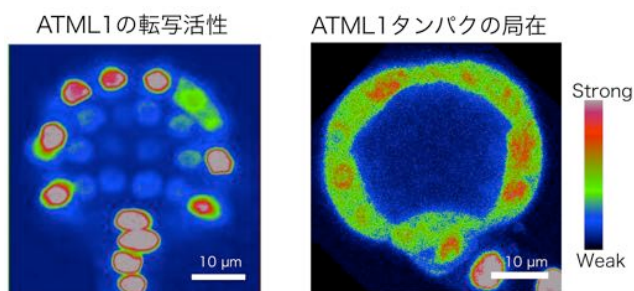


図 1 *ATML1* の転写活性 (左) と *ATML1* タンパク質の局在 (右)

ATML1 は内側の細胞でも弱く転写されるが、*ATML1* タンパク質は最外層の細胞でのみ検出される。

った。これらの結果は、ATML1 タンパク質の蓄積や核局在が内側の細胞で抑制されることで、ATML1 の活性が最外層の細胞に限定されている可能性を示唆する。次に、ATML1 の転写後調節における ATML1 の各ドメインの役割を調べるために、各領域を欠失した *GFP-ATML1* 遺伝子を胚全体で発現する形質転換植物を作製した。また、変異タンパク質の機能を確認するために、ATML1 の転写制御領域下で変異タンパク質を作らせるコンストラクトを、野生型や *atml1;pdf2/+* 変異体に導入した。観察の結果、ZLZ コード領域を欠失することで、ATML1 タンパク質の蓄積量が増加することが分かった (図 2)。また、ZLZ コード領域や START コード領域の欠失により、ATML1 の核局在が促進されることも分かった。ZLZ ドメインを欠失すると、球状胚の内側の核でも ATML1 タンパク質が蓄積した (図 2)。

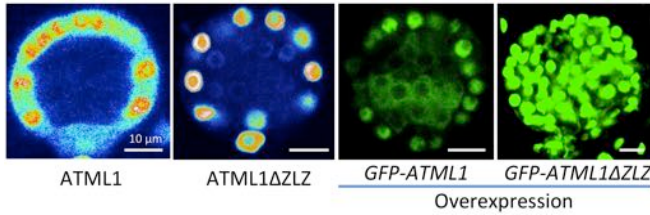


図 2 ZLZ コード領域は内層における ATML1 タンパク質の蓄積や核局在を抑制している

ZLZ を欠失した ATML1ΔZLZ は核局在が強くなり、胚の内側の細胞でも弱く蓄積する。また、胚全体で作らせると内側の細胞でも核局在が見られる。

ATML1 の転写制御領域下で GFP レポーターを発現させると、心臓型胚の内層でも弱い GFP シグナルが検出されるが、野生型 ZLZ コード領域を GFP と融合することで、内層における GFP タンパク質の蓄積を抑制することができた。従って、ZLZ コード領域は ATML1 タンパク質の蓄積を抑制し、ZLZ ドメインや START ドメインは ATML1 の核局在を抑制していることが示唆された。ZLZ コード領域の欠失は ATML1 の核局在を強く亢進するが、ATML1 の表皮誘導能も失わせたため、強い核局在が ATML1 の正のフィードバック制御や ATML1 の発現パターン決定・表皮分化に与える効果は分からなかった。そこで、核移行シグナルを付加した ATML1 を ATML1 の転写制御領域下で発現させたところ、ATML1 の核への蓄積を増加させることができた。しかし、内側の細胞における ATML1 の誤発現や多層表皮の形成は観察できなかった。このことは、外側の細胞における ATML1 の転写促進と、内層における ATML1 の核移行の抑制、ATML1 タンパク質の蓄積の抑制などの多階層の制御が組合わさることで、最外層特異的な ATML1 の活性が決まっていることが示唆された (図 3)。この成果の一部は論文として公表した (Iida et al, 2019)。

質の蓄積を抑制し、ZLZ ドメインや START ドメインは ATML1 の核局在を抑制していることが示唆された。ZLZ コード領域の欠失は ATML1 の核局在を強く亢進するが、ATML1 の表皮誘導能も失わせたため、強い核局在が ATML1 の正のフィードバック制御や ATML1 の発現パターン決定・表皮分化に与える効果は分からなかった。そこで、核移行シグナルを付加した ATML1 を ATML1 の転写制御領域下で発現させたところ、ATML1 の核への蓄積を増加させることができた。しかし、内側の細胞における ATML1 の誤発現や多層表皮の形成は観察できなかった。このことは、外側の細胞における ATML1 の転写促進と、内層における ATML1 の核移行の抑制、ATML1 タンパク質の蓄積の抑制などの多階層の制御が組合わさることで、最外層特異的な ATML1 の活性が決まっていることが示唆された (図 3)。この成果の一部は論文として公表した (Iida et al, 2019)。

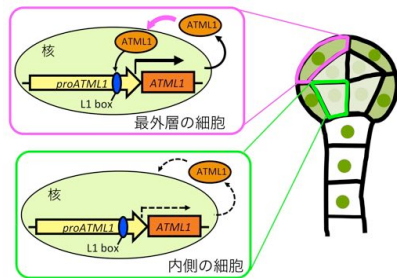


図 3 ATML1 の最外層特異的な活性を決めるしくみ ATML1 の転写や、ATML1 タンパク質の核局在・蓄積が内側の細胞で抑制されることで正のフィードバックが抑制され、ATML1 の活性が一番外側の細胞に限定される。

(2) ATML1 過剰発現体のエンハンサー/サプレッサー変異体のスクリーニング

ATML1 の転写後調節に関わる遺伝子、下流遺伝子を同定するために、ATML1 過剰発現体のエンハンサー/サプレッサー変異体のスクリーニングをおこなった。GFP-ATML1 融合遺伝子をエストロジオール誘導性のプロモーター下で発現する系統の種子を 0.4%EMS で 8 時間変異原処理した。表皮が異常な個体は芽生えで致死になる可能性があり、変異体として同定されても系統の維持が難しいため、各 M1 植物から個別に種子を回収した。回収した M2 種子を 0.15 μM と 10 μM のエストロジオール培地上で発芽させ、変異体のスクリーニングをおこなった。低濃度の 0.15 μM でも強い過剰発現表現型を示す個体をエンハンサー変異体 (図 4)、高濃度の 10 μM でも弱い過剰発現表現型を示す個体をサプレッサー変異体候補とした。現在までに独立な約 500 系統についてスクリーニングをおこない、13 の候補が得られた。

ATML1 の過剰発現表現型を亢進・抑圧する変異体候補 13 系統について、塩基配列の解析をおこない、GFP-ATML1 遺伝子に変異を持たないことを確認した。さらに、強い表現型を示す変異体については、戻し交配とラフマッピングを進めた。一つの系統について、SSLP マーカーを用いた詳細なマッピングを進めたところ、700 kb の範囲まで候補領域を絞ることができた。また、この変異体の形態観察をおこない、25% の芽生えで子葉のパターン形成に異常が生じることを明らかにした。種子を作ることは可能だが、稔性が極めて低いことも分かった。本葉の切片を作製して組織学的な観察をしたところ、葉の細胞の形態や組織の配置に異常が観察された。次世代シーケンズ解析の結果、この系統では、これまでのところ表皮における機能が未知な遺伝子に変異が生じていることが明らかになった。

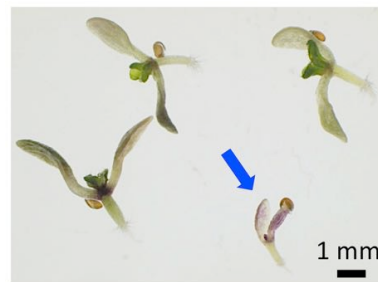


図 4 ATML1 過剰発現体の表現型を促進するエンハンサー変異体

(3) ATML1 の下流遺伝子候補 *DTL20* の解析

DTL20 は *ATML1* と同様に初期胚から表皮で発現する。しかし、*ATML1* と *DTL20* の遺伝学的な上下関係は分かっていた。そこで、*ATML1* の過剰発現体と *atml1;pdf2* 変異体（補足：*PDF2* は *ATML1* と最も相同性の高い遺伝子であり、*atml1;pdf2* では表皮形成や胚発生が異常となる）で、*DTL20* の詳細な発現解析をおこなった。胚珠培養で *ATML1* の発現を胚全体で誘導すると、胚の内側の細胞層でも *DTL20* のプロモーターが異所的に活性化されることが分かった。一方、*atml1;pdf2*/+植物が作る胚の中には、*DTL20* のプロモーター活性が低下しているものが観察された。クロマチン免疫沈降実験の結果、*ATML1* は *DTL20* プロモーターの L1 box を含む領域に局在することが分かった。この L1 box 配列は *DTL20* の胚表皮における発現に必要であった。これらの結果は、*ATML1* と *PDF2* が初期胚で *DTL20* の発現を促進することを示唆する。一方、*dtl20* 変異体で *ATML1* mRNA や GFP-*ATML1* タンパク質の挙動・効果を調べたところ、野生型と比べて *ATML1* mRNA の蓄積量や、*ATML1* タンパク質の局在、*ATML1* 過剰発現による表皮分化誘導能に大きな違いは見られなかった。多重変異体株を作製したところ、*ATML1* やそのホモログの活性が低い条件下では、*DTL20* の機能が芽生えの正常な発生に必須であることが分かり、*DTL20* が *ATML1* やそのホモログの働き・効果を亢進する可能性が考えられた。この成果は論文として投稿中である (Takada et al, 再投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ①Hiroyuki Iida, Ayaka Yoshida, and Shinobu Takada*
ATML1 activity is restricted to the outermost cells of the embryo through post-transcriptional repressions.
Development 146: dev169300 (2019). 査読有り
*Author for correspondence. doi: 10.1242/dev.169300

[学会発表] (計 17 件)

- ①飯田 浩行、吉田 彩香、Gerd Jürgens、高田 忍
表皮分化のマスター遺伝子 *ATML1* の活性を最外層に限定する制御機構。
第 60 回日本植物生理学会年会 (名古屋大学 東山キャンパス) 2019 年 3 月 15 日
- ②飯田 浩行、吉田 彩香、高田 希、伊藤 みはる、Gerd Jürgens、高田 忍
一層の表皮が作られるしくみ: マスター転写因子 *ATML1* の上流・下流因子の解明
第 60 回日本植物生理学会年会 (名古屋大学 東山キャンパス) 2019 年 3 月 13 日
- ③Hiroyuki Iida, Ayaka Yoshida, Shinobu Takada
ATML1 activity is restricted to the outermost cells to enable a single epidermal layer formation.
29th International Conference on Arabidopsis Research (LOGMO, Turku, Finland). 26-27 June 2018
- ④飯田 浩行、吉田 彩香、Gerd Jürgens、高田 忍
ATML1 の活性制御による一層の表皮形成。
第 59 回日本植物生理学会年会 (札幌コンベンションセンター) 2018 年 3 月 29 日
- ⑤飯田 浩行、吉田 彩香、高田 希、高田 忍
一層の表皮が作られるしくみ: マスター転写因子 *ATML1* の上流・下流因子の解明。
第 59 回日本植物生理学会年会 (札幌コンベンションセンター) 2018 年 3 月 28 日
- ⑥高田 忍、吉田 彩香、飯田 浩行、高田 希
受容体型キナーゼ ACR4 は *ATML1* 下流で胚の生長や表皮分化を正に制御している。
日本植物学会第 81 回大会 (東京理科大学 野田キャンパス) 2017 年 9 月 8 日
- ⑦飯田 浩行、吉田 彩香、Gerd Jürgens、高田 忍
表皮分化のマスター遺伝子 *ATML1* の活性制御について。
日本植物学会第 81 回大会 (東京理科大学 野田キャンパス) 2017 年 9 月 8 日
- ⑧飯田 浩行、吉田 彩香、Gerd Jürgens、高田 忍
表皮分化のマスター転写因子の活性を最外層に限定するしくみ。
第 58 回日本植物生理学会年会 (鹿児島大学 郡元キャンパス) 2017 年 3 月 16 日
- ⑨飯田 浩行、高田希、吉田 彩香、Gerd Jürgens、高田 忍

表皮分化のマスター遺伝子 *ATML1* の最外層特異的な活性を決める多階層制御.
第 58 回日本植物生理学会年会 (鹿児島大学 郡元キャンパス) 2017 年 3 月 16 日

⑩高田 忍、高田 希、吉田 彩香、飯田 浩行
表皮分化のマスター転写因子 *ATML1* の活性を制御する分子機構の解析.
第 57 回日本植物生理学会年会 (岩手大学 上田キャンパス) 2016 年 3 月 18 日

⑪飯田 浩行、吉田 彩香、高田 希、高田 忍
表皮分化のマスター転写因子 *ATML1* の活性を決める多階層制御.
第 57 回日本植物生理学会年会 (岩手大学 上田キャンパス) 2016 年 3 月 20 日

⑫飯田 浩行、吉田 彩香、高田 忍
表皮分化を制御する *ATML1* 遺伝子の転写および転写後制御.
日本植物学会第 79 回大会 (朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター) 2015 年 9 月 8 日

⑬飯田 浩行、吉田 彩香、高田 忍
Transcriptional and post-transcriptional regulation of a master transcription factor for epidermal cell identity.
International ERATO Higashiyama Live Holonics Symposium 2015 (名古屋大学野依記念学術交流館) 2015 年 8 月 27 日

⑭高田 希、吉田 彩香、高田 忍
ACR4 functions downstream of *ATML1* to promote embryonic development.
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 17 日

⑮飯田 浩行、吉田 彩香、高田 忍
Transcriptional and post-transcriptional regulation of *ATML1*, a key regulator for epidermal cell identity.
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 17 日

⑯高田 希、吉田 彩香、高田 忍
ATML1 activates expression of *ACR4* during the initiation of epidermal cell fate.
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 18 日

⑰飯田 浩行、吉田 彩香、高田 忍
表皮分化のマスター遺伝子である *ATML1* の位置依存的な発現および転写活性の制御について.
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 13 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~shinobu_takada/index.html

プレスリリース

「植物が体の表面にだけ表皮をつくるしくみを発見！」
大阪大学, 2019 年 4 月 18 日

6. 研究組織

(1) 研究分担者
無し

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 飯田 浩行

ローマ字氏名: (IIDA, Hiroyuki)

研究協力者氏名: 吉田 彩香

ローマ字氏名: (YOSHIDA, Ayaka)

研究協力者氏名: 高田 希

ローマ字氏名：(TAKADA, Nozomi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。