

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25113004

研究課題名(和文) 維管束幹細胞形成ロジックの多元的研究

研究課題名(英文) Studies on vascular stem cell development in plants

研究代表者

伊藤 恭子(大橋恭子)(Ohashi-Ito, Kyoko)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：90451830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 79,900,000円

研究成果の概要(和文)：維管束幹細胞形成の分子機構を明らかにするために、鍵となる転写因子複合体 LHW-T5L1 の機能解明を中心に研究を進めた。LHW-T5L1 はサイトカイニンの合成とシグナル伝達を制御することで細胞非自律的に維管束幹細胞の分裂の活性化を促すことを明らかにした。また、LHW-T5L1 には、サーモスペルミンやオーキシンの作用を介した、フィードバック制御機構があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To understand molecular mechanisms underlying vascular stem cell development, we analyzed functions of a key transcriptional complex consisting of LHW and T5L1. We revealed that LHW-T5L1 non-cell autonomously regulates vascular stem cell proliferation through the regulation of cytokinin action. We also showed that LHW-T5L1 regulates factors, which form feedback loops to control the LHW-T5L1 activity.

研究分野：植物発生

キーワード：植物 発生

1. 研究開始当初の背景

植物には主に、茎頂分裂組織 (SAM)、根端分裂組織 (RAM)、維管束の前形成層・形成層に幹細胞群が存在する。幹細胞の形成・維持に関する研究は広く行われており、特に、SAM と RAM においてはその形成・維持の鍵となる因子や制御メカニズムの一端が明らかにされている。しかしながら、幹細胞の形成過程の詳細な分子メカニズムや細胞特性を十分に理解することができていない。それは、これまでこれらの研究を主に推進してきた個体レベルでの遺伝学的手法が主要な鍵因子の単離には適していたものの、形成過程の解析には不向きであったためだと考えられる。また、個体における幹細胞の数は非常に限られているため、研究に供することのできる材料が十分確保できないことも、細胞特性を調べることを困難にする原因であったと考えられる。そこで、本研究では、幹細胞の中でも維管束の幹細胞をモデルとして、維管束幹細胞を人為的に誘導することのできる培養細胞を用いてこれらの問題点を克服し幹細胞の研究を進めようと考えた。

LONESOME HIGHWAY (LHW) は維管束の初期形成を制御する鍵因子である。LHW は胚発生初期の維管束始原細胞形成時から機能し、維管束始原細胞の形成に必須である。維管束始原細胞は、分裂を繰り返す維管束幹細胞でもある。また、LHW 機能により、個体の根において細胞分裂活性が保たれることも示されている。そこで、本研究では LHW を用いて人為的に維管束形成を誘導することで、維管束幹細胞が形成される過程を詳細に解析できるのではないかと考えた。併せて、LHW 作用後の細胞を用いて、幹細胞の細胞特性についても解析可能であると考えた。

2. 研究の目的

幹細胞は植物の発生・形態形成の要となる細胞であるが、幹細胞の形成メカニズムや幹細胞の持つ分子的特徴など植物幹細胞を分子レベルで理解することは十分にはできていない。そこで、本研究ではシロイヌナズナの根における維管束幹細胞をモデルとし、多元的な解析を行うことで、植物幹細胞形成のロジックを解明することを目的とする。維管束幹細胞形成の鍵となる LHW ファミリーの遺伝子と TARGET OF MONOPTEROS5 (TM05) ファミリーの遺伝子からなる転写因子複合体 (LHW-TM05) の機能を中心に解析し、維管束幹細胞形成のメカニズムおよびその細胞状態を分子レベルで明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

維管束幹細胞が形成されていく過程および幹細胞性をもたらす要因を分子レベルで明らかにする。

転写制御ネットワークおよび genome-wide

な転写産物の変動、植物ホルモン動態とその制御、代謝産物変動と幹細胞特異的物質の同定、幹細胞的細胞分裂の仕組み、他の植物種における普遍性、の観点から解析していく。

この 5 つの次元の研究を統合することで、幹細胞としての identity がもたらされるメカニズム、および、その細胞状態の変化を分子レベルで明らかにし、維管束幹細胞形成ロジックの全体像を理解する。

4. 研究成果

LHW は T5L1 とヘテロダイマーを形成し転写因子として機能するため、LHW および T5L1 をエストロジェン存在下で同時に誘導可能な培養細胞株を作成した。この培養細胞にエストロジェンを添加した後の遺伝子発現変動を経時的にマイクロアレイにより解析した。12、24、48、72 時間後の遺伝子の発現変動を調べた結果、3 倍以上発現上昇する遺伝子が、それぞれ、27 遺伝子、225 遺伝子、321 遺伝子、676 遺伝子あった。これらの中には、植物ホルモンの合成や輸送に関連した遺伝子や転写因子などが複数含まれていた。LHW-T5L1 によって、大規模な遺伝子発現プロファイルの変更がなされることが明らかになった。

上述のマイクロアレイデータに基づき、LHW-T5L1 により制御される下流遺伝子を選抜した。まず、その中でも特に、サイトカニンの制御に関連する遺伝子の詳細な解析を進めた。マイクロアレイデータから、サイトカニン合成の最終ステップを触媒する酵素である LOG3、LOG4、サイトカニンのシグナル伝達に関わる AHP6 が LHW-T5L1 の下流候補遺伝子としてあがった。詳細な解析を進めた結果、LHW-T5L1 は、根端分裂組織の道管前駆細胞において、LOG3、LOG4、および、AHP6 の発現を直接正に制御することが明らかとなった。さらに、根端分裂組織の道管前駆細胞において、LOG3 および LOG4 の機能により活性型サイトカニンが作られ、このサイトカニンに周囲の細胞が応答し、維管束幹細胞の分裂活性化が起こることを明らかにした。また、道管前駆細胞では、LHW-T5L1 により発現誘導される AHP6 が、サイトカニンのシグナルを負に制御するため、サイトカニンに応答せず細胞分裂が起きないこともわかった。以上の解析から、維管束幹細胞形成の際には、LHW-T5L1 は道管前駆細胞にシグナルセンターとしての役割を与え、ここで合成したサイトカニンをシグナルとして用いて周囲の維管束幹細胞の分裂を活性化する分子機構を制御していることが示唆された。

次に、LHW-T5L1 の制御するその他の遺伝子として、サーモスペルミン合成酵素をコードする ACAULIS5 (ACL5) と、bHLH タンパク質をコードする SACL3 に着目した。LHW-T5L1 は ACL5 と SACL3 の発現を共に正に制御することがわかった。また、ACL5 によって合成される

サーモスペルミンおよび SACL3 が、LHW-T5L1 の機能抑制に働くことがわかった。これにより LHW-T5L1 を起点としたネガティブフィードバック制御の存在が明らかになった。

さらに、オーキシン関連遺伝子の解析を行った。その結果、LHW-T5L1 は、根端分裂組織の維管束領域においてオーキシンに関連する遺伝子の発現を制御していることが明らかになった。また、これらの機能欠損変異体では、維管束の形成に異常が生じることもわかった。

LHW-T5L1 は道管前駆細胞の運命決定にも寄与すると考えられたため、そのメカニズムの解明にも取り組んだ。

LHW および TM05/T5L1 機能の普遍性および起源の検証をするために、陸上植物の基部に位置するゼニゴケを用いて、LHW オースログ (MpLHW) と TM05 オースログ (MpTM05) の解析を進めた。MpLHW、MpTM05 遺伝子のプロモーター：レポーター形質転換体を作製し発現解析を行い、これら遺伝子の葉状体における発現パターンを明らかにした。

LHW-T5L1 過剰発現培養細胞を用いたワイドターゲットメタボローム解析により、LHW-T5L1 発現細胞特異的な代謝物を探索した。用いた培養細胞のトランスクリプトームデータと併せ、代謝物の維管束形成への関与を検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 46 件)

Ohashi-Ito, K., Iwamoto, K., Fukuda, H. (2018) Expression of VND7, a master regulator of tracheary elements. *Plant Cell Physiol.* 59, 989-996. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy036> (査読有)

Kariya, Y., Asanuma, Y., Inai, M., Asakawa, T., Ohashi-Ito, K., Fukuda, H., Egi, M., Kan, T. (2016) Practical synthesis of spermine, thermospermine and norspermine. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 64, 1403-1407. <https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00355> (査読有)

Katayama, H., Iwamoto, K., Kariya, Y., Asakawa, T., Kan, T., Fukuda, H., Ohashi-Ito, K. (2015) A Negative Feedback Loop Controlling bHLH Complexes Is Involved in Vascular Cell Division and Differentiation in the Root Apical Meristem. *Curr. Biol.* 25: 3144-3150. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.051> (査読有)

Ohashi-Ito, K., Fukuda, H. (2016) Functional mechanism of bHLH complexes

during early vascular development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 42-27. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.003> (査読有)

伊藤(大橋)恭子 (2015) 維管束初期形成における道管前駆細胞の役割 *化学と生物* 53: 578-579. <https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.53.578> (査読有)

Ohashi-Ito, K., Fukuda, H. (2014) Xylem. *Curr. Biol.* 24: R1149. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.010> (査読無)

Ohashi-Ito, K., Fukuda, H. (2014) Initiation of vascular development. *Physiol. Plant.* 151: 142-146. <https://doi.org/10.1111/ppl.12111> (査読有)

Ohashi-Ito, K., Saegusa, M., Iwamoto, K., Oda, Y., Katayama, H., Kojima, M., Sakakibara, H., Fukuda, H. (2014) A bHLH complex activates vascular cell division via cytokinin action in root apical meristem. *Curr. Biol.* 24: 2053-2058. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.050> (査読有)

〔学会発表〕(計 15 件)

伊藤(大橋)恭子、岩本訓知、福田裕穂「根端分裂組織における道管分化の制御」第 58 回日本植物生理学会年会、札幌、2018 年 3 月

館野ひなた、福田裕穂、伊藤(大橋)恭子「維管束形成因子による根端分裂組織の制御」日本植物学会第 81 回大会、野田、2017 年 9 月

伊藤(大橋)恭子、福田裕穂「LBD15/ASL11 による道管分化マスター因子の制御」日本植物学会第 81 回大会、野田、2017 年 9 月

伊藤(大橋)恭子、福田裕穂「維管束初期形成因子 LHW-TM05 の新規下流因子の解析」第 58 回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017 年 3 月

Kyoko Ohashi-Ito, Hiroo Fukuda “Functional mechanism of bHLH complexes during early vascular development” Latest Advances in Plant Development & Environmental Response, AWAJI, JAPAN, 2016 Nov. 29-Dec. 26

伊藤(大橋)恭子、福田裕穂「bHLH 転写因子複合体の機能からみる維管束初期形成の分子機構」日本植物学会第 80 回大会、沖縄、

2016年9月

Kyoko Ohashi-Ito, Hirofumi Katayama, Kuninori Iwamoto, Yuka Kariya, Tomohiro Asakawa, Toshiyuki Kan, Hiroo Fukuda
“A negative feedback loop controlling LONESOME HIGHWAY-T5L1 is involved in vascular cell division and differentiation.” 第57回日本植物生理学会年会、岩手、2016年3月

片山博文、假屋唯香、浅川倫宏、菅敏幸、福田裕穂、伊藤(大橋)恭子 「LONESOME HIGHWAY 転写因子を起点とした維管束分化の解析」第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学、2015年3月

伊藤(大橋)恭子、三枝毬亜、福田裕穂
「根端分裂組織における維管束細胞の分裂活性化機構」第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学、2015年3月

片山博文、假屋唯香、浅川倫宏、菅敏幸、福田裕穂、伊藤(大橋)恭子 「bHLH型転写因子 LONESOME HIGHWAY の機能解析による維管束初期形成機構の解明」日本植物学会第78回大会、明治大学、2014年9月

三枝毬亜、福田裕穂、伊藤(大橋)恭子
「維管束初期形成におけるサイトカイニンの役割」日本植物学会第78回大会、明治大学、2014年9月

伊藤(大橋)恭子、三枝毬亜、福田裕穂
「根の維管束幹細胞の分裂活性獲得を司る分子機構」日本植物学会第78回大会、明治大学、2014年9月

伊藤(大橋)恭子、片山博文、福田裕穂 「維管束幹細胞形成の分子機構」第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年3月

片山博文、福田裕穂、伊藤(大橋)恭子
「LONESOME HIGHWAY を介する維管束分化初期過程の解析」第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年3月

片山博文、福田裕穂、伊藤(大橋)恭子
「LONESOME HIGHWAY を介する維管束分化初期過程の解析」日本植物学会第77回大会、北海道、2013年9月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 恭子 (大橋 恭子) (Ohashi-Ito, Kyoko)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：90451830

(3) 連携研究者

福田 裕穂 (Fukuda, Hiroo)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：10165293

近藤 侑貴 (Kondo, Yuki)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：70733575