

平成22年 5月 7日現在

研究種目： 学術創成研究費
 研究期間： 2007 ~ 2011
 課題番号： 19GS0315
 研究課題名(和文) 植物体内における細胞集団の分化状態を規定するシグナル分子の機能探索
 研究課題名(英文) Analysis of intercellular signaling molecules working in organ development and differentiation in plants
 研究代表者
 岡田 清孝 (OKADA KIYOTAKA)
 基礎生物学研究所・所長
 研究者番号：50101093

研究代表者の専門分野： 分子遺伝学

科研費の分科・細目： 基礎生物学・植物生理・分子

キーワード： 植物器官発生、シロイヌナズナ、細胞間シグナル、ペプチドホルモン、分裂組織

1. 研究計画の概要 多細胞からなる植物の器官の構築と発生過程についての研究は、シロイヌナズナをモデル系とする分子遺伝学とイメージング技術をはじめとする分子細胞学の解析によって急速に進展したが、細胞分裂と細胞分化の空間的制御に関わる「細胞間シグナル」の分子の実体とその機構の解析は未解決であった。

本研究は、分裂組織において器官が形成される際に働く「細胞間シグナル」を明らかにすることを目的としている。その候補として、短いペプチド、microRNA、オーキシン、その他の低分子物質、が考えられ、新たな研究手法を開発して、これらの分子が細胞間シグナルとしての機能を持つか、否かを調べる。(1)細胞間隙から調製したペプチドや新規な翻訳後修飾ペプチドについて生物機能、生成過程、分泌・輸送と受容の機構、などについて解析する。(2)分裂組織で働く microRNA を同定し、その働きを解析する。(3)新規突然変異体の解析から、オーキシン輸送複合体の形成の機構を解析し、新たな細胞間シグナル分子を同定して機能を調べる。(4)ペプチドを加えた培地中でシロイヌナズナを発芽させ、器官発生と形態の変化を観察するバイオアッセイ系を開発する。(5)微光束紫外光レーザーによる細胞破壊実験系や近赤外光レーザーによる遺伝子発現誘導系を開発して、細胞間シグナル分子の挙動と機能を調べる。

2. 研究の進捗状況 (1)葉の表側と裏側の領域を正しく決定するために、細胞間シグナルが重要であると考えられている。葉の表側と裏側の領域が正しく決まらない突然変異体を解析から、葉の表裏の領域決定に必要な新規因子としてコハク酸セミアルデヒド(SSA)またはその代謝産物を同定した。シロイヌナズナの芽生えから一方の子葉を除去し、茎頂分裂組織を剥き出

して側面に SSA を与えると、表裏の方向が異常になった葉が生じる。SSA あるいはその代謝産物が、1950年代の茎頂分裂組織と葉原基を外科的に分断する実験によって指摘されているが、実態が不明であったシグナル分子である可能性が高い。

(2) CLV3 ペプチドは分裂組織の表皮細胞から細胞間隙に分泌され、分裂組織の中心部の細胞に働くことによって分裂組織の構造とサイズを一定に保つ役割を持った重要な細胞間シグナル分子である。合成ペプチドを用いた新たな解析手法により、少なくとも3種の CLV3 受容体が関与する複雑な受容機構を明らかにした。また、前駆体タンパク質から活性を持つペプチドを切り出すペプチダーゼを同定するための新たな手法を開発し、ペプチダーゼを多数同定して機能を解析している。

(3) 分泌型ペプチドの中でも翻訳後修飾ペプチドは、生合成するために余分なエネルギーコストを伴うことから、進化的に保存されてきた翻訳後修飾ペプチドには、生物にとってそのコストを上回るメリットがあると期待される。チロシン硫酸化ペプチドの選択的濃縮・検出系を確立して、シロイヌナズナ細胞培養液について網羅的な解析を行ない、植物体において全身的な細胞増殖と細胞肥大に関与する新規な硫酸化ペプチド PSY1 を同定し、チロシン硫酸化酵素 (TPST) の精製とクローニングにも成功した。さらに、根端の分裂組織の維持と成長に関与する新規な硫酸化ペプチドホルモンを同定して、解析を続けている。研究の過程でペプチドの微量解析系を確立し、この系を利用して、CLV3 の成熟型構造が、アラビノース糖鎖の付加したグリコペプチドであることを見出し、受容体で

ある CLV1 に直接結合することを証明した。

(4) 植物ホルモンであるオーキシンは植物体内を定まった方向に輸送され、細胞はオーキシンの濃度に応答して増殖と組織化をおこなう。オーキシンは、分裂組織の維持、葉原基の形成、維管束組織の形成などの多様な役割を持つシグナル分子であり、それぞれの過程においては、オーキシンの極性輸送の方向と輸送量の制御が重要と考えられている。維管束前駆細胞の協調的な細胞分化に関わる *NO VEIN (NOV)* 突然変異体を単離して解析し、オーキシンの分布を制御する新たな分子複合体が存在することを示唆する結果を得た。

(5) シグナル分子を生成分泌する細胞・組織、移行経路、受容細胞・組織を解析するための新規な装置として、微光束紫外光レーザー顕微鏡による細胞破壊実験系を新たに開発し、茎頂分裂組織の一細胞 (径 10 μ m) のみを照射して破壊することを可能にした。また、赤外線レーザー顕微鏡を用いて、植物体の任意の細胞で遺伝子の発現を誘導する実験系を開発した。これらの新たな実験装置と実験系は、植物のみならず動物にも適用可能であり、共同研究用機器として多くの研究者の利用に供する予定である。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由) これまでの 3 年間の研究は、当初の研究目的に向かって順調に進展している。(1) 長年の謎であった茎頂分裂組織における細胞間シグナル分子の候補を同定した。(2) CLV シグナル伝達系の下流因子として多数の候補遺伝子が得られた。(3) オーキシンを極性輸送する PIN の発現と極性的局在の制御に関わる NOV 遺伝子の同定に成功した。(4) 新しいペプチドホルモンの探索を新奇のアプローチ手法により少なくとも 3 種類の新しい短鎖翻訳後修飾ペプチドホルモンを同定することに成功した。同定したシグナル物質の中には「分化状態を規定するシグナル分子」そのものと考えられるモルフォゲン様分子も含まれる。また、各グループでは、新たな技術開発にも成功しており、残りの研究期間内に、当初の予定以上の成果が期待される。その一方で、網羅的なペプチドと microRNA の解析はまだ十分な展開となっておらず、人員を補強して研究期間内の進展を目指し、論文の作成と発表に努力を傾注する。

4. 今後の研究の推進方策 研究期間が終了するまでの間に研究目的を達成するために、主に以下の解析をおこなって成果を発表する。(1) コハク酸セミアルデヒド (SSA) あるいはその代謝産物が、側生器官の表と裏の発生に関わる新規シグナル分子であるか否かの確認作業とともに、シロイヌナズナの花序塊の細胞間隙から抽出したペプチド分子の機能解析を急ぐ。(2) 次世代シーケンサーを用いた突然変異体の原因遺伝子の単離法を確立し、ペプチドホルモン下流のシグナル伝達因子の候補突然変

異体の原因遺伝子を単離して研究結果をまとめる。(3) チロシン硫酸化酵素 (TPST) の遺伝子破壊株 (*tpst-1*) の表現型解析を進め、硫酸化ペプチドの植物成長における役割の全体像を解明する。(4) オーキシンの分布を制御する上位機構に関わる遺伝子の生化学的機能を明らかにする。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 8 件)

(1) *COE1*, an LRR-RLK responsible for commissural vein pattern formation in rice. Sakaguchi, J., Itoh, J., Ito, Y., Nakamura, A., Fukuda, H. and Sawa, S. *Plant J.* 査読有り, In Press (2010).

(2) NO VEIN Mediates Auxin-Dependent Specification and Patterning in the *Arabidopsis* Embryo, Shoot, and Root. Tsugeki, R., Ditengou, D.A., Sumi, Y., Teale, W., Palme, K. and Okada, K. *Plant Cell* 査読有り, 21: 3133-3151 (2009).

(3) Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*. Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J. and Okada, K. *Development* 査読あり, 136: 1039-1048 (2009)

(4) Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis*. Komori, R., Amano, Y., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y. *Proc Natl Acad Sci USA* 査読あり, 106: 15067-15072 (2009).

(5) A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y. *Nature Chem Biol*, 査読あり, 5: 578-580 (2009).

(6) VAJ/GFA1/CLO is involved in the directional control of floral organ growth. Yagi, N., Takeda, S., Matsumoto, N. and Okada, K. *Plant Cell Physiol.* 査読あり, 50: 515-527 (2009).

(7) Evolution of CLE signaling. Miwa, H., Tamaki, T., Fukuda, H. and Sawa, S. *Plant Signaling & Behavior* 査読あり, 4: 477-481 (2009).

(8) Plant meristems: CLV3/ESR-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. Miwa, H., Kinoshita, A., Fukuda, H. and Sawa S. *J. Plant Res.* 査読あり, 122: 31-39 (2009).

(その他 論文 27 件・学会発表 78 件・特許 1 件)

[その他] ホームページ

<http://www.nibb.ac.jp/sections/okada-k.html>

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

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~bioact/matsu/index.html>

http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/5_iden.html