

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22570038

研究課題名（和文）

植物細胞の分化状態維持に関わる遺伝子機能の解析

研究課題名（英文）

Molecular analysis of plant genes involved in the maintenance of cell fate

研究代表者

上口 智治 (UEGUCHI CHIHARU)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：20232738

研究成果の概要（和文）：細胞の分化状態を維持する機構は、植物の正常な生育に必須である。本研究では、植物の幹細胞の未分化性を維持するのに必要な新規遺伝子を同定し、幹細胞の維持には DNA 障害レベルの低減が重要であることが示唆された。また、既知遺伝子の新たな機能として、分化しつつある細胞がその状態を維持する機能があることを見出した。これらの結果は、植物細胞の分化あるいは未分化状態を維持する新規なメカニズムを示唆する。

研究成果の概要（英文）：It is essential for plant growth and development to maintain the undifferentiated state of stem cells and the cell fate of differentiating cells. We identified a novel gene required for maintenance of undifferentiated state of stem cells through the reduction of DNA damage. We also found that the known gene has a novel function for proper progression of cell differentiation process. These results, thus, suggested novel mechanisms for the maintenance of plant cell fate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物ホルモン・成長生理・全能性

1. 研究開始当初の背景

細胞の分化運命を決定し、維持する機構は、植物の正常な器官形成を可能にする重要な基盤である。細胞の分化状態は細胞とその周囲の環境との相互作用によって決まると考えられ、細胞間コミュニケーションに関わるシグナル伝達機構と遺伝子発現の転写制御が重要な役割を果たしている。近年、分裂組織特異的に機能する制御機構に加えて、一般的な細胞機能に関わる遺伝子が細胞の分化状態の決定や維持に重要な役割を果たして

いることが明らかになりつつある。これら一般的な細胞機能の重要性には多大な関心が寄せられ、植物器官発生研究の最重要課題の一つともなっているが、具体的な分子機構や前述した分裂組織特異的な制御機構との関連はまだよくわかっていない。さらに植物細胞には分化した成熟細胞が容易に未分化細胞へ転換できるという動物には見られない可塑性があるが、こうした「植物特異的」な分子機構についても未解明である。

申請者はシロイヌナズナから、*meristem*

disorganization 1 (mdo1) および *bouquet (boq)* と名付けた 2 種類の変異体を分離した。両者は細胞の分化運命決定と維持に関して逆の表現型を示す。*mdo1* においては、茎頂分裂組織 (SAM) の幹細胞が維持できず、茎の帯化等の様々な生長異常を示す。一方 *boq* 変異体では分化運命決定を受けた細胞がその運命を維持できず未分化細胞に戻った結果、茎頂領域や本葉葉柄基部に多数の SAM を形成し、花茎数の顕著な増加や帯化を引き起こす。

MDO1 遺伝子は既知の機能ドメインを含まない、比較的小さなタンパク質をコードしており、植物特異的な細胞機能に関与することが強く示唆される。一方 *BOQ* 遺伝子は WD40 リピートタンパク質をコードし、以前に *VERNALIZATION INDEPENDENCE3 (VIP3)* として報告されていた。*VIP3* はエピジェネティック制御に関与することが示唆されており、*BOQ* 遺伝子のさらなる研究から、植物における細胞分化運命決定維持に関する重要な知見が得られるものと期待できる。

2. 研究の目的

細胞の分化運命を決定し維持する機構は、植物の正常な器官形成を可能にする重要な基盤であると同時に、植物特異的な細胞運命の可塑性に関連する分子機構である。申請者はこの機構に深く関わりとされる二種のシロイヌナズナ変異体を分離した。*mdo1* 変異では分裂組織の細胞が未分化状態を維持できず、逆に *boq* 変異体では分化運命の決定あるいは維持に欠陥を生じていると考えられる。本研究では、ユニークな表現型を示すこれらの変異体を用いて、細胞の未分化状態の維持と分化運命の決定や維持に関する新規な分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

mdo1 変異体の解析においては、まず SAM や RAM の構造変化を組織学的ならびに分裂組織特異的遺伝子の発現のレベルで解析し、変異表現型の特徴付けを行う。次いで表現型から示唆される分裂組織部位における細胞分裂活性の変化を明らかにし、その原因となる細胞周期関連遺伝子の発現変化や DNA 障害応答の有無を検証する。さらに *MDO1* の分子機能を明らかにする目的で相互作用因子の同定と遺伝学的解析を予定する。また SAM における葉序・葉間期の異常に関するオーキシン極性輸送系の関与について検討する。

boq-1 変異体の解析では、予想される細胞

の分化運命の決定あるいは維持にどのような機構で関与しているのかを明らかにすることが重要である。野生型背景において変異 *BOQ* タンパク質を過剰発現させることで *boq* 表現型を誘導することができるはずで、このことを実証する。また変異タンパク質と直接相互作用する因子の同定と解析を行う。

4. 研究成果

mdo1 変異体の解析

(1) 走査電子顕微鏡観察・プラスチック切片観察・未分化マーカー遺伝子および分化決定マーカー遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析の結果、*mdo1* 変異体では未分化細胞が分化誘導を受けて、SAM の規則的な構造が崩壊していることを示した (図 1)。

(2) 静止中心マーカー遺伝子の発現解析・コルメラ分化マーカーであるデンブンの蓄積・静止中心と内皮マーカー遺伝子の発現解析を行うことによって、RAM において静止中心の機能が低下あるいは消失することで、各種始原細胞の維持ができなくなっていることを示した (図 2)。

図 1 野生型 (左) と *mdo1* (右) の SAM の縦断切片

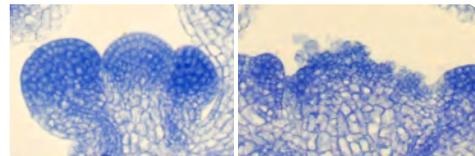
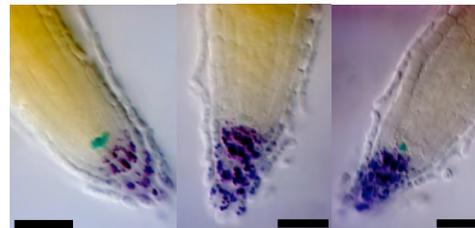


図 2 野生型 (左) と *mdo1* の根端。ブルーに染色されている細胞は静止中心。紫色はデンブリン粒。



(3) 根端において PI (Propidium Iodide) 染色を行ったところ、分化度の低い領域において細胞全体が染色されていることを見出した (図 3)。死細胞検出試薬である Sytox Orange でも染色されたため、*mdo1* では未分化細胞が優先的に死滅していると結論した。

(4) 放射線等による DNA 障害が与えられた際、植物においても動物同様に、未分化な幹細胞がプログラム細胞死を起したり分化誘導を受けることが最近示された。*mdo1* の表現型が DNA 障害応答の結果惹起されたものである可能性を検討した。DNA 障害により誘導される遺伝子の発現解析 (図 4)・DNA 二重鎖切断イベントの検出・DNA 障害試薬に対する感受性を解析することで、確かに *mdo1* では DNA 二重鎖切断レベルの上昇・DNA 障

害応答遺伝子発現の上昇・DNA 障害試薬に対する感受性の昂進が生じていることを確認できた。

図3 野生型(左)と *mdo1* (右)におけるPI染色像(上側)と Sytox Orange 染色像(下側)

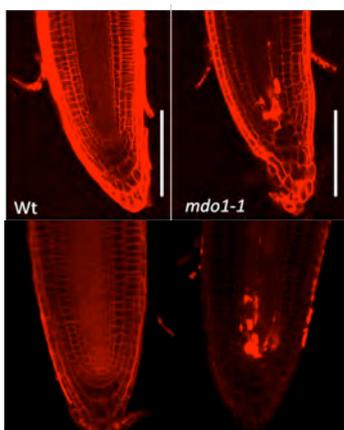
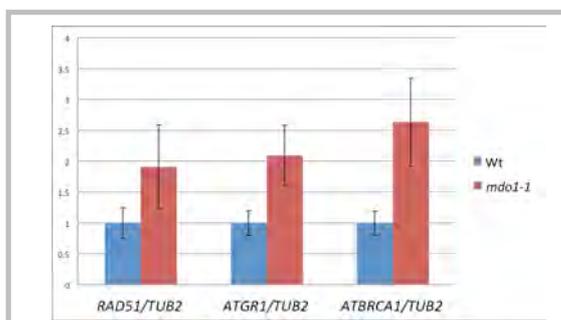


図4 DNA 障害応答性遺伝子発現の上昇



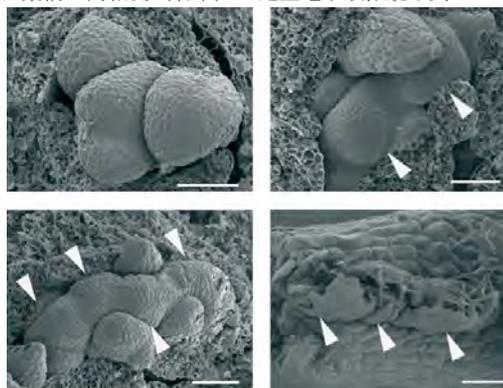
(5) DNA 障害応答反応のマスターレギュレーターである ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED (ATM) キナーゼの変異と *mdo1* との二重変異体を構築することで、*mdo1* 変異体の表現型が強められることを見出した。これは *MDO1* が *ATM* と共通する経路で働いていることを示唆する。

(6) 以上の結果から、*mdo1* 変異体においては、DNA 二重鎖切断の頻度が上昇しており、ATM/ATR 両キナーゼの活性化が常時起こっており、(おそらくはその制御下で) 未分化な幹細胞のプログラム細胞死や分化誘導が生じると共に、減少した幹細胞の数を補うべく未分化細胞の再供給が無秩序に起こることで分裂組織の規則的な構造が崩壊した結果、様々な生長異常が発生するというモデルを提唱した。

boq 変異体の解析

(1) 走査電子顕微鏡観察・切片観察により、*boq* では本来の SAM の周囲や葉柄の向軸側に extra な SAM が多数発生することが判明した(図5)。これらは発芽後に新規に発生するものであり、生長と共にその数が上昇する。

図5 野生型(左上)と *boq* (その他)の茎頂領域あるいは葉柄の向軸側(右下)の走査電子顕微鏡写真



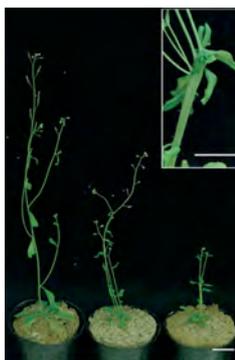
(2) SAMにおける未分化細胞マーカーである *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* 遺伝子の発現をレポーター遺伝子を用いて調べたところ、*boq* においては野生がたよりもその発現領域が広がっており、本来発現していない葉柄の基部でも発現していることが判明した。

(3) *STM* 遺伝子は胚性SAMの形成に必須である。*boq stm* の二重変異体を構築したところ、胚性SAMのみならず extra SAM の形成も起きなかった。この結果は *boq* における extra SAM の形成には *STM* 遺伝子の機能が必要であるというを示す。

(4) *stm* 変異体ではある頻度で不定葉の発生が認められる。*boq* 変異はこの表現型を昂進させる。また *stm* でまれに形成される花は花芽分裂組織の幹細胞が早期に消費されるため、中心領域の花器官が形成されないが、*boq* 変異によってそれらが形成されるようになる。この結果は、*boq* によって irregular な未分化細胞の形成活性が促進されたことを示唆する。

(5) 野生型植物において変異型 *boq* アリルを過剰に発現させることで、*boq* 様の表現型を起こさせることができた(図6)。表現型の強さは *boq* アリルの発現量に依存しており、変異タンパク質が細胞の分化状態に影響を与えたと考えられる。

図6 野生型(左)と、野生型背景において変異型 *boq* アリルを過剰発現させた植物体(中央と右)。挿入写真は著しく帯化した茎。



(6) 以上の結果から、*boq*変異体においては、幹細胞から生み出され、分化決定を受けた娘細胞が未分化状態を取り戻す傾向が強く、分化状態を維持しにくいのではないかと解釈できる。従って野生型*BOQ*遺伝子の役割は、器官形成時に細胞の分化運命決定を維持し、未分化状態へと“先祖返り”させないことにあるのではないかとこの考えを提唱した。

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 2件)

1. Hashimura, Y. and Ueguchi, C. The *Arabidopsis MERISTEM DISORGANIZATION 1* gene is required for the maintenance of stem cells through the reduction of DNA damage. *Plant J.* 査読有(2011) **68**, 657-669. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04718.x
2. Takagi, N. and Ueguchi, C. Enhancement of meristem formation by *bouquet-1*, a mis-sense allele of the *VERNALIZATION INDEPENDENCE 3* gene encoding a WD40 repeat protein in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Cells* 査読有(2012) **17**, 982-993. doi: 10.1111/gtc.12014

[学会発表] (計 6件)

1. 橋村侑磨、上口智治「シロイヌナズナ *MERISTEM DISORGANIZATION 1* (*MDO1*)遺伝子は頂端分裂組織における未分化細胞の維持に必要である」第33回日本分子生物学会年会 2010年12月(神戸)
2. 橋村侑磨、上口智治「シロイヌナズナ *MERISTEM DISORGANIZATION 1* (*MDO1*)遺伝子は頂端分裂組織における未分化細胞の維持に必要である」第52回日本植物生理学会年会 2011年3月(仙台)
3. 中上朋美、上口智治「*MERISTEM DISORGANIZATION 1* (*MDO1*)遺伝子は胚発生能力を持つ配偶子の形成に

必要である」52回日本植物生理学会年会 2011年3月(仙台)

4. 橋村侑磨、上口智治「シロイヌナズナ *MERISTEM DISORGANIZATION 1* (*MDO1*)遺伝子は頂端分裂組織における未分化細胞の維持に必要である」第53回日本植物生理学会年会 2012年3月(京都)
5. 中上朋美、上口智治「*MERISTEM DISORGANIZATION 1* (*MDO1*)遺伝子は胚発生能力を持つ配偶子の形成に必要である」53回日本植物生理学会年会 2012年3月(京都)
6. 中上朋美、橋村侑磨、上口智治「シロイヌナズナにおける胚発生能力を持つ配偶子の形成」54回日本植物生理学会年会 2013年3月(岡山)

[その他]

ホームページ等

<http://bbc.agr.nagoya-u.ac.jp/~gaikan/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上口 智治 (UEGUCHI CHI HARU)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：20232738

(2) 研究分担者なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者なし

()

研究者番号：