

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570047

研究課題名(和文)植物細胞の未分化状態の解除に関わる分子機構

研究課題名(英文)Studies on genes that contribute to stem cell differentiation and homeostasis

研究代表者

槻木 竜二 (Tsugeki, Ryuji)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50303805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物の幹細胞の維持や分化制御の仕組みを明らかにすることは、植物の発生を理解する上で重要な課題であるが、分子レベルでの解明にはほとんど至っていない。

幹細胞らしさの抑制に関わる遺伝子として、VAHとEVAHを同定した。VAHとEVAHが、幹細胞らしさの付与に関わるWOXファミリー遺伝子の発現を負に制御することを明らかにした。VAH、EVAHは、幹細胞らしさの解除の分子機構に関わると考えられる。

オーキシンに依存した分裂組織の幹細胞維持などに必要な遺伝子としてCUVを同定した。

研究成果の概要(英文)：In plants, the meristems harboring stem cells are central to post-embryonic formation of organs and tissues. To understand plant growth and development, it is important to reveal the mechanisms that contribute to stem cell differentiation and homeostasis. Arabidopsis thaliana VAH, EVAH and CUV were identified as genes that influence stem cell differentiation and homeostasis. Present data suggest that VAH and EVAH mediate negative control of stemness in the shoot and root. CUV facilitates auxin-mediated development including root meristem maintenance and apical-basal patterning of embryonic and gynoecium development. CUV differentially facilitates expression of genes, thereby influencing auxin-mediated development.

研究分野：植物分子発生学

キーワード：植物幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

植物の発生で特徴的なのは、生育環境に応じた器官の形成が胚発生の後で繰り返しおこなわれることにある。樹齢 2000 年を越える木々であれば、2000 年以上もの間、器官の形成に必要な幹細胞を維持しつつ、葉などの器官を作り続けている。植物の幹細胞とはどういうものなのか？未分化な状態とは何であるのか？分化能の獲得・維持はどのように制御されているのか？また、未分化な細胞が特定の働きを持つ細胞へと分化していく過程で遺伝子発現はどのようにリプログラミングされるのか？これらは、植物の発生を理解する上で重要な問題であるが、分子レベルでの解明にはほとんど至っていない。

(1) 幹細胞の未分化状態の維持についての研究は多いが、解除に着目した研究はほとんどない。多細胞生物の発生において、幹細胞から生じた細胞は、分化する過程で幹細胞らしさを正しく失う必要がある。例えば、幹細胞の増殖能を持ち続けると必要以上に増殖してしまうだろう。しかしながら、どのように幹細胞らしさが喪失されるのかほとんどわかっていない。

(2) 植物におけるオーキシンに依存した組織や器官の形成、細胞分化、分裂組織の幹細胞維持には、オーキシンの生合成や極性輸送、受容、応答に関わる遺伝子の適切な発現が必要だが、その発現制御についてはわかっていないことが多い。

## 2. 研究の目的

(1) 幹細胞の未分化状態を解除する機構を解析する。

申請者は、細胞の未分化状態の解除に関わる新規遺伝子として、*VASCULAR HYPERPLASIA (VAH)*を見出している。根端幹細胞ニッチの形成領域の制限などに関わる *VAH* 遺伝子の機能欠損変異体では、幹細胞マーカーの異所的な発現や、幹細胞領域の拡大、幹細胞の分裂能の上昇などの表現型が見られる。また、*VAH* 遺伝子は、幹細胞ニッチ等で発現する *MUSCHEL-RELATED HOMEBOX (WOX)* 遺伝子の発現を負に制御している。*VAH* 遺伝子の機能を明らかにし、未分化状態の解除の側面から、幹細胞の未分化状態の実体に迫りたい。

*VAH* タンパク質複合体の構成タンパク質を同定・解析して、*VAH* タンパク質の生化学的な役割を明らかにする。

*VAH* タンパク質と物理的に相互作用する因子の遺伝子を解析する。

*vah* 変異体で異常な発現上昇や異所的発現の見られる遺伝子を解析する。

(2) オーキシンに依存した組織や器官の形成、細胞分化、分裂組織の幹細胞維持に関わる遺伝子として、*CLUMSY VEIN (CUV)*を同定している。シロイヌナズナ変異体 *cuv-1*では、子葉や本葉、根などでの維管束の形成に異常があることや、根端分裂組織の活性維持、雌

しべの頂端基部軸に沿ったパターン形成など、オーキシンによって制御される他の過程にも異常があることが予備的な観察から示唆されていた。また、強いアリルである *cuv-2* *cuv-3* 変異体では、頂端基部軸に沿った初期胚発生の異常や、雄性配偶子の伝播効率の低下が予備的な実験で観察されていた。*CUV* 遺伝子は、ヒトや酵母でスプライシングに重要なことが知られているタンパク質のオースログをコードしていた。他方、クラミドモナスと線虫の同オースログは一般的なスプライシングには必要ではなく、ジーンサイレンシングと性決定に各々重要な役割を持つことが示されている。高等植物のそれについてはこれまで報告されておらず、役割などわかっていない。

オーキシンを介した維管束形成や根端分裂組織の維持などの発生過程における *CUV* の役割を明らかにする。

*CUV* のスプライシングへの関与、遺伝子発現への寄与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) *VAH* 遺伝子の機能を解析し、植物幹細胞の分化状態を制御する分子機構を明らかにする。

*vah* 変異体において、分裂組織についての表現型を解析する。

*VAH* タンパク質と相互作用し、共に働くと考えられる因子を同定する。

*VAH* タンパク質と相互作用することが示唆された因子について遺伝学的解析を加える。また、*vah* との二重突然変異体を作製し、その表現型を解析する。

*vah* 変異体で、異常な発現上昇や異所的発現の見られる *WOX* ファミリー遺伝子などについて、*VAH* との遺伝学的相互作用を解析する。*WOX* 遺伝子には機能的剰余性があると予想されるので、適宜、多重変異体を作製し解析する。

(2) *CUV* 遺伝子の機能を解析し、オーキシンに依存した組織や器官の形成、細胞分化、分裂組織の幹細胞維持を制御する仕組みを明らかにする。

*cuv* 変異体の、オーキシンに依存した組織や器官の形成、細胞分化、分裂組織の幹細胞維持についての表現型を解析する。

*cuv* 変異体で、オーキシンの生合成や極性輸送、受容、応答に関わる遺伝子、ハウスキープ遺伝子などの転写産物を解析する。スプライシングに異常はあるか、転写産物の量に異常はあるか等を確認する。

## 4. 研究成果

(1) *VAH* 遺伝子は、幹細胞らしさを負に制御する。

*vah* 変異体の表現型を解析した結果、*VAH* 遺伝子は、茎頂分裂組織や根端分裂組織の幹細胞、維管束幹細胞の分化制御に関わること

が明らかになった。*vah* 変異体の根端では、*WOX* 遺伝子の異所的な発現だけでなく、静止中心マーカーや、幹細胞マーカーの異所的な発現も観察された。また、分裂組織や維管束の幹細胞の分裂能の上昇も確認された。

茎頂分裂組織で発現する *CLAVATA3 (CLV3)* 遺伝子の機能が失われると、茎頂分裂組織が肥大化する。*CLV3* 遺伝子は、茎頂分裂組織のサイズを一定に保つための負のフィードバックループを形成していることが知られている。*vah* 変異が、*clv3* 変異の茎頂分裂組織肥大の表現型を昂進することを確認した。このことは、*VAH* が茎頂分裂組織のサイズの負の制御に関わることを示している。

*VAH* タンパク質と共に働く因子を同定し、それをコードする遺伝子を *ENHANCER OF VAH (EVAH)* と名付けた。*EVAH* 遺伝子と *VAH* 遺伝子の両方の機能が失われると、茎頂分裂組織と根端分裂組織の両方で、幹細胞の性質を持つ領域が拡大した。これらは、*VAH* タンパク質と *EVAH* タンパク質が、幹細胞らしさを負に制御していることを示唆している。

*vah* 変異体で見られていた、幹細胞らしさ増大の表現型が、*vah wox* 多重変異体では部分的に抑制されていた。*VAH* 遺伝子による *WOX* 遺伝子の負の制御が、幹細胞らしさの抑制に寄与しているという考えを支持した。本研究から、幹細胞らしさを負に制御する新規遺伝子 *VAH* と *EVAH* を同定した。*VAH* と *EVAH* の研究を進めることにより、幹細胞らしさを負に制御する新規分子機構が明らかになると期待される。

(2) Pre-mRNA スプライシングは真核細胞に必須である。動物や酵母では、DEAH-box ATPase タンパク質である Prp16 が、pre-mRNA スプライシングに必要なスプライソソームのコンフォメーション変化を促すことが知られている。一方、単細胞緑藻クラミドモナスや線虫では、Prp16 オースログは pre-mRNA スプライシングに必須ではないこと、クラミドモナスでは遺伝子サイレンシング、線虫では性決定に重要な役割を持つことが示されている。高等植物の Prp16 オースログについてはまだ報告されていなかった。シロイヌナズナでは、*CUV* が Prp16 オースログを唯一コードする遺伝子である。*CUV* 遺伝子が、オーキシンに依存した組織や器官の形成、細胞分化、分裂組織の幹細胞維持に必要であること、オーキシンの生合成や極性輸送、受容、応答に関わる遺伝子などの発現を促していることが示された。

*CUV* が、維管束形成 (図1)、頂端基部軸に沿った胚 (図2) とめしべの形成、おしべの形成、花序位置の決定、根端分裂組織の維持、根毛形成位置の平面内極性など、オーキシンを介した発生を支えていることを明らかにした。

オーキシンに依存した器官形成、細胞分化、分裂組織の幹細胞維持には、オーキシンの生

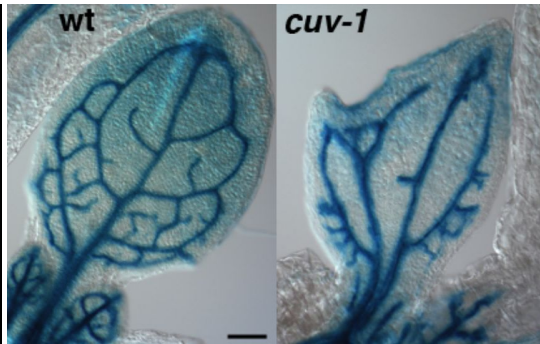


図1 *cuv-1* 変異体では、葉の維管束形成に異常がある。

シロイヌナズナの野生型 (wt) と *cuv-1* 変異体の葉原基における *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN 8* 遺伝子 (*ATHB8*) の発現。*ATHB8* は、将来維管束になる維管束前駆細胞で発現する。*ATHB8* 遺伝子の発現を司る *ATHB8* プロモーターの活性を、*GUS* 遺伝子をレポーターとして組織化学的に検出している。*GUS* タンパク質を発現する細胞は、*GUS* の酵素活性により青く染めることができる。青く染まっている細胞では、維管束前駆細胞マーカーである *ATHB8* が発現している。*cuv-1* 変異体の葉原基では、*ATHB8* の発現パターンに異常が見られる。写真は同じスケールで撮られたもの。スケールバーは、100  $\mu\text{m}$ 。

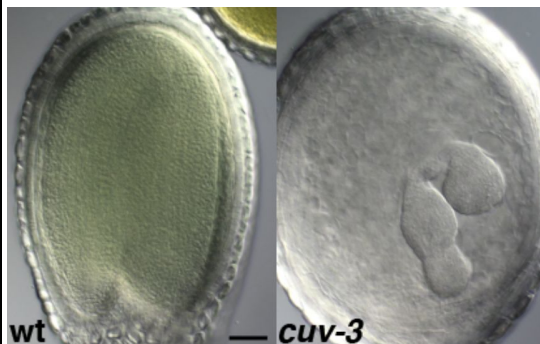


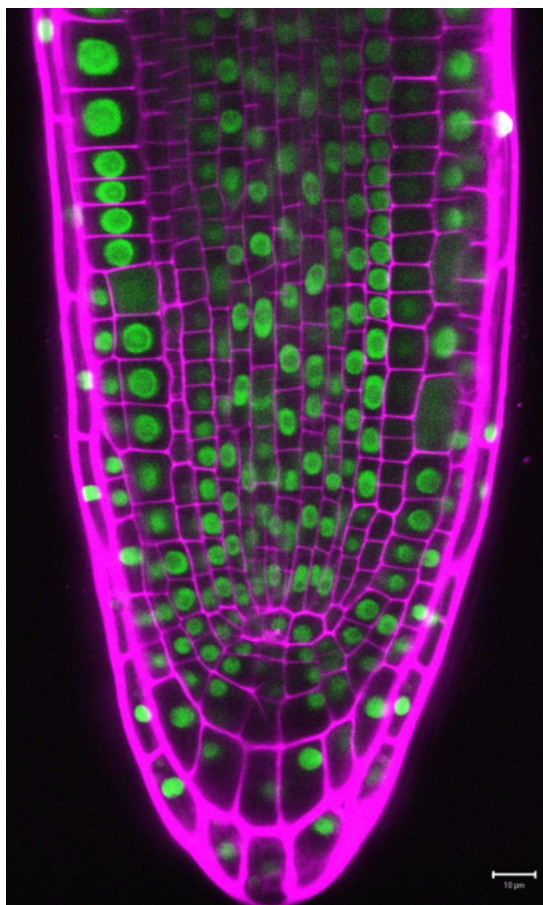
図2 *cuv-3* 変異体では、頂端基部軸に沿った胚の形成に異常がある。

シロイヌナズナ *cuv-3* ヘテロ接合体植物の果実から取った、野生型表現型の胚 (wt)、*cuv-3* 変異体の胚 (*cuv-3* ホモ接合体) を含む胚珠の顕微鏡写真。透明化处理により、胚珠中の胚が見られている。同じ果実から採取した胚珠なので、胚発生開始のタイミングはほぼ同じと考えられる。*cuv-3* 変異体の胚では、頂端基部軸に沿った胚の形成が異常になっている。胚だけでなく、胚柄にも異常な細胞分裂が生じている。*cuv-3* 変異体の胚の発達は、心臓型胚から早期魚雷型胚の段階で止まり、胚性致死となる。写真は同じスケールで撮られたもの。スケールバーは、50  $\mu\text{m}$ 。

合成や極性輸送、受容、応答に関わる遺伝子の適切な発現が必要であるが、その発現制御についてはわかっていないことが多い。*CUV* が、オーキシン合成や極性輸送、受容、応答に関わる遺伝子を含む遺伝子の発現を遺伝子特異的、組織特異的に促すことを明らかにした。

*CUV* が、DEAH-box ATPase タンパク質である Prp16 オソログを唯一コードする遺伝子であること、*CUV* タンパク質は核に局在することがわかった(図3)。

本研究から、*CUV* が、オーキシンの依存した組織や器官の形成、細胞分化、分裂組織の幹細胞維持に必要であること、オーキシンの合成や極性輸送、受容、応答に関わる遺伝子などの発現を促していることを明らかにした。



**図3** *CUV:GFP* 融合タンパク質は核に局在する。

*CUV* 遺伝子のプロモーターで *CUV:GFP* 融合タンパク質遺伝子を発現させた形質転換体の根端。細胞の輪郭がマゼンタ色で示されている。緑色が、*CUV:GFP* 融合タンパク質の GFP (緑色蛍光蛋白質) の蛍光。*CUV:GFP* タンパク質は特異的に核に局在している。  
スケールバーは、10  $\mu\text{m}$ 。

## 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)

Tsugeki, R., Terada, S., The Arabidopsis ortholog of the DEAH-box ATPase Prp16 influences auxin-mediated development., *Plant Signaling & Behavior*, 査読有, Vol. 10, No. 10, 2015, e1074369. DOI:10.1080/15592324.2015.1074369

Tsugeki, R., Tanaka-Sato, N., Maruyama, N., Terada, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Okada, K., CLUMSY VEIN, the Arabidopsis DEAH-box Prp16 ortholog, is required for auxin-mediated development., *The Plant Journal*, 査読有, Vol. 81, No. 2, 2015, 183-197. DOI: 10.1111/tpj.12721

### [学会発表](計2件)

榎木 竜二、佐藤(田中) 奈々、丸山望、寺田志穂、小嶋美紀子、榊原均、岡田清孝、*CLUMSY VEIN* は、オーキシンの依存した器官形成に関わる遺伝子の発現を促している、第54回 日本植物生理学会年会、2013年3月21日-23日、岡山大学(岡山県岡山市)。

榎木 竜二、寺田 志穂、幹細胞らしさを負に制御する遺伝子の解析、第57回 日本植物生理学会年会、2016年3月18日-20日、岩手大学(岩手県盛岡市)。

### [その他]

ホームページ等

[http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/annual/5\\_iden.html](http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/annual/5_iden.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎木 竜二 (TSUGEKI, Ryuji)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50303805