

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440151

研究課題名(和文) シロイヌナズナCLV3下流におけるSUMO化タンパク質の網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of signaling of CLV3 and CLEs in Arabidopsis thaliana

研究代表者

山口 泰華 (Yamaguchi, Yasuka)

熊本保健科学大学・保健科学部・研究員

研究者番号：90448522

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)：CLE遺伝子は植物の器官に幅広く分布し、幾つかのCLEは重要な働きを示すことが知られる。研究計画開始当初は、茎頂部におけるCLV3遺伝子のシグナル経路にのみ焦点をあてて研究遂行に臨んだが、CLE遺伝子群は発現・ペプチド配列が類似しており、相補的に機能すると考えられ、網羅的に解析しなければ分子機構の解明はできない。そこで、CRISPR法を用いて32種類すべてのCLE遺伝子欠損リソースの樹立を行った。さらに、CLE41とCLE44の二重欠損体を作成して解析して投稿論文の執筆を行い、これらの成果は植物生理学誌(Plant and Cell Physiology)平成29年11月号に掲載された。

研究成果の概要(英文)：The CLE gene family shows a wide distribution and functional duplication in various organs, and some of them show important functions in the plant world. At the beginning of the research program, we focused only on the CLV3 signal pathway, which regulates cell proliferation in the shoot apex. However, it is expected to work complementarily since the CLE gene group has similar expression patterns and peptide sequences, so, it is hardly difficult to clarify the functions of these CLE gene pathway without each CLE gene mutants. Therefore, by using the CRISPR method, we established all 32 CLE gene deficient resources. In addition, we found new phenotypes of the double mutant of CLE 41 and CLE 44. These results were published in 2017 issue of Plant and Cell Physiology Journal.

研究分野：発生生物学

キーワード：CLE

1. 研究開始当初の背景

ペプチドホルモンは、植物の器官形成に働くことが知られており、特に CLE ペプチドホルモンは高度に保存されている。シロイヌナズナでは、32種類の CLE 遺伝子が同定されているが、そのうちのほとんどが機能不明である。CLE 遺伝子のひとつである CLV3 は、茎頂分裂組織の活性制御に必要であることが知られており、受容体は3種類あることが知られている。しかし、その下流の分子機構は明らかになっていない。

一方で、植物体の茎頂・根端分裂組織など様々な領域で複数の CLE 遺伝子が発現していることがレポーター解析によって確認され、ペプチド振りかけ実験や、また CLE 遺伝子の強制発現体 (Gain-of-function) 解析などから、CLV3 遺伝子を含め、CLE 遺伝子群が非常に複雑に相互作用して、様々な組織の形成を調節すると理解されていた。ところが、植物での遺伝子発現様式の解析がレポーター解析にとどまっていることや植物での遺伝子機能欠損技術 (Loss-of-function) がなかったことから、どの CLE 遺伝子がどこで発現しており、どの組織形成に必須であるかなど、分子生物学的、遺伝学的解析がほとんど進んでいないなどの問題があった。

2. 研究の目的

シロイヌナズナの CLV3 ペプチドホルモンは、茎頂分裂組織の活性制御に必要であることが知られており、受容体は3種類あることが知られている。しかし、その受容体下流のシグナル因子は、ほとんど明らかになっていない。一方、熊本大学の澤研究室では、受容体の一つ *clv2* の突然変異体のエンハンサースクリーニングの原因遺伝子として、SUMO 結合酵素に相同性の高い *st28* が単離された。

そこで、CLV3 の下流で SUMO 化シグナルが機能すると考え、本研究計画では、茎頂の活性制御を調節すると予想される SUMO 化タンパク質を網羅的に同定し、その作用機序の解析から受容体の下流のシグナル伝達経路を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

CLV3 ペプチドホルモンの下流に位置する、SUMO によって活性制御を受けるシグナル因子の単離同定を行う。SUMO 化されたタンパク質を、植物組織から精製し、質量分析を行う。二段階精製を行う事で、本研究の効率的な遂行を目指す。

CLE 遺伝子群の組織内での発現様式を明らかにする。RT-PCR や *in situ* 法を用いる。

CLE 遺伝子群同士の機能を明らかにするために、CLE 遺伝子欠損体のリソースを作成する。

4. 研究成果

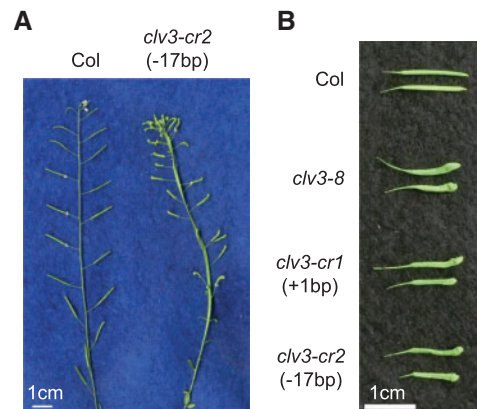
研究グループは、まず植物や植物と共生・寄生関係にある生物の CLE 遺伝子群について

の総説を執筆した (Yamaguchi YL et al., J Exp Bot. 67(16):4813, 2016)。

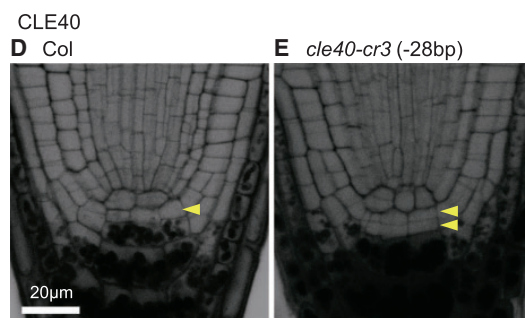
一方で研究計画の実施については、研究開始当初においては、CLV3 の下流の SUMO 化タンパク質を網羅的に同定することにより、茎頂の CLE 遺伝子による細胞分裂調節機構の解析の突破口に繋がると考えていた。しかし、植物では、複数種みつかった SUMO 遺伝子が、ほとんど機能していないという報告があり、ただ単に SUMO 化修飾を受けるタンパク質を同定しただけでは、CLE シグナル伝達経路を明らかにできないと考えられた。そのため、研究計画を一部変更して、まず、CLE 遺伝子群の欠損体のリソース作成を優先して行った。また、CLE 遺伝子群の正確な発現様式も優先して行った。

当時、すでに解析されていた CLE 遺伝子群の欠損体は、わずかに5種類 (CLV3、CLE8、CLE26、CLE40、CLE41) であり、現存の CLE 遺伝子突然変異体の種類もわずかであった。そこで、CRISPR 法を利用して、シロイヌナズナの32種類すべての CLE 遺伝子欠損体を作成して解析するとともに、リソースを公表し、その供与を行った。

CLV3



新規に作成した CLV3 欠損体 (*clv3-cr1*, *clv3-cr2*) の表現型は、従来の CLV3 欠損体 (*clv3-8*) と同様の果実心皮の増大の表現型を示した。Col は野生型を示す。

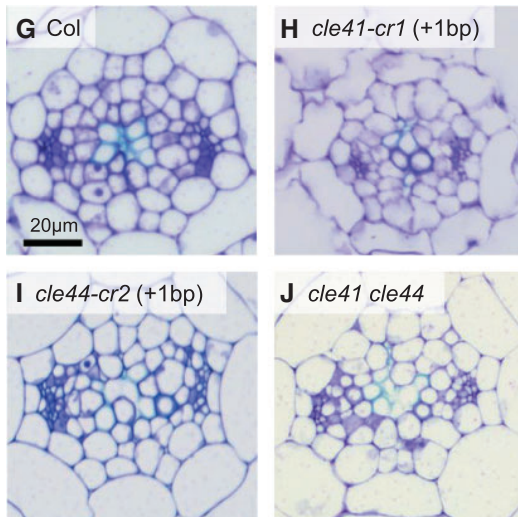


新規に作成した CLE40 欠損体 (*cle40-cr3*) の表現型は、既に報告のある CLE40 欠損体と同様にコルメラ細胞増大の表現型を示した。Col は野生型を示す。

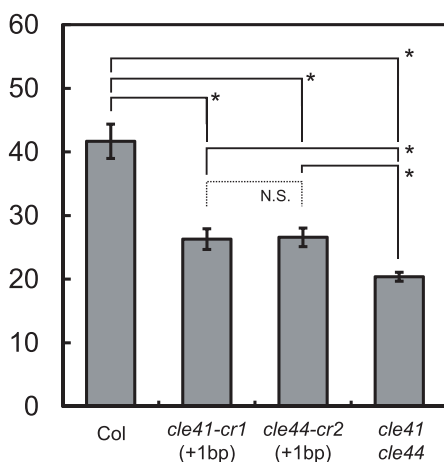
つぎに、本実験計画で作成したリソースを活用して、機能重複があると予想された CLE41 と CLE44 の二重欠損体を解析した。CLE41 と CLE44 のペプチド配列は、非常に良く似た分子構造をしている。既に報告のある、CLE41 欠損体の解析からは、CLE41 は維管束形成に関わることが報告されている (Hirakawa et al., 2010)。CLE41 は、維管束にある植物幹細胞である前形成層細胞 (procambial cell) の細胞数を増加させる機能があると考えられた。

そこで本研究成果では、CLE41 と CLE44 欠損体および CLE41 と CLE44 二重欠損体の表現型の比較解析から、CLE41 と CLE44 は相補的に機能していることを明らかにした。この結果は、CLE 遺伝子リソースがあったからこそ可能になった解析の結果である。これらのデータを元に投稿論文の執筆を行い、投稿論文は植物生理学会誌の平成 29 年 1 月号に掲載された (Yamaguchi YL et al., *Plant Cell Physiol.* 1;58(11):1848, 2017)。

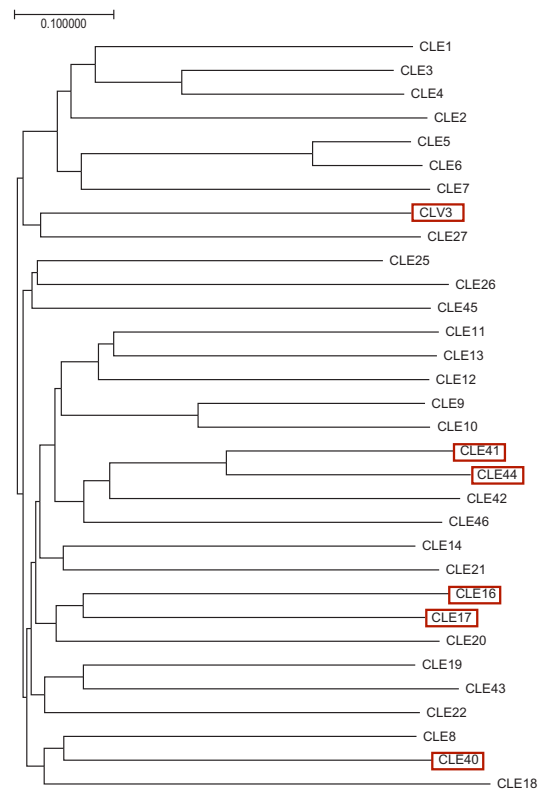
TDIFs (CLE41 / CLE44)



K procambial cell number / section



CLE41 欠損体 (cle41-cr1) と CLE44 欠損体 (cle44-cr2) では、procambial cell の細胞数減少の表現型が観察され、二重欠損体 (cle41 cle44) ではこの表現型の昂進が観察された。



シロイヌナズナ CLE 遺伝子群の系統樹を示す。赤枠で示す遺伝子は、本研究計画で作成したリソースを利用して、その表現型解析を行った遺伝子である。CLE16 と CLE17 は、根端部の幹細胞である静止中心に発現が見られるので、静止中心における機能があると予想されたが、CLE16 と CLE17 の二重欠損体では予想される表現型は観察されなかった。

<引用文献>

- Hirakawa, Y., Kondo, Y. and Fukuda, H. TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the WOX4 homeobox gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 22: 2010, 2618-2629.

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)

- Yamaguchi YL, Ishida T, Yoshimura M, Imamura Y, Shimaoka C, Sawa S. A Collection of Mutants for CLE-Peptide-Encoding Genes in Arabidopsis Generated by CRISPR/Cas9-Mediated Gene Targeting. *Plant Cell Physiol.* 査読有 1;58(11): 2017, 1848-1856.
- Yamaguchi YL, Ishida T, Sawa S. CLE peptides and their signaling pathways

in plant development. J Exp Bot. 査読
有 67(16): 2016, 4813-4826.

〔学会発表〕(計 1件)

① Yasuka L. Yamaguchi, Mika
Yoshimura, Yuko Imamura, Chie
Shimaoka, Ryota Tateishi, Shinichiro
Sawa, Takashi Ishida. Generation of
CRISPR/spCas9 mediated loss-of-CLE
peptide mutants in *Arabidopsis*. (CRISPR
法による CLE 欠損シロイヌナズナの作製)
第 39 回日本分子生物学会年会, 2016,

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 泰華 (YAMAGUCHI, Yasuka)

熊本大学・理学部・先端科学研究部・学術振
興会 特別研究員 (RPD)

研究者番号：9 0 4 4 8 5 2 2

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し

(4) 研究協力者 無し