

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：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2012

課題番号：19060001

研究課題名（和文） 茎頂及び根端メリステム新生の共通基盤となる細胞増殖統御系

研究課題名（英文） Cell proliferation-controlling system as fundamental to de novo formation of shoot and root apical meristems

研究代表者

杉山 宗隆 (SUGIYAMA MUNETAKA)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：50202130

研究成果の概要（和文）：器官新形成が強い温度感受性を示すシロイヌナズナの突然変異体を用いた分子遺伝学的解析により、メリステム新生に先立つ細胞増殖統御について、シュート再生に際し rRNA 生合成因子の不均一な発現低下が増殖域の限局化に関与すること、側根原基形成時の不等細胞分裂の終結にミトコンドリア mRNA 代謝が関与することなどを明らかにした。また、細胞分裂と体積成長を関係づける独自の数理モデルに改良を加え、根端の成長プロフィールと適合することを示した。

研究成果の概要（英文）：Cell proliferation-controlling systems prerequisite for meristem neof ormation were studied by the molecular genetic analysis with Arabidopsis mutants temperature-sensitive for organogenesis de novo, which showed that uneven decrease of rRNA biosynthesis gene expression leads to the restriction of cell proliferation to small areas during shoot regeneration and that mitochondrial mRNA metabolism is involved in the termination of formative cell division at the initiation of lateral root primordia. Our original mathematical model linking cell proliferation and volume growth was revised to fit the actual profiles of root apical growth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	14,200,000	0	14,200,000
2008年度	14,200,000	0	14,200,000
2009年度	14,200,000	0	14,200,000
2010年度	14,200,000	0	14,200,000
2011年度	14,200,000	0	14,200,000
2012年度	14,200,000	0	14,200,000
総計	85,200,000	0	85,200,000

研究分野：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：メリステム、細胞増殖、シュート再生、側根原基、プレ mRNA スプライシング、rRNA 生合成、ミトコンドリア、mRNA 代謝

1. 研究開始当初の背景

側根や不定根、不定芽の形成においては、予め定まっていた場所ではなかった場所で、秩序立った細胞増殖が始まり、根端メリステムあるいは茎頂メリステムが新たに形成される。また

カルスからの器官再生では、既存の位置情報が失われた、あるいは大きく乱された中で、細胞増殖の秩序が回復し、メリステムが生じる。これらの事実は、メリステム新形成の基層に、自律性が高く頑健な細胞増殖統御系が

存在することを示唆している。しかし、通常の発生過程における各メリステムの構築・維持に関して分子遺伝学的手法を駆使した先進的研究が行われている一方で、器官再生等に伴うメリステム新生は言わば研究の空白地帯にあって、細胞増殖統御という観点からの追究も全くなされていなかった。私たちは本研究開始時まで、器官再生を指標形質としてシロイヌナズナの温度感受性突然変異体を多数単離して分子遺伝学的解析を進めていた。その中で細胞増殖の統制の乱れと茎頂・根端メリステム形成不全を示すものをいくつも見出し、メリステム新生に関わる細胞増殖統御系を分子遺伝学的に解析するための材料が揃いつつあった。

細胞増殖と成長とが何らかの決まった関係で結びついていれば、それもまた増殖統御系を構成する要素としてきわめて重要である。本研究開始の10年ほど前から、根端成長を細胞動力学的に解析する方法の洗練が進み、細胞増殖と体積成長の詳細な空間プロフィールが報告されるようになっていた。私たちは、こうしたデータに基づいて、細胞増殖と体積成長の間に相互依存のかつトレードオフの関係があると考え、これを簡単な数理モデルにまとめた。この数理モデルが実際の成長パターンに不完全ながら適合したことから、モデルで想定した関係は基本的には妥当であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、器官再生のときなど、茎頂メリステムや根端メリステムが新しくつくられる際に共通基盤となる細胞増殖統御系について、これを構成する素過程を分子遺伝学的に同定してその役割を明らかにし、最終的には統御系の全体像をとらえることを目指した。また、細胞増殖と体積成長の関係を検証し、この関係に基づいてメリステムによる先端成長の基本的枠組みを解明することも目的とした。

3. 研究の方法

シロイヌナズナの器官再生に関わる温度感受性変異体のうちメリステム新生時の細胞増殖パターンが乱れるものを選び、これらを表現型に従って以下の3つのタイプに分け、タイプごとに細胞増殖制御と責任遺伝子の分子機能に関する解析を行った。

[タイプ 1] 器官再生過程では脱分化と根端メリステム新生、茎頂メリステム新生が強い温度感受性を示す *srd2* と *rid1*。側根形成時の細胞増殖の異常に特徴があり、制限温度下で

は側根原基全体で統制を欠く細胞増殖が続き、メリステムが構築されない。*SRD2* はスプライソソーム snRNA の転写活性化因子をコードし、*RID1* はプレ mRNA スプライシングへの関与が推定される DEAH ボックス RNA ヘリカーゼをコードしている。これらを踏まえ、このタイプの変異体については、表現型は側根形成を中心に解析し、分子レベルでは snRNA およびスプライシングに注目した解析を行った。

[タイプ 2] 器官再生過程では全体にやや弱い温度感受性を示し、制限温度下で帯化した側根を形成することを特徴とする *rrd1*、*rrd2*、*rid4*。Temperature-Dependent Fasciation にちなみ、TDF 変異体と総称。*RID4* は E クラスのペンタトリコペプチドリピート (PPR) タンパク質をコードしている。TDF 変異体については、側根形成の表現型を精査するとともに、本研究開始時点で未同定であった *RRD1* と *RRD2* を同定し、分子機能が推定できる遺伝子を糸口に増殖制御との関連を追究することとした。

[タイプ 3] 器官再生過程では根端メリステム新生、茎頂メリステム新生の温度感受性が強く、脱分化の感受性はやや弱い *rid3*。シュート再生時の細胞増殖異常に特徴があり、制限温度下ではカルス表層の細胞分裂が高まり、メリステム構築の場となる細胞塊が正しく形成されない。*RID3* は新規 WD40 リピートタンパク質をコードしている。これを踏まえ、*rid3* については、*RID3* の分子機能を特定し、細胞増殖の抑制的制御との関係を追究することとした。

メリステムによる先端成長パターンについては、様々な条件で育てたシロイヌナズナを材料に用い、根端成長の細胞動力学的解析とそれによって得られたデータの数理モデルによる解析を行った。解析方法の改善も合わせて進めた。数理モデルは細胞増殖と体積成長を関係づける独自のものであるが、実測データとの照合によりモデルの見直しも行った。

4. 研究成果

側根原基の形成は、内鞘細胞の不等垂層分裂で始まる。数回の不等垂層分裂により、原基の基部を構成する細胞集団が生じると、並層分裂が始まって、原基は盛り上がるように発達していく。このときには、原基全域で活発な細胞分裂が見られる。その後、分裂が休止する段階を経て、メリステム領域での分裂再活性化に至る。この側根形成の初期過程を、時系列を追って詳しく調べるために、半同調的側根形成誘導系を

開発した。この実験系は、発芽直後のきわめて若い芽生えから切り出した外植片をオーキシンで処理することにより、側根原基の新規発生を誘導するもので、各種分子マーカーを利用した経時観察により、側根形成の進行がほぼ揃っていることを確認した。

srd2 および *rid1* の場合、制限温度下では原基全域での細胞分裂が休止しないまま持続し、根端メリステムが確立しない。*SRD2* が snRNA 転写活性化因子をコードしていることから、snRNA 蓄積量と側根形成との関係に注目し、半同調的側根形成誘導系を用い詳細に解析した。その結果、原基全体で高レベルに保たれていたスプライソソーム snRNA が細胞分裂休止期に著しく低下すること、*srd2* の原基では早い段階から snRNA 蓄積量がやや少なく、それが時間とともにさらに減少していくことなどがわかった。側根原基の基部-先端部軸の成立には、オーキシン排出キャリアの PIN タンパク質による極性輸送でつくられるオーキシン濃度勾配が重要と考えられている。*srd2* 変異体の異常側根原基では、*PIN1* の発現が著しく低下しており、オーキシンの濃度勾配も見られなかった。これらの結果から、スプライソソーム snRNA の欠乏はオーキシン極性輸送を妨げて、細胞増殖制御を乱すことが示された。

RID1 については、出芽酵母 Prp22 との類似から、プレ mRNA スプライシングへの関与が推定されていた。*RID1* の導入・発現は酵母の *prp22* 変異株を相補できなかったが、イントロン除去効率に対する *rid1* 変異の影響などを調べることで、この推定が正しいことを実証した。*srd2* の解析結果と合わせ、オーキシン極性輸送系がプレ mRNA スプライシング能力の低下にきわめて敏感であり、高いスプライシング能力の維持がオーキシン勾配をつくりだすのに不可欠であることが示唆された。

rid2 は rRNA の生合成に欠陥をもつ変異体で脱分化などが強い温度感受性を示し、*sriw1* は *rid2* の表現型を回復させることを指標に単離した抑圧変異体である。この *sriw1* 変異が、*srd2* や *rid1* に対しても、脱分化やメリステム新生の温度感受性に関し抑圧効果を発揮することを発見した。分子遺伝学的解析により、*sriw1* 変異体の抑圧能は NAC ファミリー転写因子 ANAC082 の機能欠損に起因することがわかった。*srd2*、*rid1*、*rid2* に関する解析結果と *sriw1* の解析結果に基づき、脱分化やメリステム新生に際してプレ mRNA スプライシング、rRNA 生合成といった基本的な RNA プロセッシングの能力が拡大し、ANAC082 はこの能力をチェックして細胞増殖を負に調

節している、という仮説を提示した。

半同調的側根形成誘導系を用いて TDF 変異体の側根原基形成初期過程を精査した結果、内鞘細胞の不等垂層分裂が適正に終結せず過剰に起きることが帯化の原因であることが判明し、TDF 変異体の責任遺伝子は不等垂層分裂を終結させる制御系に関わると判断された。未同定であった *RRD1* と *RRD2* のポジショナルクローニングを行い、*RRD1* はポリ A 特異的リボヌクレアーゼ (PARN) 様タンパク質、*RRD2* は *RID4* と同じく E クラス PPR タンパク質をコードすることを突き止めた。タンパク質の局在を調べたところ、*RRD1*、*RRD2*、*RID4* のいずれも主として、あるいは専らミトコンドリアに存在することがわかった。

制限温度下で側根形成を誘導した TDF 変異体と野生型を材料として、マイクロアレイ解析を行い、転写物を比較した。その結果、*rrd1* 変異体では、ミトコンドリアコードの呼吸鎖タンパク質の mRNA がポリアデニル化された異常な状態で蓄積していることがわかった。これより、*RRD1* がミトコンドリア mRNA の選択的ポリ A 分解に関わることが示された。E クラス PPR タンパク質は一般に RNA 編集にはたらくとされている。実際 *rrd2* と *rid4* では、ミトコンドリア mRNA の特定の部位で編集効率が下がっており、*RRD2* と *RID4* も直接の分子機能は RNA 編集であると考えられた。一方、*rrd1* と *rrd2*、*rrd1* と *rid4* が合成致死性を示したことから、*RRD1* と *RRD2*、*RID4* は機能上、密接に関連していることが窺われた。また、*rrd2* と *rid4* でも、*rrd1* ほどではないものの、ミトコンドリア mRNA のポリアデニル化が認められた。これらの知見より、RNA 編集を行う *RRD2* と *RID4* の補佐を受けて、*RRD1* が PARN として作用するような、全く新しいタイプのポリ A 依存的ミトコンドリア mRNA 代謝の存在が示唆された。

ミトコンドリアの mRNA 代謝と細胞増殖制御の関係については、呼吸鎖阻害剤を用いた実験から手掛かりが得られた。半同調的側根形成誘導系に適当な濃度の呼吸鎖阻害剤を与えると、制限温度で培養した TDF 変異体の場合と同様に、帯化した側根が形成されることを発見した。これは、TDF 変異体ではミトコンドリア mRNA 代謝の不全が呼吸活性の低下をもたらし、その結果として内鞘細胞の不等垂層分裂の過剰を引き起こすことを示唆する。逆に言えば、側根原基形成時には、ミトコンドリアの mRNA 代謝が高まり、それが活発な呼吸を支えることで、不等垂層分裂

の適正な終結が実現していると考えられる。側根形成過程における細胞増殖制御と各遺伝子の関係を、SRD2 も含め、まとめて図 1 に示す。

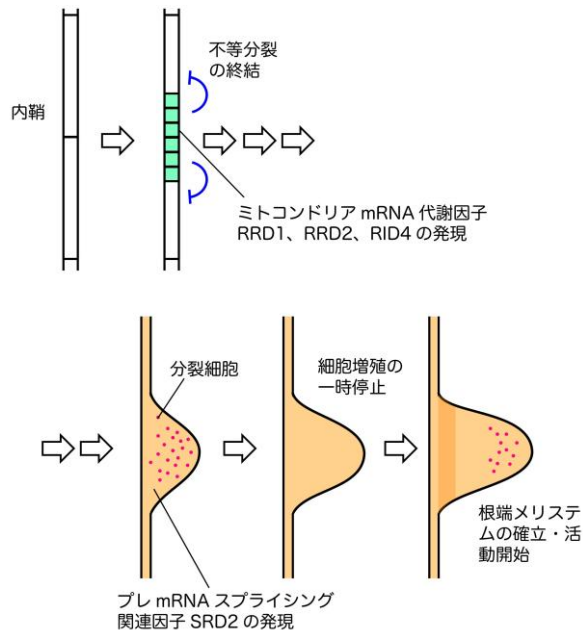


図 1 側根形成過程における細胞増殖制御の各遺伝子産物の関係

rid3 変異はシュート再生時の *CUC1*、*STM* の発現を高進するとともに、メリステム新生を妨げ、メリステム構築の場となるカルス表層の細胞塊を過度に成長させることがわかっていた。miRNA による制御を受けない変異 *CUC1* を強制的に発現させたときに、カルス表層細胞塊の過剰成長とメリステム新生の阻害が見られたことで、*rid3* の形態学的表現型と *CUC1* 発現異常との因果関係が示された。また、カルス表層で *RID3* と *CUC1* が互いに排除し合うような発現パターンを示すこと、*CUC1* 高発現域にメリステム構築の元となる細胞塊が生じることも判明した。これらの結果は、*RID3* が *CUC*・*STM* 経路の作用を空間的に制限することによって、細胞増殖を適度に局限化して、メリステム前駆細胞塊の形成を調節していることを示している。胚発生過程における *RID3* 発現についても検討したが、初期には胚全域で一様に強かった発現が、発生段階が進むにつれてメリステム予定領域を中心に低下していくような変化が見られ、シュート再生時の発現パターンとの類似が窺われた。加えて、*rid3* 変異体の胚で *CUC1* と *STM* の発現が上昇・拡大していたことから、*RID3* はシュート再生と同様に胚発生過程でも *CUC*・*STM* 経路の抑制的制御に関わっていると考えられた。

RID3 がコードする WD40 リピートタンパ

ク質は真核生物全般に広く保存されているが、*RID3* と配列の類似度が高いタンパク質の中には、分子機能がわかっているものがあった。より丁寧な *in silico* 解析を行ったところ、rRNA 生合成への関与が報告されている出芽酵母の *IPI3* との類縁関係が見出された。そこで、*rid3* 変異体における rRNA 前駆体の蓄積を調べて、*RID3* がプレ rRNA プロセッシングにはたらくことを確認した。これらの総合により、rRNA 生合成因子が *CUC*・*STM* 経路の制限を介して細胞増殖を局限化する、という意外な機構が示された (図 2)。

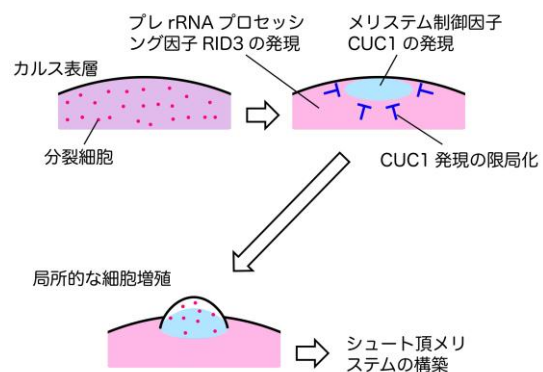


図 2 シュート再生過程における細胞増殖制御と *RID3* の役割

根の伸長成長の空間プロファイルを得るには、異なる時間に撮影した画像の間で各地点を対応づけて、それらの変位を計算する必要がある。このような画像マッチングと変位の計算を効率的に行うために、新しい画像解析プログラム *GrowthTracer* を開発した。*GrowthTracer* は、特異点フィルターを用いて多重解像度画像を構築し、低解像度画像によるマッチングで高解像度画像のマッチングを制約することで、正確で効率的なマッチングを実現している。従来の成長測定用の画像解析プログラムと比べると、画像のコントラストを上げるための特別な前処理を必要としない点、わずか2枚の画像で変位を計算できる点で、*GrowthTracer* は優れている。実際にシロイヌナズナの根端成長の細胞動力学的解析において *GrowthTracer* を使用し、その有用性を確かめた。

体積成長と細胞増殖を関連づける私たちの数理モデルは、器官が成長に利用できる活動の総量はそこに含まれる細胞数によって規定される、器官成長は細胞増殖、体積成長、器官維持の3つの側面からなる、器官維持は器官の体積に応じた活動量の割り当てを要求する、という仮定に立つ。*GrowthTracer* を利用して、多数の試料から取得した根端成長の細

胞動力的データと、このモデルから予想される成長プロフィールを比較すると、系統的な差異が見られた。そこで、核内倍加の影響を考慮して、細胞数を基礎とするモデルからゲノム DNA 量を基礎とするモデルに改変した。これにより、根端成長の実測値とモデルとが、よりよく合致するようになった。

根端成長に対する温度の影響を細胞動力的方法によって調べ、得られたデータから改変数理モデルを用いて成長の各側面のコストを見積もった。その結果、生育温度が 22° C を下回ると、増殖コストと体積増大コストがともに大きく低下することなどが示唆された。

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 11 件)

- ① Misato Ohtani, Taku Demura, Munetaka Sugiyama (2013) *Arabidopsis* ROOT INITIATION DEFECTIVE 1, a DEAH-box RNA helicase involved in pre-mRNA splicing, is essential for plant development. *The Plant Cell* 25. 印刷中, 査読有り
DOI: 10.1105/tpc.113.111922
- ② Akitoshi Iwamoto, Eri Kondo, Hirotomo Fujihashi, Munetaka Sugiyama (2013) Kinematic study of root elongation in *Arabidopsis thaliana* with a novel image-analysis program. *Journal of Plant Research* 126: 187-192. 査読有り
DOI: 10.1007/s10265-012-0523-5
- ③ Kurataka Otsuka, Munetaka Sugiyama (2012) Tissue organization of fasciated lateral roots of *Arabidopsis* mutants suggestive of the robust nature of outer layer patterning. *Journal of Plant Research* 125: 547-554. 査読有り
DOI: 10.1007/s10265-011-0471-5
- ④ Iwai Ohbayashi, Mineko Konishi, Kazuo Ebine, Munetaka Sugiyama (2011) Genetic identification of *Arabidopsis* RID2 as an essential factor involved in pre-rRNA processing. *The Plant Journal* 67: 49-60. 査読有り
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04574.x
- ⑤ Misato Ohtani, Taku Demura, Munetaka Sugiyama (2010) Particular significance of *SRD2*-dependent snRNA accumulation in polarized pattern generation during lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* 51: 2002-2012. 査読有り
DOI: 10.1093/pcp/pcq159
- ⑥ Hiroaki Tamaki, Mineko Konishi, Yasufumi

Daimon, Mitsuhiro Aida, Masao Tasaka, Munetaka Sugiyama (2009) Identification of novel meristem factors involved in shoot regeneration through the analysis of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 57: 1027-1039. 査読有り
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03750.x

[学会発表] (計 75 件)

- ① Kurataka Otsuka, Mineko Konishi, Atsuko Kinoshita, Munetaka Sugiyama “Phenotypic and molecular characterization of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis* that form fasciated roots under the restrictive temperature” XVIII International Botanical Congress, Melbourne, Australia (July 23-30, 2011)
- ② Shunsuke Saiga, Hiroaki Tamaki, Munetaka Sugiyama “Requirement for the RID3-dependent negative control of cell proliferation in de novo morphogenesis” 21st International Conference on *Arabidopsis* Research, Yokohama, Japan (June 6-10, 2010)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bg.s.u-tokyo.ac.jp/koishikawa/research/sugi-lab/sugi-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 宗隆 (SUGIYAMA MUNETAKA)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：50202130

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大谷 美沙都 (OHTANI MISATO)
理化学研究所・バイオマス工学研究プログラム・研究員
研究者番号：60435633

岩元 明敏 (IWAMOTO AKITOSHI)
東京学芸大学・教育学部・助教
研究者番号：60434388