

## 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 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2013

課題番号：19060005

研究課題名（和文）情報分子によるメリステム構築の統御系

研究課題名（英文）Regulation of meristem function through signaling molecules.

研究代表者

柿本 辰男 (KAKIMOTO TATSUO)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70214260

研究成果の概要（和文）：

私たちは、メリステムの一種である形成層の活性制御の主要調節因子は サイトカイニンであることを見だし、サイトカイニン応答の研究においてはクロマチンリモデリング因子および TBP 結合因子 TAF の一つによって調節されている事を見いだした。また、葉の表皮細胞の幹細胞性の性質の負のフィードバックに働く分泌ペプチド因子 EPF2 および気孔の数の制御因子 stomagen を見いだした。EPF1, RPF2 は MAP キナーゼを活性化することによりシグナルを伝える事、さらにこの MAP キナーゼが発生プログラムと環境ストレス応答の統合点であることを見いだした。これらは、情報分子によるメリステム制御理解を深めるものである。

研究成果の概要（英文）：

We found that cytokinins are the main regulators for the activity of cambium, and that cytokinin responses are regulated by chromatin remodeling factors and TAFs. We also worked on the regulation of meristematic cells in the leaf epidermis. We identified a secretory peptide EPF2, which functions as a negative feedback regulator for stemness of the meristemoid mother cells. EPF1 and EPF2 information was transmitted through a MAP kinase cascade. We also found that this MAP kinase cascade integrate developmental program and stress signaling.

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：植物科学

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、サイトカイニン、分泌ペプチド、情報伝達

1. 研究開始当初の背景

植物のメリステムには、茎頂メリステム、根

端メリステム、形成層、葉の気孔系譜前駆細胞などがある。メリステムは幹細胞を含み、

分化に向かう細胞を供給する組織である。メリステムにおける幹細胞性の付与および増殖の制御は、細胞間のコミュニケーションに寄って高度に組織化されていると考えられるが、その仕組みは部分的にしか解明されていなかった。例えば、地球上の安定したバイオマスの中心をなす材木は根や幹の形成層が幹細胞であり、形成層の活性に寄って材の形成が制御されていると言って良いが、形成層の活性制御については未知であった。また、葉の表皮においては、メリステモイド母細胞が幹細胞であり、幹細胞の維持の程度が葉の表皮細胞の数や気孔の数を決めているが、その制御機構もわかっていなかった。根においては、オーキシンに応答して細胞分裂を開始できる能力がある細胞は、内鞘細胞であるが、どうして内鞘細胞にこのような能力があるのかも判っていない。もう一つの未解決の問題点は、これら種々のメリステムの違いを与える仕組みや、環境に応じたメリステム制御の仕組みも判っていない。さらに、これら制御系をなす分子機構も未知の部分が多い。より具体的には、サイトカニンやオーキシンの情報伝達系の大枠は解明されているが、まだ完全解明にはほど遠い。

## 2. 研究の目的

メリステムは細胞の分裂能と未分化性を維持しているが、同時にメリステムはそれぞれに特有の性質を持つ。このように、メリステムには自律的な増殖能、未分化性維持の仕組みと、それぞれのメリステムとしての性質の違いを生み出す仕組みという興味深い問題が存在する。本研究では、メリステムを支える新しい遺伝子を見だし、メリステムを構成する細胞間のシグナル伝達とメリステムの性質を与える遺伝子のネットワークの仕組みを理解することを目的とする。さらに、環境シグナルによる細胞増殖制御の仕組みも解明する。また、新たな器官原基形成の際には、細胞極性の形成と不等分裂が重要な役割を果たす。その制御機構の解明に取り組む。

## 3. 研究の方法

形成層の活性制御機構の解明においては、サイトカニン合成酵素遺伝子多重変異体を作成し、形態学的観察および、サイトカニンの定量実験をおこなった。サイトカニン情報伝達系の研究においては、私たちが以前の研究で同定したサイトカニン応答突然変異体の原因遺伝子の解析と、トランスクリプトーム解析を行なった。オーキシン感受性の研究の為には、それぞれシロイヌナズナに複数存在する TIR/AFB 遺伝子と AUX/IAA 遺伝子の各一つを全ての組み合わせで共発現する酵母を作成し、オーキシン受容系を酵母の中で再構成した。これを用いて、TIR/AFB と

AUX/IAA の各組み合わせにおけるオーキシン感受性を測定した。シュートの表皮細胞の細胞数制御機構の研究は、分泌小ペプチド分子の網羅的解析の中から見いだした EPF2 の機能解析を主に遺伝学的手法で行なった。また、環境応答の研究は、高浸透圧下で原表皮の発生制御系因子の挙動を観察し、また、これらの因子の変異体の高浸透圧応答を調べた。内鞘細胞アイデンティティ決定因子のスクリーニングは、公開されている多数のトランスクリプトームデータを解析し、内鞘細胞特異的に発現する転写因子を選んでその機能解析を、主に遺伝学的手法で行なった。

## 4. 研究成果

### (1) 形成層の活性制御機構の解明

形成層は、植物の根や幹の肥厚時の細胞供給の源である。しかしながら、形成層の活性制御機構は知られていなかった。私たちは、植物ホルモンであるサイトカニンの合成酵素遺伝子の多重変異体を作ったところ、形成層の活性が全く無く、根は全く肥厚しない事を見いだした。この突然変異体にサイトカニンを与えると根の肥厚は回復する事から、形成層の活性制御の主役はサイトカニンであることを証明できた。また、接ぎ木実験により、サイトカニンは根からシュートへも、シュートから根へも容易に移動する事を見いだした。

### (2) サイトカニン情報伝達系の新たな発見

これまでに私たちが中心となって、サイトカニンの受容体を発見し、また、情報伝達系の初発機構の大枠もほぼ判って来ている。しかしながら、これでサイトカニンの作用が理解できたと言える状況ではない。サイトカニンは、組織培養系において細胞分裂を促進し、またシュートを誘導する作用を持つ。私たちは、この作用に着目して、2つのサイトカニン応答突然変異体を分離していた。原因遺伝子を同定したところ、一つは、クロマチンリモデリング因子、もう一つは転写制御因子である TAF の一つであった。サイトカニンによるシュートアイデンティティ調節においてクロマチンリモデリングの関与を示したものとして意義がある。

### (3) オーキシン感受性の多様性を生み出す仕組み

オーキシンはメリステムにおける形態形成を引き起こす主要因子であるとともに、細胞伸長や細胞分裂など様々な生理現象の調節因子である。これらの生理現象は広い濃度範囲のオーキシンによって制御されている。オーキシン情報の受容は、オーキシンによって誘導される TIR クラスのタンパク質と AUX/IAA クラスタンパク質の相互作用と、それにより引き起こされる AUX/IAA クラスタン

パク質の分解によって行なわれる。シロイヌナズナは、他の植物と同様に、これら2つのクラスをコードする遺伝子をたくさん持っている。私たちは、これら2つのクラスのタンパク質の全ての組み合わせにおけるオーキシン感受性を調べた。その結果は、多様なオーキシン感受性を理解する上での重要な情報となった。

(4) シュートの表皮細胞の細胞数制御機構  
葉原基の表皮において、一部の細胞はメリステモイド母細胞(MMC)となる。MMCは増殖能を持ち、全ての気孔孔辺細胞と多くの一般表皮細胞を作り出す。これまで、細胞数がどのように自己制御されているのかについては未知であった。私たちは、MMCから分泌されるペプチド分子EPF2を見いだした。EPF2は新たなMMCが出来る事を抑制することで、細胞密度の自己調節をしている事を明らかにした。また、葉原基の内部細胞で発現し、気孔の数を正に制御する分泌ペプチド因子Stomagenも見いだした。さらに、これらの分子は、ER-family/TMMに受容され、MAPKを介して幹細胞性を与える転写因子SPCHの分解

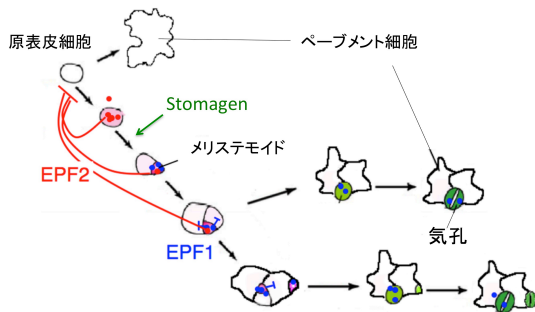


図1. 本研究で明らかになったペプチド性シグナル分子による表皮細胞パターンニングを引き起こす事を示した。

#### (5) 環境に応答した表皮細胞増殖の抑制機構の解明

植物の発生の特徴の一つは、環境に応じて成長を大きく調節する事である。私たちは葉の成長に注目し、浸透圧ストレス下では、植物は自らの成長を積極的に抑制する仕組みを持っている事を見いだした。その際、幹細胞性を与える転写因子SPCHの分解を介して細胞数を減少させている事を見いだした、今後の研究の発展が見込める。

#### (6) 内鞘細胞アイデンティティの決定機構

側根形成の初期過程にはオーキシンが重要な役割を果たしている。根にオーキシンを作用させると、内鞘細胞のみが細胞分裂を開始して側根を形成するが、どうして内鞘細胞だけがこの能力を持つのかは判っていなかった。そこで、内鞘細胞としての性質を付与できる転写因子をスクリーニングし、有力な候補を見だし、今後の研究につながった。

#### 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 18 件)

1. Shimizu-Mitao Y, Kakimoto T. (2014) Auxin Sensitivities of All Arabidopsis Aux/IAAs for Degradation in the Presence of Every TIR1/AFB. *Plant Cell Physiol.* (査読有) pii: pcu077.
2. Tanaka H, Nodzyński T, Kitakura S, Feraru MI, Sasabe M, Ishikawa T, Kleine-Vehn J, Kakimoto T, Friml J. (2014) BEX1/ARF1A1C is Required for BFA-Sensitive Recycling of PIN Auxin Transporters and Auxin-Mediated Development in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* (査読有) 55, 737-749
3. Tanaka H, Kitakura S, Rakusová H, Uemura T, Feraru MI, De Rycke R, Robert S, Kakimoto T, Friml J. (2013) Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* (査読有) 9, e1003540.
4. Jewaria PK, Hara T, Tanaka H, Kondo T, Betsuyaku S, Sawa S, Sakagami Y, Aimoto S, Kakimoto T. (2013) Differential Effects of Peptides Stomagen, EPF1, and EPF2 on Activation of the MAP Kinase MPK6 and the SPCH Protein Level. *Plant Cell Physiol.* (査読有) 54, 1253-1262.
5. Niwa T, Kondo T, Nishizawa M, Kajita R, Kakimoto T, Ishiguro, S (2013) The EPIDERMAL PATTERNING FACTOR LIKE5 Peptide Represses Stomatal Development by Inhibiting Meristemoid Maintenance in Arabidopsis thaliana. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読有) 77, 1287-1295.
6. Uchida N, Lee JS, Horst RJ, Lai HH, Kajita R, Kakimoto T, Tasaka M, Torii KU. (2012) Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (査読有) 109:6337-6342.
7. Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, Sakakibara H, Schumlling T, Tran LS. 2011 Analysis of cytokinin mutants and regulation of

- cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell*. (査読有) 23:2169-2183.
8. Furuta K, Kubo M, Sano K, Demura T, Fukuda H, Liu YG, Shibata D, Kakimoto T. (2011) The CKH2/PKL Chromatin Remodeling Factor Negatively Regulates Cytokinin Responses in Arabidopsis Calli. *Plant Cell Physiol*. (査読有) 52, 618-28.
  9. Kubo M, Furuta K, Demura T, Fukuda H, Liu YG, Shibata D, Kakimoto T. (2011) The CKH1/EER4 Gene Encoding a TAF12-Like Protein Negatively Regulates Cytokinin Sensitivity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*. (査読有) 52, 629-37.
  10. Kanke M, Nishimura K, Kanemaki M, Kakimoto T., Takahashi TS, Nakagawa T, Masukata H. (2011) Auxin-inducible protein depletion system in fission yeast. *BMC Cell Biol*. (査読有) 12:8
  11. Tsujimura K, and Kakimoto T. 2011 Cytokinin receptors in sporophytes are essential for male and female functions in Arabidopsis thaliana. *Plant Signaling and Behavior* (査読有) 6, 66-7
  12. Arata Y, Nagasawa-Iida A, Uneme H, Nakajima H, Kakimoto T., Sato R, (2010) Phenylquinazoline Compound S-4893 Is A Noncompetitive Cytokinin Antagonist That Targets Arabidopsis Cytokinin Receptor CRE1 And Promotes Root Growth In Arabidopsis And Rice. *Plant Cell Physiol*. (査読有) 51, 2047-2059.
  13. Kondo T, Kajita R, Miyazaki A, Hokoyama M, Nakamura-Miura T, Mizuno S, Masuda Y, Irie K, Tanaka Y, Takada S, Kakimoto T., Sakagami Y. (2010). Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signalling molecule. *Plant Cell Physiol* (査読有) 51: 1-8.
  14. Nishimura K, Fukagawa T, Takisawa H, Kakimoto T., Kanemaki M. (2009). An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat Methods* (査読有) 6: 917-22
  15. Hara K, Yokoo T, Kajita R, Onishi T, Yahata S, Peterson KM, Torii KU, Kakimoto T. (2009). Epidermal cell density is autoregulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiol* (査読有) 50: 1019-31
  16. Pertry I, Václavíková K, Depuydt S, Galuszka P, Spíchal L, Temmerman W, Stes E, Schmülling T, Kakimoto T., Van Montagu MC, Strnad M, Holsters M, Tarkowski P, Vereecke D. 2009. Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (査読有) 106:929-34
  17. Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, Kinoshita-Tsujimura K, Václavíková K, Miyawaki K, Kakimoto T. (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (査読有) 105: 20027-31
  18. Tran LS, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T., Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (査読有) 104: 20623-8
- [学会発表] (計 40 件)
1. 柿本 辰男, Kumari Archana, Bergmann Dominique, Jewaria Pawan, 環境にตอบสนองした発生プログラム調節、日本植物生理学会シンポジウム、2014 年 3 月 1 8 日、富山大学
  2. Kakimoto, T., The TAF-related protein CKH1 and the chromatin remodeling-factor CKH2 negatively regulate cytokinin-induced callus formation in Arabidopsis., Auxins and Cytokinins in Plant Development. 2009 年 7 月 12 日、プラハ (チェコ)
  3. Kakimoto, T. Regulation of epidermal cell-pattern by secretory peptides. FEBS congress, 2009 年 7 月 15 日、プラハ (チェコ)
  4. Kakimoto, T., Peptide mediators that regulate epidermal patterning. 18th International Conference on Arabidopsis Research. 2007 年 8 月 22 日、北京 (中国)
- [図書] (計 2 件)
1. Kakimoto, T. (2012) EPF. In *Handbook of*

biologically active peptides. 総ページ数  
2032 ページ、pp20-23, Kastin ed., Elsevier,  
Amsterdam.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：哺乳類動物細胞におけるタンパク質分  
解誘導法

発明者：鐘巻将人、西村浩平、柿本辰男、  
深川竜郎、滝澤温彦

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特願 2009-110449

出願年月日：2009年4月30日

国内外の別：国内、国際

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio\\_w  
b/lab\\_page/cell\\_physiol/sitepg/Kakimoto  
\\_Lab/homu.html](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_w<br/>b/lab_page/cell_physiol/sitepg/Kakimoto<br/>_Lab/homu.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿本 辰男 (KAKIMOTO TATSUO)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70214260