

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25113002

研究課題名(和文)葉の発生ロジックの多元的開拓

研究課題名(英文)Multidimensional Exploration of Logics of Leaf Development

研究代表者

塚谷 裕一(Tsukaya, Hirokazu)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：90260512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 131,700,000円

研究成果の概要(和文)：教科書の知見を塗り替える、あるいは新たに付け加えることができる成果として、(1)核内倍加によるゲノムの量と細胞サイズとの関係性は、従来思われてきたような一義的なものではないことの発見(Tsukaya 2013; Katagiri et al. 2016:後者は、日本植物形態学会の平瀬賞を受賞)、(2)葉の細胞分裂領域の時空間的な制御は、AN3タンパク質のモルフォゲンの挙動(つまり細胞間の単純拡散)のみで説明できることの発見(Kawade et al. 2017)を得た。

研究成果の概要(英文)： We could substitute past knowledge or add a new topic to the present textbooks during this research project. Namely, (1) the relationship between the ploidy level regulated by endoreduplication and cell size is not as simple as formerly believed (Tsukaya 2013; Katagiri et al. 2016: the latter received The Hirase Award from The Japanese Society of Plant Morphology); (2) spatial-temporal regulation of leaf meristem can be explained by a classic morphogen-like diffusion of AN3 protein (Kawade et al. 2017).

研究分野：生物系 / 遺伝 / 植物形態・構造 / 植物生理・分子 / 植物分子生物・生理学 / 系統・分類

キーワード：葉 発生ロジック 細胞間コミュニケーション 器官発生 サイズ制御

1. 研究開始当初の背景

葉は、植物の代謝の源をもたらす光合成の主要器官であり、外部環境要因のセンサー器官でもある。また植物のバイオマスの大半を占める点でも、そのサイズ・成長制御の仕組みは世界的に注目されている。私たちはこれまでに、**多くの葉の発生制御因子の同定に成功してきたが**、葉の発生という膨大な遺伝子変化の全体像からすれば、それもきわめてわずかな側面に過ぎない。しかるに最近、「補償作用」と呼ぶ現象の解析から、**器官レベルでの細胞間相互作用を検出することに成功**したことを機に再検討していくうちに、多細胞系の発生の理解は、その**本質的な制御経路図**を抽出することにこそあり、今後の発生生物学はそれを目指すべきだと感じるようになった。

2. 研究の目的

本研究では、多細胞系における統御系を軸に、そのごく一部のみを拡大して解明するのではなく、全体像を解明することを目指し、**葉という器官が1つのまとまりとして発生する本質的な経路、なりたちを、遺伝子の言葉で解くことを目的とした。最終的には、発生生物学の教科書に新しい記述を加える・あるいは過去の記述を書き替える成果をあげることを目標に掲げた。**

3. 研究の方法

「葉プログラム」のハブとなっている2つの転写共役因子 AN3 と AN を柱として、**葉の発生制御の本質的経路の全体像**を解明する。これには公募班・伊藤博士との共同研究を始める。ハブ因子の周辺には、多数の付随的経路が見いだされると推定されるので、その中からの根幹的経路の抽出には、支援班・望月博士の数理的ロジック解析の協力を仰ぐ。RTFL も位置価を与える重要因子として解明を進める。またハブ因子の下流でのグローバルな遺伝子発現変化の別な側面として、支援班・平井博士との共同研究により、代謝系と葉の発生との接点を解明し、「代謝発生学」のような新しい研究分野・スタイルを確立・提唱する。この代謝と葉の発生制御に関しては、ここ数年の間に重要性が浮上してきたハウスキーピング遺伝子の、発生制御因子としての役目にも焦点を当て、分担者の堀口博士、Ferjani 博士がその解析にあたる。さらに分担者の坂本の協力を得て、葉原基における1細胞レベルのイメージング解析を進め、細胞間の相互作用等、見逃されてきた側面を解明する。また支援班・河内博士の協力により、葉の進化以前の段階にあるゼニゴケで、上記解析から抽出される諸経路の役目を確認することで、葉の進化に本質的な因子を同定する。

4. 研究成果

教科書の知見を塗り替える、あるいは新た

に付け加えることができる成果としては、(1)核内倍数性と細胞サイズの関係性は従来思われてきたような一義的なものではないことの発見(Tsukaya 2013; Katagiri et al. 2016:本論文は、日本植物形態学会の平瀬賞を受賞)、(2)葉の細胞分裂領域の時空間的な制御は、AN3 タンパク質の細胞間拡散(=古典的なモルフォゲンの挙動)のみで説明できることの発見(Kawade et al. 2017)が挙げられる。これらを支える各成果について、以下に述べる。

器官レベルでの細胞増殖と細胞伸長を統御する仕組みを反映する現象・補償作用については *fas1*, *fugu5*, また *KRP20/x* における細胞異常肥大の分子背景がそれぞれ明らかになった(Hisanaga et al. 2013; Ferjani et al. 2013a, 2013b; Katano et al. 2016; Takahashi et al. 2017)。 *fugu5* に関しては前島班員(公募班)との共同解析の成果である。これについては支援班・望月博士の数理的解析とも組み合わせ、PPi が発生上、また代謝経路上に果たす役割について全く新たな知見を得、投稿中である(Ferjani et al., submitted)。

また補償作用に伴うオルガネラ数制御について新知見を得、論文にまとめた(Kawade et al. 2013)ほか、現時点での補償作用の知見を総説として公刊した(Hisanaga et al. 2015)。さらに、核内倍加による葉の細胞サイズ肥大は、確率論的に制御されていることを、数理的解析により証明した(Kawade et al. 2017)。

RTFL ペプチドファミリー(Yamaguchi et al. 2013)については、陸上植物における著しい多様化をドメイン解析から明らかとし、またシロイヌナズナとイネとの間で、過剰発現効果の違いを報告した(Guo et al. 2015)。さらに支援班・河内博士との共同研究により、ゼニゴケに1コピーのみ存在する RTFL の過剰発現と機能欠損型変異を作出したところ、全く新しい表現型を見いだした。これについては生理学的解析と併せて公表予定である(Guo et al., in prep.)。

また被子植物の葉の多様性に注目した観点からは、現時点での知見を総説にまとめた(Tsukaya 2014)。また藤田班員(公募班)らとの共同研究により、食虫植物ムラサキヘイソウの捕虫葉の袋状の形態形成の仕組みを解析した。この袋状の形態形成については、従来推測されていたような背腹性の制御の変化によらないこと、むしろ局所的な細胞分裂面の変化によっていることを明らかとした(Fukushima et al. 2015)。またケン科における葉原基の長軸への分化方向の多様性についても、従来推測されていたような単純な成長勾配では説明がつかないことを見だし、種ごとに異なるメカニズムで制御されている可能性を抽出し、2つの論文にまとめた(Ikeuchi et al. 2013; 2014)。また腐生植物が進化するにあたり、葉を鱗片上に退化させた

過程に関して、新たな仮説を提唱した (Tsukaya 2017)。

さらに葉を構成する細胞のサイズ制御に関して、倍数性作出系を活用した解析を進め、倍数性の増加と細胞体積増加の関係についての新知見を論文として発表した (Tsukaya 2013)。またこの発見を発展させるべく、分担者の東京理科大・松永の協力により、葉原基の中で1細胞レベルでの発生過程の追跡を可能とするバイオイメージング技法を確立した。これを用いた結果、同一の葉原基の中でも、表皮組織と葉肉組織とで核内倍加の影響が大きく異なることを見いだした (Katagiri et al., 2016)。

また細胞増殖と細胞伸長の間のバランス制御の重要性について、前島班員(公募班)との共同解析から新たな知見を得、2つの論文にまとめた (Maeda et al. 2014; Ferjani et al. 2015)。

加えて葉の発生制御において、ハブとしてはたらく可能性が高い重要因子 AN3 の上流・下流遺伝子群についてマイクロアレイデータ解析と共発現データベースの分析、関連変異体の RNAseq データ、また発生遺伝学的手法とにより重要経路の候補を取得した。細胞間コミュニケーションの重要性に関して、AN3 そのものが細胞間移動することで、mRNA の発現している内部組織と、発現していない組織との間で細胞分裂が協調することを、すでに明らかにしている (Kawade et al. 2013)。それに加え、葉の原基の先端=基部軸に沿った発現勾配とタンパク質の核酸の勾配が、葉原基における細胞分裂領域の範囲を決定していることを、実験データと数理解析とから証明した (Kawade et al. 2017)。ここで観測された AN3 タンパク質の挙動とその発生学上の効果は、古典的なモルフォゲンの性質を満たすものであり、初の実験事例報告となる。

また公募班の伊藤班員との共同研究により、イネの AN3 ホモログの性質を解析した結果、発生上の機能はシロイヌナズナと同じであるが、組織上の発現パターンがまるで逆となっていることを見いだした (Shimano et al. 2018)。上記知見と併せて考えると、AN3 タンパク質の細胞間移動は、被子植物の進化の歴史上、その方向性を変えたことがあることになる。

また支援班の平井班員との共同によるメタボロミクス解析により、代謝の変化のうちどれが本質的に重要な部分かの解析をスタートし、「代謝発生生物学」の1つのモデルケースとして実験的な変異体スクリーニングを進め、CYP の中より有力な候補を得、発生上の代謝の役目について解析を進めた。

最後に、葉の発生制御において、やはりハブとしてはたらく可能性が高い重要因子 AN については、支援班の河内班員との共同研究の協力を得て、ゼニゴケにおける解析をすすめ、被子植物と機能上同様の細胞学的効果を

持つこと、しかも単相世代(配偶子世代)において被子植物の複相世代(孢子体世代)と同じ役割を担っていたことが判明した (Furuya et al., in revision)。また京大・西村いくこ研との共同解析により、シロイヌナズナでは葉細胞の光環境に依存した核の位置決定にも AN が関わっていることを見いだした (Iwabuchi et al., submitted)。

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 42 件)

(1) Kawade K*, Tanimoto H, Horiguchi G, Tsukaya H. (2017) Spatially different tissue-scale diffusivity shapes ANGUSTIFOLIA3 signaling gradient in growing leaves. *Biophys J.* **113**: 1109-1120. 査読有

(2) Obayashi I, Lin C-Y, Shinohara N, Matsumura Y, Machida Y, Horiguchi G, Tsukaya H, Sugiyama M*. (2017) Evidence for a role of ANAC082 as a ribosomal stress response mediator leading to growth defects and developmental alterations in Arabidopsis. *Plant Cell* **29**: 2644-2660. 査読有

(3) Wang X, Wang H, Liu S, Ferjani A, Li J, Yan J, Yang X, Qin F* (2016) Genetic variation in *ZmVPP1* contributes to drought tolerance in maize seedlings. *Nature Genet.* **48**:1233-1241. 査読有

(4) Fukushima K, Fujita H, Yamaguchi T, Masayoshi K, Tsukaya H, and Hasebe M* (2015) Oriented cell division shapes carnivorous pitcher leaves of *Sarracenia purpurea*. *Nature Commun.* **6**: 6450, doi:10.1038/ncomms7450. 査読有

(5) Kawade K*, Horiguchi G, Usami T, Yokota M, and Tsukaya H. (2013) ANGUSTIFOLIA3 signaling coordinates proliferation between clonally distinct cells in leaves. *Curr. Biol.* **23**: 788-792. 査読有
他

〔学会発表〕(計 195 件)

(1) 堀口吾朗、塚谷裕一
シロイヌナズナ MIR396A の過剰発現が地上部と地下部の境界の維持に与える影響
国立遺伝学研究所 第7回植物RNAネットワークシンポジウム(招待講演)
2017年12月 国立遺伝学研究所(静岡県三島市)

(2) Hiroyuki Koga, Kei Hashimoto, Kiminori Toyooka, Hirokazu Tsukaya
Understanding the molecular mechanisms of dimorphic leaf development in response to submergence using non-model plants

Callitriche. Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (招待講演)
2017年11月 Academia Sinica (台湾)
(3) Hirokazu Tsukaya
ANGUSTIFOLIA3/AtGIF 1, a versatile regulator of leaf organogenesis.
International Conference on Arabidopsis Research ICAR 2016 KOREA (招待講演)
2016年07月 Gyeongju (韓国)
(4) Hirokazu Tsukaya
Cell-layer-specific coordination between ploidy and cell size in leaves
The 26th International Conference on ARABIDOPSIS Research
2015年07月 Palais des Congres, Paris (フランス)
(5) Hirokazu Tsukaya
What factors determine the positioning of meristematic zones in leaves?
第25回国際シロイヌナズナ会議 (招待講演)
2014年07月 British Columbia 大学 (カナダ)
(6) Hirokazu Tsukaya
Control of mechanisms of meristematic activities is leaf primordia
第7回 APOCB シンポジウム (招待講演)
2014年2月 Biopolis (シンガポール)
他

〔図書〕(計6件)

- (1) 塚谷裕一、丸善出版、植物学の百科事典、2016、802
- (2) 塚谷裕一、荒木崇 編著、放送大学教育振興会、改訂版 植物の科学、2015、289
- (3) Tsukaya H.、Springer、Atlas of Plant Cell Structure (Chapter Meristems) 2014、187-202
- (4) 巖佐庸、齊藤成也、倉谷滋、塚谷裕一(編) 岩波書店、岩波生物学辞典、2013、2171
- (5) 塚谷裕一(分担執筆)、東京化学同人、生物学入門、2013、153-171
- (6) 塚谷裕一(分担執筆)、羊土社、理系総合のための生命科学、2013、334

〔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
東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 発生進化研究室
<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/bionev2/jp/index.html>

岡崎統合バイオサイエンスセンター
BIO-NEXT プロジェクト 塚谷研究室
<http://www.oib.orion.ac.jp/metabolo/>

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究 植物の多元的開拓
<http://logics.plantdev.biol.s.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
塚谷 裕一 (TSUKAYA Hirokazu)
東京大学・理学系研究科(理学部)・教授
研究者番号：90260512

(2)研究分担者
松永 幸大 (MATSUNAGA Sachihiro)
東京理科大学・理工学部・教授
研究者番号：40323448

堀口 吾朗 (HORIGUCHI Goro)
立教大学・理学部・准教授
研究者番号：70342847

Ferjani Ali
東京学芸大学・教育学部・准教授
研究者番号：20530380

坂本 卓也 (SAKAMOTO Takuya)
東京理科大学・理工学部・研究員
研究者番号：40637691

(3)連携研究者
榊原 恵子 (SAKAKIBARA Keiko)
立教大学・理学部・准教授
研究者番号：90590000

(4)研究協力者
山口 貴大 (YAMAGUCHI Takahiro)
基礎生物学研究所・助教
研究者番号：60450201

川出 健介 (KAWADE Kensuke)
自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)、
岡崎統合バイオサイエンスセンター・
特任准教授

研究者番号：90612086

古賀 皓之 (Koga Hiroyuki)
東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・
助教
研究者番号：30783865