

令和元年6月10日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07401

研究課題名(和文) シロイヌナズナ胚における子葉形成機構の解析～調節遺伝子と細胞と器官形態との関係

研究課題名(英文) Analysis of cotyledon formation in Arabidopsis embryo ~ on relation among regulatory genes, cell and organ shape

研究代表者

相田 光宏 (Aida, Mitsuhiro)

熊本大学・国際先端科学技術研究機構・教授

研究者番号：90311787

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)：本研究では植物胚の形を立体的かつ正確に記録する技術を確立した。この技術を用い、胚の形状がどのように変化するかを詳しく調べたところ、葉(子葉)の形成が開始される際に胚先端部が特定の方向へ偏って拡大することがわかった。この成長の偏りは、胚の個々の細胞の成長の偏りと相関があった。また子葉の形づくりを調節するCUC2およびCUC3遺伝子の働きをなくすと細胞成長の偏りが減少し、胚全体の形状も対称なまま成長することが明らかになった。以上から、器官の形づくりには個々の細胞の形とその協調が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は体の先端部に新しい葉を次々に付け加えていくことで成長する。葉を正しい位置に正しい形で形成するためには様々な遺伝子が働くことがわかっているが、個々の遺伝子がどのようにして葉を構成する個々の細胞の振る舞いに影響し、ひいては葉全体の形を決定するかは明らかでない。本研究ではシロイヌナズナのCUC2およびCUC3遺伝子が個々の細胞の形を特定の方向へ伸ばす働きを持つことを明らかにした。今後は、これらの遺伝子の細胞レベルでの働きが器官全体の形の形成とどのような関係にあるかを明らかにすることで、遺伝子が形作りに働く仕組みを明らかにできることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have established a method to precisely record 3D structure of plant embryos. Using this method, we traced how the shape of the embryo changed as the progression of embryonic leaf formation and found that the apical region of the embryo showed polarized growth. This polarized growth was associated with the polarized shape of individual cells that compose embryonic leaves. Embryos lacking the function of CUC2 and CUC3, genes that are required for correct cotyledon shape, showed less polarized cell shape and grew more symmetrically compared to normal embryos, suggesting that regulation of cell shape underlies correct organ shape.

研究分野：植物発生学

キーワード：発生 転写因子 形態形成 葉 境界部 対称性 オーキシン

## 1. 研究開始当初の背景

これまで植物器官の形・色・サイズ等の性質を決定する遺伝子（以下、調節遺伝子）が多数明らかにされた。このような遺伝子の多くは転写因子をコードし、各器官に固有な遺伝子発現を制御することで器官全体の性質に影響する。一方これらの調節遺伝子の発現場所の決定には、シグナル分子を介した細胞間相互作用が重要である。このように「決まった場所に特定の調節遺伝子が発現するしくみ」については広く理解が進んでいる。

一方、個々の調節遺伝子がどのようにして器官に固有な「形」をもたらすかについては不明な点が多い (Davies 2013)。調節遺伝子のオン・オフにより、巨視的なレベルで器官の形が変化することは明らかであるが、その変化が個々の細胞特性のどのような変化に由来するのかについての理解は不十分である。これを明らかにするには (1) 個々の細胞の形とその変化を定量的に記述し、(2) 個々の細胞の形態に対する調節遺伝子の影響を定量的に記述したうえで、(3) 個々の細胞形態と器官の形との相互関係を明らかにすることが重要である。

## 2. 研究の目的

生物の形態形成には、転写因子などをコードする様々な調節遺伝子が関与する。しかし調節遺伝子のはたらきが、どのような原理で巨視的なレベルでの器官の形へと変換されるかは不明である。本研究では双子葉植物シロイヌナズナの子葉形成をモデルに、二つの子葉の原基とその境界部における個々の細胞形態と増殖パターンの特徴を、3D イメージングと画像解析で定量的に調べる。これにより領域ごとの細胞の特徴と器官の形との関係を明らかにする。また、二つの子葉原基の境界部で発現し、子葉原基どうしを「分離」する機能をもつ調節遺伝子 *CUC* に着目し、その活性が子葉原基及び境界部の細胞形態と増殖パターンにどのように影響するかを定量的に調べる。以上から「調節遺伝子の活性」・「細胞の形」・「器官の形」の間の相互関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

子葉形成の初期過程に焦点を絞り、二つの子葉原基および境界部の細胞形態と、その変化を明らかにする。そのため、まず野生型胚について A) 細胞の形と大きさの定量的解析、B) 細胞増殖・成長パターンの解析、C) 細胞内因子の解析を行い、子葉原基と原基境界部における細胞の特徴の違いを定量的に明らかにする。次に *CUC* の機能欠損変異体について同様の解析を行い、野生型と比較する。得られた定量的データを用いて *CUC* の活性とそれに応じた細胞の性質の変化と、実際の器官の分離との関係を明らかにする。さらに、*CUC* 遺伝子の下流で働く遺伝子の発現及び機能解析を行い、*CUC* 遺伝子が子葉原基の成長を調節する際の作用機序を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) シロイヌナズナ胚の 3D イメージング法の確立

シロイヌナズナ胚の個々の細胞について、その立体的な形状と配置を把握するために、胚の透明化と染色法について検討を行った。その結果、従来の mPS-PI 法では染色が弱く、サンプルごとの染色具合もきわめてばらつきが大きいこと、効率的な画像取得には不向きであることが分かった。一方、栗原らによって報告された ClearSee 法による透明化と細胞壁の染色剤であるカルコフロールによる染色を組み合わせた手法 (Kurihara et al., 2015) を試みたところ、初期球状胚から中期心臓胚まで、試料の深部まできわめて明瞭な蛍光画像を得ることに成功した。またこの方法で調製したサンプルでは GFP の蛍光も良好に観察できることも分かった。

### (2) 3D 画像を用いた野生型および *cuc2 cuc3* 変異体胚の定量的解析

各ステージの多数の胚についてスタック画像を取得し、立体構築を行った。野生型胚では子葉形成に伴って、胚頂端部が横方向に大きく拡大し、それまで放射相称型だった胚の形状が二放射相称へと変換することが分かった。一方、子葉境界部の調節因子である *CUC2* および *CUC3* 遺伝子の二重ノックアウト変異体では、胚頂端部の横方向への拡大は抑えられ、逆に前後方向への拡大が促進されており、結果として子葉形成が進んでも放射相称に近い形状を示していた。

### (3) 分子マーカーを用いた解析

子葉原基のマーカーであるオーキシン応答性リポーター *DR5-GFP* および子葉境界部のマーカーである *CUC1-GFP* の発現について調べたところ、二重変異体ではいずれのマーカーの発現も著しく乱れていることが明らかになった。以上の結果から、*CUC2* と *CUC3* は胚頂端部の左右方向への拡大を促進し、前後方向への成長を抑制すること、および胚の二放射相称性の確立

に必要であることが示唆された。また、これらの遺伝子は正常なオーキシンの蓄積部位の形成や、CUC1 遺伝子の正常な発現パターンにも必須であることが明らかになった。

#### (4) セグメンテーションによる野生型および *cuc2 cuc3* 変異体胚の定量的解析

ClearSee 法で取得した野生型および *cuc2 cuc3* 二重変異体の胚について、ImageJ ソフトウェア及び MorpholibJ plug-in を用いて 3D セグメンテーションを行い、胚を構成する個々の細胞の形態情報を抽出した。その結果、野生型胚の頂端部では子葉原基とその間の部分で細胞体積が顕著に異なること、および *cuc2 cuc3* ではその差が不明瞭になることが明らかになった。CUC 遺伝子が胚頂端部の側方への広がりを促進すること、およびオーキシン応答の分布に影響することと合わせると、CUC 遺伝子はオーキシンの分布の制御を介して胚頂端部の細胞成長に影響し、それによって子葉の分離を促進することが示唆される。

#### (5) CUC の下流遺伝子の発現および機能解析

CUC 遺伝子により発現が直接制御される遺伝子の候補として、ペプチドホルモンをコードする遺伝子が同定された。レポーター遺伝子を用いた解析により、この遺伝子の胚頂端部における発現が、CUC1・CUC2・CUC3 に依存することがわかった。また機能喪失変異体では子葉原基先端部のオーキシン応答が減少するとともに、原基の成長が遅延することもわかった。以上から CUC 遺伝子は胚頂端部におけるペプチドホルモンの合成を促すことで、子葉原基の成長を促進する機能をもつことが示唆された。

#### <引用文献>

Davies, A. J (2013). Mechanisms of Morphogenesis, 2nd edition. Academic Press. ISBN: 978-0-12-391062-2.

Kurihara D, Mizuta Y, Sato Y, Higashiyama T (2015). ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. Development 142. 4168-79. doi: 10.1242/dev.127613.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

① Hasegawa J, Sakamoto Y, Nakagami S, Aida M, Sawa S, Matsunaga S (2016). Three-dimensional imaging of plant organs using a simple and rapid transparency technique. Plant Cell Physiol 57, 462-472. doi: 10.1093/pcp/pcw027. 査読有

② Tameshige T, Okamoto S, Lee JS, Aida M, Tasaka M, Torii KU, Uchida N (2016). A secreted peptide and its receptors shape the auxin response pattern and leaf margin morphogenesis. Curr Biol 26, 1-8. doi: 10.1016/j.cub.2016.07.014. 査読有

③ Scofield S, Murison A, Jones A, Fozard J, Aida M, Band LR, Bennett M, Murray JAH (2018). Coordination of meristem and boundary functions by transcription factors in the SHOOT MERISTEMLESS regulatory network. Development 145, dev157081. doi: 10.1242/dev.157081. 査読有.

〔学会発表〕 (計 11 件)

① シンポジウム招待講演 シロイヌナズナにおける茎の分枝メカニズム. 相田光宏. 第 80 回日本植物学会年会 分枝は進化の分かれ道? 分かれても分かれきれない植物のつながりを探す. 宜野湾市. 沖縄コンベンションセンター. 2016 年 9 月.

② 口頭発表 分裂組織の始めの一步~このシスはほんとに大事なのか? 相田光宏. 遺伝学研究所研究会「イネ分子遺伝学の彷徨」国立遺伝学研究所, 三島. 2016 年 10 月.

③ シンポジウム企画・講演 Embryonic Shoot Formation: Establishing the Basis for Plant Life. Aida M. 1st IROAST Symposium, Plant Cell and Developmental Biology: Approaches to Multiscale Biosystems. 熊本大学. 熊本. 2017 年 11 月.

④ 口頭発表 茎頂分裂組織の成長方向を考える. 相田光宏. 遺伝学研究所研究会「イネ分子遺伝学の方向性」国立遺伝学研究所, 三島. 2017 年 11 月.

⑤ 口頭発表 胚のシュート形成過程における CUC1 および CUC2 タンパク質による STM 遺伝子の発現制御. 岩本亮介, 渡辺舜, 相田光宏. 第 59 回日本植物生理学会年会. 札幌, 札幌コンベン

ションセンター. 2018年3月.

⑥ シンポジウム招待講演 Regional Interaction during Arabidopsis Flower Primordium Formation. Aida M. 2nd International Conference on Meristem Biology. University of Science and Technology of China, Hefei, China. 2018年6月.

⑦ シンポジウム招待講演 Embryonic Shoot Formation: Establishing the Basis for Plant Life. Aida M. HBMC Scientific Advisory Committee Meeting Symposium. Horticultural Biology and Metabolomics Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, China. 2018年6月.

⑧ 口頭発表 セグメンテーションによるシロイヌナズナ胚頂端部の形態解析. 井上雄規, 相田光宏. 新学術領域研究「植物多能性幹細胞」第2回若手ワークショップ. 国民宿舎小豆島交流センター, 小豆島. 2018年10月.

⑨ 口頭発表 シロイヌナズナの茎頂分裂組織形成におけるオーキシン生合成遺伝子の発現解析. 田中俊介, 相田光宏. 新学術領域研究「植物多能性幹細胞」第2回若手ワークショップ. 国民宿舎小豆島交流センター, 小豆島. 2018年10月.

⑩ 口頭発表 シュート幹細胞の形成機構. 相田光宏. 第4回幹細胞研究会「幹細胞の基本原則と共通性～植物と動物の比較から～」岡崎コンファレンスセンター, 岡崎. 2018年11月.

⑪ 口頭発表 茎頂分裂組織を介した植物の成長と形づくりのメカニズム. 相田光宏. 日本動物学会・九州沖縄植物学会・日本生態学会 合同熊本例会. 熊本大学, 熊本. 2018年11月.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://iroast.kumamoto-u.ac.jp/aida/ja/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

該当者なし

(2)研究協力者

該当者なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。