

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07422

研究課題名(和文)植物表皮細胞の起源を探る

研究課題名(英文)A study on the establishment of plant epidermal cells

研究代表者

高橋 卓 (Takahashi, Taku)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：20271710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物がどのように表皮最外層という位置情報を認識し、表皮細胞としての同一性を確立するのかという課題の解明を目的とする。

シロイヌナズナの表皮分化のマスター転写因子ATML1、PDF2のゼニゴケにおける相同遺伝子MpPDF2について、ゲノム編集による変異株を作出し、機能欠損では致死、タンパク質機能領域のC末端側の弱い変異では成長に著しい遅延が見られ、この遺伝子が必須であることを明らかにした。一方、東京大学との共同研究において、シロイヌナズナの表皮最外層という位置情報は転写因子ATML1が最外層に特異的なスフィンゴ脂質との相互作用により活性化されることに変換される機構が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の表皮は、器官どうしの融合回避や外的環境からの防御など、形態形成や生育に必須の役割を果たす。本研究では、地上部表皮細胞がどのように分化するかの機構解明を目指し、鍵となる転写因子タンパク質の重要性、活性化機構の一端を明らかにした。植物の発生分化、器官形態形成の分子基盤の解明において大きな進展であり、生命の本質の理解につながると同時に、地球環境や人類の生存を支える生き物としての植物の今後の研究に手がかりを与えると期待される。

研究成果の概要(英文)：To define how the identity of epidermal cells is established in plants, mutants of a gene in the moss *Marchantia polymorpha*, MpPDF2, which is homologous to *Arabidopsis* ATML1 and PDF2 encoding key transcription factors for epidermal cell differentiation, were generated by genome editing strategy. The result revealed that the null mutant was lethal while the weak mutant allele in the C-terminal domain showed remarkably delayed growth, suggesting that MpPDF2 is essential for survival. Furthermore, in *Arabidopsis*, the positional information of the epidermis was found to be established through the activation of ATML1 by its interaction with outermost cell-specific sphingo lipids.

研究分野：植物発生遺伝学

キーワード：シロイヌナズナ ゼニゴケ 表皮 形態形成 細胞分化 転写因子

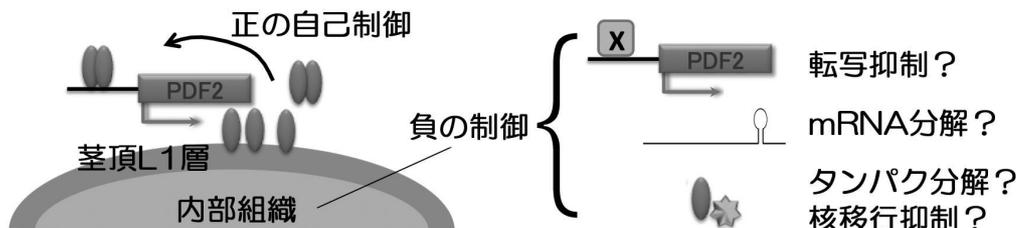
## 1. 研究開始当初の背景

高等植物の発生過程において、表皮は器官どうしの融合回避や外的環境からの防御など、形態形成や生育に必須の役割を果たす。本研究者らは、シロイヌナズナの茎頂表皮(L1層)に特異的に発現する遺伝子の発見をきっかけに、表皮細胞分化の分子基盤の解明を目指した研究を行い、L1層に特異的な発現を示す遺伝子上流に保存された配列「L1ボックス」を見つけた。L1ボックスにはホメオドメインをもつ転写因子 PDF2、ATML1 が結合し、その二重突然変異 *pdf2-1 atm1-1* は表皮細胞を欠くという表現型を示すことを明らかにして、PDF2 と ATML1 が地上部の表皮分化に中心的な役割を果たすことを証明した。さらに、PDF2、ATML1 の完全な機能欠損の二重変異は胚発生過程で致死になり、これらの少なくとも1つが植物の生存に必須であることを報告した。一方、PDF2、ATML1 が属する HD-ZIP IV ファミリーについて、全16遺伝子の発現様式や変異体の包括的な解析を行い、その多くが茎頂L1層や様々な器官の表皮で冗長的に機能していることを明らかにした。また、このファミリーに属する HDG1、2、5、12 が PDF2 と協調して花小器官の表皮で働き、小器官のアイデンティティーの決定に関与していることを示した。本研究者らが解明した、PDF2 と ATML1 の L1 ボックス配列への結合を介した表皮に特異的な遺伝子発現と表皮細胞の分化機構では、PDF2 と ATML1 の遺伝子発現自体が表皮に特異的であり、PDF2 と ATML1 自身の遺伝子プロモーターにも L1 ボックスがあることから、正の自己制御が示唆される。しかし、PDF2 や ATML1 の遺伝子発現が胚の初期発生過程で開始し、卵割に伴って表皮 L1 層に限定される仕組みは依然不明であり、表皮細胞分化の基盤がどのように確立するかという根源的な疑問は解決されていない。

他方、PDF2 相同遺伝子は、明確な表皮細胞を分化しないゼニゴケ(コケ植物)にも1遺伝子存在することが確認されているが、その解析は進んでいない。したがってその機能を明らかにすることは、維管束植物における表皮細胞の誕生、アイデンティティーの確立と維持の分子機構の解明に、重要な手がかりを与える研究になると予想される。

## 2. 研究の目的

本研究では、垂層分裂による細胞増殖や葉緑体の分化抑制など、維管束植物の表皮細胞に特有の現象をもたらした分子的基盤を明らかにすることを目標として、シロイヌナズナの地上器官表皮細胞において、表皮分化のマスター因子として機能する転写因子 ATML1、PDF2 の遺伝子発現が茎頂 L1 層に限定、維持される分子機構を明らかにする。これらの転写因子遺伝子の発現が茎頂 L1 層に限定、維持される分子機構については、正の自己制御を考慮すると、内部の細胞におけるこれらの遺伝子 mRNA あるいは遺伝子産物の分解や負の制御因子による発現または機能の抑制が想定され(下図)、そのような細胞間のシグナルの違いが生じる原因は、究極的には外的環境の影響に帰すると考えられる。こうした正の自己制御ループに基づく多細胞生物の発生プログラムは、きわめて本質的でありながら、植物では十分検討されていない。そこで ATML1、PDF2 の遺伝子 mRNA の消長、翻訳制御、タンパク質局在、他のタンパク質との相互作用について、詳細な解析をすすめる。さらに、ゲノム編集技術を利用して、ゼニゴケの PDF2 相同遺伝子破壊株を作出し、その解剖学的解析から機能解明を目指すとともに、陸上植物の表皮細胞の分化機構の起源に関する手がかりを得る。



## 3. 研究の方法

研究は3年計画として、以下の2課題を並行してすすめた。

(1) シロイヌナズナ PDF2、ATML1 遺伝子の転写及び転写後制御の解析: 表皮分化のマスター転写因子 PDF2、ATML1 の mRNA の消長、遺伝子産物と他の因子との相互作用について、胚発生過程を中心に詳細に調べる。

(2) ゼニゴケ PDF2 相同遺伝子の機能解析: レポーター遺伝子を用いた遺伝子発現解析と、ゲノム編集による遺伝子破壊株の作出、表現型観察に基づく機能解析をすすめる。

### (1)シロイヌナズナ PDF2、ATML1 遺伝子の転写及び転写後制御の解析

PDF2 やその相同遺伝子 ATML1 の発現が胚発生過程において L1 層に限定されるためには、L1 層より内側の細胞で発現が抑えられる必要がある。考えられる機構について、検証を行う。

#### PDF2の3' UTR による発現制御の解析

PDF2, ATML1を含むシロイヌナズナのHD-ZIP IVファミリー全16遺伝子のうち、10遺伝子の3'非翻訳領域には、保存された短い共通配列が認められる(Nakamura et al. 2006)。本研究からは、これをHDG(ヘッジ)ボックスと名付けた。各遺伝子の3'非翻訳領域をさらに詳しく調べたところ、いずれのHDGボックスにも逆向き相補配列が距離をおいて存在しており、ステムループ構造の2本鎖RNAを形成することが予想された。こうした構造は、ショウジョウバエなどの発生関連遺伝子の3'非翻訳領域にもしばしば認められ、mRNAの分解を介した発現制御に重要な役割を演じていることが知られる。胚のL1層より内側でHDGボックスが分解の標的になる可能性が考えられることから、発現への影響をみるために、GUSレポーター遺伝子にPDF2の3'非翻訳領域を融合した遺伝子を、PDF2プロモーターや構成的なCaMV35Sプロモーターなどの下流に連結したプラスミドを構築し、シロイヌナズナ植物への導入、形質転換株における発現パターンの解析を行う。

#### PDF2, ATML1と相互作用する因子の探索

PDF2, ATML1タンパク質が、胚のL1層より内側の細胞で核に局在せず機能できなくなるために、L1層だけで発現が維持される可能性も考えられる。PDF2, ATML1タンパク質が、胚のL1層で他の因子との相互作用によって活性化あるいはL1層より内側の細胞で他の因子との相互作用によって機能できなくなる可能性を考え、相互作用する因子を探索する。特にホメオドメインC末端側のSTART領域に注目し、脂質の探索をすすめる。

#### (2) ゼニゴケ PDF2 相同遺伝子の機能解析

ゼニゴケゲノム上に1つだけ存在するPDF2相同遺伝子について、そのプロモーターにGUSレポーター遺伝子をつないだ融合遺伝子を構築し、遺伝子発現解析をすすめるとともに、ゲノム編集による遺伝子破壊株の作出とその解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1)シロイヌナズナ PDF2, ATML1 遺伝子の転写及び転写後制御の解析

シロイヌナズナのHD-ZIP IVファミリーに属する10遺伝子の3'非翻訳領域に保存された短い共通配列HDGボックスの機能については、GUSレポーター遺伝子にPDF2の3'非翻訳領域を融合した遺伝子を構築し、シロイヌナズナへの導入、形質転換株の作出、解析を進めた結果、GUSの発現様式やmRNAの安定性に影響は認められなかった。その配列の存在意義に関する手ごかりは未だ得られていないが、ゼニゴケの相同遺伝子にも保存されていることから、さらにmRNAの消長について詳しい解析を継続する。

東京大学(阿部光知准教授)との共同研究において、シロイヌナズナの表皮最外層という位置情報の伝達経路は、マスター転写因子ATML1およびPDF2の転写時の制御というよりも翻訳後のタンパク質活性化/不活性化制御に作用点を持つということ、その制御にはスフィンゴ脂質との相互作用が必要であるということが強く示唆される結果を得た。すなわち、最外層という位置情報が最外層に特異的なスフィンゴ脂質によってマスター転写因子に伝えられた後、マスター転写因子が活性化することで内側の細胞ではなく最外層の細胞群のみが表皮細胞分化を起こすというしくみが明らかになった。

#### (2) ゼニゴケ PDF2 相同遺伝子の機能解析

シロイヌナズナの表皮細胞分化のマスター転写因子ATML1, PDF2のゼニゴケにおける相同遺伝子MpPDF2について、ゲノム編集による変異株の作出を試みてきたが、中央の機能領域(ホメオドメイン, STARTドメイン)を編集の標的とした変異株は全く得られず、致死になることが推定された。タンパク質の機能領域のさらにC末端側とmRNAの3'非翻訳領域を標的とした編集のための形質転換株の作出を追加し、選抜した結果、成長に著しい遅延の見られる形質転換株が得られた。MpPDF2プロモーターにレポーターをつないだ融合遺伝子をゼニゴケに導入し、発現解析を行った結果、MpPDF2は細胞分裂の盛んな領域で発現していることが推定された。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- (1) T. Okamoto, S. Takatani, Y. Noutoshi, H. Motose, and T. Takahashi  
Omeprazole enhances mechanical stress-induced root growth reduction in *Arabidopsis thaliana*.  
*Plant Cell Physiol.* 59 (2018) 1581-1591 (査読有)
- (2) T. Takahashi  
Thermospermine: an evolutionarily ancient but functionally new compound in plants.  
*Methods and Protocols, Methods Mol. Biol.* 1694 (2018) 51-59 (査読有)
- (3) K. Otani, K. Ishizaki, R. Nishihama, S. Takatani, T. Kohchi, T. Takahashi, and H. Motose  
An evolutionarily conserved NIMA-related kinase directs rhizoid tip growth in the basal land plant *Marchantia polymorpha*.  
*Development* 145 (2018) dev.154617 (査読有)
- (4) S. Takatani, S. Ozawa, N. Yagi, T. Hotta, T. Hashimoto, Y. Takahashi, T. Takahashi, H. Motose

Directional cell expansion requires NIMA-related kinase 6 (NEK6)-mediated cortical microtubule destabilization.

Sci. Rep. 7 (2017) 7826 (査読有)

(5) P.H. Masson, T. Takahashi, and R. Angelini

Editorial: Molecular mechanisms underlying polyamine functions in plants.

Front. Plant Sci. 8 (2017) 14 (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

(1) 岡本崇・松尾拓俊・本瀬宏康・高橋卓

サーモスペルミンとザイレミンを用いたシロイヌナズナ子葉の木部分化制御の解析

日本植物学会第82回大会(広島)2018年9月14-16日

(2) 磯山彰吾・古本拓也・本瀬宏康・高橋卓

シロイヌナズナの表皮分化に必須な *ATML1* と *PDF2* に相同なゼニゴケ遺伝子の解析

日本植物学会第82回大会(広島)2018年9月14-16日

(3) 永田賢司・高橋卓・阿部光知

シロイヌナズナ表皮細胞において脂質が伝達する位置情報シグナリングの解明

日本植物学会第82回大会(広島)2018年9月14-16日

(4) 岡本崇・能年義輝・高谷彰吾・本瀬宏康・高橋卓

ヒトのH<sup>+</sup>-ATPase 特異的阻害剤 Omeprazole はシロイヌナズナの根の機械的刺激感受性を高める

第59回日本植物生理学会年会(札幌)2018年3月28-30日

(5) 永田賢司・高橋卓・阿部光知

シロイヌナズナにおける特異的脂質による位置情報伝達機構の解析

第59回日本植物生理学会年会(札幌)2018年3月28-30日

(6) 永田賢司・高橋卓・阿部光知

シロイヌナズナ表皮細胞分化における鍵因子の脂質を介した機能制御機構の解明

第58回日本植物生理学会年会(鹿児島)2017年3月16-18日

(7) 永田賢司・高橋卓・阿部光知

シロイヌナズナ表皮細胞分化における鍵因子の脂質を介した機能制御機構の解明

第29回植物脂質シンポジウム(大阪)2016年11月25日

〔図書〕(計1件)

(1) 高橋卓

第10章-2 植物のからだ作り

鷲谷いづみ監修 基礎生物科学 培風館 (2016)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 本瀬 宏康

ローマ字氏名: Hiroyasu Motose

研究協力者氏名: 岡本 崇

ローマ字氏名: Takashi Okamoto

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。