

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15139

研究課題名(和文) 維管束篩部分化における、篩要素と篩伴細胞の同調性と細胞間コミュニケーションの解析

研究課題名(英文) The analysis of cell-cell communication during the phloem sieve element cell and companion cell development in Arabidopsis

研究代表者

宮島 かわり(古田かわり)(Miyashima, Kaori)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・特別研究員(RPD)

研究者番号：10746655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物維管束の細胞分化において、光合成産物の輸送路である篩要素細胞とその機能をサポートする篩伴細胞の細胞分化の同調性とその制御機構を明らかにすることを目的としている。本研究では機能的に緊密な篩要素細胞と篩伴細胞の機能的緊密性に重要な細胞間連絡路である原形質連絡が、細胞分化の過程において徐々に発達する様子を3次元走査型電子顕微鏡イメージングにより明らかにすることができた。

また本研究では、篩伴細胞で主に発現するが篩要素の最終分化直前に一過的に発現し、細胞自律的に篩要素の核消失を制御する因子SEEN1を同定した。SEEN1は核消失の完了に必要なNEN4の発現を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

維管束植物において光合成産物の輸送路である篩部組織では、輸送管である篩要素細胞とそれに隣接する篩伴細胞は、機能的に密接な関係にある。この細胞間の機能的緊密性が細胞分化の過程で獲得されるのかどうかはほとんど知見がなかった。本研究では、細胞分化プロセスに注目し、篩要素細胞と篩伴細胞の協調的な機能に重要な原形質連絡が細胞分化の過程で徐々に発達する様子を明らかにした。これにより、機能的に緊密な細胞の細胞分化における細胞間コミュニケーションを見出すことができたと考えられる。また、篩要素の細胞分化における核消失に必要な遺伝子を新たに同定した。

研究成果の概要(英文)：The sieve element cell and companion cell in plant vascular phloem are tightly communicated in their function. It is still unknown whether the sieve element cell and companion cell are closely communicated in their cell differentiation process. In this research, I found that the plasmodesmata, which is a channel the symplastic cell-cell communication in plant, is gradually developed along with the cell differentiation process of sieve element cell and companion cell. On the other hand, the cell-autonomous regulator of the enucleation of sieve element cell, SEEN1, was identified. The SEEN1 is expressed mainly in the phloem companion cells, but also in the one sieve element cell just before enucleation, and the sieve element-specific SEEN1 is enough to complement the enucleation phenotype of seen1 mutant. the SEEN1 positively regulates the NEN4, which is necessary for the completion of the sieve element enucleation.

研究分野：植物生長生理学

キーワード：植物 シロイヌナズナ 発生 維管束 篩部 細胞間コミュニケーション 同調性 細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

細胞間コミュニケーションは多細胞生物の形態形成において重要であり、維管束植物でも、発生に関わる様々な細胞間コミュニケーションが知られている。しかし、細胞機能的に緊密な異種細胞群が、それらの細胞分化を同調させるために細胞間コミュニケーションしているという知見は報告されていなかった。

維管束植物の光合成産物を輸送する篩部組織は、輸送管としての機能を担う篩要素と、篩要素を構造的・機能的にサポートする篩伴細胞が隣接して存在し、ユニットとして機能する。

篩要素は分化の最終過程で核消失を伴う細胞内消化がおこり輸送管としての機能を獲得する。本研究者は、これまでに篩要素の核消失が起こらない突然変異体、*sieve element enucleation1 (seen1)* を単離していた。*SEEN1* 遺伝子は維管束植物に保存される機能未知なタンパク質をコードし、その分子機能は全く不明であった。ただ、興味深いことに、研究開始当初は、*SEEN1* 遺伝子の発現は篩伴細胞でのみ観察されていた。これらのことから、篩要素の最終分化は篩伴細胞により細胞非自律的に制御されていると考えられた。これまでに、篩要素の最終分化が篩伴細胞により細胞非自律的に制御されるという知見はない。しかし、篩要素と篩伴細胞の細胞間では、多くの原形質連絡が構築されることから (Esau, 1969)、それらの細胞分化が細胞非自律的かつ同調的に進行している可能性は非常に高いと考えられた。

そこで、本研究では、機能的に緊密な篩要素と篩伴細胞の細胞分化過程における細胞間コミュニケーション機構、および、細胞分化の同調性に注目した。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、まず、(1)*SEEN1* 機能解析から、篩要素分化における篩要素と篩伴細胞の細胞間コミュニケーション機構を明らかにすること、さらに(2)篩要素と篩伴細胞の分化の同調性とそれら細胞間に構築される原形質連絡の構築過程を解明することを目的とした。

具体的には、(1) *SEEN1* を介した篩要素と篩伴細胞の細胞間コミュニケーション機構の解析では、*SEEN1* 遺伝子の分子生物学的解析および、*seen1* 突然変異体のサブレッサースクリーニングや *SEEN1* の相互作用因子の探索を行うことで、機能未知である *SEEN1* 遺伝子が、どのように細胞非自律的に篩要素分化を制御するか解明することを目的とした。

また、(2)篩要素と篩伴細胞の細胞分化の同調性と、それら細胞間の原形質連絡の構築過程の解明では、篩部分化における遺伝子発現レベルでの解析、および3次元走査型電子顕微鏡解析を用いた超微細構造の変化の解析から、篩要素と篩伴細胞の分化を解析し、それら細胞分化の同調性を見出すことを目的とした。特に、原形質連絡の発達に着目し、その発達段階を詳細に解析することとした。

## 3. 研究の方法

機能的に緊密な篩要素と篩伴細胞において、その細胞分化が、どのようにして同調的に成立するのか全く不明である。まず、(1) *SEEN1* を介した篩要素と篩伴細胞の細胞間コミュニケーション機構の解析では、*SEEN1* タンパク質の細胞内局在や、篩伴細胞から篩要素への移動の有無などを解析することにした。また *SEEN1* の分子作用を明らかにするために、*seen1* 突然変異体のサブレッサースクリーニングや、*SEEN1* の相互作用因子の探索を行うことにした。

また、(2)篩要素と篩伴細胞の細胞分化の同調性と、それら細胞間の原形質連絡の構築過程の解明については、篩要素と篩伴細胞の細胞分化の同調性自体が未解明であるため、篩要素と篩伴

細胞の細胞分化マーカーセットの作製とその相関性の解析、また篩要素と篩伴細胞の細胞形態変化の同調性の解析から明らかにすることとした。細胞形態の観察には、Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM)を用いた3次元走査型電子顕微鏡解析を行うこととした。

#### 4. 研究成果

##### (1) SEEN1 を介した篩要素と篩伴細胞の細胞間コミュニケーション機構の解析

まず、*SEEN1* 遺伝子の発現場所を詳細に解析した結果、*SEEN1* 遺伝子は篩伴細胞で主に発現するが、篩要素細胞でも最終分化直前に一過的に発現することが明らかとなった。篩要素特異的に *SEEN1* 遺伝子を発現させたところ、*seen1* 突然変異体の核消失異常の表現型が回復したため、*SEEN1* 遺伝子は細胞自律的に篩要素の細胞分化を制御していることがわかった。また、*SEEN1* タンパク質の細胞内局在を調べたところ plasmamembrane に局在することが分かった。

また、*SEEN1* が制御する篩要素細胞分化を詳細に明らかにするため、*seen1* 突然変異体の篩要素と篩伴細胞の細胞形態を3次元走査型電子顕微鏡解析から詳細に調べた。その結果、*seen1* 突然変異体では篩要素の核消失だけではなく、篩要素の細胞質基質の消失も起こっていないことが分かった。このことは、*SEEN1* 遺伝子は篩要素の核消失だけではなく、篩要素の最終分化そのものを制御することが分かった。

次に、*SEEN1* の機能を解析するために、*SEEN1* が制御する篩要素分化プロセスを詳細に解析した。*seen1* 突然変異体における篩要素分化マーカーの発現を解析した結果、細胞内消化の誘導因子である *NAC45* 遺伝子や、その下流で篩要素の核消失の完了に必要な *NEN4* 遺伝子の発現が観察された。つまり、*seen1* 突然変異体では篩要素分化の機能遺伝子は少なくとも発現しているが核消失が起こらないということが分かった。また、篩要素の細胞内消化が起こらない *nac45 nac86* 二重変異体で *SEEN1* 遺伝子が発現していることから、*SEEN1* 遺伝子は *NAC45* 遺伝子とは独立に核消失を制御していることが明らかとなった。

また、*SEEN1* タンパク質機能は、未知であることから、*seen1* 突然変異体のサプレッサースクリーニング、および酵母 two-hybrid アッセイによる相互作用因子の探索を研究開始時に計画していた。*seen1* 突然変異体のサプレッサースクリーニングについては複数個体を単離したものの、次世代でサプレッサーの表現型を明確に維持したものを得ることができなかった。また、酵母 two-hybrid アッセイによる相互作用因子の探索については、シロイヌナズナの全 cDNA ライブラリーを用いて実験を行う計画を立てたが、共同研究により転写因子ライブラリーを用いて実験が行えたため、転写因子ライブラリーを用いた実験を先行した。いくつかの候補因子を得たが、後ほど *SEEN1* の細胞内局在が plasmamembrane であることが明らかになり、転写因子との相互作用は生理的意味を持たない可能性が考えられた。

本研究から、研究開始時の予想と異なっていたが、篩要素細胞分化を細胞自律的に制御する新規遺伝子を同定することができた。この新規遺伝子は既存の細胞内消化制御機構とは別経路で機能していることが分かった。また、この遺伝子は篩要素の最終分化の直前のみで発現することから、篩要素の細胞内消化という不可逆的な細胞分化プロセスが厳密に制御されていることが明らかとなった。本研究内容は論文としてまとめる準備をしている。今後、相互作用因子などが明らかになれば、*SEEN1* タンパク質の機能も明らかとなり、*SEEN1* がどのように篩要素の細胞内消化を制御しているか明らかになると考えられる。

##### (2) 篩要素と篩伴細胞の細胞分化の同調性と、それら細胞間の原形質連絡の構築過程の解明

まず、篩要素や篩伴細胞特異的な遺伝子発現マーカーセットを作製した。篩要素マーカーについては、本研究者のこれまでの研究で用いてきた *APL* 遺伝子、*NAC45* 遺伝子、*NEN4* 遺伝子、他に、篩要素分化初期で発現する *PEAR1* 遺伝子の核マーカーを作製した。篩伴細胞マーカーについては、分化初期は *SAPL* 遺伝子、篩要素の核消失の時期は *APL* 遺伝子、分化後期は *SUC2* 遺伝子を用いてきたが、さらに篩伴細胞マーカーを得るために AREX データベースを用いて新規に数個の候補遺伝子をクローニングした。しかし、分化初期や中期の篩伴細胞で発現するマーカーは得られなかった。そこで上述の遺伝子を用い、GFP および RFP を用いて篩要素と篩伴細胞の分化マーカーを同時に可視化する系統を作製した。また、*seen1* 突然変異体および篩部分化に異常をもつ既知の突然変異体にこれらの分子マーカーを導入し、細胞分化の同調性を解析した。各突然変異体については解析途中であるが、少なくとも *seen1* 突然変異体で *SUC2* 遺伝子が発現していることから、篩要素の核消失異常は篩伴細胞分化に遺伝子発現レベルでは影響は与えないことが示唆された。このことは篩要素の核消失が起こらない *nac45 nac86* 二重変異体で *SUC2* 遺伝子が発現していることから裏付けられる。また、*SEEN1* 遺伝子は、篩要素では最終分化直前しか発現しないが、篩伴細胞では分化初期から発現している。しかし、*seen1* 突然変異体で篩伴細胞の分化後期で発現する *SUC2* 遺伝子が発現していることから、*SEEN1* 遺伝子は篩伴細胞分化に遺伝子発現レベルでは影響は与えないことが示唆された。

次に、篩要素と篩伴細胞の細胞分化の同調性として、篩要素と篩伴細胞の間の原形質連絡を観察した。篩伴細胞は、形態学的に、篩要素との原形質連絡が多く、細胞質(リボソーム、ミトコンドリアなど)の密度が高いという特徴が報告されている(Esau, 1969)。特に篩要素と篩伴細胞の細胞機能として、篩要素と篩伴細胞の間の原形質連絡は重要である。そこで、3次元の走査型電子顕微鏡解析により、原形質連絡の発達過程を観察した。その結果、篩要素と篩伴細胞の間の原形質連絡は、細胞分化の過程で徐々に発達していく様子が観察された。このことから、機能的に緊密な篩要素と篩伴細胞において、細胞分化の同調性があることが示唆された。また、篩要素と篩伴細胞の細胞間の原形質連絡を阻害し、篩要素細胞分化過程における原形質連絡の重要性を見出すために、分化初期の篩伴細胞で発現する *SAPL* 遺伝子のプロモーター下で、カロース合成酵素遺伝子 *CASL3* の優性変異を利用した原形質連絡阻害ツール(*icals3m* 系; Våten et al., 2011)を誘導的に発現させる系統に、篩要素や篩伴細胞の細胞分化マーカーを導入した。解析途中であるが異常が見出されており、篩部形成における原形質連絡の重要性が推定された。

研究開始時には、遺伝子マーカーの作製の他に、3次元の走査型電子顕微鏡解析により篩部分化過程での篩伴細胞の細胞内変化を観察することで、篩伴細胞分化過程を明らかにすることも計画していたが、研究対象としているシロイヌナズナの根端は分裂活性が高く未分化な細胞が多いため、細胞質のオルガネラの密度からは篩伴細胞や篩伴細胞の細胞分化における細胞内変化を特定することはできなかった。

本研究から、細胞機能に重要な篩要素と篩伴細胞の間の原形質連絡が、細胞分化の過程で徐々に発達していくことが初めて明らかとなり、原形質連絡形成において篩要素と篩伴細胞の細胞分化の同調性が示唆された。しかし、篩要素の核消失は篩伴細胞の細胞分化に遺伝子発現レベルでは影響を与えないなど細胞分化が独立に制御されている様子も観察され、篩要素と篩伴細胞の細胞分化の同調性と独立性が明らかとなった。今後は篩要素と篩伴細胞の間で原形質連絡の発達を制御する機構などが明らかになれば、原形質連絡形成における篩要素と篩伴細胞の細胞分化の同調性がより理解できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古田かおり、宮島俊介、Ilya Belevich, Yka Helariutta, Eija Jokitalo, 中島敬二
2. 発表標題 維管束の篩要素における核消失を伴う細胞分化の新規制御機構
3. 学会等名 日本植物学会 第82回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University of Cambridge			
フィンランド	University of Helsinki			