

機関番号：12601

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2006～2010

課題番号：18GS0313

研究課題名（和文）器官サイズ制御の分子基盤—補償作用の分子遺伝学的解明

研究課題名（英文）Molecular basis of regulation of organ size

----Molecular genetic approaches to reveal mechanisms of compensation

研究代表者

塚谷 裕一（TSUKAYA HIROKAZU）

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：90260512

研究成果の概要（和文）：

葉原基で細胞分裂能に異常が生じて細胞数が不足すると、細胞サイズが通常より大型化する現象を、私たちは補償作用と呼んでいる。この補償作用という現象が、細胞分裂能に関する情報の細胞間伝達によって引き起こされていることを、キメラ解析系を樹立して初めて示すことに成功したほか、補償作用の背景となっている遺伝子経路を新たに数多く同定することができた。また葉原基の中での細胞分裂領域と細胞伸長領域の空間配置制御についても明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Our studies on mechanisms of leaf development have revealed that an unknown system integrates activities of cell proliferation and cell expansion in leaves, depending on non-cell autonomous regulations. We also showed that gene expression not only regulates leaf form, but the resulting organ shape also secondarily regulates gene expression in a particular part of the organ primordium. These findings strongly indicate importance of understanding of the organ-level integration of cell behaviors to reveal mechanisms of organogenesis in multicellular organs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	65,100,000	19,530,000	84,630,000
2007年度	61,600,000	18,480,000	80,080,000
2008年度	61,600,000	18,480,000	80,080,000
2009年度	52,800,000	15,840,000	68,640,000
2010年度	52,800,000	15,840,000	68,640,000
総計	293,900,000	88,170,000	382,070,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学（5806）

キーワード：器官サイズ、発生・分化、葉、補償作用

1. 研究開始当初の背景

器官レベルの制御は、細胞レベルの制御の単純な積み重ねではないことが、近年、明らかとなってきた。植物の葉においては、細胞周期の制御に異常を与え、細胞の供給が低下

した状態にしても、葉のサイズは、細胞数の減少から計算されるほどには減少しない。これは、原因不明の細胞肥大が異常に亢進して、細胞数の減少を相殺するからである。細胞レベルでの制御を超えた、器官レベルでの統合

的制御を強く受けていることが、上記のような事例から、確かとなってきている。この器官サイズの制御という重要課題の解明には、これまでにない、器官レベルの制御という、新たな発想に基づく研究を緊急に必要としていた。

2. 研究の目的

器官サイズの制御という重要課題の解明。そしてその成功を通して、これまでの、細胞の振る舞いを基盤とした形態形成という概念を、大きく変え、生命体の形作りの仕組みに対する理解を劇的に変化させること。

3. 研究の方法

シロイヌナズナについて、補償作用を明瞭に示す変異体についての、細胞分裂と細胞伸長の発生過程におけるカイネティックスの解明；補償作用能を欠損した変異体を単離し、どのような分子基盤に依存しているのか、また、なぜ細胞数の現象がこうした原因遺伝子の作用を引き起こすのかの解明；器官レベルでの細胞数のモニタリングが、何をもって、どのようになされているのかの解明。

4. 研究成果

まず第1に、葉の原基において、キメラ解析系を樹立することで、個々の細胞の振る舞いを器官レベルで統合する、細胞非自律的な細胞間コミュニケーションが実在することの証明に成功した。これは従来の、葉の発生制御に関する理解を大きく塗り替える発見であり、世界的に注目を集めた。また葉原基の中での細胞分裂領域と細胞伸長領域の空間配置制御についても、従来の理解の誤りを2つ訂正すると同時に、これに関連して、葉の原基の「境界」と「位置価」に関わる因子の重要性を示す新たなデータを多数見いだした。また、シロイヌナズナのようなモデル植物が持つ葉とは異なる形態形成メカニズムを持つ植物種の葉について、その形態形成機構を解析する中で、従来のモデル種の解析から提唱されてきた概念的モデルの中に、修正すべき点を複数見だし、遺伝子発現が形を作り上げていくだけでなく、できあがった形状が逆に、その特定の位置の細胞での遺伝子発現を促す可能性も発見した。さらに補償作用の背景となっている遺伝子経路を新たに数多く同定することができた。

加えて、当初から補償作用を引き起こすことで注目してきた *an3* 変異の原因遺伝子・*AN3* について、単に葉の細胞分裂のアクセル因子であるだけでなく、想像以上に葉の発生にとって根幹的な因子であること、すなわち背腹性の決定あるいは葉としてのアイデンティティの決定にも、重要な鍵因子であることを見だし、発表した。これらの成果もま

た、世界的に大きな注目を集めている。

今後に関しては、こうして得られた新たなブレイクスルーを元に、〈葉原基の位置価に基づくホロニック制御機構の解明〉を目指している。その具体的標的は4点あり、葉原基において、ペプチド性因子が位置価決定を制御するその仕組み、細胞分裂過程と細胞伸長過程とをつなぐ細胞間コミュニケーションの正体の解明、平面成長に関する位置価決定因子と、葉としてのアイデンティティ、胚発生における頂端側アイデンティティの決定機構の解明である。これらを併せて解明することで、植物器官の形態形成に関する最大の謎、位置価決定と形態・サイズのホロニック制御の分子実体が理解されると期待している。

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 70 件)

① Ikeuchi M, Yamaguchi T, Kazama T, Ito T, Horiguchi G, and Tsukaya H. (2011)

ROTUNDIFOLIA4 regulates cell proliferation along the body axis in Arabidopsis shoot. *Plant Cell Physiol.* (査読有) 52: 59-69.

② Horiguchi G, Nakayama H, Ishikawa N, Kubo M, Demura T, Fukuda H, and Tsukaya H.

(2011) ANGUSTIFOLIA3 plays roles in adaxial/abaxial patterning and growth in leaf morphogenesis. *Plant Cell Physiol.* (査読有) 52: 112-124.

③ Horiguchi G, Mollá-Morales A, Pérez-Pérez JM, Kojima K, Robles P, Ponce MR, Micol JL, and Tsukaya H. (2011)

Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant J.* (査読有) 65: 724-736.

④ Ferjani A, Segami S, Horiguchi G, Muto Y, Maeshima M, Tsukaya H. (2011) Keep an eye on P_i: The vacuolar-type

H⁺-pyrophosphatase regulates post-germinative development in

Arabidopsis. *Plant Cell* (査読有) 23: 2895-2908.

⑤ Ichihashi Y, Kawade K, Usami T, Horiguchi G, Takahashi T, Tsukaya H. (2011) Key proliferative activity in the junction between the leaf blade and the leaf petiole of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Phys.* (査読有) 157: 1151-1162.

⑥ Minamisawa N, Sato M, Cho K-H, Ueno H, Takeuchi K, Kajiwara M, Yamato KT, Ohyama K, Toyooka K, Kim G-T, Horiguchi G, Takano H, Ueda T, and Tsukaya H. (2011) AUNGUSTIFOLIA, a plant homolog of CtBP/BARS, functions outside the nucleus. *Plant J.* (査読有) 68: 788-799.

⑦ Nelissen H., Fleury D., De Groeve, S., Bruno, L., Yamaguchi, T., Prinsen E., Cnops, G., Neyt, P., Bitonti, B., De Block, M., Witters, E., De Jaeger, G., Tsukaya, H., Houben, A. and Van Lijsebettens M. (2010) Plant Elongator regulates auxin-related genes during RNA polymerase II transcription elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* (査読有) 107: 1678-1683

⑧ Ichihashi Y, Horiguchi G, Gleissberg S, Tsukaya H. (2010) The bHLH transcription factor SPATULA controls final leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* (査読有) 51: 252-261.

⑨ Kawamura E, Horiguchi G, Tsukaya H. (2010) Mechanisms of leaf tooth formation in Arabidopsis. *Plant J.* (査読有) 62: 429-441

⑩ Kazama T, Ichihashi Y, Murata S, Tsukaya H. (2010) The mechanism of cell cycle arrest front progression explained by a KLUH/CYP78A5-dependent mobile growth factor in developing leaves of *Arabidopsis*

thaliana. *Plant Cell Physiol.* (査読有) 51: 1046-1054.

⑪ Furumizu C, Tsukaya H, Komeda Y. (2010) Characterization of EMU, the Arabidopsis homolog of the yeast THO complex member HPR1. *RNA* (査読有) 16: 1809-1817.

⑫ Kawade K, Horiguchi G and Tsukaya H. (2010) Non-cell-autonomously coordinated organ-size regulation in leaf development. *Development* (査読有) 137: 4221-4227

⑬ Usami T, Horiguchi G, Yano S and Tsukaya H (2009) The *more and smaller cells* mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* genes in the control of heteroblasty. *Development* (査読有) 136: 955-964.

⑭ Fujikura U, Horiguchi G, Ponce MR, Micol, JL, and Tsukaya H. (2009) Coordination of cell proliferation and cell expansion mediated by ribosome-related processes in the leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* (査読有) 59: 499-508

⑮ Horiguchi G, Gonzalez N, Beemster GTS, Inzé D, and Tsukaya H. (2009) Impact of segmental chromosomal duplications on leaf size in the *grandifolia-D* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* (査読有) 60: 122-133.

⑯ Lin X, Minamisawa N, Takechi K, Zhang W, Sato H, Takio S, Tsukaya H and Takano H. (2008) Isolation and characterization of the *Larix gmelini* ANGUSTIFOLIA (*LgAN*) gene. *Planta* (査読有) 228: 601-608.

⑰ Nagano AJ, Fukasawa M., Hayashi M., Ikeuchi M., Tsukaya H, Nishimura M., Hara-Nishimura I (2008) AtMap1: a DNA Microarray for Genomic Deletion Mapping in

Arabidopsis thaliana. *Plant J.* (査読有) 56: 1058-1065.

⑱ Fujikura U., Horiguchi, G., Tsukaya, H. (2007) Dissection of enhanced cell expansion processes in leaves triggered by defect in cell proliferation, with reference to roles of endoreduplication. *Plant Cell Physiol.* (査読有) 48: 278-286.

⑲ Ferjani, A., Satoshi, Y., Horiguchi, G., and Tsukaya, H. (2007) Analysis of leaf development in *fugu* mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant Physiol.* (査読有) 144: 988-999.

⑳ Fujikura U., Horiguchi G., Tsukaya H. (2007) Genetic relationship between *angustifolia3* and *extra-small sisters* highlights novel mechanisms controlling leaf size. *Plant Signaling & Behavior* (査読有) 2(5): 378-380.

㉑ Cho, K.-H., Choi, H., Seki, M., Jun, S. E., Yi, Y. B., Shinozaki, K., Tsukaya, H., and Kim, G.-T. (2007) DRL regulates adaxial leaf patterning and shoot apical meristem activity in *Arabidopsis*. *J. Plant Biol.* (査読有) 50: 467-474.

㉒ Stern MD., Aihara H., Cho K-H., Kim G-T., Horiguchi G., Roccaro GA., Guevara E., Sun J., Negeri D., Tsukaya H., Nibu Y. (2007) Structurally related *Arabidopsis* ANGUSTIFOLIA is functionally distinct from the transcriptional corepressor CtBP. *Dev, Genes & Evol.* (査読有) 217: 759-769.

㉓ Breuer C., Stacey NJ., Roberts G., West CE., Zhao Y., Chory J., Tsukaya H., Azumi Y., Maxwell A., Roberts K., Sugimoto-Shirasu K.

(2007) BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, is required for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Plant Cell* (査読有) 19: 3655-3668.

㉔ Horiguchi G., Ferjani A., Fujikura U., and Tsukaya H. (2006) Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* (査読有) 119: 37-42

㉕ Horiguchi G., Fujikura U., Ferjani A., Ishikawa N., Tsukaya H. (2006) Large-scale histological analysis of leaf mutants using two simple leaf observation methods: identification of novel genetic pathways governing the size shape of leaves. *Plant J.* (査読有) 48: 638-644.

[学会発表] (計 181 件)

① Hirokazu Tsukaya “Developmental biologists and ‘housekeeping genes’: the whys and wherefores” 2011 July 28

② Gorou Horiguchi “General and specific roles of the ribosome in leaf development” 2011 July 28

③ Kensuke Kawade “Inter-cell-layer movement of ANGUSTIFOLIA3 coordinates cell proliferation between clonally distinct tissues in leaves” 2011 July 29

④ Ali Ferjani “Removal of Cytosolic P₁i is a Prerequisite for Proper Resumption of Post-Germinative Development in *Arabidopsis thaliana*” 2011 July 29

以上 XVIII INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS 2011, Melbourne, Australia

⑤ Hirokazu Tsukaya “Integration of cell proliferation and cell expansion in leaf organogenesis” Symposium “Regulation

of Plant Growth from CELLS to ORGANS to ORGANISMS” April 13, 2010 Universität Potsdam, Potsdam, Germany

⑥ Kensuke Kawade “CHARACTERIZATION OF INTERCELLULAR SIGNALING THAT COORDINATES CELL PROLIFERATION WITH POST-MITOTIC CELL EXPANSION DURING LEAF DEVELOPMENT” 21st International Conference on Arabidopsis Research June 6-10, 2010 Pacifico Yokohama

⑦ Kensuke Kawade “Leaf size is regulated by a cell-autonomous system linking cell proliferation and post-mitotic cell enlargement” 20th International Conference on *Arabidopsis Research* 1 July 2009 Edinburgh, Scotland, United Kingdom

⑧ Tsukaya, H. “Integration of local information on leaf organogenesis” Plant Growth Biology and Modeling workshop 14 October, 2009 Centro de Congresos “Ciutat d’ Elx” Elche, Spain

⑨ Ferjani, Ali “Effect of sucrose on compensated cell enlargement in *fugu5* mutant cotyledons” July 23-27, 2008

⑩ Horiguchi, Gorou “Gdp1, a putative RNA-binding protein, participates in the control of leaf shape and cell proliferation” July 23-27, 2008

⑪ Kawamura, Eiko “Developmental analysis on the tooth in Arabidopsis” July 23-27, 2008

⑫ H. Tsukaya “Unknown relationship between leaf-cell size and ploidy level” July 23-27, 2008

以上 19th International Conference on Arabidopsis Research. Montreal, Canada

⑬ Takahiro Yamaguchi “Evolutionary Developmental Studies on Unifacial Leaves in Monocots” Sep. 13, 2008.

⑭ Ali Ferjani “FUGU5/AVP1 Activity Is Essential for Post-Germinative Growth and Organ-Size Control in Arabidopsis” Sep. 13, 2008.

⑮ Gorou Horiguchi “*ANGUSTIFOLIA3* Plays a Role in the Growth and Patterning of Leaf through Nucleolar Functions” Sep. 13, 2008.

⑯ Takeshi Usami “The *more and smaller cells* Mutants of *Arabidopsis thaliana* Identify Novel Roles of *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* Genes in the Control of Heteroblasty” Sep. 13, 2008.

⑰ Eiko Kawamura “Developmental Analysis of Tooth in Arabidopsis” Sep. 13, 2008.

⑱ Yasunori Ichihashi “Leaf Meristem: Meristematic Region that Supplies Cells Bidirectionally to Form Leaf Blade and Petiole” Sep. 13, 2008.

以上 The 55th NIBB Conference Arabidopsis Workshop 2008 “Frontiers of Plant Science in the 21st Century” Okazaki Conference Center

⑲ Hirokazu Tsukaya “Genetic Basis of Leaf Shape/Size Evolution” The 8th NIBB-EMBL Joint Meeting Evolution:Genomes, Cell Types and Shapes Nov. 21-23 2008. Okazaki Conference Center

⑳ Hirokazu Tsukaya “Organ size, cell size and ploidy: how an increase in ploidy promotes cell and organ growth?” 18th International Conference of Arabidopsis Research June 20-23, 2007 Beijing, China

㉑ Tsukaya, Hirokazu “How leaf size and shape are controlled? • • • Genetic analyses

of Arabidopsis mutants as an attempt to answer the question” Plant Biology & Botany 2007 JOINT CONGRESS July 9, 2007 Hilton Chicago, U. S. A.

⑳ Hirokazu Tsukaya “Mechanisms of leaf size evolution in terms of ploidy level” Pre-Symposium of East Asian Society of Plant Taxonomists “Evo-Devo & Phylogenetics, Regional Floristic Studies” Oct. 5, 2007 Chungbuk National University, Chung-Ju, Korea

㉑ 塚谷裕一 “細胞増殖停止と生命現象 植物の葉における細胞増殖停止と細胞伸長” 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学大会合同大会 Dec. 11-15, 2007 パシフィコ横浜ヨコハマグランドインターコンチネンタルホテル

㉒ 塚谷裕一 “Organ-level control of cell proliferation/enlargement in leaf morphogenesis” Apr. 10-12, 2006

㉓ Ali Ferjani “Cross-talks between cell proliferation and cell expansion in leaf development” Apr. 10-12, 2006

㉔ 堀口吾朗 “Too few cells are too much for the plant: organ-wide regulation of leaf size” Apr. 10-12, 2006

以上、CDB Symposium 2006 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 神戸市

㉕ Ali Ferjani “Coordination of cell proliferation and cell expansion processes in leaf size determination”

XV Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology 17-21 July 2006 Lyon

㉖ Gorou Hoiguchi “Too few cells are too much for the plant: organ-wide regulation of leaf size” FASEB summer research conferences 12-17 August 2006 Vermont

㉗ 塚谷裕一 “葉の器官サイズの制御と補償作用：多細胞系における細胞増殖と細胞伸長との統合システム”日本分子生物学会 2006 フ

オーラム Dec.6-8 2006 名古屋国際会議場 名古屋市

〔図書〕(計8件)

① Tsukaya H. (2008) Orchidaceae. In: “Flora of Mustang” eds. by Ohba H, Iokaya Y, and Raj Sharma, L. Kodansha Scientific Ltd., Tokyo, pp. 471-482.

② Fejani, A., Yano, S, Horiguchi, G. and Tsukaya, H. (2008) Control of leaf morphogenesis by long- and short-distance signaling: differentiation of leaves into sun or shade types and compensated cell enlargement *In: Plant Growth Signaling*, Eds. by L. Bögre & G.T.S. Beemster (Plant Cell Monograph series, #10), pp. 47-62. Springer.

③ Tsukaya H. (2006). A new member of the CtBP/BARS family from plants: *Angustifolia*. In: CtBP Family Proteins, Chapter 12, G. Chinnadurai (ed.). G. Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA. pp.112-118.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/bionev2/jp/index-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚谷 裕一 (TSUKAYA HIROKAZU)
東京大学大学院理学系研究科・教授
研究者番号：90260512

(2) 研究分担者

堀口 吾朗 (HORIGUCHI GORO)
立教大学・理学部生命理学科・准教授
研究者番号：70342847

山口 貴大 (YAMAGUCHI TAKAHIRO)
東京大学大学院理学系研究科・特任研究員
研究者番号：60450201

フェルジャニ アリ (Ferjani Ali)
東京学芸大学・教育学部・助教
研究者番号：20530380