

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06286

研究課題名（和文）最外層の細胞を表皮へと分化させる位置情報の解明

研究課題名（英文）Positional information that guides epidermal cell specification in the outermost cells

研究代表者

高田 忍 (Takada, Shinobu)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：40456992

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）：陸上植物は、葉の表面に防御組織である表皮を作り、乾燥や感染から身を守っている。多くの植物では、葉の一番外側の細胞のみから表皮が作られるが、そのしくみは分かっていなかった。本研究では、葉の内側の細胞（葉肉細胞）を表面に露出させると、葉肉細胞で表皮を作る遺伝子ATML1が活性化され、葉肉細胞が表皮運命を獲得することを発見した。つまり葉の表面に位置した細胞は、その系譜とは無関係に表皮の性質を持つようになった。次に、植物細胞が自分の位置を知るしくみを調べたところ、植物細胞は外側からの物理的な力を感じることで、自分が内側にいると判断し、表皮へと変化しないようにしていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉の表面の細胞だけが表皮になることは約50年前から既に知られていた。しかし、植物細胞が「表面」の位置を認識するしくみは分かっていなかった。本研究はこの植物発生における長年にわたる謎を解明したものである。現在まで、植物が自分の位置を知るための目印（位置情報）の多くは未解明であり、「物理的な圧迫」が葉の内側と表面の細胞運命を決める目印になっているという知見は、植物細胞分化研究に広く応用できる。また、植物細胞の運命を自由にコントロールすることで、表皮のみに作られる二次代謝産物等の大量生産が可能になるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：In land plants, the shoot epidermis covers the surface of the leaves to protect them from desiccation and pathogen attack. In many plant species, the shoot epidermis is formed only from the outermost cells of the aerial organs. However, the mechanisms by which only the outermost cells are specified as the epidermis have remained unknown. In this study, we found that when the inner mesophyll cells of the leaves were exposed to the surface, these outermost mesophyll cells upregulate the expression of an epidermal fate promoting gene, ATML1. This observation indicates that cells located on the organ surface develop into the epidermis irrespectively of their origin. How do plant cells know they are on the surface? This study suggested that plant cells recognize that they are located in the inner tissues of the leaves by sensing physical forces from the outside, preventing them from differentiating into the epidermis.

研究分野：植物発生生物学

キーワード：位置情報 表皮分化 マスター転写因子 シロイヌナズナ 転写後調節 植物細胞運命の決定

1. 研究開始当初の背景

植物細胞運命の決定には、細胞の系譜よりも、個体内での最終的な細胞の「位置」が重要であることが示唆されている。つまり、植物細胞は何らかの目印（位置情報）を指標に個体内で自分の置かれた位置を認識して、適切な細胞へと分化している。しかし、植物細胞の位置依存的な遺伝子発現・細胞分化を決める位置情報の多くは分かっていない。

陸上植物の地上部の表皮は、植物を乾燥や病原菌の感染・食害などから守る防御組織であり、内側に作られる光合成組織（葉肉組織）とは異なる役割を持つ。面白いことに、多くの植物において、表皮細胞は器官の最外層の細胞のみから作られる。この発生学的にユニークな性質から、表皮分化は位置に応じた細胞分化を研究するための良いモデルとなっている。50 年近く前におこなわれた細胞系譜解析により、葉の表皮細胞が並層分裂して内側と外側の娘細胞に分かれると、内側の娘細胞は表皮運命を失い、葉肉細胞として分化することが示された。つまり表皮細胞運命は最外層の細胞のみで維持されるようである。しかし、細胞が最外層の位置を認識するメカニズムや、表皮運命と葉肉細胞運命を決める分子的な実体は分かっていなかった（総説 Takada and Iida, 2014 *Frontiers in Plant Science*）。

シロイヌナズナの *ATML1* 遺伝子は、HD-ZIP class IV 転写因子をコードし、初期胚の時期から最外層の細胞で強く転写される (Takada and Jürgens, 2007 *Development*; 総説 Iida and Takada, 2020 *Plants*)。 *ATML1* とそのホモログ *PDF2* の二重変異体では、葉の表皮分化ができなくなり、表皮の無い葉が作られる。我々は、*ATML1* の構成的に発現させると、葉の内側の組織にも、気孔の孔辺細胞や毛状突起といった、地上部の表皮の特徴を持つ細胞が作られることを示した (Takada et al, 2013 *Development*)。これらの結果は、*ATML1* が表皮分化のマスタータンパク質であることを示唆する。さらに、*ATML1* が内側の細胞で弱く転写されても *ATML1* タンパク質は蓄積しにくいことや、*ATML1* タンパク質が細胞質と核に存在し、胚の内層の細胞では核局在が弱くなることを発見した (Iida et al, 2019 *Development*)。胚の表皮細胞が並層分裂すると、内側の細胞で *ATML1* タンパク質の蓄積や核局在が減少したことから、50 年前に示されていた位置依存的な表皮運命の消失メカニズムの一つは、内側の組織における *ATML1* の活性抑制であることを見出した (Iida et al, 2019 *Development*)。しかしながら、*ATML1* の最外層特異的な転写を指示する位置情報の正体は未解明のままであった。*ATML1* の表皮特異的な転写にはオーキシンや miRNA などの既知のモルフォゲン分子が関わっていないことも分かっており、未知のシグナル伝達経路の関与が示唆される。(Takada and Jürgens, 2007 *Development*; Nodine and Bartel, 2010 *Genes & Development*)。

2. 研究の目的

上記のように、*ATML1* の活性は、転写・転写後レベルで「位置」に応じて厳密に調節されていることから、位置情報の作用点になっている可能性が高い。本研究の目的は、*ATML1* の活性を調節する上流のシグナルを同定することで、最外層特異的な表皮分化に必要な、位置情報の実体を明らかにすることである。また、*ATML1* の下流で *ATML1* の活性を適正なレベルに調節するフィードバック調節分子の同定もおこない、表皮における *ATML1* の活性を決める分子機構の全容を解明する。

3. 研究の方法

本研究では、まず (1) *ATML1* の最外層依存的な転写や表皮分化を新規に誘導する系を確立する。そして、(2) この系を利用した薬理的な実験や物理的な圧迫実験により *ATML1* の最外層依存的な転写誘導に必要なシグナルやその伝達経路を明らかにする。また、*ATML1* の活性は正負のフィードバック調節によって適正なレベルに保たれていることが示唆されている (San-Bento et al, 2014 *Plant Journal*)。そこで、(3) RNA-seq 解析により *ATML1* の過剰発現によって発現が上昇する遺伝子を網羅的に同定し、発現解析や過剰発現実験、機能欠失変異体の解析をおこなうことで、*ATML1* の活性をフィードバック調節する下流遺伝子候補の選抜をおこなう。

4. 研究成果

(1) 葉肉細胞における *ATML1* の転写・表皮再生誘導系の確立

研究代表者たちの研究グループでは、シロイヌナズナの本葉の表皮を剥ぎ、葉肉細胞を葉の表面に露出させると、最外層になった葉肉細胞で *ATML1* の転写が増加する現象を発見していた (図 1; RISE: Rapid induction of surface *ATML1* expression)。そこで、鋭い針を使って若い葉の表皮に広範囲で傷をつけると、内側の葉肉細胞が *ATML1* を発現するようになり、葉肉細胞から表皮が再生されることが分かった。この傷害誘導性の表皮再生は葉の齢に依存しており、若い葉では表皮の

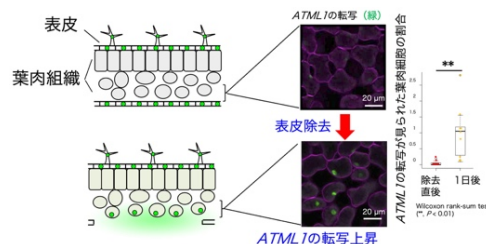


図 1 RISE

葉肉細胞を表面に露出させると *ATML1* のプロモーター活性が上昇する。この上昇は微小管重合阻害剤や、MAPK 阻害剤で抑制される。

傷害により葉肉細胞で *ATML1* タンパク質の蓄積や表皮の分化誘導が見られるのに対し、成熟した葉の葉肉細胞では RISE による *ATML1* の転写上昇は見られるものの、*ATML1* タンパク質の蓄積も表皮の再生も見られなかった。これは葉肉細胞の分化転換のポテンシャルが葉の成熟とともに低下することを意味している。最外層依存性の表皮再生は、若い葉が傷ついた時、防御組織である表皮を速やかに再生・修復することで葉を守り、光合成能力を維持するメカニズムなのかもしれない。いずれにせよ、RISE は位置依存的な遺伝子発現や細胞分化を誘導・可視化できる初めての系である。

(2) RISE に必要な条件の解明

RISE を用いて、最外層依存性の *ATML1* の転写活性化に必要なシグナルの探索をおこなった。阻害剤を用いた観察により、RISE には、MAPK シグナル、表層微小管束の形成、プロテアソームの活性が必要であることが示唆された。また、葉の表皮を除いた時、露出した葉肉細胞が葉の表面方向へと突出・伸長する現象が観察された。これは、葉肉細胞は外側の表皮組織によって圧迫されており、表皮を取り除くことで、葉肉細胞がこの圧迫から開放されたことを意味する。そこで、圧迫からの解放が、葉肉細胞における *ATML1* の発現上昇に必要なかどうかを調べた。表皮を取り除いた葉を二枚のカバーガラスで挟み、クリップを使って圧迫すると、葉肉細胞の突出も *ATML1* の転写上昇も抑制されることが分かった (図 3)。また、細胞の伸長が阻害される高浸透圧液下でも、表皮除去後の葉肉細胞に

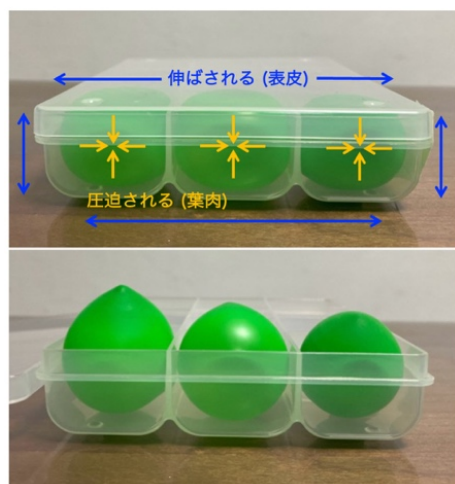


図 4 物理的な力の違いが表皮運命と葉肉運命を分ける目印になっている。緑色の風船は葉肉細胞を、透明の容器は表皮を模している。圧迫から解放されると葉肉細胞は伸長し、表皮運命を獲得する。

(2) *ATML1* の活性をフィードバック調節する下流遺伝子の解析

研究代表者のグループでは、これまでに、*ATML1* 過剰発現体のサプレッサー変異体やエンハンサー変異体を単離することで、*ATML1* の転写後調節に関わる候補遺伝子の同定をおこなってきた。一方、*ATML1* の活性は正負のフィードバック調節によって適正なレベルに保たれていることが示唆されている。そこで、本研究では、*ATML1* の下流遺伝子から、*ATML1* の活性を調節する遺伝子の探索をおこなった。RNA-seq 解析により、*ATML1* の過剰発現によって有意に発現が変動する遺伝子を同定し、*ATML1* の下流遺伝子候補 (*DTL* 遺伝子) とした。それらの候補の中で、公開されている RNA-seq データで表皮時的な発現パターンを示す遺伝子を選び、RT-qPCR 解析をおこなった。RT-qPCR 解析の結果、*atml1 pdf2* 変異体で発現が減少していた遺伝子に注目してさらなる解析をおこなった。レポーター遺伝子を用いた発現解析の結果、*DTL4* と *DTL5* 遺伝子は胚や葉の表皮で強く転写されることが分かった。また、*DTL4* と *DTL5* 遺伝子を芽生えで過剰発現したところ、表皮分化が抑制され、表皮が脱分化したような表現型が見られた (図 5)。このことから、*DTL4*

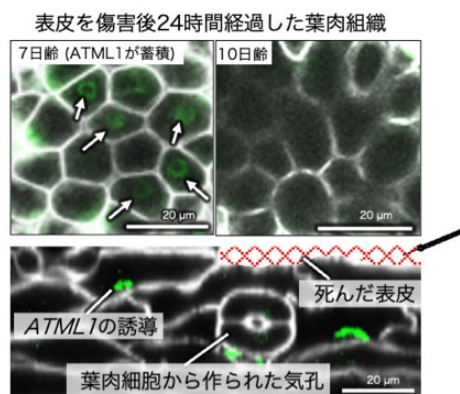


図 2 葉肉細胞からの表皮再生

6 日齢植物の第 1 本葉の表皮を傷つけると、1 日後には最外層の葉肉細胞が *ATML1* タンパク質を蓄積し (左上; 矢印)、5 日後には表皮細胞に分化する (下)。9 日齢植物に同じ処理をしても *ATML1* の蓄積や表皮の再生は起こらない (右上)。

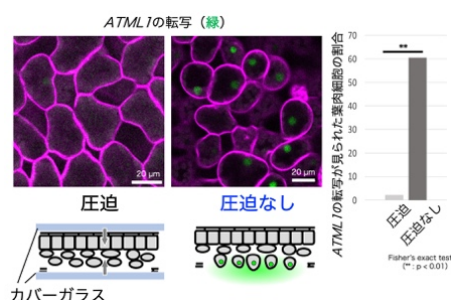


図 3 物理的な圧迫が RISE を抑制する。表皮を除去すると、最外層になった葉肉細胞は物理的な圧迫から解放され、*ATML1* を転写するようになる (写真と棒グラフ右)。表皮除去後の葉をカバーガラスで圧迫すると *ATML1* の発現上昇は見られない (写真と棒グラフ左)。

には物理的な圧迫からの解放や葉肉細胞の伸長が必要であり、通常の発生で葉の内側の細胞が表皮へと分化しない理由の一つは、物理的な圧迫によって *ATML1* の転写が抑制されているからだと考えられる。これで、約 50 年前に観察された表皮細胞から葉肉細胞への分化転換メカニズムの一端が理解できた。葉の細胞は「圧迫」という物理的な「力」を認識して、表皮へと分化するか、葉肉細胞へと分化するかを決めていると思われる (図 4)。一方、RISE を阻害する条件で胚珠培養実験をおこなった結果、胚発生における表皮分化には、RISE とは異なるシグナル経路が関わっている可能性が示唆された。これらの結果は論文として報告するとともに、所属機関からプレスリリースをおこなった。

や *DTL5* は *ATML1* の下流で表皮運命を抑制する働きを持つ可能性が示唆された。*DTL4* と *DTL5* には、相同性の高い遺伝子 *DTL4L1* と *DTL5L1* が存在しており、どちらも表皮で転写されることが確認できたため、*dt14 dt14l1* や *dt15 dt15l1* の二重変異体を確立して表現型を観察した。*dt14 dt14l1* も *dt15 dt15l1* も胚発生の異常は見つからなかったが、葉の形態に異常が見られた。これらの結果から、*DTL4*、*DTL4L1*、*DTL5*、*DTL5L1* は、*ATML1* の下流で *ATML1* の活性を負に調節する有力な候補であることが言える。今後は、これらの *DTL* 遺伝子が *ATML1* の活性を抑制する分子メカニズムとその生物学的な意義に注目して研究を進めていきたい。

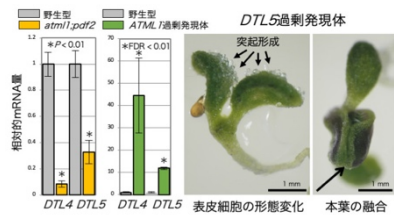


図 5 *ATML1* の下流遺伝子候補 *DTL4* と *DTL5* (左) *atml1 pdf2* 変異体や *ATML1* の過剰発現体における *DTL4* と *DTL5* の相対的な mRNA 量。(右) *DTL4* や *DTL5* を過剰発現すると表皮細胞の形態変化 (突起形成) や葉の融合など、表皮分化が異常な変異体に特徴的な表現型を示す (矢印)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Brumm Sabine, Singh Manoj K., Kriechbaum Choy, Richter Sandra, Huhn Kerstin, Kucera Tim, Baumann Sarah, Wolters Hanno, Takada Shinobu, Juergens Gerd	4. 巻 112
2. 論文標題 N - terminal domain of ARF - GEF GNOM prevents heterodimerization with functionally divergent GNLI in Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 772～785
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15979	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Iida Hiroyuki, Maehoenen Ari Pekka, Juergens Gerd, Takada Shinobu	4. 巻 14
2. 論文標題 Epidermal injury-induced derepression of key regulator ATML1 in newly exposed cells elicits epidermis regeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-36731-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Iida Hiroyuki, Takada Shinobu	4. 巻 10
2. 論文標題 A Quarter Century History of ATML1 Gene Research	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 290～290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants10020290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

1. 著者名 Hiroyuki Iida, Ayaka Yoshida, Shinobu Takada	4. 巻 146
2. 論文標題 ATML1 activity is restricted to the outermost cells of the embryo through post-transcriptional repressions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 —
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.16930	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —

[学会発表] 計14件 (うち招待講演 0件／うち国際学会 2件)

1. 発表者名 高田 忍、吉田 彩香、飯田 浩行
2. 発表標題 マスター転写因子の活性調節と表皮細胞の運命決定
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高田 忍、吉田 彩香、伊藤 みはる、栢原 敦、趙 露、柿本 辰男、飯田 浩行
2. 発表標題 マスター転写因子の活性調節と植物細胞の運命決定
3. 学会等名 近畿植物学会第12回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高田 忍、吉田 彩香、高田 希、伊藤 みはる、Ari Pekka Maehonen, Gerd Juergens, 飯田 浩行
2. 発表標題 植物の表皮細胞運命の決定とATML1遺伝子の活性抑制
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroyuki Iida, Ayaka Yoshida, Ari Pekka Maehonen, Gerd Juergens, and Shinobu Takada
2. 発表標題 Specification of epidermal cell fate in plant shoots
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高田 忍、Gerd Juergens、飯田 浩行
2. 発表標題 植物の表皮細胞分化とATML1の活性調節
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯田 浩行、高田 忍
2. 発表標題 植物の表皮細胞運命の決定とATML1遺伝子の活性調節
3. 学会等名 近畿植物学会第11回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田 忍、Gerd Juergens、飯田 浩行
2. 発表標題 表皮細胞運命の決定とATML1遺伝子の活性抑制
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田 忍、Gerd Juergens、飯田 浩行
2. 発表標題 植物の表皮細胞運命の決定とATML1遺伝子の活性抑制
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会（つくば年会；オンライン開催）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田 忍、吉田 彩香、高田 希、伊藤 みはる、Gerd Juergens、飯田 浩行
2. 発表標題 ATML1は細胞系譜とは無関係に最外層の細胞で活性化される
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯田浩行, Gerd Juergens, 高田忍
2. 発表標題 ATML1の転写は最外層の細胞で促進される
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田忍, 吉田彩香, 高田希, 伊藤みはる, 飯田浩行
2. 発表標題 シロイヌナズナ地上部の表皮分化における DTL遺伝子の役割
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯田 浩行、吉田 彩香、高田 希、伊藤 みはる、Gerd Juergens、高田 忍
2. 発表標題 一層の表皮が作られるしくみ: マスター転写因子ATML1の上流・下流因子の解明
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田 浩行、吉田 彩香、Gerd Juergens、高田 忍
2. 発表標題 ATML1の活性制御による一層の表皮形成
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Iida, Ayaka Yoshida, Shinobu Takada
2. 発表標題 ATML1 activity is restricted to the outermost cells to enable a single epidermal layer formation
3. 学会等名 29th International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物胚発生のページ http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~shinobu_takada/index.html 力に応じて変わる細胞の運命 植物細胞が自分の位置を知るしくみ（大阪大学プレスリリース） https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2023/20230428_2 植物が体の表面にだけ表皮を作るしくみを発見！ 植物の形づくりの解明に期待（大阪大学プレスリリース） https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2019/20190418_1
--

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
研究協力者	飯田 浩行 (Iida Hiroyuki)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	吉田 彩香 (Yoshida Ayaka)		

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			
フィンランド	ヘルシンキ大学			
ドイツ	チュービンゲン大学			