

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19370019
 研究課題名 (和文) 植物幹細胞の維持機構の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of mechanisms underlying maintenance of plant stem cells
 研究代表者
 梅田 正明 (UMEDA MASA AKI)
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授
 研究者番号： 80221810

研究成果の概要 (和文) : 本研究では細胞増殖を負に制御する因子の機能解析を行ない、植物の幹細胞を維持する分子機構の解明を目指した。その結果、分裂組織において表皮から内側の細胞層に向けて作用する極長鎖脂肪酸由来のシグナルが存在し、これが幹細胞集団の細胞分裂を抑制することが明らかになった。また、分裂組織における細胞分裂をモニタリングするために、*CDT1a* のプロモーターに C 末側のコード領域を繋いだ改変遺伝子が S 期特異的マーカーとして有効であることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文) : In this study, we focused on negative regulators of cell division to reveal molecular mechanisms underlying maintenance of plant stem cells. We found that some signal derived from very long chain fatty acid, which is produced in the epidermis of shoot apices, acts on inner cell layers to suppress stem cell division. Moreover, we developed a novel S phase-specific reporter gene by using the carboxy-terminal region of *CDT1a* to monitor cell proliferation in meristems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：幹細胞、細胞周期、分化全能性、細胞分裂、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

植物は胚発生後に大部分の器官を形成する。つまり、成長を続けながら新たな器官形

成を行うという、極めてユニークな特徴を持っている。このような能力は器官形成の場となる分裂組織を維持し続けることによって可能となり、それにより様々な環境条件に適応した成長を遂げることもできる。したがって、分裂組織を如何に維持するかは、植物の器官形成の本質的な命題と言える。

分裂組織を維持する上で最も重要な役割を果たすのが幹細胞である。地上部では茎頂分裂組織、地下部では根端分裂組織に存在する形成中心の細胞が幹細胞の分裂と分化状態を規定し、恒常的な器官形成を保証する。これらの過程にはペプチド性因子や受容体と介した細胞間シグナルのやり取りが重要であることが示唆されていたが、一方で植物ホルモンも重要な役割を担う可能性が指摘されていた。例えば、茎頂分裂組織の形成中心においてはサイトカイニンと呼ばれる植物ホルモンに感受性が高い環境が形成されており、一方で別の植物ホルモンであるオーキシンは葉原基周辺で濃度上昇が見られることから、サイトカイニンとオーキシンの量比が幹細胞の未分化状態の維持に重要であると考えられていた。

動植物を問わず、一般に幹細胞の分裂は遅く、器官原基を形成する細胞の分裂は速い。しかし、その分子機構に関する解析は殆ど為されていなかった。上述のように植物は持続的な成長を遂げるために、異なる分裂速度をもつ細胞集団を分裂組織で維持し続けなければならない。したがって、幹細胞の分裂制御機構を理解することは、分裂組織の機能を理解することにもつながる。また、我々は以前の研究で、シロイヌナズナにおいて幹細胞を未分化状態で維持するためには分裂に必要なサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 活性をある閾値以上に高く保つことが必要不可欠であることを見出していた。また、オランダの Scheres 博士のグループも、CDK 活性の増加 (減少) → Rb の活性低下 (増加) → 幹細胞の分裂活性化 (分化誘導) という一連の流れを想定し、細胞分裂や分化と CDK 活性の密接な関連性を指摘していた。

2. 研究の目的

以上のような研究背景より、本研究では未分化な幹細胞集団を一定数維持し続けるためには、CDK 活性をある一定の範囲内で制御する分子機構が必要不可欠であると仮定した。そこで、CDK 活性を負に制御する分子機構に焦点を絞り、それらの機能解明を通して幹細胞の維持機構を明らかにすることを目的とした。また、組織レベルで細胞周期をモニターできるシステムを開発し、分裂組織における細胞周期の時空間的な制御について

解析することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) PAS2 の機能解析

pasticcino2 (*pas2*) 変異体は茎頂分裂組織の内層で細胞分裂が異所的に活性化される変異体として単離された。この表現型は幹細胞集団の分裂活性を負に制御する機構が働かなくなった結果として表れたものと考え、その機能解析を行なった。まず、*pas2* 変異体における形態的特徴を詳細に観察した。特に細胞分裂との関連性を明らかにするため、G2/M 期マーカーである *pCDKB2::CDKB2-GUS* を導入し、GUS 発現を観察することにより細胞分裂活性について調べた。また、脂質成分の解析を埼玉大学の西田生郎教授と共同で行なった。一方で、*PAS2* 遺伝子の発現部位を明らかにするために、*pPAS2::GUS* や *pPAS2::PAS2-GUS* といったコンストラクトを作成し、それらの形質転換体を使って GUS 発現が見られる組織の観察を行なった。また、表皮細胞のみでの *PAS2* の発現で *pas2* 変異体の表現型が抑圧されるかどうか調べるために、*ML1* プロモーターで *PAS2-GUS* を発現する *pML1::PAS2-GUS* を変異体に導入し、表現型観察を行なった。さらに、野生型植物の表皮細胞だけで *PAS2* 発現をノックダウンした際に *pas2* 変異体の表現型を再現できるかどうか調べるために、*ML1* プロモーターを使って RNAi コンストラクトを作成し、野生型植物に導入した。

(2) *KRP* の発現解析と変異体の表現型解析

細胞周期の負の制御因子として CDK インヒビターに関する機能解析を行なった。シロイヌナズナには CDK インヒビターとして 7 種類の *KRP* 遺伝子 (*KRP1-KRP7*) が存在する。そこで、これらの発現パターンを遺伝子及び組織レベルで解析するために、*pKRP::GUS/GFP* や *pKRP::KRP-GUS/GFP* といったコンストラクトを作成し、これらのレポーター系統を用いて発現解析を行なった。また、各 *krp* 変異体の交配により多重変異体を作成し、表現型解析を行なった。

(3) 新規細胞周期マーカーの開発

幹細胞を含む分裂組織周辺の細胞分裂活性をモニターするためには、これまで広く利用されてきた G2/M 期マーカーの他に、G1 期または S 期特異的なレポーター遺伝子が必須である。これらを組み合わせることにより、細胞分裂速度を組織レベルで解析することが可能になる。そこで、G1/S 期マーカーの候補遺伝子として *CDT1a* に注目し、その発現解析を行なった。*CDT1a* プロモーターに *CDT1a* のコード領域全長や部分領域を連結させた

コンストラクトを作成し、そのC末に *GUS* 遺伝子を融合してシロイヌナズナ植物体とタバコ培養細胞 BY2 に導入した。シロイヌナズナでは根端での発現パターンを解析した。BY2 では細胞同調を行ない、*GUS* 活性を指標として細胞周期特異的な発現パターンを解析した。また、分裂酵母の変異体を用いて各種部分領域を発現させた際の相補性試験も行った。

4. 研究成果

(1) *PAS2* の機能解析

pas2 変異体では、茎頂分裂組織内層の髄状部 (rib zone) を中心に細胞分裂が顕著に亢進していることが明らかになった。これは G2/M 期マーカーである *pCDKB2::CDKB2-GUS* の発現がこの領域で上昇していることから示唆された。また、組織染色の結果から表皮の脂質成分に異常がある可能性が考えられたため、*pas2* 変異体を用いて脂質成分解析を行ったところ、炭素数 20 以上の骨格から成る極長鎖脂肪酸の含量が顕著に減少していることが明らかになった。この結果と他研究グループから発表された酵母変異体を用いた相補性試験の結果から、*PAS2* は極長鎖脂肪酸の合成酵素であると考えられた。

レポーター遺伝子を用いた発現解析の結果から、*PAS2* は遺伝子・タンパク質レベルともに茎頂分裂組織の L1 層及び葉原基の表皮のみで発現していることが明らかになった。この結果は、遺伝子の発現部位と変異体の表現型が表れる組織が異なることを意味していたので、次に表皮特異的な相補実験とノックダウン実験を行った。その結果、*pas2* 変異体の表現型は L1 層や表皮のみでの *PAS2* の発現で相補されること、また野生型植物で L1 層や表皮のみで *PAS2* 遺伝子をノックダウンしても *pas2* 変異体と同様な表現型が表れることが明らかになった。これらの結果から、*PAS2* は表皮のみで発現し、そこで合成される極長鎖脂肪酸が何らかのシグナルを介して内層の細胞分裂を抑制的に制御することが示された。以上の結果は、極長鎖脂肪酸がクチクラワックスなどの構成成分となるだけでなく、それに由来するシグナル物質が細胞非自立的に幹細胞集団の細胞分裂を抑制することを示唆しており、全く新奇な知見である。

(2) *KRP* の発現解析と変異体の表現型解析

組織レベルの発現解析の結果、7 種類の *KRP* 遺伝子はその種類により異なる発現様式を示すことが明らかになった。また、プロテアソーム阻害剤である MG132 を処理する実験により、*KRP1-KRP7* すべての *GUS* 融合タンパク

質がユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解制御を受けることが明らかになった。*KRP3* および *KRP4* は茎頂及び根端の分裂組織で強い発現が見られたことから、*krp3 krp4* 二重変異体を作成したが、目立った表現型は観察できなかった。そこで他の *krp* 変異体と交配し三重変異体を作成したところ、*krp3 krp4 krp5* においてトライコームの分枝数と葉における DNA 倍数性が僅かに上昇していることが示唆された。しかし、これまでのところ分裂組織や幹細胞で異常が見られる多重変異体は得られておらず、今後さらに解析を進める必要があると考えられる。

(3) 新規細胞周期マーカーの開発

CDT1a 遺伝子のプロモーターに全長のコード領域を繋いだ *GUS* レポーター系統は、根端において斑点状の発現パターンを示した。これは *CDT1a* 遺伝子が細胞周期特異的な発現制御を受けるとともに、タンパク質レベルの分解制御も受けることを意味する結果であった。そこで、部分的なコード領域を繋いだレポーター系統についても同様に解析した結果、C 末側断片のみでも斑点状の発現パターンを示すことが明らかになった。実際にプロテアソーム阻害剤による処理で *GUS* 発現が増大したことから、C 末側に細胞周期特異的なタンパク質分解を担うシグナル配列が存在することが示唆された。そこで、このレポーター遺伝子を導入した BY2 細胞において細胞周期の進行過程における発現を調べたところ、S 期特異的に発現し、その後タンパク質分解制御により消失することが明らかになった。また、全長のコード領域は分裂酵母の変異体を相補したが、C 末側断片は相補しなかったため、後者の発現は *CDT1a* の機能的過剰発現とはならないものと考えられた。以上の結果から、この *CDT1a* 遺伝子の C 末側断片が S 期特異的なレポーター遺伝子として有効に活用できることを示すことができた。このレポーター遺伝子を G2/M 期マーカーと共に発現させることにより細胞周期進行をリアルタイムでモニタリングできるので、今後幹細胞を含む分裂組織での分裂制御機構を解析する上で有用なイメージングツールを開発することができたと言える。

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 9 件)

①Takahashi, I., Kojima, S., Sakaguchi, N., Umeda-Hara, C. and Umeda, M. (2010) Two *Arabidopsis* cyclin A3s possess G1 cyclin-like features. *Plant Cell Rep.*, 29: 307-315. 査読有

②Takatsuka, H., Ohno, R. and Umeda, M. (2009) The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF;1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation. *Plant J.*, 59: 475-487. 査読有

③Adachi, S., Nobusawa, T. and Umeda, M. (2009) Quantitative and cell type-specific transcriptional regulation of A-type cyclin-dependent kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Biol.*, 329: 306-314. 査読有

④Ishida, T., Fujiwara, S., Miura, K., Stacey, N., Yoshimura, M., Schneider, K., Adachi, S., Minamisawa, K., Umeda, M. and Sugimoto, K. (2009) SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, 21: 2284-2297. 査読有

⑤Liu, J., Zhang, Y., Qin, G., Tsuge, T., Sakaguchi, N., Luo, G., Sun, K., Shi, D., Aki, S., Zheng, N., Aoyama, T., Oka, A., Yang, W., Umeda, M., Xie, Q., Gu, H. and Qu, L.-J. (2008) Targeted degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK4/KRP6 by RING-type E3 ligases is essential for mitotic cell cycle progression during *Arabidopsis* gametogenesis. *Plant Cell.*, 20: 1538-1554. 査読有

⑥Abe, M., Kuroshita, H., Umeda, M., Itoh, J. and Nagato Y. (2008) The rice *FLATTENED SHOOT MERISTEM*, encoding CAF-1 p150 subunit, is required for meristem maintenance by regulating the cell-cycle period. *Dev. Biol.*, 319: 384-393. 査読有

⑦Kono, A., Umeda-Hara, C., Adachi, S., Nagata, N., Konomi, M., Nakagawa, T., Uchimiya, H. and Umeda, M. (2007) The *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD4 controls cell division in the stomatal lineage of the hypocotyl epidermis. *Plant Cell.*, 19: 1265-1277. 査読有

⑧Chao, W.S., Serpe, M.D., Jia, Y., Shelver, W.L., Anderson, J.V. and Umeda, M. (2007) Potential roles for autophosphorylation, kinase activity, and abundance of a CDK-activating kinase (Ee;CDKF;1) during growth in leafy spurge. *Plant Mol. Biol.*, 63: 365-379. 査読有

[学会発表] (計 41 件)

①「シロイヌナズナの気孔形成過程における CYCD4の機能解析」第51回日本植物生理学会年会 (2010年3月19日、熊本) 奥島葉子、天野廣海、安達澄子、梅田正明

②「Functional divergence of CDK-activating kinases in plant development」第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月10日、横浜) 高塚大知、梅田正明

③「シロイヌナズナの根の成長過程における細胞周期制御因子の解析」第27回日本植物細胞分子生物学会大会 (2009年7月30日、神奈川) 奥島葉子、稲本裕幸、清水皓平、梅田正明

④「Synthesis of very long chain fatty acids in the epidermis controls cell division in *Arabidopsis*」20th International Conference *Arabidopsis* Research (July 2 2009, Edinburgh) Takashi Nobusawa, Yoko Okushima, Masaaki Umeda

⑤「極長鎖脂肪酸合成を介したシロイヌナズナの器官形成制御機構」第50回日本植物生理学会年会 (2009年3月21日、名古屋) 信澤岳、草野都、岡咲洋三、斉藤和季、奥島葉子、梅田正明

⑥「極長鎖脂肪酸合成酵素PATICCINO2を介したシロイヌナズナの形態形成制御機構」日本植物学会第72回大会 (2008年9月26日、高知) 信澤岳、奥島葉子、河合博光、西田生郎、梅田正明

⑦「PATICCINO2 is essential for shoot epidermis formation」19th International Conference on *Arabidopsis* Research (July 24 2008, Montreal) Takashi Nobusawa, Yoko Okushima, Hiromitsu Kawai, Ikuo Nishida and Masaaki Umeda

⑧「器官形成を支える細胞周期制御因子の量的・質的制御機構」第49回日本植物生理学会年会 (2008年3月21日、札幌) 梅田正明、Gyung-Tae Kim

⑨「シロイヌナズナCDK活性化キナーゼ CDKF;1の機能解析」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 (2007年12月12日、横浜) 高塚大知、梅田正明

〔図書〕（計1件）

①Shimotohno, A. and Umeda, M. (2007) in *Cell cycle control and plant development: CDK phosphorylation* (D. Inzé, ed.), Blackwell Publishing, Oxford, pp.114-137.

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅田 正明 (UMEDA MASAACKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科・教授

研究者番号：80221810

(2)研究分担者

奥島 葉子 (OKUSHIMA YOKO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教

研究者番号：00432592