

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号： 63904
 研究種目： 学術創成研究費
 研究期間： 2007～2011
 課題番号： 19GS0315
 研究課題名（和文）植物体内における細胞集団の分化状態を規定するシグナル分子の機能探索
 研究課題名（英文）Analysis of intercellular signaling molecules working in organ development and differentiation in plants
 研究代表者
 岡田 清孝（OKADA KIYOTAKA）
 基礎生物学研究所・所長
 研究者番号： 50101093

研究成果の概要（和文）：植物の発生に関わるシグナル分子について解析を進めた。カリフラワーの細胞間隙から抽出したペプチドを分離し、LTP タンパク質が茎頂分裂組織の機能維持に関わることを見いだした。シロイヌナズナの分裂組織の形成と維持に関わるペプチドホルモンのシグナル伝達過程に三量体 G-protein タンパク質が重要な役割を持つことを見出した。根端メリステムの維持と成長に関与する新規硫酸化ペプチドホルモンを同定した。葉の表側領域の細胞分化に関わる miRNA の発現制御機構の解析を進めた。さらに、顕微鏡下で一個または数個の細胞に遺伝子発現を誘導する系や特定の細胞を不活性化させる系を開発した。

研究成果の概要（英文）：In order to examine intercellular signaling systems working in organ formation and development, we took several approaches. We identified small LTP proteins in apoplastic extracts of cauliflower heads having a role of formation and maintenance of shoot apical meristem. Genetic approach revealed that trimeric G-protein is involved in the intracellular signaling pathway under the peptide hormone receptors that regulate shoot and root meristem function. We showed novel group of tyrosine-sulfated glycopeptides had important roles as intercellular signals in plant development. We investigated action of microRNA165/166 in forming the boundary between the adaxial- and the abaxial-regions in developing leaves. In addition, we developed instrumental systems inducing specific gene(s) in a single plant cell or inactivating a single cell by use of laser beams.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	102,900,000	30,870,000	133,770,000
2008 年度	82,000,000	24,600,000	106,600,000
2009 年度	85,900,000	25,770,000	111,670,000
2010 年度	85,900,000	25,770,000	111,670,000
2011 年度	60,900,000	18,270,000	79,170,000
総計	416,700,000	125,280,000	542,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：植物発生、葉、表裏、アポプラスト、マイクロ RNA、茎頂分裂組織、ペプチドシグナル

1. 研究開始当初の背景

多細胞からなる植物の器官の構築と発生過程についての研究は、シロイヌナズナをモデル系とする分子遺伝学とイメージング技術をはじめとする分子細胞学の解析によって急速に進展し、植物の体制確立や器官の基本構造の形成などの植物発生における重要な過程を支配する鍵遺伝子が同定され、その発現パターンと機能との関わりについて理解が進んできた。しかし、細胞分裂と細胞分化の空間的制御に関わる「位置情報」の分子の実体とその機構の解析、例えば、葉の形成過程において、茎頂分裂組織の周縁部で葉原基を形成する位置（葉序）の決定機構や、葉の表側と裏側、中央部と周辺部などの軸構造と各領域の境界位置決定の仕組み、などは未解決で、現時点でも国際的な競争となっている。私は、従来の分子生物学、分子遺伝学、細胞生物学、生化学の解析手法を取り入れるだけでなく、新たな研究手法の開発をとともう必要があると考え、これらの問題に関心と実績を持つ我が国の若手研究者によるチームを組んで、この問題に切り込むことを計画した。

2. 研究の目的

「位置情報」の分子の実体として細胞間を移動するペプチド分子、microRNA、植物ホルモンを想定し、それぞれの分子を芽生えや茎頂分裂組織などの組織から分離する生化学的手法とシロイヌナズナを用いた分子遺伝学的手法、および新規に開発するバイオアッセイ系を用いて解析する。

3. 研究の方法

(1) ペプチド遺伝子のノックアウト株や異所的発現株などの形質を調べ、また、化学合成したペプチドについてバイオアッセイ系を用いて、各ペプチド分子の機能を解析する、(b) 分子生物学的な手法を用いてペプチド分子を分泌・修飾する細胞を同定し、生成の機構を解析する、(c) 新たな翻訳後修飾ペプチド分子の探索手法や受容体の探索手法を開発し、その機能を解析する。

(2) microRNA の解析。シロイヌナズナの分裂組織や器官原基からmicroRNA を調製し、microRNA 用のマイクロアレイ解析や塩基配列の解析から、分裂組織で発現する分子種を同定し、機能の発現機構を解析する。

(3) 新規突然変異体の解析から、オーキシン輸送複合体の形成の機構を解析し、新たな細胞間シグナル分子を同定してその生成と移動・受容について解析する。

(4) バイオアッセイ系の開発。シグナル分子を生成分泌する細胞・組織、移行経路、受容細胞・組織を解析するための新規な装置として、微光束紫外光レーザーによる細胞破壊実験系を開発し、シロイヌナズナの茎頂分裂組織や根端分裂組織の細胞破壊、特に一細胞毎の破壊を試みる。同様にシグナル分子を生成分泌する細胞・組織、移行経路、受容細胞・組織を解析するための新規な装置として、近赤外光レーザーによる遺伝子発現誘導系の確立を目指して、熱ショック遺伝子プロモーターを用いた実験系の開発を進める。

4. 研究成果

[研究代表者 岡田清孝] 研究目標の設定・研究環境の整備・成果の取り纏めをおこなった。また、基礎生物学研究所における研究グループを主宰し、研究分担者の立松圭とともに、以下の成果を得た。

新規活性ペプチドの同定を目的として食用カリフラワーの花蕾表面のアポプラストから抽出・精製したペプチド画分を植物体に投与した。葉や茎頂分裂組織および根の形態に影響を及ぼす複数の活性を分離し、LC-MS/MS およびプロテインシーケンサーによる同定を行った。シロイヌナズナには 16 個の LTP タンパク質相同遺伝子 (*AtLTPs*) がある。*AtLTP1* と *AtLTP6* はシロイヌナズナ茎頂近傍の表皮細胞で発現している。また、これらの遺伝子の過剰発現株をでは、外部から LTP を投与した場合と同様に、茎頂付近で複数の茎頂分裂組織が形成される表現型を示した。逆に恒常的な発現抑制株では、1 枚や 3 枚の子葉を持つ個体や棒状の本葉を形成する個体が観察された。

葉の表側領域の分化制御に関わる HD-ZIP III 遺伝子の発現を抑制する miRNA165/166 の発現制御機構の解析を進め、miR165 が機能する領域の決定には、一次転写産物 pri-miR165a の構造が必要であることを示した。

顕微鏡下で一個または数個の細胞に赤外光レーザーを照射して遺伝子の発現を誘導する系を開発し、根の細胞に WUS 遺伝子と CLV3 遺伝子の発現を一過的に誘導した。WUS 遺伝子の発現誘導によって側方根冠の細胞

で過剰な分裂が誘導されることがわかった。また、紫外光レーザーによって特定の細胞を不活性化させる系を開発した。

花卉の形成が遅れ、開花時に花卉が二回屈折する *fop1* 突然変異体の解析を進めた。FOP1 遺伝子は花卉表皮で発現し、ワックスの合成と分泌に関わる考えている。同様な花卉屈折表現型を示す *fop2* 突然変異体はワックスの分泌に関わると考えられることから、花卉ががく片と雄しべの間をすり抜けて成長する際に花卉表面のワックスが器官間の摩擦低下のための潤滑剤として働いていることが明確になった。

葉表面のトライコームは虫害への抵抗機能があり、葉が虫害を受けるとジャスモン酸が誘導され、トライコームの密度が増加することが知られている。トライコーム形成の表現型可塑性の機構を解析するために、ジャスモン酸依存的な密度増加がみられない URM 突然変異体を分離し、URM 遺伝子がジャスモン酸依存的に GL3 の遺伝子発現を増強させる過程を明らかにした。

[研究分担者 澤進一郎] シロイヌナズナの茎頂分裂組織の形成と維持に関わるペプチドホルモンと複数の受容体複合体の関わりを解析し、細胞内へのシグナル伝達系を詳細に調べた。

合成ペプチドホルモンに耐性を示す *sol2* 突然変異体と *cli1* 突然変異体の原因遺伝子を単離・解析した。また、CLV3 ペプチドホルモンの受容体の一つと考えられる *clv2* 突然変異体のエンハンサー突然変異体 42 株を単離した。次世代シーケンサーを利用した全ゲノムシーケンスによる解析法を開発し、これら全ての候補突然変異体のゲノムシーケンスを解読し、三量体 G-protein タンパク質が細胞内シグナル伝達に重要な役割を持つことを見出した。また、CLE ペプチドの生成に関与するペプチダーゼについて解析を進めた。

[研究分担者 松林嘉克] 植物の成長および分化に関与する短鎖翻訳後修飾ペプチド、特にチロシン硫酸化ペプチドの同定と機能解析を担当した。進化的に保存されてきた翻訳後修飾ペプチドは、成長および分化に大きな役割を持つと予想して、チロシン硫酸化ペプチドの選択的濃縮・検出系を確立し、全身的な細胞増殖と細胞肥大に関与する新規硫酸化ペプチド PSY1 を同定した。さらに、PSY1 のチロシン硫酸化モチーフを用いて、チロシン硫酸化酵素 (TPST) の同定に成功した。

TPST 遺伝子破壊株の表現型の詳細な解析と硫酸化ペプチド候補の *in silico* スクリーニングから、根端メリステムの維持と成長に関与する新規硫酸化ペプチドホルモン RGF の同定にも成功した。また、一連の研究の過程でアポプラスト局在ペプチドの nano LC-MS/MS による微量解析系を確立し、任意のペプチド遺伝子に由来する成熟型ペプチド構造を高精度に解析することを可能にした。この系は、長年の論争になっていた茎頂メリステムにおける幹細胞群の維持に関与するペプチドホルモン CLV3 の構造解明に大きく貢献した。

[研究分担者 槻木竜二] 植物ホルモンであるオーキシンは細胞集団の増殖と組織化を規定するシグナル分子の1つであり、分裂組織周辺領域の一部の細胞にオーキシンが集中して輸送されると、その細胞が分裂して葉原基となり、また葉原基の先端部の細胞にオーキシン濃度が高くなり、葉原基の軸に沿った成長を促すことが知られている。この過程の分子機構を解析し、オーキシンの極性輸送の方向を規定する PIN タンパク質の発現と局在を決定する上位機構に関わる新規遺伝子である *NO VEIN* を同定した。また、茎頂分裂組織の維持や維管束形成などに関わる CLE ペプチドホルモンと WOX ファミリーホモオボックス転写因子の組織特異的発現を制御する新規遺伝子 *VASCULAR HYPERPLASIA* を同定し、上位機構の解析を進めた。

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 47 件) すべて査読あり。

① Nakata, M. & Okada, K.: The leaf adaxial-abaxial boundary and lamina growth. *Plants* (in press, 2013)

② Tameshige, T., Fujita, H., Watanabe, K., Toyokura, K., Kondo, M., Tatematsu, K., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Kawaguchi, M., Nishimura, M., Okada, K.: Pattern Dynamics in Adaxial-Abaxial Specific Gene Expression is Modulated by Plastid Retrograde Signal during Arabidopsis leaf development. *Plos Genetics* (in press 2013)

③ Jewaria, P. K., Hara, T., Tanaka, H., Kondo, T., Betsuyaku, S., Sawa, S., Sakagami, Y., Aimoto S. and Kakimoto, T.:

Differential Effects of Peptides Stomagen, EPF1, and EPF2 on Activation of the MAP Kinase MPK6 and the SPCH Protein Level. *Plant Cell Physiol.* (2013 in press).

④ Miyawaki, K., Tabata, R., and Sawa, S.: CLE peptide function in the SAM and CLE peptide evolution in the land plant. *Curr. Opin. Plant Biol.* (2013 in press).

⑤ Takeda, S., Iwasaki, A., Matsumoto, N., Uemura, T., Tatematsu, K., Okada, K.: Physical interaction of floral organs controls petal morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 161, 1242-1250 (2013)

⑥ Shinohara, H., Matsubayashi, Y.: Chemical synthesis of Arabidopsis CLV3 glycopeptide reveals the impact of hydroxyproline arabinosylation on peptide conformation and activity. *Plant Cell Physiol* 54: 369-374 (2013).

⑦ Nakata, M., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Rikirsch, E., Laux, T., Okada, K.: Roles of the middle domain-specific *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX* genes in early development of leaves in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 519-535 (2012).

⑧ Yamada, M., and Sawa, S.: The function of CLE and other plant peptide hormones in root development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16. 1-6 (2012).

⑨ Kiyohara, S., and Sawa, S.: The role of CLE peptides in Arabidopsis development and nematode parasitism. *Plant Cell Physiol.* 53. 1989-1999 (2012)

⑩ Ejima, C., Uwatoko, T., Ngan, B. T., Honda, H., Shimizu, N., Kiyohara, S., Hamasaki, R., and Sawa, S.: SNPs of CLAVATA receptors in tomato, in a context of rootknot nematode infection. *Nematological Research.* 2. 35-40 (2012)

⑪ Shinohara, H., Moriyama, Y., Ohyama, K., Matsubayashi, Y.: Biochemical mapping of a ligand-binding domain within Arabidopsis BAM1 reveals diversified ligand recognition mechanisms of plant LRR-RKs. *Plant J* 70: 845-854 (2012).

⑫ Toyokura, K., Watanabe, K., Oiwaka, A., Kusano, M., Tameshige, T., Tatematsu, K., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Saito, K., Okada, K.: Succinic Semialdehyde Dehydrogenase is Involved in the Robust Patterning of Arabidopsis Leaves along the Adaxial-Abaxial Axis. *Plant & Cell Physiology* 52, 1340-1353 (2011).

⑬ Matsuzaki Y., Ogawa-Ohnishi M., Mori A., Matsubayashi, Y.: Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in Arabidopsis. *Science* 329: 1065-1067 (2010).

⑭ Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J., Okada, K.: Jasmonic acid control of GLABA3 links inducible defense and trichome patterning in Arabidopsis. *Development* 136, 1039-1048 (2009).

⑮ Tsugeki, R., Ditengou, F. A., Sumi, Y., Palme, K., Okada, K.: The Novel Nuclear Factor NO VEIN Mediates Auxin-Dependent Specification and Patterning in the Embryo, Shoot and Root. *Plant Cell* 21, 3133-3151 (2009)

⑯ Komori, R., Amano, Y., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y.: Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15067-15072 (2009).

⑰ Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y.: A glycopeptide regulating stem cell fate in Arabidopsis thaliana. *Nature Chem Biol* 5: 578-580 (2009).

⑱ Sakai, T., van der Honing, H., Nishioka, M., Uehara, Y., Takahashi, M., Fujisawa, N., Saji, K., Seki, M., Shinozaki, K., Jones, M., Smirnov, N., Okada, K. and Wasteneys, G.: Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal cell morphogenesis in Arabidopsis. *Plant J.* 53: 157-171 (2008).

⑲ Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y. and Matsubayashi, Y.: Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* 319: 294 (2008).

⑳ Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M.,

Sawa, S., Ohashi-Ito, K., Matsubayashi, Y. and Fukuda, H.: Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 15208-15213 (2008).

②① Ohyama, K., Ogawa, M. and Matsubayashi, Y.: Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by in silico gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. Plant J. 55:152-160 (2008).

②② Amano, Y., Tsubouchi, H., Shinohara, H., Ogawa, M. and Matsubayashi, Y.: Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 18333-18338 (2007).

②③ Shinohara, H., Ogawa, M., Sakagami, Y. and Matsubayashi, Y.: Identification of ligand binding site of phytosulfokine receptor by on-column photoaffinity labeling. J Biol Chem 282: 124-131 (2007).

[学会発表] (計 58 件)

① Matsubayashi Y.: Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. The 3rd NIBB-TLL-MPIZ Joint Symposium 2011 "Cell Cycle and Development". Temasek Life Sciences Laboratory (Singapore), Nov. 21-22 (2011)

② Sawa, S.: CLVATA signaling in meristem maintenance. Institute seminar, Temasek Life Sciences Laboratory (TLL), Singapore, May 24, 26 (2010)

③ Matsubayashi, Y.: Physiological importance of post-translational modifications in peptide hormone signaling. 20th International Conference on Plant Growth Substances. (Tarragona, Spain), June 28-July 2 (2010)

④ Tatematsu, K., Watanabe, K., Toyokura, K., Tameshige, T., and Okada, K.: The abaxial-side specific expression of *MIR165/166* clearly marks off the PHB-expression domain from the FIL-expression domain in *Arabidopsis* leaf primordia. The 20th International Conference on *Arabidopsis* Research. June

30-July 4, Edinburgh, Scotland. (2009).

⑤ Sawa, S.: CLE peptide function in meristem size maintenance in *Arabidopsis*. Faculty seminar, Seoul National University, Seoul, Korea Sept.18. (2009).

⑥ Okada, K.: Region-specific expression of regulatory genes in the lateral organ formation. SigNet International Symposium 2008. Korea University, Feb. 20-21, (2008).

⑦ Matsubayashi, Y., Ohyama, K., Ogawa, M.: Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by in silico gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. Japan-Korea Symposium - Plant Growth and Signal Transduction. (Yokohama, Japan) June 9-10 (2008).

⑧ Sawa, S.: CLE peptide function in meristem size maintenance in *Arabidopsis*. Institute seminar; University of Duesseldorf. Germany. May 6 (2008)

⑨ Okada, K.: Axis-dependent gene expression in the lateral organ formation. The 18th International Conference on *Arabidopsis* Research, Beijing, China, June 20-23 (2007).

⑩ Matsubayashi Y.: Physiological functions of two structurally distinct tyrosine-sulfated peptides in *Arabidopsis* growth and development. 18th International Conference on *Arabidopsis* Research. Beijing, China, June 20-23 (2007)

⑪ Matsubayashi Y.: Roles of two structurally distinct sulfated peptides, PSK and PSY1, in *Arabidopsis* growth and development. 19th International Conference on Plant Growth Substances. Puerto Vallarta, Mexico, July 21-25 (2007)

[図書] (計 3 件)

① Matsubayashi, Y.: Small post-translationally modified peptide signals in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* 9: e0150 (2011).

② ペプチドホルモン. 松林嘉克 新しい植物ホルモンの科学 第2版 講談社, 154-168 (2010).

③ 小柴共一、澤 進一郎: オーキシン、新しい植物ホルモンの科学、第2版、小柴、神谷編、講談社 (2007)

[その他]
ホームページ等

岡田・立松 2013年3月末で研究室を閉鎖したためにホームページなし。

澤 <http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/~sawa/>

松林 <http://www.nibb.ac.jp/ligand/>

槻木

<http://shikanai.p1.bindsite.jp/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田清孝 (OKADA KIYOTAKA)

基礎生物学研究所・所長

研究者番号：50101093

(2) 研究分担者

槻木竜二 (TSUGEKI RYUJI)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：50303805

澤進一郎 (SAWA SHIN-ICHIRO)

熊本大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：00315748

松林嘉克 (MATSUBAYASHI YOSHIKATSU)

基礎生物学研究所・細胞間シグナル研究部門・教授

研究者番号：00313974

(H22→H23 連携研究者)

(3) 連携研究者

立松 圭 (TATEMATSU KIYOSHI)

基礎生物学研究所・植物器官形成学研究室・助教

研究者番号：00373324

(H22→H23)