

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19H03246  
研究課題名(和文) CLEペプチドによる篩部パターンニング制御

研究課題名(英文) Phloem patterning by CLE peptides

**研究代表者**

柿本 辰男 (Kakimoto, Tatsuo)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70214260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：篩部が形成される細胞で発現する複数のDofタイプ転写因子(phloem-Dof)は篩部の形成を誘導するマスター因子であることを発見した。Phloem-Dofは篩部細胞形成を誘導すると同時に、篩部構成細胞の形成を阻害する分泌性ペプチド分子CLE25, 26, 45の合成も誘導することを明らかにした。CLE25, 26, 45はBAM受容体-CIK共受容体複合体によって受容されてphloem-Dofタンパク質を減少させることにより、本来の篩部形成位置の周りの細胞が篩部にならないようにしていることも明らかにした。この正と負の仕組みによって適切な数の篩部構成細胞が形成されることがわかった。

**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篩部は光合成産物を運ぶ大切な器官ですが、その細胞パターンがどのように作られるのか、篩部細胞はどのようにして分化運命を獲得するのかについてはよくわかっていませんでした。本研究において、篩部形成のマスター因子が同定されたこと、拡散性のCLEペプチドによる負のフィードバックによって適切な篩部パターンが作られることが解明されたのは学術上の大きな意義があります。

研究成果の概要(英文)：We identified master transcription factors, phloem-Dofs, which are expressed in phloem precursors, and directs the phloem-fate commitment. Phloem-Dofs induce genes that are required for phloem formation, but also induce CLE25, 26, and 45, which inhibit phloem formation. CLE25, 26 and 45 are perceived by BAM-CIK receptor-coreceptor complexes and destabilize phloem-Dof proteins forming negative feedback. These positive and negative regulation creates the proper phloem organization.

研究分野：Plant Science

キーワード：phloem CLE Arabidopsis Transcription factor Dof receptor

### 1. 研究開始当初の背景

植物の維管束は、篩部、木部、前形成層からなる。篩部は、篩管と伴細胞から成る。これらの細胞がどのように細胞運命を決めていくのかについては十分にわかっていなかった。特に篩部については篩部分化に必要な転写因子として APL などが知られていたが、これは分化における転写ネットワークの最初期に働く遺伝子ではない。篩部形成のマスター因子がわかっていない状態であった。

また、維管束細胞のパターンについて見てみると、植物は種に特有の維管束パターンを持っている。シロイヌナズナの根の横断面を取ると、直径方向に一列の道管と、それに対極する場所に各一箇所の篩部がある(図1)。木部、篩部、形成層の位置と細胞数は一定である。細胞パターンの自発的な形成には細胞間コミュニケーションが必要である。篩部形成を抑制するペプチド性シグナル分子は知られていたが、機能欠損変異体の表現型もわかっておらず、また、どのようにして篩部形成を抑制するのかの理解も不十分であった。

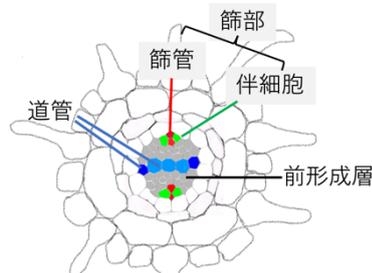


図1. 根の断面。維管束は、道管、篩部、前形成層から成る。

### 2. 研究の目的

篩部運命決定における主要な転写因子を見出すこと、さらに、篩部細胞のパターンを決める細胞間コミュニケーション分子を見出し、その作用機構を調べることが研究の目的である。

### 3. 研究の方法

篩部形成に関与する主要因子の探索のためには、まず、公開されているトランスクリプトームデータ (GSE6349 と GSE7641) を用い、篩部に優先的に発現している転写因子をリスト化した。最初の機能解析として、過剰発現あるいは、SRDX (転写抑制ドメイン) 融合タンパク質の発現によって篩部形成に影響するかどうかを調べた。その際、宿主植物として、原生篩部前駆細胞で GFP を発現する系統 (S32::GATA20) と伴細胞で GFP を発現する SUC2::GFP-GUS 系統を用いた。スクリーニングの結果、*AtDof1.1/OBP2*, *AtDof2.2*, *AtDof2.4/PEAR1*, *AtDof5.1/PEAR2*, *AtDof3.2/DOF6* and *Dof5.3/TMO6* を過剰発現した時に SUC2::GFP-GUS が異所的に発現したため、これらの遺伝子は伴細胞を誘導する能力がある可能性があると考え、これらの遺伝子と、そのホモログの機能解析を進めた。なお、篩部前駆細胞マーカーとして S32 を用いたが、これは篩部細胞列の始原細胞から発現しており、APL などもう少し篩部コミットメントの後期に発現する遺伝子マーカーを使ったほうが効率的なスクリーニングが行えたものと考えている。過剰発現あるいは、SRDX 誘導タンパク質の発現のためには、pER8 ベクターあるいはその誘導體 (XVE の発現のためのプロモーターとして pER8 で用いられている G10-90、35S プロモーター、あるいは RPS8 プロモーターを用いた) を用いた。コンストラクト作成は初期には制限酵素とリガーゼを用いたが、後期には主に SLICE 法で行った。受容体/リガンド結合アッセイは共同研究として中国精華大学にて、Baculovirus を用いて発現させたタンパク質と合成ペプチドリガンドを用いて Isothermal titration calorimetry (ITC) で行われた。

### 4. 研究成果

*Dof1.1*, *Dof2.2*, *Dof3.6*, *Dof5.3*, *Dof3.2* と *Dof5.6* は過剰発現した時に SUC2::GFP-GUS のみならず、APL::GFP も異所的に誘導した。APL は篩部要素前駆細胞と伴細胞前駆細胞の両方で発現する。篩部要素を誘導出来るのかどうかを知るため篩部要素で特異的に発現する ENOD9 に蛍光タンパク質を融合した系統も作り調べたところ、篩部要素と伴細胞の両方を誘導することがわかった。篩部要素と伴細胞は、発生経路に於いてはどちらの系譜も phloem-Dof によって制御されており、共通の細胞タイプから発生している可能性も考えられる。この2つのタイプの細胞の発生の違いを生み出す仕組みは今後の課題である。さらに、タイムラプス観察により、*Dof1.1* を強制発現させることにより異所的に APL が発現した細胞では、ENOD9 が発現した後に核の崩壊まで進むことが観察された。このことより、Phloem-Dof により篩部形成にコミットすると自発的に篩部形成の全過程が進むことがわかる。Phloem-Dof の多重遺伝子破壊株を作成した。*dof1.1/2.2/3.2/5.3/pear1/pear2* 六重ホモ変異体では、篩部要素と伴細胞は形成されないか、ほとんど形成されていなかった。過剰発現と遺伝子破壊株の結果から、phloem-Dof は篩部形成に必要な十分であると言える。

Phloem-Dof が制御している遺伝子群を明らかにするため、*Dof1.1*, *Dof2.2*, *Dof5.1* を誘導的に発現させた時のトランスクリプトーム解析をマイクロアレイを用いて行った。その結果、これまでに篩部発生系譜で優先的に発現することがわかっている発生上重要な遺伝子 (*APL*, *CVP2*, *OPS*, *SMAX1*, *SMXL3*, *SMXL4*, *SUC2*, *TDIF*) などが誘導されることが確認された。Phloem-Dof の過剰発現は細胞分裂も誘導するが、それに対応するように、*CYCD6;1*, *CYCA2;1*, *CYCD4;1*, *CYCD3;1*,

*CYCD3;2*, *CYCD3;3* が誘導されていた。また、篩部形成に抑制的に働くことが知られていた CLE ペプチド (CLE25, 26, 45) が誘導されていた。

CLE25, 26, 45 は篩部形成を抑制することが知られていたが、遺伝子破壊株が解析されていなかったため、これらの遺伝子の内在の機能は道であった。私達は *c1e25/26/45* 三重変異体を作成し、篩部発生の蛍光マーカー遺伝子 (*APL*, *SUC2*) を導入することや、ENOD9 を蛍光抗体法で染色することで篩部形成の表現型を詳細に観察した。その結果、*c1e25/26/45* では篩部領域が広がることがわかった。また、Isothermal titration calorimetry によって CLE25, 26, 45 と BAM1, BAM3 との間の結合定数を求め、これらがリガンド-受容体の関係にあることを明確にした。これらの CLE の受容体である BAM1, BAM2, BAM3 をコードする遺伝子を破壊した *bam1/2/3* 三重変異体や、BAM と共に働く共受容体 CIK2 と CIK3 をコードする遺伝子を破壊しても同じように篩部領域が拡大した。これらのことから、CLE ペプチドが篩部形成の側方阻害因子として働いていることがわかった。

CLE によって活性化された BAM-CIK 受容体複合体はどのようにして周辺細胞での篩部形成を抑制しているのだろうか。私たちは、CLE25 が phloem-Dof タンパク質の量を転写後調節によって減少させることで篩部形成を阻害していることを見出した。では、篩部になるべき細胞で作られた CLE はその細胞での篩部への分化を抑制しないのか？ phloem-Dof タンパク質は phloem-Dof 遺伝子の発現を促進することでポジティブフィードバックを形成するので、最初に発現を始めた細胞では Dof の発現が安定化する。また、私たちは、phloem-Dof は OPS と呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子を活性化することも見出した。OPS は BAM の機能を阻害することが報告されているので、phloem-Dof による OPS の活性化も、篩部になる予定の細胞での CLE による阻害が起きにくくしていると考えられる。この2つの仕組みのために篩部になるべき細胞は篩部になり、周辺細胞が篩部になるのを抑制していることが明らかになった (図2)。

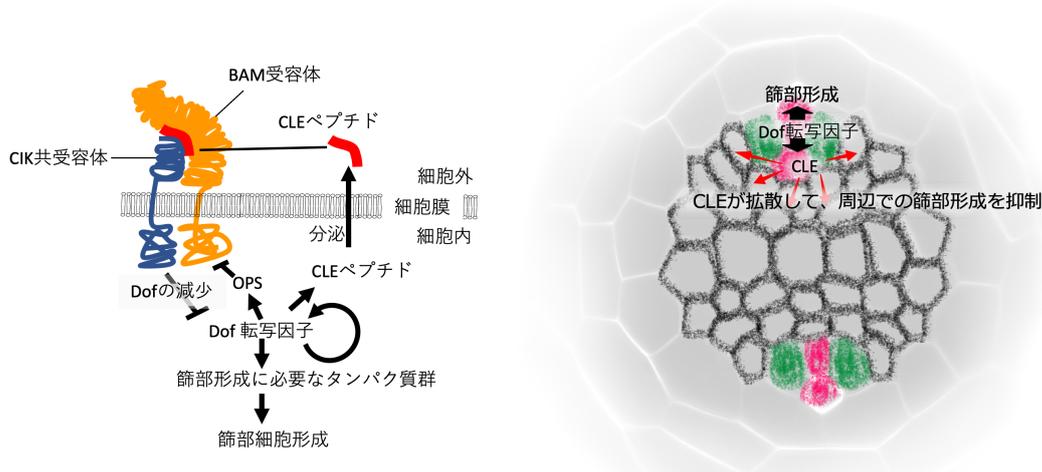


図2. Phloem-Dof転写因子は篩部形成に必要な遺伝子群を誘導するとともに、分泌ペプチドCLEを誘導する。CLEは篩部形成を抑制することで負のフィードバックを形成する。このことで、適切なパターンで篩部が形成されることを解明した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhang Y, Mitsuda N, Yoshizumi T, Horii Y, Oshima Y, Ohme-Takagi, M, Matsui M, Kakimoto, T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Two types of bHLH transcription factor determine the competence of the pericycle for lateral root initiation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 633-643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41477-021-00919-9	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 -
1. 著者名 1.Zhang Y, Umeda M, Kakimoto T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Pericycle cell division competence underlies various developmental programs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 29-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.1202a	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 -
1. 著者名 Matsuura Yuki, Fukasawa Narumi, Ogita Kosuke, Sasabe Michiko, Kakimoto Tatsuo, Tanaka Hirokazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Early Endosomal Trafficking Component BEN2/VPS45 Plays a Crucial Role in Internal Tissues in Regulating Root Growth and Meristem Size in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1027-1027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.01027	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 Qimuge Hasi, Tatsuo Kakimoto	4. 巻 63
2. 論文標題 ROP Interactive Partners are Involved in Control of Cell Division Pattern in Arabidopsis Leaves	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1130-1139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcac089	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 Pingping Qian, Wen Song, Miki Zaizen-Iida, Sawa Kume, Guodong Wang, Ye Zhang, Kaori Kinoshita-Tsujimura, Jijie Chai, Tatsuo Kakimoto	4. 巻 8
2. 論文標題 A Dof-CLE circuit controls phloem organization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 817-827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-022-01176-0	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22件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 柿本辰男
2. 発表標題 Regulation of vascular development by CLE peptides
3. 学会等名 日本植物学会84回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柿本辰男
2. 発表標題 Transcription factors that govern the stem-cell-like features of pericycle
3. 学会等名 第61回 日本植物生理学会 サテライトシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ハスチムグ、柿本辰男
2. 発表標題 ROP interactive partners (RIPs) regulate microtubule dynamics and orientation of cell division in the leaves
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ye Zhang , Nobutaka Mitsuda , Takeshi Yoshizumi , Yoko Horii , Yoshimi Oshima , Masaru Ohme-Takagi , Minami Matsui , Tatsuo Kakimoto
2. 発表標題 PFAs and PFBs, two types of bHLH proteins, determine the competence of pericycle for lateral root initiation
3. 学会等名 Secrets of stem cells underlying longevity and persistent growth in plants (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿本辰男
2. 発表標題 転写因子-ペプチド-受容体-転写因子フィードバックループによる篩部パターン形成の仕組み
3. 学会等名 近畿植物学会 第 10 回 講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金田紗苗 柿本辰男
2. 発表標題 側根原基形成における局所的なオーキシン生合成の役割
3. 学会等名 近畿植物学会 第 10 回 講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本凜、柿本辰男
2. 発表標題 シロイヌナズナの側根形成初期に発現するGATA23遺伝子の破壊株の解析
3. 学会等名 近畿植物学会 第 10 回 講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金田紗苗, 柿本辰男
2. 発表標題 側根原基形成における局所的なオーキシン生合成の役割
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ハス其木格, 柿本辰男
2. 発表標題 シロイヌナズナの葉形態形成におけるRIPタンパク質の機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ye Zhang, Nobutaka Mitsuda, Takeshi Yoshizumi, Youichi Kondou, Masaru Takagi, Minami Matsui, Tatsuo Kakimoto
2. 発表標題 Identification of key transcription factors that determine pericycle stem cell identity in Arabidopsis.
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柿本辰男
2. 発表標題 Regulation of vascular development by CLE peptides
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ハスチムグ、柿本辰男
2. 発表標題 ROP interactive partners (RIPs) regulate microtubule dynamics and orientation of cell division in the leaves
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuo Kakimoto
2. 発表標題 Transcription factors that govern the stem-cell-like features of pericycle
3. 学会等名 第61回 日本植物生理学会 サテライトシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ye Zhang , Nobutaka Mitsuda , Takeshi Yoshizumi , Yoko Horii , Yoshimi Oshima , Masaru Ohme-Takagi , Minami Matsui , Tatsuo Kakimoto
2. 発表標題 PFAs and PFBs, two types of bHLH proteins, determine the competence of pericycle for lateral root initiation
3. 学会等名 国際シンポジウム Secrets of stem cells underlying longevity and persistent growth in plants (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金田紗苗、柿本辰男
2. 発表標題 内鞘細胞の側根形成能を支配するPFA/PFB転写因子の下流遺伝子の解析
3. 学会等名 第86回 日本植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Pingping Qian, Tatsuo Kakimoto
2. 発表標題 A Dof-CLE circuit controls phloem organization
3. 学会等名 第86回 日本植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本凜、柿本辰男
2. 発表標題 内鞘細胞の側根形成能を支配するPFA/PFB転写因子の下流遺伝子の解析
3. 学会等名 2022. 11.29第11回 近畿植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金田紗苗、柿本辰男
2. 発表標題 側根創始細胞の核の移動におけるオーキシンの役割
3. 学会等名 2022. 11.29第11回 近畿植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsuo Kakimoto
2. 発表標題 Molecular basis of the competence for lateral root formation
3. 学会等名 29th FAOBMB & the 2022 CSBMB Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金田紗苗, 柿本辰男
2. 発表標題 側根創始細胞の核の移動におけるオーキシン生合成の役割
3. 学会等名 第64回植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Pingping Qian, Tatsuo Kakimoto
2. 発表標題 CLE-BAM/CIK signaling in root vascular patterning
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sanae Kaneta, Tatsuo Kakimoto
2. 発表標題 Auxin biosynthesis inhibitors impair auxin-induced directional nuclear migration in lateral root founder cells in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2023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			
ドイツ	Max plank fur plant breeding research			
中国	清華大学			