

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570030

研究課題名（和文）植物の不等分裂-極性形成から運命決定まで一を制御する新規因子群の単離と機能解析

研究課題名（英文）Isolation and characterization of novel factors that regulate asymmetric cell division in plants

研究代表者

藤田 知道 (FUJITA TOMOMICHI)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：50322631

研究成果の概要（和文）：

本研究ではヒメツリガネの不等分裂する幹細胞に着目し、新たな不等分裂制御因子を多数同定し、機能を明らかにすることを目的とした。その結果、植物特異的な新規因子や転写因子、真核生物に共通に存在するクロマチンリモデリング因子や新規因子、低分子量Gタンパク質等を同定することができた。さらに細胞周期を制御するサイクリン依存性キナーゼが極性維持に関わることを見出した。また不等分裂を阻害し等分裂を誘導する細胞壁タンパク質を見出した。

研究成果の概要（英文）：

Since little is known about molecular mechanisms of asymmetric cell division in plants, we undertook to identify genes that are involved in the processes. The moss, *Physcomitrella patens* provides a good system for the study of asymmetric cell division. We identified more than 60 genes that impaired asymmetric cell division when overexpressed. We explored dynamics of the candidate's proteins during asymmetric cell division by introducing a yellow fluorescent protein as a tag into the c-terminus. We found proteins with unknown function, plant-specific transcription factors, chromatin remodeling factors, small G proteins related to asymmetric cell division. Moreover, putative cell wall proteins are responsible for a suppression of the asymmetric cell division.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：植物、細胞分裂、細胞極性、発生・分化、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

| 多細胞生物は1個の受精卵や幹細胞の不等

分裂を出発点とし、さまざまな細胞をつくりだす。このように不等分裂による細胞の自己複製や増殖・分化のバランスの正しい制御は、個体の発生を支える最も基本的な原理であり、不等分裂の分子機構を理解することはこの基本原理のしくみを理解することである。不等分裂は発生過程のあらゆる時期にさまざまな細胞で見られるものの、後生動物においては共通の分子機構があることがあきらかになってきた。

一方、植物の発生においても不等分裂は大きな役割を果たしている。陸上植物は細胞壁を持ち細胞が移動できないため、不等分裂の制御はその後の発生に大きな影響を与える重要なプロセスである。しかしながら、後生動物で不等分裂の研究材料とされる受精卵や幹細胞が、陸上植物の場合親の組織内に存在し単離、培養することが困難であるなど、陸上植物での研究は適切な実験材料に乏しく、その分子機構についてはまだよくわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒメツリガネゴケの幹細胞が単独で培養可能であるなど、植物の不等分裂研究に極めて優れた材料であることに着目し、不等分裂の制御に関わる新しい因子を多数同定し、その分子機構を明らかにし、植物不等分裂の分子機構の全貌解明に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 完全長 cDNA の一過的過剰発現スクリーニングによる幹細胞の不等分裂異常を引き起こす原因遺伝子の同定

(2) 一過的過剰発現により同定した不等分裂候補遺伝子について、両末端の塩基配列情報からゲノムデータベースにより原因遺伝子を特定する。分子系統樹を作成し各生物種でのオルソログを同定し、機能予測を行う。

(3) ほかの生物との類似性に基づき、不等分裂制御に関わると考えられる因子を選抜し、プロトプラストで一過的過剰発現し、不等分裂異常を指標としたスクリーニングを行う。

(4) 以上より同定できた候補遺伝子産物の不等分裂過程における細胞内局在のタイムラプス観察を行う。内在性のプロモーター制御下における候補遺伝子産物のライブセルイメージングを行うため、遺伝子ターゲティング法により黄色蛍光蛋白質（シトリン）遺伝子をそれぞれの遺伝子座にノックインした安定形質転換体を作成する。それぞれのシトリンノックイン体からプロトプラストを調整し、不等分裂の全行程における融合タン

パク質の細胞内局在の変化を調べる。極性形成や不等分裂は、タンパク質自体の極性分布がその機能発現に必須である例が知られている。そこで、不等分裂前に細胞の片側に局在する因子や不等分裂後の姉妹細胞の一方に局在する因子に特に注目する。

(5) 以上の解析結果より総合的に判断して、さらに詳細に解析すべき不等分裂制御因子を決定し、安定過剰発現体、安定機能抑制体、条件的過剰発現体、条件的機能抑制体等を作成し、表現型を詳細に調査し、不等分裂のどの過程の制御に機能しているかを考察する。

4. 研究成果

不等分裂制御候補遺伝子 5 9 種類の全てに対して、citrine 蛍光タンパク質ノックイン安定形質転換体の作成し、それら全てに対して融合タンパク質の局在観察を行ったところ、幹細胞で顕著に蓄積するものを 10 種類同定できた。不等分裂の全行程におけるこれら融合タンパク質の動態を観察したところ、植物特異的な機能未知因子 VQ モチーフタンパク質が、細胞周期 G1/S の進行に関わると考えられた。またこれらの中から細胞の増殖活性と融合タンパク質の蓄積レベルがよい相関を示すクロマチンリモデリング因子と植物特異的転写因子を 3 種類同定することができた。

また本来の不等分裂を抑制し、等分裂を誘導する可能性のある新規因子 2 種類を一過的過剰発現スクリーニングにより同定することができた。これら因子の機能を、遺伝子破壊体、誘導型遺伝子過剰発現体を作成し解析した。またこれらタンパク質の局在解析を行った。その結果ともに細胞壁タンパク質として機能し、不等分裂を制御するタンパク質であることが示唆された。

さらに不等分裂の初期過程の細胞極性の形成・維持に関わる低分子量 G タンパク質とその活性化因子を同定した。さらにこれらと同じ表現型を示す機能未知な極性制御因子を 1 種類同定することに成功した。また細胞周期を制御するサイクリン依存性キナーゼが、細胞分裂を制御する機能に加えて細胞極性の維持に関わる機能を明らかにすることができた。

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 5 件)

① Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Gribskov, M., dePamphilis, C., Albert, V.A., Aono, N., Aoyama, T., Ambrose, B.A., Ashton, N.W., Axtell, M.J., Barker, E., Barker, M.S., Bennetzen, J.L.,

Bonawitz, N.D., Chapple, C., Cheng, C., Correa, L.G.G., Dacre, M., DeBarry, J., Dreyer, I., Elias, M., Engstrom, E.M., Estelle, M., Feng, L., Finet, C., Floyd, S.K., Frommer, W.B., Fujita, T., (他 73 名) (2011) The compact Selaginella genome identifies changes in gene content associated with the evolution of vascular plants. *Science*, 査読有, in press.

② Fujita, T. and Hasebe, M. (2009) Convergences and divergences in polar auxin transport and shoot development in land plant evolution. *Plant Signaling & Behavior*, 査読有, 4, 313-315.

③ Oda, Y., Hirata, A., Sano, T., Fujita, T., Hiwatashi, Y., Sato Y., Kadota, A., Hasebe, M., and Hasezawa, S. (2009) Microtubules regulate dynamic organization of vacuoles in *Physcomitrella patens*. *Plant and Cell Physiology*, 査読有, 50, 855-868.

④ Hiwatashi, Y., Obara, M., Sato, Y., Fujita, T., Murata, T., and Hasebe, M. (2008) Kinesins are indispensable for interdigitation of phragmoplast microtubules in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, 査読有, 20, 3094-3106.

⑤ Inouye T., Odahara M., Fujita T., Hasebe M., Sekine Y. (2008) Expression and complementation analyses of a chloroplast-localized homolog of bacterial RecA in the moss *Physcomitrella patens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 72, 1340-1347.

[学会発表] (計 15 件)

① 土屋 祐弥 アブシジン酸により誘導される細胞分裂と細胞分化に関わる新奇因子の同定と解析、日本植物生理学会、2011年3月20-22日、東北大学

② 巻口 勇馬 ヒメツリガネゴケの不等分裂幹細胞における CDKA の機能解析、日本植物生理学会、2011年3月20-22日、東北大学

③ 巻口 勇馬、ヒメツリガネゴケの不等分裂幹細胞における CDKA;1 の機能解析、日本分子生物学会、2010年12月7-10日、神戸ポートアイランド

④ 土屋 祐弥 アブシジン酸による細胞分

裂様式変更に関わる新奇因子の単離と解析、日本植物学会、2010年9月9-11日、中部大学

⑤ 藤田 知道 Switching between asymmetric cell division and symmetric cell division in the moss, *Physcomitrella patens*. MOSS2010, 2010 July 21-24, Sapporo

⑥ 北川宗典 ヒメツリガネゴケ原系体を用いた細胞レベルでの原形質連絡制御の解析、日本植物生理学会、2010年3月18-21日、熊本

⑦ 中村康平 ヒメツリガネゴケにおける ABA による不等分裂から等分裂への切り替えの解析、日本植物生理学会、2010年3月18-21日、熊本

⑧ 一力綾子 ヒメツリガネゴケにおいて不等分裂制御への関与が推測される GRAS ファミリー転写因子の機能解析、日本分子生物学会、2009年12月9-12日、横浜

⑨ 中村康平 ヒメツリガネゴケにおける ABA による不等分裂から等分裂への切り替えの解析、日本分子生物学会、2009年12月9-12日、横浜

⑩ 藤田知道、Functional analyses of genes responsible for asymmetric cell division in *Physcomitrella patens*、MOSS2009、2009Oct22-25 St.Louis, MO, USA

⑪ 藤田知道 不等分裂モデルであるヒメツリガネゴケ頂端幹細胞に局在するタンパク質群の同定および機能解析 日本植物生理学会、2009年3月21日-24日、名古屋大学

⑫ 北川宗典 原形質連絡による細胞間情報伝達制御と細胞の分化状態との関係性を探る、日本植物生理学会、2009年3月21日-24日、名古屋大学

⑬ 藤田知道 植物幹細胞に蓄積するタンパク質群のタイムラプス解析、日本分子生物学会年会、2008年12月9日-12日、神戸ポートアイランド

⑭ 一力綾子、ヒメツリガネゴケにおける不等分裂に関わる因子の相互作用、日本植物学会、2008年9月25日-27日、高知大

⑮ 藤田 知道、Spatio-temporal accumulation of proteins during

asymmetric stem cell division in
Physcomitrella patens, MOSS2008, 2008
Aug 17-22, Tampere, Finland

〔図書〕（計1件）

藤田知道 朝倉書店、植物の百科事典、2009
年、179-180 ページ（共著）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.sci.hokudai.ac.jp/~tfujita/Fujita/
welcome.html](http://www.sci.hokudai.ac.jp/~tfujita/Fujita/welcome.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 知道 (FUJITA TOMOMICHI)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：50322631

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし