

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 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570042

研究課題名（和文） 根冠細胞の分化と機能発現の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of root cap differentiation and functional expression

研究代表者

中島 敬二 (NAKAJIMA KEIJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：80273853

研究成果の概要（和文）：種子植物の根端に存在する「根冠」は、分裂組織の形成や保護、根の重力感受などを担う重要な組織である。我々はシロイヌナズナにおいて根冠の分化や成熟を制御する NAC 転写因子 SOMBRERO (SMB) を同定している。マイクロアレイを用いて SMB の下流遺伝子を探索した結果、脂質や多糖の代謝酵素や、分泌性タンパク質をコードする遺伝子が同定された。また SMB とよく似た NAC 転写因子 SBL1 と SBL2 も同定された。レポーター解析の結果、これらの遺伝子はいずれも根冠の外層部で特異的に発現していることが明らかとなった。この結果は、SMB が根冠細胞の機能発現に必要な遺伝子の発現を調節することで、根冠の分化や成熟を制御していることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Root cap has several important functions, such as protection of root meristem from surrounding environment and the gravity sensing. We had identified the Arabidopsis NAC transcription factor, SOMBRERO (SMB), as a key regulator of root cap differentiation and maturation. Microarray analysis identified, more than 20 genes that act downstream of SMB in the root cap. These genes included two other NAC transcription factor genes *SBL1* and *SBL2*, as well as genes involved in lipid and polysaccharide metabolism and those encoding secreted proteins. Reporter analysis revealed that they were indeed expressed specifically in the outer layers of root cap, supporting the notion that SMB acts in root cap differentiation by regulating these downstream genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：植物分子生物・生理学

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：パターン形成、分裂組織、根、根冠、植物、細胞分化、転写因子、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

種子植物の根端には「根冠」と呼ばれる組織が存在する。根冠は、根端分裂組織の保護や重力感受、土壌への代謝産物の分泌など、植物の生育に重要な様々な機能を担っている。シロイヌナズナにおいては、根冠におけるオーキシンの濃度極大が根端メリステム形成の基盤となることも分かっている。

根冠には発生生物学的に見て2つの興味深い特徴がある。1つ目は、根冠細胞が細胞系譜の異なる2種類の幹細胞に由来する点である。すなわち根冠の中央部（コルメラ）は独自の幹細胞（コルメラ幹細胞, CI）に由来するのに対し、側部根冠は表皮と共通した幹細胞(ELI)に由来する（図1）。成熟した根冠では、由来の異なるコルメラと側部根冠が一体となって細胞層を形成している。

2つ目は細胞のターンオーバーの速さである。根冠は数層の細胞層からなるが、土壌と接している最外層が能動的に剥離し、同じ速度で内側から新しい細胞が供給される。シロイヌナズナの場合、幹細胞から新たに生じた細胞が最外層で剥離するまでに5日程度しかかからない。この短い間に根冠細胞の初期分化と機能発現、そして剥離のための細胞壁の分解が進行する。

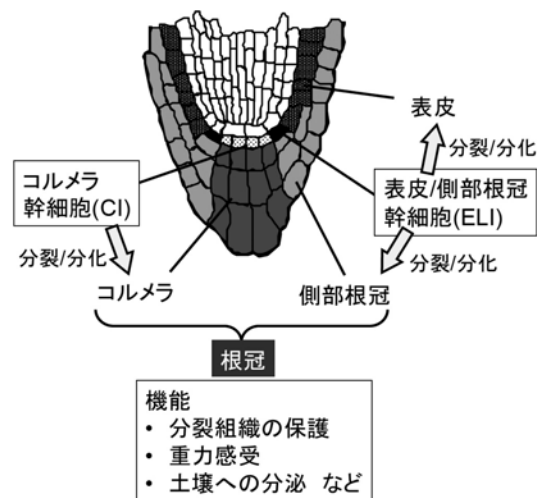


図1 根冠組織の構造と発生様式

根冠は植物の生育に重要な機能を担っているが、その分化や機能発現の機構については、分子レベルでの知見が非常に乏しい。根冠の分化に特異的な異常をもつ変異体としては、シロイヌナズナの *wox5* が知られているが、*WOX5*は根冠の幹細胞を未分化に保つ遺伝子であり、根冠の分化を直接制御するものではない。

我々はこれまでに、酵母の転写因子 GAL4 とその結合配列 UAS をもちいた独自のアクティベーションタギング系を開発し、根のパターン形成変異体を複数単離した。このうちの

1つでは、根冠をつくる幹細胞の機能が停止し、表皮細胞も失われた（図2）。その後の解析により、この表現型が NAC ドメイン型転写因子 SOMBRERO (SMB) の異所的な発現によるものであることが分かった。一方、*SMB* の機能欠損変異体 *smb* では、根冠をつくる幹細胞の分裂が亢進していた（図2）。また野生型と比較して根冠の剥離が遅れており、根端から離れた位置においても根冠細胞層が付着したままとなっていた。レポーター法により、*SMB* の発現組織を解析した結果、*SMB* は根冠の幹細胞では発現しないが、その娘細胞が根冠に分化すると弱く発現し、根冠の成熟に従って発現強度が増加していることが明らかとなった（図2）。

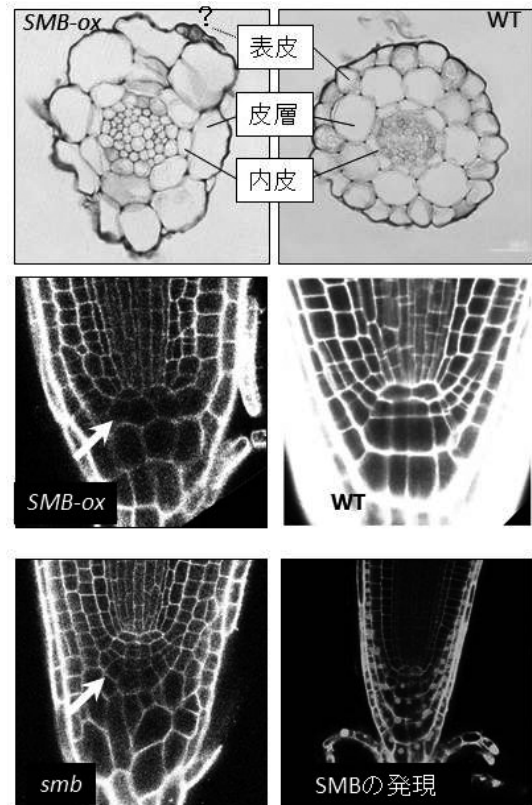


図2 *SMB* の過剰発現体と変異体の表現型、及び *SMB* 遺伝子の発現パターン

2. 研究の目的

以上の結果は、*SMB* が根冠細胞の分化や成熟を促進する重要な制御因子であることを示唆している。*SMB* の過剰発現体では、根冠の分化が幹細胞においても進行したために幹細胞性が失われ、同じ幹細胞に由来する表皮までが失われたと考えられる。反対に *smb* 変異体では、根冠の分化あるいは成熟が遅れていると仮定すると、変異体の表現型をうまく説明することができる。本研究課題では *SMB* が、根冠の初期分化から成熟までのどのように制御しているのかを明らかにするた

め、根冠において *SMB* により発現制御される遺伝子を同定し、これまで未知であった根冠の分化と機能発現の分子基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイを利用した *SMB* 下流遺伝子の同定

SMB の下流で細胞分化や成熟に機能する遺伝子を同定するため、ステロイドホルモン誘導型の *SMB* 過剰発現体 (*iSMBox*) の根を用いて、誘導前と誘導後の転写プロファイル、アジレント 44K マイクロアレイにより比較した。並行して野生型の根と *smb* 変異体の転写プロファイルも比較した。*SMB* は転写活性化因子であると考えられるので、*iSMBox* で発現が上昇し、かつ *smb* において野生型よりも発現が低下している遺伝子を探索した。さらに Birnbaum や Brady らの根組織別発現プロファイルデータをもとに、根冠で優先的に発現している遺伝子に絞り込んだ。

(2) レポーター遺伝子を用いた下流遺伝子の発現解析

上で同定された、*SMB* の下流で根冠の分化や成熟に機能すると考えられる候補遺伝子について、機能重複が推定されるものや、根冠での発現特異性が低いものを除いた 18 個について、5' 上流領域のゲノム断片をクローニングし、核移行型 YFP-GUS 融合遺伝子 (nYG) に融合した。これらのコンストラクトを野生型シロイヌナズナ植物へ形質転換し、レポーターラインを作製した。

(3) リアルタイム PCR による下流遺伝子の発現レベルの解析

同定された遺伝子の野生型、*smb* 変異体、*iSMBox* の根における発現レベルを比較するため、各遺伝子についてリアルタイム PCR による発現解析を行った。根端部から RNA を抽出し、1 本鎖 cDNA に変換したのち、タカラ社の SYBR Premix ExTaq kit と、Roche 社の LightCycler480 によりリアルタイム PCR を行った。各遺伝子について希釈系列から検量線を作製し、コントロール遺伝子 (*At5g59880*) に対する相対発現量を計算した。

4. 研究成果

上記 (1) の方法により、*SMB* の過剰発現により、発現が上昇し、*smb* 変異体において野生型よりも発現が低下している遺伝子を探索した。この方法では、*SMB* の発現量に応答する遺伝子がすべて同定されるため、根冠の分化や機能発現とは直接関係しない遺伝子も含まれてしまう可能性がある。そこで Benfey らのグループにより報告されている根の遺伝子発現マップを参考に、根冠において特異

的、あるいは優先的に発現していると考えられるものに絞り込み、30 個の候補遺伝子を得た。これらのほとんどは酵素をコードすると考えられたが、*SMB* と相関性が高い NAC 転写因子をコードする 2 つの遺伝子、*SMB-LIKE1* (*SBL1*) と、*SMB-LIKE2* (*SBL2*) も含まれていた。

酵素遺伝子としては、ワックス成分の合成遺伝子と考えられる脂質代謝関連酵素や、細胞壁成分の変換に関与すると考えられる糖代謝関連酵素などが見られた。また細胞死に関与すると考えられる遺伝子や、分泌性ペプチドをコードすると考えられる遺伝子なども得られた。

これらの下流候補遺伝子の発現パターンをレポーター法により調べた。まず、*SBL1* と *SBL2* については、*SMB* と同様に根冠において特異的に発現していた。しかし詳細な発現パターンは *SMB* とは異なっていた。*SMB* が分化した根冠細胞全体で発現しているのに対し、*SBL1* と *SBL2* は、いずれも根冠の最外層にある 1-2 層で特異的に発現していた (図 3)。また、*SBL1* と *SBL2* は *iSMBox* 植物においては根冠以外にも表皮で発現が認められた。反対に *smb* 変異体では、根冠の最外層でも発現しない細胞が見られた。

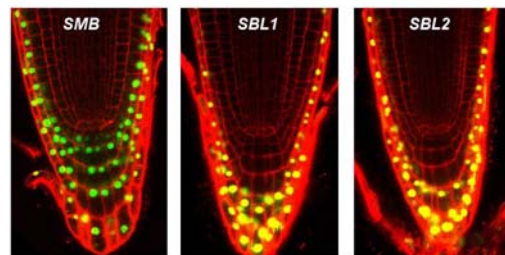


図 3 根冠における *SMB*, *SBL1*, *SBL2* の発現パターン

sb11 と *sb12* の各単独変異体には異常は検出されなかったが、二重機能欠損変異体においては、根冠細胞の剥離が遅延していた (図 4) また *smb sb11 sb12* 三重変異体においては、根冠細胞の剥離遅延に加え、若い根冠領域において、*smb* 変異体と同様に細胞パターンにも異常がみられた (図 4)。以上の結果は、根冠細胞の外層において、*SBL1* と *SBL2* が *SMB* 依存的に発現し、これらが根冠外層の成熟や剥離を制御している可能性を示唆する。

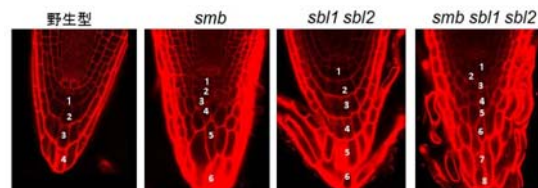


図 4 *smb*, *sb11*, *sb12* 多重変異体の根冠

マイクロアレイ解析の結果を確認するとともに、各遺伝子型の根における正確な発現レベルを見積もるため、これらの下流候補遺伝子についてリアルタイムPCR解析を行った。その結果、脂質代謝関連酵素遺伝子の1つを除いて、すべて *SMB* の過剰発現により発現が上昇し、*smb* 変異体において野生型よりも発現が低下することが確かめられた (図5)。また同じ解析を、*sb11 sb12* 二重変異体や、*smb sb11 sb12* 三重変異体についても行った結果、各遺伝子ごとに、*SMB*, *SBL1*, *SBL2* の3つの転写因子に対する依存性に違いが見られることが明らかとなった (図5)。

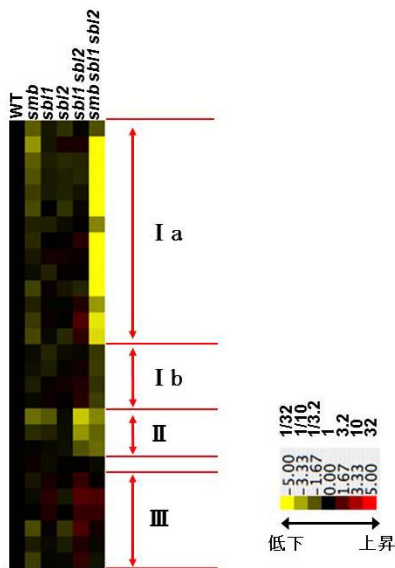


図5 各下流候補遺伝子の様々な遺伝子型背景における相対発現強度のクラスタリング
Ia, Ib, II, III の各グループは、3つの NAC 転写因子に対する依存性の違いで分類したもの。

さらに、これらの下流候補遺伝子の詳細な発現パターンを解析するため、それぞれのプロモーター領域に nYG レポーター遺伝子を融合したコンストラクトを作製し、野生型シロイヌナズナ植物に導入した。候補遺伝子の数が多かったため、根冠における発現特異性が弱いと推定される遺伝子や、ゲノム上でタンデムに重複している遺伝子などを整理し、合計 18 個の遺伝子についてレポーターラインを作製した。その結果、2 つの遺伝子についてはレポーターの発現が観察されなかったものの、他の 16 個の遺伝子について発現パターンを観察することができた (図6)。

どの遺伝子も共通して、根冠の最外層で発現していたが、その発現パターンには遺伝子によって相違が見られた。まず空間的な違いとしては、側部根冠細胞のみで発現するものと、コルメラと側部根冠の両方で発現するものが見られた。

また、根冠細胞が剥離する少し前から発現が始まるものと、剥離の直前から発現が始まるものがあり、剥離後の細胞でも発現が維持されるものと、剥離と同時に発現が低下する遺伝子が見られた。

これらの下流候補遺伝子の発現は、根冠全体で発現している *SMB* よりも、むしろ *SBL1* や *SBL2* の発現パターンに類似していた。このことは、これら 15 個の遺伝子が、*SMB* のみでなく、むしろ *SBL1* や *SBL2* を介した間接的な経路で発現制御されていることを示唆する。さらに遺伝子によって発現パターンに差があることは、未知の転写因子による協調的な制御を受けていることを示唆している。

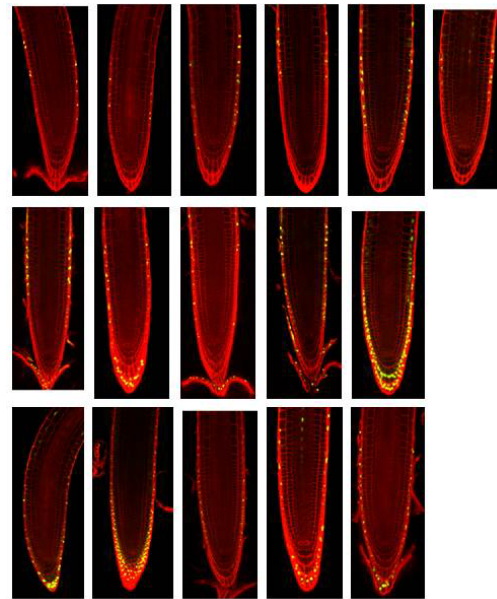


図6 16個の下流候補遺伝子のレポーターラインにおける YFP の発現パターン

今回の発現解析からは、内側の根冠細胞で発現する遺伝子は見つからなかった。*SMB* は内側の根冠細胞層でも発現し、コルメラ始原細胞の維持に必要な別の NAC 転写因子 FEZ の発現を抑えていることが示唆されている。今回解析した遺伝子の発現が根冠の外層に偏っていたのは、候補遺伝子を選別する際に組織特異的 GFP レポーターラインのセルソーティングで得られた遺伝子発現マップのデータを用いたためと考えられる。根冠細胞の外層は内層に比べて圧倒的に細胞数が多く、プールした細胞群のトランスクリプトームに対する寄与が大きい。また、根冠細胞の初期分化に機能する遺伝子は、他の組織の初期分化にも共通して機能している可能性も考えられる。また根冠の外層にある細胞は、他の組織には見られない独特の機能を果たしているため、もともと特異的な遺伝子の数が多いことも十分に考えられる。

本研究で得られたものも含め、根冠の内層と外層でそれぞれ特異的に発現する GFP マーカーラインが存在するので、これらを *SMB*、*SBL1* 及び *SBL2* の変異体や過剰発現体に交配し、それらの根から分化段階の異なる根冠細胞をソーティングしてトランスクリプトーム解析することで、根冠組織内の特異的な発現パターンと転写制御の違いを同時に見ることのできる発現マップを得ることができると期待される。

今後、これらの遺伝子が実際に根冠の分化や機能発現に関与しているかを明らかにするには、生物学的な機能を実証する必要がある。*SMB* の下流候補遺伝子の多くは、シロイヌナズナのゲノム中で遺伝子ファミリーを形成しており、同じ遺伝子座でタンデムに配置しているものもある。公開されている根の遺伝子発現マップを見ると、それら相同遺伝子の発現パターンもよく似ており、機能重複していると考えられる。そこで、相同遺伝子を一度に抑制できる人工マイクロ RNA (amiRNA) を設計し、それらを根冠細胞で特異的に過剰発現する植物の作製を進めている。今後、得られた植物の根冠の表現型を解析し、下流遺伝子が根冠の分化や成熟にどのように機能しているのかを検討する必要がある。

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)

[学会発表] (計 1 件)

中島敬二、中西美耶子、磯本淳志、橋本隆、NAC 転写因子 SOMBRERO は根冠分化を促進する、第 51 回日本植物生理学会年会 2010. 3. 23, 熊本

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/hashimoto/?cate=27>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 敬二 (NAKAJIMA KEIJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：80273853