

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22687003

研究課題名(和文)植物の表皮形成を制御する位置情報の解明

研究課題名(英文)Identification of positional signals regulating shoot epidermal cell fate

研究代表者

高田 忍 (Takada, Shinobu)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40456992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物が、特定の場所に決まった細胞を分化させるためには、遺伝子発現を決める転写因子が重要な役割を持つ。しかしながら、植物において、細胞の運命を決めるマスター転写因子の正体や、マスター転写因子の生産・活性を特定の細胞に限定するメカニズムは、ほとんど分かっていない。我々はシロイヌナズナのATML1が、地上部の表皮分化を正に制御するマスター転写因子としてはたらくことを初めて示した。さらに、ATML1の発現を最外層の細胞に限定するメカニズムを解明するために、新しいツールの開発をおこなった。

研究成果の概要(英文)：Cell-type specific transcription factors play key roles in determining cell fate through the regulation of gene expression. However, molecular mechanisms regulating the cell-type dependent activity of transcriptional factors are largely unknown. Our studies showed that ATML1 functions as a master transcriptional regulator for shoot epidermal cell fate in *Arabidopsis thaliana*. We developed new tools to identify key components that restrict ATML1 expression to the outermost cell layer.

研究分野：植物発生生物学

キーワード：細胞分化 位置情報 パターン形成 胚発生 転写制御 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生では、正確な位置に特定の性質・遺伝子発現を示す細胞が分化する必要がある。そのため、細胞はモルフォゲンの勾配などの「位置情報」を利用して、自分自身の位置を認識している。特に植物の発生では、細胞系譜よりも個体内での最終的な細胞の「位置」が細胞運命の決定に重要であることが分かっている(van den Berg et al, 1995)。しかしながら、植物の位置情報伝達に関わる遺伝子はあまり知られていない。これには二つの理由が考えられる。まず、植物には機能的に重複した遺伝子が多いため、単一遺伝子の変異では表現型が表れない可能性がある。また、位置情報が異常な変異体は胚致死となる可能性が高いが、芽生えの表現型に注目した変異体スクリーニングに比べて、ハウスキーピング遺伝子の変異体と区別し難く、表現型の解釈が難しい胚致死性変異体のスクリーニングは避けられてきた。

ATML1 は胚の表面に位置する細胞で発現し、そのホモログ *PDF2* とともに表皮形成を制御すると考えられている(Abe et al, 2003)。*ATML1* は細胞の identity が決まる以前の胚発生初期から胚の最外層で発現するため、位置情報によって直接その発現が制御されている可能性が高い(Lu et al, 1996)。これまでに我々は、*ATML1* の表皮特異的発現に十分な 101 bp と 300 bp の二つのシス領域を明らかにしている(Takada and Jürgens, 2007)。酵母の one-hybrid スクリーニングによって、101 bp の領域には *ATML1* や *PDF2* などの HD-ZIP class IV 転写因子が結合することが分かった。これら HD-ZIP class IV 遺伝子のプロモーターには自身の結合配列(L1 box)が存在するため、正のフィードバックによる発現制御が示唆されている(Abe et al, 2001; Abe et al, 2003)。一方、300 bp の領域には HD-ZIP class IV 以外の転写因子が結合することが分かった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、表皮分化を決める位置情報伝達経路を理解することである。そのために、*ATML1* の転写制御領域に結合する転写因子の解析をおこなう。さらに、新しい逆遺伝学的手法を開発することで、*ATML1* の発現を最外層に限定する因子のスクリーニングを可能にする。また、*ATML1* 転写因子が表皮特異的な遺伝子発現や表皮分化に与える影響を調べることで、表皮分化を決める転写制御機構の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 表皮特異的な遺伝子発現を決める転写因子の機能解析

atml1;pdf2 二重変異体が表皮を欠く葉を作ることから、*ATML1* と *PDF2* の少なくともどちらかが表皮分化に必要であることは既に報告されていた(Abe et al, 2003)。しかしな

がら、gain-of-function 実験の報告はなく、*ATML1* の発現が表皮分化に十分であるかについては分かっていた。そこで、estradiol 誘導系を用いて *ATML1* を胚または芽生え全体で過剰発現し、*ATML1* が表皮以外の細胞に表皮細胞の運命を与えられるかどうかを調べる。また、*ATML1* を転写抑制配列である SRDX と融合させ、発芽後の芽生え全体で発現誘導することで、*ATML1* の標的遺伝子の発現を発芽後に抑制する実験もおこなう。この実験により、*ATML1* が表皮運命の決定だけでなく、分化の維持にも必要かどうかを検証する。

(2) 表皮特異的な遺伝子発現を決める転写メカニズムの解明

L1 box を介した正のフィードバック制御の役割

L1 box は表皮特異的に発現する多くの遺伝子のプロモーターに存在する配列であるが、その役割は十分には分かっている。そこで、*ATML1* が表皮特異的な遺伝子の L1 box に局在するかどうかをクロマチン免疫沈降法によって確かめる。さらに、L1 box を持つ遺伝子の発現が、*ATML1* の過剰発現体で上昇し、*atml1;pdf2* 変異体で減少するかどうかを調べる。

L1 box を介さない制御

300 bp の領域に結合する転写因子が *ATML1* の発現を決めている可能性を検証するために、酵母の one-hybrid スクリーニングで見つかった転写因子の結合配列に変異を導入し、遺伝子発現パターンに与える影響を調べる。

ATML1 転写因子の活性が位置依存的に調節されている可能性の検証

ATML1 が自身の発現に与える影響を調べることで、*ATML1* の転写活性の細胞タイプまたは位置依存性も明らかにする。そのため、*ATML1* を胚または芽生え全体で発現させ、内側の細胞でも *ATML1* のプロモーター活性が誘導されるかを調べる。

(3) 位置情報を与える遺伝子を単離するためのツールの開発

位置依存的な転写因子の活性変化を可視化するレポーター系統の確立

転写因子と LexA の DNA 結合部位の融合タンパク質を、二成分系を用いて胚全体の細胞で作らせる。そして、LexA 結合配列の下流に GFP をつないだレポーターを用いて、転写因子の活性が細胞タイプまたは位置依存的に調節されているかを調べる。

胚で複数の細胞運命を同時に可視化する形質転換体の確立

胚致死性変異体の中で、ハウスキーピング遺伝子の変異体でなく、初期胚から表現型が異常となるものは、位置情報伝達が乱れている

可能性がある。そこで、複数の細胞運命を同時に可視化することで確実に細胞運命が異常となった胚致死変異体を選別する。そのためのレポーター系統を確立する。

4. 研究成果

(1) *ATML1* は表皮分化のマスター制御因子としてはたらく

ATML1 は表皮以外の細胞に表皮の細胞運命を与える

ATML1 が細胞運命に与える影響を調べるために、芽生え全体で *ATML1* を発現させる実験をおこなった。*ATML1* の過剰発現は胚致死になることが予測されたため、estradiol 転写誘導系を利用した。芽生え全体で *ATML1* を過剰発現したところ、子葉の内層でも *ATML1* や *FDH* などの表皮特異的な遺伝子の発現が検出された。また、L1 box を持つ多くの遺伝子の mRNA 量が増加していることも分かった。葉の内側の細胞を観察したところ、本来葉肉細胞が作られる場所に、気孔や毛状突起など、表皮で特徴的に見られる構造が作られていた (図 1)。一方、*atml1;pdf2* 変異体では、L1 box を持つ複数の遺伝子の発現が低下していた。これらの結果は、*ATML1* が表皮分化を正に制御するマスター遺伝子としてはたらくことを示唆している。

ATML1 は表皮特異的な遺伝子のプロモーターに局在する

クロマチン免疫沈降実験の結果、*ATML1* は、L1 box を含む複数のプロモーター領域に局在することが分かった。このことから、*ATML1* が表皮特異的な遺伝子の発現を直接制御していることが示された。

ATML1 は葉肉細胞の分化を抑制する
atml1;pdf2 二重変異体の葉は表皮を欠き、葉肉細胞が露出している (Abe et al, 2003)。表面に作られた葉肉細胞も表皮マーカー遺伝子を発現することから、*atml1;pdf2* では、表皮として発生した細胞が、部分的に葉肉細胞へと分化転換した可能性がある。また、*ATML1* を葉全体で発現させたところ、内側の葉肉細胞の分化や、葉肉細胞マーカー遺伝子の発現が抑制され、透明の細胞からなる葉が作られた (図 1)。これらの結果から、*ATML1* や *PDF2* が葉肉細胞の分化を抑制していることが示唆された。

ATML1 またはその下流遺伝子は表皮分化の維持にも重要である

atml1;pdf2 の強いアリルは胚致死になるため、発芽後の *ATML1* や *PDF2* の機能を調べるのは困難である (San-Bento et al, 2014; Ogawa et al, 2015)。そこで、*ATML1* を転写抑制配列である *SRDX* と融合させ、発芽後の芽生え全体で発現誘導した。その結果、*ATML1-SRDX* を発現する植物では、子葉や本葉の表皮が脱分化し、表皮特異的な遺伝子の発

現も低下することが分かった。このことから、*ATML1* またはその下流遺伝子の働きが、表皮分化の決定だけでなく、維持にも重要であることが示された。

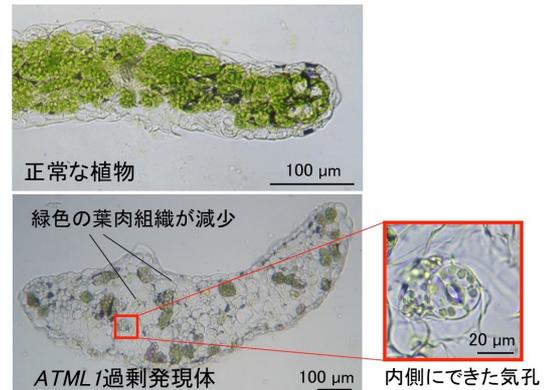


図 1 *ATML1* 過剰発現体の表現型
ATML1 を葉全体で発現させると、緑色の葉肉細胞が減少し、内側の組織にも気孔が作られた。

(2) 表皮の identity と「表面」の位置が垂層分裂に必要である

植物の表皮細胞は規則的な垂層分裂をする傾向が強い。しかしながら、表皮細胞の分裂面を決めるメカニズムは分かっていない。*ATML1-SRDX* を発現する表皮では規則的な垂層分裂パターンが乱れることから、*ATML1* やその下流遺伝子は規則的な垂層分裂に必要であることが分かる。一方、内層で *ATML1* を過剰発現させてできた気孔で、一對の孔辺細胞を分ける細胞壁の角度 (孔辺母細胞の分裂面の角度) を調べたところ、器官の表面に対して垂直な方向に分裂する傾向は見られなかった。しかし、L2 層に出来た気孔や、葉肉の空隙に面する気孔は、「表面」に対して垂直な方向に分裂していた (図 2)。これらのことから、表皮の identity を持ち、「表面」近くに位置することが、表皮細胞の規則的な垂層分裂に必要であることが示唆された。

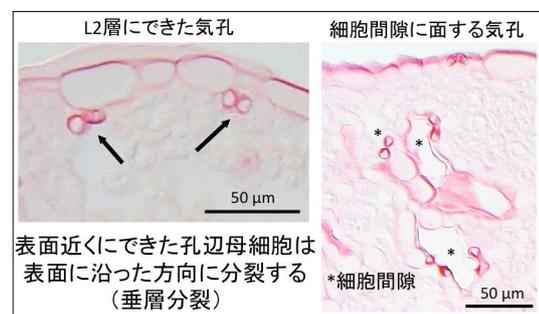


図 2 *ATML1* の過剰発現により、葉の内側の細胞にできた気孔の分裂面
表皮の identity と、表面近くに位置することが表皮細胞の垂層分裂に必要であることが示唆された。

(3) *ATML1* は転写後調節を受けている可能性がある

芽生えや胚全体で *ATML1* を誘導したところ、表皮以外の内側の細胞層でも *ATML1* が転写因子として機能できることが分かった。一方、*ATML1* のはたらきが弱い細胞も観察された。これらのことは、*ATML1* が細胞タイプまたは位置に応じて異なる転写後制御を受けている可能性を示唆する。

(4) *ATML1* プロモーターに作用する転写因子の解析

300 bp の領域で見つかった二つの転写因子結合配列に変異を導入したが、表皮特異的な発現パターンには影響がなかった。このことから、他の未知転写因子が 300 bp 領域を介した転写制御に関わっていることが示唆された。

(5) 位置情報を与える因子を同定するためのツールの開発

位置依存的な転写活性を検出するツールの開発

GAL4/UAS 二成分系を用いて、転写因子と LexA の DNA 結合部位の融合タンパク質を胚全体の細胞で作る形質転換体を作製した。胚全体の細胞で転写が誘導されていることは、UAS 下流につないだ *RFP* の発現で確認した。さらに、LexA 結合配列の下流に *GFP* をつないだレポーターを作製し、上記の系統に導入することで、転写因子の活性を可視化した。植物ホルモン応答性の転写因子を使用したところ、その植物ホルモンの濃度が高いと言われている細胞で、強い GFP 蛍光が観察された。

胚で複数の細胞運命を同時に可視化するマーカーラインの確立

異なる蛍光タンパク質を用いて、胚の最外層、内層、胚柄を同時に可視化する形質転換体を作製した。この形質転換体では、一つの T-DNA 内に三つのレポーター遺伝子が含まれているので、掛け合わせによって特定のマーカーだけが分離する心配がない。この形質転換体を用いて、現在までに、約 50 の胚致死変異体について細胞運命の変化を調べ、表皮運命が異常となる候補変異体について詳細な解析をしているところである。

(6) まとめと今後の展望

本研究により、*ATML1* が地上部の表皮運命の指定と維持に関わるマスター転写因子の一つであることが明らかになった。また、過剰発現体で葉の内側の組織で作られた気孔（孔辺母細胞）の分裂面を詳細に解析することで、表皮細胞固有の分裂特性が明らかになった。今後は過剰発現の系を利用することで、表皮分化に必要な標的遺伝子の網羅的な同定・解析をおこないたい。特に、表皮の垂層分裂面を決定する因子を明らかにしたい。また、*ATML1* の活性は、転写だけでなく、転

写後調節によっても制御されている可能性が示唆された。今後は、*ATML1* の細胞タイプ依存的な転写後調節と、下流遺伝子の発現調節との関係を明らかにしたい。さらに、開発したツールを用いて、*ATML1* の発現パターンや活性を決める因子を同定することで、表皮分化を決定する位置情報の正体を明らかにしたい。

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)

Shinobu Takada* and Hiroyuki Iida
Specification of epidermal cell fate in plant shoots. *Frontiers in Plant Science* 5:49. (2014). 査読有り

*Author for correspondence.

doi: 10.3389/fpls.2014.00049

Shinobu Takada*

Post-embryonic induction of *ATML1-SRDX* alters the morphology of seedlings.

PLoS ONE 8 (10): e79312 (2013). 査読有り

*Author for correspondence.

doi: 10.1371/journal.pone.0079312

Shinobu Takada*, Nozomi Takada, and Ayaka Yoshida

Induction of epidermal cell fate in *Arabidopsis* shoots. (addendum)

Plant Signaling & Behavior 8:e26236 (2013). 査読有り

*Author for correspondence.

doi: 10.4161/psb.26236

Shinobu Takada*, Nozomi Takada, and Ayaka Yoshida

ATML1 promotes epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* shoots.

Development 140, 1919-1923 (2013).

査読有り

*Author for correspondence.

doi: 10.1242/dev.094417

Nobutaka Mitsuda, Miho Ikeda, Shinobu Takada, Yuko Takiguchi, Youichi Kondou, Takeshi Yoshizumi, Miki Fujita, Kazuo Shinozaki, Minami Matsui, and Masaru Ohme-Takagi

Efficient Yeast One-/Two-Hybrid Screening Using a Library Composed Only of

Transcription Factors in *Arabidopsis thaliana*.

Plant Cell Physiol. 51, 2145-2151 (2010).

査読有り

doi: 10.1093/pcp/pcq161

[学会発表](計 20 件)

高田 希、吉田 彩香、高田 忍
ACR4 functions downstream of ATML1 to promote embryonic development.
第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都・世田谷区)
2015 年 3 月 17 日

飯田 浩行、吉田 彩香、高田 忍
Transcriptional and post-transcriptional regulation of *ATML1*, a key regulator for epidermal cell identity.
第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都・世田谷区)
2015 年 3 月 17 日

高田 希、吉田 彩香、高田 忍
ATML1 activates expression of *ACR4* during the initiation of epidermal cell fate.
第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都・世田谷区)
2015 年 3 月 18 日

飯田 浩行、吉田 彩香、高田 忍
表皮分化のマスター遺伝子である *ATML1* の位置依存的な発現および転写活性の制御について。
日本植物学会 第 78 回大会 明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)
2014 年 9 月 13 日

Nozomi Takada, Ayaka Yoshida, and Shinobu Takada
ATML1 activates the expression of *ACR4* during initiation of epidermal cell fate.
第 55 回日本植物生理学会年会 富山大学五福キャンパス(富山県・富山市)
2014 年 3 月 18 日

Shinobu Takada, Ayaka Yoshida, Hiroyuki Iida, and Nozomi Takada
Transcriptional regulation of epidermal cell fate in *Arabidopsis thaliana* shoots.
第 55 回日本植物生理学会年会 富山大学五福キャンパス(富山県・富山市)
2014 年 3 月 20 日

Shinobu Takada, Nozomi Takada, and Ayaka Yoshida
ATML1 promotes epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* shoots.
24th International Conference on Arabidopsis Research (Sydney Convention and Exhibition Centre, シドニー, オーストラリア). 2013 年 6 月 26 日

Nozomi Takada, Ayaka Yoshida, and Shinobu Takada
ARABIDOPSIS CRINKLY 4 is a downstream target of ATML1-mediated transcriptional

regulation.
24th International Conference on Arabidopsis Research (Sydney Convention and Exhibition Centre, シドニー, オーストラリア). 2013 年 6 月 25 日

高田忍、高田 希、吉田彩香
ATML1 promotes epidermal cell differentiation in the post-embryonic development
第 54 回日本植物生理学会年会 岡山大学(岡山県・岡山市) 2013 年 3 月 21 日

吉田彩香、Gerd Jürgens、高田忍
Regulation of epidermis-specific expression of *ATML1*
第 54 回日本植物生理学会年会 岡山大学(岡山県・岡山市) 2013 年 3 月 21 日

高田忍、吉田彩香、高田 希
シロイヌナズナの *ATML1* 遺伝子は表皮分化を正に制御する
第 35 回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場・マリメッセ福岡(福岡県・福岡市)
2012 年 12 月 13 日

吉田彩香、Gerd Jürgens、高田忍
ATML1 の表皮特異的な発現における autoregulation の役割
第 35 回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場・マリメッセ福岡(福岡県・福岡市)
2012 年 12 月 13 日

Shinobu Takada, Nozomi Takada, and Ayaka Yoshida
ATML1 regulates epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* shoots.
23rd International Conference on Arabidopsis Research (Hofburg Imperial Palace, ウィーン, オーストリア).
2012 年 7 月 4 日

高田忍、吉田彩香
ATML1 regulates epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* shoots
第 53 回日本植物生理学会年会 京都産業大学(京都府・京都市) 2012 年 3 月 16 日

高田忍、吉田彩香
Transcriptional regulation of epidermis-specific gene expression
第 34 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
2011 年 12 月 13 日

高田忍、吉田彩香
シロイヌナズナの *ATML1* 遺伝子は表皮特異的な遺伝子の発現を正に制御する
第 75 回大会日本植物学会 東大駒場キャンパス(東京都・目黒区駒場)

2011年9月17日

吉田彩香、Gerd Jürgens、高田忍
ATML1 の表皮特異的な発現を決める遺伝子の探索
第75回大会日本植物学会 東大駒場キャンパス(東京都・目黒区駒場)
2011年9月19日

高田忍、吉田彩香
シロイヌナズナの *ATML1* 遺伝子は表皮特異的な遺伝子の発現を正に制御する
第52回日本植物生理学会年会 東北大学(宮城県・仙台市) 2011年3月22日(東日本大震災の影響で中止)

吉田彩香、Gerd Jürgens、高田忍
ATML1 の表皮特異的な発現を決める遺伝子の探索
第52回日本植物生理学会年会 東北大学(宮城県・仙台市) 2011年3月20日(東日本大震災の影響で中止)

Shinobu Takada, Tatsuo Kakimoto, Gerd Jürgens.
Transcriptional regulation of epidermis-specific gene expression.
21st International Conference on Arabidopsis Research パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市). 2010年6月7日

[その他]
ホームページ
http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~shinobu_takada/index.html

報道
「植物マスター遺伝子を解明、葉の内部に表皮の組織を作成 阪大が成功」
産経新聞社, 2013年04月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 忍 (TAKADA, Shinobu)
大阪大学・理学研究科・助教
研究者番号: 40456992

(2) 研究協力者

高田 希 (TAKADA, Nozomi)
吉田 彩香 (YOSHIDA, Ayaka)
飯田 浩行 (IIDA, Hiroyuki)
伊藤 みはる (ITO, Miharuru)