

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 5月 29日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657027

研究課題名（和文） 植物幹細胞の非対称性を確立する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Study of molecular mechanism of asymmetry in plant stem cells

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）：

生物の発生では、1つの細胞が性質の異なる2つの細胞を生み出す不等分裂が重要な役割を果たしている。植物における不等分裂の制御機構は、まだ不明な点が多い。

私たちはヒメツリガネゴケ原糸体の細胞が、不等分裂することに注目し、その制御機構の解明を目指し研究を進めた。本研究では、不等分裂にともない非対称に分配される複数の因子に着目し、生細胞定量イメージングを行う等により、非対称分配を確立するしくみは複数経路あることを示唆することができた。またストレスなどにより、本来不等分裂する細胞が等分裂することを見出し、このような分裂様式の変更にかかわる因子を3種類同定し、その機能が分裂様式の変更に関わることを示唆することができた。

研究成果の概要（英文）：

Asymmetric cell division is important for multicellular organisms to control their developmental program. Molecular mechanisms of asymmetric cell division are still largely unknown in plants. The moss, *Physcomitrella patens* provides a good system for studying the mode of cell division since the whole processes are easily observable at a single cell level.

We identified ten of the fluorescent protein-tagged proteins were segregated asymmetrically during cell division, and found distinct types of uneven segregation are underlying during asymmetric cell division. We also found that either under a stress condition or upon abscisic acid treatment, the apical cell changed a cell division mode from asymmetry to symmetry. Then in order to understand a molecular mechanism for how the mode of cell division can be switched, we identified several genes, and further studied their function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：植物ホルモン・成長生理・全能性

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物は受精卵や幹細胞の不等分裂を出発点として、さまざまに細胞を分化させながら発生する。不等分裂にともなう運命決定

因子の非対称な分配は、それぞれの娘細胞に非対称な細胞運命をもたらすことになる。このように運命決定因子の非対称分配のしくみを知ることは、多細胞生物の発生原理の根

本の一つを理解することになる。

後生動物では運命決定因子の分配についての共通原理がわかってきた(Knoblich, 2008)。植物でも不等分裂による細胞運命の決定は重要である(Scheres & Benfey, 1999)。しかし受精卵や幹細胞の単離培養は難しく、不等分裂を細胞レベルで解析することは困難である。また、動物で共通に見出されたaPKC/PCP など非対称分配の鍵となる制御タンパク質群が植物には存在しないことなどから、植物には独自の運命決定因子の分配制御機構の存在が考えられているものの、その実体はまだよくわかっていない(Menke & Scheres, 2009; Petricka *et al.* 2009)。

このような状況のもと代表者はコケ植物(ヒメツリガネゴケ)が植物幹細胞の不等分裂の分子細胞生物学的研究に非常に優れた実験系であることに気づき、その分子機構を明らかにすることを目的に研究をすすめてきた(Fujita *et al.* 2004)。これまでに幹細胞の運命制御に関わる核内タンパク質4種類に着目し、不等分裂時の分配の様子を詳細に観察したところ、植物特異的なある転写因子の分配様式が、後生動物の運命決定因子の分配様式とは全く異なるらしいことに気がつき、本研究の出発点となった。

2. 研究の目的

そこで本研究は、後生動物とは異なる様式で、常に幹細胞側だけにのみ非対称分配される転写因子に注目し、その非対称分配がどのように不等分裂時に達成されるのかを詳細に観察することにした。そしてその非対称性を生み出す制御因子の同定を試み、その機能解析をすすめ、それぞれの娘細胞に異なる運命をもたらすいまだ未知の分配制御原理を発見することにもアプローチすることを目的とした。

またこの転写因子とは異なる手段により分配されるしくみが同一細胞内にも存在するらしい予備的結果を得ていたため、これらのタンパク質の細胞分裂時の分配の様子を定量的に検証できる生細胞イメージング観測系を開発し、定量解析する事も目的とし、植物の不等分裂幹細胞において、非対称に分配する方法にはどの程度多様性があり、後生動物との共通性が存在するのか、また存在するとすればどの程度なのか等を明らかにすることも目的とした。

さらに本研究過程を進める中で、乾燥やストレスホルモンのアブシジン酸が、上記の非対称分配を抑制するらしい事を見出したので、その過程を詳しく細胞レベルで観察するとともに、その分子機構の解明も目指した。そのためにまた非対称性分配を抑制する細胞壁タンパク質を同定し機能解析を進めた。

3. 研究の方法

主として分子生物学的手法、細胞生物学的手法、無菌植物培養技術を用い解析を進めた。

(1) 転写因子の非対称分配を定量的に検証できる培養系を確立しタイムラプスイメージングによる定量解析を行った。

(2) 対象となるタンパク質の機能解析をそれらタンパク質の過剰発現形質転換体や機能破壊形質転換体を作成することによりすすめた。

(3) 解析対象となるタンパク質の動態をライブで観察するため、蛍光タンパク質をノックインした組換え植物株を作成し、生細胞イメージング解析を行った。また得られた画像データの定量的な解析法を確立し、定量解析を行った。

4. 研究成果

ヒメツリガネゴケ原系体の各細胞は、通常培養下では、性質や大きさの異なる娘細胞を生じる非対称分裂をおこなう。この過程を研究する中で、乾燥ストレスやストレスホルモンのアブシジン酸が、非対称分裂を抑制し、その過程で我々が対象としている非対称分配されるべきタンパク質の非対称分配を抑制するらしい事を見出した。

この一方でストレスを除去すると、再び非対称分配ならびにその結果として、不等分裂が再開されることも見出した。そこでストレス応答に関わる例えばストレス情報伝達因子がどのように非対称分配しているかは不等分裂と等分裂の分裂様式の可逆的な変化を制御するかの分子機構の研究も進めた。

また、本来研究目的とした転写因子の非対称分配を定量的に検証できる生細胞イメージング培養系を改良し観察したところ、培養環境により予想以上に非対称性を確立できる時間帯が変動する事が明らかとなった。このことはこの細胞が非対称性を確立するのに柔軟なシステムをもっている事を示唆している。

またクロマチンリモデリング因子は、不等分裂を境に、幹細胞側でその核内の蓄積量が増加する事を見出した。この非対称性の確立は、上述の転写因子の非対称性が、おそらくは片側の娘細胞での分解により確立されていくこととは異なっているようである。また不等分裂の前後におけるこれらの非対称分配は、いずれもアブシジン酸により抑制される事を見出した。さらに逆遺伝学的手法により、アブシジン酸シグナル伝達因子群の内、ABI3がこの非対称性の抑制制御に関わっているらしい事が示唆された。

さらにストレスあるいはアブシジン酸に応答して非対称分配を抑制する候補因子を探索し、2種類のタンパク質を同定し、その

1次配列にもとづいた構造解析をおこなった。その結果、これらは細胞壁タンパク質および糖鎖修飾タンパク質をコードしていると予測できた。

次にこれらタンパク質の機能解析を過剰発現形質転換体や機能破壊形質転換体を作成することによりすすめた。その結果、確かにこれらのタンパク質が細胞極性を負に制御し、不等分裂を抑制するとともに、細胞運命を同じくする2つの娘細胞を生み出す等分裂に関わっている可能性を確認できた。

今後、これらの因子が非対称分配にどのように関わるのかの分子機構の解明を調べていくことにより、ストレスに応じて、不等分裂と等分裂という可逆的な分裂様式の変更の分子メカニズムの解明を目指すことが可能になった。

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2件)

① Kitagawa, M. and Fujita, T. (2013) Quantitative imaging of directional transport through plasmodesmata in moss protonemata via single-cell photoconversion of Dendra2, **Journal of Plant Research**, DOI 10.1007/s10265-013-0547-5 Published online: 05 February 2013. (査読有)

② 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., Gramzow, L., Gutensohn, M., Harholt, J., Hattori, M., Heyl, A., Hirai, T., Hiwatashi, Y., Ishikawa, M., Iwata, M., Karol, K.G., Koehler, B., Kolukisaoglu, U., Kubo, M., Kurata, T., Lalonde, S., Li, K., Li, Y., Litt, A., Lyons, W., Manning, G., Maruyama, T., Michael, T.P., Mikami, K., Miyazaki, S., Morinaga, S., Murata, T., Mueller-Roeber, B., Nelson, D.R., Obara, M., Oguri, Y., Olmstead, R.G., Onodera, N., Petersen, B.L., Pils, B., Prigge, M., Rensing, S.A., Riaño-Pachón, D.M., Roberts, A.W., Sato, Y., Scheller, H.V., Schulz, B., Schulz, C., Shakhov, E.V.,

Shibagaki, N., Shinohara, N., Shippen, D.E., Sørensen, I., Sotooka, R., Sugimoto, N., Sugita, M., Sumikawa, N., Tanurdzic, M., Theißen, G., Ulvskov, P., Wakazuki, S., Weng, J.-K., Willats, W.W.G.T., Wipf, D., Wolf, P.G., Yang, L., Zimmer, A.D., Zhu, Q., Mitros, T., Hellsten, U., Loqué, D., Otiillar, R., Salamov, A., Schmutz, J., Shapiro, H., Lindquist, E., Lucas, S., Rokhsar, D., Grigoriev, I.V. (2011) The Selaginella Genome Identifies Genetic Changes Associated with the Evolution of Vascular Plant. **Science**, 332, 960-963. (査読有)

[学会発表] (計10件)

① 日本植物生理学会 H25/3/21-23 (岡山大学) ヒメツリガネゴケにおける CDKA の機能解析

石橋充浩、巻口勇馬、野田なつみ、日渡祐二、石川雅樹、鈴木穰、菅野純夫、長谷部光泰、藤田知道

② 日本植物生理学会 H25/3/21-23 (岡山大学)

ヒメツリガネゴケ原糸体の発生過程における原形質連絡のサイズ排除限界の変化 Munenori Kitagawa, Makoto Terauchi, Tomoaki Nishiyama, Miharuru Ayabe, Taizo Motomura, Tomomichi Fujita

③ 日本植物学会第76会大会 H25/9/15-17 (兵庫県立大学)

ヒメツリガネゴケ原糸体における分子ふるい効果 綾部美晴, 北川宗典, 藤田知道

④ MOSS2012 国際会議 June 16-18, 2012, (The New York Botanical Garden, Bronx, NY, 米国)

Cell wall proteins regulates asymmetric and symmetric modes of cell division Yuya Tsuchiya, Kohei Nakamura, Hiroyuki Imai, Yoichi Sakata, Ralph Quatrano, Mitsuyasu Hasebe & Tomomichi Fujita

⑤ 日本植物生理学会 H25/3/16-18 (京都産業大) ヒメツリガネゴケ原糸体の発生過程における原形質連絡のサイズ排除限界の変化 Munenori Kitagawa, Makoto Terauchi, Tomoaki Nishiyama, Miharuru Ayabe, Taizo Motomura, Tomomichi Fujita

⑥ 日本植物生理学会 H25/3/16-18 (京都産業大) 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

土屋祐弥、今井裕之、中村康平、坂田洋一、Ralph Quatrano, 長谷部光泰、**藤田知道**

⑦日本植物生理学会 H25/3/16-18 (京都産業大) Recapitulation of parasitic nematode secretion activity in plant cells, 中野智陽、**藤田知道**、大崎満、後藤デレック

⑧第34回日本分子生物学会年 H24/12/13-16 (パシフィコ横浜) Plant extracellular matrix protein regulates asymmetric and symmetric modes of cell division 土屋祐弥, 中村康平, 今井裕之, 坂田洋一, Ralph Quatrano, 長谷部光泰, **藤田知道**

⑨MOSS2011 国際コケ植物会議 H24/9/11-14, (Leistungszentrum Herzogenhorn, Freiburg, Germany) The change of size exclusion limit of plasmodesmata in the filamentous tissue, protonemata of *Physcomitrella patens*, Munenori Kitagawa, Makoto Terauchi, Tomoaki Nishiyama, Taizo Motomura, **Tomomichi Fujita**

⑩第63回日本細胞生物学会大会 H24/6/27-29 (北海道大学)
Imaging analysis of intercellular communication of macromolecules through plasmodesmata in plants, Munenori Kitagawa, Tomoaki Nishiyama, **Tomomichi Fujita**

[その他]

ホームページにて成果の一部を公表している。

<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