

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370024

研究課題名(和文) 茎頂及び根端分裂組織の活性制御分子機構の相同性と相違点

研究課題名(英文) Similarities and differences of molecular mechanisms on the regulation of meristematic activity

研究代表者

澤 進一郎 (SAWA, Shinichiro)

熊本大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：00315748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、PUB4は、地下部ではRPK2と機能し、CLEシグナルを下流に伝えているが、地上部では、その受容体パートナーが異なることが明らかとなった。CLV1は地上部で機能するが地下部では機能しない。逆に、CLV1のホモログであるBAM1は、地下部で機能し、地上部ではCLV1程の機能はないと考えられる。

本研究により、地上部と地下部で、類似の因子を利用する場合と、それぞれ特徴的な因子を利用して幹細胞活性制御系が存在することが明らかとなったが、同じ因子を利用する場合でも、その作用機構については、地上部と地下部ではかなり、異なるということが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：BAM1 mainly function in root tissues, but clv1 does not. On the other hand, CLV1 functions but BAM1 has minor functions in the shoot apex. As for the RPK2, it functions with PUB4 in root tissues, but PUB4 has different functions in shoot tissues. CLEN3 functions only in root tissues functioning between BAM1 and MAPKKK.

In this analyses, we could find that there are similarities and differences on the molecular mechanisms regulating meristematic activities between shoot apical meristem and root apical meristem.

研究分野：plant molecular development

キーワード：CLE pepitde signaling

1. 研究開始当初の背景

植物は、器官を切除して培養することや、分化全能性をひきだすことが容易であることから、いかにも各器官、組織、細胞が自律分散的に生きているように見える。しかし、中枢神経系を持つ動物のような中央管理型の生命形態ではないにもかかわらず、各器官(細胞)の間では確実に情報のやりとりを行っていて、個体としての統一性を保っている。このように植物における形態形成機構の基本原理解明の上で、空間認識機構の解析は大きな命題となる。一方、植物の胚発生後の形態形成は、全て頂端分裂組織の活性に依存しており、その活性調節には三次元的な分裂組織空間内での細胞間コミュニケーションを介した空間認識が必要不可欠である。

茎頂分裂組織と根端分裂組織では、構造が全く異なり、根端分裂組織では細胞系譜が追えるのに対し、茎頂分裂組織でははっきりしない。しかし、そのような異なる構造をもつ分裂組織の空間認識と活性制御における分子機構が全く異なるわけではなく、共通の因子を利用していることも分かっている。なかでも、CLE ペプチドホルモンシグナルは、両分裂組織の空間認識に関与し、分裂組織のサイズを制御することで、分裂組織の活性を負に制御することが知られている。茎頂分裂組織では、その活性制御に関する分子機構の知見が少しずつ得られてきているが、根端分裂組織では、CLE シグナルの受容体は同定されているものの、リガンドとなる CLE 遺伝子も未だに同定されておらず、その全体像は全く分かっていない。

2. 研究の目的

植物は移動できないために、様々な環境変化などに応じて、適切な形態変化をしなければならず、分裂組織内だけでなく、様々な器官からも情報を得て、分裂組織の性質やサイズの変更に対応しなければならないと考えられる。さらに、器官分化のほぼ全てが胚発生段階で完了する動物と異なり、植物は分裂組織により、死ぬまで新しい器官を作り続ける。このことから、この分裂組織は植物の形態形成において根本を担う重要な組織であり、その性質やサイズは厳密に、また遺伝的に制御されなければならないと考えられる。それでは、どのようにして細胞間で情報のやりとりを行っているのだろうか。また、各細胞は、細胞自身の位置情報や、環境、発生プログラムをどのように認識して自分自身を分化させ"個

体"を形作っているのだろうか。

植物では、分裂組織を中心とした空間認識機構・細胞間情報伝達機構は高度に発達し、その結果、分裂組織のサイズが決定され、分裂組織全体の活性の恒常性が保たれていると考えられるが、現在、その分子基盤が整っているとは言い難い状況にある。

本研究では、**構造の全く異なる二つの頂端分裂組織である茎頂分裂組織及び根端分裂組織の活性制御機構において共通して機能する CLE シグナル伝達機構**を中心に深く解析することで、植物における**根端分裂組織と茎頂分裂組織の相同性、相違点についての知見を得る**ことを目的としている。

3. 研究の方法

様々な CLE ペプチドの投与や過剰発現実験が行われ、その結果、CLE の機能により根の分裂組織が縮小し、根の伸長阻害が起こることが多数の研究室から報告されている (kinoshita et al., 2007, PCP 等)。さらに、この根の伸長阻害という異常な表現型は、rpk2 突然変異と clv2 突然変異により抑圧されることから (Kinoshita et al., 2010 Development), CLE シグナル伝達系が根端分裂組織の活性制御を行う事も知られている。

我々は、これまでに多数の clv2 エンハンサー突然変異体を単離しており、それらは、clv2 に比べて、強いペプチド耐性を示し、根の伸長阻害が抑圧されることを明らかにしている。また、その抑圧突然変異体は 根端分裂組織でのみ表現型が昂進されるもの、根端、及び茎頂分裂組織の両方で表現型が昂進されるものの二つのグループに分類できることから、二種類の分裂組織の活性制御に関する分子機構において、相同性と相違性が存在することが示唆された。

本研究では、様々なペプチド耐性突然変異体の解析を中心に行うことで、根端分裂組織と茎頂分裂組織の活性制御における分子機構について、アプローチを行った。

4. 研究成果

本研究は、大きく 茎頂分裂組織と 根端分裂組織、両分裂組織の相同性と相違性の理解、の三つのテーマに関する解析に分けて考えることが出来る。

茎頂分裂組織における CLE シグナル伝達系の解析として PUB4 の分子機能解析を行った。その結果、PUB4 が幹細胞の分裂のタイミングの調節を行う事を明らかにした。また、AGB1 が PUB4 と共に機能することを明らかにした。

根端分裂組織の CLE シグナル伝達系の因子として、様々なペプチド耐性突然変異体の原因遺伝子の単離に成功した。また、多くについて、分子遺伝学的解析を行うことが出来た。BAM1 は、根で CLE の受容体として機能する事を明らかとした。また、CLEN3 はキナーゼをコードしており、BAM1 の下流で機能し、MAPKKK にシグナルを伝えることを明らかにした。CLEN3 は根で特異的に機能していると考えている。

両分裂組織の相同性と相違性に関して、茎頂と根端で、同一の因子でも異なる機能を持つことが明らかとなってきた。PUB4 は、地下部では RPK2 と機能し、CLE シグナルを下流に伝えているが、地上部では、その受容体パートナーが異なることが明らかとなった。CLV1 は地上部で機能するが地下部では機能しない。逆に、CLV1 のホモログである BAM1 は、地下部で機能し、地上部では CLV1 程の機能はないと考えられる。CLEN3 は、地下部で BAM1 の下流で機能するが、地上部では機能しないと考えている。

本研究により、地上部と地下部で、類似の因子を利用する場合と、それぞれ特徴的な因子を利用して幹細胞活性制御系が存在することが明らかとなったが、同じ因子を利用する場合でも、その作用機構については、地上部と地下部ではかなり、異なるということが明らかとなった。

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 28 件)

Hasegawa, J., Sakamoto, Y., Nakagami, S., Aida, M., Sawa, S., and Matsunaga, S. (2016) Three-dimensional Imaging of Plant Organs Using a Simple and Rapid Transparency Technique. *Plant Cell Physiol.* In Press. (査読有り)

Bowman, J., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M., Berger, F., Dolan, L., Haseloff, J., Ishizaki, K., Kyoizuka, J., Lin, S.S., Nagasaki, H., Nakagami, H., Nakajima, K., Nakamura, Y., Ohashi-Ito, K., Sawa, S., Shimamura, M., Solano, R., Tsukaya, H., Ueda, T., Watanabe, Y., Yamato, K.T., Zachgo, S., and Kohchi, T. (2016) The Naming of Names: Guidelines for Gene Nomenclature in *Marchantia* Plant cell Physiology. 57. 257-261. (査読有り)

Hida, H., Nishiyama, H., Sawa, S., Higashiyama, T., Arata, H. (2015) Chemotaxis assay of plant-parasitic nematodes on a gel-filled microchannel device. *Sensors and Actuators B* 221.1483-1491 (査読有り)

Shimizu, N., Ishida, T., Yamada, M., Shigenobu, S., Tabata, R., Kinoshita, A., Yamaguchi, K., Hasebe, M., Mitsumasu, K., and Sawa, S. (2015) BAM 1 and RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 constitute a signaling pathway and modulate CLE peptide triggered growth inhibition in *Arabidopsis* root. *New Phytologists* 208.1104-1113 (査読有り)

Motomitsu, A., Sawa, S., and Ishida, T. (2015) Plant peptide hormone signaling. *Essays in Biochem.* 58. 115-131 (査読有り)

Mitsumasu, K., Nishiyama, H., Nakagami, S., Kanemaru, Y. and Sawa, S. (2015) Molecular mechanisms of parasitism of plant-parasitic nematodes at apoplast. *Jap. J. Pesticide Sci.*, 40, 44-51 (査読有り)

Kinoshita, A., Seo, M., Kamiya, Y., and Sawa, S. (2015) Mystery in genetics: PUB4 gives a clue to the complex mechanism of CLV signaling pathway in the shoot apical meristem *Plant Signaling & Behavior*. 10:6, e1028707 (査読有り)

Nishiyama, H., Ngan, B. T., Nagakami, S., Ejima, C., Ishida, T., and Sawa, S. (2015) Protocol of root-knot nematode culture by hydroponic system and nematode inoculation to *Arabidopsis*. *Nematological research*, 45.45-50 (査読有り)

Kinoshita, A., Hove, C.A., Tabata, R., Yamada, M., Shimizu, N., Ishida, T., Yamaguchi K., Shigenobu, S., Takebayashi, Y., Iuchi, S., Kobayashi, M., Kurata, T., Wada, T., Seo, M., Hasebe, M., Bilou, I., Fukuda, H., Scheres, B., Heidstra, R., and Sawa, S. (2015) A plant U-box protein, PUB4, regulates asymmetric cell division and cell proliferation in the root meristem. *Development* 142., 444-453. (査読有り)

Ferjani, A. Hanai, K., Gunji, S., Maeda, S., Sawa, S., and Tsukaya, H. (2015) Balanced cell proliferation and expansion is essential for flowering stem growth control. *Plant Signaling & Behavior*. 10:3, e992755 (査読有り)

Maeda, S., Gunji, S., Hanai, K., Hirano, T., Kazama, Y., Ohbayashi, T., Abe, T., Sawa, S., Tsukaya, H., and Ferjani, A. (2014) The Conflict between Cell Proliferation and Expansion Primarily Affects Stem Organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 55. 1994-2007 (査読有り)

Ishida, T., Tabata, R., Yamada, M., Aida, M., Mitsumasu, K., Fujiwara, M., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Higuchi, M., Tsuji, H., Shimamoto, K., Hasebe, M., Fukuda, H., and Sawa, S. (2014) Heterotrimeric G proteins control stem cell proliferation through CLAVATA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO rep.* 15.1202-1209 (査読有り)

Nishiyama, H., Nakagami, S., Todaka, A., Arita, T., Ishida, T., and Sawa, S. (2014) Light-dependent green gall formation induced by *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 16. 889-893 (査読有り)

Tabata, R. and Sawa, S. Maturation processes and structures of secreted peptides in plants. (2014) *Frontiers in Plant Science* 04 July; doi: 10.3389/fpls.2014.00311. (査読有り)

Bidadi, H., Matsuoka, K., Sage-Ono, K., Fukushima, J., Pitaksaringkarn, W., Asahina, M., Yamaguchi, S., Sawa, S., Fukuda, H., Matsubayashi, Y., Ono, M., Satoh, S. (2014) CLE6 expression recovers gibberellin deficiency to promote shoot growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 78.241-252. (査読有り)

Araya, T., Miyamoto, M., Mibowo, J., Suzuki, A., Kojima, S., Tsuchiya, Y. N., Sawa, S., Fukuda, H., Wiren, N., Takahashi, H. (2014) CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111. 2029-2034 (査読有り)

Fukunaga, H., Sawa, Y., and Sawa, S. (2014) Identification of Japanese Lecanorchis (Orchidaceae) Species in Fruiting Stage *Int. J. Biol.* 6. No. 2. DOI: 10.5539/ijb.v6n2p1 (査読有り)

Tominaga-Wada, R., Nukumizu, Y., Wada, T., Sawa, S., and Tetsumura, T. (2013) CLAVATA3-like genes are differentially expressed in grape vine (*Vitis vinifera*)

tissues. *Journal of Plant Physiology.* 170,1379-1383. (査読有り)

Miyawaki, K., Tabata, R., and Sawa, S. (2013) Evolutionarily conserved CLE peptide signaling in plant development, symbiosis, and parasitism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16.598- 606. (査読有り)

Tamaki, T., Betsuyaku, S., Hamasaki, R., Fujiwara, M., Fukao, Y., Fukuda, H., and Sawa, S. (2013) CLE19 peptide activity is regulated by SUPPRESSOR OF LLP1 1-mediated C-terminal processing in endosomes in *Arabidopsis*. *Plant J.* 6. 970-981 (査読有り)

⑲Jewaria, P. K., Hara, T., Tanaka, H., Kondo, T., Betsuyaku, S., Sawa, S., Sakagami, Y., Aimoto S. and Kakimoto, T. (2013) Differential Effects of Peptides Stomagen, EPF1, and EPF2 on Activation of the MAP Kinase MPK6 and the SPCH Protein Level. *Plant Cell Physiol.* 54, 1253-1262 (査読有り)

⑳Tabata, R., Kamiya, T., Shigenobu S., Yamaguchi K., Yamada, M., Hasebe, M., Fujiwara, T., and Sawa, S. (2013) Identification of an EMS-induced causal mutation in a gene required for boron-mediated root development by low-coverage genome re-sequencing in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior.* 8. e22534 (査読有り)

㉑Replogle, A., Wang, J., Paolillo, V., Smeda, J., Kinoshita, A., Durbak, A., Tax, F., Wang, X., Sawa, S., and Mitchum, M. G. (2013) Synergistic Interaction of CLAVATA1, CLAVATA2, and RECEPTOR-1 LIKE PROTEIN2 KINASE 2 in Cyst Nematode Parasitism of *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 26. 87-96 (査読有り)

㉒Yamada, M., and Sawa, S. (2013) The function of CLE and other plant peptide hormones in root development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16. 1-6. (査読有り)

㉓Kiyohara, S., and Sawa, S. (2012) The role of CLE peptides in *Arabidopsis* development and nematode parasitism. *Plant Cell Physiol.* 53. 1989-1999 (査読有り)

㉔Kiyohara, S., Fukunaga, H., and Sawa, S. Characteristics of the falling speed of Japanese orchid seeds. (2012) *International J. Biol.* 4. 10-12 (査読有り)

⑲ Shimizu, N., Sawa, Y., and Sawa, S. Adaptation and evolution of seed shape on bleeding area in Japanese orchids. (2012) International J. Biol. 4. 47-53 (査読有り)

⑳ Ejima, C, Uwatoko, T, Ngan, B. T., Honda, H., Shimizu, N., Kiyohara, S., Hamasaki, R., and Sawa, S. (2012) SNPs of CLAVATA receptors in tomato, in a context of rootknot nematode infection. Nematological Research. 2. 35-40 (査読有り)

〔学会発表〕(計 10件)

1. 澤進一郎, 日本植物学会、細胞外インテリジェント空間における細胞間・生体間情報伝達機構の解析 シンポジウム「植物の細胞外インテリジェントシステム」という新しい概念, 姫路, 2012年9月15日

2. S. Sawa, International Marchantia Workshop, Aso, CLE gene function in Marchantia, Aso, 2012年12月18日

3. S. Sawa, NIBB-MPIPZ-TLL Symposium, Analysis of CLE peptide function in meristem maintenance and nematode infection steps in Arabidopsis, Okazaki, 2012年11月19日

4. S. Sawa, 21st Conference of the International Plant Growth Substances Association, Carboxypeptidase in CLE peptide maturation step, and CLE signaling molecules in Arabidopsis, The Shanghai International Conference Center, 2013年6月18日

5. S. Sawa, International Cell Wall Integrity Symposium, Participation of the cell wall interface in intercellular signaling in plants, KKR Kamakura, 2013年10月31日

6. 澤進一郎, 日本農薬学会, 植物感染性線虫の感染分子機構の解析, 京都大学, 2014年3月15日

7. S. Sawa, Cambridge University seminar, Molecular dissection of CLE signaling pathway in Arabidopsis, Cambridge University, 2015年03月02日

8. S. Sawa, 日本発生生物学会, Comprehensive genetic analysis of CLV3 downstream pathway in Arabidopsis, WINC AICHI, 2014年5月27日

9. Sawa, S., Nakagami, H. Nishiyama, Y. Kanemaru, A. Motomitsu, Front Lines of Plant Cell Wall Research, 東大寺総合文化センター 2015年03月20日

10. S. Sawa, 日本植物生理学会, Analysis of Arabidopsis attractant of plant parasitic nematode, M. incognita, 岩手大学, 2016年3月18日

9.

〔図書〕(計 9件)

重信秀治, 澤進一郎, 栗原志, 持田恵一, 上原(山口)由紀子, 高木宏樹, 阿部陽, 寺内良平, 関原明, 高橋聡史 (2015) 植物ゲノム解析、次世代シーケンサー活用術、化学同人(査読なし)

光増可奈子, 西山英孝, 中上知, 金丸由実, 澤進一郎 (2015) 細胞外空間(細胞壁)に注目した植物寄生性線虫の感染分子機構、日本農薬学会誌 (査読なし)

Sawa, S. (2015) Analysis of attractant of plant parasitic nematode. Soy Protein Research (査読なし)

Sawa, S. (2013) Analysis of Molecular Mechanisms of Plant Parasitic Nematode Infection Steps. Soy Protein Research. 16. 39-42 (査読なし)

澤進一郎 (2013) ペプチドホルモンによる植物幹細胞活性制御と線虫感染 Pure Science 8. pp6 (査読なし)

澤進一郎・本田紘章・田畑亮 2012. MpCLE1 遺伝子の機能解析. BSJ Review 3: 129-133. (査読なし)

江島千佳 澤進一郎 (2013) 植物への線虫の感染の仕組み 植物生理学会みんなのひろば

(<http://www.jspp.org/17hiroba/kaisetsu/ejima.html>) (査読なし)

澤進一郎ら共訳 Biology (2013) (Starr, BROOKS/COLE)(東京化学同人)(査読有り)

Sawa, S. (2012) **Basic analysis on the defense for nematode infection in Plant.** Soy Protein Research. 15. 21-25. (査読なし)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

澤進一郎 (SAWA SHINICHIRO)
熊本大学・自然科学研究部・教授
研究者番号：00315748

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：