

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770049

研究課題名(和文) 茎頂と根端の両メリステム形成を制御する新規因子の解析

研究課題名(英文) Studies on new factors involved in shoot and root apical meristem formation

研究代表者

寿崎 拓哉 (Suzaki, Takuya)

基礎生物学研究所・共生システム研究部門・助教

研究者番号：40575825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物の正常な形態形成は茎頂と根端に存在するメリステムに依存している。本課題は、茎頂と根端の両メリステムの維持制御に関わる新規遺伝子の解析を通して、各メリステムの維持機構やその共通性について新たな知見を得ることを目的とする。

ミヤコグサを用いて、茎頂と根端の両メリステムの維持が破綻した突然変異体を3系統単離し、メリステムに着目した表現型解析と原因遺伝子の特定を行った。変異箇所を特定した遺伝子はいずれもメリステムの制御において関与がこれまで示されていないものであった。今後は詳細な機能解析を進めることにより、茎頂・根端メリステムの維持機構の詳細や共通性の理解が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Postembryonic plant development ultimately depends on the activity of shoot and root apical meristem, which are respectively located at the tip of shoot and root. The molecular mechanisms of individual meristems formation have been intensively studied in Arabidopsis, however, it remains elusive with respect to the conserved regulatory mechanism of both meristems. In this study, we isolated 3 novel *Lotus japonicus* mutants that are defective in maintenance of both types of meristems. To gain the new insights into the respective and common mechanisms in the regulation of the meristems, we performed the phenotypic analyses of the mutants and tried to identify the responsible genes. Positional cloning together with genome resequencing approach identified the responsible genes. Future functional analyses will contribute further to our understanding of the detailed regulatory mechanisms of each meristems and their commonality.

研究分野：植物発生遺伝学

キーワード：茎頂分裂組織 根端分裂組織

1. 研究開始当初の背景

高等植物の地上部の形態形成は、茎頂と根端にそれぞれ存在する頂端メリステムに依存している。頂端メリステムにおいて、細胞の未分化状態の維持と側生器官へと分化する細胞供給のバランスが保たれることにより、植物の適切な形づくりが成立する。

これまでの主としてシロイヌナズナを用いた研究により、それぞれのメリステム形成の分子機構が盛んに研究されてきた。その結果、茎頂メリステムでは、CLV-WUS フィードバック制御系を基本にしたメリステムの維持制御モデルが提唱されている()。また、イネにおいても、CLV シグナル伝達系を介した茎頂メリステムの負の制御系が保存されていることが明らかにされており、その一方でイネに独自の機構も存在していることが示されてきた()。根端メリステムにおいては、シロイヌナズナを用いて植物ホルモンのオーキシンの関与が深く研究されており、また根端メリステムのアイデンティティ決定に必要な転写因子が特定されている()。さらに、WUS と類似したホメオドメインタンパクである WOX5 が根端の幹細胞維持に関与することが示されている()。WOX5 の機能特定により、茎頂と根端のメリステム制御の共通性も示唆され始めているが、詳細な機構は明らかとなっていない。

我々は、植物種間のメリステム制御の保存性と多様性という観点から、他の植物のメリステム維持機構に関心をもった。そこで、これまでマメ科のモデル植物の1つであるミヤコグサを用いて、EMS 突然変異体を用いた大規模なスクリーニングを行ってきた。その結果、メリステム形成に異常を示すミヤコグサの突然変異体を3ライン単離することに成功した。この3ラインは類似した表現型を示し *loss of apical meristems activities (lam)* 変異体と名付けた。*lam* 変異体は、茎頂と根端の両方のメリステム活性が発生早期に停

止する特徴的な表現型を示す。茎頂と根端の両方のメリステムの維持が異常となる突然変異体の報告例は少ないが、代表的なものとして、シロイヌナズナの *fasciata* 変異体 (*fas1*, *fas2*) が知られている。*fas1* 変異体では茎頂メリステムのサイズが増大し花茎の帯化が起こる()。一方、*lam* 変異体では茎頂メリステムのサイズが減少し、茎頂メリステムの活性が早期に停止にする。このことから、*lam* 変異の影響は *fas* 変異とは逆の方向性をもつといえる。突然変異体の数が充実し、研究の進んでいるシロイヌナズナやイネにおいても、*lam* 変異体と類似した表現型を示す変異体は報告されていない。

ミヤコグサは植物と根粒菌の共生機構の研究のモデル植物として知られているが、ミヤコグサを含むマメ科植物ではメリステム制御の遺伝学的な解析はこれまでほとんど行われていない。また、*CLV1* や *CLV3* の同祖遺伝子が茎頂メリステム制御ではなく、根粒の数の制御において重要な働きを担うことが示されており()、マメ科のメリステムの制御機構の研究は高等植物のメリステム制御の多様性という観点からも興味深いものになると思われた。

2. 研究の目的

ミヤコグサを用いて、茎頂と根端メリステム形成の遺伝的制御機構を明らかにすることを目的とする。さらに、ミヤコグサの研究により、得られた知見をシロイヌナズナなどの他の植物へと還元し、メリステム形成のより深い理解を得ることを目指す。

3. 研究の方法

lam 変異体の茎頂メリステムの形成パターンとサイズ、葉原基の分化パターンを明らかにするために、走査型電子顕微鏡を用いた茎頂の観察を行う。また、組織切片や透明化法を用いて茎頂メリステムのサイズを測定し野

生型と比較する。根端メリステムに関しては、組織切片を用いて細胞構造を調べ、根毛の分化領域を指標にサイズを測定する。また、PI (Propidium Iodide) により根端の死細胞を染色することにより、根端メリステムの活性を調べる。

シロイヌナズナのメリステム形成に関わる遺伝子のミヤコグサのオルソログを収集し、*in situ* hybridization により、*lam* 変異体における各マーカー遺伝子の発現パターンを調べる。茎頂メリステムに関しては、*STM*、*WUS*、*CLV3*、根端メリステムに関しては *WOX5*、*SCR* の発現パターンを解析する。また、*HISTON H4* と *CyclinB1:1* の発現パターンを解析することにより、*lam* 変異体におけるメリステム維持の異常と細胞周期の進行の関係を調べる。

Miyakojima MG-20 系統である *lam* 変異体と Gifu B-129 系統との交配集団を用いたポジショナルクローニングを行い、*lam* 変異体の原因遺伝子を特定する。原因遺伝子の特定後は、個々の遺伝子の機能解析を進め、さらにシロイヌナズナの *LAM* 遺伝子の同祖遺伝子の機能解析を進める。

4. 研究成果

形態観察および分子マーカーの発現パターン解析を中心とした表現型解析により、*lam* 変異の影響を理解した。また、*lam* 変異体ではメリステム活性の早期停止に加えて、葉原基の分化パターンが異常となることがわかった。さらに、野生型では播種後1ヶ月程度で花成が起こるのに対し、*lam* 変異体では6ヶ月を過ぎても花成が起こらないことがわかった。このことから、*lam* 変異は栄養生長から生殖生長への相転換にも影響を与えることが示唆された。さらに、*lam* 変異体の根は、根端メリステム活性の早期活性停止により長さが短くなるのに加えて、太くなることがわかった。このことから、*lam* 変異が根

の放射方向のパターニングに影響を与えることが示唆された。

ポジショナルクローニングによる *lam* 変異体の原因遺伝子の特定を進めたところ、おおまかな座乗位置を決定できたが、組換え抑制が起こる領域であったため、ポジショナルクローニングのみで、原因遺伝子を特定していくことは困難となった。そこで、次世代シーケンサーを用いたゲノムリシーケンスを並行して進めた結果、ポジショナルクローニングで絞り込んだ領域内において、*lam* 変異体特異的な一塩基多型を同定することに成功した。一般的に、次世代シーケンサーを用いたゲノムリシーケンスでは、対象生物のゲノムサイズの×20~30のカバー率でシーケンスする必要があると考えられている。本研究では×3程度のカバー率であったが、ポジショナルクローニングと組み合わせることにより、原因遺伝子を特定することに成功し、シーケンスにかかるコストを抑えることができた。本研究で確立した方法論は、今後他の変異体の原因遺伝子を特定していく際にも効力を発揮すると考えられる。

特定した3つの *LAM* 遺伝子は、いずれも他の植物では頂端メリステム形成との関与が示唆されていないものばかりである。したがって、今後これらの *LAM* 遺伝子の機能解析の研究を進めることにより、茎頂・根端メリステム制御の分子機構の新知見がもたらされる可能性が期待される。さらに、茎頂・根端メリステムの遺伝的制御の共通基盤の理解が進むことが期待される。

< 引用文献 >

Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., Simon, R. (2000) Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science* 289: 617-619.

Pautler, M., Tanaka, W., Hirano, H.-Y., Jackson, D. (2013) Grass meristems I: shoot apical meristem maintenance, axillary meristem determinacy and the floral transition. *Plant Cell Physiol* 54: 302-312.

Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y.-S., Amasino, R., Scheres, B. (2004) The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119: 109-120.

Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., Laux, T. (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446: 811-814.

Kaya, H., Shibahara, K.I., Taoka, K.I., Iwabuchi, M., Stillman, B., Araki, T. (2001) *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* 104: 131-142.

Suzaki, T., Yoro, E., Kawaguchi, M. (2015). Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int Rev Cell Mol Biol* 316: 111-158.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Takuya Suzaki, Emiko Yoro and Masayoshi Kawaguchi (2015) Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int Rev Cell Mol Biol* 316: 111-158、査読有
doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.01.004

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/miyakohp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寿崎 拓哉 (Suzaki, Takuya)

基礎生物学研究所・共生システム研究部門・助教

研究者番号：40575825