

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291060

研究課題名(和文) ストレス適応としての積極的成長抑制の分子機構

研究課題名(英文) Active growth repression of plants under environmental stresses

研究代表者

柿本 辰男 (Kakimoto, Tatsuo)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70214260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物はbioticあるいはabioticなストレスに直面すると成長が抑制される。高浸透圧などによる環境水ポテンシャルの低下は、特にシュートの成長を強く抑制する。少なくともその一部は、積極的に成長を抑制することが将来にわたる環境適応の一部であると考えられる。私は、ストレスに応答した積極的成長抑制機構を、葉の表皮細胞の増殖に焦点をあてて研究した。私達は、浸透圧ストレスが、MAP kinaseカスケードを介して葉表皮の幹細胞維持に必須な転写因子であるSPCHの量を減少させ、葉表皮幹細胞を消失させる事、また、この現象が、ストレス応答としての細胞増殖の抑制の原因となっている事を示した。

研究成果の概要(英文)：Plant growth is retarded under biotic or abiotic stresses. Low environmental water potential generally represses plant growth, especially the growth of shoots. The growth reduction is in part simply because plants cannot grow well, but also in part considered to be an active adaptive response of plants. We focused on stress responses of growth of leaf epidermal cells, and uncovered the molecular mechanisms of growth repression under high osmolarity. The leaf epidermal stem cells (MMCs) is maintained by the transcription factor SPEECHLESS (SPCH). Here we found that osmotic stress activates the MAPK cascade, which in turn phosphorylates SPCH and leads to decrease in SPCH protein level. Blocking the MAPK activity inhibited the decrease in MMC number and the growth reduction caused by osmotic stress. These results highlighted the integration of stress-induced signaling and internal developmental signaling.

研究分野：植物成長生理学

キーワード：植物 成長 環境 ストレス

1. 研究開始当初の背景

植物は悪い環境にさらされた時、自ら成長を抑制する仕組みを持っている。これは、成長にエネルギーを割くよりも悪環境に対応することにエネルギーを費やすためという側面がある。さらに、水やイオンなどの欠乏時には、シュートの成長を抑制してこれらのデマンドを下げる一方、根からの吸収を維持すると考えることができる。ストレスにさらされた時、環境が悪いために十分に成長できないという側面以外に、植物自らが積極的に成長を抑制している側面があると考えている。葉の表皮の細胞系譜は、原表皮細胞からペーパーメント細胞に分化する系譜と、幹細胞性細胞である MMC に始まる気孔系譜からなる。気孔系譜は、気孔孔辺細胞だけでなく、多くのペーパーメント細胞も作り出す。気孔系譜の細胞増殖は、植物が持つフィードバック制御で制御されるだけでなく、環境に応答するようである。植物が持つ内在のフィードバック制御の分子機構はよく知られていたものの、この、悪環境に応答した積極的成長抑制の分子機構は理解されていなかった。

2. 研究の目的

植物が、biotic あるいは abiotic なストレスにさらされた時に積極的に成長を抑制する分子機構を解明することが目的である。特に、シュートの成長に大きな寄与をしている葉の表皮での分子機構を解明する。より具体的には、表皮細胞の細胞系譜のどの段階が環境ストレスに応答するのか、また、気孔系譜調節系の情報伝達系との関係はどうなっているのか明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

研究対象の植物は、シロイヌナズナである。MMC のマーカーとして EPF2p-GFP と SPCHp-SPCH-GFP を用いた。また、気孔系譜制御系の様々な遺伝子の突然変異体、MAP キナーゼによりリン酸化されない SPCH バリエーションである SPCH(S1-4)などを用いた。播種後 4.5 日のシロイヌナズナを用い、高浸透圧ストレスとしては、0.2M マンニトールで 24 時間処理を行い、第一、第二本葉の abaxial 側の全細胞数を数えた。

4. 研究成果

1) 浸透圧ストレスを感知すると、シロイヌナズナは MMC の数を減少させることにより、葉の成長を抑制する。高浸透圧が最初に影響を及ぼす表皮発生過程を知る為、GFP マーカー系統を用いた。MMC のマーカーである EPF2p-GFP 陽性細胞数は、高浸透圧処理で速やかに減少した。MMC の減少が細胞数減少の唯一の原因であるのかどうかを知る為に、MMC を欠損する変異体である *spch* を用いた実験を行った。*spch* では気孔系譜がないために表皮細胞数はもともと少ないが、高浸透圧処理でさらなる細胞数の減少は

全く起きなかったことから、MMC の減少が細胞数減少の唯一の原因であることが明らかとなった。

2) 浸透圧ストレスは、MAP キナーゼを活性化し、SPCH をリン酸化することにより分解に導き、MMC 数を減少させる。

内在の発生制御系においては、MMC で分泌されるペプチド性シグナル分子 EPF2 が ER ファミリー受容体キナーゼにより認識され、MAP キナーゼを活性化する。MAP キナーゼは SPCH をリン酸化し、これを不安定化する。SPCH は MMC 決定因子であるので、この制御系は安定した数の MMC を作るためのフィードバックループとなっている。浸透圧ストレスシグナルがこの ER-MAPK-SPCH 制御系に流れ込んでいるのかどうかを調べた。その結果、高浸透圧による MMC 抑制には ER 受容体キナーゼは必要ないが、MAPK が必要であること、また、SPCH タンパク質に存在する MAPK ターゲット配列が必要であることがわかった。

3) 高浸透圧ストレスによる MMC 減少に、アブシジン酸は部分的に関与している。

一般に、アブシジン酸はストレス応答において重要な役割を果たしている。そこで、アブシジン酸耐性変異体である *abi1*, *snrk2.2/3/6*、アブシジン酸合成系変異体などを用いた実験を行い、アブシジン酸の関与は部分的であることがわかった。

4) アブシジン酸による MMC 数の減少には DELLA タンパク質が必要である。

DELLA タンパク質はジベレリンの情報伝達の抑制因子として良く知られている。*della5* 重変異体では、アブシジン酸処理による MMC 減少がかなり抑制されていた。

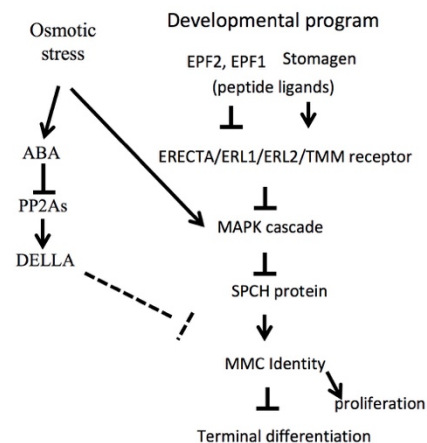


図 1. 高浸透圧に応答した成長抑制の分子機構

5) 高浸透圧に応答した成長抑制機構が異常となった突然変異体の単離

高浸透圧に応答した成長抑制に関して未知の機構を知る為に、高浸透圧でも MMC マーカー

陽性細胞が減少しにくい突然変異体を複数分離し、マッピングとシーケンスにより原因遺伝子を見出した。

#### 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 10 件)

- 1) Jewaria PK, Hara T, Tanaka H, Kondo T, Betsuyaku S, Sawa S, Sakagami Y, Aimoto S, Kakimoto T. 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, doi: 10.1093/pcp/pct076 (2013)
- 2) Tanaka H, Kitakura S, Rakusová H, Uemura T, Feraru MI, De Rycke R, Robert S, Kakimoto T, Friml J. Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis thaliana*. doi: 10.1371/journal.pgen.1003540 (2013)
- 3) Tanaka H, Nodzyński T, Kitakura S, Feraru MI, Sasabe M, Ishikawa T, Kleine-Vehn J, Kakimoto T, Friml J. (2014) BEX1/ARF1A1C is Required for BFA-Sensitive Recycling of PIN Auxin Transporters and Auxin-Mediated Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 55, 737-749. doi: 10.1093/pcp/pct196.
- 4) Shimizu-Mitao Y, Kakimoto T. (2014) Auxin Sensitivities of All *Arabidopsis* Aux/IAAs for Degradation in the Presence of Every TIR1/AFB. *Plant Cell Physiol.* 55, 1450-1459.
- 5) Kumari A, Jewaria PK, Bergmann DC, Kakimoto T. (2014) *Arabidopsis* Reduces Growth Under Osmotic Stress by Decreasing SPEECHLESS Protein. *Plant Cell Physiol.* 55, 2037-2046.
- 6) Lin CY, Huang LY, Chi WC, Huang TL, Kakimoto T, Tsai CR, Huang HJ. (2014) Pathways involved in vanadate-induced root hair formation in *Arabidopsis*. *Physiol Plant.* 153, 137-148.
- 7) Müller D, Waldie T, Miyawaki K, To JP, Melnyk CW, Kieber JJ, Kakimoto T, Leyser O. (2015) Cytokinin is required for escape but not release from auxin mediated apical dominance. *Plant J.* 82, 874-886. doi: 10.1111/tpj.12862
- 8) Sugawara S, Mashiguchi K, Tanaka K, Hishiyama S, Sakai T, Hanada K, Kinoshita-Tsujimura K, Yu H, Dai X, Takebayashi Y, Takeda-Kamiya N, Kakimoto T, Kawaide H, Natsume M, Estelle M, Zhao Y, Hayashi K, Kamiya Y, Kasahara H. (2015)

Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants. *Plant Cell Physiol.* 56, 1641-1654. doi: 10.1093/pcp/pcv088

- 9) Randall RS, Miyashima S, Blomster T, Zhang J, Elo A, Karlberg A, Immanen J, Nieminen K, Lee JY, Kakimoto T, Blajevska K, Melnyk CW, Alcasabas A, Forzani C, Matsumoto-Kitano M, Mähönen AP, Bhalerao R, Dewitte W, Helariutta Y, Murray JA. (2015) AINTEGUMENTA and the D-type cyclin CYCD3;1 regulate root secondary growth and respond to cytokinins. *Biol Popen.* doi: 10.1242/bio.013128.
- 10) Siddique S, Radakovic ZS, De La Torre CM, Chronis D, Novák O, Ramireddy E, Holbein J, Matera C, Hutten M, Gutbrod P, Anjam MS, Rozanska E, Habash S, Elashry A, Sobczak M, Kakimoto T, Strnad M, Schmülling T, Mitchum MG, Grudler FM. (2015) A parasitic nematode releases cytokinin that controls cell division and orchestrates feeding site formation in host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112, 12669-12674 doi: 10.1073/pnas.1503657112

[学会発表] (計 件)

- 1) Ye Zhang, Mitsuda Nobutaka, Takeshi Yoshizumi, Yoichi Kondo, Masaru Takagi, Minami Matsui, Tatsuo Kakimoto. Molecular Mechanisms that Determine Pericycle Cell Identity. 日本植物学会第 77 回大会, 2013 年 9 月 14 日, 北海道大学
- 2) Shimizu-Mitao Y and Kakimoto T, Comprehensive degradation analyses of AUX/IAAs in combination with several auxins and all TIR1/AFBs., 24th ICAR, 2013 年 6 月 13 日, シドニー (オーストラリア)
- 3) 志水 (三田尾) 悌, 柿本辰男. オーキシシンシグナル伝達因子の多様なオーキシシン感受性, 日本植物学会第 77 回大会, 2013 年 9 月 3 日
- 4) 志水 (三田尾) 悌, 柿本辰男, オーキシシン応答の多様性とオーキシシン濃度依存性, 第 55 回 日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 19 日, 富山大学
- 5) 柿本辰男, Kumari Archana, Bergmann Dominique, Jewaria Pawan, 環境に応答した発生プログラム調節, 第 55 回 日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 19 日, 富山大学
- 6) Ye Zhang, Nobutaka Mitsuda, Takeshi Yoshizumi, Yoichi Kondo, Masaru Takagi, Minami Matsui, Tatsuo Kakimoto, Molecular Mechanisms that Determine Pericycle Cell Identity, 第 55 回 日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 19 日, 富山大学
- 6) Zhang Y, Mitsuda N, Yoshimizu T., Kono

Y., Takagi M., Matsui M., Kakimoto T., Molecular mechanisms that determine pericycle identity. International Symposium on Auxin and Cytokinin in Plant Development. 2014.07.01, Prague, Czech Republic.

7) Shimizu Y., Kakimoto T., Auxin sensitivities and functions of Aux/IAAs. International Symposium on Auxin and Cytokinin in Plant Development. 2014.07.01, Prague, Czech Republic.

8) Kumari A., Pawan J., Bergmann D., Kakimoto T., Active growth repression of leaves under osmotic stress is executed by decreasing the SPEECHLESS protein in Arabidopsis. 25<sup>th</sup> International Conference on Arabidopsis Research. 2014.07.30, Vancouver, Canada.

9) Zhang Y., Mitsuda N., Yeh C-M., Yoshizumi T., Kondo Y., Takagi M., Kakimoto T. Molecular mechanisms that determine pericycle cell identity. 日本植物学会第79回大会. 2015.09.06. 新潟

10) Qian P., Kumari. A., Kakimoto T., Regulation of plant epidermal development in response to biotic and abiotic stresses. 日本植物学会第79回大会 2015.09.07 新潟

11) Zaizen M., Kume S., Zhang Y., Mitsuda N., Yoshizumi T., Kondo Y., Takagi M., Matsui M., Kakimoto T. 篩部形成に關与する転写因子の解析. 第57回植物生理学会年会 2016.03.18 岩手大学、盛岡、岩手

12) ハスチムグ、柿本辰男. 初期器官発生における低分子量Gタンパク質の機能解析. 第57回植物生理学会年会 2016年03月18日. 岩手大学、盛岡、岩手

13) Qian P., Minobe A., Ishida T., Sawa S, Kakimoto T. CLE(CLAVATA/ESR-LIKE)9 controls cell proliferation in stomatal lineage. 第57回植物生理学会年会 2016年3月18日 岩手大学

14) Sugawara S., Mashiguchi K., Tanaka K., Hishiyama S., Sakai T., Hanada K., Kinoshita-Tsujimura K., Yu H., Dai X., Takebayashi Y., Takeda-Kamiya N., Kakimoto T., Kawaide H., Natsume M., Estelle M, Zhao Y, 他3名. Distinct characteristics of Indole-3-acetic acid and phenylacetic acid, two common auxins in plants. 第58回日本植物生理学会年会 2017.03.17 鹿児島大学

15) 財前美希、久米佐和、Ye Zhang, 光田展隆、吉積毅、近藤陽一、高木優、松井南、柿本辰男. 篩部特異的な転写因子が維管束パターンを制御するしくみ. 第58回日本植物生理学会年会. 2017.03.17. 鹿児島大学

16) Sagawa S.,

〔図書〕(計3件)

1) 町田泰則、柿本辰男、他、高校生物解説書授業でそのまま使える PowerPoint 付き! 植物編 (KS 生命科学専門書), 講談社 (2014)

2) 柿本辰男, 生物の科学 遺伝 2016年09月 植物ホルモンの研究の発展 pp. 348-349 ISBN978-4-86043-442-7

3) 柿本辰男、他、新しい植物ホルモンの科学 第3版、ISBN978-4-06-153452-0

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿本辰男 (KAKIMOTO, Tatsuo)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 70214260