

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440136

研究課題名(和文) 脂質による細胞増殖調節を介した植物の器官成長の制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of organ growth by synthesis of very-long-chain fatty acids in Arabidopsis

研究代表者

奥島 葉子 (Okushima, Yoko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：00432592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物の器官成長を制御する過程では、表皮で合成された超長鎖脂肪酸が維管束におけるサイトカイニンの生合成を抑えることで地上部の細胞増殖を調節する機構が存在すると考えられるが、このシグナル伝達経路の分子機構は不明である。本研究では、表皮におけるブラシノステロイドの受容が超長鎖脂肪酸による器官成長の制御に必要であることを示唆する結果を得た。さらに、表皮の超長鎖脂肪酸が内部組織の細胞増殖の制御を行う過程で働く因子に異常を持つと考えられるシロイヌナズナ変異体を5系統単離し、そのうち2系統について責任遺伝子の候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：In plants, very-long-chain fatty acids (VLCFAs) are used for the synthesis of triacylglycerols, cuticular waxes and sphingolipids. Recently we have revealed that VLCFA synthesis in the shoot epidermis suppresses cell proliferation in internal tissues by down-regulating cytokinin biosynthesis in the vasculature, thereby restricting aerial organ growth. However, the mechanism how VLCFA synthesis controls cytokinin biosynthesis in a non-autonomous manner remains largely elusive. In this study, we found that brassinosteroid signals are involved in VLCFA-mediated plant growth regulation. In addition, by the genetic screening of factors working in VLCFA-mediated growth regulation, we identified 5 lines of defective in cafenstrole response (dcr) mutants. Candidates of the responsible genes for two dcr mutants have been identified by the whole genome sequencing.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：器官成長 シロイヌナズナ 脂質 植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

植物は固着生活を送るため、環境の変化に応じて成長速度や器官サイズ等を最適化する機構を備えている。しかし、植物が環境の変化を受容し、そのシグナルを最終的に細胞増殖の調節因子の制御にまで伝える経路についてはほとんど明らかになっていない。

植物個体および各器官の最外層に存在する表皮細胞層は、外界との境界として物理的、化学的、生物的ストレスを直接受容する重要な組織である。実際に、表皮細胞層への病原菌の感染が植物体全体の成長抑制を引き起こすこと等が知られており、表皮で受容したシグナルが何らかの細胞間コミュニケーションを介して内部の細胞層に伝えられ、組織内部の細胞分裂を調節することにより植物全体の成長を制御する仕組みがあると考えられるが、その分子機構は全く不明である。

興味深いことに、細胞伸長や分裂、器官成長の制御を行う植物ホルモンであるブラシノステロイドは地上部においては主に表皮で合成・受容され、そこから植物全体の成長を促進するシグナルが発せられていることがシロイヌナズナにおいて報告されている (Savaldi-Goldstein, *et al.* 2007)。しかし、この経路において表皮における BR の合成あるいはシグナルを制御する機構、表皮より発する成長促進シグナルが内部細胞層に伝えられる機構、およびシグナル分子の実体のいずれも不明のままである。

その一方で申請者らは、脂肪酸の一種である超長鎖脂肪酸 (炭素数 20 以上の脂肪酸) が植物の成長制御や器官形成に重要な役割を持つことを独自に見出した。表皮細胞層で特異的に合成される超長鎖脂肪酸は、組織内部におけるサイトカイニン合成を細胞非自立的に抑制することで、過剰な細胞増殖を抑えたと考えられるが、その分子機構はやはり不明である。

2. 研究の目的

表皮細胞層が、内部細胞層の細胞増殖制御を介して植物全体の成長を調節する分子機構の解明を目指す。特にこの機構において表皮からのシグナル発信に密接に関与すると考えられる超長鎖脂肪酸およびブラシノステロイドの役割に注目し、細胞増殖の制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

ブラシノステロイドのシグナル伝達経路における超長鎖脂肪酸の作用点を見出すため、ブラシノステロイド応答性遺伝子の発現制御や、ブラシノステロイド情報伝達において中心的な役割を持つ因子の細胞内局在や活性化制御に超長鎖脂肪酸が果たす役割を解析する。さらに、超長鎖脂肪酸合成阻害剤であるカフェンストロールによる処理により、野生型シロイヌナズナ植物体の成長が促進されるという表現型を指標とし、

表皮の超長鎖脂肪酸を介した器官成長の制御に関与する因子を遺伝学的に同定する。加えて、表皮から内部細胞層へ細胞増殖を制御するシグナルが移動する機構についても解析を試みた。

4. 研究成果

1) 超長鎖脂肪酸およびブラシノステロイド情報伝達系の相互作用の解析

ブラシノステロイドが超長鎖脂肪酸を介した器官成長の制御過程に関与する可能性を検討した。野生型シロイヌナズナ植物体に超長鎖脂肪酸の合成阻害剤であるカフェンストロールを処理すると、器官成長が促進される。ブラシノステロイドの受容体を欠損した *bri1* 変異体では、このカフェンストロールによる器官成長の促進が阻害されることを見出した。さらに、表皮のみで BRII の発現を回復した *AtML1:BRII-GFP/bri1* 変異体では、カフェンストロールによる器官成長促進の表現型が回復したことから、表皮におけるブラシノステロイドの受容が超長鎖脂肪酸による器官成長の制御に必要であることが強く示唆された。

さらに、超長鎖脂肪酸の合成阻害剤であるカフェンストロールを処理した野生型植物や、超長鎖脂肪酸の含量が減少した *pas2* 変異体では、ブラシノステロイドに応答して発現の上昇するいくつかの遺伝子の発現が誘導されていることを見出した。このことから、超長鎖脂肪酸はブラシノステロイドシグナルを抑制している可能性が考えられた。また、ブラシノステロイドに応答した遺伝子発現を制御する転写因子、BES1 の機能獲得型変異体では、カフェンストロール処理による器官成長の促進に加え、サイトカイニン合成遺伝子の発現誘導も抑制されていた。これらの結果から、超長鎖脂肪酸が器官成長を制御する経路には、BES1 が関わる可能性が示唆された。

加えて、ブラシノステロイドの受容体である BRII の発現および局在が超長鎖脂肪酸の制御を受ける可能性について調べた。その結果、カフェンストロール処理を行ったシロイヌナズナにおいて、*BRII* の遺伝子発現レベルはカフェンストロール処理の影響を受けないが、*BRII-GFP* の細胞内局在が乱れる可能性が示唆された。

2) 超長鎖脂肪酸シグナルによる器官成長を制御する新規因子の同定

EMS により変異原処理を行ったシロイヌナズナ植物系統のプールより、カフェンストロール処理を行っても器官成長が促進されない変異体系統を多数同定した。この中から、カフェンストロール処理を行っても、サイト

カイニン生合成遺伝子の発現が上昇しない候補を系統を5系統同定し、*defective in the cafenstrole response (dcr)1-5* 変異体と名付けた。

これら *dcr1*, 2, 3, 4, 5 系統について、詳しい表現型の解析を行った。その結果、これら5系統の変異体はいずれもカフェンストロール処理を行っても、葉および茎頂、胚軸における細胞増殖の活性化がおこらないことを確認した。さらに、*dcr1*, 2, 3, 4, 5 系統のいずれにおいても、カフェンストロール処理によって超長鎖脂肪酸の内生量が野生型と同様に減少することから、これら *dcr* 変異はカフェンストロールが超長鎖脂肪酸の合成を抑制する過程には関与しないと考えられる。以上のことから、*dcr* 変異体群は、超長鎖脂肪酸からサイトカイニン生合成までの過程に変異を有することが示唆された。

次に、*dcr* 変異体の責任変異の探索を行った。Col 背景である *dcr1*, 2, 3, 4, 5 変異体それぞれを野生型 *Ws* と異種交配した F2 植物を用い、ラフマッピングを行った。その結果、責任変異が存在する染色体上の位置を絞り込むことができた *dcr3* 及び *dcr4* について世代シーケンサーにより全ゲノム配列を決定した。遺伝子のコード領域にホモで存在し非同義変異を引き起こす変異体特異的な SNP の探索を行った結果、*dcr3* については1個、*dcr4* については2個の責任遺伝子候補を得た。

今後、*dcr3* 及び *dcr4* については、同定した責任変異候補を含む遺伝子の T-DNA 挿入変異体の表現型の解析を行い、原因遺伝子の決定を行う必要がある。さらに、他の *dcr* 変異体についても、準備が出来次第、次世代シーケンサーによる全ゲノム配列の解析を行い、責任変異箇所の同定を試みる。*dcr* 変異体の原因遺伝子が明らかになれば、表皮の極長鎖脂肪酸がサイトカイニン生合成遺伝子の発現制御を介して植物の器官成長を調節する機構の解明につながると期待される。

3) 表皮から内部細胞層への情報伝達機構の解析

表皮特異的、且つ誘導的に変異型カロース合成酵素 *cals3m* を発現させた形質転換体 *AtML1p::cals3m* を作成したところ、この植物では、カフェンストロール処理による器官成長の促進が DEX 処理特異的に損なわれることを見出した。このことから、原形質連絡を介したシンプラスト輸送が表皮から内部細胞層への細胞間情報伝達機構に関わる可能性が示唆された。

さらに、カフェンストロール処理を行った野生型シロイヌナズナでは、葉の気孔のクラスター化が観察された。カロースの合成酵素の変異体等、原形質連絡の開口度に異常をきたす植物体では、同様に気孔の形成に関する

表現型を示すことから、超長鎖脂肪酸が原形質連絡の開口度の調節を介して、細胞間シグナル伝達の制御に関わる可能性を示唆する可能性を考えている。

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4件)

- 1) Okushima Y, Shimizu K, Ishida T, Sugimoto K, Umeda M (2014). Differential regulation of B2-type CDK accumulation in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell reports*. 33, 1033-40 (査読あり)
- 2) Yi D, Alvim Kamei CL, Cools T, Vanderauwera S, Takahashi N, Okushima Y, Eekhout T, Yoshiyama KO, Larkin J, Van den Daele H, Conklin P, Britt A, Umeda M, De Veylder L (2014). The *Arabidopsis* SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *Plant Cell*. 26, 296-309. (査読あり)
- 3) Takahashi N, Kajihara T, Okamura C, Kim Y, Katagiri Y, Okushima Y, Matsunaga S, Hwang I, Umeda M (2013). Cytokinins control endocycle onset by promoting the expression of an APC/C activator in *Arabidopsis* roots. *Current Biology*. 23, 1812-7 (査読あり)
- 4) Nobusawa T, Okushima Y, Nagata N, Kojima M, Sakakibara H (2013). Restriction of cell proliferation in internal tissues via the synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis. *Plant Signaling & Behavior* 5, e25232. (査読なし)

[学会発表](計6件)

- 1) 奥島 葉子, 史 佳卉, 奥田 利美, 服部 弘嗣, 坂本 智昭, 倉田 哲也, 稲垣 宗一, 梅田 正明「シロイヌナズナにおいて DNA 損傷応答に関わる新規因子の同定」日本植物学会第 79 回大会 (新潟県、新潟市) 2015 年 9 月 6-8 日
- 2) Yoko Okushima, Takashi Nobusawa, Masaaki Umeda "Control of shoot growth by epidermis-derived signals in *Arabidopsis*" Plant Organ Growth Symposium (ゲント、ベルギー) 2015 年 3 月 10-12 日
- 3) Jihui Shi, Toshimi Okuda, Hirotsugu Hattori, Soichi Inagaki, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya

Kurata, Yoko Okushima, Masaaki Umeda "Identification of genes involved in DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*" 第 56 回日本植物生理学会年会 (東京都) 2015 年 3 月 18 日

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

4) Yoko Okushima, Masaaki Umeda "Regulation of organ growth by synthesis of very-long-chain fatty acids in *Arabidopsis*" 第 56 回日本植物生理学会年会 (東京都) 2015 年 3 月 17 日

5) 荻田伸夫, 奥島葉子, 倉田哲也, 時澤陸朋, 山本義治, 高橋直紀, 梅田正明「DNA 損傷応答に関わる SOG1 の標的遺伝子の解析」第 56 回日本植物生理学会年会 (東京都) 2015 年 3 月 16 日

6) Hidekazu Iwakawa, Yusuke Atsumi, Yoko Okushima, Masaaki Umeda "VLCFA synthesis is involved in the germination rate of lateral organs from the shoot apical meristem" 第 56 回日本植物生理学会年会 (東京都) 2015 年 3 月 16 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥島 葉子 (OKUSHIMA, Yoko)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教

研究者番号：00432592