

茎頂分裂組織における成長制御およびシュート幹細胞維持メカニズムの解析

Growth regulation in the shoot meristem for stem cell maintenance

(公益社団法人日本植物学会推薦)

代表研究者 熊本大学 相田 光宏 Kumamoto University Mitsuhiro AIDA
協同研究者 熊本大学 山田 瑞樹 Kumamoto University Mizuki YAMADA

Stem cells that produce plant shoot organs such as leaves, stems, and floral organs are maintained at the summit of a dome-shaped tissue called the shoot meristem. Continuous cell proliferation within the shoot meristem results in the lateral expansion of the tissue and allows production of lateral organ primordia that grow distally from the tissue periphery. How this dynamic growth pattern of the shoot meristem is regulated and how the shoot stem cells are maintained within the tissue remain elusive. By focusing on the functions of the transcription factors CUC1, CUC2, and CUC3, which are essential for shoot meristem formation and morphogenesis of organ boundaries, together with their downstream factors that are potentially involved in directional tissue growth, we investigated molecular mechanisms that regulate growth patterns within the shoot meristem and their significance in stem cell maintenance. The results suggest that the phytohormone auxin plays a key role in the downstream process.

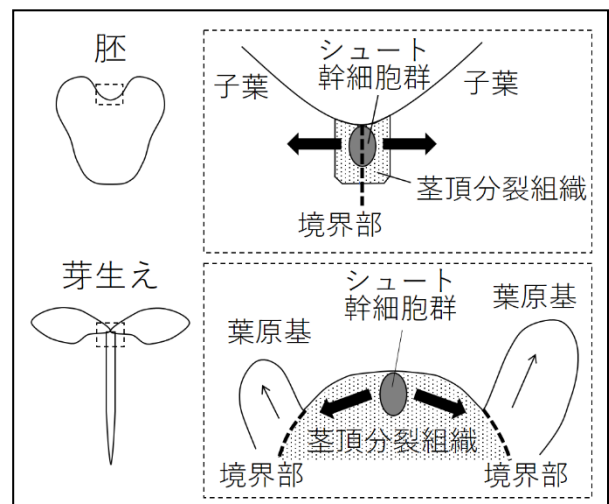
研究目的

植物は一生に渡って成長を続け、中には数10メートルもの高さに達する植物種もある。こうした植物の高い成長能力を支える要因の一つとして、頂端分裂組織のはたらきが挙げられる。頂端分裂組織は茎と根の先端に存在する未分化な組織であり、これらの組織中の細胞が分裂を繰り返すことで、体のパーツとなる各種の器官を継続的に生み出される。頂端分裂組織の活性が長期的に維持されることで、植物は上下方向への成長を続けることが出来る。

頂端分裂組織のうち、茎の先端にある方は茎頂分裂組織と呼ばれ、1本の茎とそれを囲む多数の葉からなるシュートという構造をつくる。茎頂分裂組織はドーム状の形をしており、その中央先端部に一群の幹細胞（シュート幹細胞）が存在する。幹細胞は継続的に分裂して自己を更新しながら分化細胞を生み出す細胞のことであり、シュート幹細胞を長期的に維持するしくみの理解が、植物の成長メカニズムを理解する上で必須である。

茎頂分裂組織およびシュート幹細胞群は、ともに胚発生において子葉の境界部に生じる（右図の上段）。この時期、茎頂分裂組織は水平方向へと拡大を開始

し、芽生えの時期までにドーム状の形状を示すようになる（同じ図の下段）。その後の発生でも水平方向への成長は維持されるが、葉原基では組織の成長が一転して垂直方向にシフトする。これまでに同定された、茎頂分裂組織の水平方向の成長が阻害される変異体では、シュート幹細胞群が維持できない（Barton and Poethig, 1993）。このことは分裂組織の水平方向の成長がシュート幹細胞群の永続性に重要であることを示唆しているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究ではシュート幹細胞群が維持



される場としての茎頂分裂組織に着目し、子葉境界部で発現して茎頂分裂組織の形成を促進する *CUP-SHAPED COTYLEDON* 遺伝子群 (*CUC1*・*CUC2*・*CUC3*; Takeda and Aida, 2011) の制御下でどのように茎頂分裂組織とシュート幹細胞群が形成および維持されるのかを、*CUC* の下流遺伝子群に着目して明らかにすることを目指した。この研究により、茎頂分裂組織に特有な成長パターンがいかにして確立し維持されるかが明らかにできるとともに、この成長パターンが植物の永続的な器官形成過程にどのような役割を持つかが明らかにできると期待できる。

研究経過

これまで我々は *CUC1*・*CUC2*・*CUC3* によって発現が制御される下流遺伝子として、*KNOX* 型転写因子をコードする *STM* および *ALOG* 型転写因子をコードする *LSH3*・*LSH4* を同定し、これらの遺伝子が *CUC* の下流で茎頂分裂組織の形成と子葉原基境界部の形態形成に影響することを明らかにしてきた (Takeda et al., 2011; Scofield et al., 2018)。 *CUC* の下流遺伝子候補をさらに多数同定する目的で、*CUC1* 過剰発現体を用いたトランスクリプトーム解析を行ったところ、オーキシン生合成遺伝子およびオーキシン応答の抑制遺伝子の 2 種類が同定された。オーキシンは植物ホルモンの一種で、局所的に生合成され、極性輸送によって細胞間を移動し、特定の部位に蓄積して植物器官の形成を促す働きを持つ (Leysner, 2018)。加えてオーキシンには、維管束細胞の形成期に見られるように、細胞を特定の方向へ偏って伸長させるはたらきも知られている (Biedron and Banasiak, 2018)。そこで、これらのオーキシン関連因子の発現が *CUC* 遺伝子の働きにより活性化し、茎頂分裂組織および子葉原基境界部の成長方向へ影響するのではないかと考え、さらに解析を進めることにした。

まずオーキシンの生合成遺伝子の発現を *GFP* レポーターを用いて解析したところ、この遺伝子は胚発生の早い段階から *CUC* 遺伝子が発現する部位と重なる領域である子葉境界部において発現することが分かった。一方、同じレポーターを *CUC* 遺伝子の突然変異体で、茎頂分裂組織を欠損し、子葉に強い形態異常を示す *cuc2 cuc3* 二重変異体へ導入したところ、*GFP* の発現がほぼ消失することが分かった。以上から、オーキシン生合成遺伝子の発現活性化に *CUC* が必要であることが分かった。

次にこの遺伝子の発現の消失が、*cuc2 cuc3* 二重変異体の形態異常に関係しているかどうかを調べるため、この遺伝子のコード配列を *CUC2* 遺伝子のプロモーター配列の下流につないだ融合遺伝子を *cuc2 cuc3* 二重変異体へ導入したところ、表現型の回復は見られなかった。

続いてもう一つの *CUC* 下流遺伝子候補であるオーキシン応答抑制遺伝子についても解析を進めた。まず、この遺伝子の発現について *GUS* レポーター系統を用いて解析したところ、胚発生の早い段階から *CUC* 遺伝子の発現領域と重なる部位で発現することが分かった。次に、同じレポーター遺伝子を *cuc2 cuc3* 二重変異体へ導入したところ、*GUS* の発現は *CUC* の発現部位に相当する領域の一部において消失することが分かった。このことから、*CUC* 遺伝子はオーキシン応答抑制遺伝子の発現制御にも関わることが明らかになった。

ここまでの結果は、*CUC* 遺伝子がオーキシンの生合成および応答性に関わる遺伝子の発現を制御することで、胚におけるオーキシン応答の状態を変化させる可能性を示唆する。そこで、オーキシンの応答性リポーター遺伝子である *DR5* の発現パターンについて、正常胚と *cuc2 cuc3* 二重変異体胚とで比較した。その結果、正常な胚では頂端部 2 箇所対称な位置において *DR5* の発現が開始され、その部分が子葉原基へと発達するのに対し、*cuc2 cuc3* では *DR5* の発現開始が正常胚より遅れ、発現を始めた後も、その空間的模式に乱れが生じていた。このことは、*CUC* 遺伝子が胚頂端部における正常なオーキシン応答の分布形成に必要なことを示唆する。

次に正常胚と *cuc2 cuc3* 胚のそれぞれを高濃度のオーキシンを含む培地で培養した後に *DR5* の発現パターンを観察したところ、正常胚では *DR5* のシグナルの分布がほとんど変わらなかったのに対して、*cuc2 cuc3* では広い範囲でシグナルの増加が認められた。このことは、*CUC* 遺伝子が胚頂端部の細胞のオーキシン応答性を抑制していることを示している。

さらに、正常な胚と *cuc2 cuc3* 胚のそれぞれについて、オーキシンの極性輸送阻害剤の存在下で培養した後に *DR5* の発現パターンを観察したところ、いずれにおいても胚頂端部でのシグナルの消失が一部の個体で観察された。ただ興味深いことに、シグナルを消失する個体の割合は正常胚よりも *cuc2 cuc3* のほうが小さかった。このことは、*cuc2 cuc3* 変異体に

において極性輸送の阻害剤に対する感受性が減少していることを示している。

最後に、*CUC* 遺伝子が幹細胞の制御因子の発現に与える影響についても調べた。シロイヌナズナにおいては、シュート幹細胞群で発現する *CLV3* とその直下の細胞群で発現する *WUS* の相互作用が、シュート幹細胞の維持に重要であることが分かっている (Somssich et al., 2016)。両遺伝子の胚における発現を *cuc2 cuc3* において調べたところ、いずれも顕著に減少していた。また、*WUS* 遺伝子に対する *CUC1* の過剰発現の影響を調べたところ、*WUS* の発現が *CUC1* によって促進されることが分かった。

考察

本研究において、*CUC* 遺伝子が 1) 子葉境界部においてオーキシンの生合成および応答抑制に関わる遺伝子の発現を制御すること、2) 子葉形成にともなうオーキシン応答の空間的分布を制御すること、3) 胚頂端部の細胞のオーキシンに対する応答性を抑制すること、4) オーキシン極性輸送阻害剤に対する感受性を高めること、そして 5) シュート幹細胞の制御系遺伝子である *WUS* と *CLV3* の発現を促進することが明らかになった。以上のことから、*CUC* 遺伝子がオーキシンの生合成、応答抑制、極性輸送を介して胚頂端部におけるオーキシン応答の空間的な分布を制御し、正常な子葉形成および *WUS-CLV3* 制御系の発現を含めたシュート幹細胞の形成を促進する、というシナリオが考えられる。

ただし、*CUC* 遺伝子はオーキシンに関連する遺伝子以外にも数多くの遺伝子の発現を制御しており、その中には *KNOX* 型転写因子をコードする *STM* や *AOG* 型転写因子をコードする *LSH3・LSH4* などの調節遺伝子も含まれている。*CUC* 遺伝子の子葉境界部形成およびシュート幹細胞制御系への影響が、実際にオーキシン関連遺伝子の発現を介したものであるかどうかについては、今後慎重に検討していく必要がある。特に、*CUC2* 遺伝子のプロモーター配列の制御下でオーキシン生合成遺伝子を発現させても *cuc2 cuc3* 変異体の表現型を回復しなかったことから、少なくとも単一のオーキシン生合成遺伝子の発現の有無で、子葉形成と幹細胞形成に対する *CUC* 遺伝子の影響を説明することは困難である事がわかる。したがって今後は、オーキシン生合成遺伝子とその他の *CUC* 下流遺伝子との複合的な効果を検討する必要がある。

CUC 遺伝子がオーキシンを介して発生過程を制御することは、葉の発生や胚珠の発生においても知られている (Bilsborough et al., 2011; Galbiati et al., 2013)。このことから、本研究で胚発生において見出した *CUC* 遺伝子のオーキシンに対する影響は、この遺伝子が関わる他の発生過程においても共通したものであると考えることができる。ただし葉や胚珠の発生と異なり、胚ではシュート幹細胞の制御というユニークかつ重要な過程が含まれていることから、今後も *CUC* 遺伝子の下流において、オーキシンとシュート幹細胞形成がどのような関係にあるのかを更に詳しく解析していくことの意義は大きいと思われる。

Barton, M.K., and Poethig, R.S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development* **119**, 823-831.

Biedroń, M., and Banasiak, A. (2018). Auxin-mediated regulation of vascular patterning in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Rep* **37**, 1215-1229.

Bilsborough, G.D., Runions, A., Barkoulas, M., Jenkins, H.W., Hasson, A., Galinha, C., Laufs, P., Hay, A., Prusinkiewicz, P., and Tsiantis, M. (2011). Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3424-3429.

Galbiati, F., Sinha Roy, D., Simonini, S., Cucinotta, M., Ceccato, L., Cuesta, C., Simaskova, M., Benkova, E., Kamiuchi, Y., Aida, M., Weijers, D., Simon, R., Masiero, S., and Colombo, L. (2013). An integrative model of the control of ovule primordia formation. *Plant J* **76**, 446-455.

Leyser, O. (2018). Auxin signaling. *Plant Physiol* **176**, 465-479.

Scofield, S., Murison, A., Jones, A., Fozard, J., Aida, M., Band, L.R., Bennett, M., and Murray, J.A.H. (2018). Coordination of meristem and boundary functions by transcription factors in the SHOOT MERISTEMLESS regulatory network. *Development* **145**.

Somssich, M., Je, B.I., Simon, R., and Jackson, D. (2016). CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development* **143**, 3238-3248.

Takeda, S., and Aida, M. (2011). Establishment of the embryonic shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* **124**, 211-219.

Takeda, S., Hanano, K., Kariya, A., Shimizu, S., Zhao, L., Matsui, M., Tasaka, M., and Aida, M. (2011). CUP-SHAPED COTYLEDON1 transcription factor activates the expression of *LSH4* and *LSH3*, two members of the ALOG gene family, in shoot organ boundary cells. *Plant J* **66**, 1066-1077.

研究の発表

口頭発表

1. セグメンテーションによるシロイヌナズナ胚頂端部の形態解析. 井上雄規, 相田光宏. 新学術領域研究「植物多能性幹細胞」第2回若手ワークショップ. 国民宿舎小豆島交流センター, 小豆島. 2018/10/05.
2. シロイヌナズナの茎頂分裂組織形成におけるオ

ーキシン生合成遺伝子の発現解析. 田中俊介, 相田光宏. 新学術領域研究「植物多能性幹細胞」第2回若手ワークショップ. 国民宿舎小豆島交流センター, 小豆島. 2018/10/05.

3. 境界部からの情報発信～子葉形成と境界部の関係～. 相田光宏 遺伝学研究所研究会「イネ分子遺伝学の飛躍」国立遺伝学研究所, 三島. 2018/10/12.
4. シュート幹細胞の形成機構. 相田光宏. 第4回幹細胞研究会「幹細胞の基本原則と共通性～植物と動物の比較から～」岡崎コンファレンスセンター, 岡崎. 2018/11/07-
5. 茎頂分裂組織を介した植物の成長と形づくりのメカニズム. 相田光宏. 日本動物学会・九州沖縄植物学会・日本生態学会 合同熊本例会. 熊本大学, 熊本. 2018/11/17
6. Organ boundary as a signaling source for embryonic shoot morphogenesis. Aida M. Mechanisms of Plant Perception -from endogenous to exogenous-. Centre Général Guisan, Lausanne, Switzerland, 2019/09/20.