

論文内容の要旨

論文題目

Study on cell signaling in plant vascular stem-cell maintenance

維管束幹細胞の維持における細胞シグナル伝達の研究

氏名 平川 有宇樹

序

陸上植物の長期にわたる発生と成長は、分裂組織の内部に維持される幹細胞の働きに依存している。この幹細胞の維持には周囲のニッチ細胞からの分化抑制シグナルを受容する必要があると考えられているが、その分子的な実態は明らかになっていない。近年、植物における新規のシグナル分子として低分子ペプチドが相次いで発見されている。そこで私は、幹細胞維持への関与が予想される維管束木部細胞分化阻害因子 TDIF に着目し (Ito et al., 2006; 図 1)、その生体内での働きについての研究を行った。

結果と考察

1. TDIF の機能解析

合成 TDIF ペプチドを与えて育成した植物体では、葉脈における木部道管の形成が抑制されたが(図 2A)、前形成層と篩部組織は阻害されなかった(図 2B)。TDIF をコードする遺伝子 *CLE41* の過剰発現体も同様の表現型を示した(図 2C)。胚軸の維管束においては、篩部と木部の間に存在する前形成層細胞が TDIF 処理によって増加した(図 3B, C)。逆に、*cle41-1* 変異体では、前形成層細胞数の減少し、篩部細胞に隣接した位置での前形成層細胞の木部分化が見られた(図 3D)。以上の結果から、TDIF は前形成層細胞の木部分化を阻害し、増殖を促進することが明らかとなった。

2. TDIF 受容体遺伝子 *TDR* の同定と発現解析

TDIF 受容体遺伝子 *TDR* を同定するため、TDIF 非感受性株の探索を行った。一回膜貫通型のロイシンリッチリピート受容体型キナーゼ遺伝子ファミリーから候補となる遺伝子を選抜し、その T-DNA 挿入型

変異体を収集した。この中から TDIF 非感受性株を見出し、その原因遺伝子 *TDR* (Atg61480) を同定した (図 1, 4)。*tdr-1* 変異体では、*cle41-1* と同様の表現型が見られた (図 3E)。*TDR* と *CLE41* のプロモーター-GUS 解析の結果、それぞれ前形成層および篩部で強い発現が見られた (図 5)。また、*TDR* の細胞外領域は TDIF と直接結合することが明らかとなった。したがって、篩部細胞から分泌された TDIF が *TDR* 受容体を介して前形成層細胞に受容されることが示された。

3. TDIF シグナル標的遺伝子の探索

TDIF 受容後のシグナル経路を明らかにするため、TDIF シグナルの標的転写因子を探索した。WOX ファミリー転写因子の遺伝子発現解析を行った結果、TDIF 処理により *WOX4* の発現上昇が見られた。この発現上昇は *TDR* に依存し、TDIF 投与後 1 時間で起こった (図 6)。*WOX4* は *TDR* と同様、前形成層で発現が見られた (図 5)。以上から *WOX4* は TDIF シグナル伝達の標的遺伝子であると考えられる。

4. *WOX4* 遺伝子の機能解析

WOX4 の機能欠損型変異体 *wox4-1* は、TDIF による木部道管形成阻害に関して野生型と同等の感受性を示した (図 4)。一方で、前形成層細胞増殖に関しては、*tdr-1* と同様の表現型を示した (図 3F)。したがって、*WOX4* は前形成層細胞の増殖促進経路に働く遺伝子であることが示唆された。*wox4-1* では篩部に隣接した木部細胞形成が見られなかったことから、前形成層細胞の維持には TDIF による木部分化阻害活性が重要であることが明らかとなった。

5. 二次肥大成長における TDIF シグナルの機能解析

播種後 4 週目の植物の胚軸の維管束横断面では、野生型と *wox4-1* では環状の形成層が見られたのに対し、*tdr-1* では部分的に欠損していた (図 7A-D)。形成層欠損部位では、篩部に隣接した木部分化が起こっており、これにより維管束の二次肥大成長が停止していたことが分かった (図 7E-G)。以上より、TDIF の木部分化阻害活性が幹細胞維持に必要であることが明らかとなった。

まとめ

本研究では、TDIF シグナルが維管束幹細胞を維持するための分化抑制シグナルとして働くことを示した (図 8)。篩部細胞群から分泌される TDIF は、近傍の前形成層細胞において *TDR* 受容体キナーゼを介して受容され、その木部分化を阻害することによって幹細胞機能の維持に貢献する。同時にこのシグナルは標的転写因子 *WOX4* を介して幹細胞群の増殖促進に寄与する。したがって篩部細胞が維管束幹細胞を支持するニッチ細胞の一つであると考えられる。

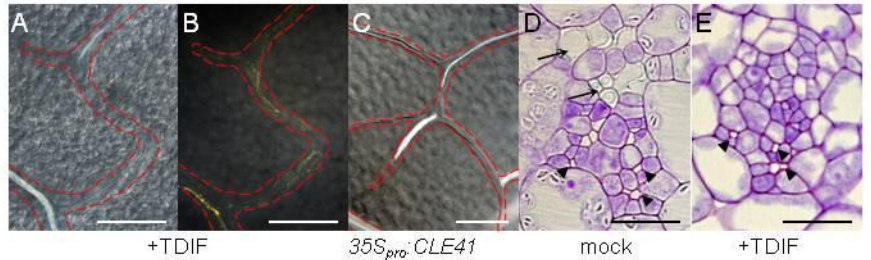
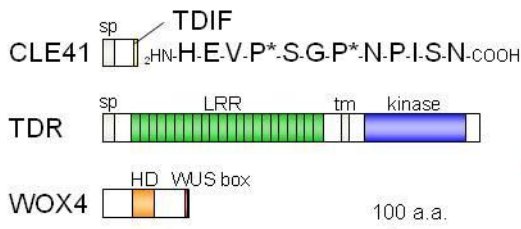


図1 シロイヌナズナ TDIF シグナル関連遺伝子がコードするタンパク質の構造
TDIF は CLE41 タンパク質の C 末端付近の領域から生成される。P* ヒドロキシプロリン、sp シグナルペプチド、LRR ロイシンリッチリピート、tm 膜貫通領域、HD ホメオドメイン。

図2 TDIF による木部分化の阻害

(A, B) TDIF 処理による葉脈における不連続な木部道管(白)の形成。篩管は連続的に形成される(アニンブルー染色)。(C) CLE41 遺伝子過剰発現体。(D, E) 葉脈横断面における TDIF による木部細胞特異的な分化阻害。点線は葉脈、矢印は木部細胞、矢じりは篩部細胞を示す。スケールバー: 100 μm (A-C)、20 μm (D, E)。

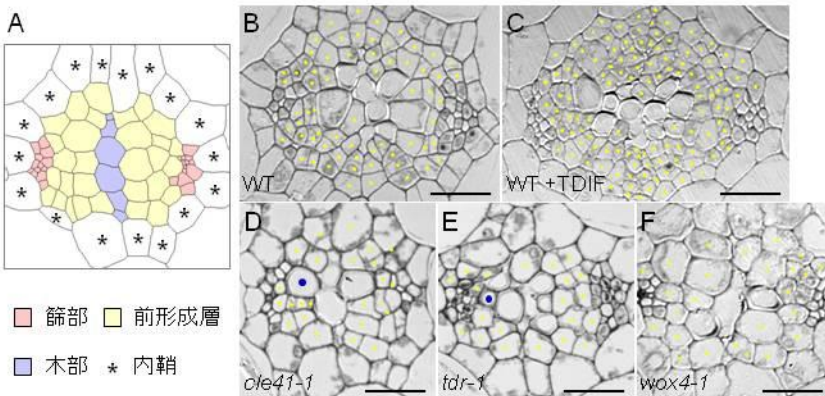


図3 TDIF による前形成層細胞増殖の促進

(A) 胚軸維管束の横断面の模式図。(B-F) TDIF 投与および各変異体における胚軸維管束の横断切片。黄色の点は前形成層細胞、青色の点は篩部に隣接した木部細胞を示す。スケールバー: 20 μm。

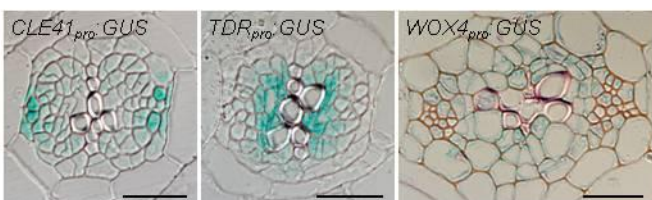


図5 遺伝子発現領域の解析

胚軸維管束の横断面におけるプロモーター GUS 解析。CLE41 は主に篩部、TDR と WOX4 は主に前形成層において GUS のシグナルが見られる。スケールバー: 20 μm。

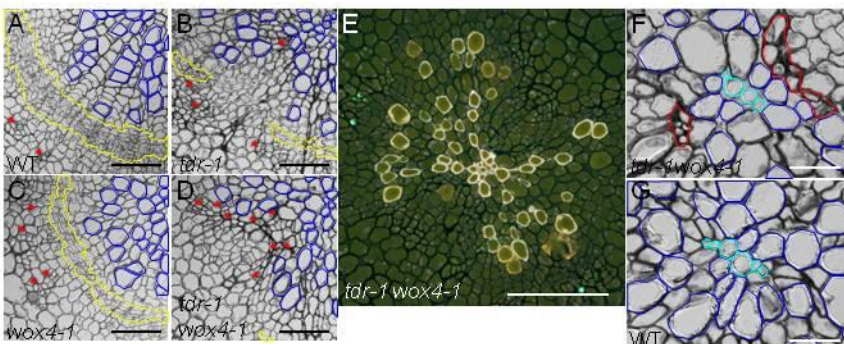


図7 維管束二次肥大成長の解析

播種後 4 週の胚軸維管束の横断切片。(A-D) 形成層領域の拡大図。黄、青線の領域は形成層、木部道管細胞、矢じりは篩部細胞を示す。(E) *tdr wox4* 二重変異体における強い表現型。維管束の肥大成長に顕著な異常が見られる。(F, G) E の中央部拡大図および野生型との比較。青、水色、赤線の領域はそれぞれ木部、初期の木部、篩部を示す。スケールバー: 50 μm (A-D)、100 μm (E)、20 μm (F, G)。

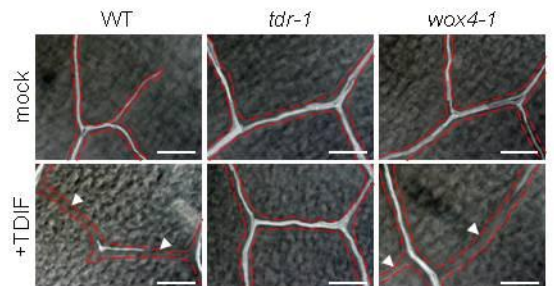


図4 葉脈道管形成における TDIF 感受性
各変異体の葉脈における TDIF の道管形成阻害効果。tdr 変異体は TDIF に非感受性を示す。点線は葉脈、矢じりは道管形成の阻害部位を示す。スケールバー: 100 μm。

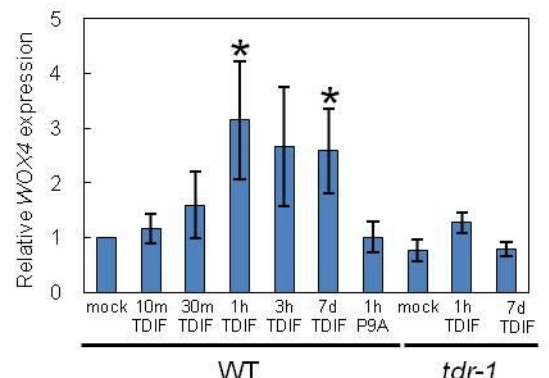


図6 TDIF による WOX4 遺伝子の発現変動

TDIF 投与後の WOX4 mRNA 量を示す。P9A は TDIF の非活性型誘導体。バー: SD, n=3, *p<0.05。

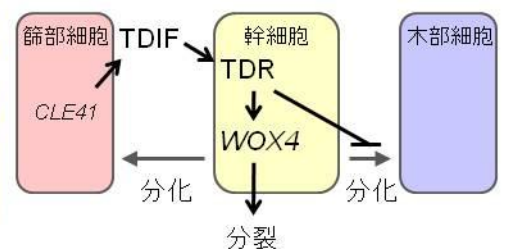


図8 TDIF シグナル経路のモデル

CLE41 にコードされる TDIF は篩部細胞より分泌され、TDR 受容体を介して幹細胞に受容される。このシグナルによって幹細胞の木部分化が抑制される一方で、WOX4 を介して細胞分裂が促進される。