

論文の内容の要旨

論文題目 Study on signaling network governing vascular cell differentiation

(維管束細胞の分化を支配するシグナルネットワークの研究)

氏名 近藤 侑貴 (指導教員 福田裕穂)

序

生物の体は、多様に機能分化した様々な細胞から構成されている。それぞれの細胞は、互いに、ホルモンなどを介した緊密なコミュニケーションを通じて自らの運命を決めていく。中でも、道管細胞は、通道組織としての連続性、他の維管束細胞との機能連携のため、厳密な細胞間コミュニケーションのもとに形成されると考えられてきた。そこで本研究では、細胞間相互作用因子として働く CLAVATA3/ESR (CLE) ペプチドホルモン群に着目し、それらの細胞内シグナル伝達機構の解明を通して、道管細胞分化の厳密な制御機構を明らかにすることを目指した。

結果と考察

シュートにおける道管細胞の分化運命決定機構

CLE ペプチド群に属する TDIF は、道管細胞分化を抑制し、維管束幹細胞の維持に重要な役割を果たす (Ito et al., 2006)。そこで、TDIF の作用機構に迫るため、逆遺伝学のアプローチから、TDIF の受容体として膜貫通型受容体様キナーゼ TDIF RECEPTOR (TDR) を同定した。更に Y2H スクリーニングから、TDR のキナーゼドメインと相互作用する因子として、細胞質キナーゼ BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2) を単離した (図 1)。TDR は BIN2 だけでなく、ホモログである BIL1、BIL2 と結合し (図 1)、*bin2/bil1/bil2* 三重変異体は、外生的な TDIF 投与に対して強い耐性を示した (図 2)。これら BIN2 様遺伝子の発現パターンを調べたところ、葉の維管束に沿って GUS のシグナルがみられたことから、TDR と BIN2、BIL1 そして BIL2 は、共に維管束で機能することが示された (図 3)。次に、TDIF、TDR、BIN2 をタバコの表皮細胞で発現させ、シグナルの再構築を試みた。FRET を用いた分子間距離の測定から、BIN2 は TDR と細胞膜近傍で近接し、TDIF の刺激に応じて解離することが明らかになった (図 4)。この BIN2 の解離には、TDR のキナーゼ活性が必要であり、BIN2 の既知のリン酸化サイトである 200 番目のチロシンではなく、48 番目のスレオニンのリン酸化が重要であることがわかった (図 5)。さらに、シロイヌナズナ前形成層細胞において BIN2 の活性を測定するための新たなアッセ

イ系を開発し、TDIFが内生のTDRを介してBIN2を活性化することを明らかにした(図6)。これらの結果から、TDIF-TDRシグナル系はBIN2様キナーゼの活性促進を通して道管分化を阻害していると推測された。そこでBIN2様キナーゼの特異的な阻害剤bikininを葉ディスクに処理したところ、異所的な道管分化を強く誘導した(図7)。以上の結果は、TDIFはTDRと結合したBIN2を解放し、活性化することで道管分化を抑制することを強く示唆した。BIN2はブラシノステロイド(BR)シグナルの負の制御因子であることが知られている(Kim et al., 2009)。そこで、道管分化におけるTDIFとBRの関係性について更なる解析をおこなった。BRの一種であるブラシノライド(BL)を添加すると、bikinin処理と同様に、異所的な道管分化が促進された(図8)。このBLの効果はTDIFによって打ち消され、TDIFとBLは互いの効果を濃度依存的に抑制しあうことが示された(図8)。以上の結果をもとに、私は、TDIFとBRの細胞内シグナル経路はBIN2によって統合され、前形成層細胞からの道管細胞への分化のON/OFFを制御しているという新たなモデルを提示した(図9)。

一方で、TDIFはWOX4と呼ばれる転写因子を介して、前形成層細胞の分裂を促進するという別の作用をもつことが知られている(Hirakawa et al., 2010)。bin2/bil1/bil2変異体は、前形成層の分裂促進に関しては、TDIFに対して野生型と同程度の感受性を示したことから(図10)、TDRとBIN2の遺伝学的相互作用は、道管分化制御の局面に限定されるということが示唆された。そこで、wox4変異体を用いてTDR-WOX4の経路を遮断した状態で、BIN2様キナーゼの機能を阻害することにした。興味深いことに、wox4変異体背景でbikininを処理すると、胚軸の維管束において篩部・木部の間に位置する前形成層がほとんど維持されなくなった(図11)。この表現型はtdrの胚軸維管束の表現型と酷似している(Hirakawa et al., 2010)。以上の結果から、道管分化に対して抑制的に働くTDR-BIN2経路は、TDR-WOX4経路と協調的に働くことで生体内においては、維管束の幹細胞群の維持に大きく貢献していることが明らかとなった(図12)。

根における道管細胞の分化運命決定機構

興味深いことにTDIFは根の道管分化は阻害しない。そこで、根における道管細胞の分化制御因子を探索するため、26種の合成CLEペプチドを根に投与し、網羅的にそれらの影響を調べた。その結果、CLE10を含むいくつかのCLEペプチド群が根の原生木部道管の形成を阻害することを見出した(図13)。CLE10ペプチドの作用機構を調べるため、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析をおこなったところ、植物ホルモンであるサイトカイニンの負のシグナル伝達因子であるType-A ARR遺伝子群に発現の低下がみられた(図14)。さらに、サイトカイニンシグナル伝達に関わる様々な因子の変異体を用いた遺伝学的解析から、CLE10はType-A ARRsに属するARR5、ARR6の発現を負に制御することで、サイトカイニンの細胞内シグナル伝達を強めていることが明らかとなった(図13)。次に、CLEペプチドの既知の受容体の変異体に対してCLE10投与実験をおこなったところ、clv2変異体がCLE10の原生木部道管形成の阻害効果に対して耐性をもつことが分かった(図14)。このclv2変異体では、CLE10投与とは逆に、異所的な原生木部形成が促進され、この表現型はサイトカイニンシグナルが減少した変異体においても観察された(図15)。以上の結果から、根の原生木部道管の形成制御において、Type-A ARRsを介したサイトカイニンとCLEペプチドシグナリングのクロストークが重要なはたらきをもつことが示唆された(図16)。

まとめ

今回、道管細胞の分化制御に関して、新たに異なる2つのシグナル機構を明らかにすることに成功した。それぞれのシグナル系は、地上部と地下部の維管束と働く場所が異なっているが、両者のシグナル系には共通して、植物ホルモンとCLEペプチドシグナルがクロストークするという厳密性を生み出す複雑な制御機構が見出された。これらの結果は、植物細胞の発生運命の決定に際して、異なるCLEペプチドと植物ホルモンの組み合わせが、細胞内で統合されることが鍵になっていることを示唆しており、細胞分化の新たな制御の仕組みが提示された。

発表論文: Kondo et al., Plant and Cell Physiology, 52: 37-48, 2011.

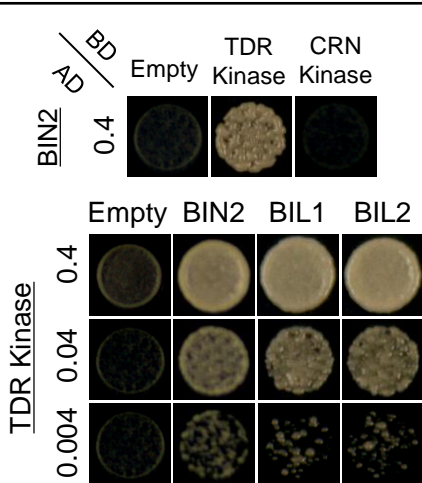


図1 酵母ツーハイブリッド法によるTDRとBIN2の相互作用の検出
TDR細胞内ドメインは、BIN2とそのホモログBIL1、BIL2と相互作用した。数字は培地にまいた培養液のODを示す。

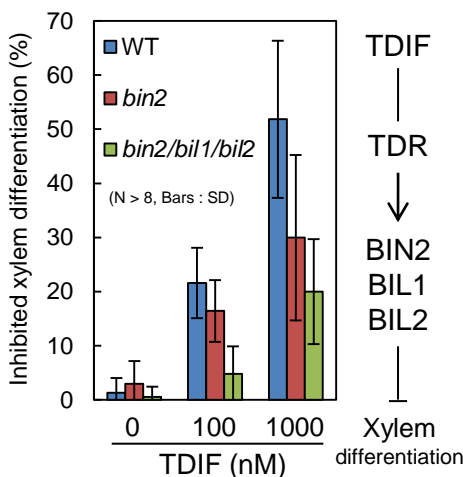


図2 葉脈道管形成におけるTDIF感受性
左図は道管分化の阻害された葉脈の割合を示す。bin2及びbin2/bil1/bil2変異体は、TDIF投与に対して耐性を示し、右図のような遺伝学的関係が明らかとなった。

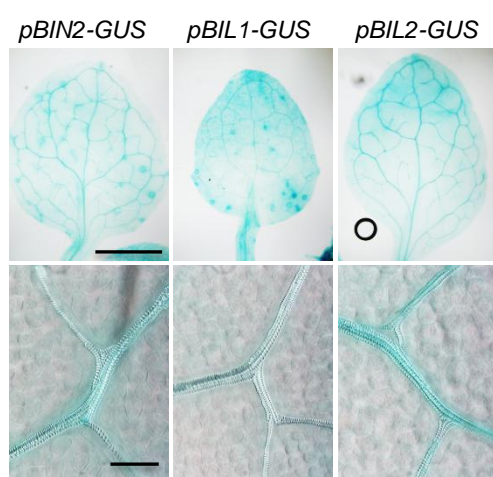


図3 葉におけるBIN2様キナーゼ遺伝子の発現パターン
BIN2、BIL1、BIL2はいずれも葉の維管束に沿って発現が観察された。スケールバーはそれぞれ、1 mm、50 μm。

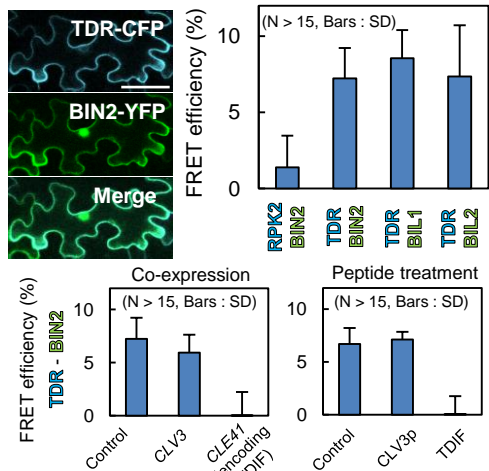


図4 植物細胞におけるTDRとBIN2の結合様式
TDR-CFP、BIN2-YFPをタバコ表皮の同一細胞に一過的発現させ、細胞膜上でFRET効率を測定した。下段はリガンド刺激によるTDR-BIN2間のFRET効率の変化を示す。スケールバーは50 μm。

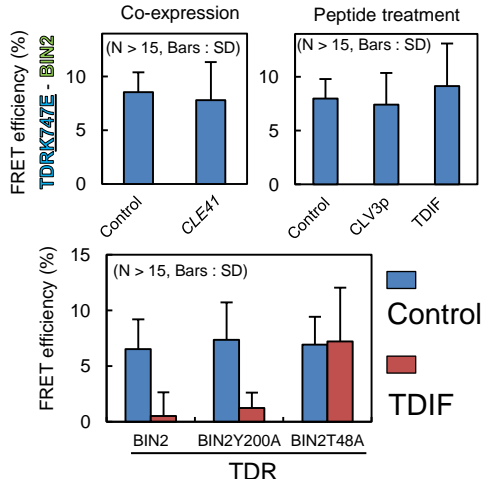


図5 BIN2の解離におけるBIN2T48のリン酸化の重要性
TDRK747EにおいてはTDIF処理によるBIN2の解離は見られなかった。同様に、BIN2T48Aにおいても解離は見られなかった。

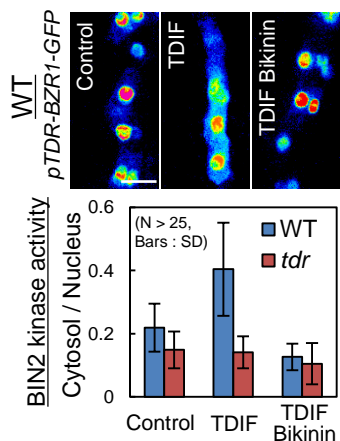


図6 前形成層におけるTDIFのBIN2キナーゼ活性への影響
BIN2の基質であるBZR1を前形成層で発現させ、局在の変化を指標にキナーゼ活性を定量した。スケールバーは10 μm。

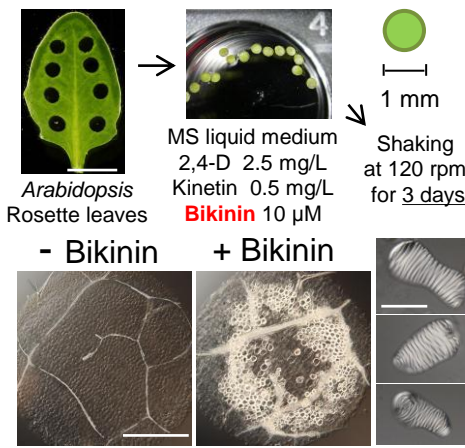


図7 Bikininによる道管分化の誘導
BikininによりBIN2, BIL1, BIL2の活性を阻害すると、多数の道管細胞が異所的に誘導された。スケールバーは順に5 mm, 500 μm, 50 μm。

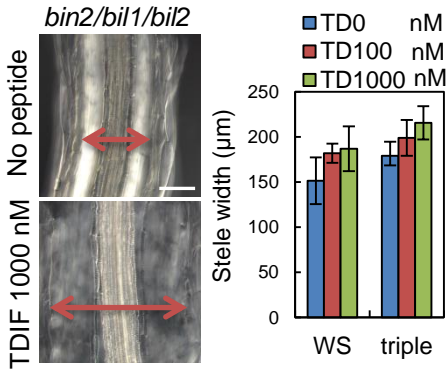


図10 BIN2様キナーゼの前形成層の分裂促進への影響

赤矢印は、*bin2/bil1/bil2* 三重変異体における発芽後11日目の胚軸の維管束幅を示している。右の表のように、三重変異体においても、野生型と同様にTDIFに反応する様子が見られる (n = 8)。スケールバーは 100 μm。エラーバーは標準誤差を表す。

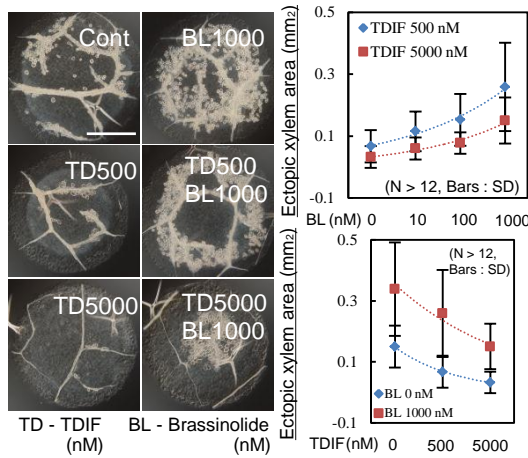


図8 TDIFとBRの道管分化に与える影響
TDIFと brassinolid (BL) は拮抗的に道管分化の抑制と促進にはたらく。スケールバーは500 μm。

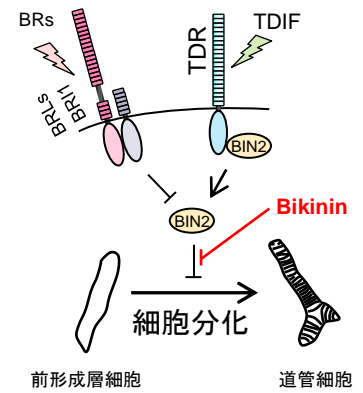


図9 シュートにおける道管分化制御機構のモデル

BIN2が正反対の働きをもつTDIFとBRのシグナルを統合し、最終的に道管分化の制御を支配することが明らかとなった。

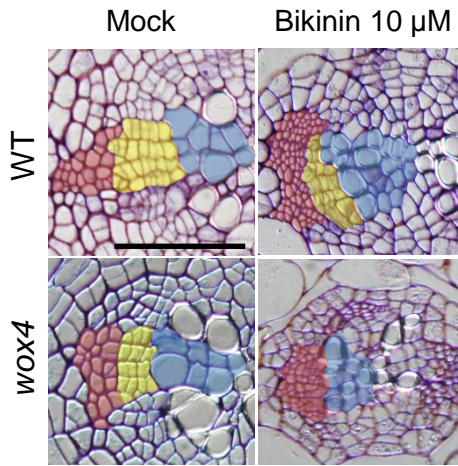
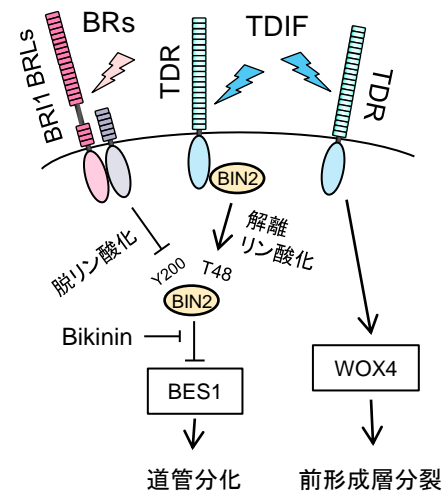


図11 BIN2様キナーゼの維管束幹細胞維持における役割

発芽後11日目の胚軸の横断切片を作製した。赤、黄、青色はそれぞれ節部、前形成層、木部の細胞を示している。スケールバーは 50 μm。



維管束幹細胞維持

図12 TDR-BIN2及びTDR-WOX4経路による維管束幹細胞の維持機構

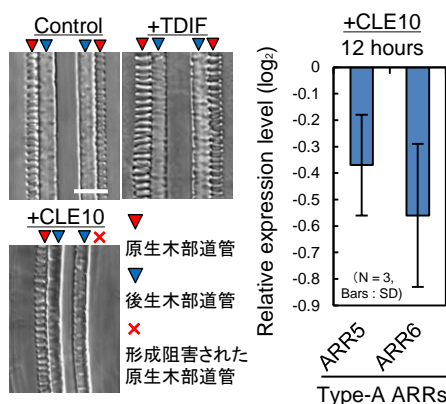


図13 根の道管分化を制御するCLEペプチドとその作用機構

TDIFは根の道管分化を阻害しない。一方、CLE10が原生木部道管の形成を阻害する活性をもつことが明らかとなった。右図はCLE10投与によるARR遺伝子の発現低下を示す。スケールバーは25 μm。

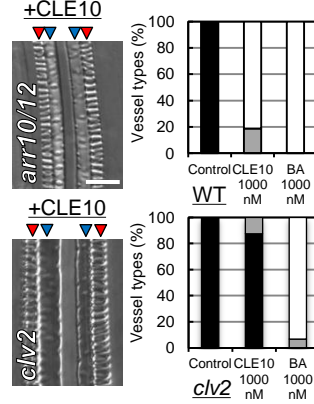


図14 様々な変異体を用いた遺伝学的解析

CLE10の投与に耐性をもつ変異体を単離した。*clv2* はCLE10に耐性を示すが、サイトカニンであるBAIには耐性を示さない。スケールバーは25 μm。

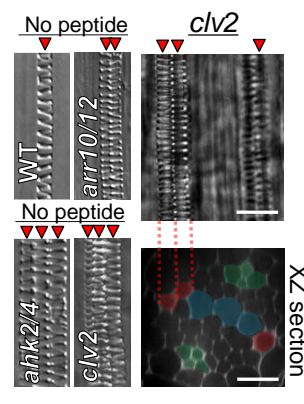


図15 変異体の原生木部道管形成における表現型解析

CLEやサイトカニンのシグナルが低下した変異体では、野生型に比べて過剰な原生木部道管の形成が見られた。スケールバーは25 μm。

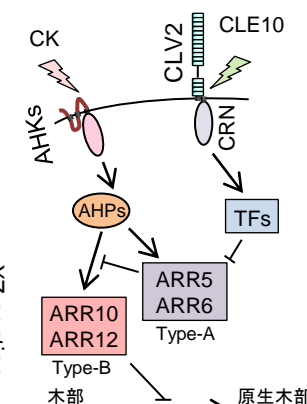


図16 根における道管分化制御機構のモデル

CLEペプチドはType-A ARRsの発現量を抑制することでサイトカニンシグナルとクロストークする。