

細胞間シグナルを介した細胞周期制御機構に関する研究

杉山 輝樹

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 植物成長制御研究室
(梅田 正明 教授)

令和2年1月20日 提出

目次

略語一覧	---	3
第1章 緒言	---	4
第2章 細胞間コミュニケーションによる根の表皮細胞の細胞周期制御		
2-1. 序論	---	18
2-2. 材料と方法	---	19
2-3. 結果	---	23
2-4. 考察	---	59
第3章 細胞間コミュニケーションによる幹細胞維持機構の解明		
3-1. 序論	---	66
3-2. 材料と方法	---	68
3-3. 結果	---	73
3-4. 考察	---	90
謝辞	---	93
参考文献	---	96

略語一覽

Act-MYB	activator-type R1R2R3-Myb transcription factor
Arabidopsis	Arabidopsis thaliana
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKA	A-type CDK
CDKB	B-type CDK
Col-0	Columbia ecotype
CSC	columella stem cell
CYCA	A-type cyclin
CYCB	B-type cyclin
DMSO	dimethylsulfoxide
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGL3	ENHANCER OF GLABRA 3
FC	Fold change
GL3	GLABRA 3
GL2	GLABRA 2
KRP	Kip-related protein
mPS-PI	modified pseudo-Schiff propidium iodide
MS	Murashige and Skoog
MSA	mitotic specific activator
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PI	propidium iodide
QC	quiescent center
RAM	root apical meristem
RBR	RETINOBLASTOMA-RELATED
Rep-MYB	repressor-type R1R2R3-Myb transcription factor
RHD6	ROOT HAIR DEFECTIVE 6
TTG1	TRANSPARENT TESTA GLABRA1
UTR	untranslated region
WER	WEREWOLF
WOX5	WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5

第 1 章

緒言

植物の発生過程における細胞間コミュニケーションの役割

多細胞生物の発生過程においては、細胞同士がコミュニケーションを取り合い、細胞分裂および分化を時空間的に厳密に制御することで、組織形成が行われる。特に植物においては、個々の細胞が移動することができないため、周囲とコミュニケーションをとることによって自身の細胞の位置情報を認識し、適切な挙動を取る。細胞間コミュニケーションは、情報伝達物質を一方から他方の細胞に伝えることによって成立する。動物分野では盛んに研究が行われており、情報伝達物質を体液に乗せて長距離輸送するエンドクリン型と、分泌した物質が自由拡散によって近隣する細胞に作用するパラクリン型に大別されている(Warrillow et al., 2008)。植物では、植物ホルモンやペプチドホルモンが、エンドクリン型(長距離輸送型)およびパラクリン型(拡散型)の伝達様式で機能することが知られている(Norman et al., 2011; Murphy et al., 2012)。例えば、サイトカイニン¹は維管束を介して植物の地上部と地下部の間を行き来しており、両器官の成長を制御している(Bartrina et al., 2011)。特に地下部で生産されるトランスゼアチン型サイトカイニンは、地上部器官の成長を促進するエンドクリン型の植物ホルモンとして知られている(Kiba et al., 2013)。また、別の植物ホルモンであるオーキシンは、地上部で生産されたものが、維管束を介して地下部へ輸送され、細胞周期進行を促進することが知られている(Zhao et al., 2011)。オーキシンは根でも合成されているが、地上部・地下部共に細胞膜上に存在する排出輸送体の配向制御により、局所的にオーキシンを蓄積させ、器官形成や成長を制御する(Tanaka et al., 2007, Wang et al., 2014)。ペプチドホルモンを介した細胞間コミュニケーションの例としては、ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR (RGF)が挙げられる。RGFは根端の幹細胞領域で産生される13アミノ酸から成るペプチドであり、拡散によって根の基部側へと広がり、より広い領域の細胞に受容される(Matsuzaki et al., 2010)。RGFを受容した細胞内では、細胞分裂の制御に重要な転写因子 *PLETHORA (PLT)*のタンパク質の安定化が起こる(Matsuzaki et al., 2010)。したがって、幹細胞から遠い細胞は、十分なRGFが供給されず、PLTタンパク質の安定化が起きにくいいため、細胞分裂が抑えられる。このようにRGFはパラクリン型の伝達様式で細胞分裂を制御する細胞間コミュニケーション因子として機能する。

近年の研究から、様々な転写因子が植物細胞間を移動することも明らかになっている。例えば胚発生の過程では、bHLH型転写因子である TARGET OF MONOPTEROS7 (TMO7)が胚から原根層へ移動し、原根層の運命決定に機能することが知られている(Schlereth et al., 2010)。また、別のbHLH型転写因子である *UPBEAT1 (UBP1)*は根冠で転写され、タンパク質が根の分化領域へ移動する (Tsukagoshi et al., 2010)。 *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*は茎頂分裂組織の形成および維持に重要なホメオボックス型

転写因子であるが、茎頂分裂組織の最外層(L1層)から一層内側のL2層へ移動することが知られている(Kim et al., 2003)。これらの転写因子に、GUS や 3 x GFP などの分子量が大きいタグを付加することで細胞間移行を阻害すると、機能欠損変異体の表現型を回復することができなくなることから、細胞間移行によって適切な細胞へ移動することがこれら転写因子の機能発現に不可欠であると考えられる(Kim et al., 2003; Schlereth et al., 2010; Tsukagoshi et al., 2010)。

転写因子の細胞間移行はプラズモデスマータを介した植物特異的な情報伝達機構であると知られている(Nakajime et al., 2001; Bernhardt et al., 2005; Kurata et al., 2005; Wu et al., 2010; Sager et al., 2018)。プラズモデスマータは植物細胞間をつなぐ管状の連絡通路であり、連絡通路を覆う細胞膜とその内側にチューブ状の小胞体であるデスモソームによって構成されている(Nicolas et al., 2017)。転写因子がプラズモデスマータを介して別の細胞へ移動することで隣り合った細胞間のコミュニケーションが成立する(Maule et al., 2011; Vaten et al., 2011)。

シロイヌナズナでカロース合成酵素の機能獲得型変異遺伝子 *ical3m* を発現させると、プラズモデスマータにカロースが蓄積して、連絡通路が塞がることにより、分裂活性の著しい低下や、分裂面の角度の異常などが観察される(Vaten et al., 2011; Liu et al., 2017)。このことから、プラズモデスマータを介した細胞間コミュニケーションは、正常な細胞分裂を促すのに不可欠であると考えられる。

SHORT ROOT (SHR) は根の中心柱で転写され、タンパク質が一層外側の内皮細胞へ移動して、*SCARECROW (SCR)* の発現を誘導することが知られている(Nakajima et al., 2001)。内皮細胞列の最も根端側に位置する皮層/内皮始源細胞では、*SHR* と *SCR* が協調的に働き D6 型サイクリンの発現を誘導して、その不等分裂を制御している(Sozzani et al. 2010)。しかしながら、細胞間を移動する転写因子が細胞周期制御因子を制御する例は他に報告がなく、細胞間コミュニケーションを介した細胞分裂制御の実態については理解が進んでいないのが現状である。

植物の CDK-サイクリンおよび CDK のリン酸化制御

細胞周期の制御の分子機構においては、セリン-スレオニンキナーゼである Cyclin-Dependent Kinase (CDK) とパートナー因子であるサイクリン(Cyclin; CYC)が中心的に働くことが知られている。シロイヌナズナのサイクリンには A 型サイクリンが 3 種類(CYCA1-3)、B 型サイクリンが 3 種類(CYCB1-3)、D 型サイクリンが 7 種類(CYCD1-7)存在する。その中で、CYCA3 と D 型サイクリン 7 種類全てが G1 期および G1/S 進行、残りの A 型と B 型サイクリン(CYCA1-2, CYCB1-3)が G2/M 進行を制御している

(Wang et al., 2004; Menge et al., 2005, Boruc et al., 2010; Takahashi et al., 2010)。

植物の CDK は、*CDKA*、*CDKB*、*CDKC*、*CDKD*、*CDKE*、*CDKF*、*CDKG* の 7 種類に分類されている(Menges et al., 2005)。そのうち、*CDKA* と *CDKB* の 2 種類が細胞周期の進行を直接的に制御している(Segers et al., 1997; Mironov et al., 1999; Adachi et al., 2009; Boruc et al., 2010; Joubes et al., 2000)。CDKA は細胞周期を通して発現しており、PSTAIR モチーフを介してサイクリンと結合し、全ての細胞周期ステージの進行を制御している (Mironov et al., 1999; Adachi et al., 2009; Boruc et al., 2010)。一方で、CDKB は PSTAIR モチーフを有しておらず、酵母の *cdc2/cdc28* 変異株を相補できない、植物特異的な CDK として知られている(Joubes et al., 2000; Weimer et al., 2016)。CDKB は *CDKB1* と *CDKB2* の 2 種類のサブグループからなり、それぞれ S 期後期から M 期、G2 期から M 期にかけて発現している。そのため、主に G2/M の進行を制御していると考えられている(Porceddu et al., 2001; Menges et al., 2005)。*CDKD* と *CDKF* は、CDK の T-loop 領域をリン酸化し活性化する CDK 活性化キナーゼ (CDK-Activating Kinase; CAK)として知られている(Fisher et al.2005; Umeda et al., 2005; Takatsuka et al., 2009)。CAK のターゲットである CDKA の 161 番目のスレオニンをバリン置換した変異型 CDKA は *cdka* 機能欠損変異体の表現型を相補できないことが報告されており、植物においても CAK によるリン酸化が CDK の活性に重要であることがわかる(Dissmeyer et al., 2007)。一方で、*CDKC* は転写制御、*CDKE* はストレス応答、*CDKG* は RNA の代謝やプロセッシングに関与していることが報告されているが、細胞周期を制御しているという知見は報告されていない(Zhao et al., 2017; Zeng et al., 2014)。

CDK のリン酸化を介した制御は CAK 以外にも報告されている。動物では、タンパク質キナーゼである *WEE1* が CDK の 14 番目と 15 番目のスレオニンとチロシンをリン酸化することで、CDK 活性を抑制する(Sun et al., 1999)。このリン酸基がフォスファターゼである *CDC25* によって取り除かれると、CDK は活性化する(Russell et al., 1986; Kumagai et al., 1991; Gautier et al., 1991)。シロイヌナズナの CDKA の 14 番目と 15 番目のスレオニンとチロシンをそれぞれアスパラギン酸とグルタミン酸に置換した擬似リン酸化型 CDKA (CDKA DE)は *cdka* 機能欠損変異体の表現型を部分的にしか相補できないことから、14 番目と 15 番目のスレオニンとチロシンのリン酸化は植物の CDK 活性制御にも重要であると考えられている(Weimer et al., 2012)。しかしながら、植物にも *WEE1* と *CDC25* のオルソログが保存されているが、通常生育条件下で各機能欠損変異体は顕著な表現型を示さない(Sun et al., 1999; Sorrell et al., 2002; Gonzalez et al., 2004)。唯一報告されている例として、*wee1* 機能欠損変異体が DNA 複製阻害剤に感受性を示すという結果であり、このことから *WEE1* は S 期において何らかの機能を有すると考えられている(Schutter et al., 2007; Dissmeyer et al., 2009)。しかしながら、CDKA の 14 番目と 15 番目のスレオニンとチロシンをそれぞれバリンとフェニルア

ラニンに置換した変異型 CDKA は、*wee1* 機能欠損変異体の表現型を相補することができないことから、S 期における *WEE1* の機能は、CDKA を介したものでないと考えられている (Dissmeyer et al., 2009)。

植物の CDK 阻害因子

動物では CDK 阻害因子 (CDK inhibitor; CKI) の一つである Cip/Kip ファミリーの CKI が CDK とサイクリンに結合し、CDK 活性を阻害することが知られている (Wang et al., 1997)。KIP-RELATED PROTEIN (*KRP*) は、Cip/Kip ファミリーに属する p27 と相同性をもつ、植物の CKI である (Veylder et al., 2001)。シロイヌナズナでは、*KRP* は 7 種類存在しており、*in vitro* における解析の結果、全ての *KRP* が CDKA、CDKB1、CDKB2 と結合して CDK 活性を阻害することが明らかとなっている (Nakai et al., 2006)。*KRP* は C 末端の高度に保存された CDK 結合配列を介して CDK と結合する。また、N 末端側には、PEST 配列、核移行シグナルなど様々なモチーフが存在しており、分子種により有しているモチーフが異なる。*KRP* の多くはタンパク質分解制御を受けており、*KRP1*、*KRP2*、*KRP6*、*KRP7* は植物体に 26S プロテアソーム阻害剤である MG132 を処理することで、安定化することが報告されている (Verkest et al., 2005; Kim et al., 2008; Li et al., 2016)。このタンパク質分解制御を担っている鍵因子の一つとして、E3 ユビキチンリガーゼの一つである SCF 複合体の構成因子の *F-box-like17* (*FBL17*) が報告されている (Kim et al., 2008)。*FBL17* は *KRP6* および *KRP7* と相互作用して、ユビキチン化を促し、これらの *KRP* タンパク質を分解に導く (Kim et al., 2008)。

KRP を過剰発現するシロイヌナズナでは、器官成長の著しい阻害や、葉の鋸歯化など多面的な表現型が観察され、*CDKA* の活性が低下した変異体と多くの類似点が見られる (Veylder et al., 2001; Annika et al., 2012)。一方で、*KRP* の機能欠損変異体では、変異を持つ *KRP* の種類が多いほど CDK 活性が亢進することから、*KRP* は機能的に冗長性が高いと考えられている (Cheng et al., 2013)。7 種類の *KRP* 全てが欠損した多重変異体が単離されており、葉のサイズの増大や胚のう母細胞の異常増殖によって種子内に二個体の胚が形成される頻度が上昇する (Cao et al., 2018)。一方で、特定の *KRP* 遺伝子変異によって引き起こる表現型も報告されている。例えば、*KRP2* の変異は側根数の増加を、*KRP5* の変異は根の伸長抑制を、*KRP6* の変異は発芽促進をもたらす (Sanz et al., 2011; Wen et al., 2013; Nieuwland et al., 2016)。

SIAMESE (*SIM*) とシロイヌナズナに 16 種類存在する *SIM* のホモログである *SIAMESE-RELATED1-16* (*SMR1-16*) は植物特異的な CKI として知られている (Kumar et al., 2015)。*In vitro* 解析の結果、*SIM* は CDKA や CDKB と結合し、その活性を抑制す

ることから、全ての細胞周期ステージの進行を制御していると考えられている (Harashima and Schnittger, 2012; Kumar et al., 2015)。また、*SIM* の機能欠損変異体ではトライコームの異所的な細胞分裂が起こるが、この表現型は *cycd3;1/2/3* 三重変異や *cdkb1;1/1;2* 二重変異を導入することで回復することから、*SIM* はサイクリン-CDK の活性を抑制することで分化細胞の細胞分裂を抑制していることが考えられている (Kumar et al., 2015)。16 種類存在する *SMR* の内、*SMR1*、*SMR2*、*SMR3*、*SMR4*、*SMR5*、*SMR6*、*SMR11*、*SMR13* を *sim* の機能欠損変異体にトライコーム特異的なプロモーターを用いて強制発現させた場合に、*sim* の機能欠損変異体の表現型が相補されることから、*SMR* は *SIM* と同様に CDK 活性を抑制していると予想されている (Kumar et al., 2015)。また、*SMR1* は乾燥耐性によって発現誘導され、*SMR5* と *SMR7* は DNA 損傷によって発現誘導されることから、*SMR* は外界からのストレスに応答し細胞周期をハブとして機能していると考えられている (Yi et al., 2014; Dubois et al., 2018)。

RBR による細胞分裂の制御

G1 期から S 期への移行には、*CELL DIVISION CYCLE (CDC6)*、*ORIGIN RECOGNITION COMPLEX 1 (ORC1)*、*PCNA* などの DNA 複製の開始および進行に必要な遺伝子群の発現が必要である。これらの遺伝子群の発現は *E2F* 転写因子によって制御されている (Ramirez et al., 2003; Klaas et al., 2005)。シロイヌナズナの *E2F* は *E2Fa*、*E2Fb*、*E2Fc*、*E2Fd*、*E2Fe*、*E2Ff* の 6 種類存在しており、*E2Fa*、*E2Fb*、*E2Fc* は DPa または DPb と二量体を形成して下流遺伝子の発現を調節する (Mariconti et al., 2002; Kosugi et al., 2002; Van et al., 2010; Wang et al., 2018) (図 1-1)。一方で、*E2Fd*、*E2Fe*、*E2Ff* には、DPa または DPb と二量体を形成するために必要なドメインが保存されておらず、単量体で機能すると考えられている (Kosugi et al., 2002)。また、*E2Fd*、*E2Fe*、*E2Ff* のいずれかを過剰発現させたシロイヌナズナでは *E2F*-DP 複合体の転写活性が低下することから、*E2Fd/e/f* は *E2Fa/b/c* と競合的に機能すると考えられている (Kosugi et al., 2002)。

RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) は *E2F* に直接結合し、*E2F* の機能を抑制することで S 期への進行を阻害する (Magyar et al., 2005; Gutzat et al., 2012) (図 1-1)。サイクリン-CDK は RBR をリン酸化することで、RBR と *E2F* の結合を阻害し、*E2F* の活性化を促す (Boniotti et al., 2001; Gutzat et al., 2012) (図 1-1)。RBR の機能欠損変異体は配偶体致死性を示すため、miRNA の導入によるノックダウン実験により機能が解析されてきた (Wildwater et al., 2005; Johnston et al., 2010; Ramirez et al., 2013; Perilli et al., 2013; Matos et al., 2014)。RBR をノックダウンしたシロイヌナズナでは、気孔系譜細胞や根の QC 細胞が分裂を停止することができなくなることから、RBR は発生の過程で細

胞分裂活性の抑制に重要な役割を担っていると考えられている (Johnston et al., 2010; Ramírez et al., 2013; Perilli et al., 2013; Matos et al., 2014)。この気孔系譜と QC 細胞の分裂抑制は、RBR が転写因子である FAMA や SCARECROW(SCR)と結合することにより、標的遺伝子の発現を制御することが報告されており、E2F を介した細胞周期制御とは異なると考えられている (Ramírez et al., 2013; Perilli et al., 2013; Matos et al., 2014)。

MYB3R による G2/M 期の進行制御

G2 期から M 期への進行においては、R1R2R3 型 MYB 転写因子(MYB3R)が重要な役割を持っている。MYB3R は M 期への進行に重要な *CYCLINB (CYCB)*や *CDKB* 遺伝子群のプロモーター上に存在する MSA エlement に結合し、これらの遺伝子の転写を制御する(Haga et al., 2007; Kobayashi et al., 2013)。シロイヌナズナにおいて *MYB3R* をコードする遺伝子は *MYB3R1~MYB3R5* の 5 つである(図 1-3)。そのうち、*MYB3R4* は転写活性化能を有しているため、Activator MYB (Act-MYB)と呼ばれている。一方で、*MYB3R3* と *MYB3R5* は転写抑制能を有しているため、Repressor MYB (Rep-MYB)と呼ばれている。*MYB3R1* は転写活性化能と転写抑制能の両方の機能を有していると考えられている (Kobayashi et al., 2013)。*MYB3R2* は他の MYB3R 遺伝子との相同性が低いことから、異なる機能をもっていると考えられている(Kobayashi et al., 2013; Chen et al 2017)。

Act-MYB は G2 期後期に発現が誘導され、MSA エlement を有した G2/M 期特異的遺伝子群の転写を促進する(Haga et al., 2007; Haga et al., 2011)。*Act-MYB* の標的遺伝子には *CYCB1* や *CDKB2* のような G2/M 期の進行に重要なサイクリンや CDK があることから、*Act-MYB* はこれらの遺伝子発現を直接制御することで、G2 期から M 期への移行を促していると考えられる(Haga et al., 2007) (図 1-1)。一方で、*Act-MYB* はサイクリン-CDK によるリン酸化で活性化することから、*Act-MYB* とサイクリン-CDK 複合体は正のフィードバックループを形成することが示唆されている(Araki et al., 2004; Haga et al., 2007)。*Act-MYB* の機能欠損変異体である *myb3r1 myb3r4* 二重変異体では、著しい成長異常や、分裂面の角度異常によってパターン形成が損なわれるなど多面的な表現型が観察される(Haga et al., 2007; Haga et al., 2011)。したがって、*Act-MYB* は G2 期から M 期への移行を制御しているマスターレギュレーターであると考えられている。

Rep-MYB は、G2/M 期以外の細胞周期ステージで発現し、G2/M 期特異的遺伝子群の発現を抑制している(Kobayashi et al., 2013)。*Rep-MYB* の機能欠損変異体では、G1/S 期の細胞でも G2/M 特異的遺伝子群が発現する(Kobayashi et al., 2013)。また、分化細

胞においても G2/M 特異的遺伝子群が異所的に発現することから、Rep-MYB は G2/M 期特異的遺伝子群の発現を G2/M 期に限定する機能とともに、分化細胞でこれらの遺伝子発現を抑制する機能を持っていると考えられている(Kobayashi et al., 2013)。Act-MYB と同様に、Rep-MYB も CDK によるリン酸化制御を受けており、リン酸化されると 26S プロテアソームにより分解に導かれる(Chen et al., 2017)(図 1-1)。例えば DNA 損傷は CDK 活性を低下させることにより、Rep-MYB を安定化させる。DNA 損傷条件下では、ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED (ATM)や ATM AND RAD3-RELATED (ATR)といったセンサーキナーゼがゲノムの損傷部位を認識すると、転写因子 SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1 (SOG1)をリン酸化し活性化させる(Zhou and Elledge, 2000; Abraham, 2001; Bartek and Lukas, 2001; Kurz and Lees-Miller, 2004)。活性化された SOG1 は、SMR5 や SMR7 などの CKI の発現を誘導し、CDK 活性の低下を引き起こす(Yi et al., 2014; Ogita et al., 2018)。その結果、Rep-MYB のタンパク分解が抑制され蓄積量が増加することで、G2/M 期特異的遺伝子群の発現誘導が阻害され、細胞周期が G2 期で停止する(Yi et al., 2014; Chen et al., 2017)。このように、Rep-MYB のリン酸化は G2/M 期の進行を制御する上で非常に重要である。

根の表皮細胞の運命決定

シロイヌナズナの根の表皮は、根毛を形成することができる根毛細胞と根毛を形成しない非根毛細胞の二種類の細胞タイプで構成されている(Manlio et al., 1996)。これらの二つの細胞タイプは位置情報によって厳密に制御されており、二つの皮層細胞と接している表皮細胞は根毛細胞の、一つの皮層細胞と接している表皮細胞は非根毛細胞の運命を獲得することから、表皮細胞が皮層細胞からシグナルを受け取ることが重要であると考えられる(Griersona et al., 2014)。本論文では便宜上、二つの皮層細胞と接している表皮細胞を根毛細胞(Trichoblast cells)、一つの皮層細胞と接している表皮細胞を非根毛細胞(Atrichoblast cells)と呼ぶ。

根の表皮細胞の運命を決定するための表皮細胞-皮層細胞間のシグナル伝達機構については不明な点が多いが、根の表皮細胞で発現している受容体型キナーゼ *SCRAMBLE (SCM)* と *QUIRKY (QKY)* がシグナルを受容していると考えられているため、何らかのペプチドシグナルが皮層細胞から送られていると予想されている(Su et al., 2007; Song et al., 2019)。また、皮層細胞の運命を制御する転写因子 *JACKDOW (JKD)* の機能欠損変異体では、異所的な根毛細胞と非根毛細胞の割合が増加することから、皮層細胞由来のシグナル因子は、*JKD* の下流で制御されていると考えられる(Hassan et al., 2010)。

シロイヌナズナの根の表皮細胞の運命決定については、変異体の単離および原因遺伝子の機能解析により理解が進んできた。bHLH 型転写因子をコードしている *GLABRA 3 (GL3)* と *ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3)* は根毛細胞で発現が誘導され、その後、タンパク質がプラズモデスマータを介して根毛細胞から非根毛細胞へ移行する (Bernhardt et al., 2005)。非根毛細胞において GL3 と EGL3 は MYB 型転写因子である WEREWOLF (WER) と MYB23、WD40 タンパク質である TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) と共に MYB-bHLH-WD40 複合体を形成し、非根毛細胞の運命決定に重要である *GLABRA2 (GL2)* の発現を誘導する (Masucci et al., 1996; Bernhardt et al., 2003; Hassan et al., 2010; Grierson et al., 2014) (図 1-2)。MYB-bHLH-WD40 複合体は、GL2 以外に、CAPRICE (CPC) と TRIPTYCHON (TRY) も発現誘導する。CPC および TRY タンパク質は *JKD-SCM/QKY* を介したシグナル依存的に根毛細胞へ移行し、CPC と TRY は、WER および MYB23 と競合的に GL3 や EGL3 と結合することで、MYB-bHLH-WD40 複合体の形成を阻害する (Kang et al., 2009; Song et al., 2019)。これによって根毛細胞では *GL2* の発現誘導が阻害され、根毛細胞としての運命を獲得する (Kirk et al., 2004)。*GL2* は転写抑制因子として機能しており、根毛形成を促す *ROOTHAIR DEFECTIVE 6 (RHD6)* の発現を直接抑制する役割を持っている (Lin et al., 2015) (図 1-2)。

根端の幹細胞の維持機構

シロイヌナズナの根端では、分裂活性が非常に低い静止中心 (Quiescent center; QC) を一層の幹細胞が取り囲み、幹細胞ニッチ (Stem cell niche; SCN) を形成している。QC よりも頂端側は、コルメラと側部根冠によって構成されており、QC と接しているコルメラ細胞は幹細胞として機能する。この幹細胞が不等分裂を行うと下側の娘細胞は分化コルメラ細胞になり、上側の娘細胞は幹細胞として維持される。分化コルメラ細胞は分裂しないため、コルメラ幹細胞 (Columella stem cell; CSC) は一層のみ維持される。

レーザー照射によって QC 細胞を消滅させると、それと接する幹細胞が分化を開始することから、QC は周囲の幹細胞を維持する役割を持つと考えられている (Berg et al., 1997)。CSC を維持する QC 由来の鍵因子として *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)* が報告されている (Pi et al., 2015)。*WOX5* の mRNA は QC で発現しているが、タンパク質は QC と CSC で観察されていることから、*WOX5* タンパク質は QC から CSC へ移動すると考えられている。*WOX5* の機能欠損変異体では、QC 特異的な遺伝子の発現が著しく低下するとともに、QC 細胞分裂頻度が上昇する。また未分化な CSC が観察されないことから、*WOX5* は QC 性と、幹細胞性の両方を制御する因子である

と考えられている。3xYFPを付加することでCSCへの移動を阻害した*WOX5*を*wox5*機能欠損変異体で発現させると、QC特異的な遺伝子発現は回復できるが、CSCの未分化性は相補できないことから、QC性は細胞自律的に、幹細胞性は細胞非自律的に制御されていると考えられる(Pi et al., 2015)。*WOX5*は、茎頂の幹細胞を制御する*WUSCHEL (WUS)*の近縁の転写因子である。*WOX5*と*WUS*は、プロモータースワップによる機能回復実験を行なうと、お互いの欠損変異体の表現型を回復することから、根端と茎頂の幹細胞制御には類似点があると考えられている(Sarkar et al., 2007)。

これまでの研究から、根端の幹細胞の維持には細胞周期のマスターレギュレーターである*CDK*の活性が重要であると考えられている。*CDK*をリン酸化することにより活性化する*CDK*活性化キナーゼを誘導的にロックダウンすると、細胞分裂が停止する前に幹細胞が分化することが報告されている(Umeda et al., 2000)。このことから、*CDK*活性は細胞周期制御だけでなく、幹細胞の未分化性を維持するのにも必要であることが考えられる(図1-3)。また、*CDK*の下流で細胞周期を制御している*RBR*も幹細胞性の維持に関与していることが知られている。*RBR*のロックダウン植物では、CSCの層数が増える(図1-3)。一方で、*RBR*の過剰発現体では逆に幹細胞が消失することから、*RBR*は幹細胞の分化を促していると考えられる(Wildwater et al., 2005) (図1-3)。

本研究の目的

以上のように根の表皮は2つの異なる細胞タイプで構成されており、それらは細胞間コミュニケーションにより、その細胞運命を厳密に制御している。また、コルメラ幹細胞の幹細胞性の維持にもQCとの細胞間コミュニケーションが必要不可欠である。興味深いことに根の表皮細胞は細胞タイプにより異なる分裂速度で増殖しており、コルメラ幹細胞の不等分裂は必ず分裂能を持たない分化コルメラ細胞を生み出す。したがって、根の表皮やコルメラ領域においては、細胞間コミュニケーションが細胞分裂活性の制御にも働いている可能性が考えられる。そこで本研究では、根の表皮細胞とコルメラ細胞の細胞分裂制御における細胞間コミュニケーションの役割を解析することにより、細胞移動ができない植物の組織形成に関して新たな制御系を見出すことを目的としている。

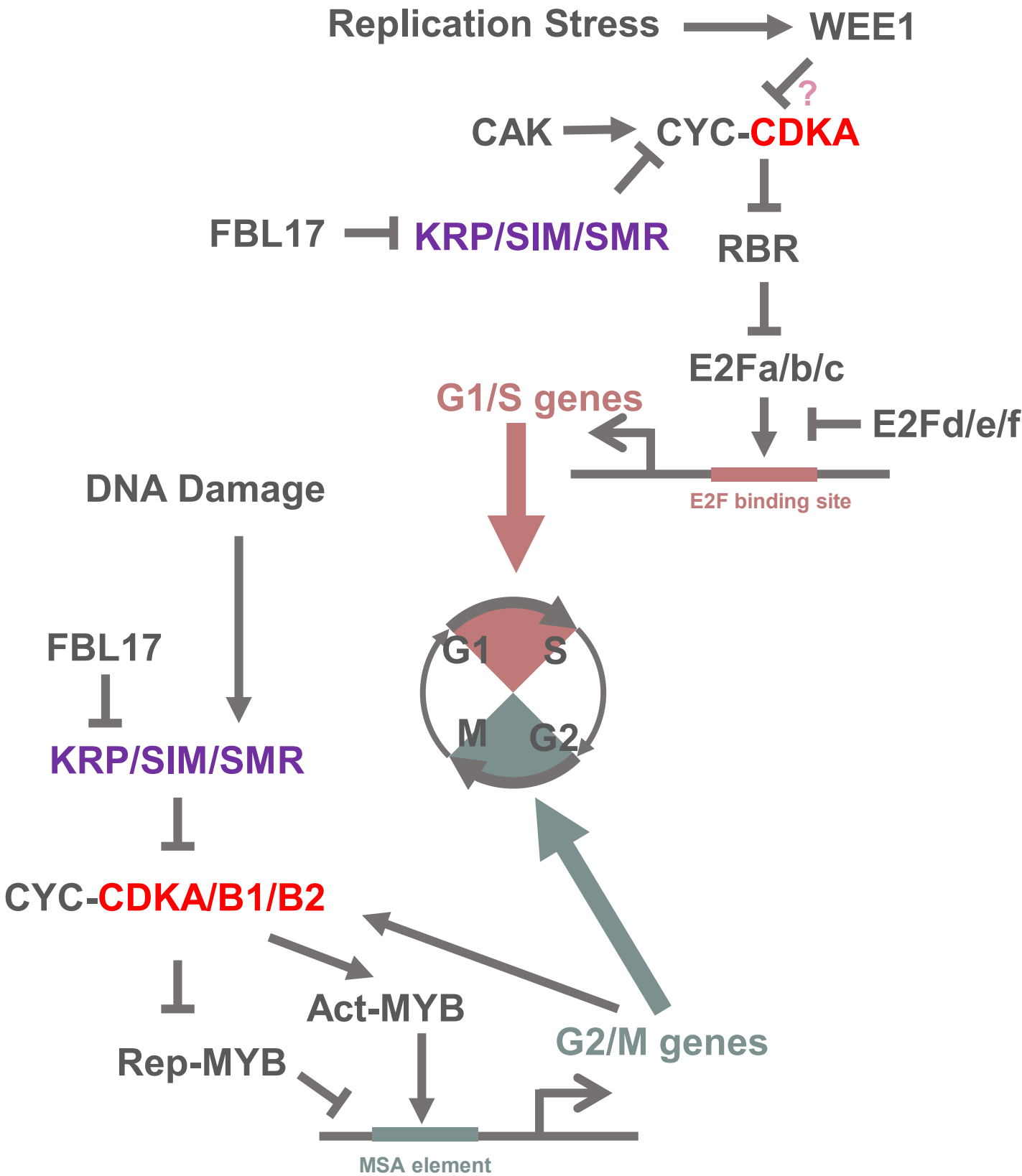
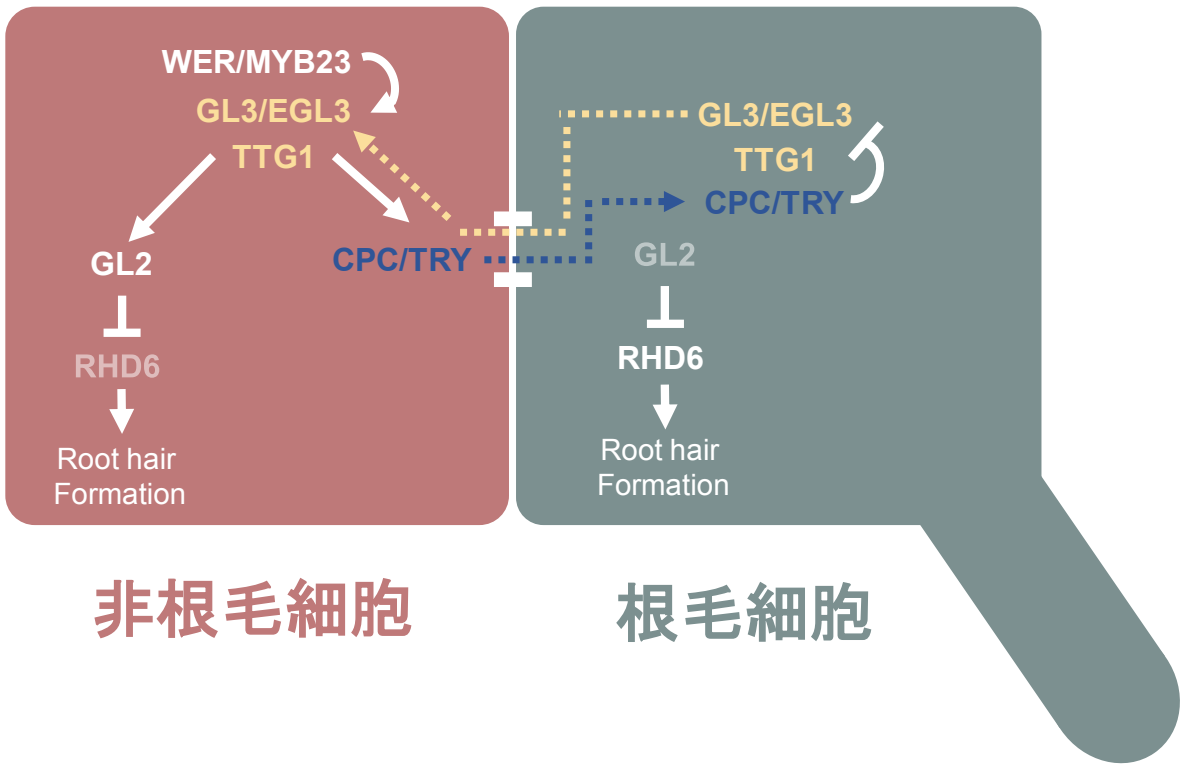


図1-1. 細胞周期進行制御の分子機構

G1/S期進行制御ではE2FとRBR、G2/M期進行制御ではAct-MYBとRep-MYBという、下流因子を共有した転写活性化因子と転写抑制因子が細胞周期進行を制御している。細胞周期のマスターレギュレーターであるCDKはリン酸化を介して転写抑制因子(RBRとRep-MYB)を阻害することで、細胞周期が正常に進行する。



非根毛細胞

根毛細胞

図1-2. 根の表皮細胞運命決定の分子機構

根の表皮の細胞運命決定過程においては、bHLH型転写因子をコードするGL3とEGL3が、WD40タンパク質であるTTG1、MYB型転写因子であるWERとMYB23と転写活性複合体を形成し非根毛細胞の運命獲得を促す。一方で、根毛細胞ではこの複合体のWERとMYB23がCPCとTRYに置き換わることで非活性型の複合体となり、根毛細胞の運命獲得に寄与する。青い点線はCPCおよびTRYの細胞間移行、黄色い点線はGL3およびEGL3の細胞間移行を示す。

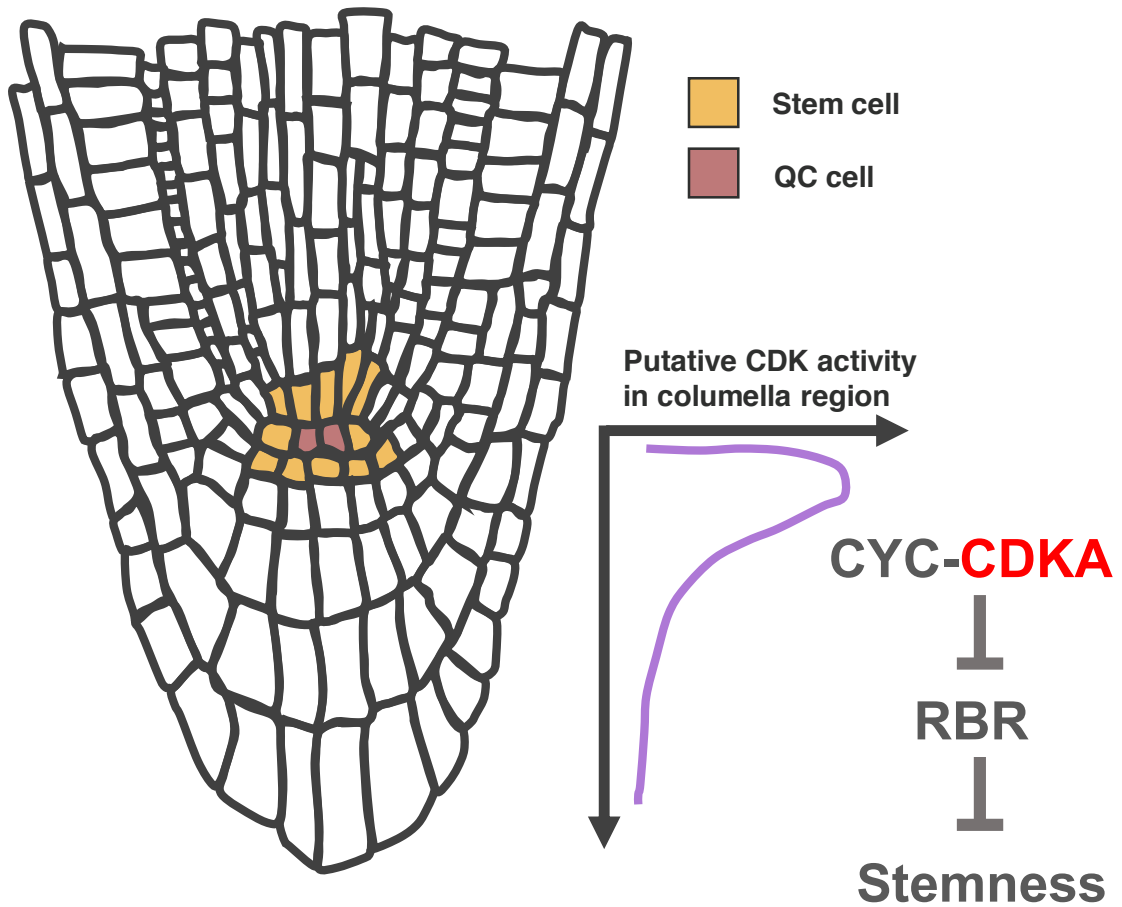


図1-3. CDK活性による幹細胞性の維持

根の幹細胞ニッチは幹細胞とQC細胞によって構成されている。幹細胞はQC細胞からシグナルを受け取ることで幹細胞性を維持している。また、幹細胞の維持においては、CDKはRBRをリン酸化し抑制することも重要であると考えられている。QC細胞と接している細胞のみが幹細胞としてふるまうことができることから、QC細胞からのシグナルによって高いCDK活性が維持されることで、幹細胞を維持していると予想されている。

第 2 章

細胞間コミュニケーションによる 根の表皮細胞の細胞周期制御

1. 序論

シロイヌナズナの根の表皮細胞の運命獲得には、細胞間コミュニケーションが重要である。まず、非根毛細胞の運命獲得に重要な転写因子 *GLABRA 3 (GL3)* と *ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3)* が、根毛細胞で転写・翻訳され、非根毛細胞へ移動する。そして、MYB 型転写因子である *WEREWOLF (WER)* または *MYB23*、*WD40* タンパクである *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)* と *MYB-bHLH-WD40* 複合体を形成し、*GLABRA 2 (GL2)* の発現を誘導することで、非根毛細胞の運命決定を行う (Masucci et al., 1996; Bernhardt et al., 2003; Griersona et al., 2014)。一方で、非根毛細胞では *MYB-bHLH-WD40* 複合体が *CAPRICE (CPC)* および *TRIPTYCHON (TRY)* の発現誘導を行い、その後、*CPC* と *TRY* タンパク質が根毛細胞へ移動する(図 1-4)。*CPC* と *TRY* タンパク質は *MYB-bHLH-WD40* 複合体の形成を阻害することにより、*GL2* の発現誘導を抑制し根毛細胞の運命決定を行う (Kirik et al., 2004)。

オーキシン排出輸送体 *PIN FORMED2 (PIN2)* の細胞膜上での蓄積量や液胞の蓄積するタイミングなど根毛細胞と非根毛細胞の違いは、根毛形成の有無のみではないことが報告されている (Lofke et al., 2013; Lofke et al., 2015)。また、非根毛細胞と比較して、根毛細胞の方が分裂領域の細胞数が多いことから、細胞分裂活性が高いことが示唆されている (Berger et al., 1998)。また、根毛細胞では並層分裂の頻度が増えているが、全ての表皮細胞が根毛細胞の運命を獲得する変異体では、非根毛細胞列に位置している細胞でも並層分裂の頻度が上昇することから。根毛細胞と非根毛細胞で異なる分裂制御がなされている可能性が示唆されている (Berger et al., 1998)。

以上のような、細胞間コミュニケーションを介した細胞運命の決定機構が働いている一方で、表皮の分裂領域では根毛細胞と非根毛細胞の分裂速度が異なることが報告されていることから、細胞間コミュニケーションが細胞分裂の制御にも関与することを示唆している。そこで本章では、シロイヌナズナの根の表皮における細胞周期進行の制御機構について解析を行った。

2. 材料と方法

(1) 植物材料および培養条件

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いた。野生型として、Col-0を用いた。*cpc try*変異体としてCS67760、*gl3 egl3*変異体としてCS67763、*gl2*変異体としてCS67762、*rhd6*変異体としてCS67771を用いた。細胞周期マーカーである *Cytrap* は Yin et al. (2014) と同じ株を用いた。*PCNA-GFP* は Yokoyama et al. (2016)と同じ株を用いた。*cyca2;2/3/4* 三重変異体は Vanneste et al. (2011)と同じ株を用いた。*pCYCB1;2:GFP* は Muller et al. (2002)と同じ株を用いた。*myb3r1/4* 変異体は Haga et al. (2007)と同じ株を用いた。*MYB3R3-GFP* および *myb3r1/3/5* 変異体は Kobayashi et al. (2013)と同じ株を用いた。本研究で用いた変異体は、表1に示したプライマーを用いてジェノタイピングを行った。*gl3 egl3*変異体、*gl2*変異体、*try*変異体は塩基置換による点変異であるため、表1に示した genotyping F および genotyping R を用いて各ゲノム領域を増幅した後に、genotyping seq により塩基配列を解析し、変異が導入されているのかを確認した。

MS 培地上に播種した後、2日間4℃の暗室で春化処理をし、5日間、23℃のバイオトロンで、培養した。また、ライブイメージングでは、MS 培地上に播種した後、2日間4℃の暗室で春化処理をし、4.5日間、23℃のバイオトロンで、角シャーレで培養した後に、ガラスボトムディッシュ(IWAKI カバーガラスチェンバー; カタログ No. 5202-001)に移植し、その後、23℃のバイオトロンで12時間培養したものをサンプルとして使用した。

(2) 植物の生育培地条件

MS 培地(1L)

ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類	4.6 g (1袋分)
ショ糖	10 g
1000x ビタミンストック液	1.0 mL
MES (pH 安定剤)	0.5 g

以上を 800 mL の蒸留水に加え、よく攪拌し、完全に溶かし KOH で pH を 6.3 に合わせた後、1 L に合わせた。そして、2個の 1 L 三角フラスコに 500 mL ずつ分注し、プレートにする際は、それぞれの培地に Phytigel を 2 g ずつ加えた。その後オートクレーブした。角型プレートに 80 ml ずつ分注した。ロスコビチン (Chemoscence)は 1 nM

になるように、MS 培地に添加した。

(3) 顕微鏡観察法

1) 表皮の分裂領域サイズの測定

0.01 mg/ml Propidium Iodide (PI)液で封入したシロイヌナズナの根を倒立型共焦点レーザー顕微鏡 FV1000(Olympus)の 20 倍対物レンズを用いて観察した。撮影した写真を Image J (NIH)を使用して解析した。表皮細胞の長さを測定し、隣接する細胞に比べ 150%以上長くなる表皮細胞を同定した。その細胞のすぐ下の細胞から QC までの長さを分裂領域サイズとした。

2) 表皮の分裂領域における M 期の細胞の観察

シロイヌナズナの根を 4 % (v/v) パラホルムアルデヒド (PFA)で 30 分間固定した後に、1 ng/ 1ml PAPI 液で封入し、倒立型共焦点レーザー顕微鏡 FV1000(Olympus)の 20 倍対物レンズを用いて観察した。撮影した写真を Image J (NIH)を使用して解析した。

3) ライブイメージングによる細胞周期マーカーの観察

ガラスボトムディッシュ内で培養した植物の根を倒立型共焦点レーザー顕微鏡 FV1000(Olympus)の 40 倍対物レンズを用いて観察した。30 分に 1 枚、計 48 時間、根端の写真を撮影した。撮影した写真は Image J(NIH)を使用して解析した。

(4) EdU 染色

EdU 染色は Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Invitrogen) lot:1023575 を使用し、在中していたプロトコールに従って行った。EdU 染色したサンプルは、倒立型共焦点レーザー顕微鏡 FV1000(Olympus)の 40 倍対物レンズを用いて観察した。撮影した写真は Image J(NIH)を使用して解析した。

(5) qRT-PCR

Plant Total RNA Mini Kit (Favorgen) を用いて RNA を抽出した後、0.5 μ g の RNA から、ReverTra Ace[®] (Toyobo) を用いて cDNA を合成した。qRT-PCR は、合成した cDNA に THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) および表 2 に示したプライマーを混合し、Light Cycler 480 Real-Time PCR system (Roche) により反応および解析を行った。

プライマー名	配列 (5'→3')
gl2-1 genotyping F	AAGAACGGCACGAGAACTCC
gl2-1 genotyping R	AGGCCCCGATGATCTCCACC
gl2-1 genotyping seq	AATCGAGAGAGCCGAGACGG
try genotyping F	TCGTTAAAACGAGGGATACG
try genotyping R	TATTTTATGCTGGGATAATC
try genotyping seq	TAGTTACACCTCGTGCTGAC
gl3 genotyping F	ACTAGGGCAAATTCAAGAGC
gl3 genotyping R	TGACGATGATTTCTTCCACC
gl3 genotyping seq	AAACGACGACGTTTATTACC
egl3 genotyping F	CGTTTGTTTGTACATGGGG
egl3 genotyping R	ATTACGAGATTGTACCCTGG
egl3 genotyping seq	CGGTGCCGGACAATCTAAAG
cpc-1 LP	TCTTGTGAATTAAGGAGAGG
cpc-1 RP	CTTTATGCGGTTTTTATCGG
rhd6-1 LP	AACATCAATGTTGGCGAAAAC
rhd6-1 RP	TTTGCGGGAGATTTATGATTG
myb3r1 LP	AACACCCAATATCCTGGGAAG
myb3r1 RP	GAGACTTGCTTTCACCTGTGC
myb3r3 LP	CAGCTCTTGCCTTTAAACGTG
myb3r3 RP	AAGTAACGGTGTGACGTCAGC
myb3r4 LP	GCCAGTCTTGTTTTGAAATAGCTC
myb3r4 RP	GAGGCACTGGACATCAGTTCGATC
myb3r5 LP	TTACACCGAACTCATTTTGGG
myb3r5 RP	CCATTTGTTTCCGTACATTTCG
SALK_LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

表 1. プライマー配列一覧

本研究で用いたジェノタイプング用のプライマー配列を示す。

プライマー名	配列 (5'→3')
TRY qRT F	GTGAGCAGTATCGAATGGGAGT
TRY qRT R	CACCGACAAGTCTGTACATTCG
RHD6 qRT F	TCACGAGAGCTTTCCTCCTC
RHD6 qRT R	TGAAGCCGTAGCTCATGTTG
GL3 qRT F	TCGGTTCGTTTGGTAATGAGG
GL3 qRT R	GCTTGCAATTGACGGTTAAGC
EGL3 qRT F	GGAAGACGATTCAAGCAGCA
EGL3 qRT R	GGATTCAGCGAGGGAGAGAG
qGL2 F	ATGAAGCTCGTCGGCATGAGTGGG
qGL2R	TGGATTGCCACTGAGTTGCCTCTG
qActin2 F	GGCTCCTCTTAACCCAAAGGC
qActin2 R	CACACCATCACCAGAATCCAGC

表 2. プライマー配列一覧

本研究の qRT-PCR で用いたプライマー配列を示す。

3. 結果

(1) 根毛細胞と非根毛細胞の細胞周期の長さは異なる

シロイヌナズナの根端は、分裂領域で細胞分裂を数回繰り返す、その後、分裂領域を脱した細胞は細胞伸長を始める。過去の報告では、根毛細胞列の方が非根毛細胞列よりも分裂領域サイズが大きいことから、根毛細胞の方が、有糸分裂が活発に行われていると考えられている(Burger et al., 1998)。そこでまずこの点を確認するために、発芽後 5 日目の野生型植物の根毛細胞列と非根毛細胞列の分裂領域サイズの比較を行った。Propidium Iodide (PI)染色を用いて細胞を可視化し、QC から最初に細胞サイズが接している頂端側の細胞よりも 2 倍以上急激に増大する領域までを分裂領域と定義し、分裂領域のサイズを測定した (Takahashi et al., 2013; Takatuka et al., 2018)。その結果、根毛細胞と非根毛細胞の分裂領域サイズはそれぞれ $352.9 \pm 26.2 \mu\text{m}$ 、 $237.5 \pm 34.1 \mu\text{m}$ だったことから、過去の知見と一致しており、非根毛細胞よりも根毛細胞の方が、分裂領域が大きいことがわかった(図 3-1A,B)。

次に DAPI 染色を行い、根毛細胞と非根毛細胞の M 期の細胞の出現頻度を比較した。DAPI 染色により核を可視化すると、間期の細胞では球状の核が観察されるが、M 期の核は mitotic figure と呼ばれる凝縮した染色体構造を示すことが知られている (Yin et al., 2016)。分裂領域全体で観察される mitotic figure の数を計測した結果、非根毛細胞列よりも根毛細胞列の方が M 期の細胞の出現頻度が高いことが明らかになった(図 3-1 C,D)。そこで次に、G2/M 期の細胞を可視化することができる *pCYCB1;2:NT-YFP* を用いてライブセルイメージングを行い、細胞分裂頻度を比較した。同じ植物体の根を自動追尾し、15 分に一枚の頻度で画像を取得した。一細胞列内で一時間あたりに分裂した細胞数を計測した結果、根毛細胞列では 1.5 個、非根毛細胞列では 0.5 個の細胞が分裂していることがわかった(図 3-1 E)。以上の結果から、非根毛細胞よりも根毛細胞の方が、細胞分裂周期が短いことがわかった。

次に、根毛細胞と非根毛細胞の細胞周期一周にかかる時間を明らかにするために、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)の取り込み実験を行った。EdU はチミジンのアナログであり、S 期の細胞に取り込まれる。したがって、EdU 処理を行い経時的に EdU を取り込んだ細胞の数を計測した際に、その増加率(近似線の傾き)は、単位時間あたりにどれくらいの割合で G1 期から S 期へ進行したのかを示す。細胞周期一周の進行速度が速い場合は、単位時間内に多くの細胞が S 期へ進行し、細胞周期進行が遅い場合は、S 期へ移行する細胞数が少なくなる。故に、EdU を取り込んだ細胞の増加率は細胞周期の進行速度に比例していると考えられている(Hayashi et al., 2013)。EdU 処理後、経時的にサンプリングして各時間での根毛・非根毛細胞列中の S 期の細胞の割合を調べ、回

帰直線の傾きを算出した。その結果、根毛細胞列と非根毛細胞列の回帰直線の傾きはそれぞれ 9.2 と 6 であり、根毛細胞列の方が有意に大きかった (図 3-2)。このことから、根毛細胞列よりも非根毛細胞列の方が、細胞周期一周の長さが長いことが示唆された。

根毛細胞と非根毛細胞の細胞周期速度の差を確認するために、T-clone 解析を行った。一つの根毛細胞が並層分裂することによって二つの細胞を生み出す場合、娘細胞の一つは根毛細胞(2 つの皮層細胞と接する)に、もう一つは非根毛細胞(1 つの皮層細胞と接する)になる。これら根毛細胞及び非根毛細胞は垂層分裂を行い、それぞれの細胞列を形成する。このように、同一の根毛細胞を起源を持った根毛・非根毛細胞のクラスターを T-clone と呼ぶ(図 3-3A)。最初に根毛細胞が並層分裂した後、娘細胞である根毛細胞と非根毛細胞は同時に垂層分裂を開始するため、T-clone 内の根毛細胞と非根毛細胞の数の割合は、細胞周期進行に依存する。そこでその割合を実際に計測したところ、根毛細胞の方が非根毛細胞と比較して 1.5 倍細胞数が多いことが明らかとなった(図 3-3B)。この結果は、根毛細胞の方が細胞周期の進行速度が速いという EdU の取り込み実験の結果を支持するものである。

(2) 根毛細胞と非根毛細胞では G2 期の長さが異なる

根毛細胞と非根毛細胞の間で細胞周期進行速度が異なるのは、どの細胞周期ステージの進行の違いによるのかを明らかにするために、細胞周期マーカーである *PCNA-GFP* を用いてライブセルイメージングを行った(Yokoyama et al., 2016)。*PCNA-GFP* は細胞周期のステージによって核内での局在パターンが変化する。G1 期では核全体に満遍なく局在し、S 期前期では核内で小さな Foci を形成する。その後、S 期後期ではクロモソームに局在し、G2 期では再び核全体に満遍なく局在する。また、M 期には発現が消失する。このような核内での局在パターンをライブセルイメージングによって観察することで各細胞周期ステージを特定し、それぞれの長さを測定することができる(図 3-4 A)。根毛細胞と非根毛細胞の各細胞周期ステージの長さを定量した結果、G2 期のみ長さが異なり、非根毛細胞の G2 期は根毛細胞より長いことがわかった(図 3-4 B)。

根毛細胞と非根毛細胞の G2 期の長さの差をさらに確認するために、EdU パルス実験を行なった。EdU を短時間(30 min)処理することで、その間に S 期にいた細胞を標識することができる。その後、EdU を含まない培地で培養することで、EdU で標識された細胞が G2 期を通過し、M 期へ突入する。M 期の細胞は mitotic figure で判別することができるので、EdU 標識された mitotic figure が最初に観察されるまでの時間が理

論的には G2 期の長さに相当する(Otero et al., 2010)。野生型植物を用いて EdU パルス処理後、経時的にサンプリングして EdU で標識された mitotic figure の出現頻度を測定した。その結果、根毛細胞では、EdU パルス処理 3 時間後に、非根毛細胞では 5 時間後に EdU で標識された mitotic figure が観察された(図 3-5)。このことから、非根毛細胞の方が根毛細胞よりも G2 期の長さが長いことを確認することができた。

(3) 根毛細胞と非根毛細胞では、Rep-MYB タンパク質の蓄積様式が異なる

G2 期の長さを決める要員として、G2 期後期に発現する G2/M 期特異的遺伝子群による M 期への進行制御が考えられる(Kobayashi et al., 2013)。G2/M 特異的遺伝子である B1 型サイクリン *CYCB1;2* は G2 期後期から発現し、M 期中期にタンパク質分解を受ける。そこでまず、*CYCB1;2* のプロモーター領域と第一イントロンまでを含むゲノム領域の 5' 末端側に *YFP* を付加した *pCYCB1;2:NT-YFP* を発現する植物を用いてライブセルイメージングを行った。その結果、*pCYCB1;2:NT-YFP* の蛍光を発する時間は根毛細胞、非根毛細胞とも約 1.5 時間であり、有意な差は見られなかった(図 3-6A,B)。このことから、G2 期後期における G2/M 期特異的遺伝子の発現開始以降は、根毛細胞と非根毛細胞の間で細胞周期の進行に差がないことが示された。

シロイヌナズナにおいては G2/M 特異的遺伝子群の発現は、活性化型 MYB3R(Act-MYB)と抑制型 MYB3R(Rep-MYB)の二種類の転写因子によって制御されている(Haga et al., 2007; Kobayashi et al., 2013)。G2/M 期特異的遺伝子の多くはプロモーター上に MSA エlement と呼ばれるシス配列を有しており、このシス配列に Act-MYB または Rep-MYB が結合し、発現を促進または抑制する(Haga et al., 2007; Kobayashi et al., 2013)。根毛細胞と非根毛細胞では G2/M 特異的遺伝子の発現開始以降に細胞周期進行の差は見られなかったが、発現開始のタイミングに差があり、それが G2 期の長さの違いを生み出す要因となっている可能性が考えられる。そこで、G2/M 期特異的遺伝子群の発現制御に関わる Act-MYB と Rep-MYB のタンパク質蓄積を解析するために、*MYB3R4(Act-MYB)* と *MYB3R3(Rep-MYB)* の GFP 融合タンパク質マーカーである *pMYB3R4:MYB3R4-GFP* と *pMYB3R3:MYB3R3-GFP* のライブイメージングを行った。

分裂領域内の根毛細胞と非根毛細胞を無作為に選び、GFP 蛍光を 30 分間隔で経時的に観察した。その結果、*MYB3R4-GFP* の蛍光を発する時間は根毛細胞、非根毛細胞両者ともに核分裂 2 時間前に発現が誘導され、M 期の核分裂終了後に GFP の蛍光が観察されなくなった(図 3-7A)。このことから、Act-MYB は根の表皮細胞タイプ特異的な制御を受けておらず、表皮細胞タイプ間の細胞周期の差を生み出す要因にはなっていないことが示唆された。

一方で、MYB3R3-GFP を 30 分間隔で観察し、核分裂から次の核分裂の間(細胞周期が一周する間)での MYB3R3-GFP の挙動を観察した結果、MYB3R3-GFP の蓄積は核分裂終了後に急激に上がり、その後細胞周期進行とともに徐々に減少していった(図 3-7 B)。興味深いことに、根毛細胞よりも非根毛細胞においてタンパク質の蓄積が減少し始めるタイミングが遅かった(図 3-7 B)。そこで次に、細胞周期マーカーである *pPCNA:PCNA-tdTomato* と *pMYB3R3:MYB3R3-GFP* を掛け合わせ、細胞周期の各ステージでの MYB3R3-GFP の蛍光量について調べた。その結果、非根毛細胞では G2 期開始直前まで MYB3R3-GFP の蛍光量が維持されており、G2 期の開始後から徐々に GFP 蛍光量が減少していた(図 3-7 C)。一方で、根毛細胞内では、G2 期開始前から既に蛍光量の減少が始まっていた(図 3-7 C)。以上のことから、根毛細胞と非根毛細胞では Rep-MYB のタンパク質量が減少し始めるタイミングが異なり、非根毛細胞においてはそのタイミングが遅いために G2/M 期特異的遺伝子群の発現抑制が解除されず、G2 期から M 期への移行が遅れている可能性が示唆された。

(4) Rep-MYB は非根毛細胞の細胞周期進行の遅延に関与している

MYB3R が、根毛細胞と非根毛細胞の間の細胞周期の長さを生み出す原因となっているかを明らかにするために、*Act-MYB* の機能欠損変異体である *myb3r1/4* 二重変異体と *Rep-MYB* の機能欠損変異体である *myb3r1/3/5* 三重変異体の表現型観察を行った。まず、発芽後 5 日目の植物体の分裂領域サイズを観察した結果、*myb3r1/4* 二重変異体では根毛細胞と非根毛細胞の分裂領域サイズがそれぞれ $328.1 \pm 54.3 \mu\text{m}$ 、 $216.6 \pm 39.3 \mu\text{m}$ であり、野生型と同程度であった(図 3-8 A,B)。また、T-clone 解析を行った結果、こちらも野生型と同様に、T-clone 内の根毛細胞の数は非根毛細胞よりも 1.5 倍細胞数が多いことが明らかになった(図 3-9 A,B)。そこでさらに細胞周期の長さの差を定量的に示すために、EdU の取り込み実験を行なった。EdU 処理開始後 1、2、3、6 時間目の取り込み率を用いて回帰分析を行い、回帰直線の傾きを算出したところ、野生型の根毛細胞および非根毛細胞の値がそれぞれ 9.2、6 であったのに対して、*myb3r1/4* 二重変異体内の根毛細胞および非根毛細胞の回帰直線の傾きはそれぞれ 6.5、4.1 であった(図 3-10 A,B)。*myb3r1/4* 二重変異体では両細胞タイプともに EdU を取り込んだ細胞の増加率が有意に減少していたことから、全細胞で細胞周期進行が遅延していることが示唆された(図 3-10 A,B)。しかしながら、*myb3r1/4* 二重変異体の根毛細胞と非根毛細胞の間で比較した結果、EdU を取り込んだ細胞の増加率には有意な差が見られた(図 3-10 A,B)。以上の結果から、*Act-MYB* は根毛細胞・非根毛細胞間の細胞周期の差を生み出す要因にはなっていないことが示唆された。

次に *myb3r1/3/5* 三重変異体の根毛細胞の分裂領域サイズを測定したところ、 $350.4 \pm 26.0 \mu\text{m}$ と野生型と有意な差が見られなかったが、非根毛細胞の分裂領域サイズは $344.3 \pm 39.3 \mu\text{m}$ であり、根毛細胞と同程度のサイズまで増大していた(図 3-8 A,B)。また、T-clone 解析でも、*myb3r1/3/5* 三重変異体の T-clone 内では根毛細胞と非根毛細胞の細胞数に差が無くなっていた(図 3-9 A,B)。そこで *myb3r1/3/5* 三重変異体で、非根毛細胞の細胞周期の長さが変化しているかどうか調べるために、EdU の取り込み実験を行なった。その結果、*myb3r1/3/5* 三重変異体の根毛細胞と非根毛細胞の回帰直線の傾きはそれぞれ 9.4 と 9.5 であり、どちらも野生型の根毛細胞の傾き(9.2)と比べて有意な差は見られなかった(図 3-10 A,C)。これらの結果から、*myb3r1/3/5* 三重変異体では非根毛細胞の細胞周期の長さが根毛細胞と同レベルまで短くなっていることが明らかとなった。したがって、非根毛細胞では Rep-MYB が細胞周期の進行遅延の要因となっていることが示唆された。

(5) 非根毛細胞における細胞周期の進行の遅延は *GL3* および *EGL3* により制御されている

GL3 と *EGL3* は根毛細胞(2つの皮層細胞と接している表皮細胞)で特異的に発現が誘導され、そのタンパク質がプラズモデスマータを介して非根毛細胞(1つの皮層細胞と接している表皮細胞)へ移動する。非根毛細胞において、*GL3* と *EGL3* はパートナー因子と転写活性型複合体を形成し、標的遺伝子の発現を誘導することによって、非根毛細胞としての細胞運命を決定する(Wang et al., 2010)。そこで *GL3* と *EGL3* が根毛・非根毛細胞間の細胞周期進行の違いを生み出す要因となっているかどうか調べるために機能欠損変異体である *gl3 egl3* 二重変異体と、*GL3* と *EGL3* が全ての表皮細胞で活性化している *cpc try* 二重変異体を用いて表現型観察を行った。まず、根の分裂領域を観察した結果、*gl3 egl3* 二重変異体では、根毛細胞列(2つの皮層細胞と接している表皮細胞)と非根毛細胞列(1つの皮層細胞と接している表皮細胞)の分裂領域サイズがそれぞれ $341.8 \pm 43.8 \mu\text{m}$ 、 $341.4 \pm 33.6 \mu\text{m}$ で、両者ともに野生型の根毛細胞列と比べて有意な差が見られなかった(図 3-11 A,B)。

一方で、全ての表皮細胞が非根毛細胞の運命を獲得している *cpc try* 二重変異体では、根毛細胞列と非根毛細胞列の分裂領域サイズはそれぞれ $239.7 \pm 38.4 \mu\text{m}$ 、 $234.8 \pm 27.4 \mu\text{m}$ であり、両者ともに野生型の非根毛細胞列と比べて有意な差が見られなかった(図 3-11 A,B)。次に、T-clone 解析を行ったところ、*gl3 egl3* 二重変異体や *cpc try* 二重変異体では、T-clone 内の非根毛細胞数と根毛細胞数の間に有意な差は見られなかった(図 3-12 A,B)。これらの結果から、*GL3* と *EGL3* が非根毛細胞の分裂速度の制御

に關与していることが示唆された。

そこで次に EdU の取り込み実験を行い、表皮の二種類の細胞タイプ間で細胞分裂速度の比較を行った。EdU の取り込み率をもとに回帰直線の傾きを算出した結果、*gl3 egl3* 二重変異体では根毛細胞列と非根毛細胞列の回帰直線の傾きがそれぞれ 8.1、8.4 であり、有意な差は見られなかった(図 3-13 A, B)。また、両者ともに野生型の根毛細胞と有意な差が見られなかった(図 3-13 A, B)。一方で *cpc try* 二重変異体では、根毛細胞列、非根毛細胞列の回帰直線の傾きはそれぞれ 5.2、5.4 であり、野生型の非根毛細胞と有意な差が見られなかった(図 3-13 A, B)。

次に、細胞周期マーカーである *PCNA-GFP* を *gl3 egl3* 二重変異体に導入し、非根毛細胞と根毛細胞の細胞周期の各ステージの長さを定量した。その結果、前述のように野生型では根毛細胞よりも非根毛細胞は長い G2 期を有していたのに対し、*gl3 egl3* 二重変異体では両細胞タイプで G2 期の長さに有意な差が見られず、非根毛細胞でも野生型の根毛細胞と同様に短い G2 期であることがわかった (図 3-14)。このことから、*GL3* と *EGL3* は非根毛細胞の G2 期を制御することで細胞周期を遅延させていることが示唆された。

以上の結果から、表皮細胞の運命決定の鍵を握る *GL3* と *EGL3* が非根毛細胞において細胞周期進行を遅延させる働きをもつことが示唆された。根毛細胞では *CPC* および *TRY* が *GL3* と *EGL3* の活性を抑制しているために、細胞周期進行の遅延が抑えられていると考えられる。

(6) *GL3* および *EGL3* は *GL2* 経路とは別経路で細胞周期を制御する

非根毛細胞では、活性化した *GL3* および *EGL3* が *GL2* の発現を直接誘導し、*GL2* が *RHD6* のプロモーターに結合してその発現を抑制することにより、非根毛細胞としての細胞分化を決定する。一方で、根毛細胞では *GL2* が発現していないため、*RHD6* の発現が誘導され根毛を形成する。そこで次に、*GL2* を介した表皮細胞の運命決定に関わる経路が細胞周期進行の制御にも關与しているのかを調べるために、機能欠損変異体である *gl2* 変異体と *rh6* 変異体の表現型観察を行った。

gl2 変異体では、*gl3 egl3* 二重変異体と同様に、全ての細胞から根毛が形成されることが報告されている(Bernhardt et al., 2003)。一方で *rh6* 変異体では、*cpc try* 二重変異体と同様に、根毛が全く形成されない(Hwang et al., 2017)。まず、分裂領域を観察した結果、*gl2* 変異体では根毛細胞列と非根毛細胞列の分裂領域サイズはそれぞれ $356.6 \pm 34.3 \mu\text{m}$ 、 $241.5 \pm 28.5 \mu\text{m}$ と野生型と同様であった(図 3-15 A, B)。また、*rh6* 変異体でも、根毛細胞列と非根毛細胞列の分裂領域サイズはそれぞれ $343.2 \pm 23.8 \mu\text{m}$ 、 $233.3 \pm$

33.3 μm と野生型と有意な差は見られなかった(図 3-15 A,B)。T-clone 解析を行ったところ、*gl2* 変異体、*rhd6* 変異体ともに T-clone 内の根毛細胞数は非根毛細胞の方が 1.5 倍多く、野生型と有意な差が見られなかった(図 3-16 A,B)。

さらに、EdU の取り込み率をもとに回帰直線の傾きを算出したところ *gl2* 変異体と *rhd6* 変異体の根毛細胞の回帰直線の傾きはそれぞれ 9.2 と 9.0 で、非根毛細胞では 6.6 と 6.0 であり、どちらも野生型と有意な差は見られなかった(図 3-17 A,B)。

また、細胞周期マーカーである *PCNA-GFP* を *gl2* 変異体に導入し、非根毛細胞と根毛細胞の細胞周期の各ステージの長さを定量した。その結果、根毛細胞、非根毛細胞ともに野生型と有意な差が見られなかった(図 3-18)。

以上の結果から、GL2-RHD6 経路は細胞周期進行の制御には関与しておらず、*GL3* および *EGL3* は GL2-RHD6 経路とは別経路で細胞周期進行を制御していることが示唆された。

(7) *GL3/EGL3* は非根毛細胞における Rep-MYB のタンパク質蓄積を制御する

上記のように、非根毛細胞では Rep-MYB タンパク質の蓄積が減少し始めるタイミングが遅れるため、G2/M 期特異的遺伝子群の発現誘導が遅れ、G2 期から M 期への進行遅延、ひいては G2 期の遅延が起こることが示唆された。また、*GL3* と *EGL3* がこの G2 期の延長を制御していることも明らかになった。そこで次に *GL3* と *EGL3* が Rep-MYB を介して G2 期の制御を行っているかどうかについて解析した。

まず、*GL3* と *EGL3* が *Rep-MYB* の mRNA 量を制御しているかどうか確かめるために、*gl3 egl3* 二重変異体と *cpc try* 二重変異体から単離した表皮に対して行われたマイクロアレイ解析のデータを確認した(Bruex et al., 2012)。その結果、*Rep-MYB* をコードする *MYB3R3* の転写産物量は両変異体間で差がないことがわかった(図 3-19)。この結果から、*MYB3R3* の mRNA レベルの発現は *GL3* および *EGL3* による制御を受けていないことが示唆された。

そこで次に、*Rep-MYB* のタンパク質マーカーである *pMYB3R3:MYB3R3-GFP* を *gl3 egl3* 二重変異体に導入し、ライブセルイメージングを行った。前述のように野生型では、非根毛細胞で *MYB3R3-GFP* の蓄積低下のタイミングが根毛細胞より遅れていた。それに対し、*gl3 egl3* 二重変異体では、根毛細胞での *MYB3R3-GFP* の安定化は見られず、根毛細胞と同様な挙動を取っていた(図 3-20)。この結果から、*GL3* と *EGL3* は非根毛細胞における Rep-MYB の蓄積低下の遅延に関与していることが明らかになった。

(8) CDK 活性の差が表皮細胞タイプ特異的な細胞周期進行の原因である

Rep-MYB タンパク質は CDK によってリン酸化されることで、分解に導かれる(Chen et al., 2017)。上述のように、非根毛細胞内における Rep-MYB タンパク質の安定化には *GL3* と *EGL3* が関与していることから、*GL3* と *EGL3* が CDK 活性を制御することで、Rep-MYB タンパク質の安定性制御を行っている可能性が考えられる。そこでまず、*GL3* および *EGL3* が CDK 活性を介して G2 期の制御を行っているかどうかについて解析した。

細胞周期マーカー *PCNA-GFP* をもつ植物に CDK の阻害剤であるロスコビチン処理を行った。ロスコビチンは G1/S 期移行または G2/M 期移行を制御する CDK の活性を阻害すると考えられている(Planchais et al., 1997)。ロスコビチンを低濃度 10 nM で処理し、細胞周期の各ステージの長さを定量したところ、根毛細胞の G2 期が長くなっており、非根毛細胞との差がなくなっていた(図 3-21A)。非根毛細胞においては、ロスコビチン処理により G2 期の長さは変化しないことから、ロスコビチン処理は根毛細胞の G2 期進行のみに影響を与えたと考えられる(図 3-21B)。

次に、*PCNA-GFP* を *gl3 egl3* 二重変異体に導入して、同様な実験を行なった結果、ロスコビチン処理により根毛細胞、非根毛細胞ともに G2 期が遅延しており、野生型の非根毛細胞との差が無くなった(図 3-22)。これらの結果から、非根毛細胞において *GL3/EGL3* は CDK 活性を抑制することにより G2 期進行を遅延させること、また根毛細胞では高い CDK 活性が非根毛細胞よりも早い G2 期進行を実現していることが示唆された。

次にこの仮説をさらに検証するために、G2/M 期サイクリンをコードする *CYCLIN A2* ファミリーの機能欠損変異体を用いた解析を行なった。4 種類ある *CYCLIN A2* のうち 3 つが欠損した *cyca2;2/3/4* 三重変異体の分裂領域サイズの観察を行った結果、根毛細胞列と非根毛細胞列の分裂領域サイズはそれぞれ $235.4 \pm 22.3 \mu\text{m}$ 、 $232.9 \pm 33.5 \mu\text{m}$ であり、両者共に野生型の非根毛細胞と有意な差は見られなかった(図 3-23 A,B)。このことから、*CYCLIN A2* が非根毛細胞と根毛細胞の細胞周期の長さの差を生み出す要因の一つとなっていることが示唆された。そこで次に、EdU の取り込み実験を用いて、*cyca2;2/3/4* 三重変異体の根毛細胞と非根毛細胞の細胞周期の長さを比較した結果、根毛細胞と非根毛細胞の回帰直線の傾きはそれぞれ、5 と 4.7 であり、野生型の非根毛細胞と比べて有意な差は見られなかった(図 3-24)。以上の結果から、*CYCLIN A2* は根毛細胞における高い CDK 活性を維持し、非根毛細胞よりも早い細胞周期進行を実現するのに機能していると考えられる。

(9) *myb3r1/3/5* 変異体では、非根毛細胞での根毛形成率が増加する。

非根毛細胞で細胞周期の進行遅延が起こる生理的意義を理解するため、過去に報告されている *myb3r1/3/5* 三重変異体の植物体全体を用いたマイクロアレイ解析のデータを用いて、根の表皮のマーカー遺伝子の発現を調べた(Kabayashi et al., 2013)。その結果、根毛細胞特異的に発現している *EGL3* や *RHD6* は有意に発現が上昇していた(図 3-25A)。一方で、非根毛細胞特異的に発現している遺伝子では、*GL2* の発現が上昇していたものの、*CPC* や *TRY* の発現は野生型との差が見られなかった(図 3-25A)。しかし、このデータセットは、*myb3r1/3/5* 三重変異体の植物体全体から抽出した RNA を用いて取得しているため、*GL2* のような根の表皮以外でも発現している遺伝子では、根の表皮細胞の運命決定について議論するのが難しい。そこで次に過去に報告されている根毛細胞特異的遺伝子群と非根毛細胞特異的遺伝子群に着目して、*myb3r1/3/5* 三重変異体における発現量を調べた(Bruex et al., 2012)。その結果、根毛細胞特異的遺伝子群は全体的に *myb3r1/3/5* 三重変異体で発現が高い傾向であった(図 3-25B)。一方で、非根毛細胞特異的遺伝子群では、発現が野生型より低い遺伝子と高い遺伝子が混ざっていた(図 3-25B)。このことから、*myb3r1/3/5* 三重変異体では根毛細胞の数が増加している可能性が示唆された。

そこで *myb3r1/3/5* 三重変異体の根の分化領域を観察し、根毛細胞列(2つの皮層細胞と接している表皮細胞)と非根毛細胞列(1つの皮層細胞と接している表皮細胞)のそれぞれ根毛を形成している細胞の割合を調べた。その結果、野生型の根毛細胞列ではほとんどの細胞は根毛を形成しており、8.5%の細胞が根毛を形成していなかった(図 3-26)。一方で、野生型の非根毛細胞列では、ほとんどの細胞は非根毛細胞であったのに対して、4.8%の細胞は根毛を形成していた。G2/M 期に異常が生じる変異体を用いて同様な解析を行った結果、*myb3r1/4* 二重変異体や *cyca2;2/3/4* 三重変異体では野生型と同様な根毛形成パターンが観察されたが、非根毛細胞の分裂速度が速い *myb3r1/3/5* 三重変異体においては、非根毛細胞列で異所的に根毛が形成される割合が、28.5%に上昇していた(図 3-26)。そこで、次に *myb3r1/3/5* 三重変異体での異所的な根毛細胞の出現頻度の上昇が根端の分裂領域の時点で生じているのかを調べるために、野生型植物および *myb3r1/3/5* 三重変異体の根端から 5 mm に位置する分裂領域から抽出した RNA を用いて定量 PCR を行い、分裂領域における根毛細胞と非根毛細胞特異的に発現している遺伝子の発現量について確認した。その結果、非根毛細胞特異的に発現している遺伝子である *GL2* や *CPC* や *TRY* の発現は野生型との差が見られなかった。一方で、根毛細胞特異的に発現している遺伝子では、*GL3* や *EGL3* の発現は有意

に上昇していた(図 3-27)。この結果から、非根毛細胞の分裂速度を抑えることがその細胞運命を維持するのに重要であることが示唆された。

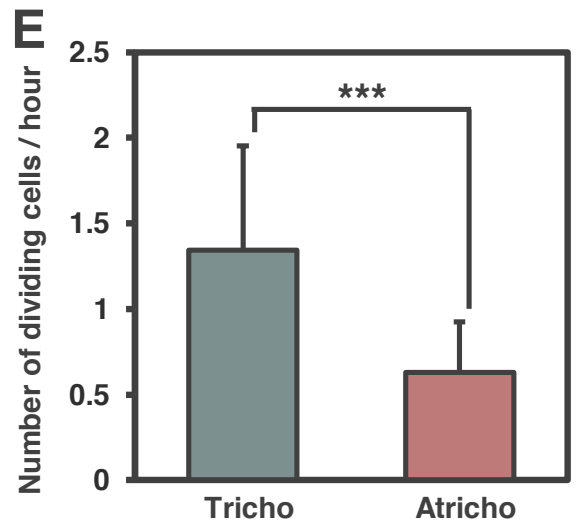
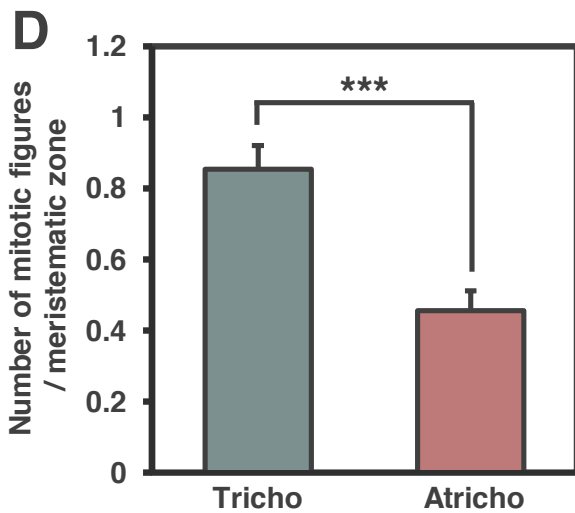
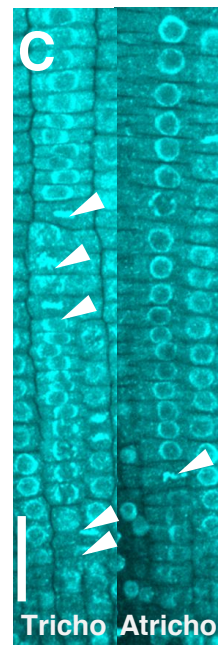
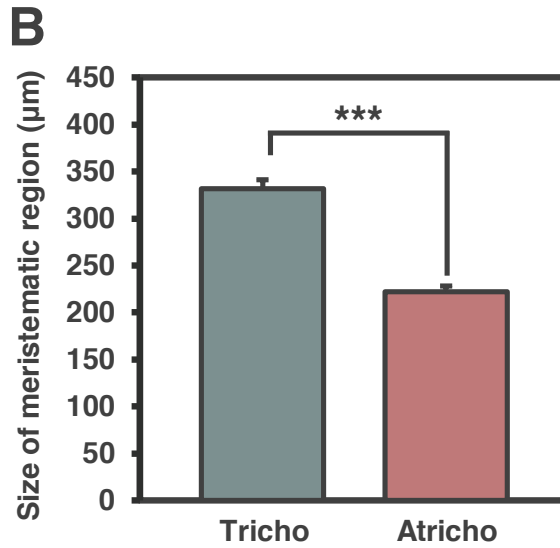
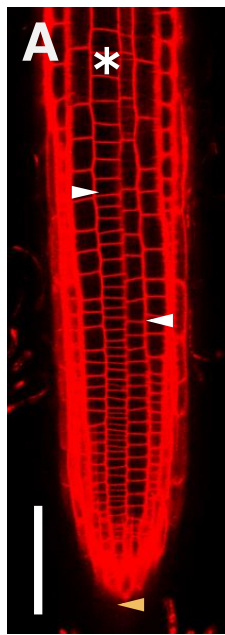


図3-1. 野生型植物の根端分裂領域における根毛細胞と非根毛細胞の比較

(A) 野生型植物をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させ、撮影した分裂領域の写真を示した。QC (黄色い矢頭)から白い矢頭までが分裂領域を示す。アスタリスクは根毛細胞列を示す。バーは100 μm。

(B) 野生型植物をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させ、QCからの分裂領域のサイズを測定し、グラフで示した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30。エラーバーは±SDを示す。***、p < 0.01

(C) 野生型植物をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させ、DAPI染色により核の観察を行った。白い矢頭はmitotic figurを指す。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。バーは50 μm。

(D) 根毛と非根毛の細胞列内のmitotic figurの個数をグラフで示した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30。エラーバーは±SDを示す。***、p < 0.01

(E) G2/M期の細胞を可視化する*pCYCB1;2:NT-YFP*マーカーを用いてライブセルイメージングを行い、一細胞列内の一時間あたりの細胞分裂頻度を測定した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 5。エラーバーは±SDを示す。***、p < 0.01

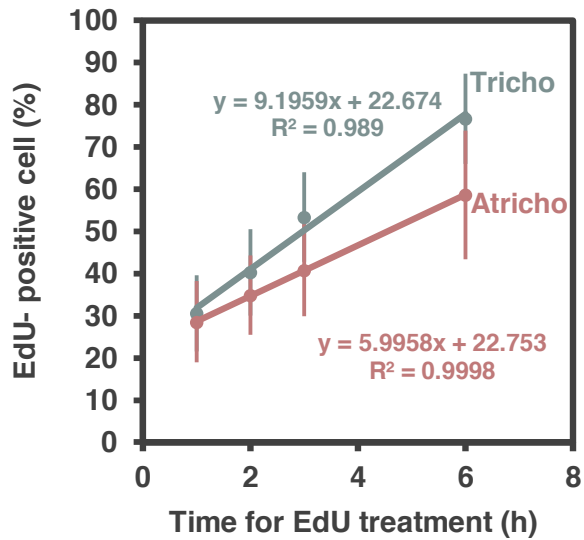


図3-2. 根毛と非根毛細胞における細胞周期の進行速度の比較

MS培地中で発芽後5日間生育させた野生型植物をEdU添加培地に移し、経時的に回収した。その後、根毛細胞 (Tricho)と非根毛細胞 (Atricho)をそれぞれ2000個以上観察し、EdUを取り込んだ細胞の割合をプロットした (青色および赤色の丸点)。プロットを線形近似したものを直線で示す。エラーバーは±SDを示す。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。

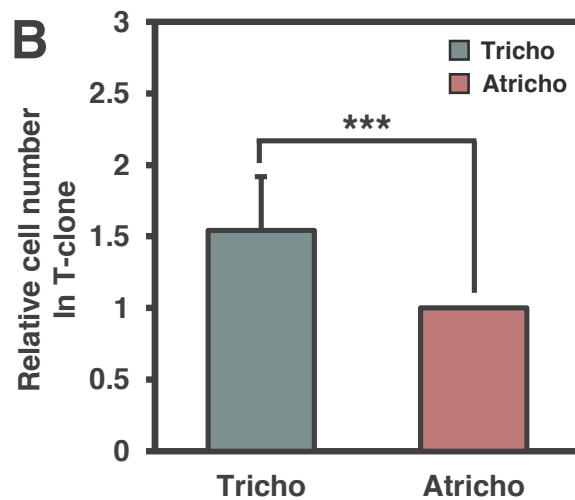
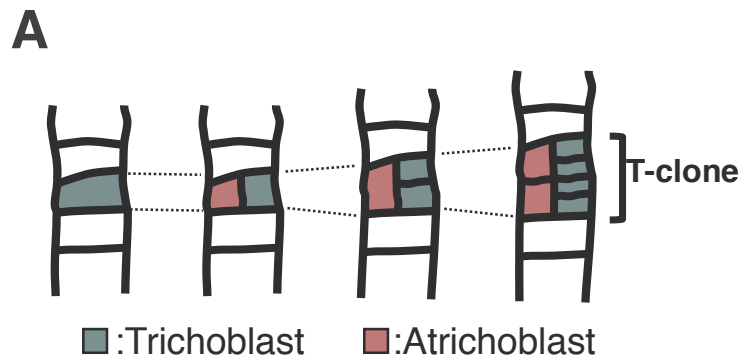


図3-3. Col-0のT-cloneにおける根毛細胞数と非根毛細胞数の割合

(A)根毛細胞が根の伸長方向に並行な分裂面を形成して分裂することによって二つの細胞を生み出す場合、娘細胞の一つは根毛細胞に、もう一つは非根毛細胞になる。その後、これらの娘細胞が分裂を行い、根毛細胞列と非根毛細胞列から成るクラスターを形成する。このような組織のことをT-cloneと呼ぶ。

(B) T-clone内の根毛細胞及び非根毛細胞の割合

Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30。エラーバーは±SDを示す。***、p < 0.01

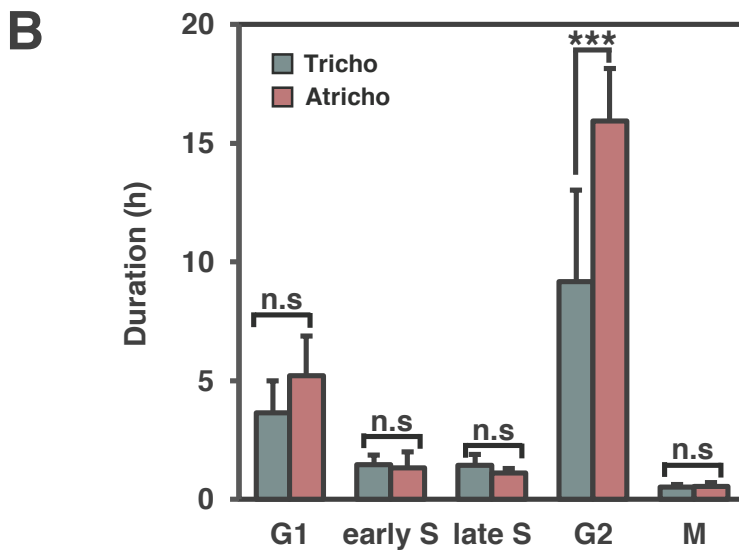
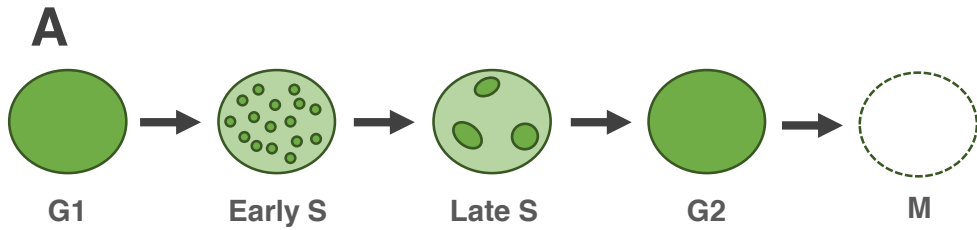


図3-4. 根毛細胞と非根毛細胞における細胞周期の各ステージの長さの比較

(A)細胞周期マーカであるPCNA-GFPの核内での各局在パターンの変化

(B) PCNA-GFPを用いてライブセルイメージングを行い。根毛細胞および非根毛細胞における細胞周期の各ステージの長さを測定した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30細胞。エラーバーは±SDを示す。***、p < 0.01。n.s、p > 0.05

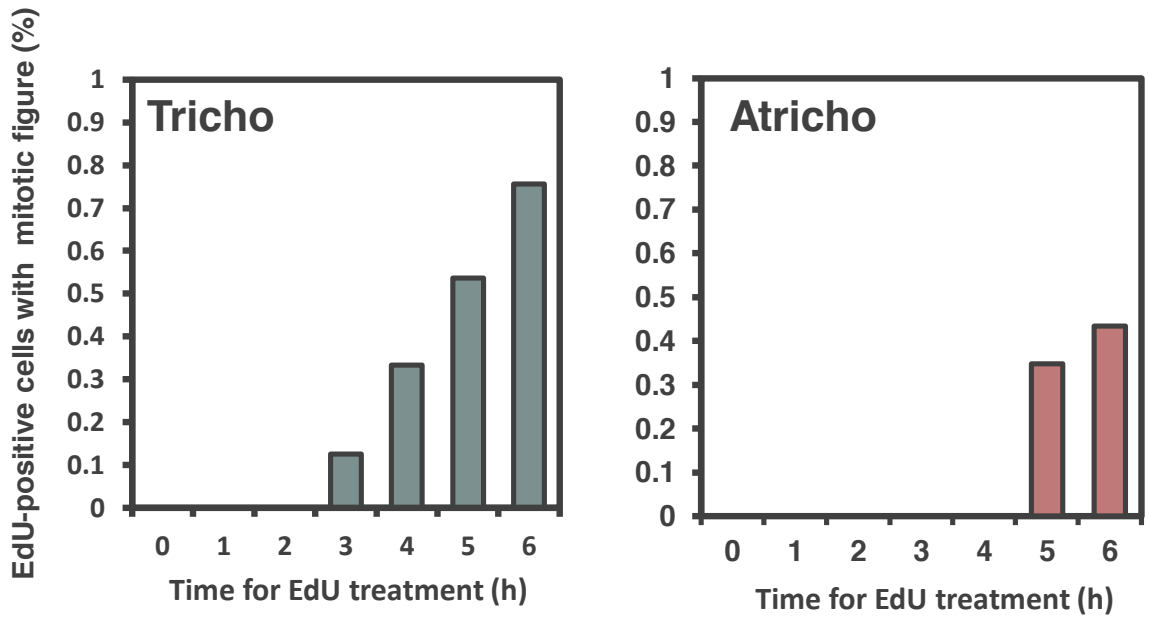


図3-5. EdUパルス実験によるG2期通過にかかる時間の比較

根毛・非根毛細胞のそれぞれについて、mitotic figureを示す全細胞のうち、EdU標識された細胞の割合を測定した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30。

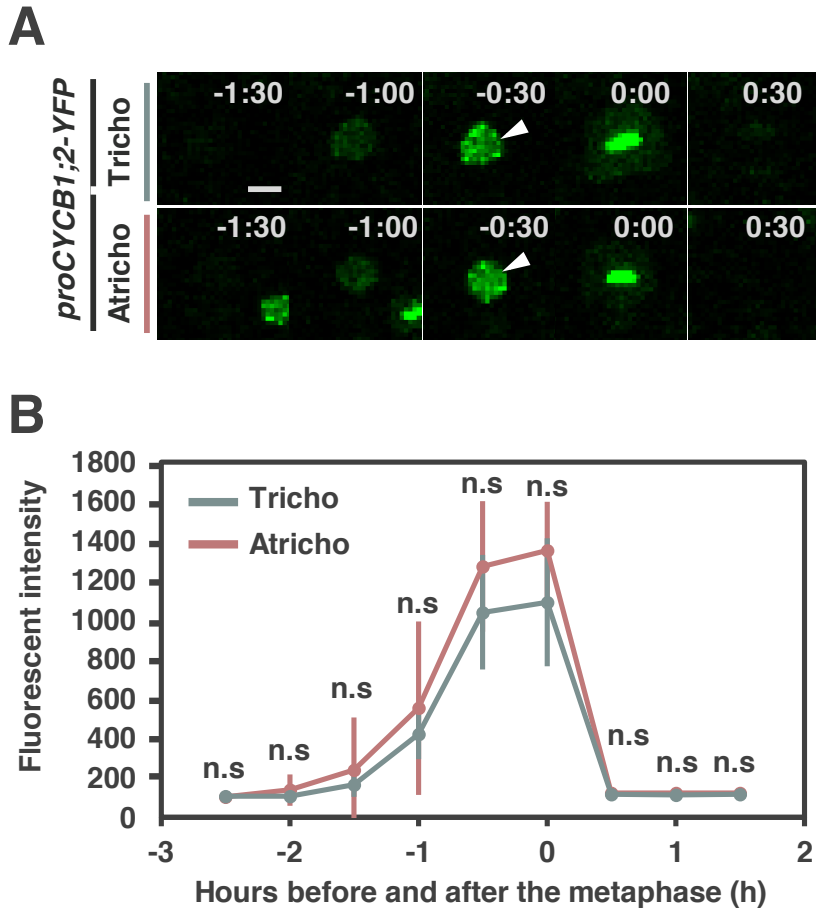


図3-6.根毛細胞と非根毛細胞のCYCB1;2遺伝子の発現様式

(A) ライブセルイメージングを行い、根毛細胞と非根毛細胞内でのCYCB1;2-YFPの蛍光画像を経時的に取得した。バーは5 μm 。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。

(B) 根毛細胞と非根毛細胞における蛍光量を示す。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。 $n > 10$ 。エラーバーは $\pm\text{SD}$ を示す。n.s、 $p > 0.05$

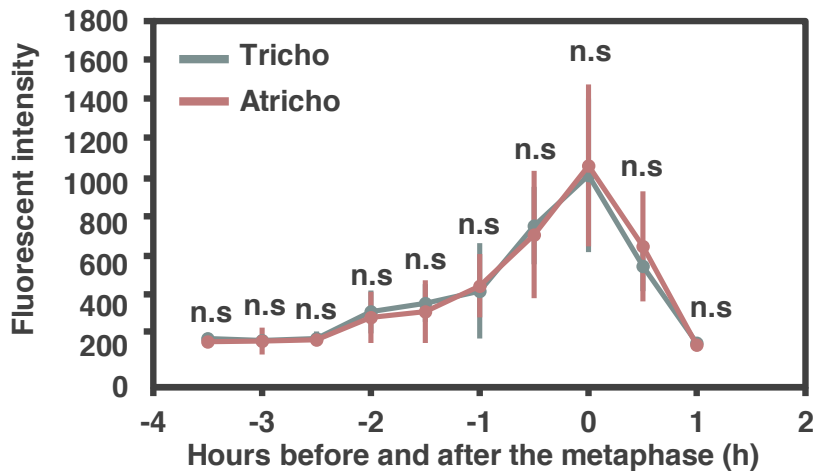
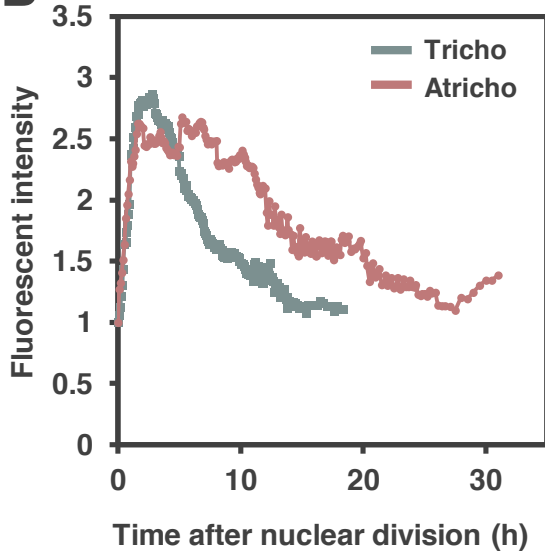
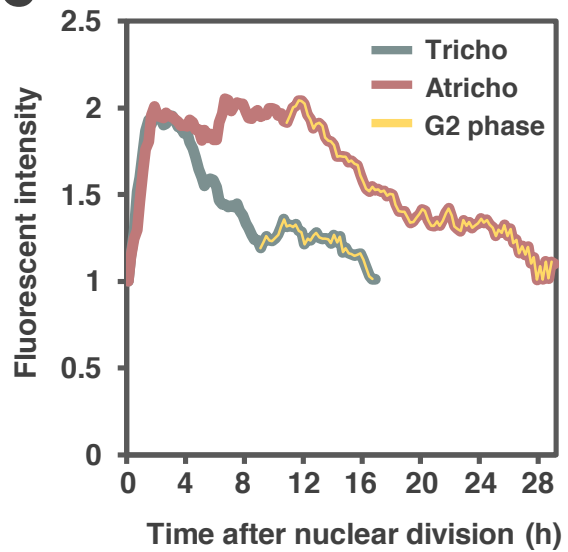
A**B****C**

図3-7.根毛細胞と非根毛細胞のMYB3Rの発現パターンの比較

(A) 根毛細胞と非根毛細胞におけるMYB3R4-GFPの蛍光量を示す。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 10。エラーバーは±SDを示す。n.s, p > 0.05

(B) 根毛細胞と非根毛細胞におけるMYB3R3-GFPの蛍光量の移動平均を示す。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 7。

(C) *pPCNA:PCNA-tdTomato/pMYB3R3:MYB3R3-GFP*の根毛細胞と非根毛細胞における細胞周期中のMYB3R3-GFPの蛍光量をG2期に相当するステージとともに示す。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。

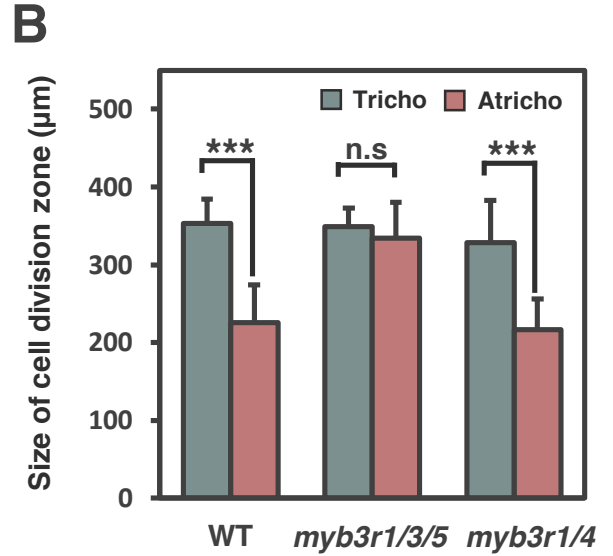
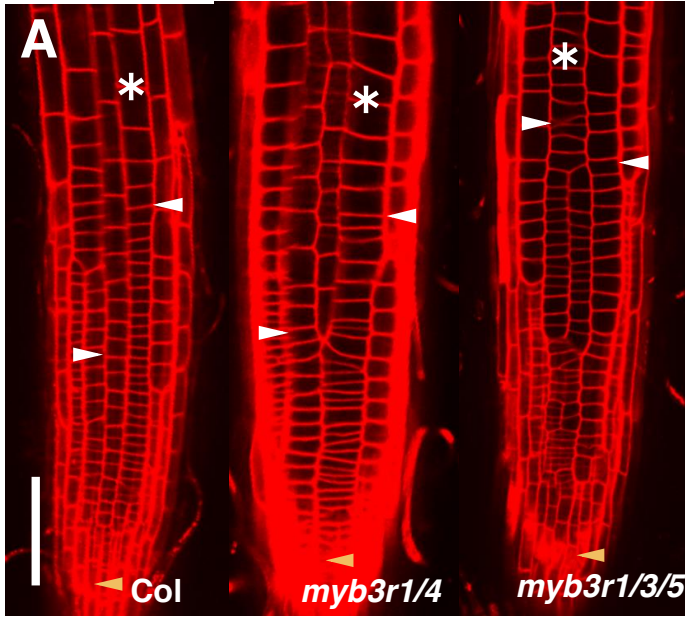


図3-8. *myb3r1/4*二重変異体と*myb3r1/3/5*三重変異体の根毛細胞と非根毛細胞の分裂領域サイズ

(A) 野生型植物、*myb3r1/4*二重変異体、*myb3r1/3/5*三重変異体をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させた後、根端の分裂領域を観察した。QC (黄色い矢頭)から白い矢頭までが分裂領域を示す。アスタリスクは根毛細胞列を示す。バーは100 μm 。

(B) 野生型植物、*myb3r1/4*二重変異体、*myb3r1/3/5*三重変異体をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させ、分裂領域のサイズを測定した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30。エラーバーは \pm SDを示す。***、 $p < 0.01$ 。n.s.、 $p > 0.05$

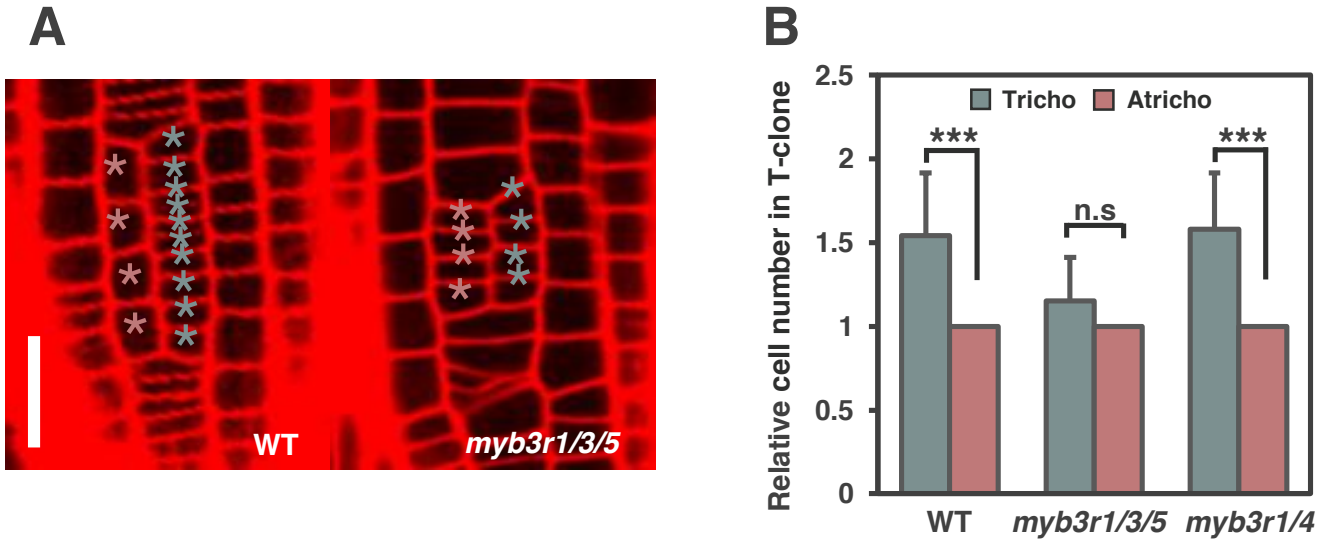


図3-9. *myb3r1/3/5*三重変異体のT-cloneにおける根毛細胞数と非根毛細胞数の割合

(A) 野生型植物と*myb3r1/3/5*三重変異体をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させ、撮影したT-cloneの観察を行った。青いアスタリスクはT-clone内の根毛細胞、赤いアスタリスクはT-clone内の非根毛細胞を示す。バーは30 μ m。

(B) T-clone内の非根毛細胞に対する根毛細胞数の割合

Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30。エラーバーは±SDを示す。***、p < 0.01。n.s、p > 0.05

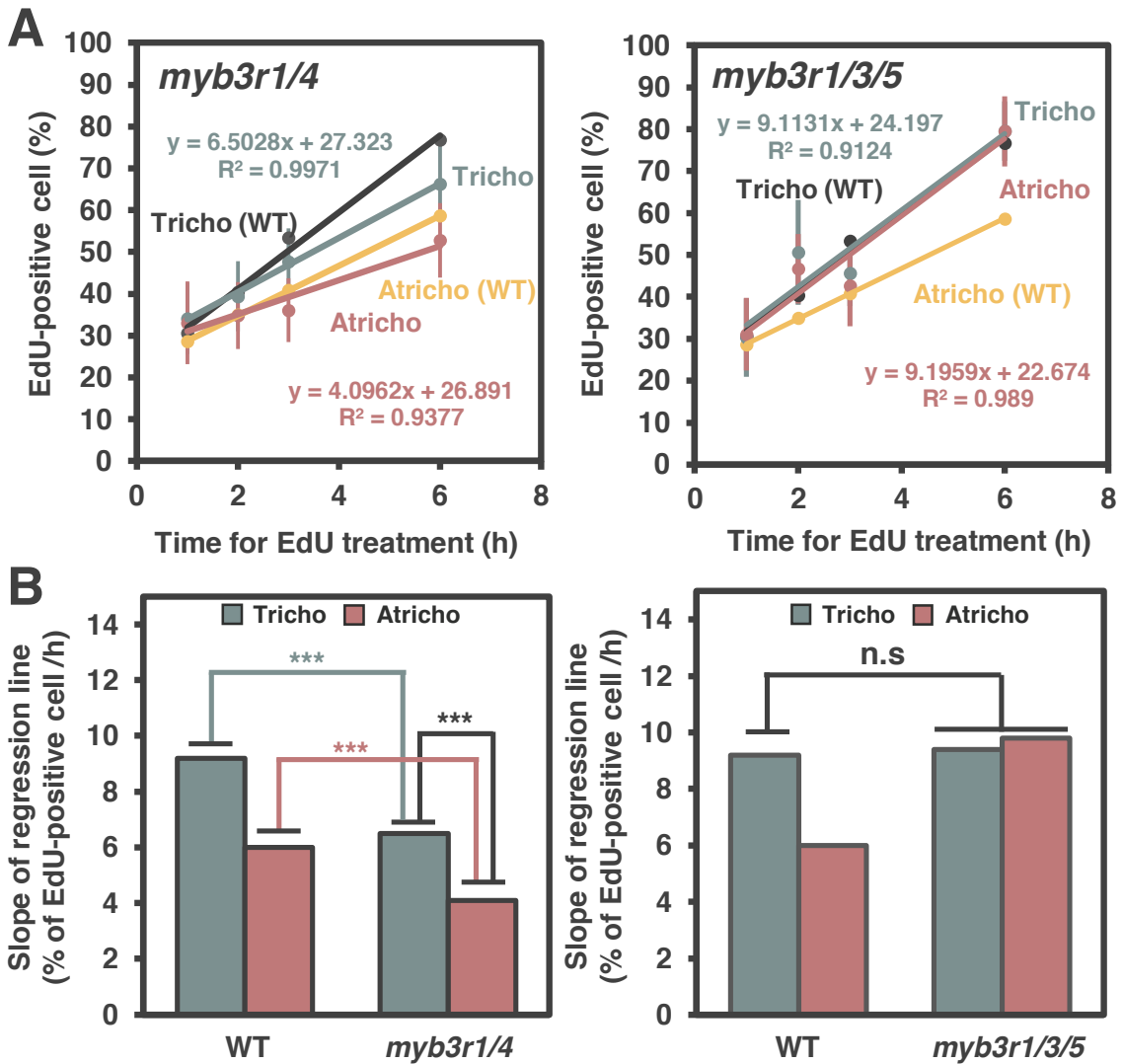
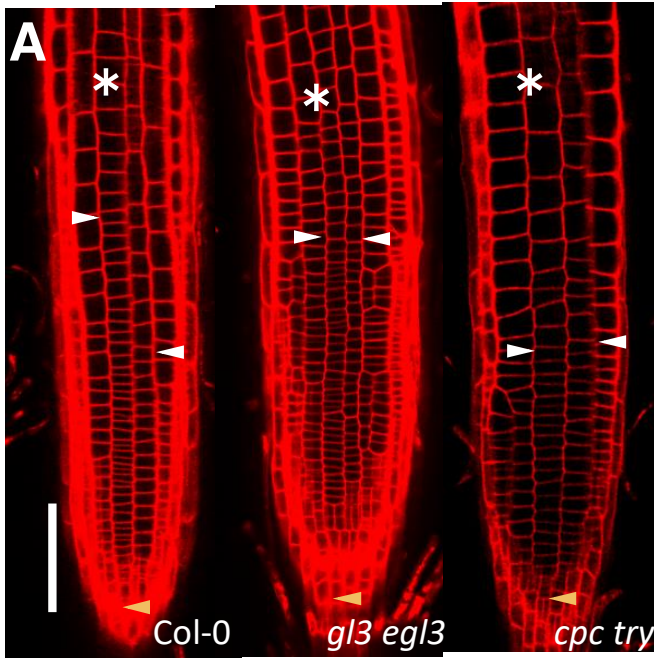


図3-10. *myb3r1/4*二重変異体と*myb3r1/3/5*三重変異体における根毛細胞と非根毛細胞の細胞周期の進行速度の比較

(A) MS培地で発芽後5日間生育させた*myb3r1/4*二重変異体と*myb3r1/3/5*三重変異体をEdU添加培地に移し、経時的に回収した。根毛細胞と非根毛細胞をそれぞれ1000個以上観察し、EdUを取り込んだ細胞の割合をプロットした (青色および赤色の丸点)。プロットを線形近似したものを直線で示す。黒色が野生型の根毛細胞、黄色が野生型の非根毛細胞、青が変異体の根毛細胞、赤が変異体の非根毛細胞のプロットと近似線である。

(B) Aで算出した野生型と*myb3r1/4*二重変異体の根毛細胞と非根毛細胞の回帰直線の傾きを分散分析により有意差を比較した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 15。***、p < 0.001。n.s、p > 0.05。

(C) Aで算出した野生型と*myb3r1/3/5*三重変異体の根毛細胞と非根毛細胞の回帰直線の傾きを分散分析により比較した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 15。***、p < 0.01。n.s、p > 0.05。



B

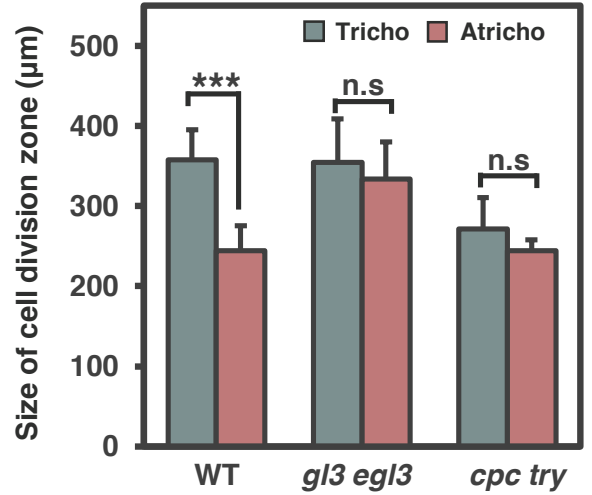


図3-11. *gl3 egl3*二重変異体と*cpc try*二重変異体の根毛細胞と非根毛細胞の分裂領域サイズ

(A) 野生型植物、*gl3 egl3*二重変異体と*cpc try*二重変異体をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させた後、根端の分裂領域を観察した。QC (黄色い矢頭)から白い矢頭までが分裂領域を示す。アスタリスクは根毛細胞列を示す。バーは100 μm 。

(B) 野生型植物、*gl3 egl3*二重変異体と*cpc try*二重変異体をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させQCからの分裂領域のサイズを測定し、グラフで示した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30。エラーバーは \pm SDを示す。***、 $p < 0.01$ 。n.s、 $p > 0.05$

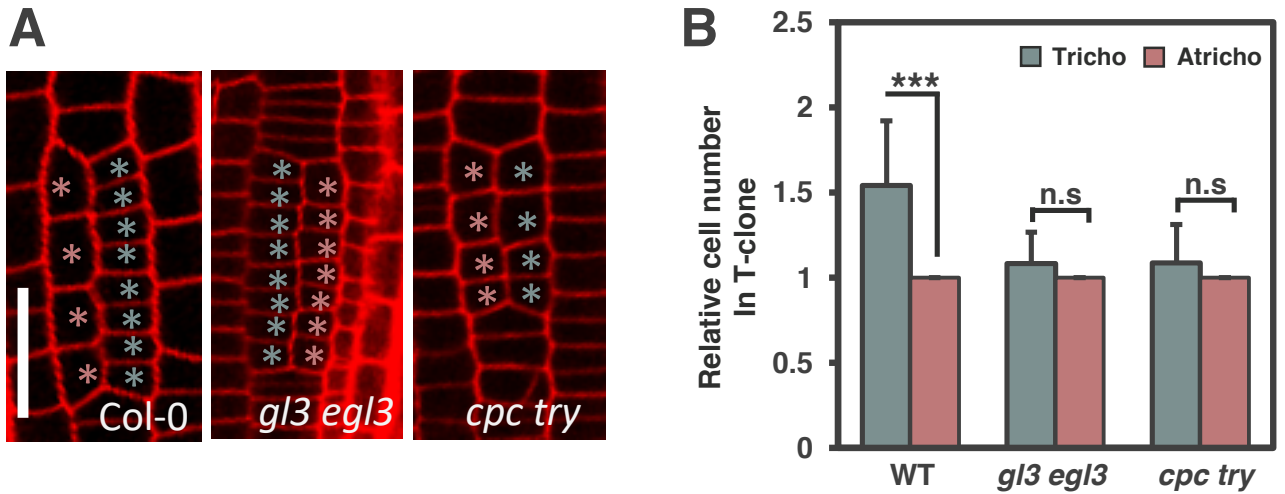


図3-12. *gl3 egl3*二重変異体と*cpc try*二重変異体のT-cloneにおける根毛細胞数と非根毛細胞数の割合
 (A) 野生型植物と*gl3 egl3*二重変異体と*cpc try*二重変異体をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させ、撮影したT-cloneの観察を行った。青いアスタリスクはT-clone内の根毛細胞、赤いアスタリスクはT-clone内の非根毛細胞を示す。バーは30 μ m。
 (B) T-clone内の非根毛細胞に対する根毛細胞数の割合
 Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30。エラーバーは±SDを示す。***、 $p < 0.01$ 。
 n.s、 $p > 0.05$

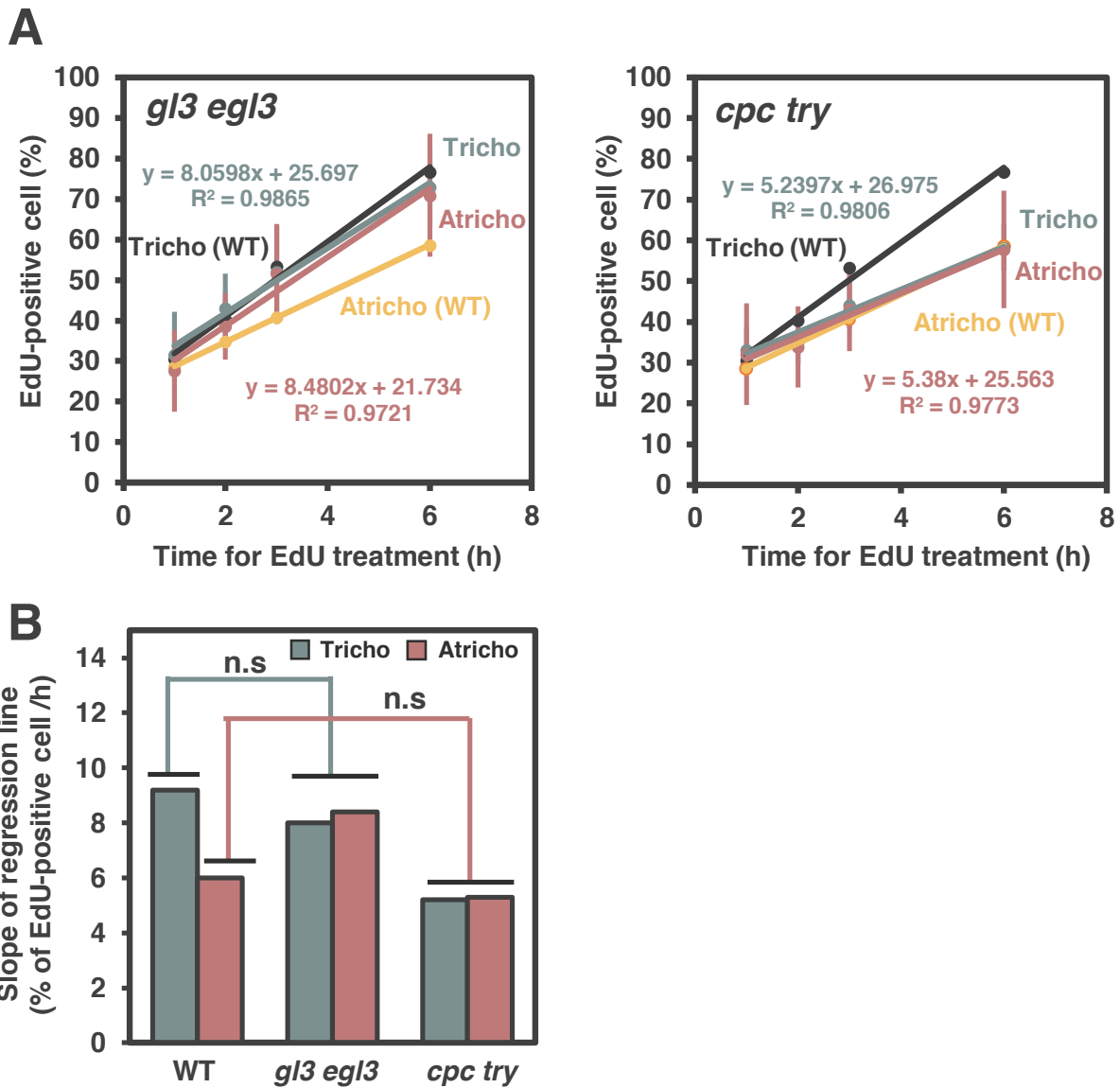


図3-13. *gl3 egl3*二重変異体と*cpc try*二重変異体における根毛細胞と非根毛細胞の細胞周期の進行速度の比較

(A) MS培地で発芽後5日間生育させた*gl3 egl3*二重変異体と*cpc try*二重変異体をEdU添加培地に移し、経時的に回収した。根毛細胞と非根毛細胞をそれぞれ1000個以上観察し、EdUを取り込んだ細胞の割合をプロットした (青色および赤色の丸点)。プロットを線形近似したものを直線で示す。黒色が野生型の根毛細胞、黄色が野生型の非根毛細胞、青が変異体の根毛細胞、赤が変異体の非根毛細胞のプロットと近似線である。

(B) Aで算出した野生型と*gl3 egl3*二重変異体と*cpc try*二重変異体の根毛細胞と非根毛細胞の回帰直線の傾きを分散分析により有意差を比較したTrichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。N > 15。***、 $p < 0.001$ 。n.s.、 $p > 0.05$ 。

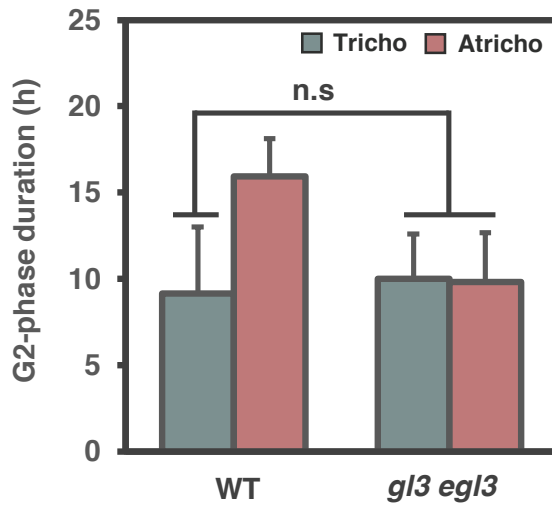


図3-14. *gl3 egl3*二重変異体における根毛細胞と非根毛細胞のG2期の長さの比較
細胞周期マーカーであるPCNA-GFPを導入した*gl3 egl3*二重変異体を用いてライブセルイメージングを行い根毛細胞および非根毛細胞のG2期の長さをグラフで示した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 10。エラーバーは±SDを示す。n.s、p > 0.05

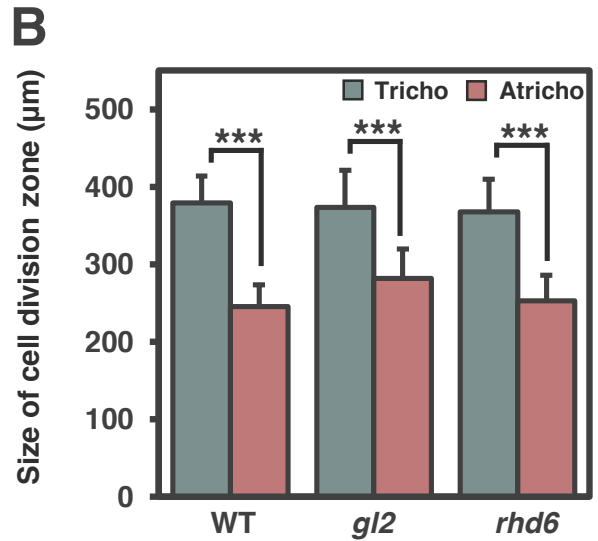
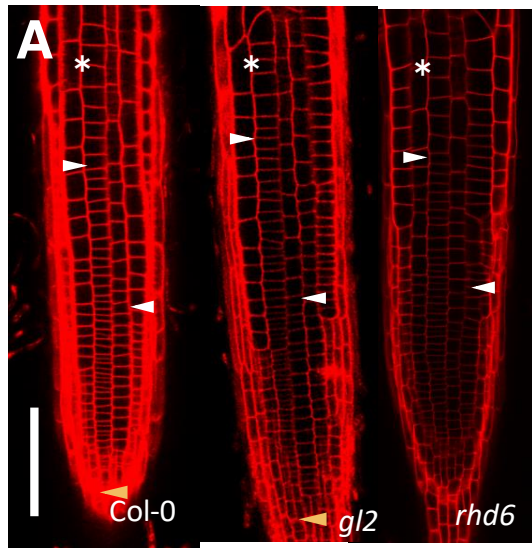


図3-15. *gl2*変異体と*rhd6*変異体の根毛細胞と非根毛細胞の分裂領域サイズ

(A) 野生型植物、*gl2*変異体と*rhd6*変異体をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させた後、根端の分裂領域を観察した。QC (黄色い矢頭)から白い矢頭までが分裂領域を示す。アスタリスクは根毛細胞列を示す。バーは100 μm 。

(B) 野生型植物、*gl2*変異体と*rhd6*変異体をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させ、分裂領域のサイズを測定した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30。エラーバーは \pm SDを示す。***、 $p < 0.01$ 。n.s、 $p > 0.05$

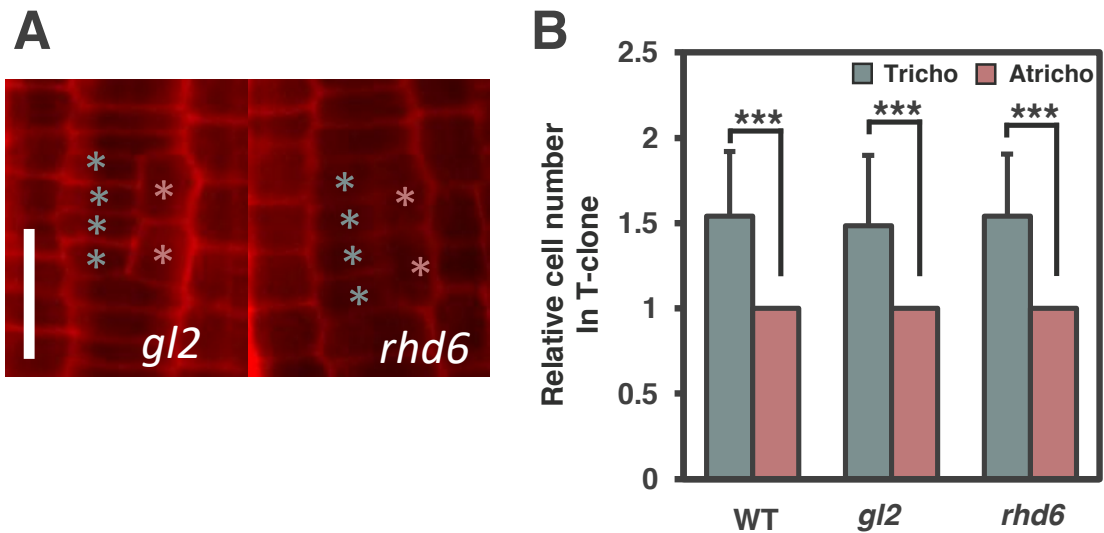


図3-16. *gl2*変異体と*rhd6*変異体のT-cloneにおける根毛細胞数と非根毛細胞数の割合

(A) 野生型植物と*gl2*変異体と*rhd6*変異体をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させ、撮影したT-cloneの観察を行った。青いアスタリスクはT-clone内の根毛細胞、赤いアスタリスクはT-clone内の非根毛細胞を示す。バーは30 μm 。

(B) T-clone内の非根毛細胞に対する根毛細胞数の割合

Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30。エラーバーは \pm SDを示す。***、 $p < 0.01$ 。n.s、 $p > 0.05$

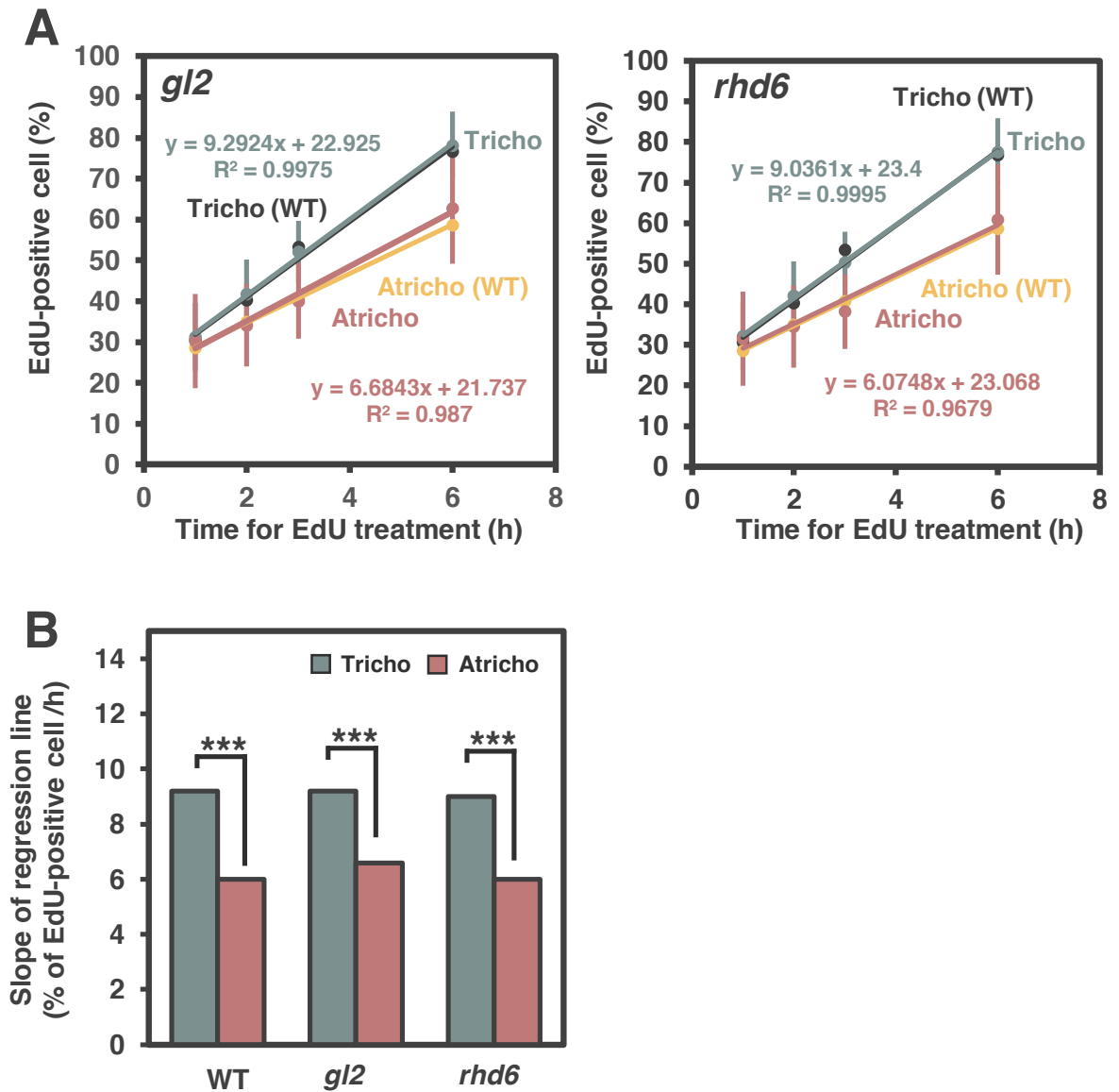


図3-17. *gl2*変異体と*rhd6*変異体における根毛細胞と非根毛細胞の細胞周期の進行速度の比較
 (A) MS培地で発芽後5日間生育させた*gl2*変異体と*rhd6*変異体をEdU添加培地に移し、経時的に回収した。根毛細胞と非根毛細胞をそれぞれ1000個以上観察し、EdUを取り込んだ細胞の割合をプロットした (青色および赤色の丸点)。プロットを線形近似したものを直線で示す。黒色が野生型の根毛細胞、黄色が野生型の非根毛細胞、青が変異体の根毛細胞、赤が変異体の非根毛細胞のプロットと近似線である。
 (B) Aで算出した野生型と*gl2*変異体と*rhd6*変異体の根毛細胞と非根毛細胞の回帰直線の傾きを分散分析により有意差を比較した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 15。***、p < 0.001。n.s、p > 0.05。

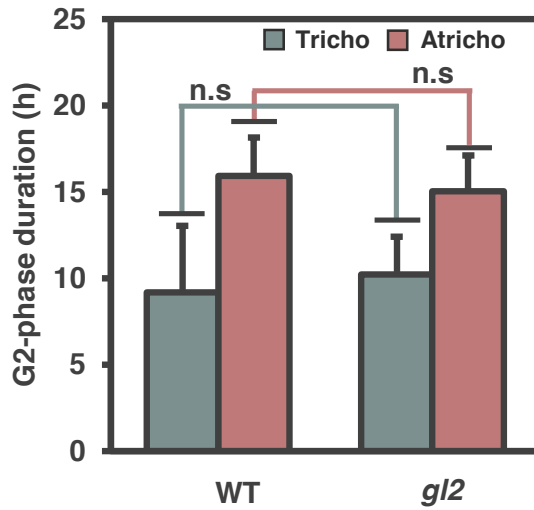


図3-18. *gl2*変異体における根毛細胞と非根毛細胞のG2期の長さの比較

細胞周期マーカーである*PCNA-GFP*を導入した*gl2*変異体を用いてライブセルイメージングを行い根毛細胞および非根毛細胞のG2期の長さをグラフで示した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 10。エラーバーは±SDを示す。n.s、p > 0.05

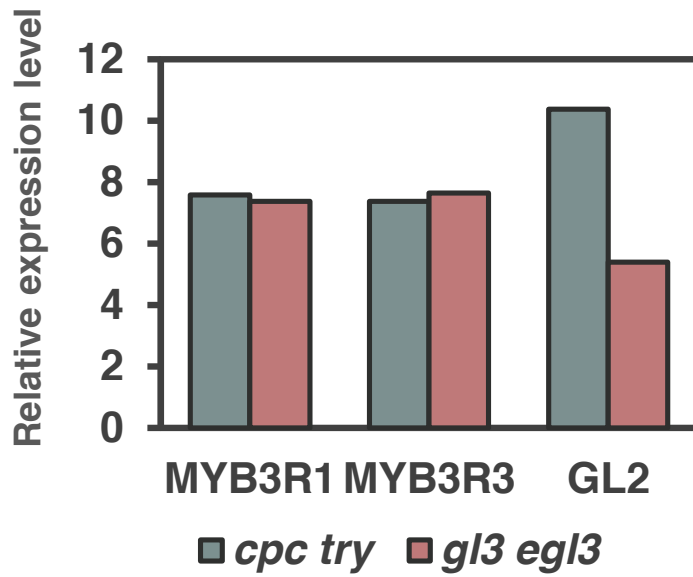


図3-19. *gl3 egl3*二重変異体内と*cpc try*二重変異体の表皮内のMYB3R1/3の発現量
MYB3R1、*MYB3R3*とポジティブコントロールである*GL2*の発現量を示した。

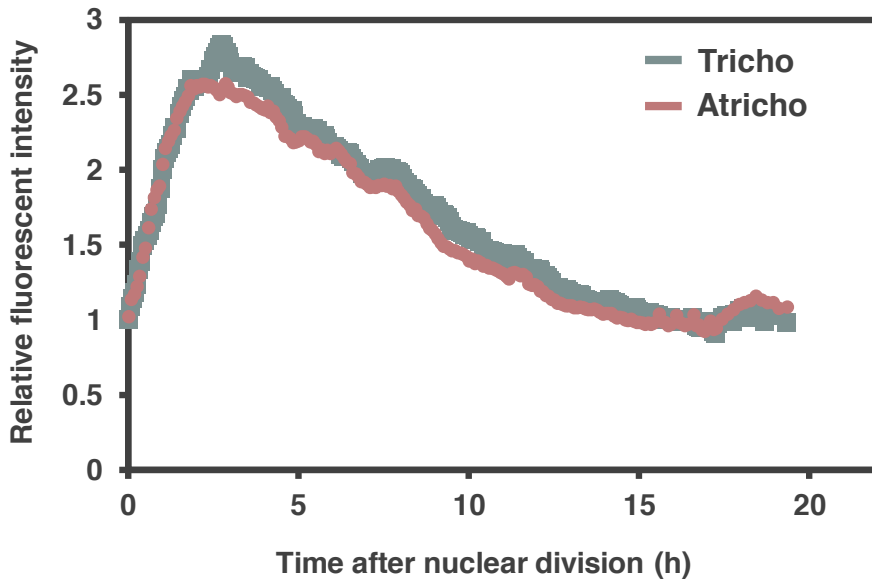


図3-20. *gl3 egl3*二重変異体内の根毛細胞と非根毛細胞のMYB3R3-GFPのタンパク質レベルの経時的変化

*gl3 egl3*二重変異体内の根毛細胞と非根毛細胞内でのMYB3R3-GFPの発現時間と発現量の移動平均を算出し、グラフで示した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。 $n > 5$ 。

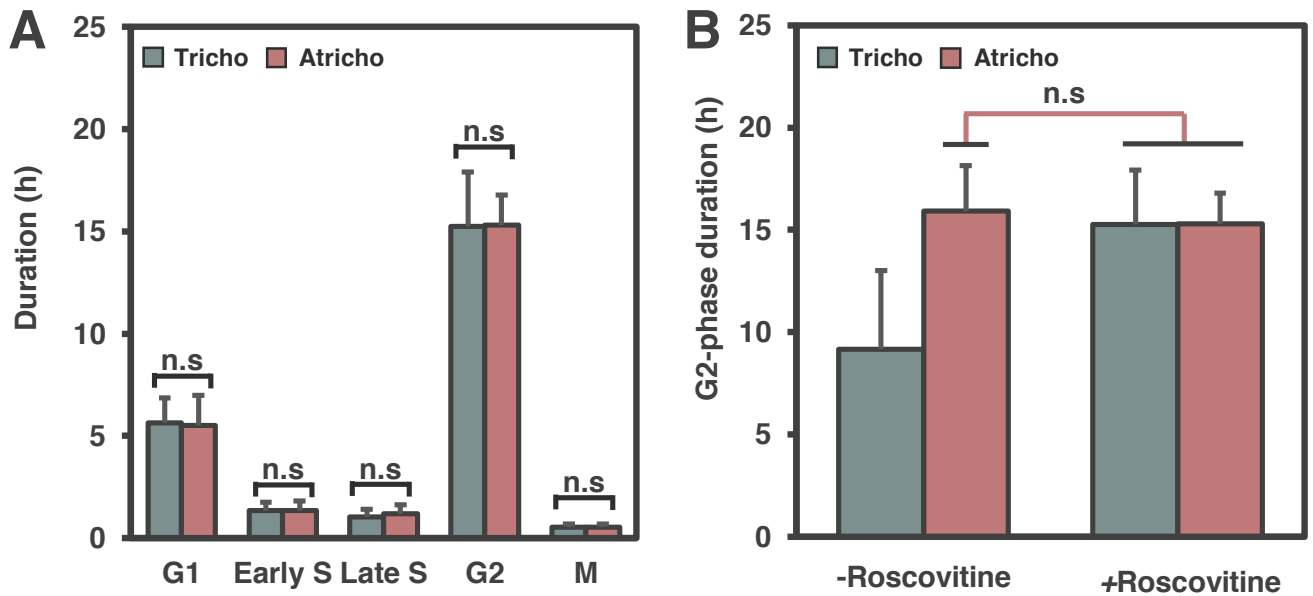


図3-21. ロスコビチン処理の有無による細胞周期の各ステージの長さの比較

(A) 10 nM ロスコビチン処理をしたPCNA-GFPを用いてライブセルイメージングを行い、根毛細胞および非根毛細胞における細胞周期の各ステージの長さを測定した。n > 30。エラーバーは±SDを示す。n.s、p > 0.05

(B) 10 nM ロスコビチン処理をしたPCNA-GFPを用いてライブセルイメージングを行い、根毛細胞および非根毛細胞のG2期の長さをグラフで示した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 10。エラーバーは±SDを示す。n.s、p > 0.05

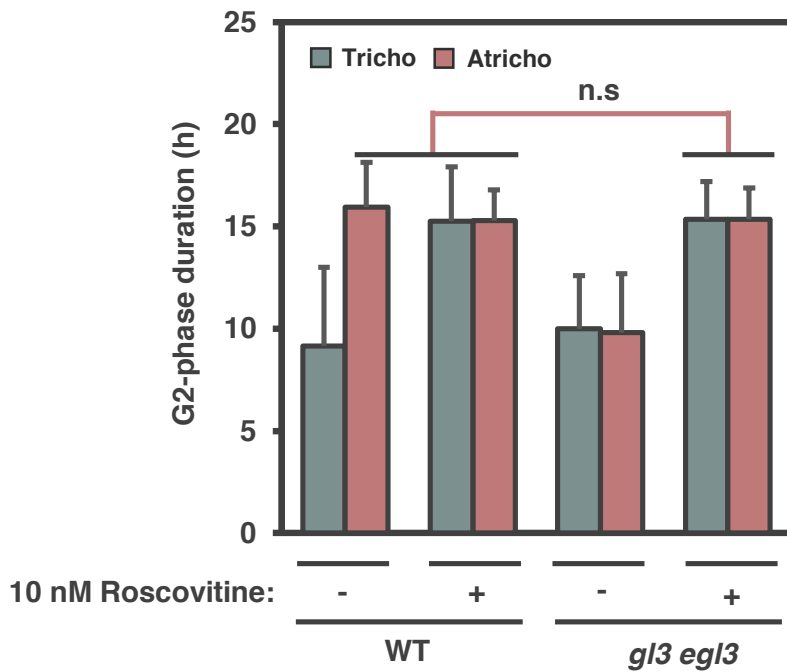


図3-22. *gl3 egl3*二重変異体におけるロスコビチン処理による根毛細胞と非根毛細胞におけるG2期の長さの比較

10 nM ロスコビチン処理をしたPCNA-GFPとPCNA-GFPを導入した*gl3 egl3*二重変異体を用いてライブセルイメージングを行い、根毛細胞および非根毛細胞のG2期の長さをグラフで示した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 10。エラーバーは±SDを示す。n.s、p > 0.05

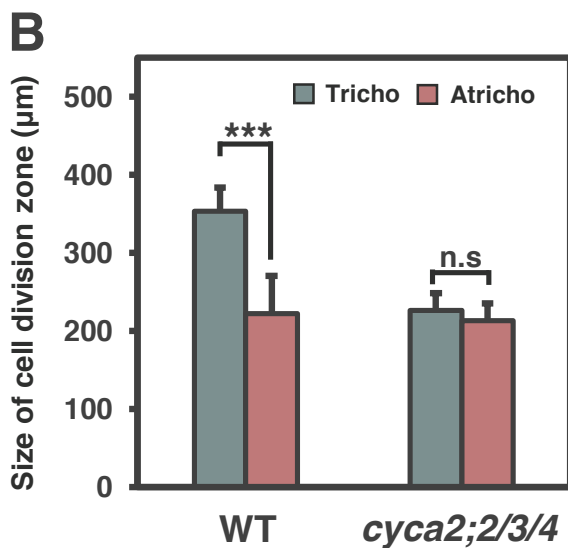
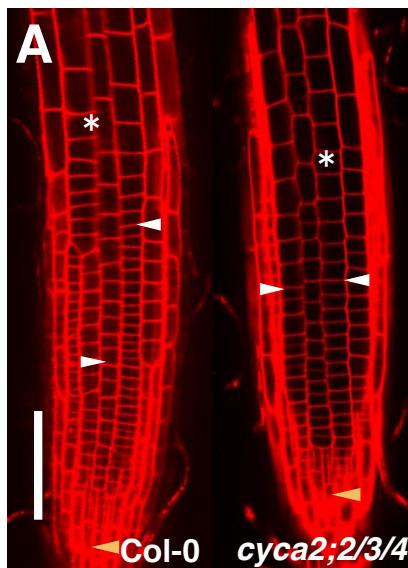


図3-23. *cyca2;2/3/4*三重変異体の根毛細胞と非根毛細胞の分裂領域サイズ

(A) 野生型植物、*cyca2;2/3/4*三重変異体をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させた後、根端の分裂領域を観察した。QC (黄色い矢頭)から白い矢頭までが分裂領域を示す。アスタリスクは根毛を示す。バーは100 μm。

(B) 野生型植物、*cyca2;2/3/4*三重変異体をMS培地に播種し、発芽後5日間生育させ、分裂領域のサイズを測定した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 30。エラーバーは±SDを示す。***、p < 0.01。n.s、p > 0.05

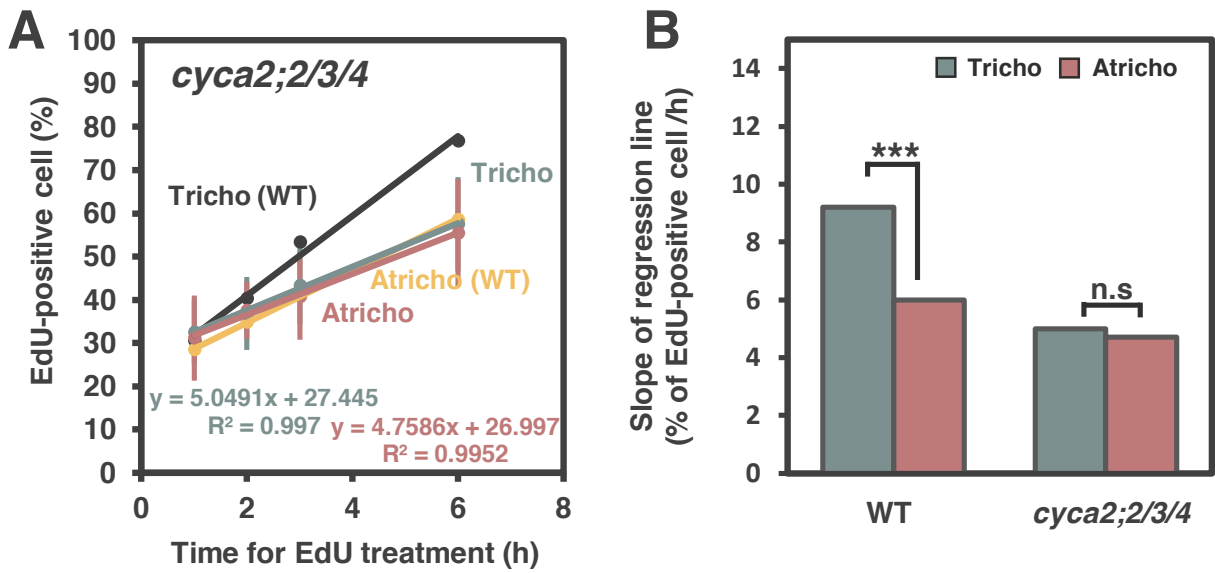


図3-24. *cyca2;2/3/4*変異体における根毛細胞と非根毛細胞の細胞周期の進行速度の比較

(A) MS培地で発芽後5日間生育させた*cyca2;2/3/4*変異体をEdU添加培地に移し、経時的に回収した。根毛細胞と非根毛細胞をそれぞれ1000個以上観察し、EdUを取り込んだ細胞の割合をプロットした(青色および赤色の丸点)。プロットを線形近似したものを直線で示す。黒色が野生型の根毛細胞、黄色が野生型の非根毛細胞、青が変異体の根毛細胞、赤が変異体の非根毛細胞のプロットと近似線である。

(B) Aで算出した野生型と*cyca2;2/3/4*変異体の根毛細胞と非根毛細胞の回帰直線の傾きを分散分析により有意差を比較した。Trichoは根毛細胞、Atrichoは非根毛細胞を示す。n > 15。***、p < 0.001。n.s.、p > 0.05。

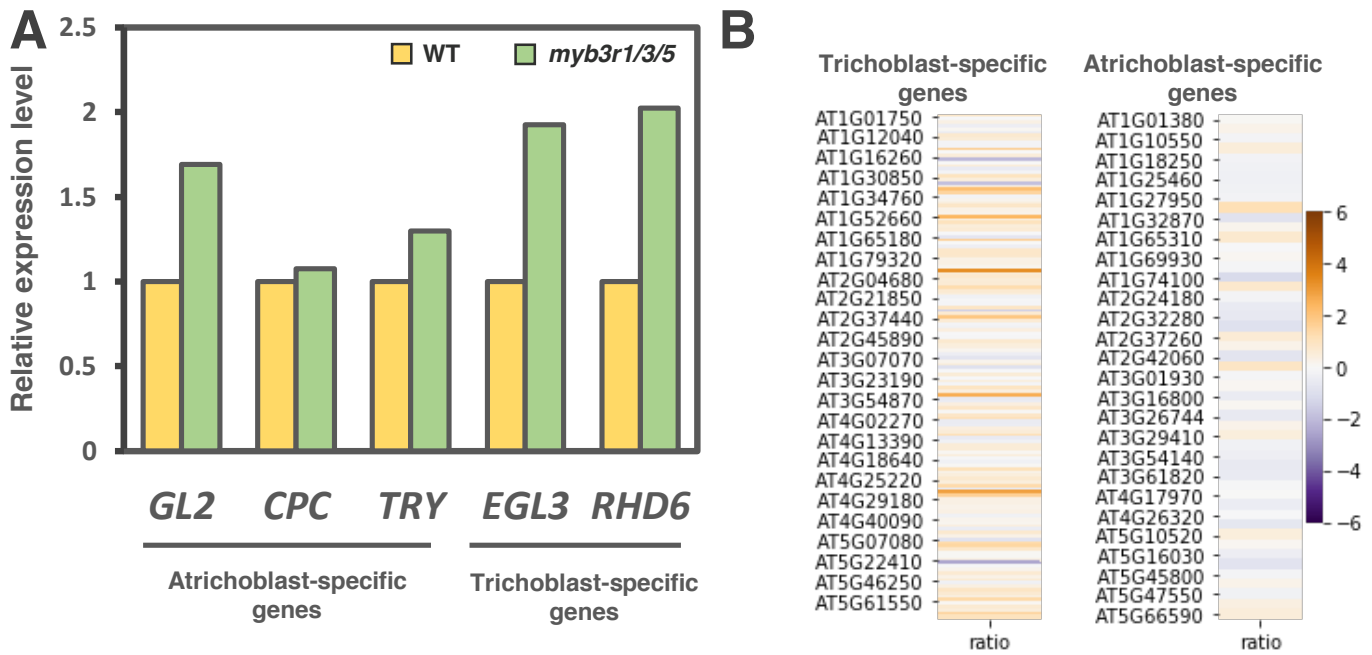


図3-25. *myb3r1/3/5*三重変異体のマイクロアレイデータを用いた、表皮細胞関連遺伝子の発現解析
 (A) *myb3r1/3/5*三重変異体における表皮の運命決定を担う遺伝子の発現量を調べた。
 (B) *myb3r1/3/5*三重変異体における根毛細胞特異的遺伝子群、非根毛細胞特異的遺伝子群の発現を調べた。野生型の発現量に対しての $\log_2(\text{Fold change})$ で示し赤が増加を、青が減少を示している。

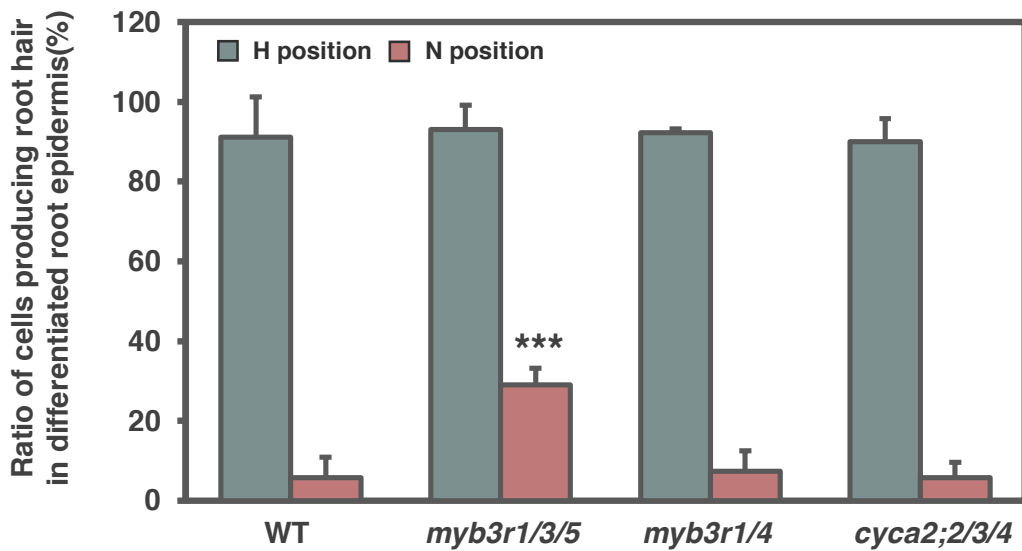


図3-26. MYB3R 変異体の根毛のパターン

MS培地で発芽後5日間生育させた野生型植物と *myb3r1/3/5* 三重変異体と *myb3r1/4* 二重変異体と *cyc2;2/3/4* 三重変異体におけるH position (コルテックス2つと接している表皮細胞)とN position (コルテックス1つと接している表皮細胞)での根毛を形成している細胞の割合を測定した。 n > 30。***、 p < 0.01。

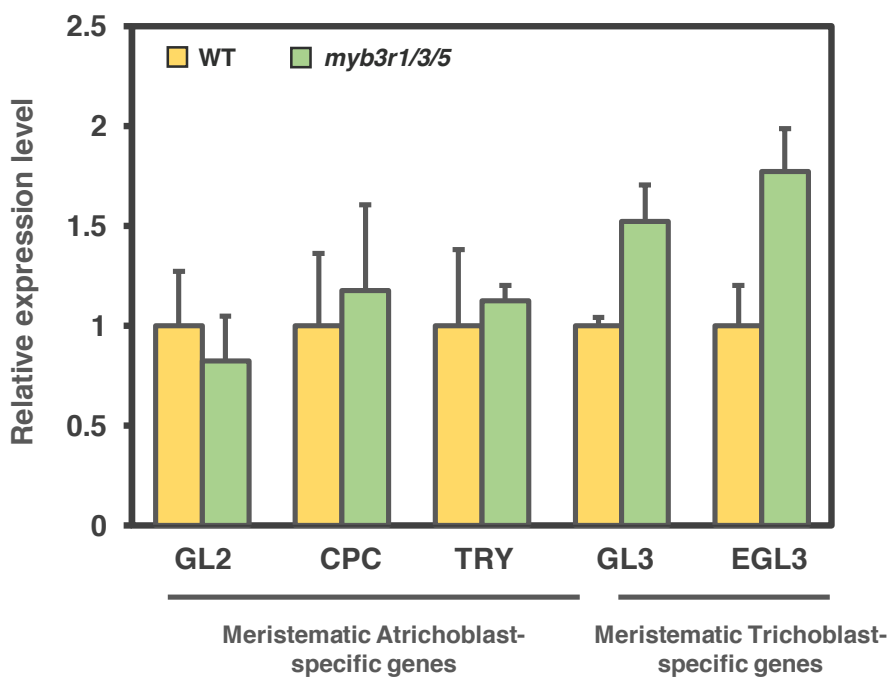


図3-27. *myb3r1/3/5*三重変異体における表皮細胞関連遺伝子の発現解析

MS培地で発芽後5日間生育させた野生型植物と*myb3r1/3/5*三重変異体の根端から5 mmの領域での根毛細胞特異的遺伝子群と非根毛細胞特異的遺伝子群の発現量を定量RT-PCRにより定量した。n = 3。***、 $p < 0.01$ 。

4. 考察

(1) 細胞間を移行する *GL3* と *EGL3* は、根の表皮細胞の運命と細胞周期の両方を制御する

シロイヌナズナの根の表皮細胞の運命は、*GL3*、*EGL3* の移動による細胞間コミュニケーションによって制御される。根毛細胞で発現している *GL3* と *EGL3* は、タンパク質が非根毛細胞へ移動して、*GL2* の発現を誘導することで根毛形成を抑制している(図 4-1) (Bernhardt et al., 2005)。本研究で *GL3*、*EGL3* の機能欠損変異体の表現型解析を行った結果、非根毛細胞において細胞周期が短くなり、根毛細胞と比較して有意な差が見られないことが明らかになった。一方で、根毛細胞の細胞周期の長さは、野生型植物の根毛細胞と有意な差が見られなかった。このように、*GL3* と *EGL3* タンパク質の移行先である非根毛細胞でのみ表現型が観察されたことから、*GL3* と *EGL3* は細胞非自律的に細胞周期を制御していることが示された(図 4-1)。一方で、*GL3* と *EGL3* の下流で機能する *GL2* の機能欠損変異体では、根毛形成については *gl3 egl3* 変異体と同様な表現型を示すが、細胞周期に関しては野生型と同様な表現型を示した。したがって、*GL3* と *EGL3* は *GL2* を介して根毛形成を制御するが、それとは異なる経路を使って細胞分裂活性を制御していると考えられる。

cyca2;2/3/4 三重変異体を使った実験で、根毛細胞の細胞周期一周の長さが長くなり、非根毛細胞との差が消失したことから、A2 型のサイクリンが根毛細胞における細胞周期進行の制御に関与していると考えられる。*GL3* と *EGL3* が *CYCA2* の発現またはタンパク質蓄積を制御しているかどうかは不明であるが、今後、*CYCA2* のレポーター遺伝子を使ってこの点を明らかにしていきたい。

(2) 根の表皮細胞タイプ特異的な細胞周期進行は Rep-MYB により制御されている

細胞周期の G2 期から M 期へ進行には、G2/M 期特異的遺伝子群の転写誘導が重要である(Menges et al., 2005; Haga et al., 2007)。シロイヌナズナにおいて、G2/M 期特異的遺伝子群は Act-MYB である MYB3R1/4 によって転写誘導され、Rep-MYB である MYB3R1/3/5 によって転写抑制される(Kobayashi et al., 2013)。本研究で、根端分裂領域における根毛細胞と非根毛細胞の細胞周期を比較した結果、非根毛細胞の方が根毛細胞よりも G2 期が長く、細胞周期が遅いことが明らかとなった。また根毛細胞と非根毛細胞で Rep-MYB の mRNA 量に差はないが、非根毛細胞では *GL3* と *EGL3* の働き

によって Rep-MYB タンパク質が安定化し、G2 期から M 期への移行が遅延しているため、G2 期が長くなることが示唆された。細胞周期のステージごとの Rep-MYB のタンパク質蓄積について調べた結果、根毛細胞では G1 期から蓄積量の減少が観察されたが、非根毛細胞では、G1-S 期でも一定の蓄積量を維持し、G2 期への移行と同時にタンパク質量の減少が始まることがわかった。したがって、*GL3* と *EGL3* は Rep-MYB のタンパク質分解のタイミングを制御することにより、G2/M 期進行をコントロールしていると考えられる。

Rep-MYB は CDK によるリン酸化制御を受けており、リン酸化された Rep-MYB は 26S プロテアソームによって分解されることが報告されている(Chen et al., 2017)。トライコームにおいて、*CDKA;1* は遺伝学的に *GL3* の下流で制御されていることが示唆されており(Bramsiepe et al., 2010)、*CDKA;1* は *CYCA2* と結合することも報告されている(Brouc et al., 2010)。したがって、表皮の根毛細胞においては *CYCA2-CDKA;1* 複合体が Rep-MYB をリン酸化することにより不安定化させ、G2 期から M 期への進行を促進している可能性が考えられる。CDK による Rep-MYB のリン酸化サイトはすでに同定されているので、今後はリン酸化サイトをアラニンに置換した非リン酸化 Rep-MYB を作成し、CDK 活性と Rep-MYB との遺伝学的な関係性を明らかにすることが期待される。

(3) 表皮細胞の運命決定における細胞周期制御の役割

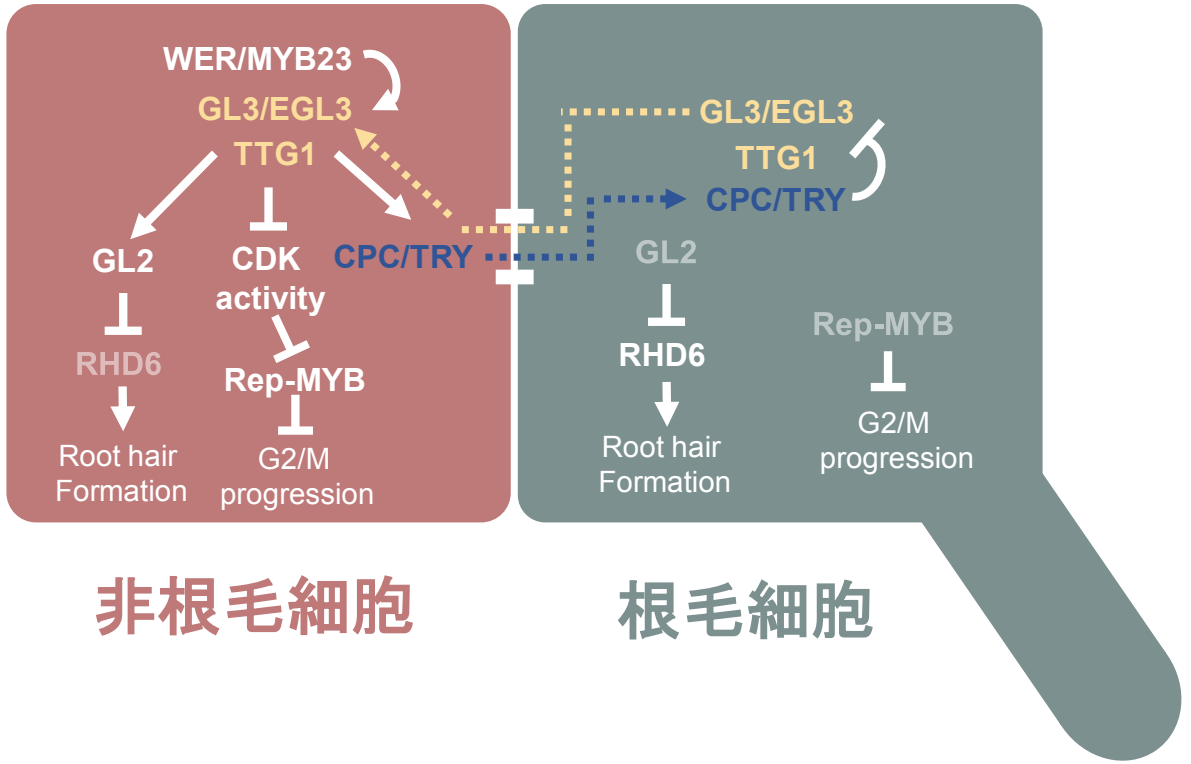
本研究により、非根毛細胞と根毛細胞で G2 期の長さが異なるために細胞周期の長さに差が生じることが明らかになったので、この生物学的意義に関して考察する。*gl2* 機能欠損変異体では、野生型植物と同様に G2 期が長い細胞列と短い細胞列で表皮が構成されているが、どちらの細胞列からも根毛形成が行われる(Masucci et al., 1996)。このことから、G2 期が短いことが根毛形成に必要ではない。一方で、*myb3r1/3/5* 三重変異体では非根毛細胞の G2 期が短くなっており、通常は根毛が形成されない非根毛細胞列で根毛が形成される割合が増えていた。このことから、非根毛細胞で G2 期を延長することは、根毛形成を完全に阻害する上で重要であると考えられる。また、*myb3r1/3/5* 三重変異体では根毛細胞列の根毛形成率には異常が見られなかったことから、細胞周期の長さによる細胞運命制御は細胞自立的な制御であることが予想される。G2/M 期進行を制御するサイクリンをコードする *CYCA2;3* を誘導的に過剰発現した植物体では、根毛の密度が増加することが報告されているが、G1/S 期進行を制御するサイクリンの過剰発現体ではそのような報告はない(Imai et al., 2006)。このことから、G2 期の長さが根毛の運命獲得に何らかの意味があると考えられる。細胞周期と根の表

皮の運命制御には *GEMININ (GEM)* が関与していることが報告されている (Caro et al., 2009)。細胞周期抑制因子 *GEM* は、非根毛細胞の運命決定に重要な *TTG1* と結合し、その活性を抑制する。一方で、*S* 期の進行を制御する *CDC10-DEPENDENT TRANSCRIPT1a (CDT1a)* は競合的に *GEM* と結合することで、*TTG1* と *GEM* の結合を阻害し、*TTG1* を活性化させる (Caro et al., 2009)。*CDT1a* は *E2F* によって *S* 期で発現が誘導され、*G2* 期後期で 26S プロテアソームによりタンパク質が分解される (Castellano et al., 2004; Yin et al., 2014)。そのため、*G2* 期が長い非根毛細胞では *CDT1a* の分解のタイミングが遅れ、*GEM* と結合することで *TTG1* が活性化される時間が長くなり、非根毛細胞としての運命決定が確実に行われている可能性が考えられる (図 4-2)。これを検証するために、今後は *Rep-MYB* の変異によって非根毛細胞の *G2* 期の長さが短くなった際に、*CDT1a* のタンパク質量が変化するかを確認する必要がある。また、*Rep-MYB* と *GEM* や *CDT1a* の遺伝学的な関係性を検証することで、この仮説が正しいのかを検証できると期待される。

動物でも、細胞周期の長さが細胞の運命決定に重要である例が報告されている。ヒト ES 細胞で *D* 型サイクリンを過剰発現させることで *G1* 期の長さを短くすると、神経外胚葉よりも外胚葉や中胚葉へ分化しやすくなり、逆に *D* 型サイクリンのノックダウンによって *G1* 期の長さを長くすると、外胚葉や中胚葉よりも神経外胚葉へ分化しやすくなることが報告されている (Siim et al., 2013; Dalston et al., 2015)。また、iPS 細胞の *G1* 期の長さにはばらつきがあるが、*G1* 期が長い細胞は神経外胚葉へ、*G1* 期が短い細胞は中胚葉へ分化しやすいという報告もある (Jang et al., 2019)。CDK や CKI の誘導過剰発現により分化誘導前の *G1* 期の長さを変化させても、*G1* 期の長さによって細胞の運命決定に違いが見られる (Jang et al., 2019)。具体的な分子メカニズムとしては、転写活性化エピジェネティックマーク 5-hydroxymethylcytosine (hmC) の量が *G1* 期の進行とともに増加するため、*G1* 期が長くなると神経外胚葉分化に必要な遺伝子の発現量が上がることが報告されている (Jang et al., 2019)。本研究では、*G1* 期ではなく、*G2* 期の長さが根毛形成能と相関することが示唆されたが、この場合もエピジェネティックマークの量的変化が細胞周期と細胞運命の関連性を理解する上で鍵となる可能性が考えられる。植物でも細胞周期進行とともに変化するエピジェネティックマークが報告されているので、今後は表皮の細胞タイプによって異なる挙動をとり、かつ、*G2* 期の進行と共に増加または減少するエピジェネティックマークに着目して研究を進めていきたい (Caro et al., 2009)。H3K4me3 や H3K37me3 レベルが根毛細胞と非根毛細胞で異なることが報告されていることから、可能性の一つとしてこれらのエピジェネティックマークが候補である (Deal et al., 2020; Ikeuchi et al., 2015)。

根毛は根の表面積を増加させ、土壌中の栄養素や水の吸収を効率的に行うために重要な器官である。近年、リンや窒素などの外部栄養環境に応答して表皮の細胞運命が

変化し、根毛の数が増える例が報告されている(Tanaka et al., 2014; Canales et al., 2016; Bhosale et al., 2018)。今後、このような例の中に、G2 期の長さが増えているケースが見つければ、G2 期の長さを介した表皮細胞の運命制御が植物の成長・生存戦略としてどのような意味があるのかという点に関して、さらに理解が深まると期待される。



非根毛細胞

根毛細胞

図4-1. 本研究で明らかになった根の表皮の細胞周期および運命決定を制御する分子機構
 非根毛細胞の運命獲得に重要であるGL3とEGL3は、細胞運命だけでなく、Rep-MYBのタンパク質の安定性を制御することによってG2期の長さも制御している。また、本研究によって、非根毛細胞の長いG2期は非根毛細胞の運命を維持する役割があることが示唆された。

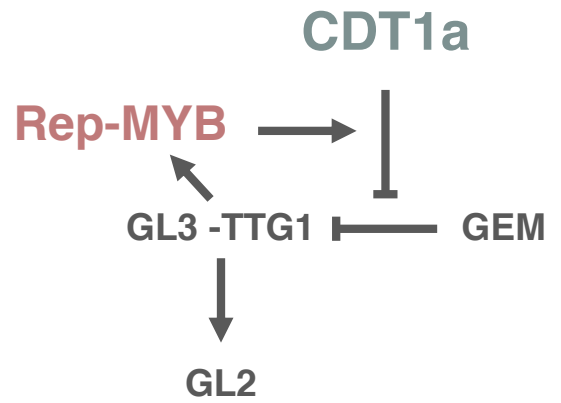
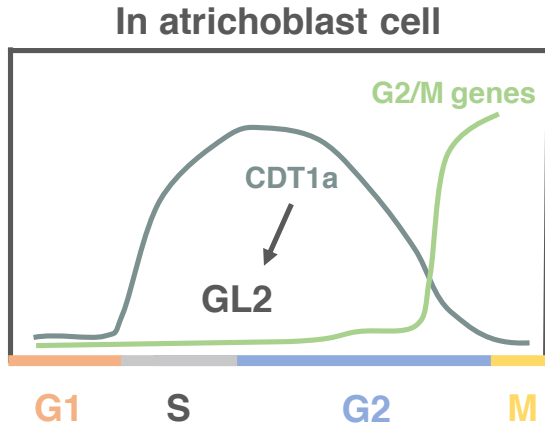


図4-2. 本研究で予想された、細胞周期の長さによる根の表皮の細胞運命制御の分子機構
 GEMはGL3-TTG1の活性を抑制することが報告されている。また、G2/M移行の際に分解される CDT1aは、GEMによるGL3-TTG1の活性抑制を阻害する。よって本研究で明らかになった、Rep-MYBによるG2期の遅延によって、CDT1aの分解のタイミングが遅れることで、GEMによるGL3-TTG1の抑制能が低下し、GL2の転写が活性化することが予想される。

第3章

細胞間コミュニケーションによる 幹細胞維持機構の解明

1. 序論

CDK 活性化キナーゼを誘導的にノックダウンすると、CSC が分化することから、CDK 活性が幹細胞性の維持に重要であると考えられている(Umeda et al., 2000)。また、D 型サイクリン *cycd1;1 cycd3;3* 二重変異体でも CSC の分化が観察されることから、CDK がサイクリンと複合体を形成して、幹細胞を維持していることが考えられる(Forzani et al., 2014)。細胞周期の進行制御においてサイクリン-CDK 複合体は RBR をリン酸化することで活性を抑制する。CDK 活性が低下している植物体とは逆に、RBR のノックダウン植物体では幹細胞の数が増えることから、CDK が RBR を介して幹細胞を維持している可能性が示唆されている(Wildwater et al., 2005)。また、CDK 活性化キナーゼや RBR の過剰発現植物体では、根端の幹細胞ニッチに存在する全ての幹細胞が分化することから、CDK と RBR による幹細胞性の維持は、幹細胞間で共通していると考えられる(Umeda et al., 2000; Wildwater et al., 2005)。

QC で発現する WOX5 タンパク質は、CSC へ移動し、幹細胞性の維持に機能することが知られている(Pi et al., 2015)。CSC において、WOX5 は TOPLESS (TPL) や HISTONE DEACETYLASE 19 (HDA19)と複合体を形成し、CYCLING DOF FACTOR 4 (CDF4)の発現を抑制する(Pi et al., 2015)。一方で、分化コルメラ細胞には、WOX5 が移動しないため、CDF4 が発現し、細胞分化が起こると考えられている(図 1-8)。しかしながら、CDF4 の機能欠損変異体を用いた表現型解析は報告されておらず、CDF4 の機能欠損変異が *wox5* 機能欠損変異体の表現型を抑圧するかなどの遺伝学的解析は未だ行われていない。

CSC の維持に移動性のペプチドホルモンが関与しているという報告もある。CLAVATA3/ESR (CLE)-RELATED PROTEIN 40 (CLE40)は、茎頂の幹細胞を制御するペプチドホルモン CLAVATA3 (CLV3)のホモログであり、根端の分化コルメラ細胞で発現し、分泌される(図 1-8)(Stahl et al., 2009)。CLE40 受容体の ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4)は CSC と一層根端側の細胞層で発現しており、CLE40 を受容した後、その下流シグナルはコルメラ細胞の分化を促進する。

以上のように CSC を正しく維持するには、WOX5 や CLE40 などの細胞間を移行する因子が重要であるが、一方で CSC においては CDK の活性が高いレベルで維持されている必要があると考えられる。しかし、細胞間移行因子がどのように CDK 活性を制御しているかは不明である。CDK タンパク質は根端で一様に

強く発現していることから、CSC 特異的な CDK 活性の制御には翻訳後レベルの制御系が機能している可能性が考えられる。そこで本章では、CDK の阻害因子である *KRP* に着目し、CSC の分裂・分化の制御における役割を解明することを目的として研究を行なった。

2. 材料と方法

(1) 植物材料および培養条件

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いた。野生型として、Col-0を用いた。*krp1*、*krp2*、*krp3*、*krp4*、*krp5*、*krp6*、*krp7*、*krp1/2/3/4/7*はCaro et al. (2018)と同じ株を用いた。CDKA-DE、*krp4/6/7*、*krp3/4/6/7*、*krp4/6/7 CDKA-DE*はZhao et al.(2017)と同じ株を用いた。*wox5*はFisher et al.(2018)と同じ株を用いた。本研究で用いた変異体は、表3に示したプライマーを用いてジェノタイピングを行った。

MS培地上に播種した後、2日間4℃の暗室で春化处理をし、5日間、23℃のバイオトロンで、培養した。

また、ライブイメージングでは、MS培地上に播種した後、2日間4℃の暗室で春化处理をし、4.5日間、23℃のバイオトロンで、角シャーレで培養した後に、ガラスボトムディッシュ(IWAKI カバーガラスチェンバー; カタログ No. 5202-001)に移植し、その後、23℃のバイオトロンで12時間培養したものをサンプルとして使用した。

(2) 培地条件(植物)

MS 培地(1L)

ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類	4.6 g (1 袋分)
ショ糖	10 g
1000x ビタミンストック液	1.0 mL
MES (pH 安定剤)	0.5 g

以上を800 mLの蒸留水に加え、よく攪拌し、完全に溶かしKOHでpHを6.3に合わせた後、1Lに合わせた。そして、2個の1L三角フラスコに500 mLずつ分注し、プレートにする際は、それぞれの培地にPhytigelを2gずつ加えた。その後オートクレーブした。角型プレートに80 mlずつ分注した。ロスコビチン(Chemoscence)は1 mMになるように、MS培地に添加した。MG132(Chemoscence)は100 μMになるように、MS培地に添加した。

(3) 顕微鏡観察法

0.01 mg/ml Propidium Iodide (PI)液で封入したシロイヌナズナの根を倒立型共焦点レーザー顕微鏡 FV1000(Olympus)の 20 倍対物レンズを用いて観察した。撮影した写真を Image J (NIH)を使用して解析した。

(4) ルゴール染色

ルゴール染色には Lugol solution (SIGMA) を用いた。シロイヌナズナの根を Lugol solution に 30 秒浸し、滅菌水で 3 回洗浄した。染色した根を透明化液で封入し、Axioskop2 plus (Zeiss)の 40 倍対物レンズを用いて観察した。解析した写真を Windows フォトビューアー (Microsoft)を用いて解析した。

(5) mPS-PI 染色

mPS-PI 染色は Truenit et al (2008)に記載されている方法に従って行なった。50 % (v/v) メタノールと 10 % (v/v) 酢酸を用いて固定したシロイヌナズナの根を 1 % (v/v) 過ヨウ素酸で 40 分間処理した後に、Schiff reagent (100 mM sodium metabisulphite/ 0.15 N HCL/ 10 µg/ml Propidium Iodide)で 3 時間処理した。その後、70 % (v/v) 包水クロラルで封入したシロイヌナズナの根を倒立型共焦点レーザー顕微鏡 FV1000(Olympus)の 20 倍対物レンズを用いて観察した。撮影した写真を Image J (NIH)を使用して解析した。

(6) 形質転換植物の作出法

1) pKRP:KRP-GFP-3'UTR ベクターの構築

シロイヌナズナ野生型 Col-0 のゲノムから Primestar HS (Takara)を使用して KRP1-7 のプロモーター領域から 3'UTR 領域まで含むゲノム領域を増幅し、BP 反応により pDONR221 ベクターに導入した(Life Technologies)。クローニングに使用したプライマーセットを表 4 に示す。その後、KRP4 と KRP 5 は SLiCE 法 (Motohashi, 2015)により、KRP1、KRP2、KRP3、KRP6、KRP7 は in Fusion 法によって sGFP 配列を KRP 遺伝子のストップコドン直前に in-frame で挿入した。

その後、LR 反応により、pKRP:KRP-GFP-3'UTR を pGWB1 ベクターに導入した (Nakagawa et al., 2007)。

2) アグロバクテリウムの形質転換(エレクトロポレーション法)

キュベットを氷上で冷やし、コンピテントセルを氷上で溶かした。ジーンパルサーの電源を入れ、Manual を選択し、2.5 に合わせた。プラスミド 5 μ L をコンピテントセル(50 μ L)に加え、ミックスし、冷やしたキュベットに全量入れた。試験管を用意し、LB 培地を 1 mL ピペットマンに吸っておいた。キュベットを電極にセット、電気を流した。音がしたら、素早く 1 mL の LB 培地を加え、試験管に移した。そして再び、キュベットに LB 培地を 1 mL 加え、試験管に入れた(合計で LB を 2 mL 加えたことになる)。そして、試験管を 1 時間程度 30 °C で振盪した。その後、培養液を選択培地に塗布し、30 °C で培養した。

生育した菌をコロニーPCR して、ベクターを保持しているコロニーを選択した。

3) 植物の感染

アグロバクテリウムのコロニーから菌を少量とり、適当な抗生物質を含む LB 培地に植菌し、30 °C で前培養した。一晚培養した菌液を適当な抗生物質を含む 250 mL の LB 培地に移し、28 °C で本培養を行った。一晚培養した菌液を遠心管に移し、7000 rpm で 7 分間遠心した。上清を除き、5% ショ糖液を 300 mL 加え、懸濁した。300 mL ビーカーに silwet-77 を 150 μ L 加え、さらにそこに菌液を加え、感染液とした。感染液にシロイヌナズナ植物体を浸し、感染させた。この個体を T0 世代とした。

4) 植物の育成

T0 世代から種子を取り、適当な抗生物質を含む MS 培地上に播種して、形質転換体の選抜を行い、シングルコピーを持つラインを取得した。

プライマー名	配列 (5'→3')
KRP1 LP	TGAAATTCTGATTGGTTCGAGC
KRP1 RP	CTGAAACGTCGACGTATCGAC
KRP2 LP	GATTTATTGGAAAAGCCAGCC
KRP2 RP	AGACTCTTCCTTAACCTGCGG
KRP3 LP	ATCAAACAAGCACCCGTGTAC
KRP3 RP	TAACGTGATCCCGACCACTAG
KRP4 LP	TGGTTAAAATTGAAACTGGCG
KRP4 RP	AAGATCAAACCGATAATTAGCAGG
KRP5 LP	GATTCATCCGATGAGCAAATG
KRP5 RP	CCAGAAAACAGCAGAAGCAAC
KRP6 LP	AATTTATTGTTCCGACCACCAC
KRP6 RP	ACACCAAACGACGAACTGTTC
KRP7 LP	CTTCCATTTTCAGATCTGGAGGTG
KRP7 RP	AAGTCATCAAGCTCTGCCTG
wox5-1 LP	TGGTCTAATGGTTGTTGATCAAG
wox5-1 RP	CTCCCGACATTTTCATCAATTC
SALK_LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
SAIL_LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC

表 3. プライマー配列一覧

本研究で用いたジェノタイピング用プライマー配列を示す。

プライマー名	配列 (5'→3')
KRP1 all for attB1	AAAAAGCAGGCTTTtactagaaaaaccgagacgag
KRP1 all rev attB2	AGAAAGCTGGGTAtcgcatatggttgacaac
KRP2 all for attB1	AAAAAGCAGGCTTTcggttaattaagtcgatcttg
KRP2 all rev attB2	AGAAAGCTGGGTAgcacttgtctcacgtaccac
KRP3 all for attB1	AAAAAGCAGGCTTTgaaattgtgccacgcaaaacc
KRP3 all rev attB2	AGAAAGCTGGGTAgtagacggctagatgtagg
KRP4 all for attB1	AAAAAGCAGGCTTTcactgcatacattaagtgg
KRP4 all rev attB2	AGAAAGCTGGGTAactgaaaccgaagtatgac
KRP5 all for attB1	AAAAAGCAGGCTTTtctctcattagtacacaac
KRP5 all rev attB2	AGAAAGCTGGGTAaccgatgagcaaatgatctaaag
KRP6 all for attB1	AAAAAGCAGGCTTTcatagtggtaactggaacatc
KRP6 all rev attB2	AGAAAGCTGGGTAgaaccagatcctaattcag
KRP7 all for attB1	AAAAAGCAGGCTTTggatgaaaattaacgaagagtc
KRP7 all rev attB2	AGAAAGCTGGGTAaatcatgccccattactgcg

表 4. プライマー配列一覧

本研究で用いた KRP のクローニング用プライマー配列を示す。

3. 結果

(1) コルメラ幹細胞の未分化性の維持には CDKA 活性が重要である

過去の研究で、誘導的に CDK 活性を低下させた場合に根端分裂組織の幹細胞が分化することから、幹細胞性の維持に CDK 活性が重要であることが示唆されてる(Umeda et al., 2001)。そこでまずこの知見の確認を行うために、発芽後 6 日目の野生型植物に CDK の阻害剤であるロスコビチンを処理し、根端分裂組織の観察を行った。mPS-PI 染色を用いて細胞壁と分化コルメラ細胞の指標であるアミロプラストを可視化した。その結果、未処理区のほとんどの個体では、QC 直下に位置する CSC 層のみがアミロプラストを有していなかった (図 3-27 A,B)。少数の個体ではアミロプラストを有していない細胞層が二層あるものもあったが、これは幹細胞が分裂終了してから、QC と接していない下側の娘幹細胞が分化を開始する前の状態であると考えられる。一方で、1 μ M のロスコビチンを 12 時間処理した場合は、QC 直下の CSC 層におけるアミロプラストの蓄積が 16 % の個体で観察された(図 3-27 B)。以上のことから、過去の知見通り、CDK 活性が幹細胞の未分化性の維持を制御していることが確認できた。

植物の CDK のうち、主に細胞周期を直接的に制御するのは、*CDKA* と *CDKB1*、*CDKB2* の三種類である。そこで次に、どの CDK 活性がコルメラ幹細胞の維持に重要であるかを調べるために、CDK の変異体を用いて表現型観察を行なった。*CDKB2* の変異体は単離されていないため、*CDKA* と *CDKB1* の表現型解析を行った。シロイヌナズナに 1 コピー存在する *CDKA;1* の機能欠損変異体は致死であることが報告されている。そこで本研究では *CDKA;1-DE* (*CDKA;1* の活性抑制リン酸化部位に擬似リン酸化アミノ酸を導入した変異型 *CDKA;1*)を *cdka;1* 欠損変異体に導入した植物(以下、*CDKA-DE* とする)を用いた。ルゴール染色を用いて、発芽後 6 日目の植物体のアミロプラストを可視化したところ、*CDKA-DE* では QC 直下の CSC 層にもアミロプラストが蓄積している個体の割合が増加していた(図 3-28 A,B)。一方で、シロイヌナズナで 2 コピー存在する *CDKB1;1* と *CDKB1;2* の二重変異体では、CSC 層でのアミロプラストの蓄積は観察されなかった(図 3-28)。野生型植物と比較して、アミロプラストが蓄積していない細胞層が二層の個体の割合が減少していたことから、この二重変異体では幹細胞の分

裂頻度が変化している可能性が考えられる(図 3-28 A,B)。以上の結果から、CDKA 活性が幹細胞の未分化性の維持に重要であることが示唆された。

(2) KRP4 と KRP7 がコルメラ細胞の分化に関与する

シロイヌナズナの *CDKA;1* は根端の全ての細胞で一様に強く発現していることが報告されている(Adachi et al., 2007)。また、多くのサイクリン遺伝子も根端細胞の全ての細胞で一様に発現している(Sanz et al., 2011; Forzani et al., 2014; Barrada et al., 2019)。そこで本研究では、*CDKA;1* 活性をタンパク質レベルで制御する鍵因子として CDK 阻害因子の KRP に着目し、解析を行なった。

シロイヌナズナには、7 種類 *KRP* 遺伝子(*KRP1-KRP7*)が存在する。まず、KRP の幹細胞維持における役割を解析するために、35S プロモーター制御下で *KRP1*、*KRP3*、*KRP6*、*KRP7* を過剰発現する植物体の表現型を観察した。発芽後 6 日目の植物体の根端を、ルゴール染色によってアミロプラストを可視化したものを観察した結果、全ての過剰発現体で CSC におけるアミロプラストの蓄積が確認された(図 3-29 A,B)。このことから、KRP はコルメラ細胞の分化を促進する、または CSC の未分化性を抑制する機能を有している可能性が考えられた。

次に、*KRP* 全ての単一機能欠損変異体を用いて根端の観察を行った (Cao et al., 2018)。その結果、*krp4* 変異体と *krp7* 変異体では、野生型植物と比較して、アミロプラストを蓄積していない CSC 層が二層になっている個体の割合が増加していた(図 3-30 A,B)。そこで、*krp4 krp7* 二重変異体を作成し、同様に根端の観察を行なったところ、アミロプラストを蓄積していない CSC 層が二層になっている個体が増加したことに加え、CSC 層が三層になっている個体も出現することが明らかとなった(図 3-31 A,B)。また、*krp4* と *krp7* の変異を含む *krp4 krp6 krp7* 三重変異体、*krp3 krp4 krp6 krp7* 四重変異体、*krp1 krp2 krp3 krp4 krp7* 五重変異体でも *krp4 krp7* 二重変異体と同様な表現型を示した(図 3-31 A,B)。これらの結果から、主に *KRP4* と *KRP7* がコルメラ幹細胞の層数の制御に関与していることが示唆された。

(3) KRP4 と KRP7 は分化コルメラ細胞で発現している

上記のように、*KRP* の過剰発現は *KRP* の種類にかかわらず CSC の分化を促進したが、*KRP* 欠損変異体では *krp4*、*krp7* およびその多重変異体のみが表現型を示した。このことから、コルメラ幹細胞の維持においては、各 *KRP* の特異的な機能ではなく、時空間的な発現制御が重要であると考えられた。そこで、eFP browser (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)を用いて、根の各細胞タイプにおける *KRP* の mRNA の相対的発現量を解析した。その結果、*KRP4* と *KRP7* は、コルメラ細胞で強く発現していることが明らかになった(図 3-32)。

次に、各 *KRP* のタンパク質レベルの発現パターンを調べるために、レポーターラインを作出した。過去の報告では、3'UTR 領域が *KRP* の発現制御に重要であることが報告されている (Schiessl et al., 2014)。そこで、転写開始地点 (transcription start site: TSS) から 3 kb 上流もしくは、3 kb 上流以内に他の遺伝子がある場合はその遺伝子の転写終了地点から TSS までをプロモーター領域と定義し、各 *KRP* 遺伝子のプロモーター領域から 3'UTR 領域までを含むゲノム断片を取得し、*GFP* 遺伝子を C 末端側に in-frame で挿入したレポーター遺伝子を作成した。発芽後 6 日目の植物体の根端を、PI 染色して観察した結果、*KRP1* は根端の剥離が起きている最外層のコルメラ細胞で、*KRP2* は内鞘細胞および維管束領域で、*KRP3* と *KRP5* は幹細胞ニッチよりも基部側の分裂領域で、*KRP6* は維管束と内鞘細胞以外の分裂領域と最外層のコルメラ細胞で発現していた(図 3-33 A)。*KRP4* は根端全体で、*KRP7* は維管束領域で発現していたのにくわえて、コルメラ領域での発現が確認された(図 3-33 A)。さらに興味深いことに、*KRP4* と *KRP7* は CSC よりも分化コルメラ細胞で強く発現していることがわかった(図 3-31 B,C,D,E)。これと上述の変異体を用いた表現型解析の結果から、CSC が分裂した後、下側の娘細胞で *KRP4*、*KRP7* の蓄積量が上がることで、コルメラ細胞が分化すると考えられた。*KRP* は 26S プロテアソームによって分解制御を受けていることが報告されている (Verkest et al., 2005; Kim et al., 2008; Li et al., 2016)。そこで、*KRP* タンパク質の蓄積制御にタンパク質分解が関与しているかを調べるために、26S プロテアソーム阻害剤である MG132 をレポーターラインに処理し、発現パターンの観察を行った。発芽後 6 日目の植物体に 100 μ M の MG132 を 6 時間処理し、PI 染色を用いて細胞の形を可視化して観察したところ、コントロールとして用いた *CYCB1;1* のレポーターラインでは、MG132 処理により、根端で全体的に GFP 蛍光を発する細胞数の増加が見られた(図 3-34)。一方で *KRP4* と *KRP7* のレポーターラインでは、分化コルメラ細胞での蛍光強度の増加

は観察されたが、CSC での GFP シグナルの増加は確認することができなかった (図 3-34)。以上の結果から、*KRP4* と *KRP7* の CSC における蓄積抑制は、タンパク質分解制御は関与していないことが示唆された。

(4) *KRP4*、*KRP7* は遺伝学的に *CDKA;1* の上流で機能する

KRP4、*KRP7* が *CDKA;1* の活性制御を介してコルメラ細胞の分化を促進しているか調べるために、遺伝学的な解析を行なった。上述のように *krp4 krp6 krp7* 三重変異体では、アミロプラストを蓄積していないコルメラ細胞層の層数が増えている (図 3-35 A, B)。また、*CDKA;1* 活性が低下した *CDKA-DE* では、コルメラ幹細胞の分化が確認される (図 3-35 A, B)。一方で、*CDKA-DE krp4 krp6 krp7* 変異体を観察したところ、*CDKA-DE* 変異体と同様に、コルメラ幹細胞の分化が見られた (図 3-35 A, B)。コルメラ幹細胞の分化においては、*CDKA-DE* が *KRP* の欠損変異に対して遺伝学的に上位であったことから、*KRP4*、*KRP7* は *CDKA;1* の上流で機能していることが考えられた。

(5) *KRP4*、*KRP7* は遺伝学的に *WOX5* の下流で機能する

以前の研究により、転写因子 *WOX5* が QC 細胞で発現し、隣の細胞である CSC に移動して、幹細胞性の維持に機能することが報告されている (Pi et al., 2015)。*KRP4*、*KRP7* の発現は CSC で低く、分化コルメラ細胞で高いことから、*KRP4*、*KRP7* の発現が *WOX5* により制御されているかを調べるために遺伝学的な解析を行なった。

ルゴール染色によってアミロプラストを可視化した根を観察したところ、*wox5* 機能欠損変異体では、CSC の分化が観察された (図 3-36 A, B) (Pi et al., 2015)。次に、*krp4 wox5* 二重変異体及び *krp7 wox5* 二重変異体を作成し、同様に観察したところ、未分化な CSC 層がそれぞれ 40.6% および 62.5% の割合で出現した (図 3-36 A, B)。さらに *krp4 krp7 wox5* 三重変異体を作成したところ、*wox5* 変異体の表現型が完全に抑圧され、CSC 層が一層または二層もつ個体のみが出現した (図 3-36 A, B)。*krp4* 変異体、*krp7* 変異体、*wox5* 変異体は全て機能欠損型変異アレル

であり、*KRP4*、*KRP7* の変異は *WOX5* の変異に対して遺伝学的に上位であったことから、*KRP4*、*KRP7* は *WOX5* の下流で機能していることが考えられた。

WOX5 は *TPL*、*HDA19* と複合体を形成し、転写抑制因子として機能する(Pi et al., 2015)。そこで、*WOX5* が *KRP* の発現を制御するかを検証するために、HDA 阻害剤トリコスタチン A (TSA) を *KRP7* のレポーターラインに処理した結果、CSC 層での *KRP7* の発現が観察された(図 3-37)。また、*wox5* 変異体に *KRP7-GFP* を導入して観察を行なったところ、CSC 層での *KRP7* の発現が確認された(図 3-38)。以上の結果から、*KRP4* と *KRP7* は遺伝学的に *WOX5* の下流で機能しており、*KRP4* と *KRP7* の位置依存的な発現パターンは *WOX5* によって制御されている可能性が示唆された。

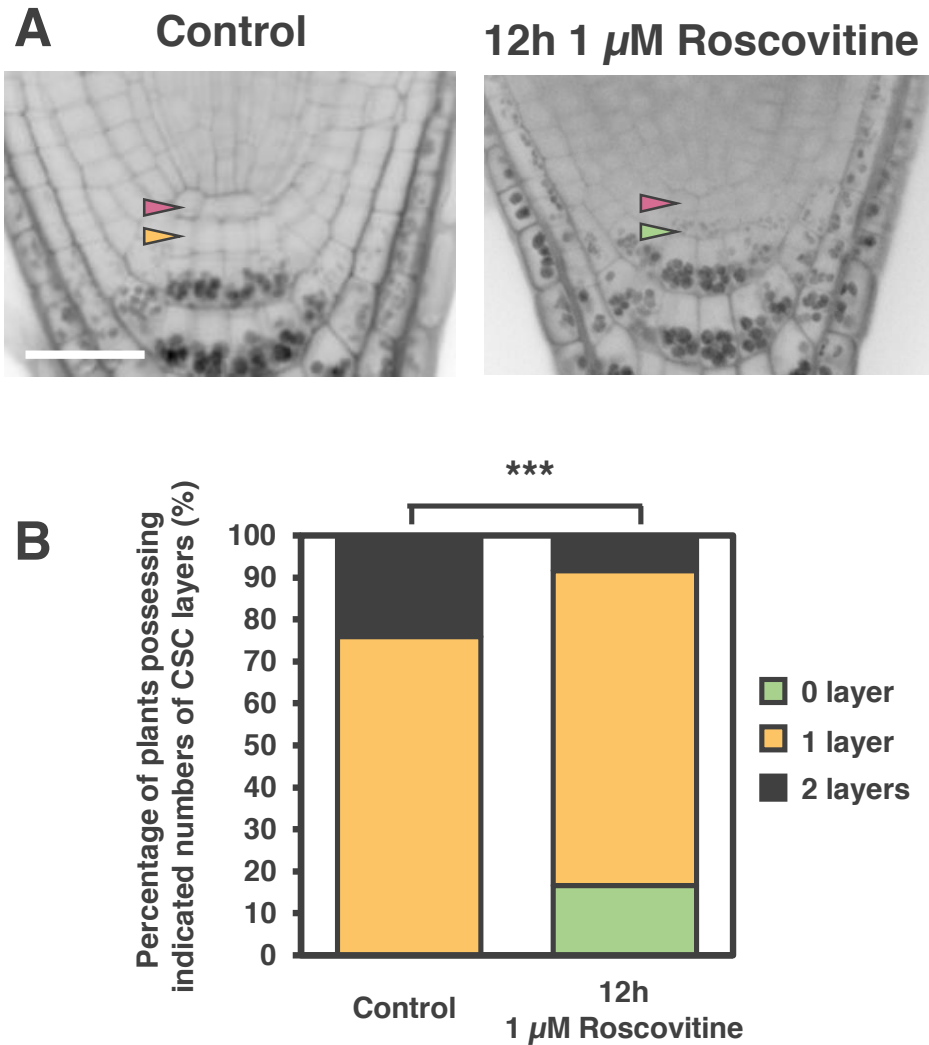


図3-27. ロスコビチン処理によるコルメラ幹細胞の分化

(A)野生型植物をMS培地に播種し、発芽後6日間生育させ、12時間1 μ Mロスコビチンで処理した。mPS-PI染色したものを観察した。赤い矢頭はQC、黄色い矢頭はアミロプラストが蓄積していない未分化なCSC層、緑の矢頭はアミロプラストが蓄積しているCSC層を示す。バーは20 μ m。

(B) Aの観察結果をもとにアミロプラストを蓄積していないCSC層の数ごとに個体を分類わけし、その割合を計算した。n > 10。***、p < 0.01

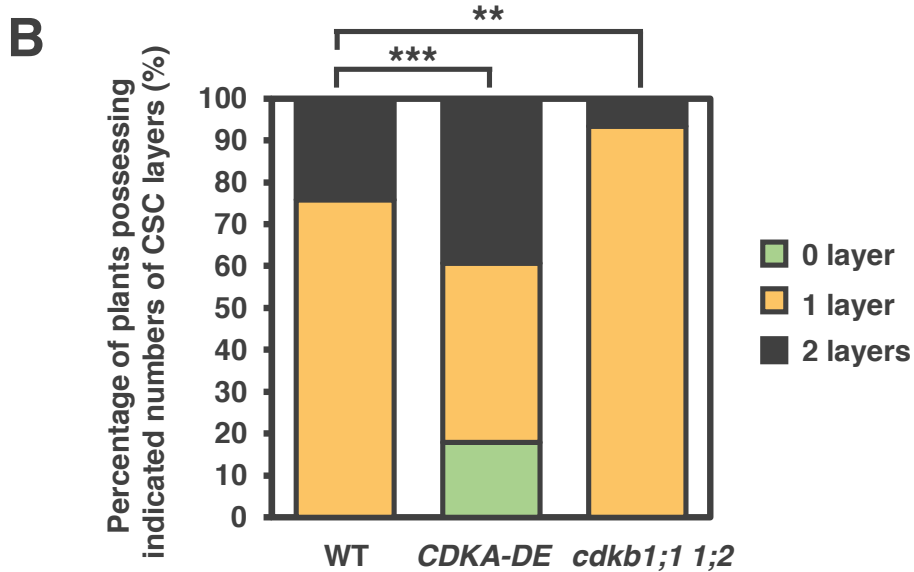


図3-28. *CDKA-DE*と*cdkb1;1 cdkb1;2*二重変異体のコルメラ幹細胞の表現型

(A) 野生型植物と*CDKA-DE*と*cdkb1;1 cdkb1;2*二重変異体をMS培地に播種し、発芽後6日間生育させた後、ルゴールにより染色して観察した。赤い矢頭はQC、黄色い矢頭はアミロプラストが蓄積していない未分化なCSC層、緑の矢頭はアミロプラストが蓄積しているCSC層を示す。バーは20 μm 。
 (B) Aの観察結果をもとにアミロプラストを蓄積していないCSC層の数ごとに個体を分類わけし、その割合を計算した。n > 30。***、p < 0.01。**、p < 0.05

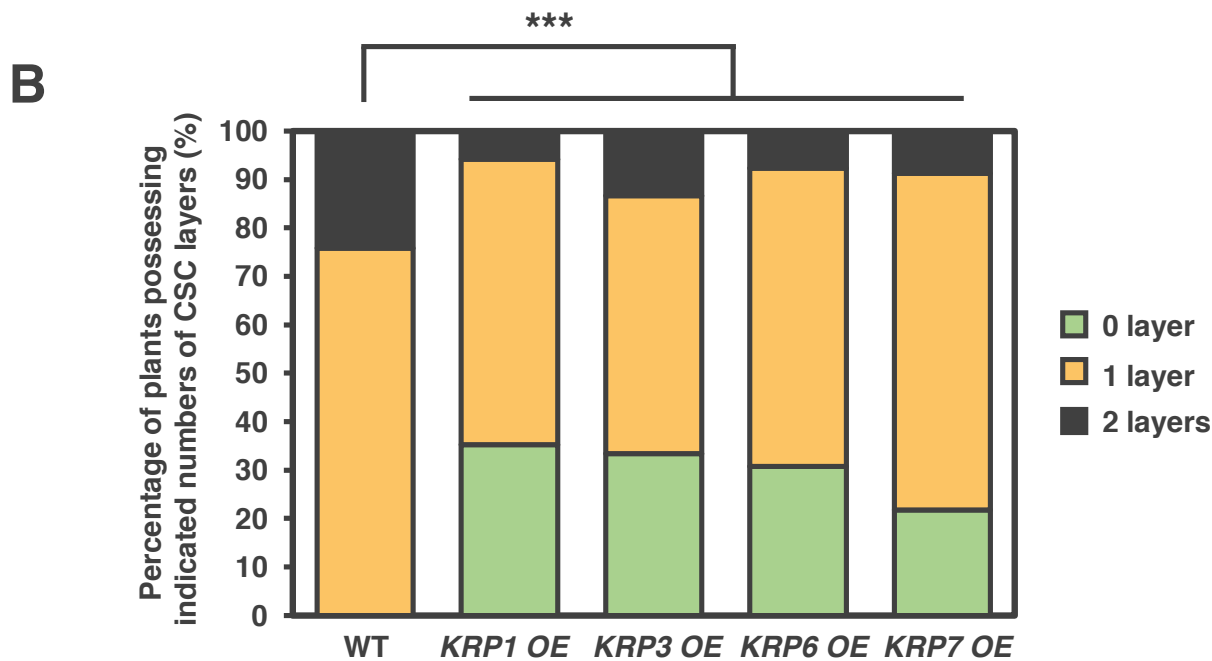
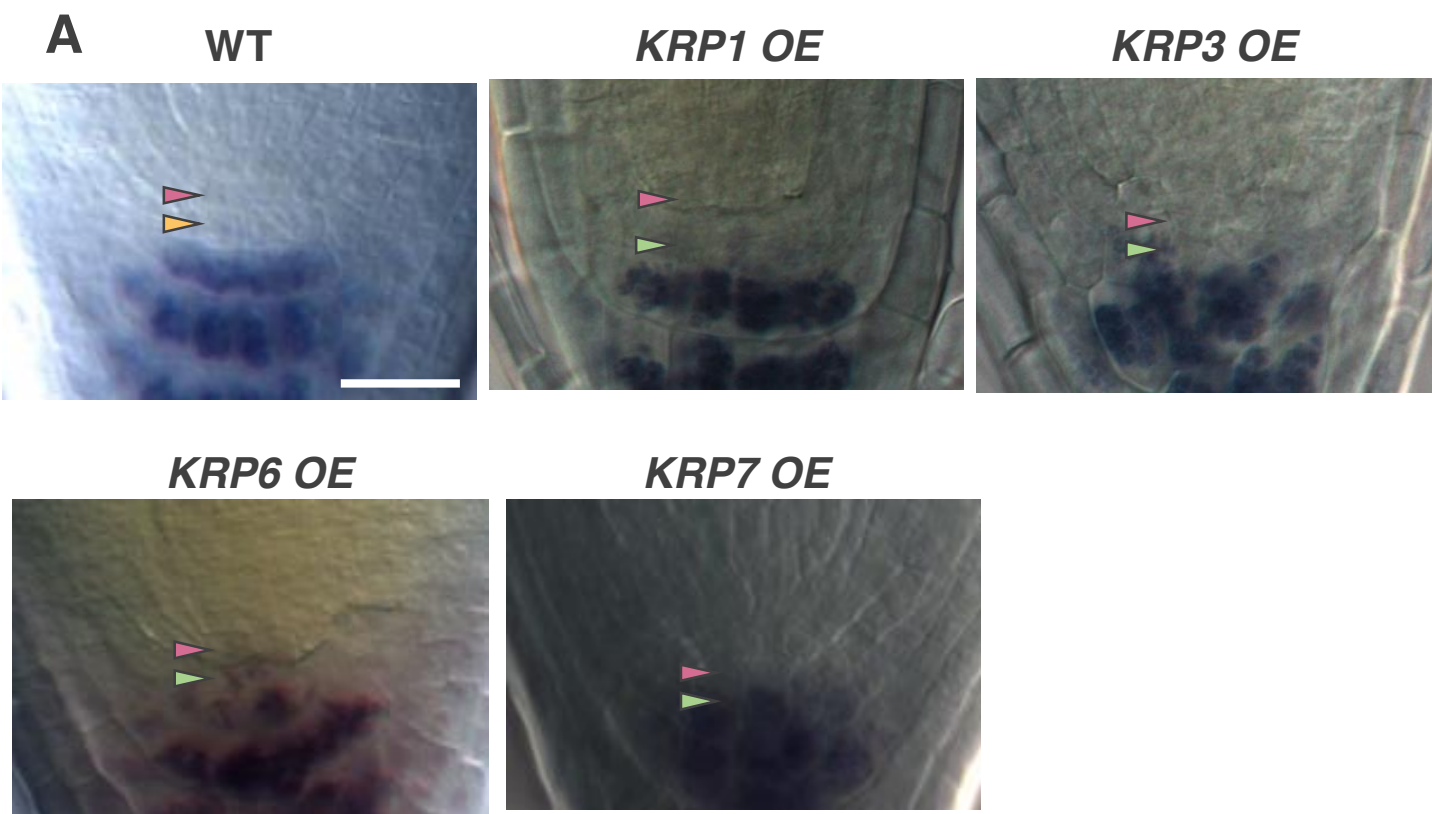


図3-29. KRP過剰発現体のコルメラ幹細胞の表現型

(A) 野生型植物と*KRP1*、*KRP3*、*KRP6*、*KRP7*の過剰発現体をMS培地に播種し、発芽後6日間生育させた後、ルゴールにより染色して観察した。

赤い矢頭はQC、黄色い矢頭はアミロプラストが蓄積していない未分化なCSC層、緑の矢頭はアミロプラストが蓄積しているCSC層を示す。

(B) Aの観察結果をもとにアミロプラストを蓄積していないCSC層の数ごとに個体を分類わけし、その割合を計算した。n > 30。***、p < 0.01

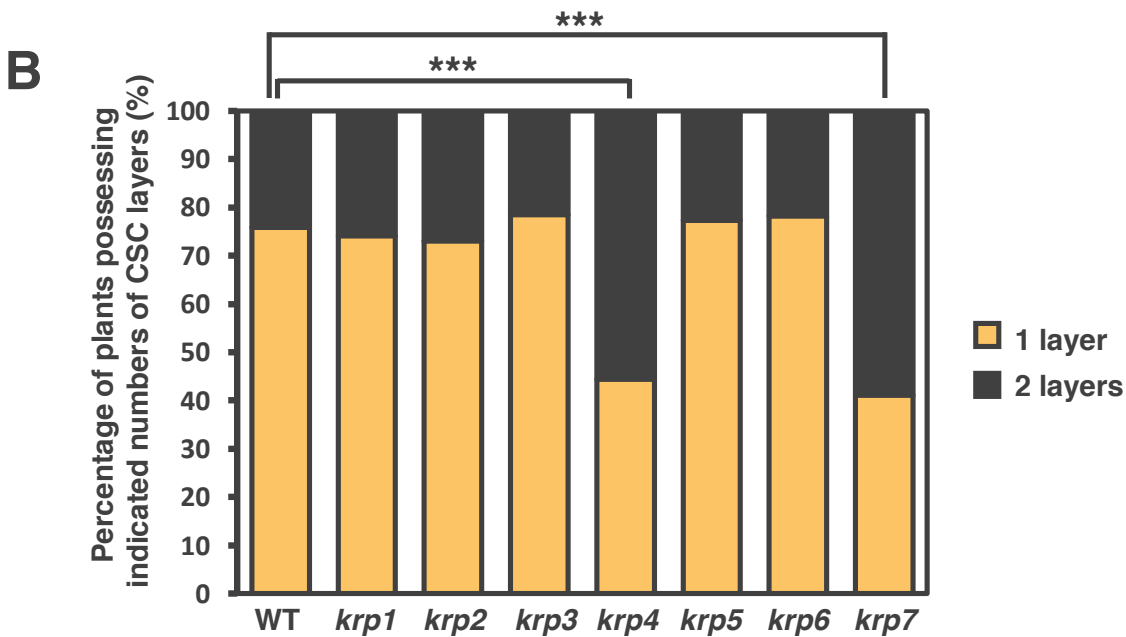
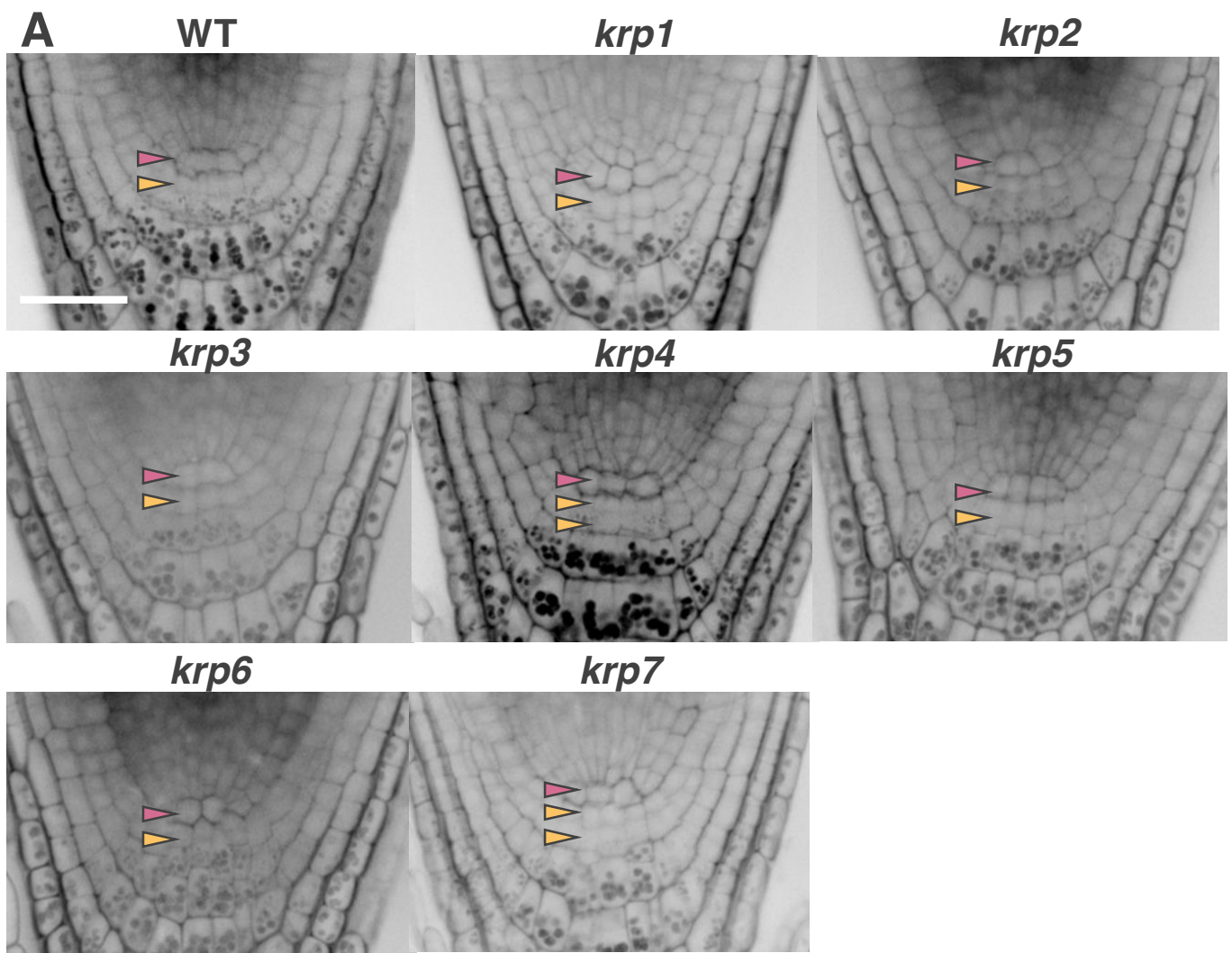


図3-30. *krp* 変異体のコルメラ幹細胞の表現型

(A)野生型植物と *krp* 単一変異体(*krp 1*、*krp 2*、*krp 3*、*krp 4*、*krp 5*、*krp 6*、*krp 7*)をMS培地に播種し、発芽後6日間生育させた後、mPS-PIにより染色して観察した。赤い矢頭はQC、黄色い矢頭はアミロプラストが蓄積していない未分化なCSC層を示す。バーは20 μ m。

(B) Aの観察結果をもとにアミロプラストを蓄積していないCSC層の数ごとに個体を分類わけし、その割合を計算した。n > 50。***、p < 0.01

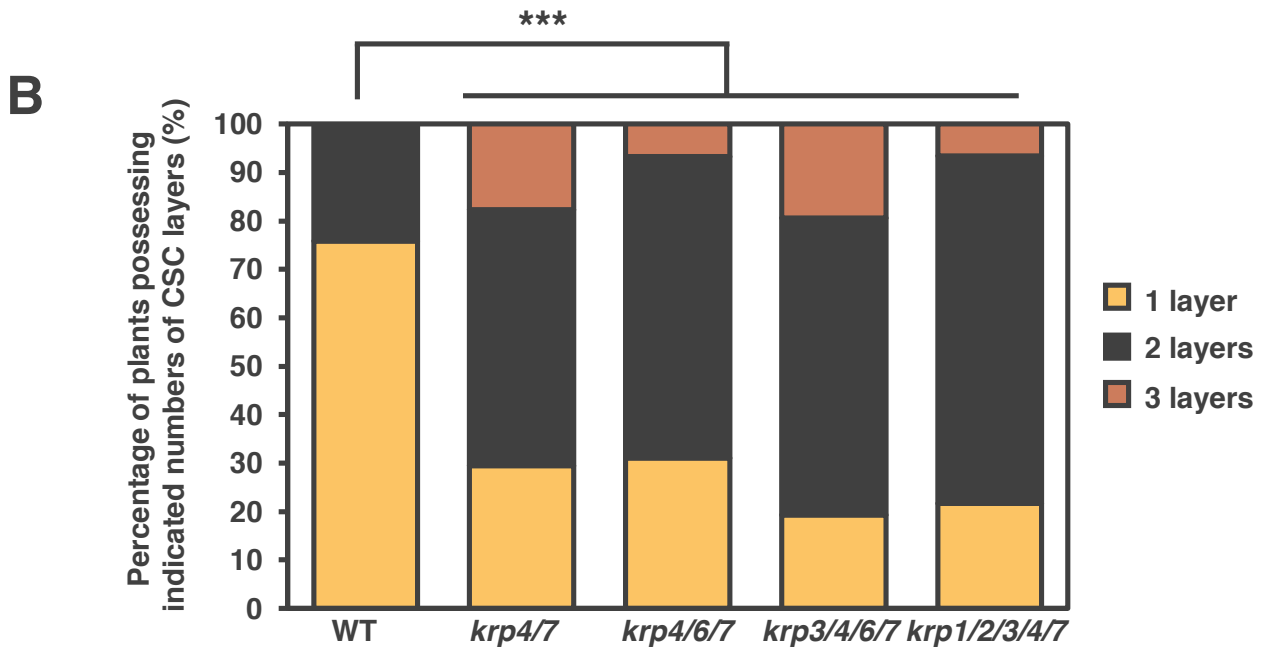
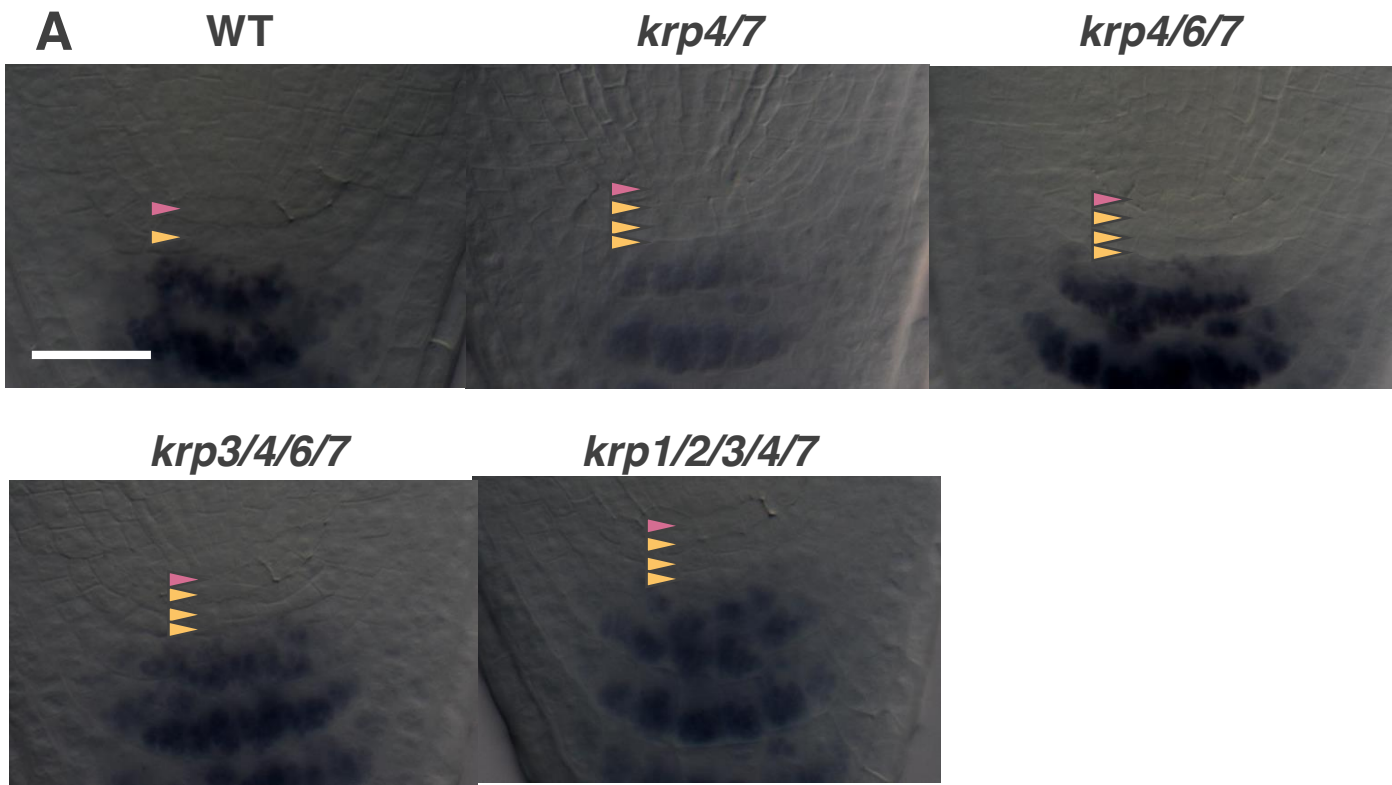


図3-31. *krp* 多重変異体のコルメラ幹細胞の表現型

(A) 野生型植物と *krp* 多重変異体(*krp4/7*、*krp4/6/7*、*krp3/4/6/7*、*krp1/2/3/4/7*) をMS培地に播種し、発芽後6日間生育させた後、mPS-PIにより染色して観察した。赤い矢頭はQC、黄色い矢頭はアミロプラストが蓄積していない未分化なCSC層を示す。バーは20 μ m。

(B) Aの観察結果をもとにアミロプラストを蓄積していないCSC層の数ごとに個体を分類わけし、その割合を計算した。n > 50。***、p < 0.01

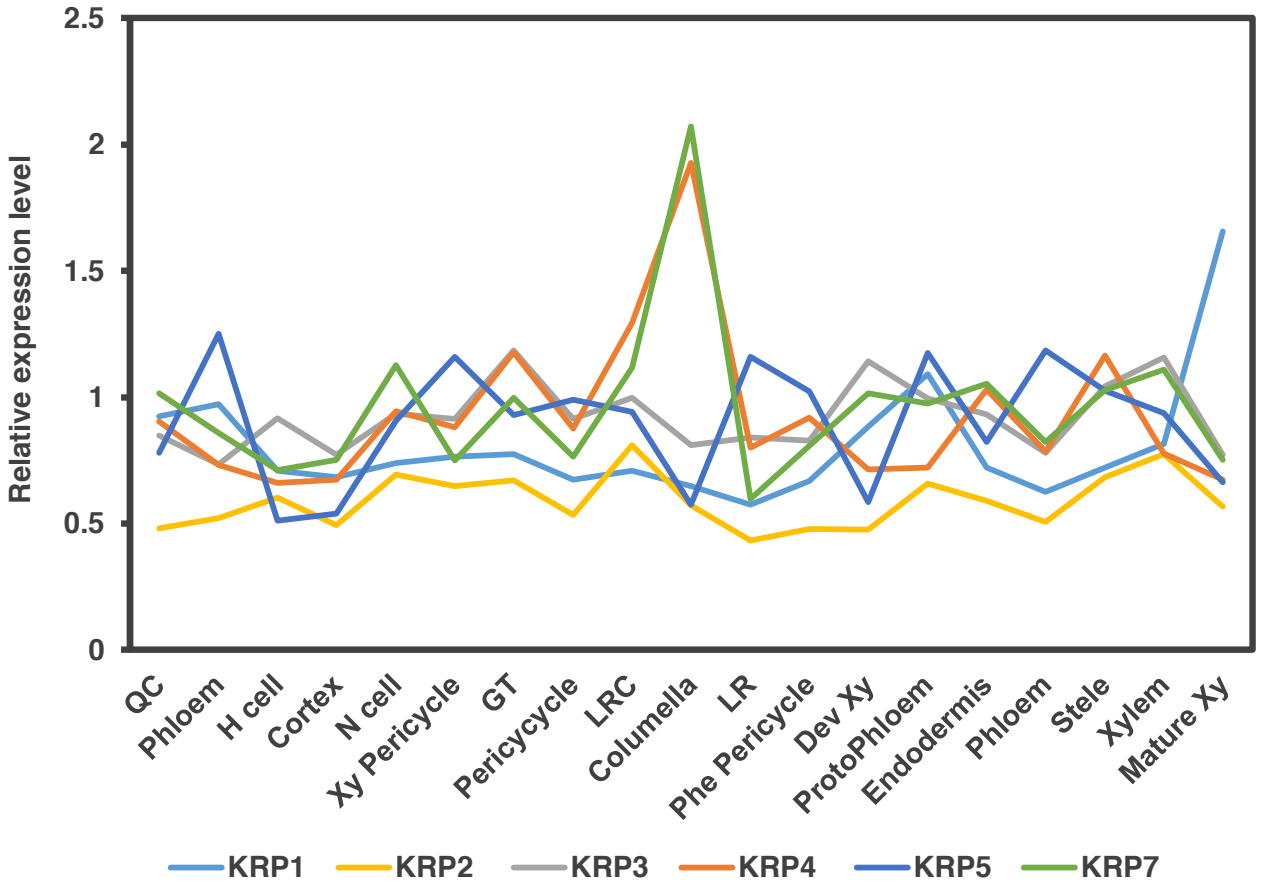
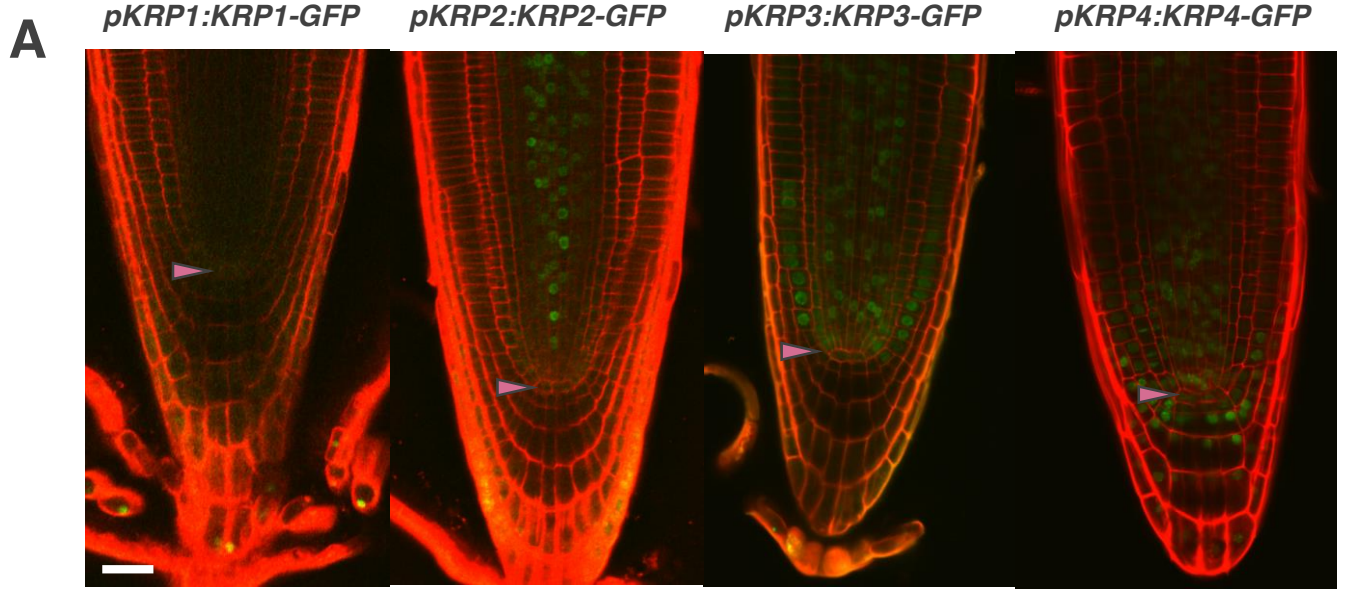


図3-32. 根の各細胞タイプにおける*KRP*遺伝子の発現量
 eFP browserのマイクロアレイデータを用いて解析した。*KRP6*はデータに含まれていないので、グラフに載せていない。H cellは根毛細胞、N cellは非根毛細胞、Xy Pericycleは導管細胞と接している内鞘細胞、GTは皮層細胞と内皮細胞、LRCは根冠、LRは側根、Phe Pericycleは師部細胞と接している内鞘細胞、Dev Xyは分裂領域の導管細胞、Mature Xyは分化導管細胞を示す。



pKRP5:KRP5-GFP *pKRP6:KRP6-GFP* *pKRP7:KRP7-GFP*

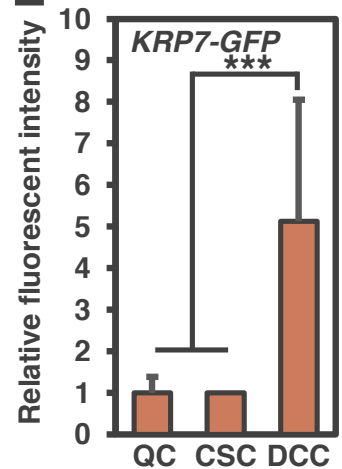
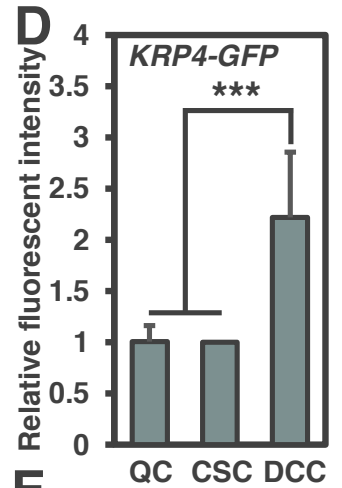
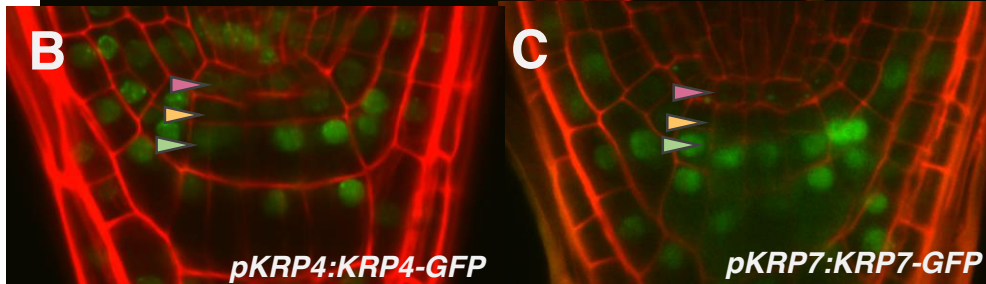
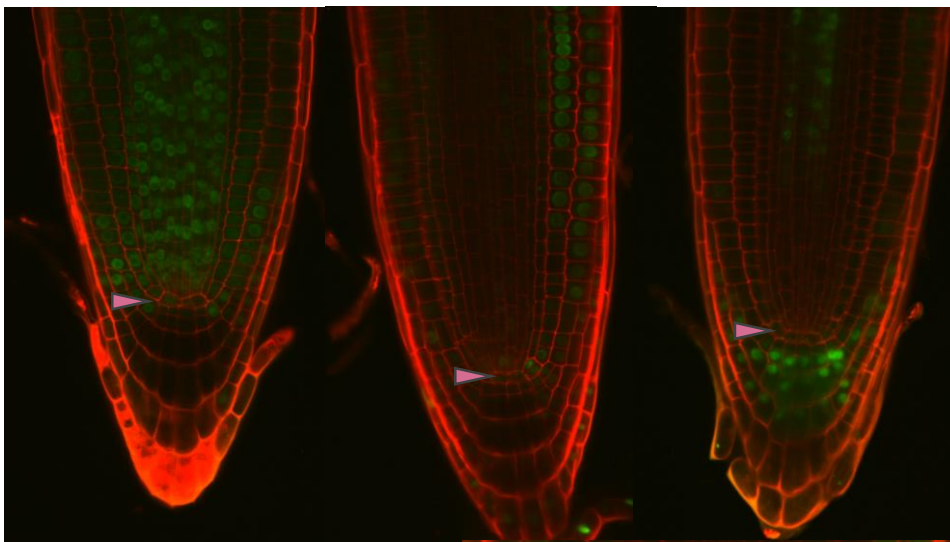


図3-33. 根端におけるの*KRP*のレポーター遺伝子の発現パターン

(A)プロモーターと3' UTR領域を含む各*KRP*のゲノム断片に*GFP*を融合したレポーター遺伝子を作成した。レポーターラインを発芽後6日間生育させ、PI染色したものを観察した。赤い矢印はQC細胞を示す。バーは20μm。

(B、C) *KRP4*と*KRP7*レポーターラインの拡大写真 赤い矢頭はQC、黄色い矢頭はQC直下の幹細胞、オレンジの矢頭は分化細胞を示す赤い矢印はQC細胞を示す。黄色い矢頭はCSC層、緑の矢頭は分化コルメラ細胞を示す。バーは20μm。

(D、E) BとCの観察結果をもとに*KRP4-GFP*と*KRP7-GFP*のQC細胞、CSC、CSCと接している分化コルメラでの蛍光輝度を定量し、CSCに対する相対的な蛍光輝度を計算した。QCはQC細胞、CSCはCSC層、DCCは分化コルメラ細胞を示す。n > 10. ***, p < 0.01。

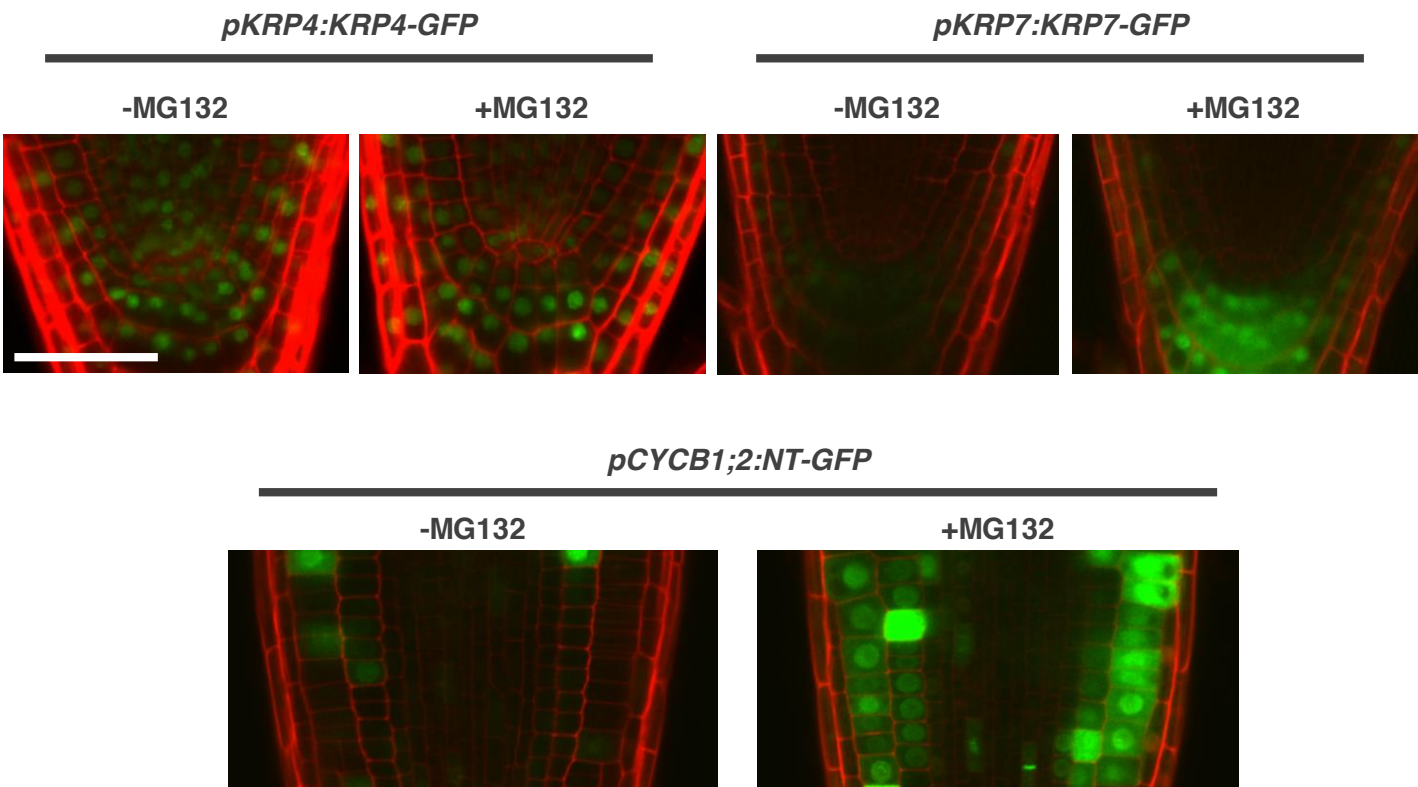


図3-34. MG132処理の有無によるKRP4-GFP、KRP7-GFPの蓄積様式の変化

図3-33で用いたレポーターラインを、発芽後6日間生育させ、6時間100 μ M MG132処理した後にPI染色した根端を観察した。ものを写真撮影した。MG132処理のポジティブコントロールとして、26Sプロテアソームによって発現が制御されている *pCYCB1;1:NT-GFP* を用いた。バーは20 μ m。

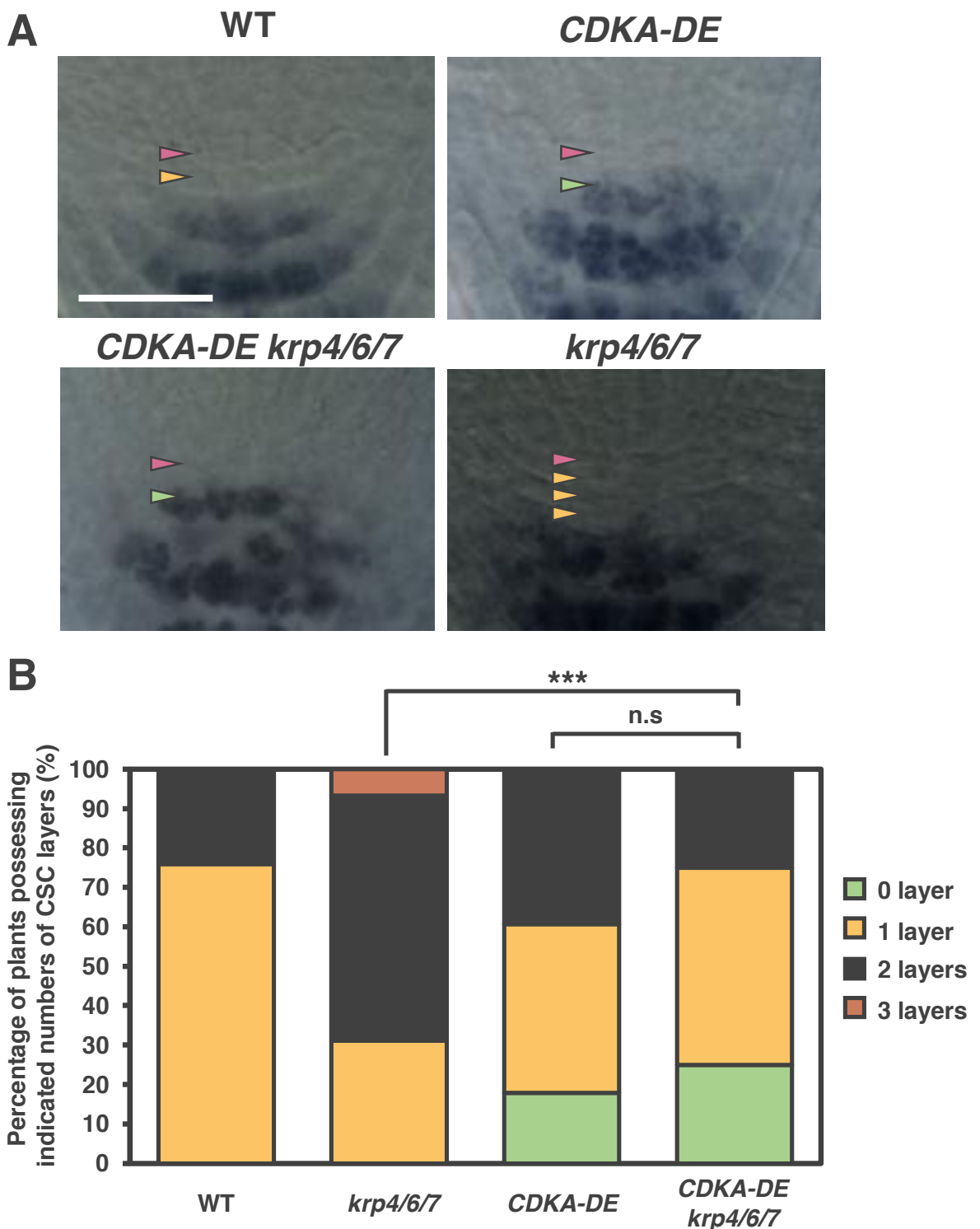


図3-35. *KRP*と*CDKA;1*の遺伝学的な相互作用の解析

(A)野生型植物と *krp4/6/7*、*CDKA-DE*、*CDKA-DE krp4/6/7*をMS培地に播種し、発芽後6日間生育させた後、mPS-PIにより染色して観察した。赤い矢頭はQC、黄色い矢頭はアミロプラストが蓄積していない未分化なCSC層を示す。緑の矢頭はアミロプラストが蓄積しているCSC層を示す。バーは20 μ m。

(B) Aの観察結果をもとにアミロプラストを蓄積していないCSC層の数ごとに個体を分類わけし、その割合を計算した。n > 50。***、p < 0.01。n.s、p > 0.05。

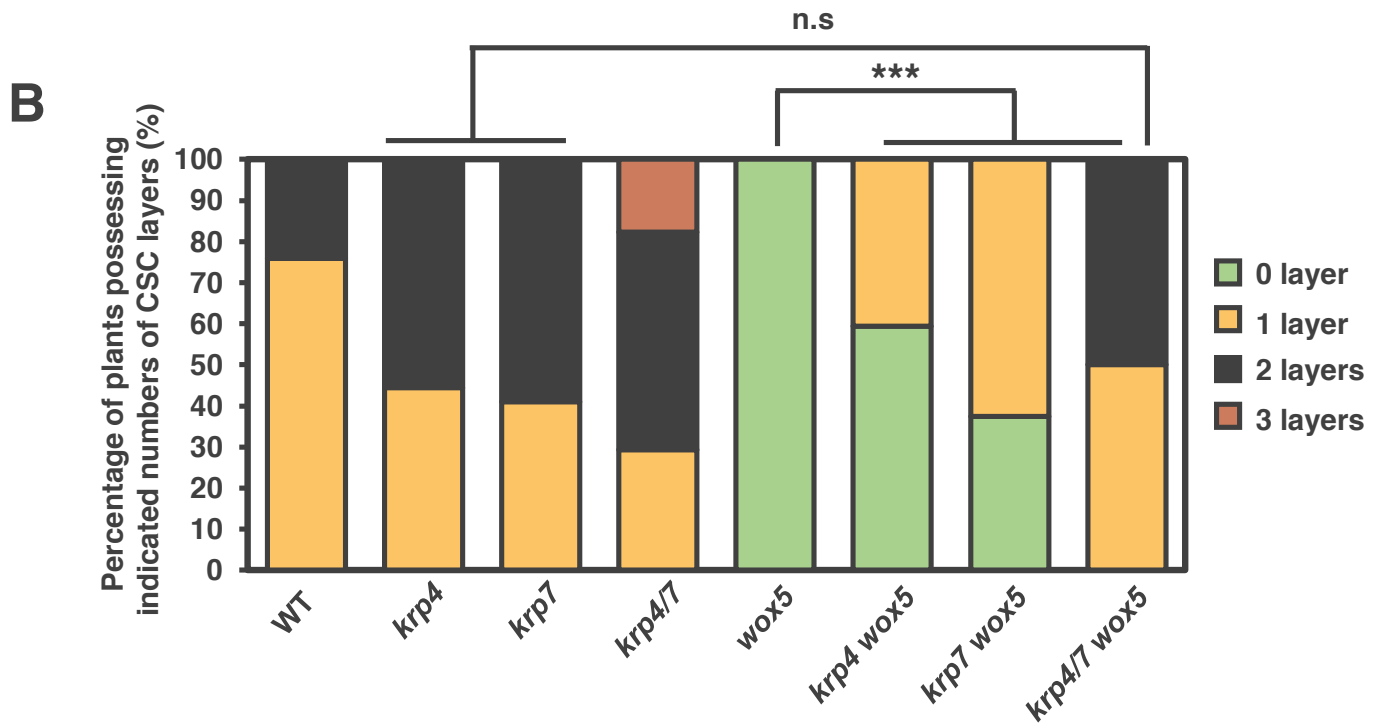
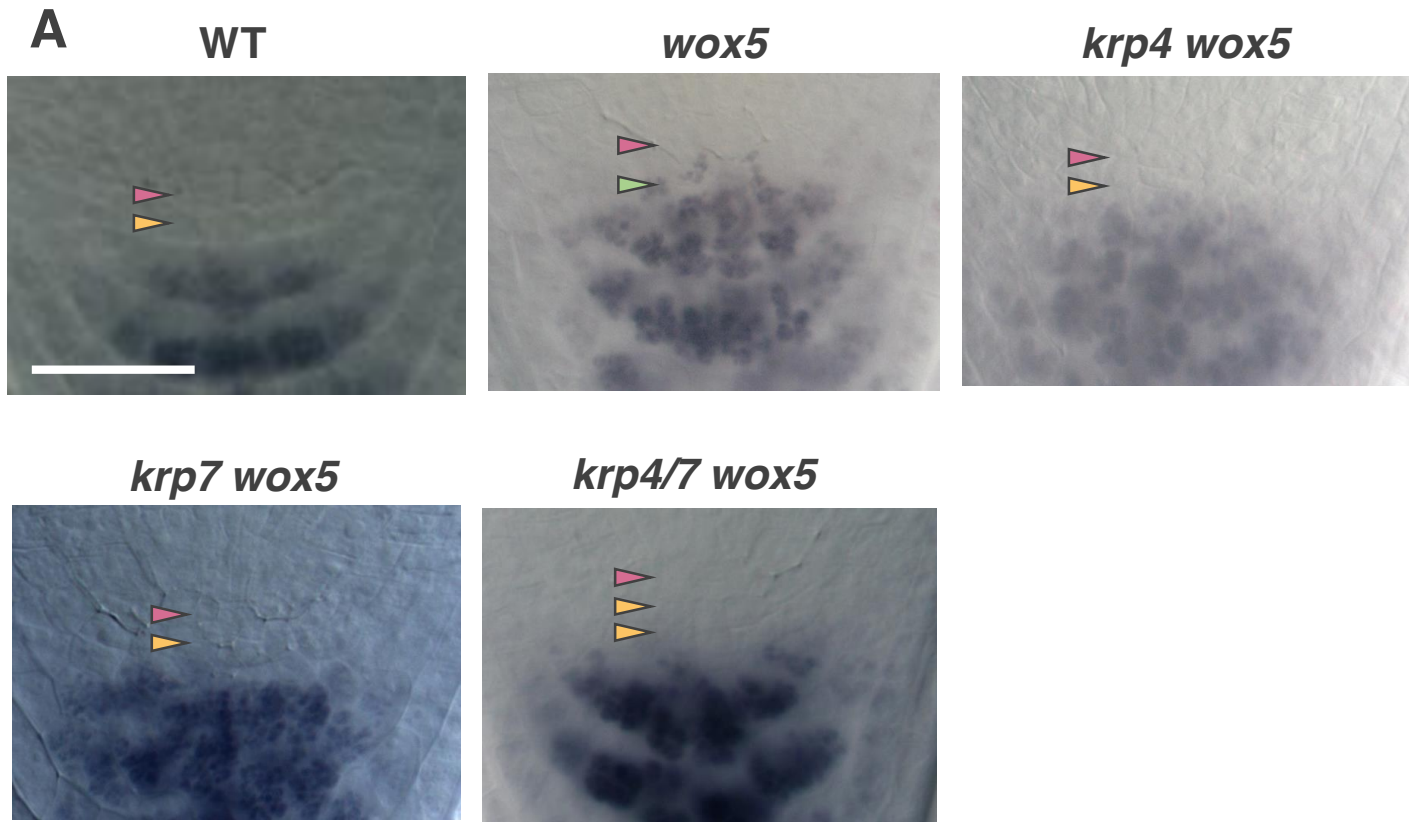


図3-36. *KRP*と*WOX5*の遺伝学的な相互作用の解析

(A)野生型植物と *krp4*、*krp7*、*krp4/7*、*wox5*、*krp4 wox5*、*krp7 wox5*、*krp4/7*をMS培地に播種し、発芽後6日間生育させた後、ルゴールにより染色して観察した。赤い矢頭はQC、黄色い矢頭はアミロプラストが蓄積していない未分化なCSC層を示す。緑の矢頭はアミロプラストが蓄積しているCSC層を示す。

バーは20 μ m。

(B) Aの観察結果をもとにアミロプラストを蓄積していないCSC層の数ごとに個体を分類わけし、その割合を計算した。n > 50。***、p < 0.01。n.s、p > 0.05。

pKRP7:KRP7-GFP

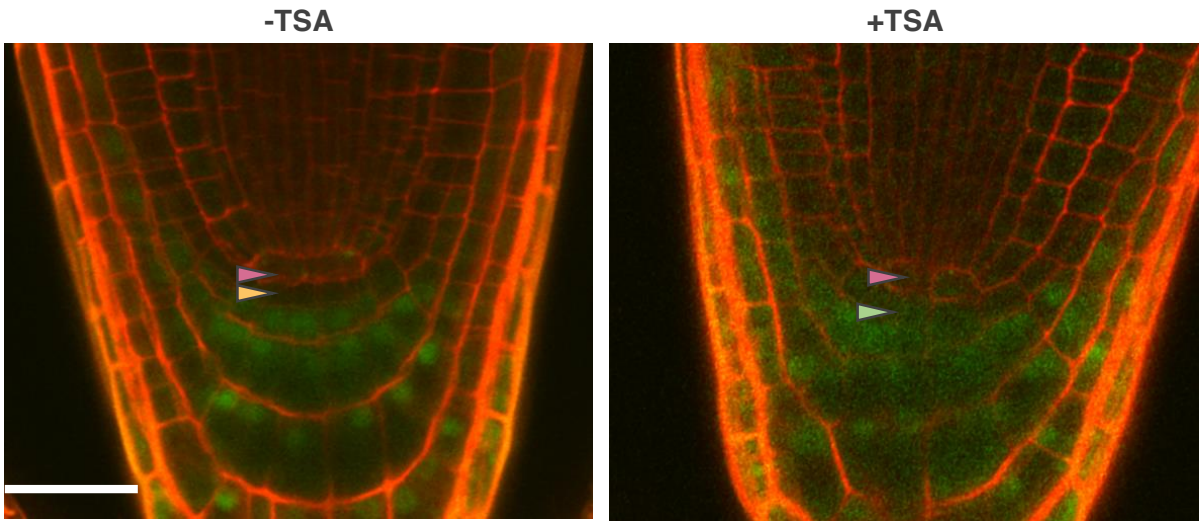
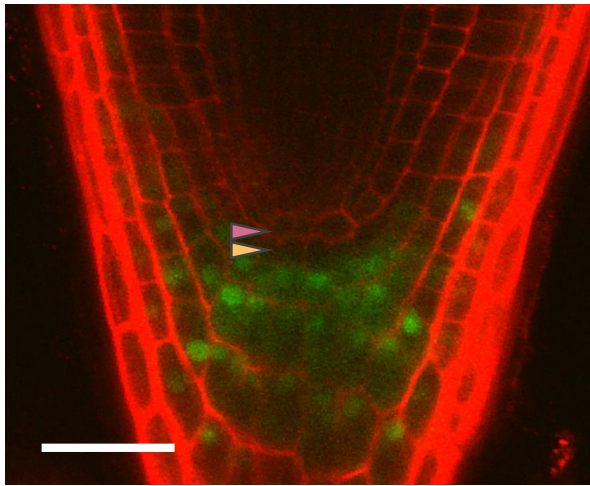


図3-37. TSA処理の有無による*KRP7-GFP*の発現様式の変化

図3-33で用いたレポーターラインを、発芽後6日間生育させ、24時間50 mg/ml TSA処理した後にPI染色した根端を観察した。赤い矢頭はQC、黄色い矢頭は*KRP7*が発現していないCSC層、緑の矢頭は*KRP7*が発現しているCSC層を示す。

バーは20 μ m。

pKRP7:KRP7-GFP



pKRP7:KRP7-GFP/wox5

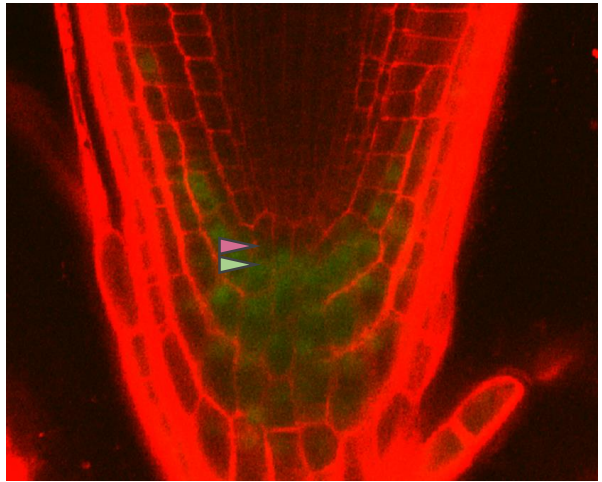


図3-38. *wox5*変異体における*KRP7-GFP*の発現様式

*pKRP7:KRP7-GFP*を導入した*wox5*変異体を、発芽後6日間生育させ、PI染色した根端を観察した。赤い矢頭はQC、黄色い矢頭は*KRP7*が発現していないCSC層、緑の矢頭は*KRP7*が発現しているCSC層を示す。バーは20 μ m。

4. 考察

(1) *KRP* による *CDK* の活性阻害を介したコルメラ細胞の分化制御機構

本研究では、シロイヌナズナ根端のコルメラ領域において、*CDK* 阻害因子である *KRP4/7* が *CSC* で発現が低く、分化コルメラ細胞で高発現していることを見出した。また、*KRP4/7* は *CDKA;1* の上流で働き、コルメラ細胞の分化を促進していることを示した(図 4-3)。*KRP4/7* は *in vitro* で *CDKA* や *CDKB* と結合し、それらの活性を抑制することが報告されている(Nakai et al., 2006)。したがって、*KRP4/7* は *CSC* が分裂した後に、*QC* 細胞と接していない下側の娘細胞で高発現し、*CDK* 活性を低下させることでコルメラ細胞の分化を促進すると考えられる。その結果、*CSC* 層は一層で維持されるのであろう。

今後の課題としては、*KRP4/7* がなぜ *CSC* で発現が低く、分化コルメラ細胞では高発現しているのかを調べる必要がある。*KRP* の蓄積制御においては、タンパク質分解が重要であることが報告されている(Marocco et al., 2015; Dewitte et al., 2011)。本研究では、26S プロテアソームの阻害剤である *MG132* を *KRP4/7* のレポーターラインに処理しても、*KRP4/7* の蓄積パターンは変化しないことを見出した。したがって、*KRP4/7* の蓄積量は転写レベルで制御されている可能性が高いと考えられる。今後は、*in situ* ハイブリダイゼーションおよび *KRP4/7* のプロモーターに *GFP* を融合したレポーター遺伝子を用いて、発現解析をより詳細に進める必要がある。

(2) *WOX5* によるコルメラ幹細胞の維持機構

WOX5 は *QC* 細胞で発現し、*CSC* へ移動する。*CSC* へ移動した *WOX5* は、*HDA19* や *TPL* と複合体を形成して転写抑制因子として機能する (Pi et al., 2015)。一方で、分化コルメラ細胞には *WOX5* が移動しないため、*CDF4* が発現し、コルメラ細胞が分化する。しかしながら、遺伝学的な解析の結果、*cdf4* 変異体は *wox5* 変異体の表現型を抑圧することができなかったことから(Pi et al., 2015)、*CDF4* は *WOX5* の標的遺伝子ではあるが、*CSC* の幹細胞性を維持するためには、

別の制御系が必要であると考えられる。本研究では、*KRP4/7* の変異が *wox5* 変異体の表現型 (CSC の分化) を抑圧することを明らかにした。したがって、CSC において *KRP4/7* の発現が *WOX5* により直接または間接的に抑制されることにより、CDK 活性が維持され、幹細胞として機能していると考えられる。今後は、*WOX5* がどのように *KRP* の発現を制御しているかを調べる必要がある。*WOX5* が *KRP4/7* のプロモーター領域に直接結合する可能性も考えられるが、これまでの研究で ZINC FINGER PROTEIN 3 (ZFP3)、CDF4、RAP2.6 の計 3 種類の転写因子が *WOX5* の推定下流因子として報告されているため、これらの転写因子が *KRP* の発現制御を行っている可能性も考えられる (Pi et al., 2015)。

WOX5 の細胞間移動は、QC と接している CSC のみに限定されており、より頂端側の分化コルメラ細胞へは移動できない (Pi et al., 2015)。コルメラ全体や分化コルメラ細胞特異的なプロモーターを用いて *WOX5* を強制発現させた植物では、QC と接していない分化コルメラ細胞も未分化性を獲得することから、*WOX5* が CSC より先の分化コルメラ細胞には移動しないことが、未分化な CSC 層を一層に保つことに重要であると考えられる (Pi et al., 2015)。電子顕微鏡を用いた観察では、CSC と分化コルメラ細胞の間に局在するプラズモデスマータは連絡口が著しく細いことから、*WOX5* の移行を CSC に限定する一つの要因として、プラズモデスマータの開口度が考えられる (Nicolas et al., 2017)。

CSC の分裂直後に *WOX5* が二つの娘細胞に分配され機能するのであれば、両方の娘細胞が幹細胞として機能し、幹細胞層数が増えてしまう。しかし、実際には QC と接しているコルメラ細胞のみが幹細胞性を維持する。また、CSC 特異的に *WOX5* を発現する植物でも、CSC 層数は増加しないことが報告されている (Pi et al., 2015)。さらに、これまで *pKRP4:KRP4-GFP*、*pKRP7:KRP7-GFP* のマーカーラインを観察した限りでは、*KRP4*、*KRP7* の発現が低い CSC 層が 2 層になっているものは確認できていないことから、*WOX5* による *KRP* タンパク質の発現抑制は CSC 分裂後に解除され、*KRP4*、*KRP7* は下側の娘細胞ですぐに発現し始めると予想される。したがって、上述のような *WOX5* の移動性の制御に加えて、CSC の分裂直後に CSC と接していない下側の娘細胞で *WOX5* の機能を積極的に抑制する機構も存在すると考えられる。その実体は未だ不明であるが、CSC 分裂時に *WOX5* や *WOX5* のパートナー因子である *HDA19* が娘細胞に不等分配され、QC 細胞と接している娘細胞に優先的に分配された結果、下側の娘細胞では *KRP4*、*KRP7* がすぐに発現し始める、といった可能性が考えられる。今

後は *WOX5* や *HDA19* のタンパク質レポーターラインを用いて、これらの因子が CSC の分裂直後にどのような挙動を取るのかを調べる必要がある。

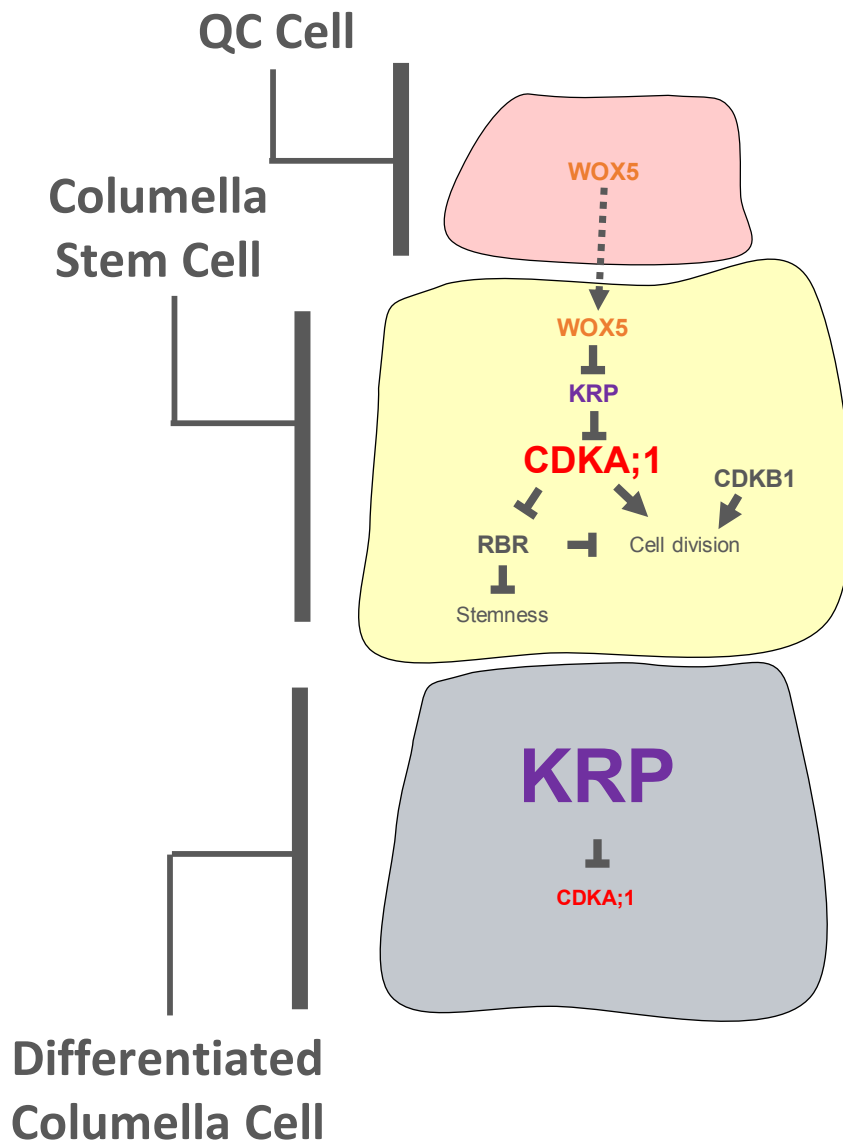


図4-3. 本研究で明らかになったKRPによる幹細胞の維持機構のモデル図
 転写因子WOX5がQC細胞からCSCへ移動し、KRPの発現を抑制することで、幹細胞性を保つために必要な高いCDK活性を維持することが可能になる。

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域 梅田正明先生の指導のもとで行われました。学部 3 年次にラボステイを受け入れてくださり、教育熱心さや豊富なアイデア、高い文章力を兼ね備えた私の憧れの研究者でした。研究面や生活面での私の至らない点を時に厳しく、しかしながらいつも暖かく見守って下さいました。梅田研究室では、自分の好きなこと・興味があることを好きなだけ行うことができ、これが普通ではないということを恥ずかしながら、他の研究室の先生方と話しているときつい最近知りました。私の至らぬ点をもどかしく感じさせてしまっていたことも多々あるとは思いますが、ネガティブなことは言わずにただ背中を押し続けてくださった器の大きさを見習い、後進につなげていきたいと思えます。学術振興会特別研究員の採択や、国際学会を始めとした多くの学会へ参加する機会を与えてくださるなど、私の研究者としてのキャリアのことを常に考え、多大なるご支援をいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

また、同研究科教授 中島敬二先生、伊藤寿朗先生にはアドバイザー委員として 5 年間熱い激励とご助言をいただき続けました。心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、高橋直紀先生、原千景氏を始めとした梅田研究室の皆様には日々の学生生活のサポートや研究に対する多くのアドバイスをいただきました。感謝申し上げます。

本研究を行う上で使用した *pPCNA:PCNA-GFP* は東京理科大学の松永幸大教授、*myb3r1/3/5* 三重変異体と *pMYB3R3:MYB3R3-GFP* は金沢大学の伊藤正樹教授、*kpr4/6/7* 三重変異体と *kpr3/4/6/7* 四重変異体と *CDKA-DE* 変異体と *kpr4/6/7 CDKA-DE* 四重変異体はハンブルグ大学の Arp Schnittger 教授に快く供与いただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

岩手大学農学部准教授 齋藤靖史先生と Abidur Rahman 先生には学部生 2 年次から現在まで暖かくサポートをしていただきました。特にこの御二方は私が博士課程への進学を決意するきっかけとなりました。深く感謝申し上げます。

カルフォルニア大学デービス校教授 John Harada 先生、Siobhan Brady 先生、Bo Liu 先生、Anne Britt 先生には本研究に対するご助言だけでなく、私のキャリア形成やスキルアップに関する多くのお言葉をいただきました。特に John Harada 先生は修士 1 年次から 5 年間何度も議論を行なって下さいました。ま

た、Siobhan Brady 先生には博士課程 1 年次に 1 ヶ月間ラボステイを快く受け入れてくださり、また、就職のサポートまでしていただきました。皆様には感謝しても仕切れません。

コンピューター言語 Python の扱いについては、京都大学の鳥井孝太郎氏から御教示いただきました。鳥井氏とは、毎日のように熱いご飯を囲い、熱い議論をすることができました。共に切磋琢磨できた友と、この環境に感謝したいと思います。

最後に、困難の多い大学院生活でしたが、暖かく支えてくださった両親、応援してくださった岩手大学の同期達やアイスランド大学やカルフォルニア大学の友人達、そして共に乗り越えてきた奈良先端科学技術大学院大学の親しい友人達に深い感謝を送るとともに、これからも皆と共に歩み抜けるように精進することを誓い、謝辞といたします。

参考文献

Adachi, S., Nobusawa, T., Umeda, M. (2009) Quantitative and cell type-specific transcriptional regulation of A-type cyclin-dependent kinase in *Arabidopsis thaliana*. *May 15*;329(2):306-14.

Anzola, JM., Sieberer, T., Ortbauer, M., Butt, H., Korbei, B., Weinhofer, I., Müllner, AE., Luschnig, C. (2010) Putative *Arabidopsis* Transcriptional Adaptor Protein (PROPORZ1) is required to modulate histone acetylation in response to auxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 107, 10308-10313.

Beeckman, T., Burssens, S., Inzé, D. (2001) The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 2001 Mar;52:403-11.

Berger, F., Hung, C.Y., Dolan, L., Schiefelbein, J. (1998) Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Dev Biol.* 1998 Feb 15;194(2):235-45.

Boruc J, Van den Daele H, Hollunder J, Rombauts S, Mylle E, Hilson P, Inzé D, De Veylder L, Russinova E. (2010) Functional modules in the *Arabidopsis* core cell cycle binary protein-protein interaction network. *Plant Cell.* 2010 Apr;22(4):1264-80.

Bruex, A., Kainkaryam, R.M., Wieckowski, Y., Kang, Y.H., Bernhardt, C., Xia, Y., Zheng, X., Wang, J.Y., Lee, M.M., Benfey, P., Woolf, P.J., Schiefelbein, J. (2012) A gene regulatory network for root epidermis cell differentiation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 2012 Jan;8(1):e1002446

Butaye, KM., Goderis, IJ., Wouters, PF., Poes, JM., Delauré, SL., Broekaert, WF., Depicker, A., Cammue, BP., De Bolle MF. (2004) Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *Plant J.*,39, 440-449.

Caro, E., Castellano, MM., Gutierrez, C. (2007) A chromatin link that couples cell

division to root epidermis patterning in Arabidopsis. *Nature*. May 10;447(7141):213-7.

Chen-Yi, Hung., Yan, Lin., Meng, Zhang., Susan, Pollock., M. David, Marks., and John, Schiefelbein. (1998) A Common Position-Dependent Mechanism Controls Cell-Type Patterning and GLABRA2 Regulation in the Root and Hypocotyl Epidermis of Arabidopsis. *Plant Physiol*. 1998 May; 117(1): 73–84.

Cheng, Y., Cao, L., Wang, S., Li, Y., Shi, X., Liu, H., Li, L., Zhang, Z., Fowke, LC., Wang, H., Zhou, Y. (2013) Downregulation of multiple CDK inhibitor ICK/KRP genes upregulates the E2F pathway and increases cell proliferation, and organ and seed sizes in Arabidopsis. *Plant J.*, 75, 642-655.

Cheng, Y., Liu, H., Cao, L., Wang, S., Li, Y., Zhang, Y., Jiang, W., Zhou, Y., Wang, H. (2015) Down-regulation of multiple CDK inhibitor ICK/KRP genes promotes cell proliferation, callus induction and plant regeneration in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.*, 6, 825.

Cheung, TH., Rando, TA. (2013) Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 14, 329-340.

Costa, S. (2017) Are division plane determination and cell-cycle progression coordinated? *New Phytol*. 2017 Jan;213(1):16-21.

Costa, S., Shaw, P. (2006) Chromatin organization and cell fate switch respond to positional information in Arabidopsis. *Nature*. 2006 Jan 26;439(7075):493-6.

Crisanto, Gutierrez. (2014) The Arabidopsis Cell Division Cycle. *The Arabidopsis Book* 7: e0120. 2009

De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, GT., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., Inzé, D. (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell*, 13, 1653-1668.

Deal, RB., Henikoff, S. (2010) A simple method for gene expression and chromatin profiling of individual cell types within a tissue. *Dev Cell*. 2010 Jun 15;18(6):1030-40.

Dello Ioio, R., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., Sabatini, S. (2007) Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.*, 17, 678-682.

Ding, Z., Friml, J. (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in Arabidopsis roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 107, 12046-12051.

Dinney, JR., Long, TA., Wang, JY., Jung, JW., Mace, D., Pointer, S., Barron, C., Brady, SM., Schiefelbein, J., Benfey, PN. (2008) Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science*. 2008 May 16;320(5878):942-5.

Dissmeyer, N., Moritz, K., Nowack, M., Pusch, S., Inzé, D., Grini, P., and Schnittger, A. (2007) T-Loop Phosphorylation of Arabidopsis CDKA;1 Is Required for Its Function and Can Be Partially Substituted by an Aspartate Residue. *Plant Cell*. Mar; 19(3): 972–985.

Dosage-sensitive function of retinoblastoma related and convergent epigenetic control are required during the Arabidopsis life cycle.

Johnston, AJ., Kirioukhova, O., Barrell, PJ., Rutten, T., Moore, JM., Baskar, R., Grossniklaus, U., Gruissem, W. (2010), *PLoS Genet*. 17;6(6):e1000988.

Dubois, M., Selden, K., Bediée, A., Rolland, G., Baumberger, N., Noir, S., Bach, L., Lamy, G., Granier, C., Genschik, P.(2018).SIAMESE-RELATED1 Is Regulated Posttranslationally and Participates in Repression of Leaf Growth under Moderate Drought.*Plant Physiol*.176(4),2834-2850.

Edgar, BA., Zielke, N., Gutierrez, C. (2014) Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Mar;15(3):197-210.

Endo, M., Ishikawa, Y., Osakabe, K., Nakayama, S., Kaya, H., Araki, T., Shibahara, K., Abe, K., Ichikawa, H., Valentine, L., Hohn, B., and Toki, S. (2006) Increased frequency

of homologous recombination and T-DNA integration in Arabidopsis CAF-1 mutants
EMBO J. 2006 Nov 29; 25(23): 5579–5590.

Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., Scheres B. (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature*, 449, 1053-1057.

González-García, MP., Vilarrasa-Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora-García, S., Russinova, E., Caño-Delgado, AI. (2011) Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development*, 138, 5849-5859.

Griersona, C., Nielsenb, E., Ketelaarcc T., and Schiefelbeind, J (2014) Root Hairs. *The Arabidopsis Book* 12: e0172. 2014

Hassan, H., Scheres, B., Blilou, I.(2010).JACKDAW controls epidermal patterning in the Arabidopsis root meristem through a non-cell-autonomous mechanism. *Development*. 137(9):1523-1529.

Heidstra, R., Sabatini, S. (2014) Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 15, 301-312.

Ilda, Casimiro., Alan, Marchant., Rishikesh, P. Bhalerao., Tom, Beeckman., Sandra, Dhooge., Ranjan, Swarup., Neil, Graham., Dirk, Inzé., Goran, Sandberg., Pedro, J. Casero., and Malcolm, Bennett. (2001) Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. *Plant Cell*. 2001 Apr; 13(4): 843–852.

Ishida, T., Hattori, S., Sano, R., Inoue, K., Shirano, Y., Hayashi, H., Shibata, D., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., Wada, T. (2007) Arabidopsis TRANSPARENT TESTA GLABRA2 is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of GLABRA2 transcription in epidermal differentiation. *Plant Cell*. 2007 Aug;19(8):2531-43.

Jasinski, S., Perennes, S., Bergounioux, C., and Glab, N. (2002) Comparative Molecular

and Functional Analyses of the Tobacco Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor NtKIS1a and Its Spliced Variant NtKIS1b1, *Plant Physiol.* Dec; 130(4): 1871–1882.

Jun, SE., Okushima, Y., Nam, J., Umeda, M., Kim GT. (2013) Kip-related protein 3 is required for control of endoreduplication in the shoot apical meristem and leaves of *Arabidopsis*. *Mol. Cells*, 35, 47-53.

Kirik, V., Simon, M., Huelskamp, M., Schiefelbein, J. (2004) The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Dev Biol.* 2004 Apr 15;268(2):506-13.

Kono, A., Umeda-Hara, C., Adachi, S., Nagata, N., Konomi, M., Nakagawa, T., Uchimiya, H., Umeda, M. (2007) The *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD4 controls cell division in the stomatal lineage of the hypocotyl epidermis. *Plant Cell.* 2007 Apr;19(4):1265-77.

Kumar, N., Harashima, H., Kalve, S., Bramsiepe, J., Wang, K., Sizani, B.L., Bertrand, L.L., Johnson, M.C., Faulk, C., Dale, R., Simmons, L.A., Churchman, M.L., Sugimoto, K., Kato, N., Dasanayake, M., Beemster, G., Schnittger, A., Larkin, J.C.(2015). Functional Conservation in the SIAMESE-RELATED Family of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Land Plants. *Plant Cell.* (11):3065-3080.

Kwak, S.H., Schiefelbein, J. (2007).The role of the SCRAMBLED receptor-like kinase in patterning the *Arabidopsis* root epidermis. *Dev Biol.* 302(1):118-131.

Li, DX., Chen, WQ., Xu, ZH., Bai, SN. (2015) HISTONE DEACETYLASE6-Defective Mutants Show Increased Expression and Acetylation of ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE1 and GLABRA2 with Small But Significant Effects on Root Epidermis Cellular Pattern. *Plant Physiol.* 2015 Aug;168(4):1448-58.

Lin, Q., Ohashi, Y., Kato, M., Tsuge, T., Gu, H., Qu, LJ., Aoyama, T. (2015) GLABRA2 Directly Suppresses Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Genes with Diverse Functions in Root Hair Development. *Plant Cell.* 2015 Oct;27(10):2894-906.

Liu, C., Li, LC., Chen, WQ., Chen, X., Xu, ZH., Bai, SN. (2013) HDA18 affects cell fate in Arabidopsis root epidermis via histone acetylation at four kinase genes. *Plant Cell*. 2013 Jan;25(1):257-69.

Löfke, C., Dünser, K., Kleine-Vehn, J. (2013) Epidermal patterning genes impose non-cell autonomous cell size determination and have additional roles in root meristem size control. *J Integr Plant Biol*. 2013 Sep;55(9):864-75.

Löfke, C., Scheuring, D., Dünser, K., Schöller, M., Luschnig, C., Kleine-Vehn, J. (2015) Tricho- and atrichoblast cell files show distinct PIN2 auxin efflux carrier exploitations and are jointly required for defined auxin-dependent root organ growth. *J Exp Bot*. 2015 Aug;66(16):5103-12.

Manlio, C., Sessa, G., Dolan, L., Linstead, P., Baima, S., Ruberti, I., Morelli, G. (1996) The Arabidopsis Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *Plant J*. 1996 Sep;10(3):393-402.

Masucci, JD., Schiefelbein, JW. (1994) The rhd6 Mutation of Arabidopsis thaliana Alters Root-Hair Initiation through an Auxin- and Ethylene-Associated Process. *Plant Physiol.*, 106, 1335-1346.

Mironov, V., De Veylder, V., Van Montagu, M., and Inze, D. *Plant Cell*. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *Apr*; 11(4): 509–522.

Motohashi, K. (2015) A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from Escherichia coli laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnol.*, 15, 47

Mähönen, AP., ten Tusscher, K., Siligato, R., Smetana, O., Díaz-Triviño, S., Salojärvi, J., Wachsman, G., Prasad, K., Heidstra, R., Scheres, B. (2014) PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature*, 515, 125-129

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K.,

Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T. (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 34-41.

Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A., Sekine, M. (2006) Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Lett.*, 580, 336-340.

Otero, S., Desvoves, B., Peiró, R., Gutierrez, C. (2016) Histone H3 Dynamics Reveal Domains with Distinct Proliferation Potential in the Arabidopsis Root. *Plant Cell*. 2016 Jun;28(6):1361-71. doi: 10.1105/tpc.15.01003.

Otto, O., Rosendahl, P., Golfier, S., Mietke, A., Herbig, M., Jacobi, A., Topfner, N., Herold, C., Klaue, D., Girardo, S., Winzi, M., Fischer-Friedrich, E., Guck, J. (2015) Real-time deformability cytometry as a label-free indicator of cell function. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2015;2015:1861-4.

Perilli, S., Perez-Perez, JM., Di Mambro R., Peris, CL, Díaz-Triviño, S., Del Bianco, M., Pierdonati, E., Moubayidin, L., Cruz-Ramírez, A., Costantino, P., Scheres, B., Sabatini, S. (2013) RETINOBLASTOMA-RELATED protein stimulates cell differentiation in the Arabidopsis root meristem by interacting with cytokinin signaling. *Plant Cell*, 25(11):4469-78.

Pi, L., Aichinger, E., van der Graaff, E., Llavata-Peris, CI,, Weijers, D., Hennig, L., Groot, E., Laux, T. (2015) Organizer-Derived WOX5 Signal Maintains Root Columella Stem Cells through Chromatin-Mediated Repression of CDF4 Expression. *Dev. Cell*, 33, 576-588.

Porceddu A1, Stals H, Reichheld JP, Segers G, De Veylder L, Barroco RP, Casteels, P., Van Montagu, M., Inzé, D., Mironov, V. (2001) A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *Sep 28;276(39):36354-60.*

Rosa, S., Ntoukakis, V., Ohmido, N., Pendle, A., Abranches, R., Shaw, P. (2014) Cell

differentiation and development in Arabidopsis are associated with changes in histone dynamics at the single-cell level. *Plant Cell*. 2014 Dec;26(12):4821-33.

Rosa, S., Ntoukakis, V., Ohmido, N., Pendle, A., Abranches, R., Shaw, P. (2014) Cell differentiation and development in Arabidopsis are associated with changes in histone dynamics at the single-cell level. *Plant Cell*. 26, 4821-4833.

Sarkar, AK., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., Laux, T. (2007) Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature*, 446, 811-814.

Schieffelbein, J. (2003) Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr Opin Plant Biol*. 2003 Feb;6(1):74-8.

Schiessl, K., Muiño, JM., Sablowski, R. (2014) Arabidopsis JAGGED links floral organ patterning to tissue growth by repressing Kip-related cell cycle inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 111, 2830-2835.

Serna, L. (2008) CAPRICE positively regulates stomatal formation in the Arabidopsis hypocotyl. *Plant Signal Behav*. 2008 Dec;3(12):1077-82.

Shuang, W., Koizumi, K., MacRae-Crerar, A., Kimberly, L., (2011), Assessing the Utility of Photoswitchable Fluorescent Proteins for Tracking Intercellular Protein Movement in the Arabidopsis Root. *PLoS One*. 2011;6(11):e27536.

Song, J.H., Kwak, S.H., Nam, K.H., Schiefelbein, J., Lee, M.M.(2019).QUIRKY regulates root epidermal cell patterning through stabilizing SCRAMBLED to control CAPRICE movement in Arabidopsis. *Nat Commun*.10(1):1744.

Takahashi, I., Kojima, S., Sakaguchi, N., Umeda-Hara, C., Umeda, M. (2010) Two Arabidopsis cyclin A3s possess G1 cyclin-like features. *Plant Cell Rep*. 2010 Apr;29(4):307-15.

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. *Curr Biol.* 2013 Sep 23;23(18):1812-7.

Takatsuka, H., Umeda, M. (2014) Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J Exp Bot.* 2014 Jun;65(10):2633-43.

Umeda, M., Umeda-Hara, C., Uchimiya, H. (2000) A cyclin-dependent kinase-activating kinase regulates differentiation of root initial cells in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 97, 13396-13400.

Van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., Scheres, B. (1997) Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature*, 20;390(6657):287-9.

Vanstraelen, M., Baloban, M., Da, Ines, O., Cultrone, A., Lammens, T., Boudolf, V., Brown, S.C., De, Veylder, L., Mergaert, P., Kondorosi, E. (2009) APC/C-CCS52A complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jul 14;106(28):11806-11.

Wang G, Kong H, Sun Y, Zhang X, Zhang W, Altman N, DePamphilis CW, Ma H. (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol.*, 135, 1084-99.

Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S., Fowke, LC. (2000) Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.*, 24, 613-623.

Weiste, C., Dröge-Laser, W. (2014) The Arabidopsis transcription factor bZIP11 activates auxin-mediated transcription by recruiting the histone acetylation machinery. *Nat. Commun.*, 5, 3883.

Wen, B., Nieuwland, J., Murray, JA. (2013) The Arabidopsis CDK inhibitor ICK3/KRP5 is rate limiting for primary root growth and promotes growth through cell elongation and endoreduplication. *J. Exp. Bot.*, 64, 1135-1144.

Wildwater, M., Campilho, A., Perez-Perez, JM., Heidstra, R., Blilou, I., Korthout, H., Chatterjee, J., Mariconti, L., Gruijsem, W., Scheres, B. (2005) The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in Arabidopsis roots. *Cell*, 123, 1337-1349.

Xu, CR., Liu, C., Wang, YL., Li, LC., Chen, WQ., Xu, ZH., Bai SN. (2005) Histone acetylation affects expression of cellular patterning genes in the Arabidopsis root epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 14469-14474.

Xu, CR., Liu, C., Wang, YL., Li, LC., Chen, WQ., Xu, ZH., Bai, SN. (2005) Histone acetylation affects expression of cellular patterning genes in the Arabidopsis root epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 4;102(40):14469-74.

Yamaguchi, M., Kato, H., Yoshida, S., Yamamura, S., Uchimiya, H., Umeda M. (2003) Control of in vitro organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 100, 8019-8023.

Yi, D., Alvim, Kamei.C.L., Cools, T., Vanderauwera, S., Takahashi, N., Okushima, Y., Eekhout, T., Yoshiyama, K.O., 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.* (1):296-309.

Yin, K., Ueda, M., Takagi, H., Kajihara, T., Sugamata, Aki, S., Nobusawa, T., Umeda-Hara, C., Umeda, M. (2014) A dual-color marker system for in vivo visualization of cell cycle progression in Arabidopsis. *Plant J.* 2014 Nov;80(3):541-52.

Yokoyama, R., Hirakawa, T., Hayashi, S., Sakamoto, T., Matsunaga, S. (2016) Dynamics of plant DNA replication based on PCNA visualization. *Sci Rep.* 2016 Jul 15;6:29657.

Zhao, X., Harashima, H., Dissmeyer, N., Pusch, S., Weimer, AK., Bramsiepe, J., Bouyer, D., Rademacher, S., Nowack, MK., Novak, B., Sprunck, S., Schnittger A. (2012) A general G1/S-phase cell-cycle control module in the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. PLoS Genet. 8(8)