

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月19日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14755

研究課題名(和文)軸器官のねじれにおける表皮細胞の役割

研究課題名(英文)Role of epidermis in twisting growth of axial organs

研究代表者

橋本 隆 (Hashimoto, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80180826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では植物軸器官の方向性をもつねじれ現象の解説する2つのモデル(表皮細胞主導型伸長モデルと細胞層間偏差伸長調整モデル)を検証するために、シロイヌナズナの細胞層特異的に微小管制御因子や細胞伸長制御因子を発現させ、根伸長表現型を解析した。各種チューブリン優勢変異体を根表皮細胞特異的に発現させた植物体では、根の表皮細胞は通常に伸長し、根の生育や形態にはほとんど異常が見られなかった。また、カタニンやSAUR9を用いて皮層と表皮の間に伸長差を生み出す操作をすると、若干の伸長阻害と伸長方向の傾きが見られた。これらの結果は2つのモデルのどちらか一方を単純に支持するものではなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, microtubule-regulating factors and cell elongating-regulating factors were expressed cell-type specifically in Arabidopsis roots, and two models (the epidermis leading model and the growth compensatory model) on organ twisting with defined chirality were tested. When several mutant tubulins were expressed specifically at root epidermis, root epidermis grew normally and overall root growth and morphology were almost normal. When katanin and SAUR9 were used to generate growth differences between cortex and epidermis, growth inhibition and slanting growth were marginally observed. These results do not support simply either one of the proposed models.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：ねじれ 微小管 左右性 シロイヌナズナ 表皮細胞 根

1. 研究開始当初の背景

申請者はモデル植物アラビドプシスのねじれ変異株を多数単離し(図1)、そのねじれ機構を研究してきた(Nature 2002, Nature Cell Biol 2010, PNAS 2007, Plant Cell 2004, Development 2000)。その過程で、根や暗所胚軸などの軸器官の表皮細胞層にみられるねじれを説明するために、「細胞層間偏差伸長モデル」を提唱した。このモデルでは、軸器官の内部組織の伸長(縦方向の生長)に対して表皮層の伸長が大きい場合に、軸器官総体の長さを維持するために表皮層が傾く(ねじれる)。傾く方向は基本的にはランダム(右または左の両方)であるが、表皮細胞に左右性の極性情報(微小管細胞骨格の左右非対称配置)があると、その極性に従い軸器官が右または左のいずれか一方にねじれる。このモデルでは、表皮細胞と内部細胞はお互いに独立して縦方向に伸長すると仮定している。

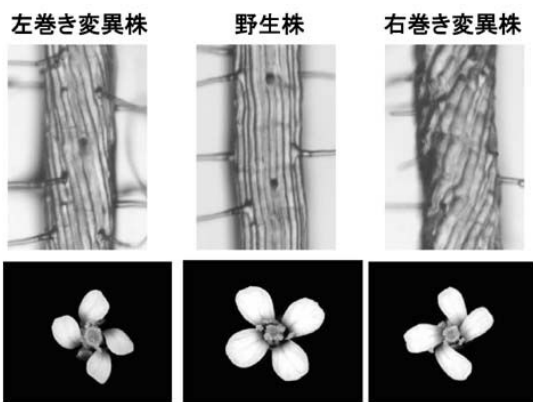


図1 微小管要因のアラビドプシスねじれ変異株。伸長軸器官は右または左のどちらか一方にねじれる

一方、ブラシノステロイド研究から表皮が地上部器官の生長律速因子であると提唱されている(文献1)。すなわち、表皮細胞が器官の大きさを決定する主要因であり、内部細胞は表皮細胞の生長に同調して生長レベルを受動的に調節する「表皮細胞主導型伸長モデル」が報告された。この論文では、ブラシノステロイド受容体 BRI1 を変異株 *bri1* の表皮細胞特異的に発現させると、*bri1* の矮性表現形がほぼ野生株レベルに回復した。しかし、

bri1 表現形が根に比べ地上部で顕著であるためか、使用した表皮細胞特異的 *ML1* プロモーターが地上部で顕著に発現するためか、表現形回復の実験は地上部(茎頂、葉)のみで行われている。従って、この表皮細胞主導の器官サイズ同調モデルが根などの他の器官において、また、ブラシノステロイドシグナル伝達以外の要因で調節される細胞や器官の生長において、同様に当てはまるのか不明である。

2. 研究の目的

植物の器官を構成する複数の細胞層の生長は同調され、器官総体としての大きさが決定される。ブラシノステロイド研究から表皮が地上部器官(茎頂メリステムと葉)の生長律速因子であると提唱されているが、この表皮律速モデルが全ての植物器官の生長に普遍的であるのか不明である。一方、申請者はねじれ変異株研究から、表皮細胞層と皮層は独立して縦方向に伸長し、内部細胞の伸長度合いが表皮に較べ抑制された場合には、軸器官の表皮細胞層はねじれるというねじれモデルを提唱した。本研究では、アラビドプシス植物の胚軸や根などで、表皮細胞と内部組織の生長を個別にコントロールすることにより、細胞層間に縦方向の伸長差を人為的に作出する。その場合の表現形を解析することにより、どちらのモデルが正しいのかを検証する。

3. 研究の方法

軸器官ねじれ現象を説明する下記2つのモデルを検証するために、アラビドプシス植物体軸器官(根)の細胞層特異的に微小管制御因子や微小管と無関係な細胞伸長制御因子を発現させ、軸器官の表現形を解析する。

・表皮細胞主導型伸長(表皮主導)モデル: 表皮細胞が傾いて伸長することが原因であり、結果として内部細胞の縦方向の伸長が抑

制される。

・細胞層間偏差調整（偏差調整）モデル：表皮細胞層が内部細胞層よりも相対的に長く伸長することが原因であり、結果として表皮細胞が傾く。

どちらのモデルでも、表皮細胞が左右どちらかに傾くかは、表層微小管の配向により決定される。

- 1) ねじれ軸器官では、表皮組織が内部組織に比べて相対的に縦方向に長い。この場合、表皮細胞は左右どちらかに傾いて伸長する以外は細胞の形は野生株とほとんど同じであるが、内部細胞は横方向に肥大している。
- 2) 表皮細胞の傾く方向が左右どちらかに決まっている場合、表皮細胞の表層微小管が右巻きまたは左巻きヘリックス構造を取る。一方、ねじれ方向がランダムな場合、表皮細胞の表層微小管は野生株と同様に細胞縦軸に対して横方向に配置する。

4. 研究成果

【検証1】

表皮細胞と内部細胞の縦方向の伸長差を作り出した場合、軸器官はねじれるか？

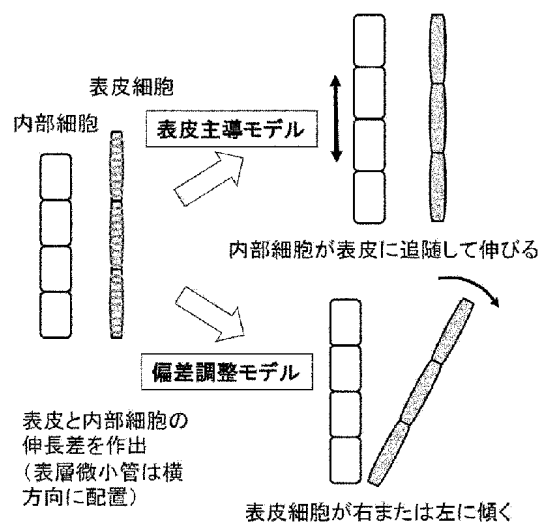


図2 軸組織のねじれ伸長を説明する2つのモデル

実験方法1：微小管切断酵素 *katanin* 変異株（文献2）は縦方向に極性を持って細胞が伸長しないため矮性となる。*Katanin* を *WRKY72* プロモーターを用いて表皮細胞特異的に *katanin* 変異株で発現させたところ、変異株での表皮と皮層の極性伸長は部分的に回復した。この部分的相補株の根にねじれは観察されなかった。

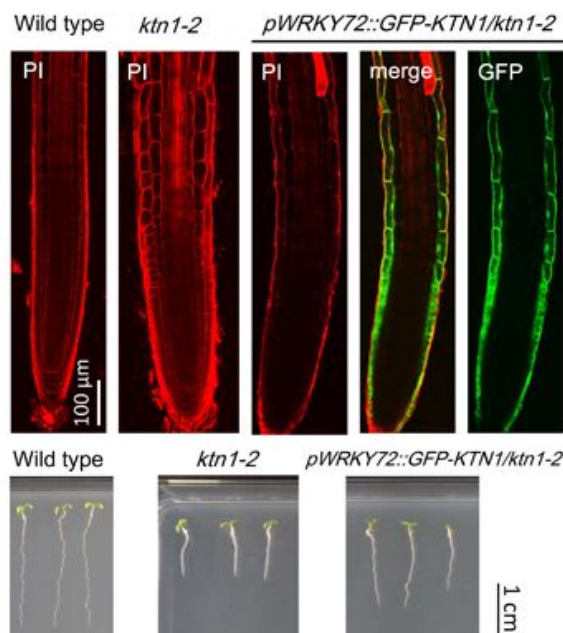


図3 カタニン変異株の相補試験

上段：野生株、カタニン変異株 (*ktn1-2*)、変異株に *GFP-KTN1* を表皮特異的に発現させた部分相補株
下段：それぞれの植物体の生育（播種後7日目）

実験方法2：細胞膜 H^+ -ATPase 活性化させ細胞伸長を促進する *SAUR9*、または不活性化させ細胞伸長を抑制するフォスファターゼ *PP2C-D*（文献3）を細胞層特異的に発現させた。*GFP-SAUR9* を表皮で発現させた場合、並びに *PP2C-D-GFP* を *C1* プロモーターを用いて皮層で発現させた場合、根の伸長がわずかに抑制され、根が部分的にわずかにねじれることが観察された。しかし、表現型が弱いため、詳細な解析はできなかった。

【検証2】

表皮細胞特異的にねじれ変異チューブリンを発現させると、軸器官はねじれるか？

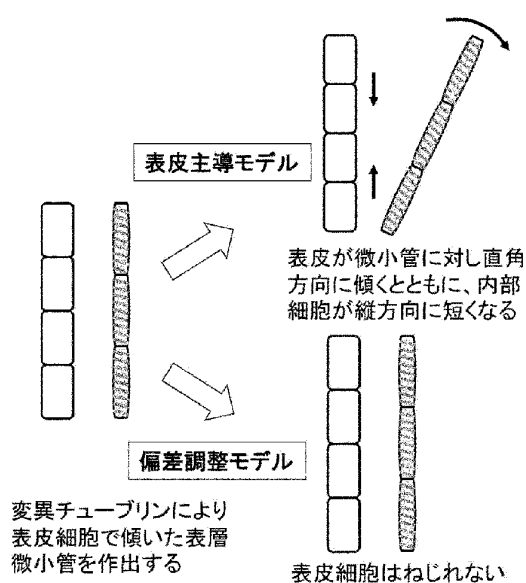


図4 変異チューブリンによる2つのモデルの検証

実験方法：アラビドプシスねじれ変異の原因である優勢機能阻害型変異チューブリン（右巻き変異 $TUB6^{S95F}$ および左巻き変異 $TUB6^{T127I}$ ）を $CaMV35S$ プロモーターを用いて全身に発現させると、ねじれ表現形が再現できる（文献4）。これらの変異チューブリンと GFP 融合タンパク質を表皮細胞特異的 $WRKY72$ プロモーターを用いて根の表皮細胞でのみ発現させた。 $TUB6^{T127I}$ 発現株ではわずかな左ねじれがみられたが、 $TUB6^{S95F}$ 発現株は野生株とほとんど変わらなかった。表現形が弱いため、さらなる解析はできなかった。

【考察】

Katanin の表皮細胞特異的相補実験の結果は、表主導モデルを支持しているようにも解釈できるが、相補が完全ではないことから、表皮のみが根全体の伸長を規定しているのではないと考えられる。一方、 $SAUR9$ と $PP2C-D$ の細胞層特異的発現実験からは、偏差調整モデルが示唆されるが、表現形が弱いため、結果の解釈が難しい。同様に、変異チューブリンの表皮特異的発現実験からも、どちらのモデルとも結論するのは難しい結果となった。

本実験では標的たんぱく質は目的とする

細胞層特異的に発現していることが確認されていることから、弱いねじれ表現型は使用プロモーターの強さが充分でなかった可能性、2つのモデルの両方がねじれ現象に寄与している可能性、が考えられる。

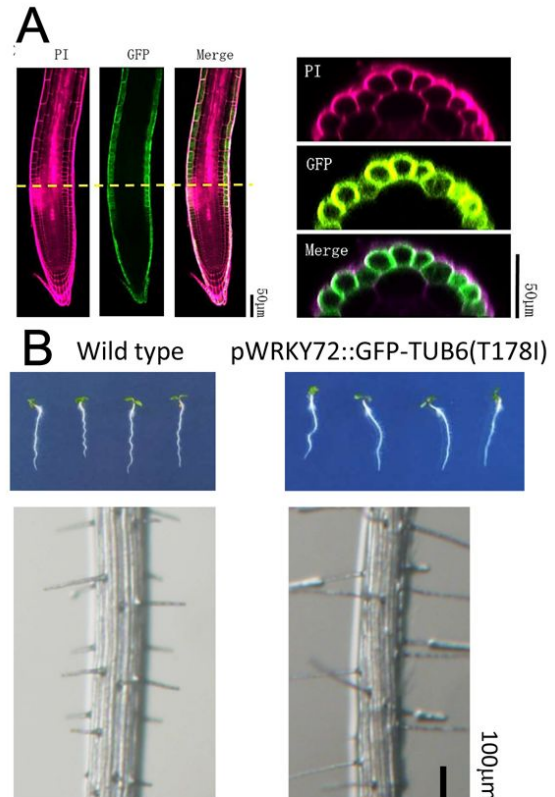


図5 変異チューブリン発現植物体
A) GFP-TUB6(T178I)をWRKY72プロモーターで発現させたシロイヌナズナ根。黄色破線の個所で横断切片を作成した。B)野生株およびAの幼植物（上）とその根分化領域（下）

【ねじれ現象の詳細な解析】

根がねじれる際に各細胞層を構成する細胞の形や伸長方向がどのように変化するかを modified Pseudo-Schiff propidium iodide 法（文献5）を用いて詳細に観察した。その結果、表皮細胞の伸長速度が増加する時点で少し遅れて全ての細胞層で伸長軸がずれはじめた。細胞軸が傾く程度は内部細胞から表皮に向かって増大し、細胞層の間の滑り（ずれ）は認められなかった。また、ねじれた根は円周方向に肥大するが、表皮では非根毛細胞が円周方向に肥大し、根毛細胞はほとんど肥大

しないことが判明した。

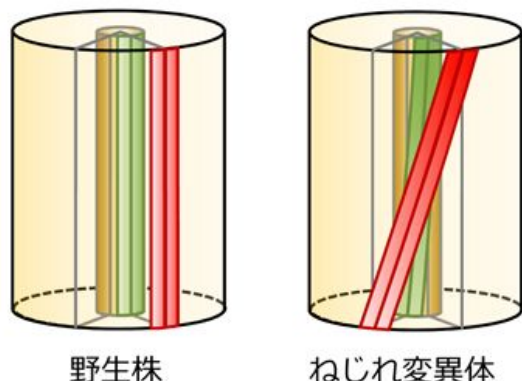


図6 根器官のねじれ成長における細胞層の傾きの模式図

<引用文献>

- 1) Savaldi-Godstein *et al.* (2007) The epidermis both drives and restrict plant shoot growth. *Nature* 446: 199-202.
- 2) Burk and Ye (2002) Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *Plant Cell* 14: 1-16.
- 3) Spartz *et al.* (2014) SAUR inhibition of PP2C-D phosphatase activates plasma membrane-H⁺-ATPases to promote cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 2129-2142.
- 4) Ishida *et al.* (2007) Helical microtubule arrays in a collection of twisting tubulin mutants of *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 104: 8544-8549.
- 5) Truernit *et al.* (2008) High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 1494-1503.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 1件)

Takashi Hashimoto、Plant Cell & Development Biology、Microtubule-mediated stress response in plants、2017年

[その他]

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/hashimoto/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本 隆 (HASHIMOTO, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ

エンス研究科・教授

研究者番号：80180826

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者