

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな(ローマ字)		KAKIMOTO TATSUO					
①研究代表者氏名		柿本 辰男		②所属研究機関・部局・職 大阪大学・大学院理学研究科・助教授			
③研究課題名	和文	既知および未知の細胞間シグナル分子による植物形態形成の調節					
	英文	Regulation of plant development by known and unknown inter-cellular signaling molecules.					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		17,900	12,800	17,000	17,000	17,000	81,700
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）	
柿本 辰男		大阪大学・大学院理学研究科・助教授		植物生理学		研究総括および研究全体	
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>本研究は、細胞間シグナル分子による植物の形態形成制御について重要な新知見を得、その理解を大きく深めることを目的とする。既知の細胞間シグナル分子による形態形成調節機構の解析と、新規の細胞間シグナル分子の探索を行う。既知の細胞間シグナル分子としては、オーキシンとサイトカイニンを中心に扱う。特にサイトカイニンについては、合成や、受容の分子機構を解明する。これらの解析を通じて、サイトカイニンが植物体のどこで合成され、その合成は、どのような調節下にあるのか、また、サイトカイニンはどのように受容されるのかを解明する。</p> <p>次に、オーキシンとサイトカイニンの作用自体が細胞間で相互調節されているのか、そうならば、その細胞間相互調節がどのように形態形成に関わるのか、という問題にチャレンジする。この点について、オーキシンやサイトカイニンの合成、分解、シグナル伝達に関わる因子の遺伝子を強制発現させた細胞を組織の中に遺伝的キメラとして作り出すことにより、これらホルモンの作用がどのように細胞間で相互作用しながら組織や器官を作り上げるのかを調べる。</p> <p>植物で知られている細胞外シグナル分子は、10個以下の植物ホルモンと、いくつかのペプチド性シグナル分子だけである。複雑な多細胞生物を作り上げるためには、まだまだ多くのシグナル分子が存在していると考えられる。そこで、新規のペプチド性シグナル分子を探索し、これらによる形態形成の制御機構を解明する。</p>							

⑦これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

1) サイトカイニンの合成制御と、植物形態形成における役割

私たちは、本研究課題開始前に、サイトカイニンの合成酵素(ATP/ADP isopentenyltransferase)を発見していた。シロイヌナズナにはサイトカイニン合成酵素は7つ(*AtIPT1*, 3-8)存在する。これらの酵素は、試験管内でATPとADPの6位の窒素をイソペンテニル化し、植物内で過剰発現させるとサイトカイニンの量を増加させることから、これらがサイトカイニン合成の最初で律速となるステップを触媒すると考えられている。シグナル分子であるサイトカイニンがどこで合成され、合成がどのような制御を受けているのかを知るため、これら7つの酵素遺伝子の発現部位を詳細に調べた。*AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT5*, *AtIPT7*は栄養成長期を通じて発現しているが、それぞれに特有の発現場所を持っている。*AtIPT6*は珠柄、*AtIPT1*は栄養器官に加えて胚珠と未熟種子、*AtIPT4*と*AtIPT8*は未熟種子で発現していた。*AtIPTs*の遺伝子発現はどれもサイトカイニンによりフィードバック制御を受けていること、*AtIPT3*の発現は硝酸イオンで活性化することもわかった。

以上の*AtIPTs*が触媒する経路が、通常の植物内で本当にサイトカイニン合成の唯一、あるいは主要経路であるのかどうかを知るには、遺伝子破壊株が必須である。単一、あるいは二重変異体には見かけ上の表現型は無いが、栄養成長期に発現している4個の遺伝子の4重変異体 *atipt1 atipt3 atipt5 atipt7*の成長は非常に悪く、予備的実験では活性型サイトカイニンであるイソペンテニルアデニンとトランスゼアチンの量は大きく低下していた。すべてのATP/ADP isopentenyltransferaseを破壊した7重ホモ接合体遺伝子破壊株もなんとか生育可能であるので、別のマイナーな合成経路も存在するのかもしれない。

2) サイトカイニン受容体のシグナル変換機構

シロイヌナズナでは、*CRE1*(=*AHK4*, *WOL*), *AHK2*, *AHK3*の3つの遺伝子の産物がサイトカイニン受容体であり、これらは膜貫通型ヒスチジンキナーゼである。*CRE1*のヒスチジンキナーゼ活性はサイトカイニンにより活性化され、下流因子(AHPs)にリン酸基を転移すると考えられている。本研究では、この反応の試験管内再構築を試み、成功した。*CRE1*を発現させた昆虫細胞から単離した細胞膜とAHPタンパク質を含む反応液中で、サイトカイニン依存的に、リン酸基がATPから*CRE1*、ついでAHPへと転移した。また、サイトカイニン非存在下では、*CRE1*はAHPに対して脱リン酸化酵素活性を持っており、サイトカイニンにより調節される2機能酵素であることがわかった。また、様々な*cre1*変異体のシロイヌナズナの解析により、実際の植物内ではリン酸リレー系因子が双方向リン酸リレーネットワークを形成し、系のリン酸化レベルは*CRE1*の2つの機能で調節されていることを示した。

3) サイトカイニンの受容・情報伝達と、これによる植物形態形成の制御

シロイヌナズナでは、*CRE1*, *AHK2*, *AHK3*の3つの遺伝子産物だけでサイトカイニンを受容するのかどうかを調べるため、これら3つの遺伝子の破壊株を解析した。その結果、3つを破壊した植物は全くサイトカイニンに応答しないこと、植物体は極めて小さいこと、雌性および優性配偶体の機能には、親組織のサイトカイニン受容体が必要なことがわかり、サイトカイニンの役割を明らかにした。

4) サイトカイニンとオーキシン作用の細胞間相互作用を介した形態形成の制御機構

サイトカイニンやオーキシンは、自己制御的に、あるいはお互いに、合成や情報伝達を制御する。ホルモンは細胞外に分泌されるので、近接した細胞がホルモン応答を制御しあい、形態形成を引き起こす原動力となる可能性がある。そこで、誘導型*cre-lox*によって、植物ホルモンの合成や応答が変化した細胞を組織内に作り出す系を作成中である。

5) 新奇分泌ペプチド性シグナル分子の探索とこれを介した形態形成の制御機構

シロイヌナズナのアミノ酸残基数が150個以下の予測遺伝子産物すべてについて、細胞外に分泌されるかどうかを、いくつかのプログラムを用いて予測した。細胞外に分泌されると予測されたもののうち、約200個の遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させた。各遺伝子に対して各々約10の独立した形質転換体の形態を観察し、複数の形質転換体で見られた表現型には、花の器官数や根の伸長の様子の異常、メリステム活性の不安定性、維管束が異常、気孔密度の上昇、低下、などを見いだした。これらの中で、過剰発現により気孔密度を低下させる遺伝子(仮名*GENE20.9*, *GENE20.10*)について詳細な解析を行っている。通常、気孔は隣接して形成されることはない。その仕組みについての現在の説は、次のようなものである。気孔形成系列の幹細胞(メリステモイド)から分泌される未知の分泌ペプチド因子が*SDD1*プロテアーゼでプロセッシングされ、隣接細胞のTMM受容体キナーゼによって認識される。これが、隣接細胞の極性と不等分裂を制御することにより、隣接しない位置に気孔を作らせる。私たちが見いだした遺伝子は孔辺細胞やメリステモイドで発現しており、これら遺伝子の二重破壊株では、互いに隣接した多数の気孔が形成されることから、今までに存在が予測されてきたシグナル分子であると考えている。気孔が存在しない*GENE20.9*過剰発現体のトランスクリプトーム解析により、*GENE20.9*の作用点はメリステモイド形成の直前であることがわかった。これを利用し、気孔形成過程で、*GENE20.9*の作用点以降で発現する遺伝子のすべてのリスト化ができた。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1) サイトカイニンの合成、受容・情報伝達系の制御機構と、植物形態形成における役割

サイトカイニンは、昔から最も重要な植物ホルモンの一つと認識されてきたが、サイトカイニン欠損植物がなかったために、内在サイトカイニンの本来の役割は曖昧なままであった。本研究では以下のように、生体内でのサイトカイニンの役割と、また、サイトカイニンの合成と受容機構の詳細を明らかにしつつある。

サイトカイニンの受容体として働きうるタンパク質をコードする遺伝子はシロイヌナズナに 3 つ存在する。そこで、これら三つを破壊した植物を作成したところ、サイトカイニン応答を全く示さない、非常に小さな不稔の植物となった。サイトカイニン応答を示さないことは、これら三つがサイトカイニン受容機能のすべてを担っていることを示している。非常に小さな植物となったことは、サイトカイニンは植物の生長に重要であることを確認するとともに、サイトカイニン情報なしでも、最低限の植物の形を作れることを示している。

サイトカイニン受容体が、ヒスチジンキナーゼ/ヒスチジンフォスファターゼの 2 つの活性を持ち、サイトカイニン存在下ではヒスチジンキナーゼ、非存在下ではフォスファターゼとして働くことがわかった。また、植物のリン酸リレー系因子は全て双方向のリン酸転移でつながって一つのリン酸リレーネットワークを形成し、そのリン酸保持レベルはサイトカイニン受容体 CRE1 (及び、可能性としては他のヒスチジンキナーゼ) のもつ 2 つの活性により調節されるという新しい概念を提出しようとしている。

サイトカイニンによる形態形成の調節機構を知るためには、サイトカイニンがどこでどのように合成され、どのような調節を受けているのかを明らかにしておかなければいけない。本研究では、すべてのサイトカイニン合成酵素(ATP/ADP イソペンテニル基転移酵素)の発現パターンを詳細に調べた。また、これらがサイトカイニンによる負のフィードバック制御を受けていることもわかった。

活性型サイトカイニン (イソペンテニルアデニンとトランスゼアチン) 合成のメインルートが、サイトカイニン合成酵素(ATP/ADP イソペンテニル基転移酵素)を介したものであることの証明のために、これらすべての遺伝子を破壊した 7 重ホモ突然変異体の作成をおこない、これが非常に小さな植物として生存できることを示した。予備的結果でも、4 重変異体で有意にサイトカイニン量が低下していることがわかっている。今後、入念なサイトカイニン定量を行い、植物体内での合成ルートを疑いないものとして示す。また、これら遺伝子破壊株により、サイトカイニンが、茎頂分裂組織の活性、側芽の活性、二次肥厚などに重要な働きを持っていることが明らかになってきた。

2) サイトカイニンとオーキシン作用の細胞間相互作用を介した形態形成の制御機構

現在のところ、プラスミド作成などの準備中であるが、ホルモンの合成あるいは情報伝達系因子を単一細胞で発現させる系は、ホルモン作用の協調的細胞間相互作用が器官形成の原動力となる可能性を検証できる魅力的な系になると考えている。

3) 形態形成を制御する新奇ペプチド性シグナル分子の探索と機能解析

植物のペプチド性細胞間シグナル分子がどれくらい存在するのかは、よくわかっていない。私たちは、分泌小タンパク質をコードする遺伝子を過剰発現して表現型を観察するというスクリーニングを大規模に行い、ペプチド性シグナル分子を探索している。シグナル分子は、その濃度によって機能が発揮されると考えられるので、過剰発現によるスクリーニングが有効と考えたわけである。これにより、ペプチド性シグナル分子の良い候補が見つかった。今後、ペプチド性シグナル分子の研究の世界を広げたい。

この一次スクリーニングによって得られた候補遺伝子のうち、気孔のパターニングの調節因子に関して、詳細な解析を進めている。気孔パターニングの制御については、想定されるシグナル分子のプロセッシング酵素と受容体が知られているが、シグナル分子そのものが、最後の未知のピースとして残っている。これを発見することができた。また、*GENE20-9* 過剰変異体では気孔系列細胞が形成されないことを利用し、気孔形成過程で働く遺伝子をリスト化した。これらを解析することにより、気孔パターニングの過程を、発生機構が最も良く理解された一つのモデル系として作り上げたい。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

「原著論文」

1. ○Higuchi M, Pischke MS, Mahonen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR, Kakimoto T: In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 8821-8826 (2004)
2. ○Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. and Kakimoto, T: Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal*, 37, 128-138 (2004).

「欧文総説」

1. Kakimoto, T. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Biology* 54, 605-627 (2003)
2. Kakimoto T: Biosynthesis of cytokinins. *J. Plant Res.*, 116, 233-239 (2003)

「和文総説」

1. 柿本辰男: サイトカイニンの合成と代謝、*植物の環境応答と形態形成のクロストーク*、131-140, 岡穆宏、岡田清孝、篠崎一雄(編)、シュプリンガーフェアラーク東京、(2004)
2. 岡穆宏、柿本辰男: サイトカイニン応答、*植物の環境応答と形態形成のクロストーク*、123-130, 岡穆宏、岡田清孝、篠崎一雄(編)、シュプリンガーフェアラーク東京、(2004)
3. 柿本辰男: サイトカイニンの受容と情報伝達、*植物の生長調節* 38, 48-57 (2003)
4. 柿本辰男: サイトカイニンの合成、受容、情報伝達、*蛋白質核酸酵素*、47, 1651-1659 (2003)

「国際学会招待講演」

1. Kakimoto, T., Cytokinin signaling, Keystone symposium Feb 2, 2005 予定, Santa Fe, USA.
2. Kakimoto T., et al., Functions of the three cytokinin receptors in Arabidopsis. 18th International Conference on Plant Growth Substances, 20-24 Sep, 2004 Canberra, Australia.
3. Kakimoto T. et al., Cytokinin perception by three receptors in Arabidopsis. 13th International Workshop on Plant Membrane Biology, June, 2004, Mont Pellier, France.
4. Kakimoto, T. cytokinin signal transduction. Cytokinin meeting, July, 2004, Berlin, Germany.