

## 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

Regulation of plant development by known and unknown  
inter-cellular signaling molecules

柿本 辰男 (Kakimoto Tatsuo)  
大阪大学・大学院理学研究科・教授



### 研究の概要

植物ホルモンであるサイトカイニンの合成経路を明らかにし、受容、情報伝達機構の新知見を得、突然変異体を用いてサイトカイニンにより調節される成長現象を明白に示した。また、新奇の細胞間シグナル分子を大規模スクリーニングによって見いだした。その中でも、表皮の密度を調節するペプチドと、不等分裂を調節するペプチドの作用機構を調べた。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物生理・分子

キーワード：シグナル分子、植物ホルモン、サイトカイニン、不等分裂、気孔

### 1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンの合成や受容の仕組みが解明されつつある時代で、私達は、サイトカイニンの合成酵素と受容体の両方を発見していた。しかしながら、植物体の中での合成の経路は分かったとは言えず、また、受容の仕組みの知識も断片的であった。さらに、サイトカイニンの生理学的役割そのものも、実のところ良く解っていなかった。また、いくつかの分泌ペプチドが細胞間シグナル分子として働いていることが知られており、それら以外にも未知の分子があるかもしれないという期待が持たれていた。

### 2. 研究の目的

サイトカイニンの合成と受容機構を明らかにする。合成酵素や受容体の遺伝子の破壊株を利用してサイトカイニンが調節する生理現象を明白な形で示す。また、未知の細胞間シグナル分子を見だし、それによる形態形成の調節機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

複数存在するサイトカイニン合成酵素とサイトカイニン受容体遺伝子に関しては、多重変異体植物の作成を行い、表現型を解析する。酵母などの中にサイトカイニン応答系を再構築するとともに、試験管内の反応系も用いる。遺伝子発現パターンの解析やタンパク質間相互作用の解析のためには、GFPをマーカーとして使い、本研究助成で購入した共焦点顕微鏡による観察を行う。また、接ぎ木実験など、生理学的解析にも工夫をこらす。ホルモンの機器分析は、共

同研究として行った。

### 4. 研究の主な成果

#### 1) サイトカイニン受容・情報伝達

シロイヌナズナに存在するサイトカイニン受容体の3つの遺伝子を全て破壊するとサイトカイニン応答が全く無くなり、植物はほとんど成長しなかった。このことは、サイトカイニンは、これら3つの遺伝子産物によってのみ受容されていることを示している。また、生化学的実験により、サイトカイニン受容体はサイトカイニン依存的に下流の因子にリン酸基を転移すること、またサイトカイニン受容体は双方向リン酸リレーを含むリン酸リレーネットワークを調節している事を示した。さらに、リン酸リレーの抑制因子 AHP6 が発現する細胞ではサイトカイニン応答が抑制され、これが導管を作る位置を決めている事を見いだした。

#### 2) サイトカイニンの合成

植物のイソペンテニル基転移酵素には、ATP/ADP イソペンテニル基転移酵素 (サイトカイニン合成酵素と呼ぶ) と tRNA イソペンテニル基転移酵素がある。シロイヌナズナの ATP/ADP イソペンテニル基転移酵素のうち、主要な4個の遺伝子を同時に破壊した植物および2個の tRNA イソペンテニル基転移酵素遺伝子を破壊した植物を作成し、サイトカイニンの分析を行った。これにより、イソペンテニルアデニン型とトランスゼアチン型のサイトカイニンは主に ATP と ADP のイソペンテニル化により開始される反応、またシスゼアチンは tRNA のイソペンテニル化とその分解により生成されることがはっきりした。この

結果の可能性は考えられていたが、イソペンテニル基転移酵素遺伝子の多重破壊株を用いなければ証明できなかったのである。

3) サイトカイニンによる二次肥厚の調節  
サイトカイニン合成酵素4重変異体の作成により、内在サイトカイニンの役割がはっきりした。茎や根の肥厚を司る形成層はサイトカイニンの減少に鋭敏に反応して活性を無くす。これは、サイトカイニンが形成層の中心的な制御因子であることを示している。さらに、4重変異体と野生型の接ぎ木実験により、初めて生理的に意味のある量のサイトカイニンが輸送される事、またイソペンテニルアデニン型のサイトカイニンは地上部から根へ、トランスゼアチン型サイトカイニンは根から地上部に輸送される事もはっきりと示す事ができた。

4) 新しい細胞間情報伝達分子の探索  
本研究が始まった時、新たなペプチド性シグナル分子を見いだす目的で、150個の分泌性ペプチドをコードする遺伝子を個別に植物に導入して過剰発現し、興味深い表現型を引き起こす遺伝子をスクリーニングした。表現型を引き起こす遺伝子が多く見いだされたが、表皮の細胞のパターニングに関わることがわかった二つの遺伝子に集中して機能解析を行った。

植物の表皮は気孔の細胞と、それ以外の表皮細胞から成る。気孔の前駆細胞であるメリステモイドは、原表皮の不等分裂によって作られる小さい細胞である。私達は、**EPF1**が、この不等分裂の分裂面の制御因子であることを見いだした。気孔の前駆細胞が**EPF1**を分泌して、周辺細胞の不等分裂を制御することにより後から形成されるメリステモイドの形成位置を調節するのである。

また、メリステモイド母細胞は、その子孫として気孔の細胞と、非気孔表皮細胞の両方を作る。従って、メリステモイド母細胞の密度が、気孔孔辺細胞を含む植物の表皮の細胞密度を決めると言える。私達は、分泌型ペプチド**EPF2**はメリステモイド母細胞とその子孫細胞で生成され、周辺細胞に働いて、遅れて作られるメリステモイド母細胞の密度をフィードバック制御していることを見いだした。この仕組みが、気孔の細胞を含む植物の表皮の細胞密度を決めるのである。

**EPF1**も**EPF2**も受容体キナーゼにより受容され、そのシグナルはMAPKカスケードによって伝達されるらしいことも分かって来た。今後は、この伝達系を明らかにするとともに、**EPF1**、**EPF2**以外にも見いだされたシグナル分子候補の機能解析を進めたい。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

サイトカイニンの合成と受容機構、生理機能の解析は入念に行い、将来に渡って重要な研究となる。二次肥厚は産業上重要な過程であり、サイトカイニンがその中心的制御因子である事も明らかとなった。また、シグナル分子のスクリーニング系はこの分野を広げ、**EPF2**による細胞の密度と**EPF1**による配置の調節は、発生調節の重要な範例となった。

6. 主な発表論文 (研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

1. Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, Kinoshita-Tsujimura K, Vaclavikova K, Miyawaki K, **Kakimoto T** 2008. Cytokinins are central regulators of cambial activity. *PNAS* 105: 20027-20031

2. Hara K, Kajita R, Torii KU, Bergmann DC, **Kakimoto T**. 2007. The secretory peptide gene **EPF1** enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes Dev* 21: 1720-1725

3. Mahonen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Törmäkangas K, Ikeda Y, Oka A, **Kakimoto T**, Helariutta, Y. 2006. Cytokinin signaling and its inhibitor **AHP6** regulate cell fate during vascular development. *Science* 311: 94-98

4. Mahonen AP, Higuchi M, Tormakangas K, Miyawaki K, Pischke MS, Sussman M, Helariutta, Y, **Kakimoto T**. 2006. Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in Arabidopsis. *Curr Biol* 16: 1116-1122

5. Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, **Kakimoto T**. 2006. Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *PNAS* 103: 16598-16603

6. Higuchi M, Pischke MS, Mahonen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman M, Kakimoto T. 2004. In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *PNAS* 101: 8821-8826

7. Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, **Kakimoto T**. 2004. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* 37: 128-138

[http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio\\_web/lab\\_page/cell\\_physiol/sitepg/](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/cell_physiol/sitepg/)