

植物幹細胞の非対称性を支配する制御システム

Mechanism of Differential Inheritance of Cell Fate Determinant in Plant Stem Cells

(日本植物学会推薦)

研究代表者 北海道大学 藤田 知道 Hokkaido University Tomomichi FUJITA

Multicellular organisms regulate cell numbers and cell fate by using asymmetric cell division and symmetric cell division according to their developmental program and environmental changes. Up to now molecular mechanisms of how asymmetric cell division is controlled and how a mode of cell division is switched between asymmetric cell division and symmetric cell division are largely unknown. The moss, *Physcomitrella patens* provides a good system for such studies due to its simple body plan.

We examined segregation pattern of couple of gene products, including candidates of cell fate determinants, during asymmetric cell division of stem cells of *P. patens*, and found the way of segregation was distinct depending on the proteins, indicating that distinct mechanisms cooperatively function to establish differential inheritance of proteins, leading to different fates of two daughter cells.

When abscisic acid was added to protonemal cells of *P. patens*, we found stem cells divided symmetrically rather than asymmetrically to produce two sibling daughters with the same nature, and the proteins that segregate differentially under a normal condition were almost equally inherited into the two daughters. We found a cell wall protein may play an important role to switch a mode of cell division from asymmetry to symmetry.

研究目的

多細胞生物は受精卵や幹細胞の不等分裂を出発点として、さまざまに細胞を分化させながら発生する。不等分裂にともなう細胞運命決定因子の非対称な分配は、それぞれの娘細胞に非対称な運命をもたらすことになる。このように運命決定因子の非対称分配のしくみを知ることとは、なぜ多細胞生物が発生できるのか、その発生原理の根本の一つを理解することになる。

後生動物では運命決定因子の分配についての共通原理が明らかになってきた。植物でも不等分裂による細胞運命の決定は重要である。しかし受精卵や幹細胞の単離培養は難しく、不等分裂を細胞レベルで解析することは困難である。また、動物で共通に見出された非対称分配を制御する aPKC/PAR など鍵となるタンパク質群が植物には存在しないことなどから、今日でも運命決定因子の分配制御機構はよくわかっていない。

新しい実験モデル植物として注目されているヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)

は、原糸体の頂端細胞が幹細胞として露出して存在し、幹細胞の不等分裂過程を生きのまま1細胞レベルで追跡することが可能である。そこで本研究はヒメツリガネゴケの幹細胞に着目し、不等分裂過程がどのように制御されているのか、その非対称性を支配する分子制御機構の解明を目的とした。

さらに不等分裂が可逆的に等分裂に切り替えられる現象を見出した。幹細胞などが発生プログラムや環境変化に応じて、不等分裂と等分裂を切り替え、細胞の数や種類を制御していることはよく知られている事実である。しかしこのような分裂様式の切り替えがどのようなしくみで制御されているのかはまだほとんどわかっていない。そこで本研究ではこのような分裂様式の切り替えを制御する分子機構の解明も目的とした。

研究経過

1、幹細胞不等分裂時の非対称性は異なるしくみで確立・維持されている

ヒメツリガネゴケの幹細胞に特異的な転写因子、クロマチンリモデリング因子、細胞壁修飾酵素、機能未知のVQモチーフタンパク質それぞれに着目し、幹細胞の不等分裂にともないそれら因子の非対称性がどのように確立し、維持されているのかを生細胞タイムラプスイメージングにより観察した。その結果、4種類の因子はそれぞれ異なるパターンで非対称性を確立していることが明らかとなった。

まず転写因子は細胞周期の間期において核に存在し、核分裂によりそれぞれの娘細胞にほぼ等分配され、分布の偏りは見られない。しかし分裂直後よりこの蓄積は非幹細胞側で急速に失われ、1-2時間後には幹細胞にのみ選択的に蓄積を維持していた。

クロマチンリモデリング因子は間期において核と細胞質の両方に存在しており、分裂期が近づくにつれ将来の幹細胞側に偏って蓄積することが明らかとなった (Fig. 1)。この蓄積には液胞が、幹細胞の基部側から先端側に極性的に伸長していくことが重要であり、液胞の伸長とともに細胞質が先端側に押しやられることによりクロマチンリモデリング因子も先端側に局在していくと考えられた。このような状態で細胞分裂がおこり、細胞質に存在するタンパク質は幹細胞となる娘細胞でより高濃度に分配された。一方でこのタンパク質は、両方の娘細胞の核にはほぼ均等に分配された。つぎに細胞壁修飾酵素 (ペクチンメチルトランスフェラーゼ) の局在のダイナミクスを不等分裂過程で観察した。このタンパク質はゴルジ体に存在すると考えられ、通常時は細胞の先端成長部分に局在していた。この先端部分の局在は細胞周期の全ての時期において維持されており、不等分



Fig.1 Differential inheritance of chromatin remodeling factor during asymmetric cell division of apical stem cell in *P. patens*. Cytoplasmic localization of the protein is acropetally enhanced as the cell progresses through a cell cycle.

裂過程を通じて先端成長を続ける幹細胞側に常に維持されていた。最後に頂端幹細胞の核に局在する機能未知のVQモチーフタンパク質の動態を観察した。このタンパク質の蓄積は、細胞周期の間期のある時期のみ一時的に蓄積することがわかった。分裂期にはこのタンパク質の蓄積は見られなくなり、分裂直後にもどちらの娘細胞にもこのタンパク質の蓄積は認められず、分裂後のおよそ1-2時間後に幹細胞の核にのみ再び蓄積が認められた。幹細胞の核における蓄積はその後減少し、次の分裂期の1-2時間前にはその蓄積は完全に見られなくなった。

以上のように幹細胞に選択的に局在する4種類のタンパク質の分配のされ方は、それぞれにより異なっていた。転写因子の非対称性の確立には、非幹細胞側での特異的な分解あるいは核外への輸送等が考えられる。クロマチンリモデリング因子の非対称性の確立には、液胞の非対称的な伸長が重要であり、そのためには液胞と微小管の相互作用が重要であると考えている。ゴルジ体に存在する細胞壁修飾酵素の幹細胞側への非対称な分配は、先端成長部分の極性を維持し続けることが大切であり、VQモチーフタンパク質の幹細胞側での特異的な蓄積には、この遺伝子の転写制御ならびにプロテアソームを介したタンパク質の分解系が関係しているのではないかと考えられた。このように不等分裂にともなうタンパク質の非対称分配には少なくとも4種類以上の異なるしくみが関わっていることが示唆された。

ところで細胞が不等分裂を正常に遂行するためには、不等分裂の各素過程が細胞周期の進行とともに秩序を保ちながら進行することが必要である。出芽酵母やショウジョウバエの神経前駆細胞の不等分裂には、細胞周期制御因子であるサイクリン依存性キナーゼCdc2が重要であり、このタンパク質のリン酸化制御が細胞極性の制御や運命決定因子の非対称分配の制御に重要であることが報告されている。そこでヒメツリガネゴケにおいてもCdc2ホモログに着目し、不等分裂との関わりを調べた。ヒメツリガネゴケのゲノム中より2種類のCdc2ホモログ、PpCDKA-1、PpCDKA-2を同定し、それぞれの遺伝子破壊体を作成したところ、目立った異常は観察できなかった。そこで両者の2重遺伝子破壊体を作成したところ、幹細胞の先端成長領域は通常1カ所であるが、2重遺伝子破壊株では2カ所できる、あるいは先端成長領域が広がる等の異常を見出した(Fig. 2)。このような異常はいったん形成された極性を維持する過程が異常であると考えられた。またこのような極性異常は通常の培養条件下ではほとんど見出せず、熱や乾燥などストレス環境下で顕著に現れることがわかった。さらにストレス環境下では、細胞伸張が顕著に抑制されることもわかった。このようにヒメツリガネゴケのCDKAは幹細胞の極性維持に必須であり、とりわけ高温や乾燥等のストレス条件下において正常な不等分裂を行うために重要な役割を担っていると考えられた。



Fig.2 PpCDKA knock-out phenotype. Apical stem cell is growing straight in a wild type (upper), but windingly in the knock-out line (lower). Bars=20 μ m.

酵母や後生動物では不等分裂する細胞の極性形成・維持を制御する上流の鍵因子として、低分子量 G タンパク質が知られている。本研究において、ヒメツリガネゴケのゲノム中に低分子量 G タンパク質 PpRop およびその活性化因子 PpRopGEF をそれぞれ 4 種類、6 種類同定した。この中から不等分裂する幹細胞において高発現している PpRop、および PpRopGEF を同定し、それらを条件的に過剰発現する形質転換体を作成し、表現型を観察した。その結果、幹細胞の先端成長部分が大きく膨らむことや等分裂の頻度が上昇することを見出した。PpCDKA と PpRop、PpRopGEF が不等分裂にともないどのようにその局在を変化させるのか、またそれぞれがどのように関係して極性を制御しているのかは今後の課題である。

2、アブシジン酸は幹細胞の非対称性を抑制し、等分裂を誘導する

ヒメツリガネゴケの原系体を乾燥や低温あるいはアブシジン酸 (ABA) 処理することにより brood cell と呼ばれるストレス耐性の細胞が誘導されることが知られている。本研究において brood cell の形成過程を経時的に観察したところ、ABA 処理により本来不等分裂するべき幹細胞が、等分裂により多数の brood cell を生み出していることを見出した。また不等分裂から等分裂への切り替えは可逆的であり、brood cell から ABA を除去することにより、brood cell は不等分裂を再開し、通常の幹細胞を生み出すことを見出した。ABA により誘導される分裂が等分裂であるかどうかを上述のクロマチンリモデリング因子の分配に着目して調べたところ、どちらの娘細胞にもこの因子はほぼ等分配されていることがわかった。また同様に上述の細胞壁修飾酵素の動態を観察したところ、ABA を添加後 1 時間以内に細胞内におけるこのタンパク質の非対称分布が失われることがわかった。このように ABA などストレス条件下では、細胞極性がすみやかに失われ、結果として等分裂により brood cell が多数作られることになると考えられた。

ストレス環境下における brood cell の誘導には、ABA シグナル伝達系の ABI3/VP1 や ABI1 のオルソログが関与していることが報告されている。本研究では、ヒメツリガネゴケのプロトプラストに過剰発現することにより brood cell 様の細胞を誘導することができた 2 種類の因子を新たに同定し、機能解析を進めた。それぞれの因子は、タンパク質の一次構造解析からアラニン・プロリンリッチなアラビノガラクトン様タンパク質およびグリコシルトランスフェラーゼをコードしていると考えられた。これら因子の条件的遺伝子過剰発現体を作成し過剰発現したところ、細胞が球状になり極性を失った brood cell 様の細胞を多数誘導することに成功した (Fig. 3)。さらにアラビノガラクトン様タンパク質の局在を調べたところ、このタンパク質は細胞膜に蓄積するものの、細胞全体ではなく、細胞ど

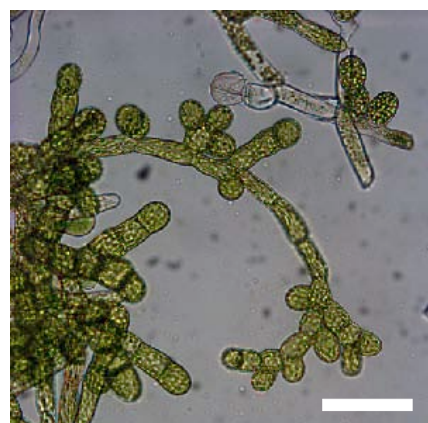


Fig.3 Inducible over-expression phenotype of Ala-Pro rich cell wall protein. Brood cell-like, globular-shaped cells are induced by an over-expression of the cell wall protein. A globular form of the cells indicates a loss of cell polarity in each cell. A bar=50 μ m.

うしが接する隔壁部分の細胞膜領域にのみ局在すると考えられた。ABA を添加したところ、このタンパク質の蓄積は見られなくなった。以上の結果よりこのタンパク質の細胞内での非対称な蓄積が細胞極性を制御する上で何らかの役割を果たしているのではないかと考えている。このタンパク質を過剰発現することは、このタンパク質の非対称な分布を乱すことになり、結果として細胞の極性が失われ、等分裂によりどちらの娘細胞も brood cell 様の球状の細胞に誘導されたのではないかと考えている。

不等分裂により生じたそれぞれの娘細胞がもつ位置情報は、幹細胞や非幹細胞などそれぞれの細胞の性質に応じて非対称であると考えられる。そしてこの位置情報の非対称性を維持することは、個々の細胞運命を維持する上で重要だと考えられる。植物において隣接した細胞間の位置情報の制御には、原形質連絡を介した細胞間コミュニケーションが重要である。そこで本研究では、ヒメツリガネゴケにおいて原形質連絡を介した細胞間のタンパク質移動を細胞レベルで可視化できる実験系を用いて、その制御を解析した。その結果、タンパク質の細胞間移動は ABA の添加により 1 時間以内に停止することがわかった。また ABA を除去することによりタンパク質の移動が再開することがわかった。このように ABA は原形質連絡を介した高分子輸送を制御することにより、隣接した細胞間の位置情報の制御に関わっているのかもしれない。

考察

本研究において不等分裂に関わる 4 種類の因子が、不等分裂過程を通じてどのように非対称性を確立し、維持されるのかを経時的に観察した。その結果、各因子により異なるパターンでその非対称性が確立・維持されていることが明らかとなった。このような非対称性の確立・維持のメカニズムが相互にどのように関係しているのかについては、それぞれの因子間ならびに低分子量 G タンパク質や CDKA などとの遺伝学的関係を明らかにし、さらにこれら因子がどのような因子をターゲットとして非対称性を制御しているのかを調べることにより、明らかにできると考えている。

今回 ABA などのストレスシグナルが不等分裂する幹細胞の分裂様式を可逆的に等分裂に切り替えることを明らかにできた。しかし、ABA が本来不等分裂する幹細胞の分裂をどのように等分裂に切り替えるのかの分子機構は現時点では不明である。シロイヌナズナにおいては、ABA と低分子量 G タンパク質 AtRop が互いを抑制し合う関係であることが報告されている。ABA が *PpRop* の発現を抑制することで細胞極性を崩壊させ、等分裂への引き金を引いているのかもしれない。予備的にはあるが、ABA の添加により *PpRop* の発現レベルが 1 時間以内に低下することを確認している。今後は ABA による *PpRop* の発現低下やアラビノガラクトン様タンパク質の蓄積、局在の変化がどのように細胞極性を制御し、分裂様式を切り替えるのか、細胞骨格系との関連にも着目して解析を進めていく。

また ABA が原形質連絡を介したタンパク質輸送を制御している可能性を明らかにすることができた。今後 ABA による原形質連絡の制御の分子機構の解明とそれにより隣接した細胞運

命の非対称性がどのように制御されるのかを明らかにすることが重要であると考える。

研究発表

口頭発表

1. Munenori Kitagawa, Yoshikatsu Sato, and Tomomichi Fujita ; Analysing the plasmodesmal regulation at a single cell level in *Physcomitrella patens*. Seoul National University-Hokkaido University joint symposium (Sapporo, 2010)
2. Munenori Kitagawa, Jun Matsuzaki, Yoshikatsu Sato, and Tomomichi Fujita ; Analysing the plasmodesmal regulation at a single cell level in *Physcomitrella patens*. MOSS 2010, The 13th Annual International Conference for Moss Experimental Research (Sapporo, 2010)
3. Kohei Nakamura, Ayako Ichiriki, Masaki Ishikawa, Yoichi Sakata, Ralph Quatrano, Takeshi Maruyama, Koji Mikami, Mitsuyasu Hasebe, and Tomomichi Fujita ; Switching between asymmetric cell division and symmetric cell division in the moss, *Physcomitrella patens*. MOSS 2010, The 13th Annual International Conference for Moss Experimental Research (Sapporo, 2010)
4. 中村康平、石川雅樹、坂田洋一、Ralph Quatrano、日渡祐二、長谷部光泰、藤田知道 ; 「ヒメツリガネゴケにおける ABA による不等分裂から等分裂への切り替えの解析」、日本植物生理学会（熊本、2010）
5. Tomomichi Fujita ; The moss, *Physcomitrella patens* as a visible model of asymmetric cell division in plants. Seoul National University-Hokkaido University joint symposium (Seoul, 2009)