

論文の内容の要旨

Study on the functions of BES1 family transcription factors in differentiation of vascular stem cells in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナの維管束幹細胞分化における BES1 転写因子ファミリーの機能解析)

齊藤 真人

【序】

植物の発生は動物と異なり、幹細胞が生涯維持されて継続的に細胞を供給することで成長する。維管束を構成する木部、篩部細胞は非常に特殊化しており、分化が不可逆であることから、これらを生み出す維管束幹細胞はとりわけ厳密な制御が必要である。これまで多くの転写因子が維管束形成過程で働くことが報告されているが、維管束幹細胞がどのような遺伝子発現制御を受けるかは不明である。本研究では、維管束幹細胞の分化を抑制している GSK3 キナーゼ (GSK3s) シグナル系に着目し、下流の転写因子を同定することで、維管束幹細胞の維持機構に迫った。

【結果と考察】

1. GSK3s の下流因子の探索

GSK3s は標的転写因子をリン酸化し、その活性を制御すると考えられている。GSK3 阻害剤は維管束幹細胞の分化を促進し、植物ホルモン処理と合わせて異所的な維管束細胞分化を誘導する実験系 (以下 VISUAL) が確立している (図 1)。本研究では、GSK3s 標的基質として知られる BES1 転写因子ファミリーに着目をし、これらの機能欠損変異体を収集した。これら変異体の VISUAL における表現型を解析したところ、特に *bes1* 変異体において木部分化率の著しい低下がみられた。この表現型は *bes1* の複数アレルで共通に見られ、また BES1 遺伝子の導入により回復することが確かめられた (図 2)。マイクロアレイや定量的 PCR による遺伝子発現解析の結果、*bes1* 変異体では木部だけではなく篩部関連遺伝子についても発現レベルが低下していた (図 3)。一方で、*bes1* 変異体では維管束幹細胞関連遺伝子の一部において発現上昇がみられたことから、分化が阻害されることで幹細胞が多

く維持されている可能性が示唆された (図 3)。これらの結果は、BES1 が GSK3s の下流で働き、維管束幹細胞から木部、篩部細胞のいずれの分化にも必要であることを示唆している。

2. BES1 ファミリーにおける冗長性の検証

BES1 のホモログのうち、最も相同性の高い BZR1 は BES1 と冗長的に機能すると考えられている。BZR1 は機能獲得型変異体を用いた解析がなされているが、機能欠損変異体は報告がない。そこで新たにゲノム編集技術により *bzr1* 変異体、*bes1 bzr1* 二重変異体を作出し、機能冗長性を検証した (図 4)。*bes1 bzr1* 変異体では木部、篩部分化のいずれに関しても、*bes1* 変異体に比べ更に抑制された (図 5)。単独変異体の比較では、*bzr1* 変異体は *bes1* 変異体に比べて弱い表現型を示すことが分かった (図 6)。これらの結果から、BZR1 は BES1 に比べると寄与度は低いものの、両者は冗長的に木部、篩部分化に機能することが示唆された。しかしながら、*bes1 bzr1* 変異体では、植物体の維管束形成においては顕著な表現型がみられなかった (図 7)。加えて、BES1 と BZR1 は、植物ホルモンであるブラシノステロイド (BR) シグナル伝達における主要な転写因子でもあるが、*bes1 bzr1* 変異体では BR 応答は部分的に低下するものの、BR 欠損変異体と類似した表現型を示さなかった (図 7)。これらの結果から、BES1 ファミリーの中で更なる冗長性をもつ可能性を考え、機能獲得型変異体 *bes1-D bzr1-D* を用いて維管束分化の表現型を確認した。変異体においては維管束幹細胞が減少する傾向が見られ、また異所的な篩部が一部の個体で確認された (図 8)。この結果は VISUAL において BES1、BZR1 が分化を促進することと一致しており、植物体においても BES1、BZR1 が維管束分化を促進していることが示唆された (図 9)。

【まとめ】

本研究では、BES1 ファミリーの機能欠損変異体を用い、培養系と組み合わせることによって、転写因子 BES1 及び BZR1 が維管束幹細胞から木部、篩部細胞のいずれの分化も促進することを見出した。また分化に対する寄与は BES1 が BZR1 に比べて大きいことが分かった。分化の方向性を決める仕組みは BES1 ファミリーだけでは説明できないため、他の制御機構があると予想される。



図1：VISUALの概要
植物ホルモンと GSK3 阻害剤 (bikinin) を処理することで、シロイヌナズナの子葉の葉肉細胞が維管束幹細胞を経て木部、篩部細胞へと分化する。DIC image で褐色に見えるのはすべて木部細胞。

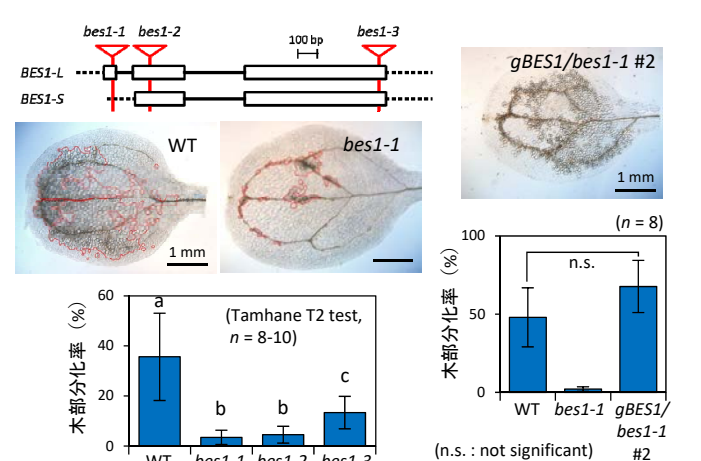


図2：bes1 変異体の表現型と相補性試験
写真は VISUAL で分化誘導後4日目の子葉。異所的な木部を赤枠で示した。グラフは異所的な木部分化率を定量化したもの。左は複数の bes1 アリルを用いた比較、右は相補性試験。

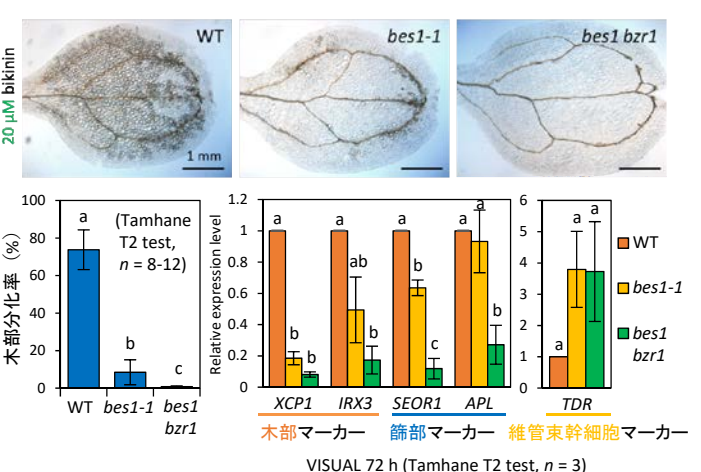


図3：VISUALにおける遺伝子発現解析
上は RT-PCR により定量化されたマーカー遺伝子の発現量。bes1 では木部、篩部マーカーの発現が抑制された。下はマイクロアレイ解析の結果。野生型で分化誘導後に4倍以上発現が上昇する遺伝子を維管束特異的遺伝子とし、発現パターンにより階層型クラスタリングを行った。bes1 で発現が低下するものと上昇するものに大きく分かれたため、それぞれについてGO 解析で上位5つまでの Term についてそれぞれ示した。

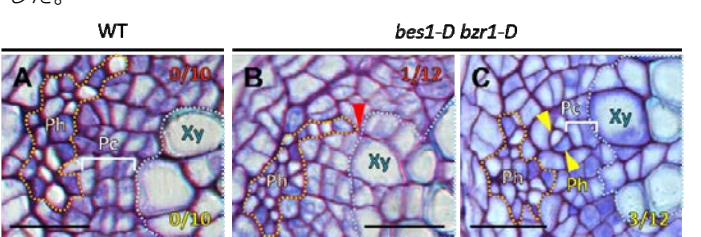


図4：BZR1 の変異体の作製
CRISPR/Cas9 法を用いて BZR1 に変異を導入した。大文字・小文字は野生型におけるエキソン・イントロンの配列。矢じりはスプライシングの位置を示す。

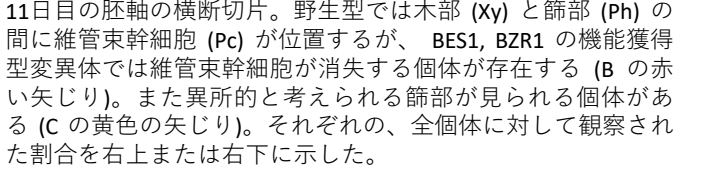


図5：bes1 bsr1 のVISUALにおける表現型
左は分化誘導後 4 日目の子葉。右は異所的な木部分化率を定量化したグラフ。bsr1 変異体は bes1 よりも弱い表現型を示した。

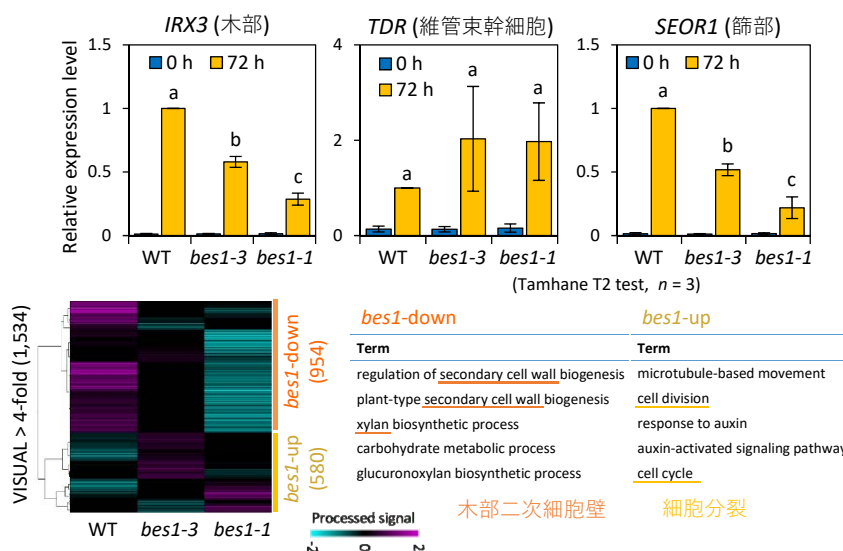


図6：bsr1 のVISUALにおける表現型
左は分化誘導後 4 日目の子葉。右は異所的な木部分化率を定量化したグラフ。bsr1 変異体は bes1 よりも弱い表現型を示した。

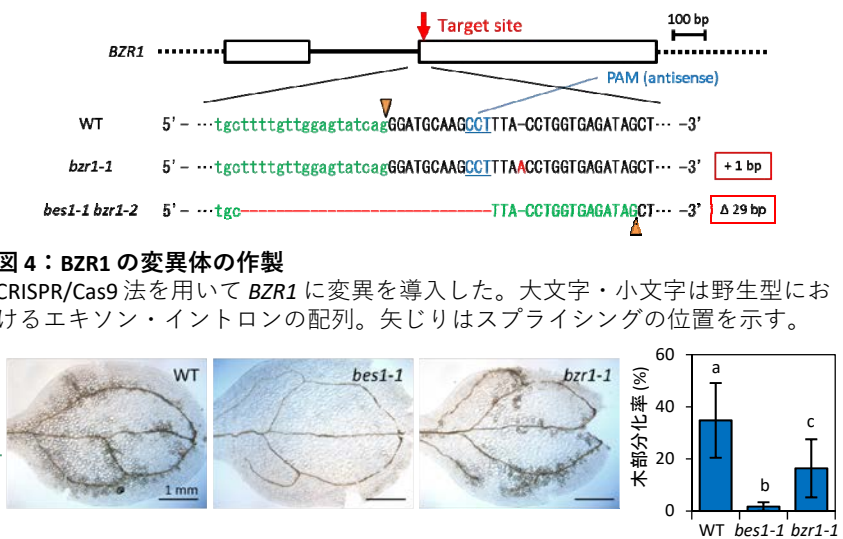


図7：bes1 bsr1 の in vivo の表現型
左は胚軸 (上) 及び花茎 (下) の横断面。花茎は一部を拡大している。右上は BR 処理条件下による胚軸の長さ。未処理条件での胚軸の長さを 1 とした相対値で示した。bes1 bsr1 では BR による胚軸伸長が抑制された。右下は暗所で発芽させた芽生えの胚軸の長さ。bri1 は BR 受容体の変異体であり、暗所での胚軸伸長が阻害されるが、bes1 bsr1 では阻害されなかった。

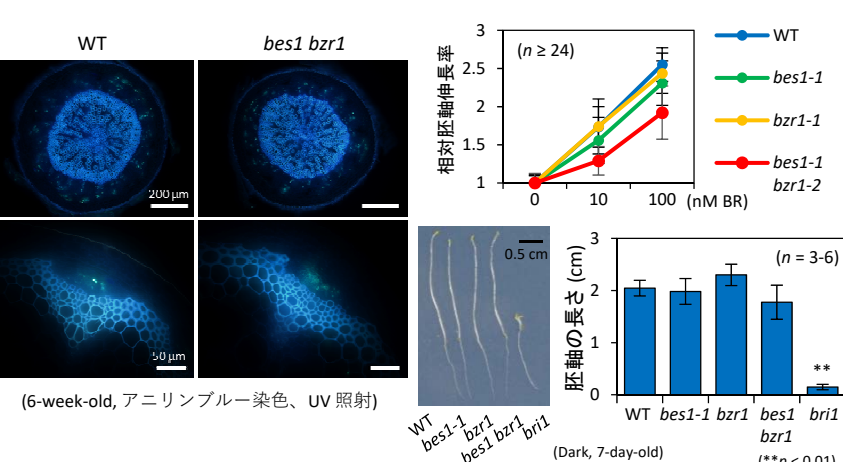


図8：維管束幹細胞の分化のモデル
GSK3 の下流で BES1、BZR1 が維管束幹細胞から木部・篩部の両方の分化を促進する。

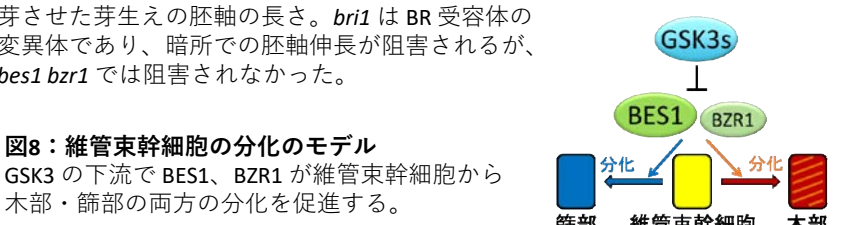


図9：bes1-D bsr1-D 二重変異体の表現型
11日目の胚軸の横断切片。野生型では木部 (Xy) と篩部 (Ph) の間に維管束幹細胞 (Pc) が位置するが、BES1、BZR1 の機能獲得型変異体では維管束幹細胞が消失する個体が存在する (B の赤い矢じり)。また異所的と考えられる篩部が見られる個体がある (C の黄色の矢じり)。それぞれの、全個体に対して観察された割合を右上または右下に示した。