

学位論文

*ERECTA* 受容体ファミリー遺伝子群による  
シロイヌナズナ茎頂分裂組織の制御機構の解明

*ERECTA*-family receptor kinase genes regulate  
stem cell maintenance in shoot apical meristem of  
*Arabidopsis thaliana*

木村 友香

名古屋大学大学院  
理学研究科 生命理学専攻

2017 年 12 月

# 目次

要旨

図表目次

## 第 1 章 序論

1-1 本研究の背景

1-2 本研究の目的

1-3 本研究で見出したこと

## 第 2 章 *er erl1 erl2* における幹細胞維持の *WUS* 依存性と *ER* ファミリーが表皮で果たす機能

2-1 *er erl1 erl2* における幹細胞の *WUS* 依存性

2-2 *ER* ファミリーの表皮での機能

## 第 3 章 *er erl1 erl2* の *SAM* の制御における各種シグナル経路の細胞層ごとの反応の差異

3-1 *CLV3* 経路が *SAM* に与える影響の細胞層特異的な調節

3-2 *er erl1 erl2* の幹細胞領域におけるサイトカイニン経路の働き

## 第 4 章 考察

4-1 *ER* ファミリーは適切な *SAM* の恒常性の維持のために *WUS* 非依存的な活性を抑制する

4-2 *wus er erl1 erl2* の SAM における *CLV3pro:GUS* のシグナルを持つ細胞と増殖性細胞の関係について

4-3 形成中心における一次的なサイトカニン応答の下流で作動する細胞非自律的な効果を ER ファミリーは細胞層特異的に調節する

4-4 幹細胞制御における ER ファミリーのリガンド

4-5 最後に

材料と方法

参考文献

謝辞

## 要旨

植物の表皮の細胞層と表皮の下に存在する内部組織は成長の間に異なった機能を発揮する。植物の全ての地上部組織の源である茎頂分裂組織(SAM)も表皮とその内部の組織からなる層構造をとっている。その SAM の内部には幹細胞集団が表皮と内部の両方の細胞層にわたってひとまとまりの集団として維持されており、新たな器官を作り出すための娘細胞を周囲に供給し続ける。しかしながら、これらの幹細胞が性質の異なる複数の細胞層の中でどのような制御を受けて 1 つの集団として振る舞うのかは未だ解明されておらず、興味深い疑問点である。さらに、SAM は層構造とは別の捉え方においても機能の異なる複数の領域を持つ複雑な組織である。このような複合組織である SAM の恒常性制御においては細胞間コミュニケーションが不可欠であると考えられる。

そこで、本論文では、以前に SAM の恒常性の制御に関わることが報告されている受容体、*ERECTA (ER)*ファミリーに着目した解析を行った。シロイヌナズナ *ER*ファミリー遺伝子は互いによく似た *ER*、*ERECTA LIKE1 (ERL1)*、*ERL2* の 3 遺伝子で構成されており、細胞膜結合型の受容体をコードしている。これまでに *ER* ファミリーは気孔の分布制御や花茎の伸長制御、葉の鋸歯の形成、木部の繊維細胞の分化開始時期の調節など植物の成長において様々な機能を担うことが報告されてきた。SAM においては、*ER* ファミリーの全ての遺伝子が SAM の全域で発現し、*ER* ファミリーの機能欠損三重変異体 *er erl1 erl2* では SAM が肥大した形態を示し、幹細胞の領域も拡大することが報告されていたが、その役割の詳細は明らかとなっていなかった。

本研究では、まず *ER* ファミリーと幹細胞の維持に必須の因子として知られてきた *WUSCHEL (WUS)* との関係の解析、そして *er erl1 erl2* の SAM の幹細胞の異常を抑制するために *ER* が機能すべき部位の解析を行った。さらに、*WUS* の上流制御因子である *CLAVATA3 (CLV3)*、*WUS* の下流因子であるサイトカイニンシグナルと *ER* ファミリーとの関わりも解析した。以下にこれらの結果の概略を詳しく述べる。

### 1. *er erl1 erl2* は *wus* の幹細胞が消失する表現型を回復させる

*er erl1 erl2* 三重変異体の拡大した幹細胞領域は *WUS* の機能を必要とするのかを調べるために、*wus er erl1 erl2* 四重変異体を作成し、SAM の表現型を解析したところ、*wus er erl1 erl2* の SAM は *er erl1 erl2* の肥大した形態を維持

し、SAM 内部層の幹細胞マーカーは消失していたものの表皮には幹細胞マーカーの発現を維持していた。この結果から、*er erl1 erl2* の SAM の表皮の幹細胞領域は *WUS* の機能に非依存的に維持されるが、内部に位置する幹細胞の維持には *WUS* の機能が必要となることが明らかとなった。

## 2. 表皮における *ER* の発現は *er erl1 erl2* の SAM と幹細胞の表現型を抑制する

*er erl1 erl2* の SAM における幹細胞マーカーの発現パターンを詳細に解析したところ、SAM の周縁の表皮層に異所的なシグナルが観察された。また、*wus er erl1 erl2* においては SAM の表皮にのみ幹細胞マーカーが維持されていた。これらの結果を受け、表皮での *ER* の機能が SAM の制御にとって重要であると推測した。そこで、*er erl1 erl2* 背景で表皮特異的に *ER* を発現させたところ、SAM と幹細胞領域の肥大が野生型程度まで回復した。*wus er erl1 erl2* で同じ操作を行うと、*wus* 単独変異体と同様の表現型を示した。したがって、表皮で発現する *ER* が SAM の肥大を抑制し、また *WUS* の機能に依存しない幹細胞制御に関わることが示唆された。

## 3. *er erl1 erl2* に対する *CLV3* 添加、サイトカニン阻害の効果は層特異的に現れる

*CLV3* は分泌型ペプチドをコードしており *WUS* の発現を抑制する機能を持つ。そこで *CLV3* と *ER* ファミリーの関係性を解析するために *er erl1 erl2* に *CLV3* ペプチドを投与したところ、この操作で全ての幹細胞マーカーが消失する野生型とは異なり、*er erl1 erl2* では内部組織の幹細胞マーカーは *CLV3* に応答し著しく縮小した一方で、表皮の幹細胞マーカーは *CLV3* に耐性を示した。次に、*WUS* は SAM のサイトカニン応答性を促進することで SAM の恒常性を制御する機能を持つため、サイトカニンと *ER* ファミリーの関係性も解析した。*er erl1 erl2* に対してサイトカニンシグナルの阻害を施したところ、全ての層の幹細胞マーカーが影響を受ける野生型とは異なり、*CLV3* 投与時と同様に内部の組織の幹細胞マーカーは著しく縮小したが表皮では耐性を示した。すなわち、*er erl1 erl2* の内部の幹細胞層の維持にはサイトカニンシグナルが必須である一方で表皮の幹細胞層の維持にはサイトカニンシグナルは必要とされないと考えられる。これらの結果から、*ER* ファミリーは *CLV3* とサイ

トカイニンによる表皮と内部組織の間での幹細胞の振る舞いの調節に必要であることが示唆された。

以上のように、本論文によりこれまでに報告のなかった *WUS* に依存しない幹細胞制御機構の存在を提示し、その仕組みの中で *ER* ファミリーが重要な役割を果たしていることを示した。また、幹細胞が *CLV3*、*WUS*、サイトカイニンから受ける影響を *ER* ファミリーが層ごとに調節していると考えられた。

Reference: Kimura Y, Tasaka M, Torii KU, Uchida N

*ERECTA*-family genes coordinate stem cell functions between the epidermal and internal layers of the shoot apical meristem.

Development 2017, in press.

## 図表目次

図 1-1 SAM の構造

図 1-2 SAM の層構造と分裂様式

図 1-3 SAM の恒常性の制御因子

表 2-1 花器官の数

図 2-1 *wus* 変異によって引き起こされる SAM の欠損は *er* ファミリー変異によって抑制される

図 2-2 *wus* 変異によって変化した花序の形態が *er erl1 erl2* 変異によって回復する

図 2-3 *wus er erl1 erl2* の SAM における細胞増殖活性

図 2-4 *CLV3pro:GUS* のシグナルが *wus er erl1 erl2* の SAM の表皮特異的に維持されている

図 2-5 内在性 *CLV3* の発現パターンと *CLV3* と *STM* の発現量

図 2-6 表皮特異的な *ER* の導入は *er erl1 erl2* で引き起こされる *CLV3pro:GUS* の変化を回復させる

図 2-7 表皮特異的な *ER* の発現は芽生えの成長を大きく回復させる

図 3-1 *er erl1 erl2* の SAM は *CLV3* ペプチドに対して耐性である

図 3-2 *WUSpro:GUS* と *CLV3pro:GUS* への *CLV3* ペプチドの効果

図 3-3 *CLV3* ペプチドの効果は *er erl1 erl2* の SAM の *CLV3pro:GUS* の発現に対して細胞層特異的な効果をもたらす

図 3-4 *CLV3pro:GUS* のシグナルを有する表皮の長さ( $\mu\text{m}$ )と面積( $\mu\text{m}^2$ )を計測に用いた方法

図 3-5 *CLV3* の発現量に対する *CLV3* ペプチドの効果

図 3-6 *er erl1 erl2* においても *CLV3* は SAM のサイズの制御を行っている

図 3-7 根の成長に対する *CLV3* ペプチドの効果

図 3-8 *er erl1 erl2* の SAM におけるサイトカニン応答性レポーターの発現パターン

図 3-9 *Type-B ARR* 遺伝子群とサイトカニン受容体遺伝子群の発現量

図 3-10 サイトカニンシグナルを阻害すると *er erl1 erl2* の SAM における *CLV3pro:GUS* の発現が細胞層特異的に阻害される

図 3-11 サイトカインシグナルの阻害が表皮と内部組織の *CLV3pro:GUS* に与える影響

図 4-1 *wus er erl1 erl2* の SAM における *CLV3pro:GUS* の発現パターンと増殖性細胞の分布パターンの不一致から考えられる可能性

図 4-2 SAM における *EPFL1pro:GUS* と *EPFL2pro:GUS* の発現パターン



## 第 1 章 序論

### 1-1 本研究の背景

#### 1-1-1 植物の茎頂分裂組織

植物の茎の先端にある茎頂分裂組織(Shoot apical meristem : SAM)は植物の葉や茎、花などの地上部組織を生み出す元となる未分化な細胞の集団である。SAM はドーム状の形態をしており、ドームの先端に位置する中央領域、中央領域の下に位置する形成中心、ドームの側面にあり中央領域をドーナツ状に囲む周辺領域、中央領域の下にある髄状領域の 4 つの領域に分けられ(図 1-1)、それぞれの領域は異なる機能を持つ(Perales and Reddy, 2012)。中央領域には一定の幹細胞集団が維持されており、形成中心が幹細胞の維持で重要な役割を果たす(Gordon et al., 2009; Miwa et al., 2009; Yadav et al., 2010)。

さらに、SAM のドームは層状の構造もっており、表皮を形成する L1 層、内部組織を形成する L2 層と L3 層で構成されている(図 1-2A)。それぞれの層は細胞分裂の様式が異なっており、L1 層と L2 層は垂層分裂、L3 層は垂層分裂と並層分裂の両方を行う(図 1-2B)(Meyerowitz, 1997)。成長の間、それぞれの層は異なる働きを担うが(Meyerowitz, 1997)、幹細胞集団は SAM の中央領域の L1 から L3 の全ての層にまたがって存在する(図 1-2A)。異なる層にまたがって維持されている幹細胞集団がどのようにして一つの集団として振る舞うよう制御されているのか、また、その仕組みの中で働く因子やメカニズムは未解明である。

#### 1-1-2 幹細胞の維持を制御する分子

SAM の形成中心で発現する *WUSCHEL* (*WUS*)は転写因子をコードしており、幹細胞の性質を維持するための中心的な役割を持つと考えられてきた(図 1-3A)。*WUS* 遺伝子を欠損した *wus* 変異体は胚発生で作られた幹細胞を芽生えた後に正常に維持することができず、幹細胞をいくつかの本葉を形成するために消費した後には、SAM が消失した表現型を示す(Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998)。この SAM と幹細胞の消失という *wus* 変異体の表現型を回復させるよう

な抑圧変異体はこれまでに見つかっておらず、*WUS*に依存しない幹細胞維持メカニズムに関する理解はほぼ進んでいない。*CLVATA3 (CLV3)*は幹細胞特異的に発現する遺伝子であり、*WUS*の発現を抑制する働きを持つ分泌型ペプチドをコードしている(図 1-3A)(Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000)。*WUS*は幹細胞領域の*CLV3*の発現を促進し(図 1-3A)、*CLV3*は形成中心における*WUS*の発現を抑制する(図 1-3A)(Brand et al., 2000; Fletcher et al., 1999; Kinoshita et al., 2010; Miwa et al., 2009; Schoof et al., 2000; Shinohara and Matsubayashi, 2015)。この*WUS*と*CLV3*によるネガティブフィードバックループによって幹細胞数が一定に維持されていると考えられている(図 1-3A)。

植物ホルモンのサイトカイニン(SAM)の表皮層で生合成され、SAMの恒常性を制御する(図 1-3B)。近年の数理的な解析によって、表皮由来のサイトカイニンが形成中心を含む領域で発現するサイトカイニン受容体を介したサイトカイニン応答によって*WUS*の発現パターンを形成することが提唱されている(図 1-3B)(Adibi et al., 2016; Chickarmane et al., 2012; Gordon et al., 2009; Gruel et al., 2016)。この*WUS*の発現誘導はサイトカイニンシグナル伝達の構成要素である*type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR)*群によって直接的に制御されている(図 1-3B)(Meng et al., 2017; Wang et al., 2017)。また、*WUS*はサイトカイニンのシグナル伝達における負のフィードバックを担う*type-A ARR*の*ARR7*と*ARR15*の発現を抑制することでSAMにおけるサイトカイニン応答性を促進する(図 1-3B)(Leibfried et al., 2005)。しかしながら、形成中心におけるサイトカイニン応答が細胞非自律的にSAMの他の領域にまで影響を与える仕組みについてはまだよくわかっていない(図 1-3B)。これまでに解析されてきた*WUS*に依存した幹細胞維持メカニズムとは対照的に*WUS*非依存的なメカニズム(Huang et al., 2015; Lee and Clark, 2015)の解明もほぼ進んでいない。

## 1-2 本研究の目的

*ERECTA (ER)*ファミリーは細胞膜貫通型の受容体キナーゼをコードしており、コードするアミノ酸配列の似た*ER*、*ERECTA LIKE 1 (ERL1)*、*ERL2*の3つの遺伝子で構成されている(Shpak et al., 2004)。これまでに*ER*ファミリ

一は気孔の分布(Shpak et al., 2005)、花茎の伸長(Uchida et al., 2012)、鋸歯の形態(Tameshige et al., 2016)、胚軸の拡大(Ikematsu et al., 2017)など、植物の様々な部位の形態をファミリーのいくつかの因子あるいは全ての因子が機能冗長的に制御することが報告されている。SAM においては、*ER* ファミリーの全ての遺伝子が SAM の全体で発現しており、SAM の恒常性の維持への関与が報告されている(Bemis et al., 2013; Chen et al., 2013; Uchida et al., 2011; Uchida et al., 2013)。*er erl1 erl2* 三重変異体の SAM は肥大した形態を示し、幹細胞領域も拡大する(Chen et al., 2013; Uchida et al., 2013)。さらに、*er erl1 erl2* の SAM の細胞増殖はサイトカニンに対して高感受性を示すことも報告されている(Uchida et al., 2013)。しかしながら、幹細胞の維持において *ER* ファミリーの活性が *CLV3-WUS* 経路やサイトカニンシグナル伝達経路とどのように関わっているかの具体的な仕組みの大部分は未解明である。

### 1-3 本研究で見出したこと

本研究では、SAM や幹細胞の維持における *ER* ファミリーの未解明な機能に迫ることを目指した。まず *er erl1 erl2* を用いた解析をさらに進めたところ、*wus* 変異体における SAM の消失が *ER* ファミリー遺伝子の欠損 (*er erl1 erl2* の三重変異) により回復し、そのときの幹細胞マーカー遺伝子は SAM の表皮特異的に発現が回復した。この *er erl1 erl2* の表現型は表皮特異的な *ER* の導入によって抑制された。さらに、*er erl1 erl2* では、*CLV3* 経路を活性化したときとサイトカニンシグナル伝達経路を阻害したときに、野生型とは異なり、幹細胞マーカー遺伝子のパターンが細胞層ごとに異なる影響を受けるようになった。これらのことから、*ER* ファミリーは *CLV3* 経路、*WUS* 経路の必要性、サイトカニンへの応答を細胞層ごとに変化させることを通じて SAM の異なる細胞層の間で幹細胞の振る舞いを調和させる作用を持つと考えられた。以降の章でこれらの解析結果を具体的に述べる。

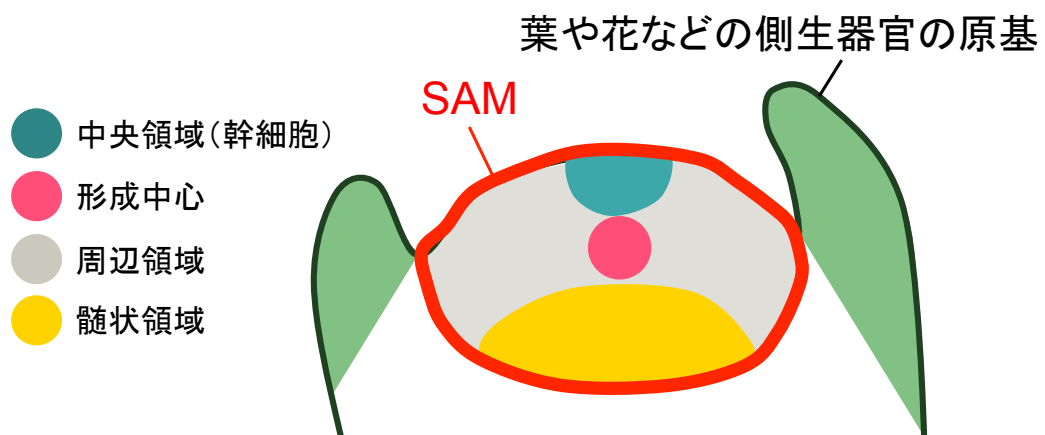


図 1-1 SAM の構造

SAM の各領域。赤線で囲んだ領域は SAM の領域を示している。

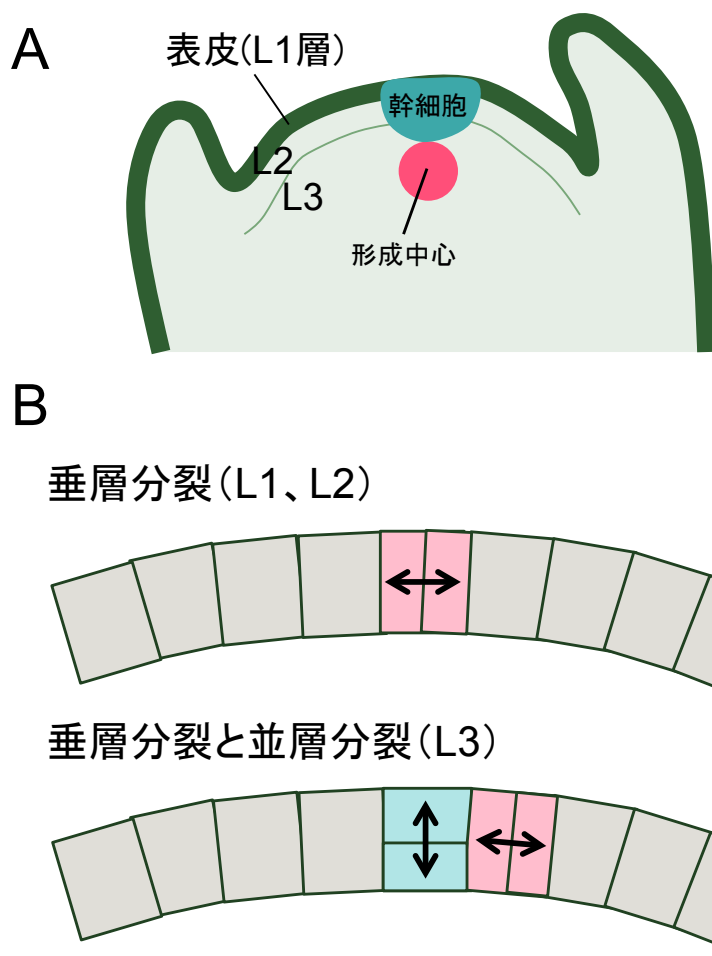


図 1-2 SAM の層構造と分裂様式

(A) SAMの層構造。L1層からL3層にまたがって幹細胞領域は維持されている。幹細胞領域の下のL3層内に形成中心が位置している。

(B) 垂層分裂は分裂面が表面に対して垂直になる分裂のことをいう。並層分裂は分裂面が表面に対して平行になる分裂のことをいう。

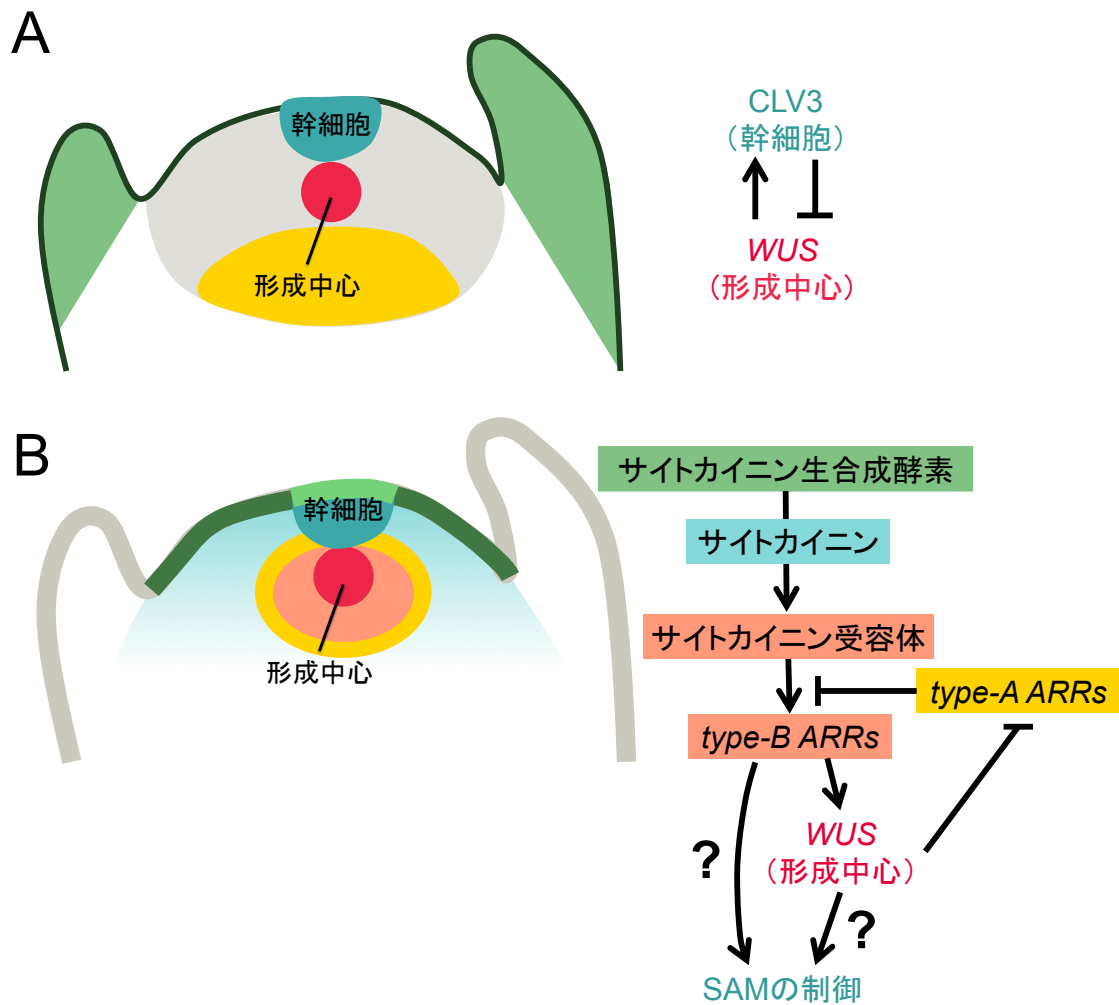


図 1-3 SAM の恒常性の制御因子

(A) WUS と CLV3 によるネガティブフィードバックループの略図。

(B) SAM の恒常性を制御するサイトカニンシグナル伝達系の略図。緑色で示した領域：サイトカニン合成酵素が発現する SAM の表皮の層。水色：表皮由来のサイトカニンの予想される分布。赤色の領域：形成中心。橙色で示した領域：サイトカニン受容体と *type-B ARR* 遺伝子が発現する形成中心を含む領域。黄色で示した領域。*type-A ARR* 遺伝子が発現する領域。

## 第2章 *er erl1 erl2*における幹細胞維持の *WUS* 依存性と *ER* ファミリーが表皮で果たす機能

### 2-1 *er erl1 erl2*における幹細胞の *WUS* 依存性

#### 2-1-1 *wus* 変異体において *ER* ファミリーの機能を欠失させた状態の解析

*ER* ファミリーの全ての活性を失った *er erl1 erl2* 三重変異体では栄養成長期の *SAM* が肥大することが過去に報告されていた(Uchida et al., 2013)(図 2-1B,F,I)。一方、*wus* においては *SAM* が発芽後すぐに完全に消費され、*SAM* が消失する(Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998)(図 2-1C,G)。これらの対立した表現型の関係を調べるために、*wus er erl1 erl2* 四重変異体を作成し、*er* ファミリー変異と *wus* 変異との遺伝学的な相互作用について調べた。すると驚くことに、*wus er erl1 erl2* では *WUS* の機能が欠損しているにも関わらず、*SAM* の構造が維持されており(図 2-1D,H,I)、野生型の *SAM* に特徴的な小さい細胞の領域(図 2-1E、赤い点線で囲まれた領域)が *wus er erl1 erl2* の *SAM* を覆うようにして回復していた(図 2-1H)。*wus er erl1 erl2* の *SAM* の回復は生殖成長期においても引き続き観察された。*wus* では胚発生で作られる *SAM* は消費されるが(図 2-1C,G)、しばらくしてから胚軸など異所的な場所から通常では見られないメリステムを作り出し、不定芽を形成する。それゆえ、*wus* の花茎の出現は野生型に比べて著しく遅延する(Laux et al., 1996)(図 2-2A,B)。対照的に、*wus er erl1 erl2* では *SAM* が正常に維持されており(図 2-1D,H)、花茎が通常通りに伸長した(2-2A,E)。また *wus* の不定芽から生まれた花茎は数個の花しか形成しなかったが(図 2-2F)、*wus er erl1 erl2* の花茎は野生型や *er erl1 erl2* のように持続的に花を作った(図 2-2C-E)。これらの結果は、*ER* ファミリーの活性が失われると *wus* の栄養成長期と生殖成長期両方の異常が大幅に抑圧されることを示している。さらに、*wus* で作られる花は一貫して雌しべを欠如したが(Laux et al., 1996)、*wus er erl1 erl2* の花は常に雌しべを形成した(表 2-1)。*wus er erl1 erl2* では雌しべの数も *wus* に比べて増加しているが、一方で花弁と萼の数は *wus* と比べても回復していないことから、花器官形成の回復は雄しべと雌しべに限定される。本研究では、以降、特に栄養成長に焦点を絞って解析を進めた。

#### 2-1-2 *wus er erl1 erl2* の *SAM* における細胞分裂活性

*wus er erl1 erl2* で維持されていた SAM における細胞分裂の頻度を定量するために、核酸類似体である EdU の取り込みを調べた。EdU は細胞周期の S 期にゲノム DNA に取り込まれ、その後のクリック反応による蛍光標識により、S 期を経た細胞の数を検出することができる。野生型と *er erl1 erl2* においては、EdU 標識された核が SAM の表皮(L1 層)と内部の L2/3 層の複数の層で検出された(図 2-3A,B)。対照的に、SAM が消失している *wus* の茎頂の中央部においては、EdU 標識された核はほぼ検出されなかった(図 2-3C,E)。この結果は、野生型や *er erl1 erl2* で見られた SAM に特徴的な小さな細胞の領域(図 2-1E,F)が *wus* においては消失していた結果と一致している(図 2-1G)。一方で、*wus er erl1 erl2* の SAM では EdU 標識されたパターンが *er erl1 erl2* のものと類似していた(図 2-3B,D)。これらの結果は、*wus er erl1 erl2* の SAM が *WUS* を欠損しているにもかかわらず細胞増殖活性を維持していることを示している。また、SAM の面積当たりの EdU 標識された核の数を調べたところ、野生型と *er erl1 erl2* 及び *wus er erl1 erl2* の数値はほぼ同じであったことから(図 2-3F)、これらの植物における SAM 内の細胞は同じような速度で分裂していると考えられる。



## 2-2 ER ファミリーの表皮での機能

### 2-2-1 *er erl1 erl2*における幹細胞マーカーの *WUS* への依存性

*CLV3pro:GUS* は信頼性のある幹細胞のマーカーとして過去の多くの研究で使われており(図 2-4A)、そのシグナルは *wus* においては消失する(図 2-4B)(Brand et al., 2002)。*er erl1 erl2*の SAM では、肥大したその形態を反映しているのかのように GUS のシグナルが SAM の中央領域だけでなく SAM の周縁部においても検出された(図 2-4C)。そしてさらに興味深いことに、*wus er erl1 erl2*の SAM では GUS のシグナルが表皮層でのみ強く検出された(図 2-4D)。*in situ* RNA ハイブリダイゼーション法によって内生の *CLV3* の mRNA の発現パターンを観察したところ、*er erl1 erl2* と *wus er erl1 erl2* において内性の *CLV3* もまた表皮の広い領域で検出され(図 2-5A,B)、拡大した表皮での *CLV3pro:GUS* のシグナルと内生の *CLV3* の発現パターンは一致していた。これらの結果から、野生型の SAM の全ての層における *CLV3pro:GUS* の発現のためには *WUS* が必要不可欠であるが(図 2-4A,B)、*er erl1 erl2*の SAM の表皮における幹細胞マーカーの発現には *WUS* の活性は必要でないと考えられる(図 2-4C,D)。一方で、*er erl1 erl2*の SAM の内部層における *CLV3pro:GUS* の発現を維持するためには *WUS* は必要である(図 2-4C,D)。すなわち、*ER* ファミリーの活性が失われた状態では、幹細胞マーカーの *WUS* への依存性は表皮と内部層で異なっている。*wus er erl1 erl2*における幹細胞マーカーの回復は内在性の *CLV3* の発現量が qRT-PCR で強く検出されたことから裏付けられる(図 2-5C)。さらに未分化な細胞のマーカーである *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*)遺伝子の発現量(Long et al., 1996)を調べたところ、*wus er erl1 erl2*における *STM*の発現量は高く、*wus er erl1 erl2*が拡大した SAM を維持している結果と一致していた(図 2-5D)。

### 2-2-2 表皮特異的な *ER* の発現の効果

*er erl1 erl2*では *CLV3pro:GUS* のシグナルが SAM の表皮の広い領域で異所的に検出され(図 2-4C)、その表皮でのシグナルは *wus er erl1 erl2*の SAM でも維持されていた(図 2-4D)。以前より *ER* のプロモーターは SAM の全域で活性を持つことが知られていたが(Uchida et al., 2013)、本研究でさらに *ERpro:ER-YFP* の SAM におけるシグナルを解析したところ、そのシグナルは

SAMの全域で検出され(図 2-6A)、タンパク質レベルでも *ER* は SAM の全域で存在していることが示唆された。一方で、*ER* ファミリーが欠損したときには、幹細胞の異常は表皮に顕著に現れる(図 2-4)。そこで、表皮における幹細胞マーカーを制御するための直接的な機能を担っているのは表皮での *ER* の働きである可能性を考えた。この可能性を検証するために、表皮特異的に活性を持つ *AtML1* プロモーター(Sessions et al., 1999)(図 2-6B)で *ER* 遺伝子を発現させる表皮特異的なレスキュー実験を、*er erl1 erl2* と *wus er erl1 erl2* で実施した。*AtML1pro:ER* を *er erl1 erl2* に導入すると、SAM の表皮の広い領域で見られていた *CLV3pro:GUS* シグナル(図 2-4C)が検出されなくなり(図 2-6C)、*CLV3pro:GUS* は野生型(図 2-4A)のように、正常なサイズの SAM の限られた領域でのみ検出された(図 2-6C)。一方で、形成中心特異的な *WUS* プロモーターの制御下で *ER* を発現させた際には、SAM の周縁にまで拡大した *CLV3pro:GUS* の発現と肥大した SAM の形態は回復しなかった(図 2-6D)。すなわち、表皮における *ER* の機能が幹細胞マーカーの異所的な発現を抑制するために十分であることを示している。このことは、*er erl1 erl2* で増加していた内在性の *CLV3* の発現量が *AtML1pro:ER* の導入によって野生型レベルまで減少することからも裏付けられる(図 2-6F)。*er erl1 erl2* の芽生えで見られる矮小の表現型(図 2-7B)も *er erl1 erl2 AtML1pro:ER* では大きく軽減した(図 2-7C)。一方で、*WUSpro:ER* は芽生えの表現型に影響を与えなかった(図 2-7D)。しかしながら、*er erl1 erl2 AtML1pro:ER* の葉柄は、野生型と *er erl1 erl2* の中間程の長さであったため(図 2-7A,B,C)、葉柄の成長には表皮以外の組織における *ER* の機能が寄与していると考えられる。

同様に、*wus er erl1 erl2* においても、特徴的な表皮の *CLV3pro:GUS* のシグナルが *AtML1pro:ER* の導入によって見られなくなった(図 2-4D; 図 2-6E)。内在性の *CLV3* の発現も *AtML1pro:ER* の導入によって *wus er erl1 erl2* と比較して大きく減少した(図 2-6G)。さらに、*AtML1pro:ER* の発現は *wus er erl1 erl2* の芽生えの矮小形の表現型も回復させた(図 2-7F,G)。

以上の結果から、表皮における *ER* の活性は正常な SAM の恒常性の維持に大きく寄与していると考えられる。

	雌しべ	雄しべ	萼	花弁	n
Wild type	1±0	5.6±0.52	4±0	4±0	10
<i>er er11 er12</i>	1±0	4.3±1.49	4.1±0.73	2.4±1.17	10
<i>wus</i>	0±0	0.81±0.6	3.18±0.75	2.45±0.82	11
<i>wus er er11 er12</i>	1±0	3.92±0.51	3.25±0.87	1.75±0.62	12

表 2-1 花器官の数

値は平均値±標準偏差を示している。

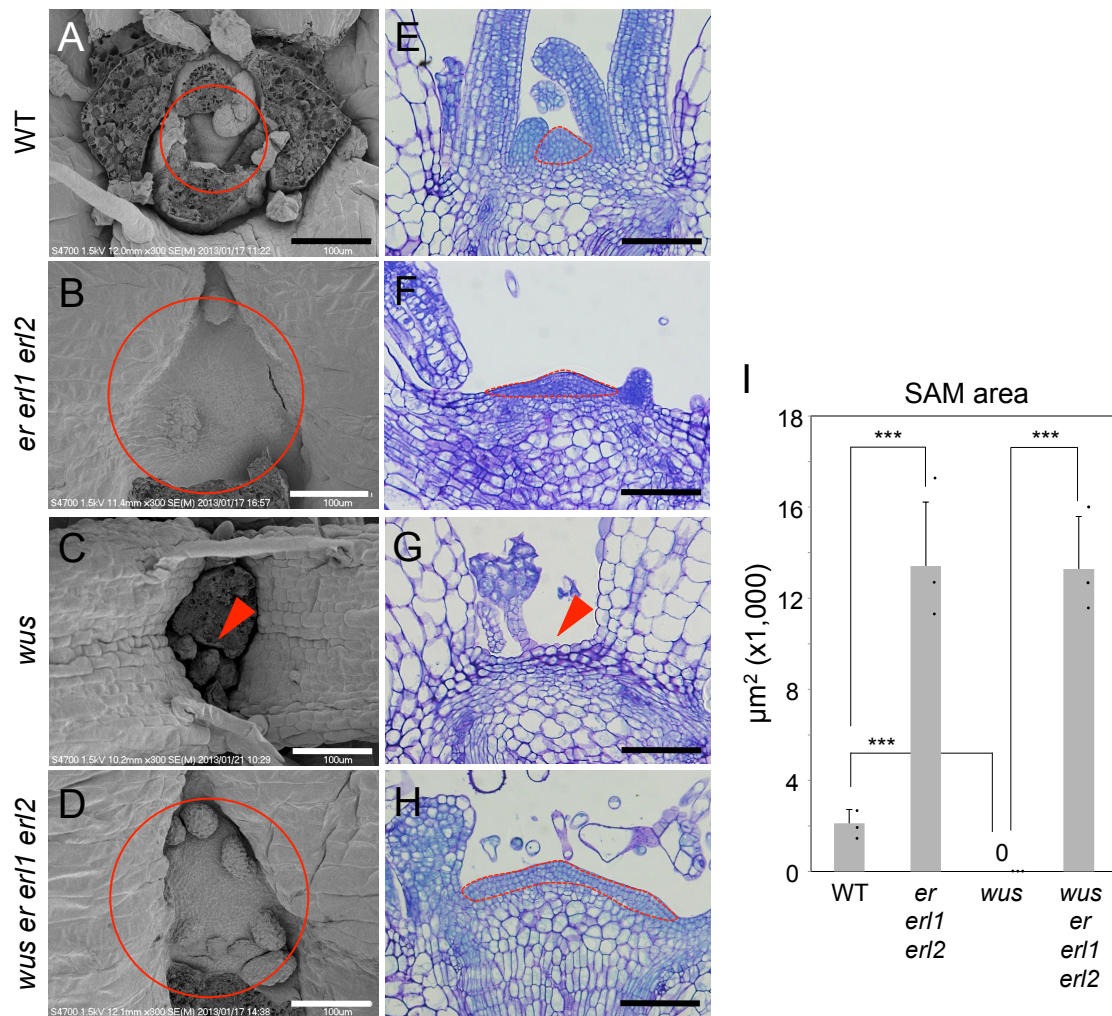


図 2-1 *wus* 変異によって引き起こされる SAM の欠損は *er* ファミリー変異によって抑制される

(A-D) 発芽後 10 日目の植物体の茎頂部分を走査型電子顕微鏡で観察した。赤い丸印は SAM を示している。矢尻は SAM が消失していることを示している。スケールバーは 100 μm。

(E-H) トルイジンブルー染色した SAM の切片。点線は SAM に特徴的な小さな細胞の領域を示している。スケールバーは 100 μm。

(I) 発芽後 10 日目の SAM の面積。測定に用いる SAM の画像は走査型顕微鏡にて取得し、ImageJ で面積を測定した。グラフの値は測定値±標準偏差(n=3)、アスタリスクは有意差(\*\*\*: P<0.005, Student's t-test)を示している。

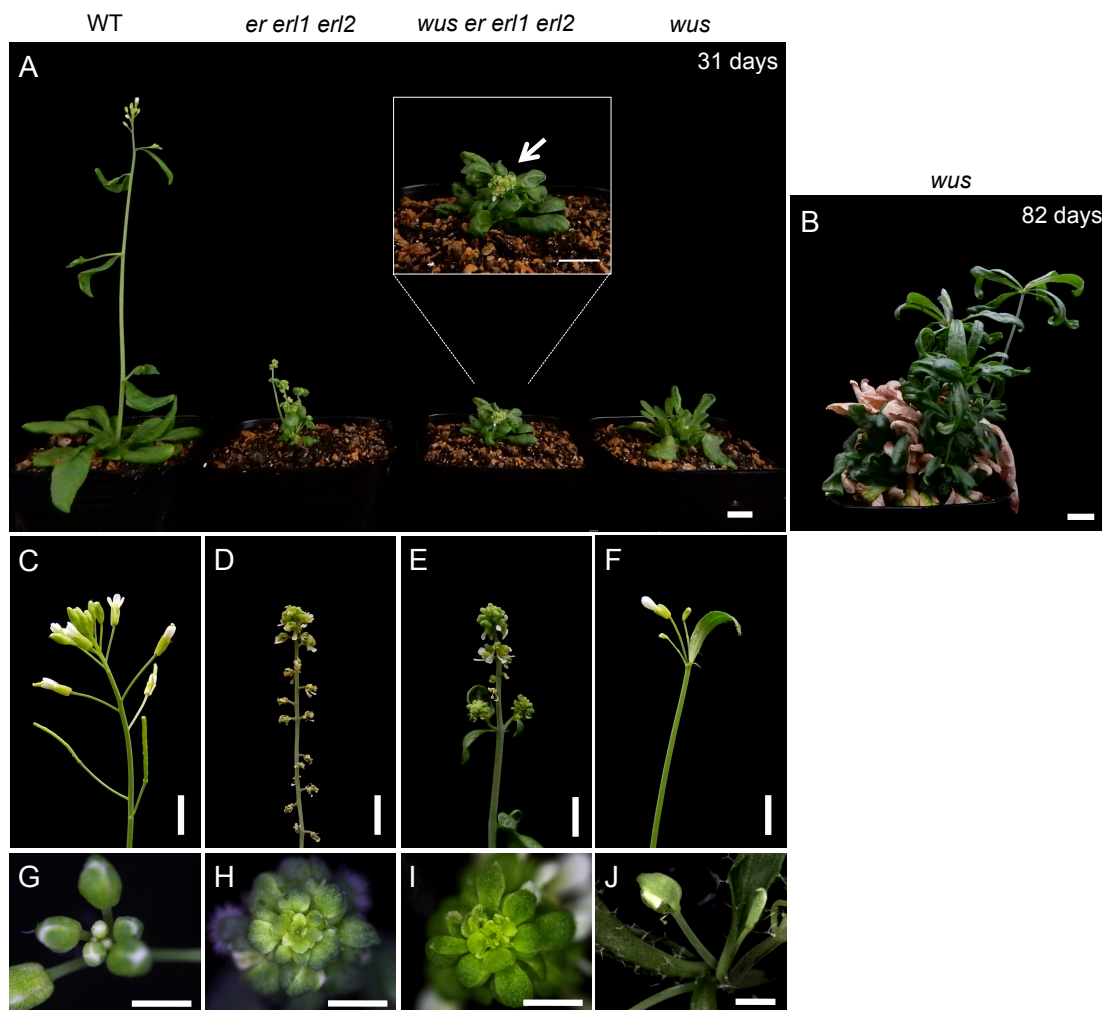


図 2-2 *wus* 変異によって変化した花序の形態が *er erl1 erl2* 変異によって回復する

(A, B) 発芽後 31 日目(A)と 82 日目(B)の写真。矢印は *wus er erl1 erl2* で作られた花茎。*wus* では花茎の発生は顕著に遅れる。スケールバーは 1 cm。

(C-F) 花茎の先端。スケールバーは 5 mm。

(G-J) 花序を上から観察。スケールバーは 1 mm。

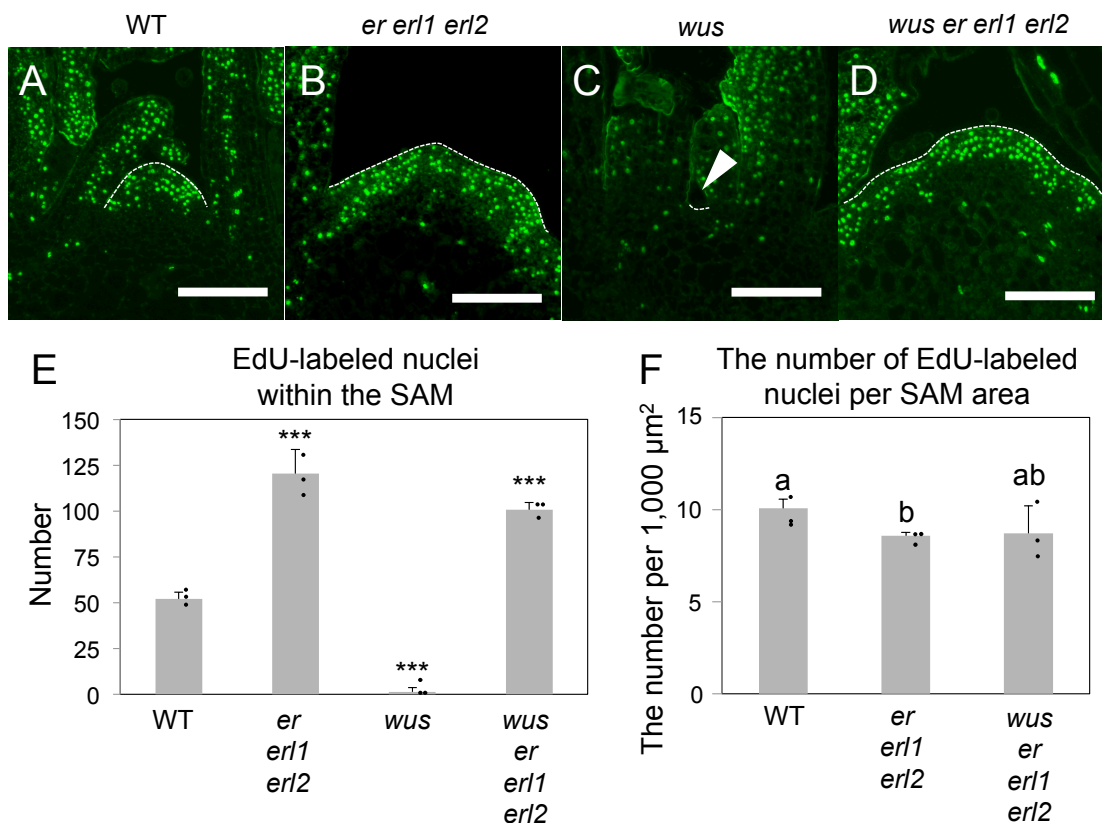


図 2-3 *wus er erl1 erl2* の SAM における細胞増殖活性

(A-D) 増殖性細胞を EdU で標識している。発芽後 10 日目の植物切片を観察した。点線は SAM の輪郭を示している。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。矢尻は SAM が消失していることを示している。

(E) SAM の領域における EdU 標識した核の数。グラフの値は測定値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)、アスタリスクは野生型と比較したときの有意差(\*\*\*) :  $P < 0.005$ )を示している。

(F) SAM の面積で標準化した EdU 標識した核の数。SAM における EdU 標識した核の数を SAM に特徴的な小さな細胞の領域の面積で標準化した。*wus* 変異体では SAM が消失しているため(図 2-1C,G)、このグラフでは *wus* 変異体の値を産出していない。有意差は Turkey's HSD test ( $P < 0.05$ )によって検出しており、データ間で有意差のないものは同じアルファベットで表記されている。

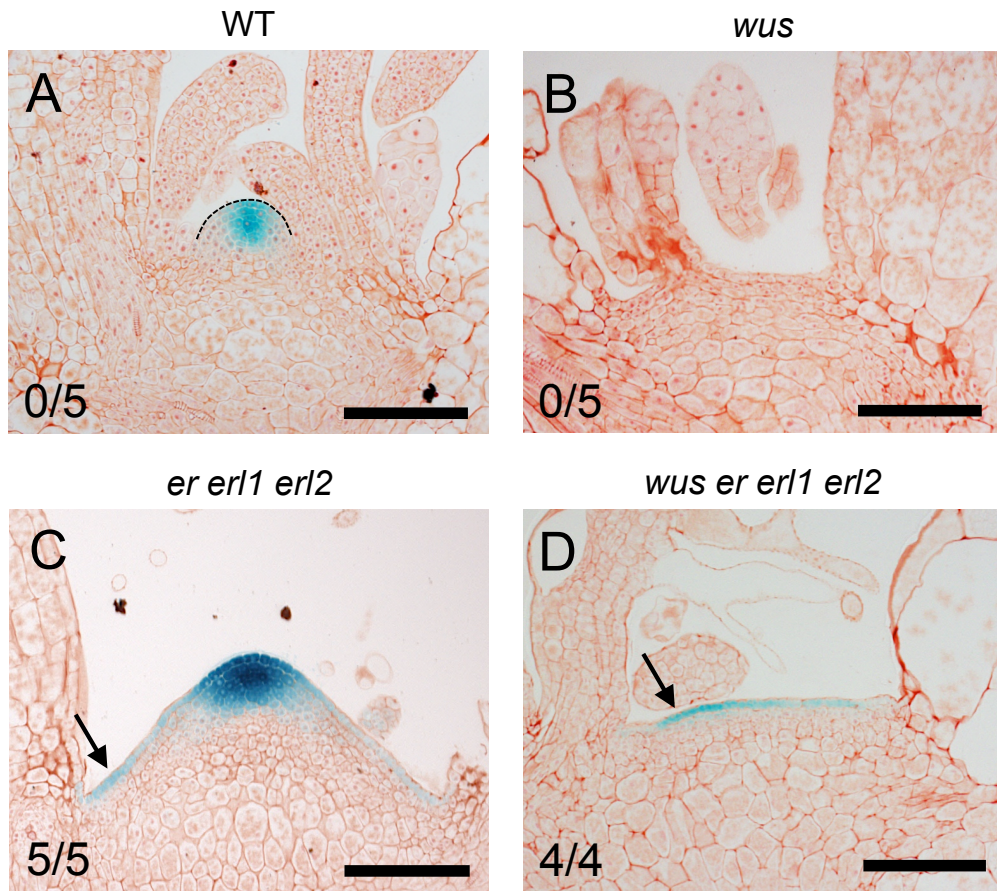


図 2-4 *CLV3pro:GUS* のシグナルが *wus er erl1 erl2* の SAM の表皮特異的に維持されている

(A-D) 発芽後 10 日目の SAM の切片における *CLV3pro:GUS* のシグナル。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。矢印は表皮特異的な *CLV3pro:GUS* のシグナルを示している。画像左下の数字は、「表皮特異的なシグナルを持つ植物の数/観察した植物の全体数」を示している。

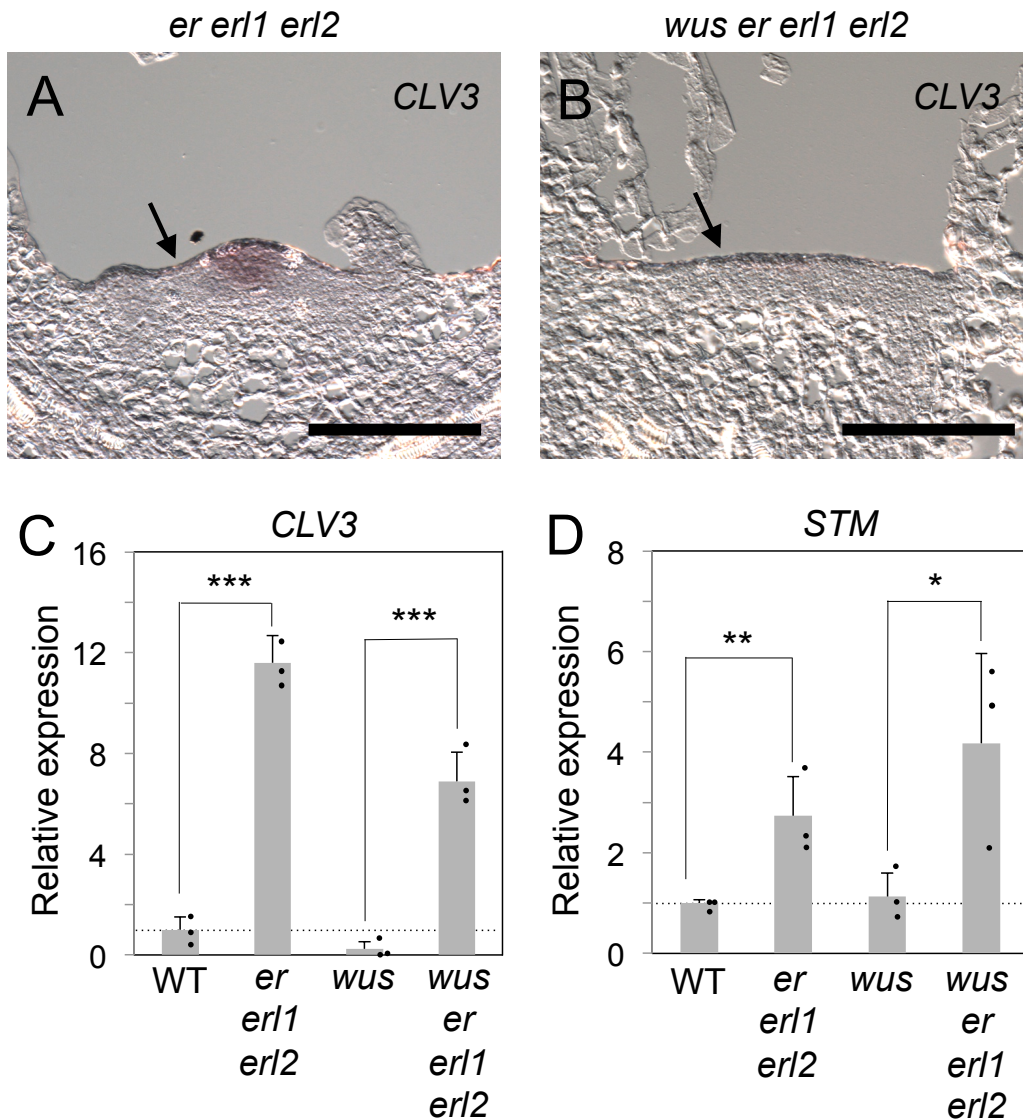


図 2-5 内在性 *CLV3* の発現パターンと *CLV3* と *STM* の発現量

(A, B) 内在性の *CLV3* の発現パターンを検出するための *in situ* RNA ハイブリダイゼーション実験。スケールバーは 100  $\mu$ m。矢尻は表皮に局在するシグナルを示している。

(C, D) 茎頂における *CLV3*(E)と *STM*(F)の転写量(n=3)を *B-TUBULIN* の量で標準化し、野生型の値を 1 に設定した。独立した 10 個の植物体を 1 つの集団として集め、各々のサンプルとした。グラフには平均値±標準偏差を示している。アスタリスクは有意差(\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , \*\*\* :  $P < 0.005$ , Student's t-test)を示している。



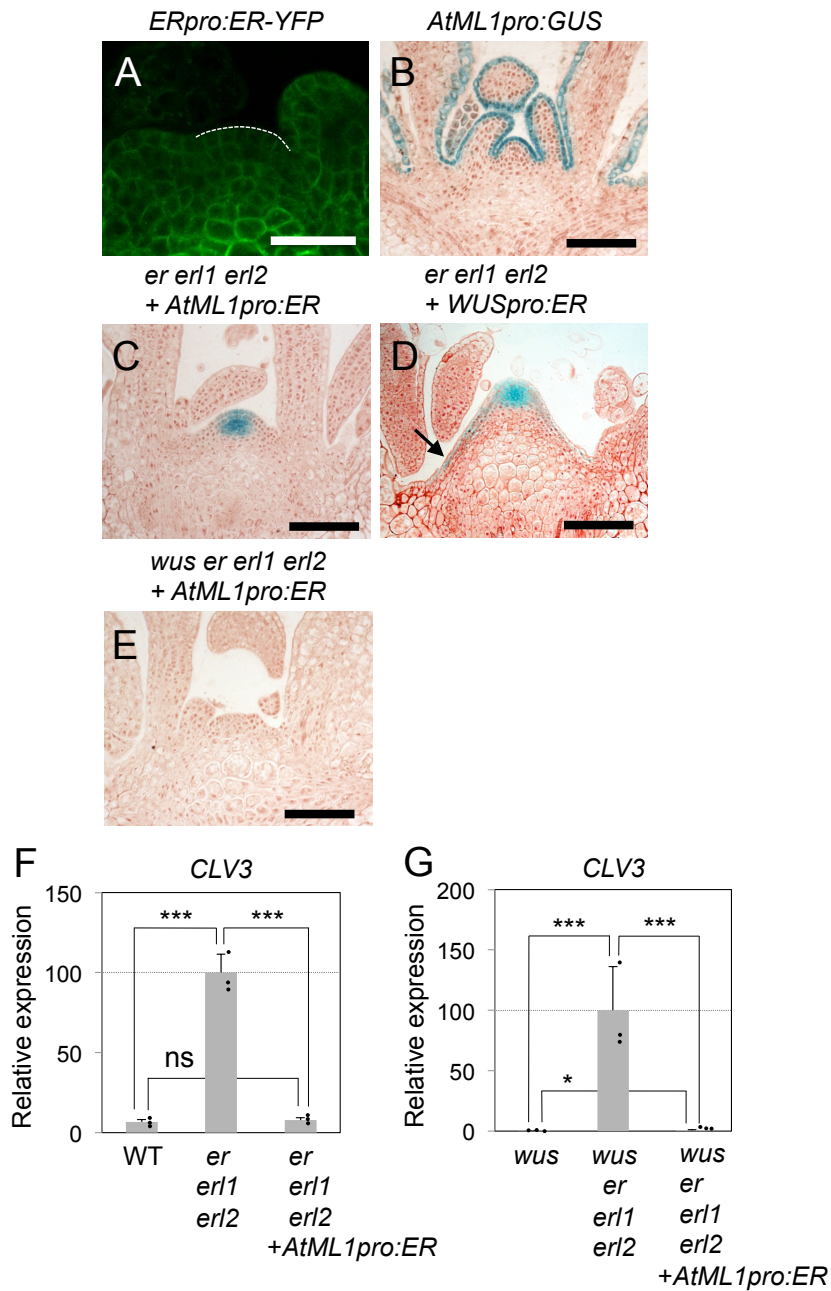


図 2-6 表皮特異的な *ER* の導入は *er erl1 erl2* で引き起こされる *CLV3pro:GUS* の変化を回復させる

(A) SAM における *ERpro:ER-YFP* のシグナル。8 日目の *er* 背景の実生を観察した。同様の顕微鏡設定で導入遺伝子を持たない野生型を観察したところ、YFP シグナルは検出されなかった。

(B) 発芽後 10 日目の植物体の SAM の切片における *AtML1pro:GUS* のシグナル。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

(C, D, E) 発芽後 8 日目(D)あるいは 10 日目(C,E)の植物体の SAM の切片における *CLV3pro:GUS* のシグナル。矢印は表皮特異的な *CLV3pro:GUS* のシグナルを示している。観察した 4 から 5 個の独立したサンプルの中で代表的な写真を示している。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

(F, G) 茎頂における *CLV3* の転写産物量を  $\beta$ -*TUBULIN* の量で標準化し、*er erl1 erl2*(D)と *wus er erl1 erl2*(E)の値を 100 に設定した。5 から 6 個の植物体を 1 つの集団として集め、各々のサンプルとした。n=3。グラフには平均値±標準偏差を示している。アスタリスクは有意差(\*:P<0.05, \*\*\*:P<0.005, Student's t-test)を示している。"ns"は有意差がないことを示している。

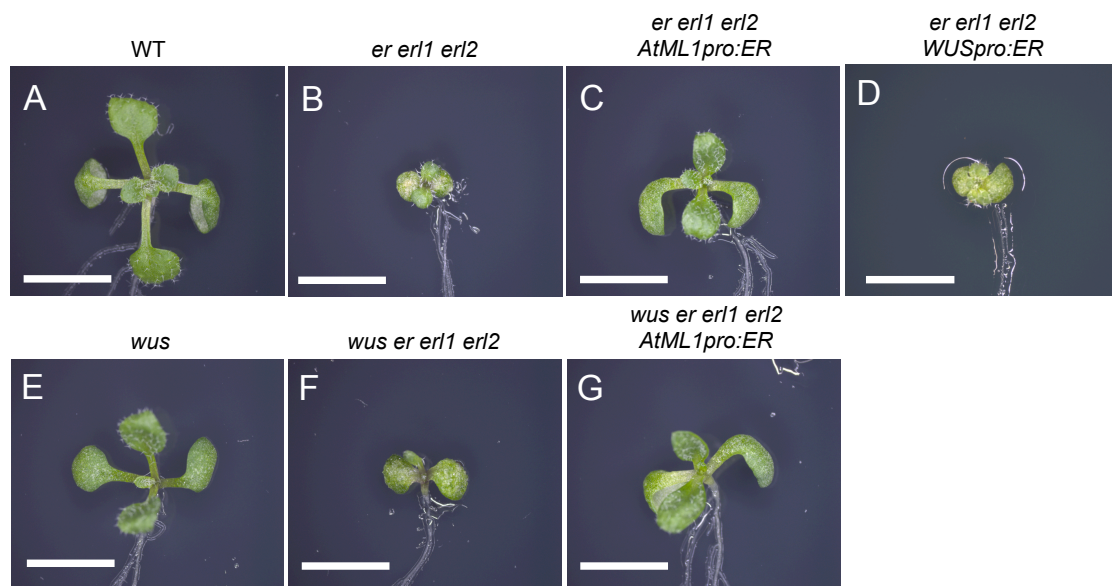


図 2-7 表皮特異的な *ER* の発現は芽生えの成長を大きく回復させる (A-G) 10 日目の植物体の写真。スケールバーは 5 mm。

## 第3章 *er erl1 erl2* の SAM の制御における各種シグナル経路の細胞層ごとの反応の差異

### 3-1 CLV3 経路が SAM に与える影響の細胞層特異的な調節

#### 3-1-1 CLV3 ペプチド添加が *er erl1 erl2* の SAM の形態と *CLV3pro:GUS*、*WUSpro:GUS* に及ぼす影響

幹細胞から分泌される CLV3 ペプチドは SAM の恒常性を制御する上で重要な役割を担っており、外から過剰量の CLV3 ペプチドを添加すると SAM の構造と幹細胞集団が消失することが知られている (Kondo et al., 2006) (図 3-1A,B,E,F,I; 図 3-3A,B)。この CLV3 ペプチドの効果の発揮に ER ファミリーが関わるのかを調べるために CLV3 ペプチドを添加した培地上で *er erl1 erl2* を培養し、SAM の形態を観察した。すると、CLV3 添加により SAM が消失する野生型とは異なり *er erl1 erl2* では CLV3 ペプチドの存在下でさえも SAM が維持されており (図 3-1C,D,G,H,I)、*er erl1 erl2* の SAM は CLV3 ペプチドに対する耐性を示した。この結果に一致して、幹細胞のマーカーである *CLV3pro:GUS*、また、SAM の維持で重要な役割を果たす形成中心のマーカーである *WUSpro:GUS* (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998) のどちらのシグナルも、*er erl1 erl2* の SAM では CLV3 ペプチド存在下でも維持されていた (図 3-2C,D,G,H)。対照的に、野生型では、CLV3 ペプチドの添加によりどちらの GUS のシグナルも消失した (図 3-2A,B,E,F)。

#### 3-1-2 *er erl1 erl2* への CLV3 添加の効果の細胞層ごとの違い

次に、*er erl1 erl2* で切片を用いて詳細に *CLV3pro:GUS* のパターンを調べたところ、CLV3 ペプチド処理の効果が表皮と内部組織とで異なっていた (図 3-3)。まず、CLV3 ペプチド処理下の *er erl1 erl2* において、GUS のシグナルを示す表皮の領域は無処理条件に比べて減少しなかった (図 3-3C-E; 解析方法は図 3-4 に示す)。一方で、内部組織で GUS のシグナルを示す領域は著しく縮小していた (図 3-3C,D,F; 図 3-4)。したがって、*er erl1 erl2* の表皮に位置する幹細胞は CLV3 ペプチドに対して耐性であるが、内部組織に存在する幹細胞は CLV3 シグナルによって制御されていると考えられる。内在性の *CLV3* の発現量を qRT-PCR により調べたところ、*er erl1 erl2* においても *CLV3* の発現量がある

程度減少していた(図 3-5)。このことは、内部組織で幹細胞領域が縮小していた観察結果と一致する。

### 3-1-2 *er erl1 erl2*における内在性の CLV3 の働き

*er erl1 erl2* の SAM は CLV3 ペプチドに一部耐性を示したことから *er erl1 erl2* における内在性の CLV3 の働きを調べるために、*clv3 er erl1 erl2* 四重変異体の SAM を観察した。図 3-6 に見られるように、*clv3 er erl1 erl2* の SAM は *clv3* や *er erl1 erl2* の SAM よりもさらに肥大した形態を示した。*er erl1 erl2* に CLV3 ペプチドを投与した際に内部層で *CLV3pro:GUS* を示す領域が著しく縮小したこと(図 3-3C,D,F)も合わせて考えると、表皮と内部組織どちらの *CLV3pro:GUS* のシグナルも CLV3 ペプチドによる影響を受ける野生型とは対照的に(図 3-3A,B,E,F; 図 3-5)、*er erl1 erl2* において CLV3 は主に内部の層に影響を与えることによって SAM の成長を制御していることが示唆される。すなわち、*ER* ファミリーは SAM の表皮と内部組織の間で CLV3 シグナルへの応答を調和させる役割を持つと考えられる。

### 3-1-3 根における CLV3 の効果

過去に、CLV3 処理の効果は SAM だけでなく根の成長にも影響を及ぼすことが報告されている(Fiers et al., 2005; Kondo et al., 2006)。そこで根の成長を観察したところ、SAM とは異なり、CLV3 ペプチド処理は野生型と *er erl1 erl2* の両方の根の成長を同じように阻害した(図 3-7)。したがって、*ER* ファミリーの欠損は根の CLV3 ペプチドの感受性には影響を及ぼさないと考えられる。

## 3-2 *er erl1 erl2* の幹細胞領域におけるサイトカニン経路の働き

### 3-2-1 *er erl1 erl2* の SAM におけるサイトカイニンの一次応答

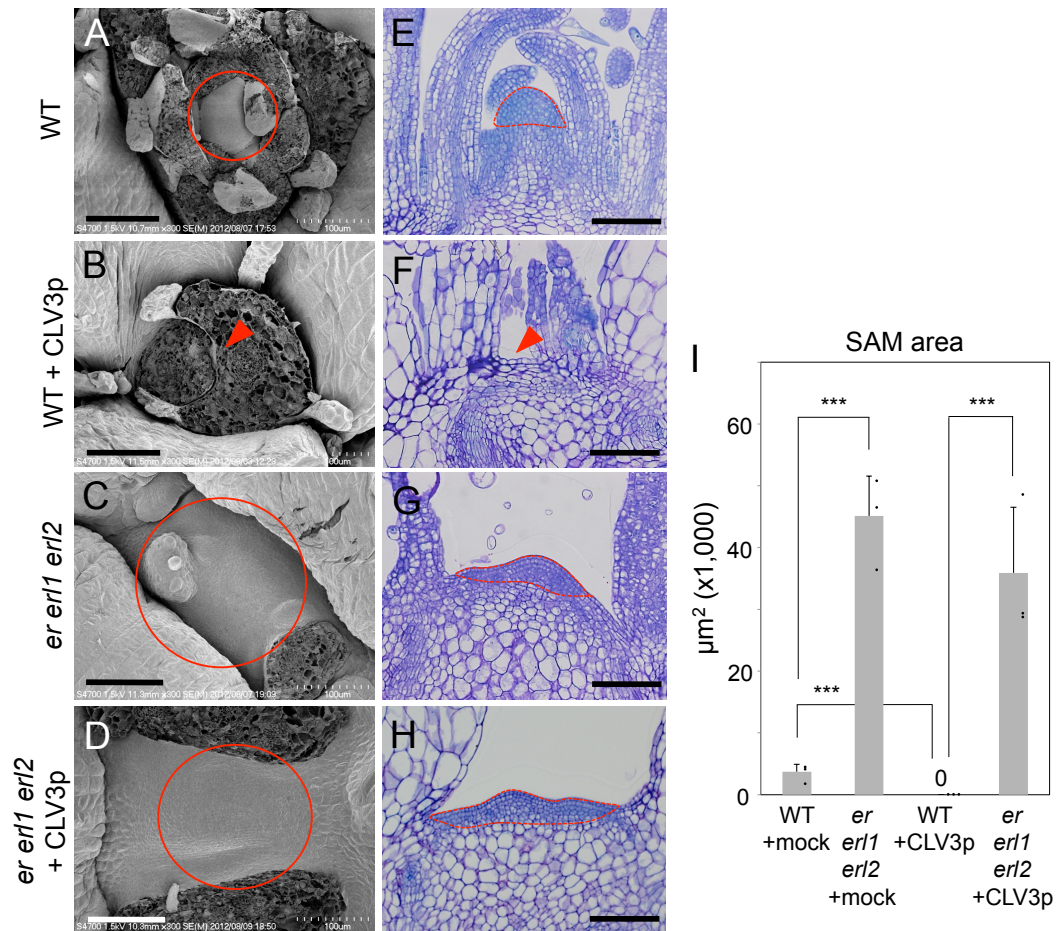
サイトカニンは SAM の恒常性の重要な制御因子であり、(Chickarmane et al., 2012; Gordon et al., 2009)、*WUS* は SAM のサイトカニン応答性を促進する働きを持つ(Leibfried et al., 2005)。*er erl1 erl2* の SAM においては表皮層と内部領域が *WUS* が欠失すると異なる振る舞いを見せたため(図 2-4A,B)、SAM の恒常性におけるサイトカニンへの依存性もまた、層特異的な様式で *ER* ファミリーによって調節されている可能性を考えた。そこで、サイトカイニンの応答性を人工的なサイトカニン応答性レポーター *TCSn::GFP* を用いて解析した(Zurcher et al., 2013)。その結果、過去の報告と同じように野生型の SAM では GFP シグナルは形成中心で検出され(Chickarmane et al., 2012)、このパターンは *er erl1 erl2* においても維持されていた(図 3-8A,B)。また、サイトカニン受容体遺伝子群とサイトカニンシグナル伝達の正の制御因子である *type-B ARR* 遺伝子群(Meng et al., 2017; Wang et al., 2017)の発現量を調べたところ、*er erl1 erl2* と野生型間で大きな違いは見られなかった(図 3-9)。この結果は *TCSn::GFP* の発現パターンが野生型と *er erl1 erl2* とで変わらない結果と一致しており、*er erl1 erl2* において一次的なサイトカニン応答は大きな影響を受けていないと考えられる。

### 3-2-2 *er erl1 erl2* におけるサイトカニンシグナルの阻害効果

野生型と *er erl1 erl2* ではサイトカニンへの一次的な応答性に大きな違いが見られなかったことから、次にサイトカニン応答の結果としての幹細胞集団の振る舞いが野生型と *er erl1 erl2* の表皮層と内部領域とで異なるか否かを調べた。そこで、サイトカイニンのシグナル伝達が阻害された状態を解析するために *wooden leg (wol)* 変異を用いた。*wol* は SAM の形成中心で発現しているサイトカニン受容体 *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 4 (AHK4)* の機能阻害型の変異アリルであり、サイトカニン受容体のシグナル伝達をドミナントネガティブ体として阻害することが知られている(Mähönen et al., 2000)。まず *wol* の単独変異は野生型と比べて SAM の大きさと *CLV3pro::GUS* シグナル領域の減少を引き起こし(図 3-10A,C)、この結果は過去に報告されているサイトカニン欠乏変異体の表現型と一致している(Werner et al., 2003)。このとき、野

生型の SAM の表皮と内部の層のどちらで検出される *CLV3pro:GUS* のシグナルも *wol* 変異によって同様の影響を受けていた(図 3-10A,C; 図 3-11A,C; 解析法は図 3-4)。対照的に、*er erl1 erl2* の表皮における *CLV3pro:GUS* のシグナルは *wol* の導入による影響を受けなかったが(図 3-10B,D; 図 3-11B)、一方で内部組織で *CLV3pro:GUS* シグナルを示す領域は減少した(図 3-10B,D; 図 3-11D)。さらに、サイトカニン受容体の非競合型アンタゴニストである S-4893(Arata et al., 2010)を用いる薬理的な実験を行ったところ、*wol* でサイトカニン経路を阻害した場合と同様に、表皮の *CLV3pro:GUS* は影響を受けなかったが、内部組織の *CLV3pro:GUS* を示す領域はアンタゴニスト投与により縮小した(図 3-10E,F; 図 3-11B,D)。以上のことから、まず野生型では表皮と内部組織どちらにおける幹細胞マーカーもサイトカニンシグナル伝達を必要とするが、一方で、*er erl1 erl2* では、表皮における幹細胞のマーカーはサイトカニンシグナル伝達の減少に耐性であるものの、内部層の幹細胞マーカーの維持にはサイトカニンシグナル伝達が必要であると考えられる。

これらの結果から、*ER* ファミリーはサイトカニンの一次的な応答性には必要ではないが、サイトカニンのシグナルを受けて幹細胞集団がどのように振る舞うかを定める二次的な応答性を異なる細胞間で調節するのに必要であると考えられる。



**図 3-1 *er erl1 erl2* の SAM は CLV3 ペプチドに対して耐性である**  
 5  $\mu\text{M}$  CLV3 ペプチド (CLV3p) 処理または無処理の発芽後 12 日目の植物体。  
 (A-D) SEM で取得した画像。(I) の定量的な解析に使用した画像の中で代表的な画像を載せている。赤い丸印は SAM を示している。矢尻は SAM が消失していることを示している。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。  
 (E-H) トルイジンブルー染色した SAM の切片。点線は SAM に特徴的な小さな細胞の領域を示している。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。3 つのサンプルを観察し代表的な写真を示し。矢尻は SAM が消失していることを示している。  
 (I) SAM の面積に対する CLV3 ペプチドの効果。発芽後 12 日目の SAM の面積。測定に用いる SAM の画像は走査型顕微鏡にて取得し、ImageJ で面積を測定した。グラフの値は測定値  $\pm$  標準偏差 (n=3)、アスタリスクは有意差 (\*\*\*) :  $P < 0.005$ , Student's t-test) を示している。



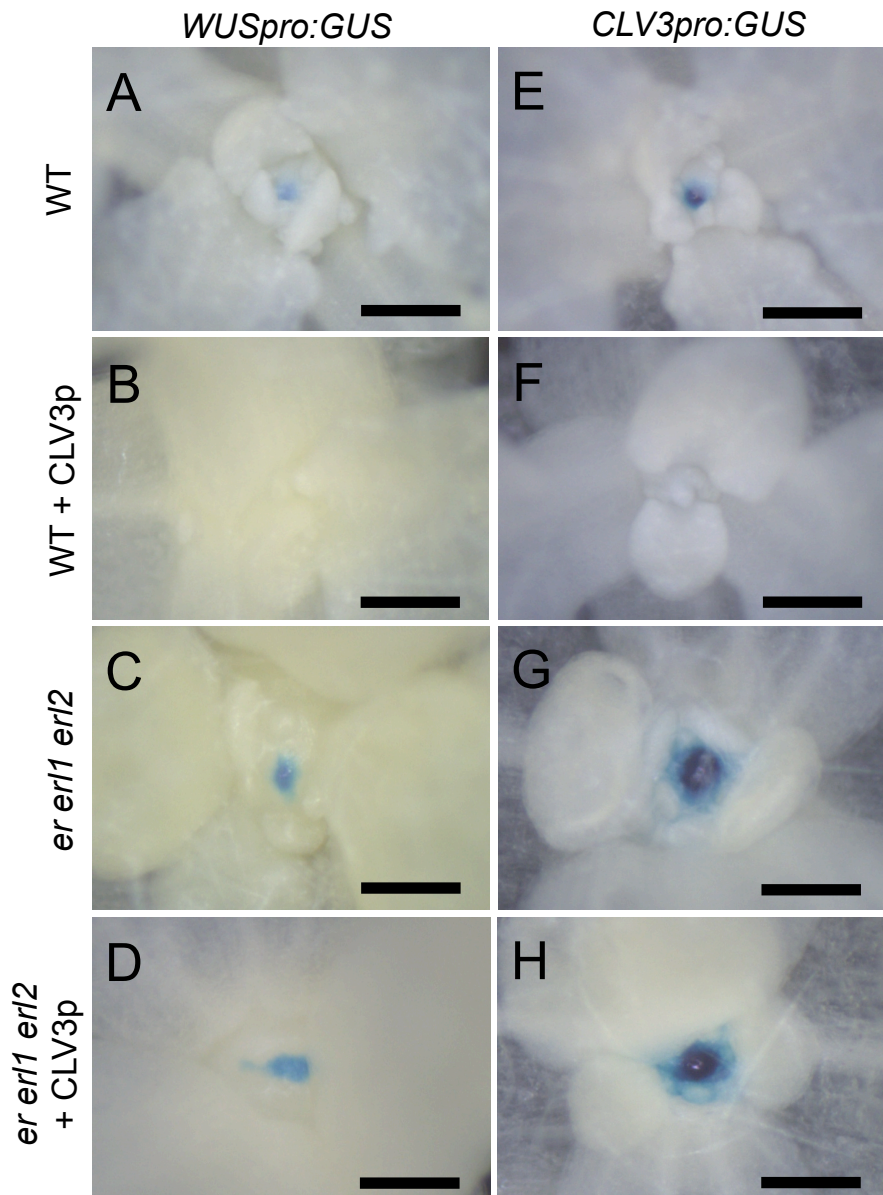


図 3-2 *WUSpro:GUS* と *CLV3pro:GUS* への *CLV3* ペプチドの効果  
 (A-H) *WUSpro:GUS*(A-D)と *CLV3pro:GUS*(E-H)のシグナル。3 個体を観察し、  
 代表的な写真を図に示した。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。

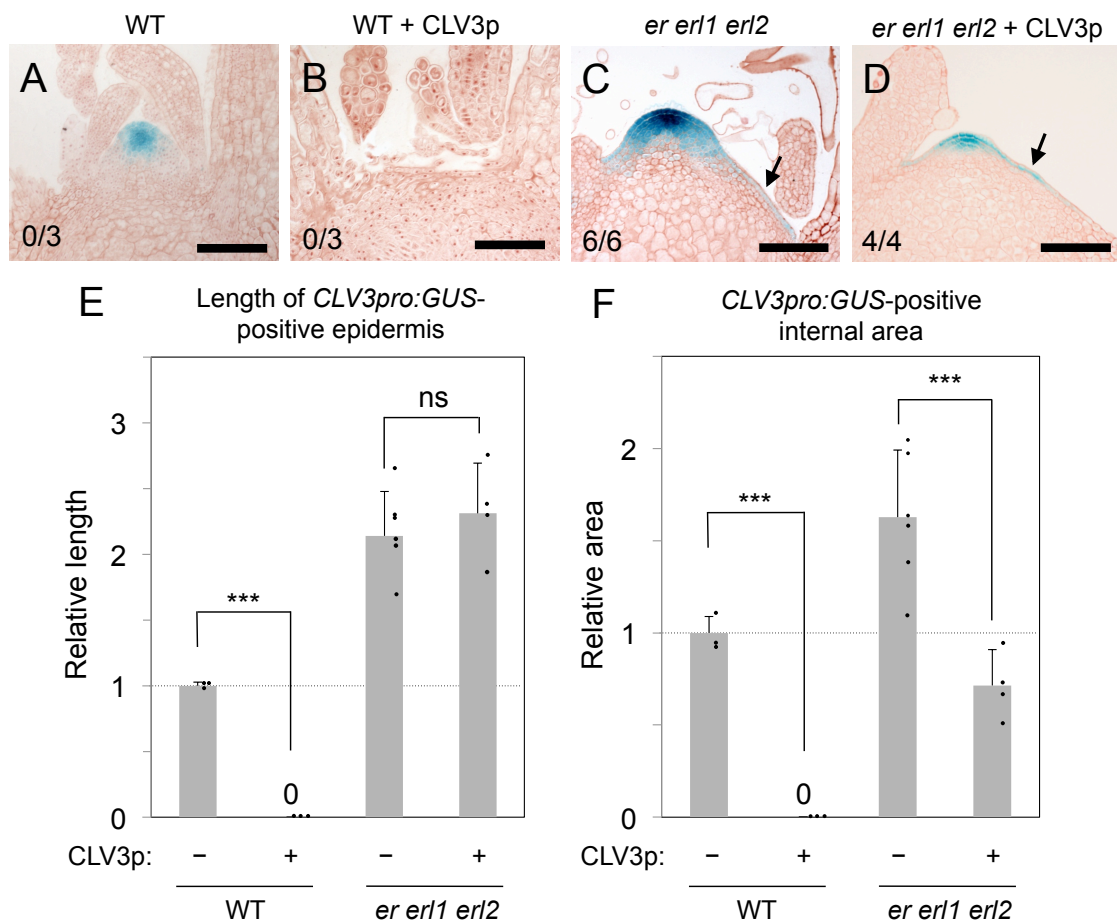


図 3-3 CLV3 ペプチドは *er erl1 erl2* の SAM の *CLV3pro:GUS* の発現に対して細胞層特異的な効果をもたらす

(A-D) SAM の切片における *CLV3pro:GUS* のシグナル。それぞれの植物や条件において観察した 3 から 6 個のサンプルの中から代表的な写真を選び図に示している。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。矢印は表皮特異的な *CLV3pro:GUS* のシグナルを示している。画像左下の数字は、「表皮特異的なシグナルを持つ植物の数 / 観察した植物の全体数」を示している。

(E, F) *CLV3pro:GUS* のシグナルを示す表皮の長さ(E)と *CLV3pro:GUS* のシグナルを示す内部組織の面積(F)。長さと面積を計測する手法は図 3-4 に示している。グラフは野生型の値を 1 に設定し、平均値±標準偏差を示している。アスタリスクは有意差(\*\*\* :  $P < 0.005$ , Student's t-test)を、「ns」は有意差がないことを示している。

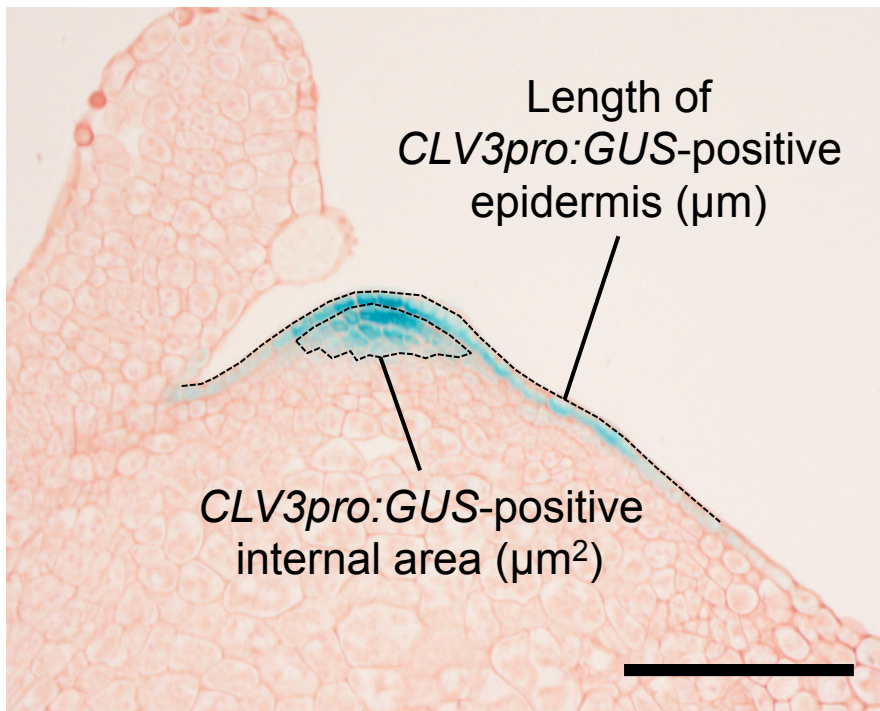


図 3-4 *CLV3pro:GUS* のシグナルを有する表皮の長さ( $\mu\text{m}$ )と面積( $\mu\text{m}^2$ )の計測に用いた方法

切片写真を ImageJ で解析した。点線は計測した部位を示している。計測に用いた *CLV3pro:GUS* を示す表皮または内部組織の領域は、GUS のシグナルの有無を基準にして決定した。図 3-3D の画像を例として挙げている。

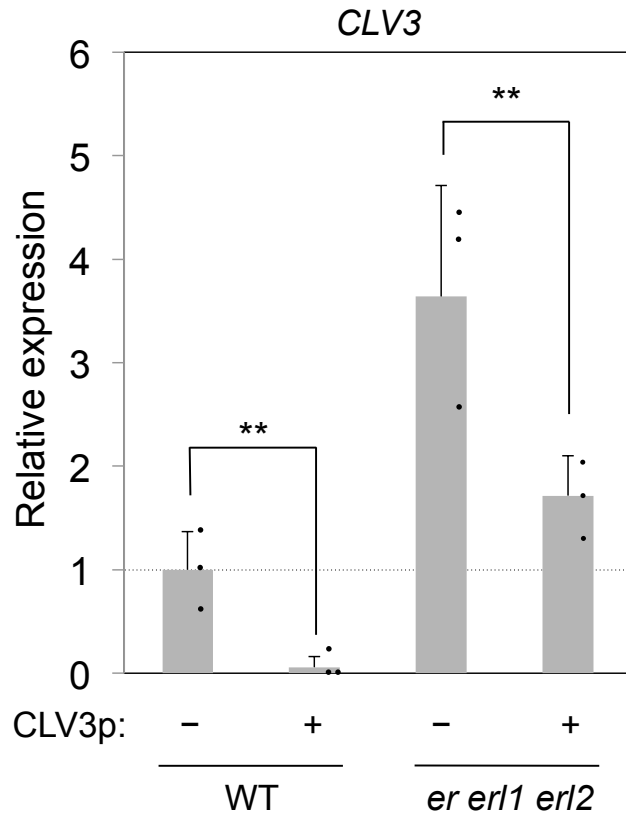


図 3-5 *CLV3* の発現量に対する *CLV3* ペプチドの効果

茎頂における *CLV3* の転写産物量を  $\beta$ -*TUBULIN* の量で標準化し、野生型の値を 1 に設定した。独立した 20 個の植物体を 1 つの集団として集め、各々のサンプルとした。n=3。グラフには平均値±標準偏差を示している。アスタリスクは有意差(\*\* : P<0.01, Student's t-test)を示している。

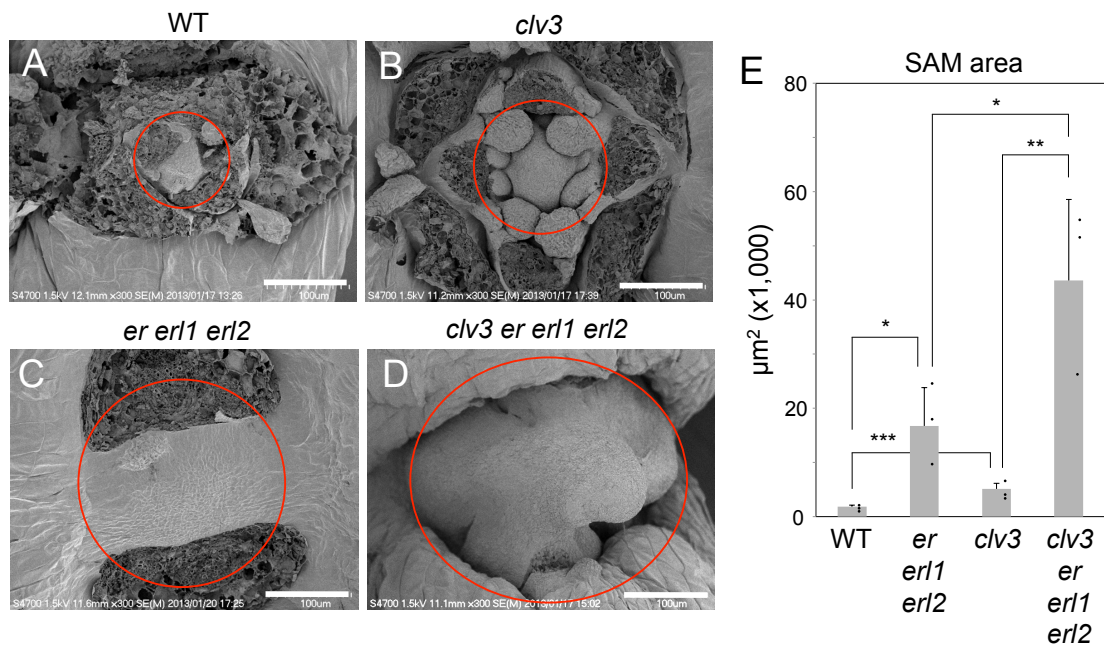


図 3-6 *er erl1 erl2* においても *CLV3* は SAM のサイズの制御を行っている

(A-D) 走査型電子顕微鏡で観察した 10 日目の植物体の茎頂。(E)の定量的な解析に使用した画像の中で代表的な画像を載せている。赤い丸印は SAM の領域を示している。スケールバーは 100 µm。

(E) (A-E)の走査型電子顕微鏡で取得した画像を ImageJ を用いて定量することによって得た。グラフの値は測定値±標準偏差(n=3)、アスタリスクは有意差 (\*\*\*) : P<0.005, \*\* : P<0.01, \* : P<0.005, Student's t-test)を示している。

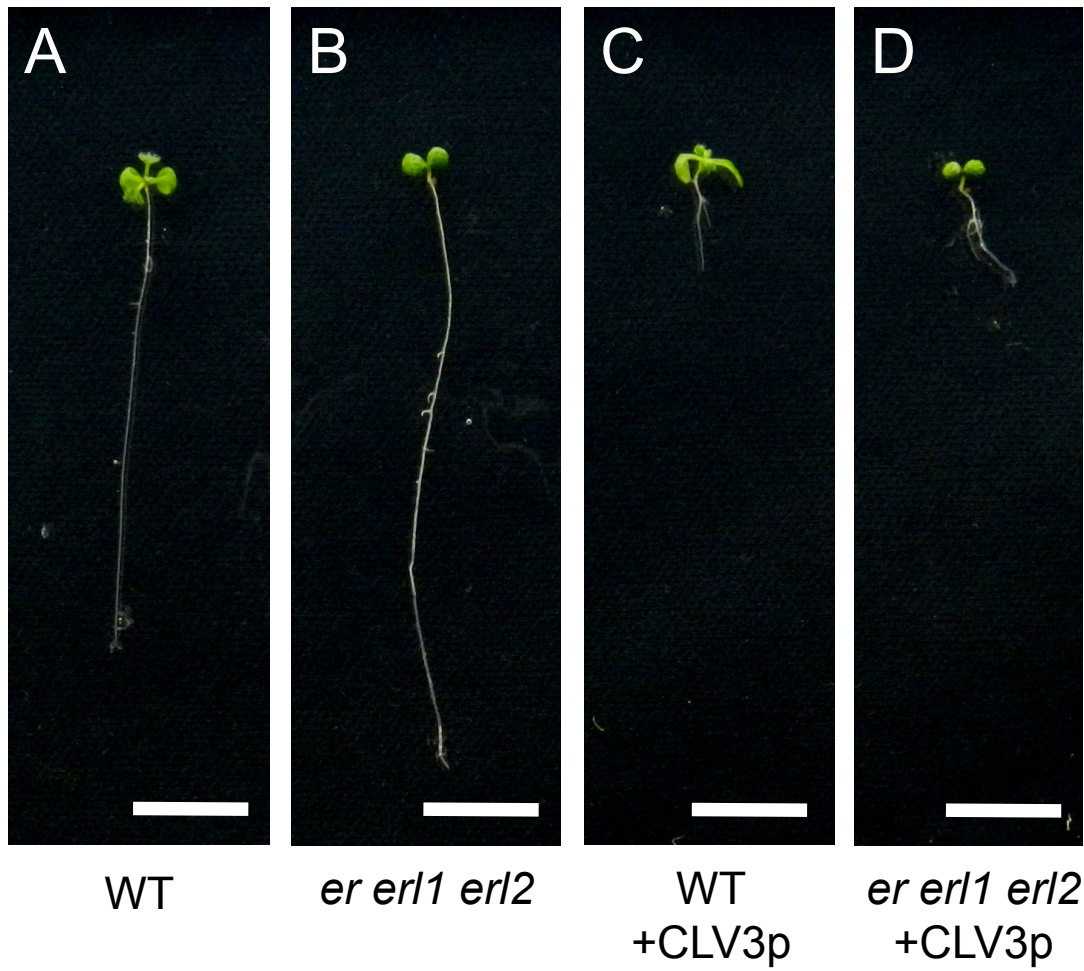


図 3-7 根の成長に対する CLV3 ペプチドの効果

5  $\mu$ M の CLV3 ペプチドを処理した野生型(WT)と *er erl1 erl2* の 10 日目の実生の根を観察した。スケールバーは 1 cm。

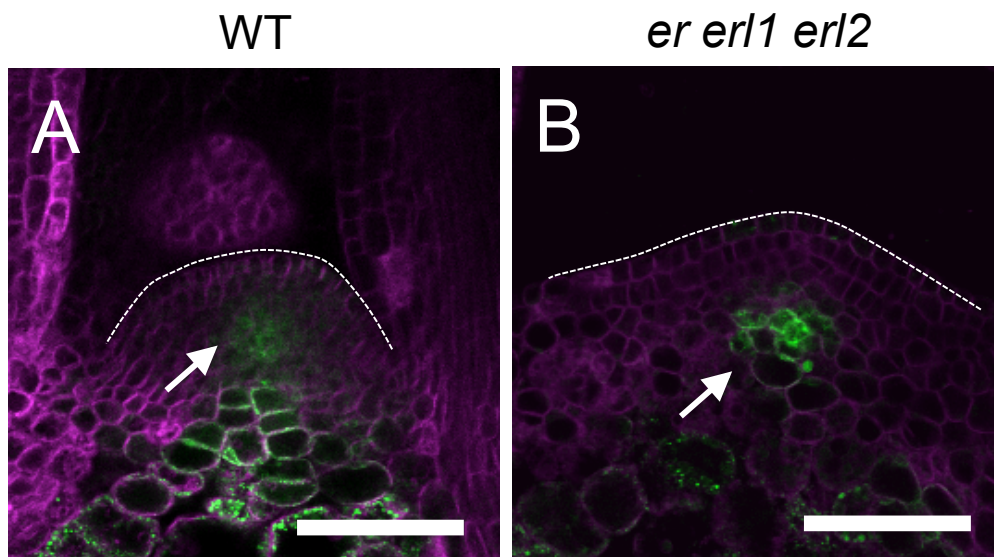
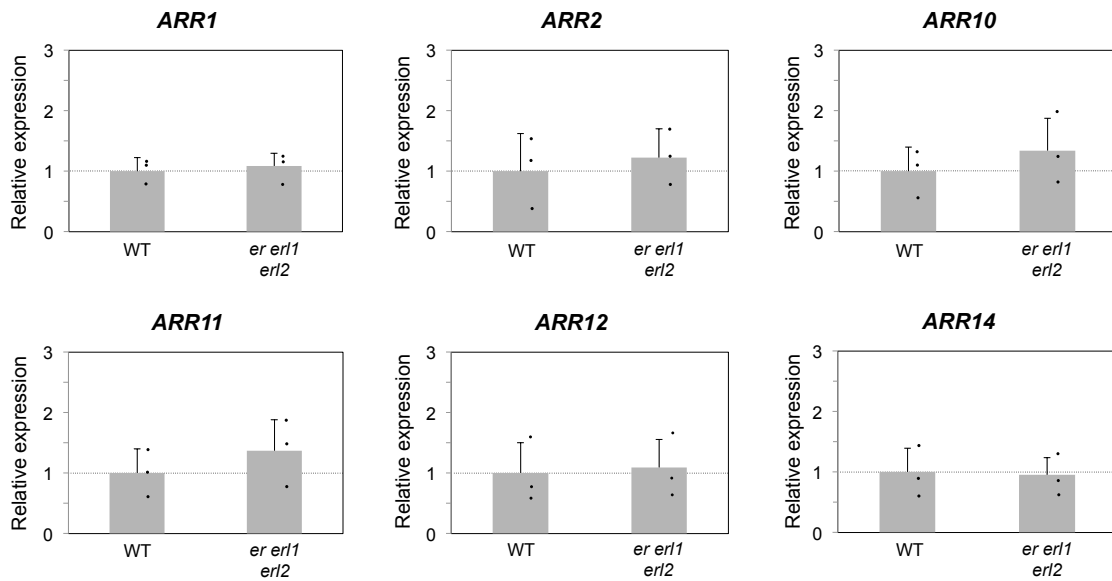


図 3-8 *er erl1 erl2* の SAM におけるサイトカイニン応答性レポーターの  
発現パターン

(A, B) 10 日目の実生の SAM における *TCSn::GFP* のシグナル。マゼンタは  
FM4-64 染色した細胞膜を示している。矢印は形成中心でのシグナル。スケール  
バーは 100  $\mu\text{m}$ 。

### Type-B ARR genes



### Cytokinin receptor genes

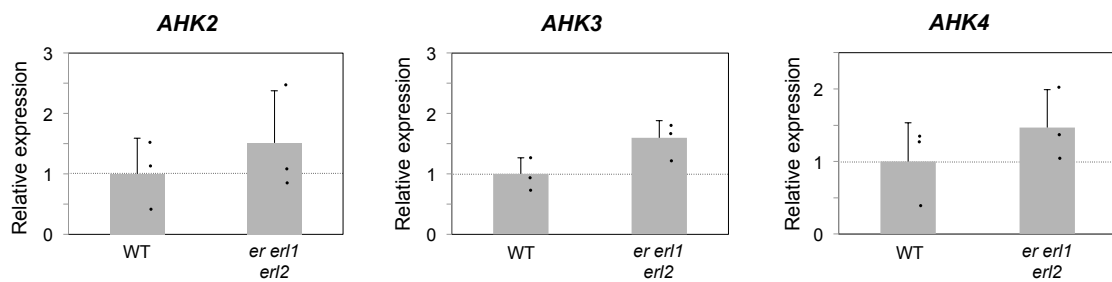


図 3-9 *Type-B ARR* 遺伝子群とサイトカイニン受容体遺伝子群の発現量 *β-TUBULIN* の発現で標準化した茎頂における各遺伝子の発現量。発現量は野生型を 1 としている。独立した 20 個の植物体を 1 つの集団として集め、各々のサンプルとした。n=3。グラフには平均値±標準偏差を示している。



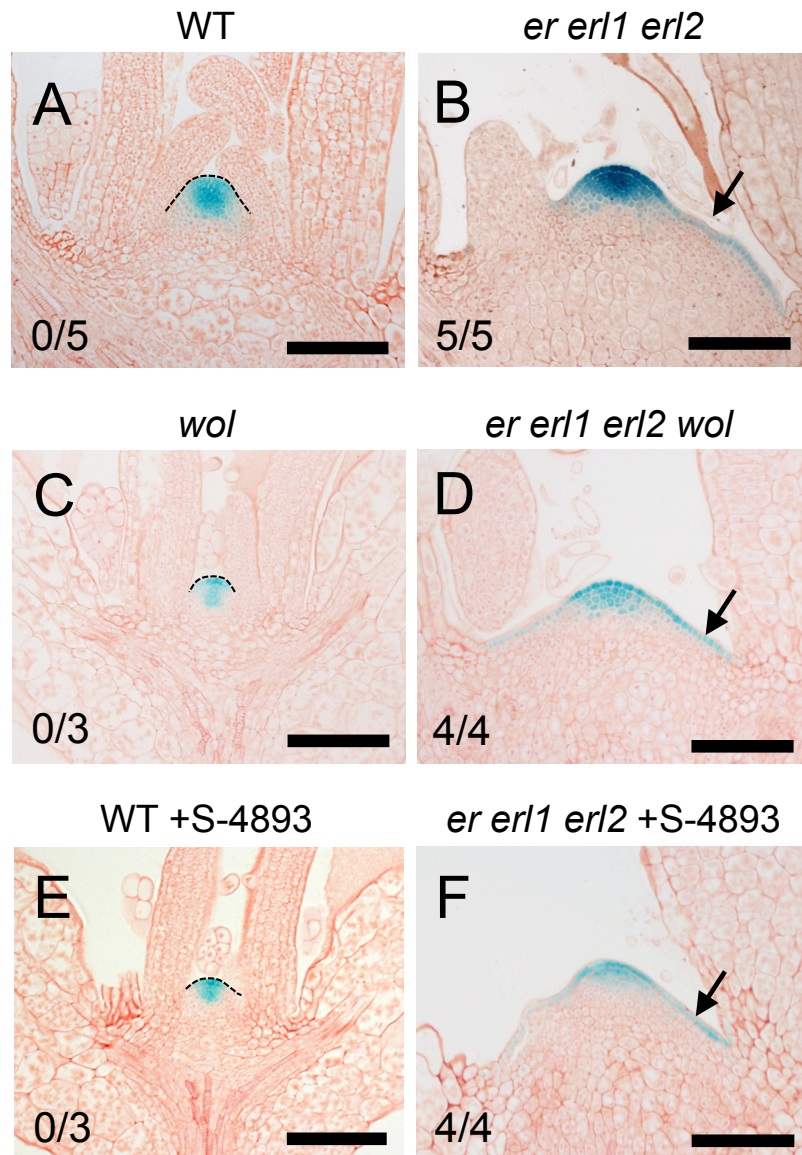


図 3-10 サイトカイニンシグナルを阻害すると *er erl1 erl2* の SAM における *CLV3pro:GUS* の発現が細胞層特異的に阻害される

(A-F) 10 日目の植物体の SAM の切片における *CLV3pro:GUS* の発現。観察した 3 から 5 個のサンプルのうち代表的な画像を示している。点線は SAM の輪郭を示している。スケールバーは 100  $\mu$ m。矢印は表皮特異的な *CLV3pro:GUS* のシグナルを示している。それぞれの画像の左下には「表皮特異的な異所的な GUS のシグナルを示す植物／観察した個体数」を示している。

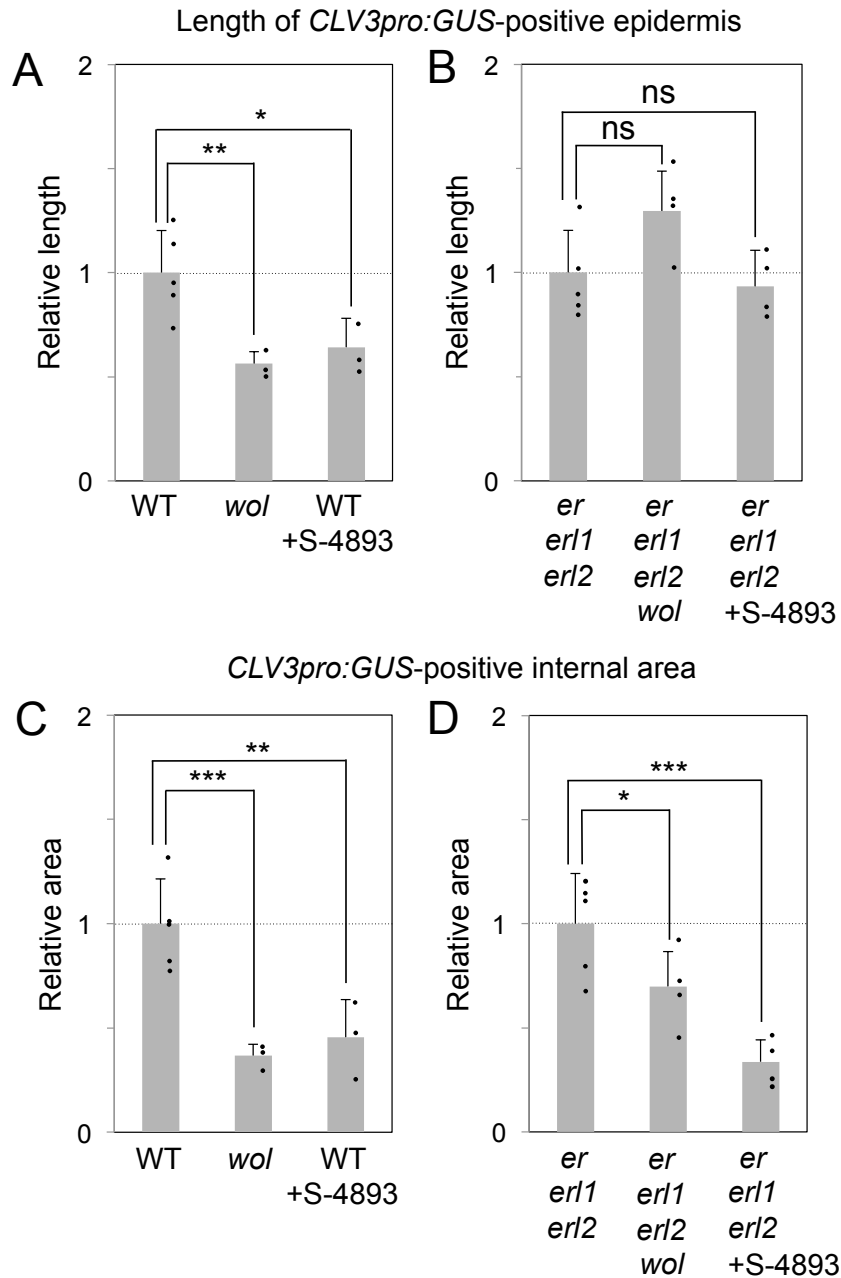


図 3-11 サイトカイニンシグナルの阻害が表皮と内部組織の *CLV3pro:GUS* に与える影響

(A-D) *CLV3pro:GUS* のシグナルを示す SAM の表皮の長さ(A,B)と SAM の内部の層の面積。それぞれ野生型(WT; A,C)と *er er1 er12*(B,D)背景における *CLV3pro:GUS* の発現領域を測定した。長さと面積を測定する手法は図 3-4 で説明している。グラフには平均値±標準偏差を示している。アスタリスクは有意差(\*\*\* :  $P < 0.005$ , \*\* :  $P < 0.01$ , \* :  $P < 0.005$ , Student's t-test)を、“ns”は有意差がないことを示している。

## 第4章 考察

### 4-1 *ER* ファミリーは適切な *SAM* の恒常性の維持のために *WUS* 非依存的な幹細胞維持活性を抑制する

本研究ではまず、*wus* の幹細胞を欠損する表現型が *ER* ファミリーの機能欠損によって抑制されることを示した。近年、*altered meristem program 1 (amp1)* 変異と *class III homeodomain-leucine zipper (hd-zip III)* 変異が異所的なメリステムの形成を促進することで部分的に *wus* の表現型を緩和することが報告されている(Huang et al., 2015; Lee and Clark, 2015)。しかしながら、*wus* 変異に対する *er* ファミリー変異の効果と *amp1* または *hd-zip III* 変異の効果の間には明らかな違いがある。まず、*amp1* と *hd-zip III* は *wus* の表現型を異所的な不定メリステムの形成によって部分的に回復させるが、胚発生に由来する正常な *SAM* の欠失は抑圧しない(Huang et al., 2015; Lee and Clark, 2015)。対照的に、*er erl1 erl2* は胚性の *SAM* を維持させることによって *wus* の異常を抑制した。また、*wus hd-zip III* は雌しべを欠いた *wus* 様の花を生じるのに対し、*wus er erl1 erl2* は雌しべを含む花を形成する(表 2-1)。これらのことから、*ER* ファミリーの働きは *AMP1* や *HD-ZIP III* とは本質的に異なると考えられる。この考えは、*HD-ZIP III* の機能を抑制することが知られる *jabba-1D* 変異が *er* 背景でのみ *SAM* の大きさを増大させることから *HD-ZIP III* と *ER* が別の経路で働くことを暗示した過去の報告とも一致している(Mandel et al., 2016; Mandel et al., 2014)。全ての層において *CLV3pro:GUS* のシグナルを欠いている *wus* と異なり(図 2-4B)、*wus er erl1 erl2* は *CLV3pro:GUS* を表皮特異的に維持しているため(図 2-4D)、*WUS* 非依存的に表皮に幹細胞を維持できる作用を *ER* ファミリーが通常は抑制していると考えられる。今後の課題としては、表皮における *ER* ファミリーの下流にどのような因子が存在し、*WUS* 非依存的な幹細胞を制御しているのかを明らかにする点が挙げられる。*WUS* に依存せずに幹細胞を維持できるメカニズムは過去に同定されてこなかったため、*ER* ファミリーの下流因子を研究することは、*SAM* と幹細胞の維持メカニズムをさらに追求するためにも役立つと考えられる。

#### 4-2 *wus er erl1 erl2* の SAM における *CLV3pro:GUS* のシグナルを持つ細胞と増殖性細胞の関係性について

野生型では、*CLV3pro:GUS* のシグナルは SAM の中央の表皮 (L1 層) と内部の L2/3 層の両方で検出され、幹細胞はこれら全ての層にまたがって位置していると考えられる。表皮の L1 層とその下の L2 層の幹細胞は垂層分裂し、一方で L3 層の幹細胞は垂層、並層どちらにも分裂する(図 1-2B) (Meyerowitz, 1997) ことで、これら幹細胞は器官形成のために周りの組織へと娘細胞を供給する。一方で、*wus er erl1 erl2* の SAM では、*CLV3pro:GUS* のシグナルは表皮でのみ検出された(図 2-4D)。それにも関わらず、*wus er erl1 erl2* でも、細胞増殖活性は表皮から内部の L2/3 層までの SAM の全ての層で検出された(図 2-3D)。さらに、組織学的な観察からも野生型の SAM に特徴的な小さな細胞の集団が *wus er erl1 erl2* の SAM でも L1/2/3 の全ての層で見られた(図 2-1H)。このように、*wus er erl1 erl2* の SAM で、*CLV3pro:GUS* のシグナルを持つ細胞のパターンと EdU 標識された細胞分裂活性のある細胞のパターンが一致しない点からは以下の可能性が想定される。まず 1 つ目の可能性は、*wus er erl1 erl2* の SAM は表皮層にのみ幹細胞を維持しているが、その幹細胞は野生型とは異なり表皮の下の層に娘細胞を供給するための並層分裂を行っている可能性である(図 4-1A)。この際には、*CLV3pro:GUS* のシグナルを持たない L2/3 の娘細胞が内部組織の維持のための増殖細胞として働いているのかもしれない。もう一つ考えられるのは、*CLV3pro:GUS* のシグナルは *wus er erl1 erl2* の SAM の内部組織では検出されなかったが、その内部層には *CLV3pro:GUS* のシグナルを持たない幹細胞が存在するという可能性である(図 4-1B)。そのような内部層の幹細胞は、*CLV3pro:GUS* のシグナルを持つ表皮内の幹細胞とは独立に維持されているのかもしれない。野生型の SAM では、そのような *CLV3pro:GUS* のシグナルを持たない幹細胞の存在を示す証拠は過去に報告されていないが、この可能性の追求は幹細胞研究の今後の展開の 1 つとして興味深いものであると考えている。この場合には、*CLV3* 以外の幹細胞のマーカーを新たに同定することが重要となる。シロイヌナズナの SAM における遺伝子発現の網羅的なデータベースが報告されているので(Yadav et al., 2009; Yadav et al., 2014)、本研究で作成した *wus er erl1 erl2* の活用と組み合わせることで新しい幹細胞マーカーを見つけることが可能になるかもしれない。

#### 4-3 形成中心における一次的なサイトカニン応答の下流で作動する細胞非自律的な効果を ER ファミリーは細胞層特異的に調節する

サイトカニン応答は SAM では主に形成中心でのみ活性化しているが(図 3-8A)(Adibi et al., 2016; Chickarmane et al., 2012; Gordon et al., 2009; Gruel et al., 2016)、サイトカニンシグナル伝達を阻害すると SAM 全体のサイズが小さくなることが知られている(Leibfried et al., 2005; Werner et al., 2003)(図 3-10A,C,E)。これは、形成中心での一次的なサイトカニン応答に応じて活性化される二次的なシグナルの存在を暗示しており、その二次的なシグナルが細胞非自律的に SAM 全体の細胞に影響を与えていると考えられる。本研究で示したように *er erl1 erl2* の形成中心におけるサイトカニン応答のパターンは正常だった(図 3-8B)。しかし、サイトカニンシグナルの阻害が全ての細胞層に影響を及ぼす野生型の SAM の幹細胞とは異なり、*er erl1 erl2* の SAM の表皮における *CLV3pro:GUS* シグナルはサイトカニンシグナルの阻害に対して耐性を示した(図 3-10)。したがって、ER ファミリーの機能が抑制されることによって、表皮にはサイトカニンによる二次的な効果に依存しない幹細胞が生じていると考えられる。これは、表皮における ER ファミリーの機能が *er erl1 erl2* の表現型の回復にとって重要であった結果とも相関していると想定している(図 2-7)。このサイトカニンシグナルの下流で働く二次的なシグナルは未だ同定されていないため、その実体を明らかにすることは興味深い課題である。*WUS* は SAM のサイトカニン応答性を調節するが(Leibfried et al., 2005)、*WUS* は数百もの遺伝子を制御する転写因子であることが知られているので(Busch et al., 2010)、*WUS* がそれら下流遺伝子群の機能のいくつかを通じて形成中心での二次シグナルの産生に関わっているのかもしれない。さらに、*CLV3* ペプチド処理とサイトカニンシグナルの阻害による *er erl1 erl2* の表現型が類似していることから(図 3-3C-F; 図 3-10B,D,F; 図 3-11)、*CLV3* シグナル伝達もサイトカニン下流の二次シグナルの制御に関わる可能性が考えられる。

#### 4-4 幹細胞制御における ER ファミリーのリガンド

ER ファミリーは受容体であるので、作用するリガンドの存在が想定できる。これまでに気孔の分布や花序や鋸歯の形態(Abrash et al., 2011; Lee et al., 2015; Lee et al., 2012; Tameshige et al., 2016; Uchida et al., 2012)においては、ER ファミリーのリガンドとして EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE (EPFL)ファミリーに属する分泌型ペプチドが同定されている。したがって、本研究で着目した幹細胞の維持においても EPFL ファミリーの因子が ER ファミリータンパク質のリガンドとして働く可能性が考えられる。これまでの EPFL ファミリー遺伝子群の発現解析を通じて、EPFL1 と EPFL2 が茎頂で発現していることを見出している(図 4-2)。これらの EPFL 因子が SAM の幹細胞の制御に関わるかどうかは興味深く、その解析は今後の課題である。一方で、ER は茎頂全域に発現しているが(図 2-6A) (Uchida et al., 2013)、本研究では表皮での ER の発現が *er erl1 erl2* の SAM や幹細胞の異常を抑圧することを示した。茎頂は表皮に加えて形成中心や髄状領域、側生器官の原基の発生部位、側生器官と SAM の境界領域など複数の領域で構成される複雑な組織であるため、将来的な研究では、それぞれの領域における個々の ER の機能を明らかにすること、また、SAM で発現する EPFL ファミリー因子がどの部位の ER タンパク質を活性化するのかを明らかにすることも重要となろう。

#### 4-5 最後に

本研究では、SAM の全ての層にわたって維持されている幹細胞集団がひとつの集団として振る舞うための仕組みの中で、ER 受容体ファミリー遺伝子群が表皮と内部組織それぞれでの幹細胞の振る舞いを協調させている可能性を提唱した。本研究を踏まえた将来的な課題としては、SAM と幹細胞の制御において ER ファミリーが活性化した後引き起こされる下流の現象を細胞層ごとにさらに解明することが挙げられるだろう。本研究がそのような将来の研究の伸展に貢献することを期待する。

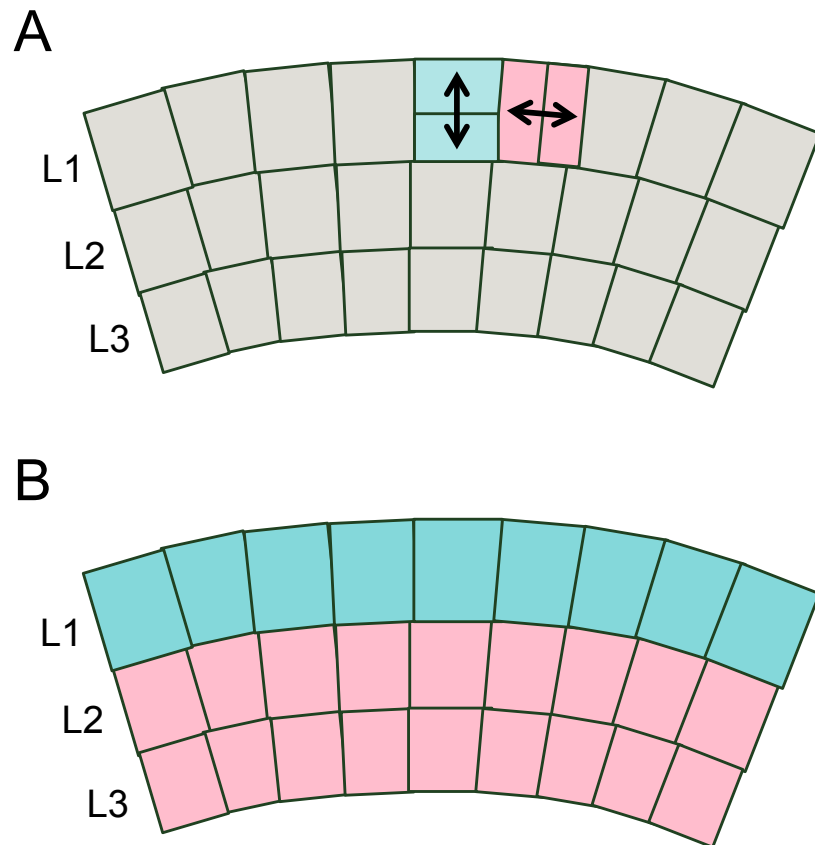


図 4-1 *wus er erl1 erl2* の SAM における *CLV3pro:GUS* の発現パターンと増殖性細胞の分布パターンの不一致から考えられる可能性

本文 4-2 で述べた 2 つの可能性。

(A) *wus er erl1 erl2* の SAM は表皮層にのみ幹細胞を維持しているが、その幹細胞は野生型とは異なり表皮の下層に娘細胞を供給するための並層分裂を行っている可能性を図示している。L1 層の水色で示した細胞は並層分裂、ピンク色で示した細胞は垂層分裂を行っている。

(B) *CLV3pro:GUS* のシグナルは *wus er erl1 erl2* の SAM の内部組織では検出されなかったが、その内部層には *CLV3pro:GUS* のシグナルを持たない幹細胞(図中のピンク色で示した細胞)が存在するという可能性を図示している。L1 層の水色で示した細胞(水色)のみ従来から幹細胞マーカーとして使われてきた *CLV3pro:GUS* のシグナルを維持している。

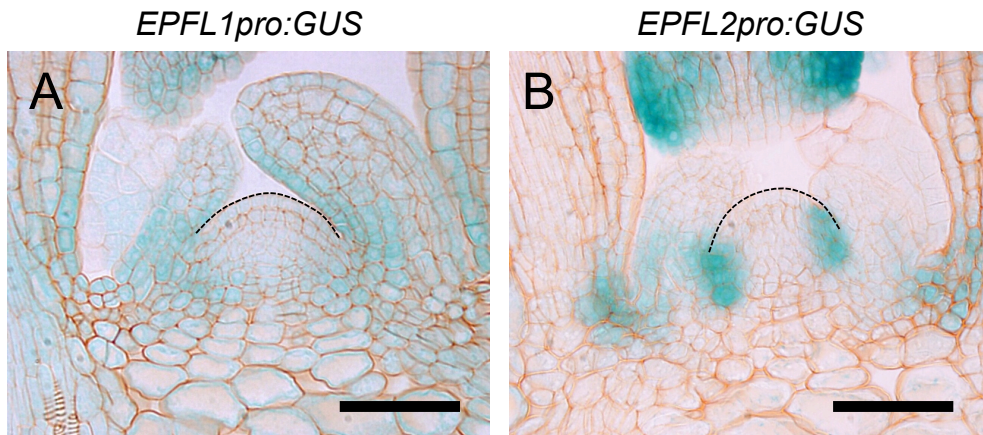


図 4-2 SAM における *EPFL1pro:GUS* と *EPFL2pro:GUS* の発現パターン

10 日目の野生型植物の SAM の切片における *EPFLpro:GUS* (A) と *EPFL2pro:GUS* (B) のシグナル。点線は SAM の領域の輪郭を示している。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。 *EPFL2pro:GUS* (B) の GUS シグナルは SAM と葉原基の間にある境界領域で検出されている。



## 材料と方法

### 植物材料

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を植物材料とし、Columbia(Col)系統を野生型として使用した。用いた変異体及び形質転換体は Col 背景の植物である。*er erl1 erl2* (Shpak et al., 2004)、*wus* (SAIL\_150\_G06) (Chatfield et al., 2013; Sonoda et al., 2007)、*wol* (Mähönen et al., 2000)、*CLV3pro:GUS* (Brand et al., 2002)、*AtML1pro:GUS* (Uchida et al., 2012)、*AtML1pro:ER* (Uchida et al., 2012)、*EPFL2pro:GUS* (Tameshige et al., 2016)、*WUSpro:GUS* (Hirakawa et al., 2017)、*ERpro:ER-YFP* (Horst et al., 2015; Ikematsu et al., 2017)は過去に確立されたものを使用した。*clv3*は Col 背景の変異体が研究開始当初に入手できなかったため、*ER* 遺伝子の機能が欠損している *Lensberg erecta* (*Ler*)背景の *clv3-2*に Col 由来の *ER* 遺伝子を導入したものを使用した。*clv3 er erl1 erl2*は、*clv3-2*を3回 Col と交雑させたものを *er erl1 erl2* と交配し、確立した。*WUSpro:ER* は過去に報告されている *AtML1pro:ER* の作成に従って作成した(Uchida et al., 2012)。以下は、*WUS* と *EPFL1* のプロモーター領域の増幅に用いたプライマーである。

<i>WUS</i> (promoter)	CAACGTCGACCACTCCTATGTTATTAGCTAAAATGTTTAG CAACGTCGACGTGTGTTTGATTTCGACTTTTGTTC
<i>EPFL1</i> (promoter)	CCCCCAAGCTTACCGAGATTTAAGTCATGGTTATATAC TCCCCGGGGTTTTGAGTTGGATTCAAGAATTACTAC

### 植物の生育条件

シロイヌナズナ種子は5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で10分間表面殺菌し、MS 培地 (組成と作成方法は後述)、または 5  $\mu$ M CLV3 ペプチド (RTVPSGPDPLHH: オペロン、純度 95%以上)や 10  $\mu$ M S-4893(InterBioScreen、1S-73130)を含む MS 培地上に播種した。その後、発芽を同調させるために 4°C 下に 2 日間置き、培養機(22°C、連続白色光)の中に移して発芽、生育させた。

MS 培地は以下のようにして作成した。ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 1L用(4.6 g)(日本製薬)1袋、スクロース 10 g、5%(w/v) MES-KOH(pH5.7) 10 ml、10 mg/ml myo-inositol 10 ml を混合し 1 L にメスアップした後、ゲランガム 5 g を加え、オートクレーブした。オートクレーブ後の MS 培地はクリーンベンチ

内で角型 2 号シャーレ(栄研化学)に分注して播種に使用した。CLV3 ペプチドや S-4893 を含む MS 培地を作成する場合、CLV3 ペプチドまたは S-4893 をオートクレーブ後に添加して作成した。

### 走査型電子顕微鏡による観察

MS 培地あるいは条件培地上で培養した植物体の地上部のみを採取し、4%FAA 溶液 (37%ホルムアルデヒド 3.375ml、100%エタノール 22.5 ml、酢酸 1.25 ml、H<sub>2</sub>O で 50 ml にメスアップ)に浸して一晩固定した。固定した植物材料を 50%から 100%のエタノール、100%アセトンに置換した後、臨界点乾燥を行った。実体顕微鏡下で乾燥した植物体から SAM が露出するように余分な葉を取り除き、イオンコーター E-1010(日立)を用いて植物体表面に金属蒸着を施した後、FE-SEM-S-4700(日立)にて観察した。

### GUS 染色

MS 培地あるいは条件培地で培養した植物体を 90%アセトンに 20 分間浸し、精製水で洗浄し、GUS 染色液(1 M Na Phosphate 1.25 ml、0.5 M EDTA 0.5 ml、Triton-X 0.05 g、50 mM potassium ferricyanide 5 ml、50 mM potassium ferrocyanide 5 ml、100mM X-Gluc 500  $\mu$ l、H<sub>2</sub>O で 25 ml にメスアップ)に入れ 5 分間減圧した。その後遮光して 37°C 下で 24 時間静置し反応させた。反応後は GUS 染色液を取り除き、30%エタノール、50%エタノールに置換し、4%FAA 溶液で一晩固定した。固定した植物体は 50%エタノールで 20 分間置換を 2 回、70%エタノール中に 30 分間置換することで FAA を除去した。

### テクノビットを用いた植物切片作成

4%FAA 溶液で固定した植物体から余分な葉を取り除き、100%エタノール、100%テクノビット浸漬液(テクノビット 7100 主剤 10 ml、テクノビット 7100 硬化剤 I 1 g)(テクノビット 7100、Heraeus Kulzer)に置換した。その後、テクノビット 7100 包埋処理液(テクノビット浸漬液 15 ml、テクノビット 7100 硬化剤 II 1 ml)を注いで硬化させ、更に固定樹脂テクノビット 3040 を流し込んで土台を作り、切片作成用ブロックを作成した。切片作成はマイクローム(RM2235、Leica)を用いて行った。ブロックを 4  $\mu$ m の薄切りにし、作成した切片は水を置いたスライドガラス上にて伸展させ、0.04%ニュートラルレッドあるいは 0.02%

トルイジンブルーで染色したのち、エンテランニュー(Merck Millipore)で封入してプレパラートを作成した。

### 顕微鏡観察

プレパラートの観察には Axio Imager A2 顕微鏡(Zeiss)を使用し、AxioCam HRc(Zeiss)にて写真撮影を行った。実生の地上部全体、あるいは茎頂部分の観察には Stemi 2000-CS(Zeiss)、写真撮影には AxioCamHRc(Zeiss)を用いた。

### 顕微鏡写真を用いた定量的な解析

SAM の面積や周縁の長さを測定する定量的な解析は、ImageJ と走査型電子顕微鏡(FE-SEM-S-4700)で撮影した SAM の写真あるいは Axio Imager A2 顕微鏡(Zeiss)と AxioCam HRc(Zeiss)を用いて取得した SAM の切片写真を用いて行った。走査型電子顕微鏡で撮影した SAM の写真においては、写真上の SAM のドームを示す部位を ImageJ の Segmented Line ツールを用いて囲み、Measure ツールを用いて面積を計測した。切片写真上の *CLV3pro:GUS* を示す表皮の長さや内部組織の面積を計測する場合は、図 3-4 上の点線で示した部位を ImageJ の Segmented Line ツールと Measure ツールで長さあるいは面積を計測した。

### 定量的リアルタイム PCR

10 日目の植物体の茎頂部分を、ジルコニアボール(YTZ-5、ニッカトー)を入れたチューブに集め、液体窒素で凍結させた後、粉砕機(MM400、ヴァーダー・サイエンティフィック)を用いて粉砕した。RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)を用いて、凍結粉砕した植物材料から全 RNA を抽出した。この全 RNA をテンプレートとし、ReverTra Ace(TOYOBO)で逆転写反応を行い、cDNA 合成を行った。リアルタイム PCR は SYBR Fast qPCR kit(KAPA)あるいは Brilliant III Ultra-Fast QPCR/QRT-PCR Master Mixes(Agient Technologies)と Light Cycler 96(Roche)を用いて行った。以下は用いたプライマーの一覧である。

<i>CLV3</i> (qRT-PCR)	TCTTCTGCTTCTTGTTTCCTTCA TCATGTAGTCCTAAACCCTTCGT
<i>STM</i> (qRT-PCR)	CAAATGGCCTTACCCTTCG GCCGTTTCCTCTGGTTTATG
<i>ARR1</i> (qRT-PCR)	GCGCACTTCTTAAGCAGGAA TGGAGTATGCGTCAAAGTCG

<i>ARR2</i> (qRT-PCR)	CGTTGATGATGATCCAACCTTGT TCCGAAGCAGAGACAATGC
<i>ARR10</i> (qRT-PCR)	CTTCAGCGCTGCCAATATC GTTCTCCCTCAACAACCTCCAA
<i>ARR11</i> (qRT-PCR)	GGTCTTGAATTAGACCTCCCTGT TGTTGCACTCCCTTCATCAC
<i>ARR12</i> (qRT-PCR)	CTCCACGATGAAGCAGGAA AACTAAACCCTCCATATCCCAA
<i>ARR14</i> (qRT-PCR)	TGTTTCTGTGGCGGTTTCAT TGTTAACGTCACCTCTCTGTCTG
<i>AHK2</i> (qRT-PCR)	CCCATATTGTATCGGTTCGACAT TTGCCCGTAAGATGTTTTCA
<i>AHK3</i> (qRT-PCR)	AGATGCCAGAAATGGATGGA ATCAAAGCCTCCCCATTCTT
<i>AHK4</i> (qRT-PCR)	GGCACTCAACAATCATCAAG TCTTTCTCGGCTTTTCTGAC

### 共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光観察

植物体は 6% UltraPure Low Melting Point Agarose(Invitrogen)に包埋し、振動刃ミクロトーム(VT1200S、Leica)にて 70  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、水でマウントした。切片は対比染色のため 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FM4-64 で染色した。GFP 蛍光と YFP 蛍光、FM4-64 のシグナルは共焦点レーザー顕微鏡(SP8、Leica または LSM800、Zeiss)で観察した。レーザーは White light laser、検出器は HyD を使用した。488nm の励起光を当て、GFP 観察には 495 nm から 555 nm、YFP 観察には 500 nm から 546 nm、FM4-64 のシグナルの観察には 580 nm から 626 nm の蛍光を取得した。

### EdU を用いた細胞分裂活性の可視化

MS 培地上で培養した 10 日目の植物体を、余分な葉を取り除いてから 10  $\mu\text{M}$  EdU(Click-iT EdU Alexa Fluor 488 imaging kit、invitrogen)を含む 1/2MS 液体培地に移して 16 時間培養した。植物体は 90%アセトンで処理し、PBS(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)で 3 回洗浄したのちに 4%FAA 溶液で固定し、テクノビット 7100(Heraeus Kulzer)に包埋してミクロトーム(RM2235、Leica)で切片を作成した。作成した切片は Alexa Fluor 488 プローブで反応させ、Axio

Imager A2 顕微鏡と FS 38HE フィルターを使用して観察した。

## 引用文献

- Abrash, E. B., Davies, K. A. and Bergmann, D. C.** (2011). Generation of signaling specificity in Arabidopsis by spatially restricted buffering of ligand-receptor interactions. *Plant Cell* **23**, 2864-2879.
- Adibi, M., Yoshida, S., Weijers, D. and Fleck, C.** (2016). Centering the Organizing Center in the Arabidopsis thaliana Shoot Apical Meristem by a Combination of Cytokinin Signaling and Self-Organization. *PLoS One* **11**, e0147830.
- Arata, Y., Nagasawa-Iida, A., Uneme, H., Nakajima, H., Kakimoto, T. and Sato, R.** (2010). The phenylquinazoline compound S-4893 is a non-competitive cytokinin antagonist that targets Arabidopsis cytokinin receptor CRE1 and promotes root growth in Arabidopsis and rice. *Plant Cell Physiol* **51**, 2047-2059.
- Bemis, S. M., Lee, J. S., Shpak, E. D. and Torii, K. U.** (2013). Regulation of floral patterning and organ identity by Arabidopsis ERECTA-family receptor kinase genes. *J Exp Bot* **64**, 5323-5333.
- Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M. and Simon, R.** (2000). Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**, 617-619.
- Brand, U., Grunewald, M., Hobe, M. and Simon, R.** (2002). Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 565-575.
- Busch, W., Miotk, A., Ariel, F. D., Zhao, Z., Forner, J., Daum, G., Suzuki, T., Schuster, C., Schultheiss, S. J., Leibfried, A., et al.** (2010). Transcriptional control of a plant stem cell niche. *Dev Cell* **18**, 849-861.
- Chatfield, S. P., Capron, R., Severino, A., Penttila, P. A., Alfred, S., Nahal, H. and Provart, N. J.** (2013). Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in WUSCHEL-dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *Plant J* **73**, 798-813.
- Chen, M. K., Wilson, R. L., Palme, K., Ditengou, F. A. and Shpak,**

- E. D. (2013). ERECTA family genes regulate auxin transport in the shoot apical meristem and forming leaf primordia. *Plant Physiol* **162**, 1978-1991.
- Chickarmane, V. S., Gordon, S. P., Tarr, P. T., Heisler, M. G. and Meyerowitz, E. M.** (2012). Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing Arabidopsis shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4002-4007.
- Fiers, M., Golemić, E., Xu, J., van der Geest, L., Heidstra, R., Stiekema, W. and Liu, C. M.** (2005). The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in Arabidopsis through a CLAVATA2-dependent pathway. *Plant Cell* **17**, 2542-2553.
- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R. and Meyerowitz, E. M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.
- Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C. and Meyerowitz, E. M.** (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16529-16534.
- Gruel, J., Landrein, B., Tarr, P., Schuster, C., Refahi, Y., Sampathkumar, A., Hamant, O., Meyerowitz, E. M. and Jönsson, H.** (2016). An epidermis-driven mechanism positions and scales stem cell niches in plants. *Sci Adv* **2**, e1500989.
- Hirakawa, Y., Shinohara, H., Welke, K., Irle, S., Matsubayashi, Y., Torii, K. U. and Uchida, N.** (2017). Cryptic bioactivity capacitated by synthetic hybrid plant peptides. *Nat Commun* **8**, 14318.
- Horst, R. J., Fujita, H., Lee, J. S., Rychel, A. L., Garrick, J. M., Kawaguchi, M., Peterson, K. M. and Torii, K. U.** (2015). Molecular Framework of a Regulatory Circuit Initiating Two-Dimensional Spatial Patterning of Stomatal Lineage. *PLoS Genet* **11**, e1005374.
- Huang, W., Pitorre, D., Poretska, O., Marizzi, C., Winter, N., Poppenberger, B. and Sieberer, T.** (2015). ALTERED

- MERISTEM PROGRAM1 suppresses ectopic stem cell niche formation in the shoot apical meristem in a largely cytokinin-independent manner. *Plant Physiol* **167**, 1471-1486.
- Ikematsu, S., Tasaka, M., Torii, K. U. and Uchida, N. (2017).** ERECTA-family receptor kinase genes redundantly prevent premature progression of secondary growth in the Arabidopsis hypocotyl. *New Phytol* **213**, 1697-1709.
- Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H. and Sawa, S. (2010).** RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in Arabidopsis. *Development* **137**, 3911-3920.
- Kondo, T., Sawa, S., Kinoshita, A., Mizuno, S., Kakimoto, T., Fukuda, H. and Sakagami, Y. (2006).** A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science* **313**, 845-848.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J. and Jurgens, G. (1996).** The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**, 87-96.
- Lee, C. and Clark, S. E. (2015).** A WUSCHEL-Independent Stem Cell Specification Pathway Is Repressed by PHB, PHV and CNA in Arabidopsis. *PLoS One* **10**, e0126006.
- Lee, J. S., Hnilova, M., Maes, M., Lin, Y. C., Putarjunan, A., Han, S. K., Avila, J. and Torii, K. U. (2015).** Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning. *Nature* **522**, 439-443.
- Lee, J. S., Kuroha, T., Hnilova, M., Khatayevich, D., Kanaoka, M. M., McAbee, J. M., Sarikaya, M., Tamerler, C. and Torii, K. U. (2012).** Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes Dev* **26**, 126-136.
- Leibfried, A., To, J. P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J. and Lohmann, J. U. (2005).** WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response



- regulators. *Nature* **438**, 1172-1175.
- Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I. and Barton, M. K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature* **379**, 66-69.
- Mandel, T., Candela, H., Landau, U., Asis, L., Zelinger, E., Carles, C. C. and Williams, L. E.** (2016). Differential regulation of meristem size, morphology and organization by the ERECTA, CLAVATA and class III HD-ZIP pathways. *Development* **143**, 1612-1622.
- Mandel, T., Moreau, F., Kutsher, Y., Fletcher, J. C., Carles, C. C. and Eshed Williams, L.** (2014). The ERECTA receptor kinase regulates Arabidopsis shoot apical meristem size, phyllotaxy and floral meristem identity. *Development* **141**, 830-841.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. and Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.
- Meng, W., Cheng, Z. J., Sang, Y. L., Zhang, M. M., Rong, X. F., Wang, Z. W., Tang, Y. Y. and Zhang, X. S.** (2017). Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS Is Critical to the Specification of Shoot Stem Cell Niche by Dual Regulation of WUSCHEL. *Plant Cell*.
- Meyerowitz, E. M.** (1997). Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* **88**, 299-308.
- Miwa, H., Kinoshita, A., Fukuda, H. and Sawa, S.** (2009). Plant meristems: CLAVATA3/ESR-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. *J Plant Res* **122**, 31-39.
- Mähönen, A. P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P. N. and Helariutta, Y.** (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes Dev* **14**, 2938-2943.
- Perales, M. and Reddy, G. V.** (2012). Stem cell maintenance in shoot apical meristems. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 10-16.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F., Jurgens, G.**

- and Laux, T.** (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**, 635-644.
- Sessions, A., Weigel, D. and Yanofsky, M. F.** (1999). The Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J* **20**, 259-263.
- Shinohara, H. and Matsubayashi, Y.** (2015). Reevaluation of the CLV3-receptor interaction in the shoot apical meristem: dissection of the CLV3 signaling pathway from a direct ligand-binding point of view. *Plant J* **82**, 328-336.
- Shpak, E. D., Berthiaume, C. T., Hill, E. J. and Torii, K. U.** (2004). Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls Arabidopsis organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development* **131**, 1491-1501.
- Shpak, E. D., McAbee, J. M., Pillitteri, L. J. and Torii, K. U.** (2005). Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. *Science* **309**, 290-293.
- Sonoda, Y., Yao, S. G., Sako, K., Sato, T., Kato, W., Ohto, M. A., Ichikawa, T., Matsui, M., Yamaguchi, J. and Ikeda, A.** (2007). SHA1, a novel RING finger protein, functions in shoot apical meristem maintenance in Arabidopsis. *Plant J* **50**, 586-596.
- Tameshige, T., Okamoto, S., Lee, J. S., Aida, M., Tasaka, M., Torii, K. U. and Uchida, N.** (2016). A Secreted Peptide and Its Receptors Shape the Auxin Response Pattern and Leaf Margin Morphogenesis. *Curr Biol* **26**, 2478-2485.
- Uchida, N., Igari, K., Bogenschutz, N. L., Torii, K. U. and Tasaka, M.** (2011). Arabidopsis ERECTA-family receptor kinases mediate morphological alterations stimulated by activation of NB-LRR-type UNI proteins. *Plant Cell Physiol* **52**, 804-814.
- Uchida, N., Lee, J. S., Horst, R. J., Lai, H. H., Kajita, R., Kakimoto, T., Tasaka, M. and Torii, K. U.** (2012). Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. *Proc Natl Acad Sci*

- U S A* **109**, 6337-6342.
- Uchida, N., Shimada, M. and Tasaka, M.** (2013). ERECTA-family receptor kinases regulate stem cell homeostasis via buffering its cytokinin responsiveness in the shoot apical meristem. *Plant Cell Physiol* **54**, 343-351.
- Wang, J., Tian, C., Zhang, C., Shi, B., Cao, X., Zhang, T. Q., Zhao, Z., Wang, J. W. and Jiao, Y.** (2017). Cytokinin Signaling Activates WUSCHEL Expression during Axillary Meristem Initiation. *Plant Cell*.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. and Schmulling, T.** (2003). Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- Yadav, R. K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M. and Reddy, G. V.** (2009). Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4941-4946.
- Yadav, R. K., Tavakkoli, M. and Reddy, G. V.** (2010). WUSCHEL mediates stem cell homeostasis by regulating stem cell number and patterns of cell division and differentiation of stem cell progenitors. *Development* **137**, 3581-3589.
- Yadav, R. K., Tavakkoli, M., Xie, M., Girke, T. and Reddy, G. V.** (2014). A high-resolution gene expression map of the Arabidopsis shoot meristem stem cell niche. *Development* **141**, 2735-2744.
- Zurcher, E., Tavor-Deslex, D., Lituiev, D., Enkerli, K., Tarr, P. T. and Muller, B.** (2013). A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network in planta. *Plant Physiol* **161**, 1066-1075.

## 謝辞

本研究を行うにあたって多くの方々に多大なるご指導・ご協力いただきました。WPI-ITbM ライブイメージングセンターの佐藤良勝チーフコーディネーターには共焦点顕微鏡による実験においてご指導いただきました。奈良先端科学技術大学院大学の田坂昌生教授には博士前期課程在学時に研究に対する熱心なご指導と助言をいただきました。名古屋大学 ITbM 植物パターン形成グループの鳥居啓子教授には研究へのご指導のみならず、研究者としての姿勢を学ばせていただきました。学習院大学の平川有宇樹博士、横浜市立大学の爲重才覚博士、京都産業大学の池松朱夏博士、遠藤仁博士、中川彩美博士には実験や日々の研究生生活において温かくサポートしていただき、大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。主旨導教員である打田直行特任准教授にはどんなときも丁寧にご指導いただき、精神的にも温かく支えていただきました。本当にありがとうございました。

最後に、辛抱強く見守り、支え続けて下さった家族に深く感謝申し上げます。