

研究終了報告書

「継続的成長を支える形成層幹細胞の動態と細胞間相互作用」

研究期間:2020年10月～2024年3月

研究者:石 東博

1. 研究のねらい

植物は光に向かって縦に伸長していくが、特に樹木などの地上植物は横に太くなる方向にも成長し、この過程は二次成長と呼ばれる。双子葉植物などの茎の二次成長においては、リング状に形成層と呼ばれる分裂組織ができ、内側に木部、外側に師部と呼ばれる組織を作り出す。新たに作られた木部・師部による水分・栄養分などの輸送が植物体全体の継続的な成長を支えており、二次成長は植物にとって重要なプロセスである。

動植物を問わず、幹細胞は形態形成において重要な役割を果たす。植物の二次成長においても、形成層に存在する幹細胞が新しく組織を作り出していると考えられてきた。しかし、個々の形成層幹細胞がいつ、どのように分裂し、分化していくかについては、150年以上前からさまざまな仮説が提唱されてきたが、その振る舞いは実験的には近年まで明らかではなかった。そもそも、形成層幹細胞はこれまで、その細胞の大きさや位置によって識別されることが多く、厳密な意味での同定がまだできていなかった。

これまでの研究代表者らの結果から、形成層幹細胞は、自らの幹細胞の維持とともに、木部細胞への分化(内側)、師部細胞への分化(外側)の両方を行っていることが明らかになった。依然、生体内でこのような複雑な細胞運命決定が時空間的にどのように制御されているかについては、細胞レベルでは明らかになっていない。また、どのように形成層幹細胞がリング状(円筒状)の配置を維持できるのかも明らかになっていない。個々の形成層幹細胞がどのように自身の位置情報を読み取りながら、他の形成層幹細胞や分化した細胞と協調して形態形成(二次成長)を担っているのだろうか？

本研究では、これらの課題を解決すべく、シロイヌナズナの胚軸の二次成長を対象として、以下の3つ目標に取り組む。

- 1) 二次成長中の形成層幹細胞の系譜・動態およびその揺らぎを明らかにし、数理モデルによって細胞レベルで二次成長を再構成する
- 2) 形成層幹細胞を特徴づける遺伝子発現と、分化過程における遺伝子発現の変遷を明らかにする。
- 3) 形成層幹細胞を制御する因子の機能を細胞レベルで明らかにし、継続的な二次成長を可能にする機構を細胞間相互作用に着目して解明する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究ではシロイヌナズナの継続的成長を支える形成層幹細胞の動態と細胞間作用の解明を目指した。まず、細胞動態の解明に必要なシリアルイメージングシステムの構築を行った。進行の遅れにより研究期間内での細胞動態の解明には至らなかったが、一番の課題であった観

察系の構築が完了しており、速やかな解明が見通される。

二次成長中の形成層幹細胞の分化過程を規定する遺伝子発現については、既存の核抽出法を改善することで、シングル核 RNA-seq に適した核を目的の組織から得る技術の開発に成功した。2500 遺伝子/核 (中央値)以上を達成することができ、シロイヌナズナ核としては国際的にもトップレベルである。開発された技術を用いてシロイヌナズナの胚軸を対象に解析したところ、既知の形成層幹細胞マーカーをすべて発現する細胞集団が得られたことから、形成層幹細胞は分化した細胞とは異なった特異的な遺伝子発現パターンを示すことが明らかになった。また、木部導管と木部柔組織への分化軌道が、形成層幹細胞から直接別々に分かれていることから、細胞分化に関する新知見を得ることもできた。

さらに、得られたデータセットを詳細に解析したところ、植物ホルモンの一つであるストリゴラクトンシグナルが二次成長中に変化することが予想され、組織学的手法や遺伝学的手法によってその機能を明らかにした。これらの結果から、ストリゴラクトンシグナルが木部導管の形成を阻害することを通じて、植物体の乾燥ストレスを制御することが示唆された。

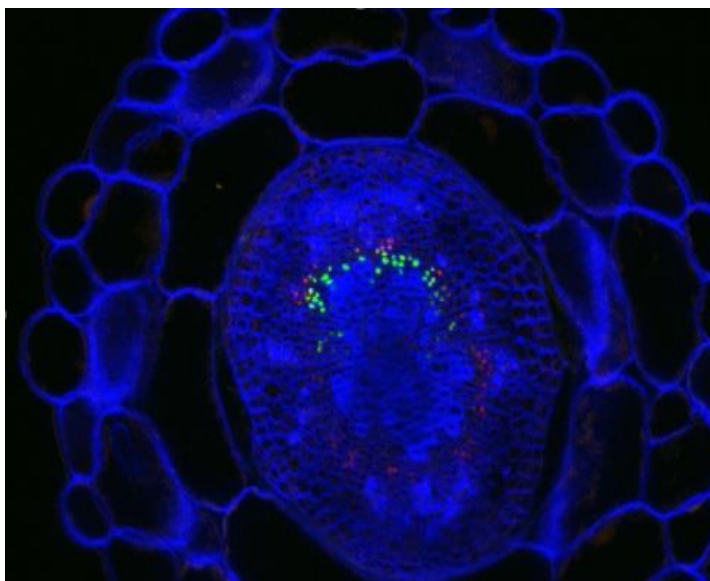
また、得られたデータセットから、細胞間相互作用を担う可能性がある組織特異的に発現する候補遺伝子が得られ、そのうちの一つに関しては、木部で発現し、隣接する細胞において、形成層幹細胞のマーカー遺伝子の発現を細胞非自律的に誘導することを明らかにした。

(2) 詳細

研究テーマ1「形成層幹細胞の系譜・動態と数理モデルによる再構成」

胚軸は縦方向に細胞も長く伸長しており、また、形成層は組織内部に位置するため、外部からの観察が容易でない。定量的細胞系譜解析を行うためには、多くの切片の蛍光観察が必要である。そこで、ビブラトームで切片を作成しながら、胚軸の切断面を連続・自動で撮影することを試みた。

フランス・モンペリエ・イメージングセンターの Automate 880 を用いて観察を依頼したところ、狙いの解析を行うのに適した像が得られたが、二光子顕微鏡を用いているため撮影に長時間を要し、COVID-19 によるロックダウンの影響もあり、大量のサンプルを処理する必要がある本系譜解析には適しないことが判明した。



TDR>H4-GFP

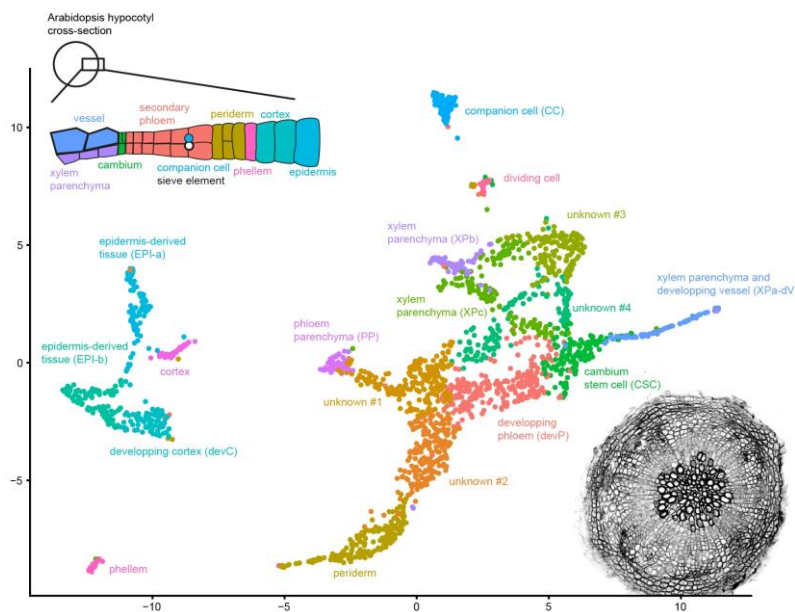
SMXL5>H2B-RFP

Cell Wall

そこで、予定を変更し、シリアルイメージングシステムを構築することにした。研究代表者の異同や半導体不足による納品の遅れなどがあり、当初の予定よりは大幅に遅れたが、大阪大学・笠井 淳司博士の協力などを経て、ようやくシステムを構築することができ、連続観察を行うことができた。

研究テーマ2「形成層幹細胞から分化する過程における遺伝子発現の変遷」

これまでの植物核抽出方法を改善することで、胚軸において単一細胞(核)レベルでも遺伝子発現情報を得ることに成功した。解析の結果、系譜解析によって実証された形成層幹細胞が、遺伝子発現状態でも特異的な状態を持つことが明らかになり、プレプリントとして発表した(Zhao, Shi et al., bioRxiv, 2023)。



胚軸を用いた単一核 RNA-seq の UMAP 図

形成層幹細胞のクラスター(緑色)では既知のマーカーがおおよそすべて発現しており、形成層幹細胞が特異的な遺伝子発現状態を持つことが示唆された。

さらに、形成層幹細胞では、植物ホルモンの一つであるストリゴラクトン(SL)のアナログ(GR24^{4D0})によって誘導される遺伝子群の発現が、師部などの分化した細胞と比べて優位に低いことが明らかになった。これらの結果から、SL シグナルが二次成長に役割を果たす可能性が示され、その後の変異体などの解析により SL シグナルが二次成長における木部導管形成を負に制御することを見出した。

また、本研究によって開発された植物核抽出からのシングル核 RNA-seq 解析法の技術は多くの研究者に必要とされ、さきがけ一期生の吉田研究員を始め、様々な植物研究者との共同研究を現在行っている。共著としての既に複数のポスター発表を行っており、今後の論文発表も期待される。得られた核抽出法は RNA-seq 解析のみならず(Rahimi et al., Current Biology, 2022)、クロマチン状態を解析する ATAC-seq にも応用可能であり(Wallner et al., Nat. Communications, 2023)、重要な新技術であると考えられる。

研究テーマ3「細胞間相互作用を担う分子の機能解明」

テーマ2の結果から、詳細な遺伝子発現アトラスが明らかになり、組織特異的に発現する遺伝子群が得られた。その中から、細胞間相互作用に寄与する可能性がある遺伝子を選び、機能解析を行っている。

候補遺伝子の一つとして、分泌性ペプチド着目している。これまで既に形成層幹細胞マーカーの一つである **WOX4** を誘導する新規のペプチドを同定した。さらに、さがけ二期生の村瀬研究員との共同研究により、その受容体についても解析し、分子機構を明らかにしていくうえで重要な発見をすることができた。

3. 今後の展開

さがけ研究による成果でも明らかになったように、形成層幹細胞は確固たるアイデンティティーを持つ細胞種であり、機能を保ちながら継続的に成長していくためには、緻密な制御が必要である。テーマ2で明らかになった遺伝子発現情報を元に、引き続きテーマ3に沿って研究を継続することで、当初のねらいに掲げた細胞間相互作用の分子実体を、今後数年以内にさらに明らかにしていくことができると期待される。テーマ1で明らかにする細胞動態情報とともに、二次成長を司るシステムの全体像を理解することで、10年後までには動植物間の幹細胞システムの違いやそれぞれの特徴を明らかにしていきたい。技術的な開発に成功した、植物組織を用いたシングル核 RNA-seq 法については、今後もさらに共同研究が広がっていくと予想される。

4. 自己評価

本さがけ研究を通じて、これまで主に組織レベルで理解されてきた二次成長を、細胞レベルで解析することができ、その細胞間相互作用の一端を明らかにすることもできた。テーマ2では目標以上の成果が得られた。テーマ1は今後速やかに目標を達成するための技術的な基盤を整えた。テーマ3についても期間内に論文化にこぎつけることはできなかったが、今後の研究につながるシーズを複数見つけることができ、さらなる発展が期待できる。

本さがけ研究の成果が認められ、学会での招待講演が増え、研究室主宰者として研究グループを開始することができ、研究者としての飛躍につながった。研究の進め方についても妥当であったと考えている。さがけ内でも重要な共同研究を行うことができ、スタートアップ支援により新規グループでも大きな遅延がなく研究を継続することができた。COVID-19 の影響で異動を余儀なくされ、当初の予定の研究に遅延が生じたが、開発した技術を生かした多くの共同研究を開始することができた。

二次成長は林業・農業と深く結びついており、バイオマスの観点からも重要な過程である。本さがけ研究によって細胞レベルの理解が深まることで、今後のイノベーションの源泉となる基盤構築につながったと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文) 発表

研究期間累積件数: 3件

1. J. Zhao#, **D. Shi**#, K. Kaeufer, C. Song, X. Xu, L. Luzziatti, T. Bennett, K. Kaufmann and T. Greb*. Strigolactones optimise plant water usage by modulating vessel formation. bioRxiv, 2023.04.05.535530, 2023

Co-first author. * Co-corresponding author.

本プレプリントでは、シロイヌナズナ胚軸を用いて、シングル核 RNA-seq 解析を行い、形成層幹細胞から分化する過程における遺伝子発現の変遷を明らかにした。その結果から、ストリゴラクトニンシグナルが二次成長中に役割を果たすことが示唆され、実際に変異体解析などにより、ストリゴラクトニンシグナルが、木部導管の形成を負に制御していることが明らかになった。

2. ES. Wallner, N. Tonn, **D. Shi**, L. Luzziatti, F. Wanke, P. Hunziker, Y. Xu, I. Jung, V. López-Salmerón, M. Gebert, C. Wenzl, JU. Lohmann, K. Harter and T. Greb. OBERON3 and SUPPRESSOR OF MAX2 1-LIKE proteins form a regulatory module driving phloem development. Nature Communications 14:2128, 2023

本論文では、師部を制御する因子として知られていた SMXL5 が、OBE3 と複合体を形成して機能することが明らかになった。研究代表者はクロマチン状態を明らかにする ATAC-seq 解析を組織特異的に行う手法を開発し、いくつかの制御因子が師部特異的にクロマチン状態が変化しており、SMXL5/OBE3 の変異体ではその特異的な状態が損なわれることを明らかにした。

3. A. Rahimi, O. Karami, A. D. Lestari, T. Werk, P. Amakorová, **D. Shi**, O. Novák, T. Greb, R. Offringa. Control of cambium initiation and activity in Arabidopsis by the transcriptional regulator AHL15. Current Biology 32(8):1764-1775.e3, 2022

本論文では、研究代表者が作出した高解像度の遺伝子発現アトラスを元に、転写制御因子である AHL15 が、シロイヌナズナの形成層を制御する新規因子であることを明らかにした。

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

【ワークショップ企画招待講演】Zhao J, Cao H, Sugimoto K, Greb T, **Shi D**. Revealing cambium stem cell behaviour during secondary growth in Arabidopsis thaliana. 第 56 回日本発生生物学会年会, 仙台 (2023)

【招待講演】**Shi D**. Cellular dynamics and regulation of cambium stem cells during secondary growth. Institute Days of Max Planck campus in Potsdam-Golm (2023)

【ワークショップ企画招待講演】**Shi D**. Single Nucleus RNA-seq using Fluorescence-Activated Nuclei Sorting (FANS). Single Cell Sequencing Techniques in Plant Biology Part 1: From Plants to

Data Generation Virtual Workshop, online (2023)

【シンポジウム企画講演】**Shi D**, Zhao J, Kawamura K, Morinaka H, Iwase A, Yoshida S, Kaufmann K, Sugimoto K, Greb T. Characterization of cambium stem cells using nuclear RNA-seq analysis identifies stem cell-specific signatures. 第 64 回植物生理学会年会, 仙台 (2023)

【著書】**Shi D**, Luzzietti L, Nodine M, Greb T, Chapter 5: Analysis of Xylem Cells by Nucleus-Based Transcriptomics and Chromatin Profiling, Javier Agusti (ed.), Xylem: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 2722 (2023)