

氏 名 青山 剛士

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1563 号

学位授与の日付 平成24年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Regulation of stem cell characters in the haploid generation of
the moss *Physcomitrella patens*

論文審査委員 主 査 教授 川口 正代司
教授 長谷部 光泰
教授 西村 幹夫
准教授 藤田 知道 北海道大学

論文内容の要旨

Stem cells are characterized by their ability to self-renew and give rise to differentiated cells and formed at particular times and positions during the development of multicellular organisms. Land plants have a haplodiplontic life cycle, in which gametophyte and sporophyte generations alternate. Whereas flowering plants form stem cells only in the sporophyte generation, non-seed plants form stem cells in both the sporophyte and gametophyte generations. Since the closest relatives of land plants, the charophytes, have a haplontic life cycle and retain stem cells only in the gametophyte generation, it is hypothesized that the molecular mechanisms underlying stem cell regulation in sporophytes were co-opted from pre-existing mechanisms in gametophytes.

For stem cell regulation in sporophyte generation, various research were extensively performed using *Arabidopsis thaliana* as a model organism. In *A. thaliana*, stem cells exist at the growing tips of shoot and root as shoot apical meristem (SAM) and root apical meristem (RAM). Class1 *KNOX* genes play a key role to maintain pluripotent stem cells in SAM. Orthologous genes of Class1 *KNOX* genes in *Physcomitrella patens* were found, and it is shown that these genes did function not in stem cells of gametophytes but in development of sporophytes. *WUSCHEL* (*WUS*) and *CLAVATA* (*CLV*) genes are also important regulators of stem cells in SAM. *WUS* gene is a homeobox transcription factor and positively regulates the expression of *CLV3* gene. In contrast, *CLV3* gene, which encodes precursor of glycopeptide, negatively regulates the expression of *WUS* gene via *CLV1*, which encodes receptor-like kinase. This negative feedback loop between *WUS* and *CLV3* genes is necessary to maintain a stem cell population in SAM. It is reported that genes, which belong to *WOX* family, exist in *P. patens*, although functions of these genes are unknown. Therefore, the author generated the disruption lines of *WOX* genes in *P. patens*. However, these disruption lines showed normal growth and no morphological difference compared with wild type in the gametophyte generation. Recently, it is shown that loss-of-function of *WOX* genes caused defects in regeneration from leaf cell and sporophyte development in *P. patens*. Although these results suggest that there are different mechanisms for stem cell regulation between gametophyte and sporophyte generations, relevance of the “co-option” hypothesis is still unclear because there is a little information for stem cell regulation in the gametophyte generation. It is important to identify the genes that regulate gametophyte stem cell formation in order to elucidate the general principles of stem cell formation in plants.

The moss *P. patens* forms a hypha-like body (protonema) and a shoot-like body (gametophore) from a protonema apical cell and a gametophore apical cell, respectively, in gametophyte generation. These apical cells have stem cell characteristics and are formed as side branches of differentiated protonema cells.

Differentiation of two different types of stem cells from side branch initial cells is controlled by two phytohormones, auxin and cytokinin. However, molecular mechanisms for such a stem cell formation have been largely unknown. In addition to simple stem cell system in *P. patens*, availability of whole genome sequence and the feasibility of gene targeting allow us to investigate developmental mechanisms in detail.

The AP2-type transcription factors, which are characterized by the AP2/ERF DNA-binding domain, form a plant-specific protein family. The AINTEGUMENTA (ANT) subfamily consists of eight genes: *ANT*, *AINTEGUMENTA-LIKE (AIL) 1*, *PLETHORA (PLT) 5/AIL5*, *PLT1*, *PLT2*, *PLT3/AIL6*, *PLT7/AIL7* and *BABY BOOM (BBM)* that are involved in the development of flowering plants. In *A. thaliana*, *PLT* genes are required for stem cell niche formation in root apical meristems, and loss-of-function of these genes causes a defect in stem cell maintenance. In addition, it is shown that *ANT*, *AIL6*, and *AIL7* regulate shoot apical meristem function. Since homologs of these genes exist in *P. patens*, these genes are good candidate to analyze the molecular mechanisms for stem cell regulation in gametophyte generation.

In this study, the author shows that four AP2-type transcription factors orthologous to *A. thaliana* eight genes are indispensable for the formation of gametophore apical cells from protonema cells. The author named the four *P. patens* genes *APB1*, *APB2*, *APB3*, and *APB4*, based on the initials of their orthologous genes *ANT*, *PLT*, and *BBM* in *A. thaliana*. Quadruple disruption of all *APB* genes blocked gametophore formation, even in the presence of cytokinin, which enhances gametophore apical cell formation in the wild type. Time-lapse observation showed that side branch initial cells do not acquire gametophore apical cell identity and directly differentiate into protonema apical cells even in the conditions of gametophore apical cell induction, at least based on their morphology. All *APB*-reporter fusion proteins were detected in side branch initial cells just after side branch formation. These signals were also detected in emerging

This study provides some new insights into regulation of stem cells in gametophyte and sporophyte generations. His research suggests that *APBs* control the fate of gametophore apical stem cells in gametophyte generation of *P. patens*. Orthologous genes of *APBs* are involved in the regulation of shoot and root apical meristem in sporophyte generation of *A. thaliana*. Therefore, this is the first report to show that orthologous genes function in the formation of stem cells in the gametophyte generation and the maintenance of stem cells in the sporophyte generation.

博士論文の審査結果の要旨

陸上植物は単複世代交代型の生活環を持ち、配偶体世代と孢子体世代に多細胞体を形成する。被子植物は孢子体世代にのみ幹細胞を形成するが、コケ植物やシダ植物は両方の世代に幹細胞を形成する。一方、陸上植物に最も近縁なシヤジクモ藻類では、配偶体世代にのみ幹細胞が形成される。幹細胞の形成維持機構の進化は、多細胞体制の進化と密接に関わっており、陸上植物の体制進化を研究する上で重要である。しかし、被子植物以外の植物では、遺伝子解析のしやすいモデル生物が無かったことから、幹細胞形成維持に関わる遺伝子の研究、とりわけ、配偶体世代における幹細胞形成維持機構はほとんど研究されておらず、その分子機構は未解明であった。

青山剛士氏は、ゲノムが解読され、遺伝子ターゲティングが容易なコケ植物セン類ヒメツリガネゴケを材料とし、配偶体世代における幹細胞形成制御因子の解析を行った。ヒメツリガネゴケ配偶体は原糸体と茎葉体という2つの体制を持ち、それぞれ、頂端に位置する原糸体頂端幹細胞と茎葉体頂端幹細胞から形成される。両幹細胞ともに、原糸体細胞がリプログラムされることによって形成されることが知られていた。青山氏は、ヒメツリガネゴケの AP2 型転写因子をコードする *APB1*、*APB2*、*APB3*、*APB4* の4つの遺伝子を挿入あるいは欠失によって機能阻害したところ、茎葉体が形成されなくなることを発見した。さらに、野生型ではオーキシシンとサイトカイニンの投与によって茎葉体幹細胞が高頻度に誘導されるが、*APB* 四重遺伝子破壊株においては、ホルモン投与条件下でも茎葉体幹細胞が形成されないことを明らかにした。さらに、それぞれの遺伝子末端にレポーター遺伝子をノックインし、*APB*-レポーター融合タンパク質の発現を観察したところ、幹細胞形成前の原糸体細胞で全ての *APB* 融合タンパク質が発現しており、茎葉体幹細胞が形成されるときには、*APB* 融合タンパク質の発現は維持されるが、原糸体幹細胞が形成されるときには、*APB* 融合タンパク質の発現が消失することを明らかにした。そして、個々の *APB* 遺伝子を遺伝子破壊したときに茎葉体形成率がもっとも下がった *APB4* cDNA を誘導プロモーターによって一過的に発現させると、茎葉体形成率が增加することを明らかにした。さらに、サイトカイニン添加が *APB4* 遺伝子誘導と相乗的に働き茎葉体形成率が上がることを発見した。一方、外生的オーキシシン添加によって4つの *APB* 遺伝子が発現誘導されることも明らかにした。以上の実験結果より、オーキシシンの制御下にある4つの *APB* 遺伝子がサイトカイニンシグナルと相互作用する事により茎葉体幹細胞形成が引き起こされるというモデルを提唱した。

本研究は原糸体細胞から茎葉体幹細胞と原糸体幹細胞という異なった性質の幹細胞がどのように作り分けられているかの分子機構を解明した点で発生学的に重要な貢献をした。また、*APB* 遺伝子は被子植物でも幹細胞形成に関わっており、今後、コケ植物と被子植物における *APB* 遺伝子ネットワークを比較することにより、両者の幹細胞形成ネットワークの相違点が明らかになることが期待され、本研究は、幹細胞形成機構の進化を研究する足がかりを築いた点で重要である。以上より、申請者の論文は学位論文として十分ふさわしい内容であるものと審査委員会で一致して判定した。