

令和元年5月22日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06172

研究課題名(和文)植物細胞の空間情報処理機構の階層的理解

研究課題名(英文) Investigation of spatio-temporal signals in plant cells

研究代表者

小田 祥久(Oda, Yoshihisa)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：30583257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では木部道管における細胞分化をモデルとして細胞内に適切に細胞骨格を配置し、細胞壁の沈着パターンを決定づける空間的なシグナルの分子実体とその階層的な作用機序の解明を試みた。その結果、ROPタンパク質の相互作用から自律的に細胞骨格の制御ドメインが形成されること、微小管と細胞膜との相互作用の調節により細胞壁の沈着パターンが決定されることが明らかとなった。これらの成果により、ROPタンパク質と細胞骨格との階層的な作用を通して細胞自律的に細胞壁の沈着パターンが決まる仕組みが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞生物の発生では個々の細胞が適切な形態や機能を獲得するプロセスが必須である。植物においては細胞膜直下に並ぶ微小管やアクチン繊維が細胞壁の沈着パターンを適切に制御することにより細胞の成長や分化を支えている。そのためには細胞内での細胞骨格等の構造の配置を時空間的に厳密に制御する必要があるが、その分子実態や作用機序は明らかとなっていなかった。本研究ではタンパク質間の相互作用から自律的に細胞内の空間配置が決定される仕組みの一端が見いだされ、多細胞発生の細胞を支える細胞の振る舞いの理解に繋がる成果となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the proteins and their actions in determining the deposition patterns of plant cell walls in xylem vessel cells. We found that two novel microtubule-associated proteins regulate the interaction between microtubules and the plasma membrane, thereby regulate the distribution pattern of microtubules and ROP GTPases beneath the plasma membrane, resulting in formation of distinct patterns of cell walls. These results imply the cell-autonomous determination of cell wall patterns through the interaction between cytoskeletons and ROP GTPases

研究分野：植物生理学

キーワード：細胞壁 微小管 GTPase

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物の発生は個々の細胞の高度な形態制御と機能化により支えられています。しかしながら、細胞内において空間情報が新たに構築され、細胞骨格や膜タンパク質の働きを介して多様な細胞の形態形成を導く分子的な仕組みはほとんど理解されていませんでした。その中で研究代表者は、木部道管分化をモデルとして細胞が空間情報を作り出す分子的な仕組みを明らかにしてきました。道管を構成する木部細胞は螺旋、網目、孔紋などの多様なパターンで二次細胞壁を沈着させます。これに伴い、隣接する道管との間に壁孔対および穿孔を形成することにより、植物体内における水輸送を実現しています。研究代表者はシロイヌナズナ培養細胞を用いた木部道管分化誘導系を用い、ROP11 GTPase が細胞自律的に細胞膜上で局所的に活性化すること、活性化した ROP11 が MIDD1-Kinesin13A 複合体を介して細胞壁合成のルールとなる表層微小管を局所的に破壊すること、表層微小管が ROP11-MIDD1-Kinesin13A 経路と排他的に作用し、両者のバランスが多様なパターンを導くこと、VETH-COG2-Exo70A1 経路が表層微小管に沿って細胞壁成分の膜輸送を誘導することなどを明らかにしました。

このように、研究代表者は多様な二次細胞壁パターンを構築するための重要因子を同定し、その仕組みの一端を解明しました。一方で、ROP11 の細胞自律的な局所活性化や細胞骨格との相互作用の詳細なメカニズムは依然として不明であり、特に細胞間で壁孔対を形成する仕組みは完全に未解明でした。この仕組みを明らかにすることにより、細胞が自律的に空間情報を創り出し、多様な形態を導くと共に、空間情報を細胞間に伝達・共有するという空間情報処理機構の階層が明らかになると考えられました。

### 2. 研究の目的

本研究では木部道管における二次細胞壁パターンの形成をモデルとして細胞が空間情報を新たに創り出し、多様な形態を導くと共に空間情報を細胞間に伝達・共有するという空間情報処理機構の階層を明らかにします。そのために二次細胞壁パターンの形成において機能する各因子の拡散や相互作用のダイナミクス、複合的な作用、新規の制御因子の関与を明らかにします。

### 3. 研究の方法

植物細胞の空間情報処理機構を階層的に理解するために、木部道管分化をモデルとして以下の3項目を計画しました。

- 1) ROP11 が局所的に活性化し、自発的に空間パターンを創り出す仕組みを解明するために、ROP 制御因子の遺伝学的解析、ROP ドメインの再構築によりその素過程を明らかにすると共に各因子の拡散と相互作用のダイナミクスを解析し、反応拡散系のモデルの構築を試みました。
- 2) 局所的に活性化した ROP11 が細胞骨格と相互作用し多様な二次細胞壁パターンを導く仕組みを明らかにするために、新規の微小管、制御因子の探索とその機能解析を試みました。
- 3) 道管に隣接した木部細胞は、隣接する道管の壁孔と同じ位置に壁孔を形成することにより、壁孔対を構築します。この壁孔対を構築する仕組みを解明することにより、空間情報を伝達・共有する機構の解明に繋がると考えられます。そこで壁孔の細胞膜に局在する受容体様キナーゼの局在を解析しました。

### 4. 研究成果

- 1) ROP11 が局所的に活性化する仕組みを明らかにするために ROP の活性化因子である ROPGEF および ROPGAP に着目しました。道管での遺伝子発現データから ROPGEF4 および ROPGEF7, ROPGAP3 と ROPGAP4 をそれぞれ候補としました。機能欠損変異体入手し、これらの遺伝子が壁孔の形成におそらく ROP11 の活性化・不活性化を介して寄与していると考えられました。ROPGEF4 と ROPGAP3 を ROP11 と共発現させると、局所的に ROP11 を活性化させることができます。そこでこれらのタンパク質と ROP11 が活性化したドメインの密度を調べたところ、ROPGEF4 および ROPGAP3 の発現量に応じて ROP11 が活性化したドメインの密度が高くなりました。これらのタンパク質が量依存的に ROP11 の局所的な活性化を制御していることを示唆しています。その仕組みを理解するために、各因子の密度、拡散速度、反応速度を含む反応拡散モデルを構築し、網羅的にドメインの形成の有無を調べました。その結果、ROPGEF-ROP 複合体の拡散速度が低いこと、ROPGEF から ROP への活性化に正のフィードバックが必要であることが示唆されました。FRAP 法を用いて ROPGEF と ROP の細胞膜上での拡散速度を調べた結果、ROP の拡散速度が ROPGEF 存在下で著しく低下することが分かりました。これらの結果は反応拡散系に類似した仕組みで ROP が局所的に活性化し、それにより壁孔の形成パターンが決定されることを示唆しています (Nagashima et al. 2018)。

- 2) 局所的に活性化した ROP11 と細胞骨格との相互作用を明らかにするために、道管に分化する培養細胞を用いて細胞骨格に局在するタンパク質の探索を行いました。その結果、2種類の機能未知タンパク質を同定しました。そのうちの一つは IQ67domain ファミリーに属する IQD13 でした。IQD13 は道管の細胞全域の微小管に局在しました。IQD13 の機能欠損変異体では壁孔が野生型よりも大きく円形になっていました。IQD13 の過剰発現では逆に壁孔が野生型よりも

細く小さくなっていました。これらの結果は IQD13 が微小管を介して壁孔、おそらく ROP11 が活性化したドメインの形態を制御していることを示唆します。IQD13 の部分配列を使ってその機能を調べたところ、IQD13 は N 末端で細胞膜に、それ以外の部分で微小管と相互作用し、両者が機能することにより、表層微小管を特異的に安定化することが分かりました。異所的に ROP11 が活性化したドメインを構築し、そのドメインの形状に対する IQD13 の影響を調べました。その結果、IQD13 の存在下では ROP11 が活性化したドメインが微小管と微小管に挟まれた領域に限定され、細長い形状のドメインが形成されました。薬剤処理による微小管の安定化や IQD13 の部分配列ではその作用がみられなかったことから、IQD13 によるドメインの形状制御には微小管および細胞膜との相互作用が必要であることが分かりました (Sugiyama et al. 2017)。

もう一つのタンパク質はこれまでに報告の無いタンパク質で cortical microtubule disordering1 (CORD1) と名付けました。CORD1 は IQD13 と同様に道管の細胞全域の微小管に局在しました。培養細胞に CORD1 を発現させると微小管が細胞膜から細胞質に遊離し、ランダムな方向に並んだことから、CORD1 は微小管と細胞膜との相互作用を抑制することが示唆されました。CORD1 の機能欠損変異体では道管の壁孔が小さくなりました。変異体の道管における微小管の様子を観察するために、胚軸組織を培養し道管を分化させる実験系を開発しました。この方法を用いて微小管を観察したところ、CORD1 の機能欠損変異体の道管では微小管がよりランダムな方向に並んでいることが分かりました。異所的に ROP11 が活性化したドメインを構築し、そのドメインの形状に対する CORD1 の影響を調べたところ、CORD1 存在下では微小管が ROP の活性化ドメインの形状に影響しにくいことが分かりました。これらの結果から、CORD1 は微小管の細胞膜との相互作用を抑制することにより、ROP と微小管との相互作用を弱め、それにより壁孔の形状を制御していると考えられました (Sasaki et al. 2017)。

これらの知見から、道管では IQD13 と CORD1 が微小管と ROP との相互作用に相反する作用を及ぼしており、両者のバランスにより二次細胞壁の沈着パターンが決定されると考えられました。これら 2 つの因子に加え、壁孔の形状に異常を示す変異体を新たに単離しており、これらの変異体の解析を進めることによりさらに詳細な仕組みが明らかになると期待されます。

3) この壁孔対を構築する仕組みを解明するために、道管で発現する受容体様キナーゼの細胞内局在を調べました。その結果、壁孔に存在する複数の受容体様キナーゼを同定しました。これらのタンパク質の解析を進めることにより、壁孔対形成の仕組みに迫ることができると期待されます。

このように本研究では木部道管分化において ROP GTPase が局所的に活性化されドメインを作り出す仕組み、ROP のドメインが微小管と相互作用して形状を変える仕組みを明らかにしました。また、壁孔対の形成に関しても有力な情報を得ており、今後の研究によりその具体的な仕組みに迫ることができると期待できます。これらの知見は細胞が空間情報を新たに創り出し、多様な形態を導き、その空間情報を細胞間に伝達・共有する仕組みに分子的、理論的な知見をもたらしており、本研究の大目的である空間情報処理機構の階層の一端を明らかにしたと言えます。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Oda Y\*, Nagashima Y, and Fukuda H, Reconstruction of ROP GTPase Domains on the Plasma Membrane in Tobacco Leaves, *Methods Mol Biol*, Vol. 1821, pp. 393-399, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-8612-5\_26. (査読無し)

2. Oda Y\*, Emerging roles of cortical microtubule-membrane interactions, *J Plant Res*, Vol. 131, pp. 5-14, 2018. doi: 10.1007/s10265-017-0995-4. (査読有り)

3. Nagashima Y, Tsugawa S, Mochizuki A, Sasaki T, Fukuda H, and Oda Y\*, A Rho-based reaction-diffusion system governs cell wall patterning in xylem vessels, *Sci Rep*, Vol. 8, pp. 11542, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-29543-y. (査読有り)

4. Fujimoto M, Sazuka T, Oda Y, Kawahigashi H, Wu J, Takanashi H, et al., Transcriptional switch for programmed cell death in pith parenchyma of sorghum stems, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 115, pp. E8783-E8792, 2018. doi: 10.1073/pnas.1807501115. (査読有り)

5. Sasaki T and Oda Y\*, Cortical microtubule dynamics during xylem vessel cell differentiation, *BSJ-Review*, Vol. 9C, pp. 148-154, 2018. DOI: 10.24480/bsj-review.9c5.0014. (和文総説, 査読有り)

6. Sugiyama Y, Wakazaki M, Toyooka K, Fukuda H, and Oda Y\*, A Novel Plasma Membrane-Anchored Protein Regulates Xylem Cell-Wall Deposition through Microtubule-Dependent Lateral Inhibition of

Rho GTPase Domains, *Curr Biol*, Vol. 27, pp. 2522-2528 e2524, 2017. doi: 10.1016/j.cub.2017.06.059. (査読有り)

7. Sasaki T, Fukuda H, and Oda Y\*, CORTICAL MICROTUBULE DISORDERING1 Is Required for Secondary Cell Wall Patterning in Xylem Vessels, *Plant Cell*, Vol. 29, pp. 3123-3139, 2017. doi: 10.1105/tpc.17.00663. (査読有り)

8. Oda Y\*, VND6-induced Xylem Cell Differentiation in Arabidopsis Cell Cultures, *Methods Mol Biol*, Vol. 1544, pp. 67-73, 2017. doi: 10.1007/978-1-4939-6722-3\_6. (査読無し)

9. Vukasinovic N, Oda Y, Pejchar P, Synek L, Pecenkova T, Rawat A, Sekeres J, Potocky M, and Zarsky V\*, Microtubule-dependent targeting of the exocyst complex is necessary for xylem development in Arabidopsis, *New Phytol*, Vol. 213, pp. 1052-1067, 2017. doi: 10.1111/nph.14267. (査読有り)

10. Oda Y\*, Experimental systems for xylem differentiation using Arabidopsis cells, *BSJ-review*, Vol. 7D, pp. 182-188, 2016. DOI: 10.24480/bsj-review.7d6.00094. (査読有り)

〔学会発表〕(計 19 件)

学会発表：発表者、題目、学会名、開催地、発表年月日、一般公演、招待講演等

1. 佐々木武馬, 福田裕穂, 小田祥久「CORTICAL MICROTUBULE DISORDERING1 (CORD1) は木部道管細胞において蓄積する細胞壁の構造を制御する」第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター(札幌), 2018 年 3 月 30 日(一般講演・口頭発表)

2. 杉山友希, 福田裕穂, 小田祥久「IQD13 は微小管と細胞膜に相互作用し、二次細胞壁のパターン形成を制御する」第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター(札幌), 2018 年 3 月 30 日(一般講演・口頭発表)

3. 長島慶宜, 津川暁, 望月敦史, 佐々木武馬, 福田裕穂, 小田祥久「道管の壁孔パターンを制御する ROP GTPase の解析」第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター(札幌), 2018 年 3 月 28 日(一般講演・口頭発表)

4. 小田祥久「道管分化における細胞壁パターン形成」ConBio2017 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会), ConBio2017 神戸ポートアイランド(神戸), 2017 年 12 月 8 日(招待講演)

5. Takema Sasaki, Hiroo Fukuda, Yoshihisa Oda「A novel microtubule-localized protein regulates the structure of xylem vessels」The 1st IROAST Symposium: Plant Cell and Developmental Biology: Approaches to Multiscale Biosystems, Kumamoto University(Kumamoto), 2017 年 11 月 14 日(一般講演・ポスター発表)

6. Yoshihisa Oda「Secondary cell wall patterning in metaxylem vessels」TAIWAN-JAPAN Plant Biology, Academia Sinica (Taipei, Taiwan), 2017 年 11 月 4 日(国際会議招待講演)

7. Yoshihisa Oda「Molecular basis of secondary cell wall patterning」GDRI Integrative Plant Biology "The Developing Plant in its Environment", Lyon (France), 2017 年 10 月 23 日(国際会議招待講演)

8. 長島慶宜, 福田裕穂, 小田祥久「道管において二次細胞壁パターンを制御する協調的な ROP シグナル分子の解析」日本植物学会第 81 回大会, 東京理科大学野田キャンパス(野田), 2017 年 9 月 10 日(一般講演・ポスター発表)

9. 佐々木武馬, 福田裕穂, 小田祥久「表層微小管の脱配向性を促進する新規微小管局在性タンパク質の機能解析」日本植物学会第 81 回大会, 東京理科大学野田キャンパス(野田), 2017 年 9 月 10 日(一般講演・ポスター発表)

10. 小田祥久, 佐々木武馬「新規木部細胞分化誘導系を用いた二次細胞壁パターン制御機構の解析」日本植物学会第 81 回大会, 東京理科大学野田キャンパス(野田), 2017 年 9 月 9 日(一般講演・ポスター発表)

11. 杉山友希, 福田裕穂, 小田祥久「細胞膜ドメインの形を制御する新規の微小管付随タンパク質の解析」日本植物学会第 81 回大会, 東京理科大学野田キャンパス(野田), 2017 年 9 月 8 日(一般講演・口頭発表)

12. 小田祥久「木部道管分化における自律的な細胞壁パターンの形成」MIMS 現象数理学拠点共同研究集会「時空間ダイナミクス～生命現象における時間変化を伴う空間秩序」明治大学中野キャンパス(東京), 2017年6月3日(招待講演)

13. 杉山友希, 若崎眞由美, 佐藤繭子, 豊岡公德, 福田裕穂, 小田祥久「二次細胞壁のパターン形成において細胞膜ドメインの形は新規の細胞膜-微小管付随タンパク質により制御される」第58回日本植物生理学会, 鹿児島大学(鹿児島), 2017年3月18日(一般講演・ポスター発表)

14. 佐々木武馬, 福田裕穂, 小田祥久「シロイヌナズナにおいて道管細胞の構造を制御する新規微小管局在因子の解析」第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学(鹿児島), 2017年3月16日(一般講演・口頭発表)

15. 長島慶宜, 福田裕穂, 小田祥久「道管において壁孔の形成を協調的に制御するROP GTPaseシグナルの解析」第58回日本植物生理学会, 鹿児島大学(鹿児島), 2017年3月16日(一般講演・口頭発表)

16. Yoshihisa Oda「Geometry formation of the immobile plant xylem cell」第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(横浜), 2016年12月1日(招待講演)

17. 佐々木武馬, 松井南, 小田祥久「シロイヌナズナにおいて細胞の形態を制御する転写因子の探索」日本植物学会第80回大会, 那覇(沖縄), 2016年9月18日(一般講演・ポスター発表)

18. Yoshihisa Oda「Dissection and reconstruction of cell-wall patterning machinery」JPR International Symposium: Semi-in-vivo developmental biology, 那覇(沖縄), 2016年9月18日(国際会議招待講演)

19. 小田祥久「木部道管分化にみる細胞の自立的な空間パターン形成」国立遺伝学研究所新分野創造センター創立10周年シンポジウム, 東京大学本郷キャンパス(文京区, 東京都), 2016年8月29日(招待講演)

特許等：発明者、特許名称、出願日、出願番号、出願人

無し

〔図書〕(計0件)

無し

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

無し

取得状況(計0件)

無し

〔その他〕  
ホームページ等

(1)研究分担者

該当無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐々木武馬

ローマ字氏名：( SASAKI, takema )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。