

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15815

研究課題名(和文) 維管束幹細胞運命決定機構の構成生物学的研究

研究課題名(英文) Reconstitution studies on vascular stem cell fate determination

研究代表者

近藤 侑貴 (Kondo, Yuki)

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：70733575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：維管束は物質輸送を担う重要な通道組織系であり、多様な機能的細胞によって構成される。これらの維管束細胞は、共通して維管束幹細胞から作られる。本研究では、維管束分化誘導システム VISUAL とそれを改良した VISUAL-CC を用いて、木部細胞・篩部細胞そして篩部伴細胞を誘導することで、維管束発生過程を構成生物学的な観点から研究を進めた。遺伝学解析から維管束幹細胞の確立に関して、新たに幹細胞形成に働く変異体を単離し原因遺伝子を特定することができた。また、発光顕微鏡を用いた維管束分化誘導過程の1細胞運命定量イメージング技術を開発し、道管分化運命・篩管分化運命の時空間動態の観察に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VISUAL を用いた遺伝学解析から新たに維管束幹細胞形成に関わる遺伝子、そして生理学的解析から幹細胞分化を負に制御する TDIF と正に制御する BR のクロストークを明らかにした。このように本研究は、維管束幹細胞を制御する新規遺伝子やメカニズムの発見につながった。維管束幹細胞制御の理解は、我々人間が素材として利用する木質細胞の性質デザインにつながる可能性がある。引き続き、維管束幹細胞制御の解明を目指すことで低炭素社会の実現に貢献できるような研究を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：Vascular system is essential for material transport throughout the plant body. These diverse vascular cells are commonly generated from vascular stem cells. In this study, we investigated the process of vascular development from the viewpoint of constitutive biology by artificially induce vascular cells using the vascular differentiation induction system VISUAL and its modified version VISUAL-CC. Genetic analysis identified a new mutant that has defect in stem cell formation and its responsible gene was determined. In addition, we developed a single-cell fate quantitative imaging technique using luminescent microscopy during the induction of vascular differentiation, and succeeded in observing the spatiotemporal dynamics of xylem and phloem fates.

研究分野：植物生理学

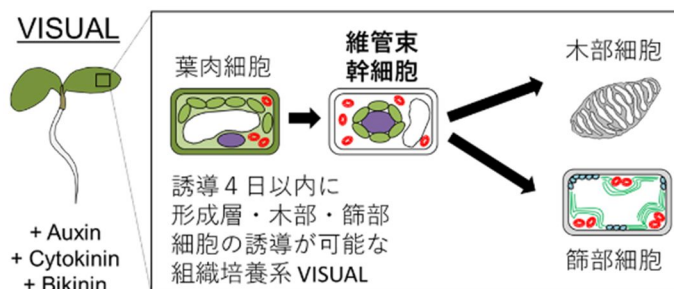
キーワード：維管束 幹細胞 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

分子生物学・遺伝学の進展に伴い、植物発生過程を制御する因子が次々と単離され、その制御機構の理解が進んできた。物質の輸送や環境応答を担う維管束は、木部道管細胞や篩部伴細胞など数多くの機能的細胞から構成され、非常に多面的な役割を果たしている。これら多様な維管束細胞はすべて形成層分裂組織内に存在する維管束幹細胞から作られると考えられている。しかしながら、維管束は植物体内の奥深くに埋め込まれているため、その発生過程においては未だ解明されていない部分が多いのが現状である。

2. 研究の目的

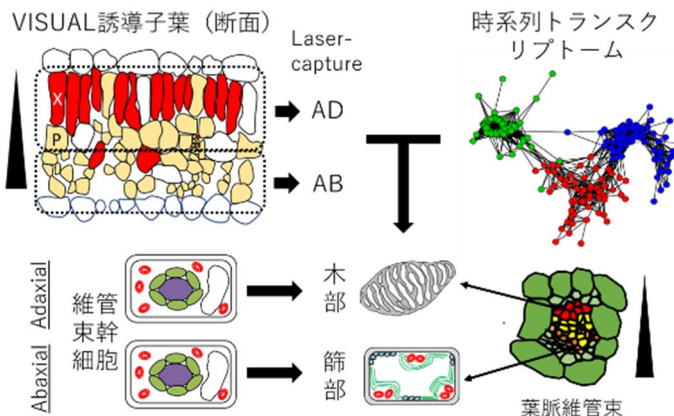
本研究では維管束発生過程を再構成することのできる組織培養系 VISUAL として新規に開発した VISUAL-CC (篩部伴細胞分化誘導系) を駆使して、構成生物学的観点から維管束細胞の運命決定機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。VISUAL においては、オーキシン・サイトカニン・bikinin の化合物を用いて培養をおこなうこと



で、シロイヌナズナ子葉の葉肉細胞を起点に維管束幹細胞が誘導され、その後木部・篩部細胞の分化がおこる(上図)。また VISUAL においては、変異体やマーカーを材料に用いること維管束発生過程の効率の良い分子遺伝学解析が可能である。このような VISUAL の利点を活かし、本研究では 維管束幹細胞がどのように分化運命を決めるのか、篩部前駆細胞はどのように篩部伴細胞へと分化運命を決めるのかといったまだ明らかにされていない部分に着目して研究を進めていく。VISUAL において自在に木部細胞・篩部細胞そして篩部伴細胞を作り、運命を操作することで、維管束発生過程を構成生物学的な観点から研究し、理解を深めていく。

3. 研究の方法

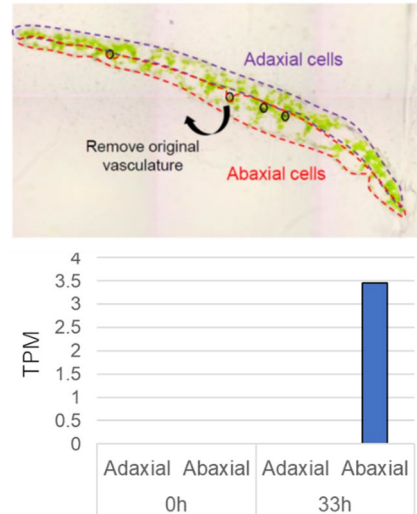
維管束は木部・形成層・篩部組織から構成され、葉の維管束においては木部細胞が Adaxial 側に、篩部細胞が Abaxial 側にそして(前)形成層はそれらの組織の間に規則正しく配置されている。組織透明化を用いた深部イメージング解析から、維管束分化誘導系 VISUAL においても生体内の維管束と同様に Adaxial-Abaxial の位置情報が木部・篩部細胞の運命決定に重要であることを見出してきた。更には Abaxial の位置情報を規定する YABBY3 転写因子が篩部分化に関与する可能性を見出している。そこで本研究提案では、Adaxial-abaxial 情報に依存した幹細胞運命決定機構を更に明らかにするため、Laser-capture-microdissection により VISUAL 誘導時の子葉を Adaxial 側/Abaxial 側にわけて取得し、幹細胞ステージにおける部位特異的トランスクリプトーム解析をおこなった。誘導前と誘導後の Adaxial 側/Abaxial 側の比較解析から幹細胞運命決定に重要な因子の絞り込みを進めた(上図)。



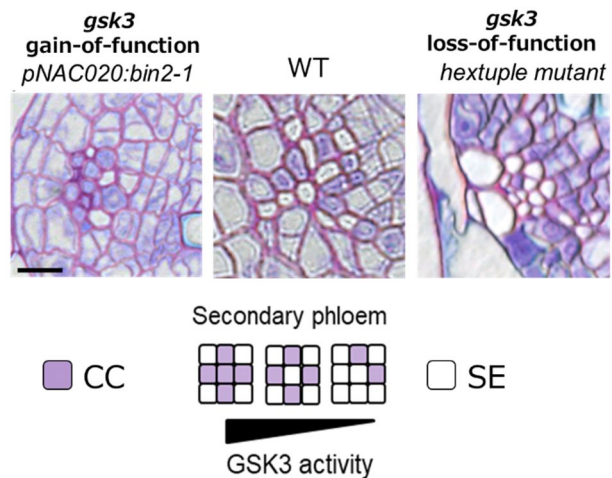
篩部伴細胞は篩要素に隣接し、原形質連絡を介して篩部輸送を助ける働きを持つことが知られている。篩部伴細胞も篩要素と同様に、維管束幹細胞から篩部前駆細胞を経て作られると考えられているが、その発生過程を制御する因子は明らかとなっていない。加えて VISUAL においては篩部伴細胞は誘導されないため、申請者は VISUAL を改変することで維管束幹細胞から篩部伴細胞を新たに誘導することに成功し、この分化系を VISUAL-CC と名付けた。この VISUAL-CC を新たに活用し、篩部前駆細胞から篩部伴細胞と篩要素の分化運命を決定する機構を明らかにするため分化誘導時における比較トランスクリプトーム解析をおこなった。

4. 研究成果

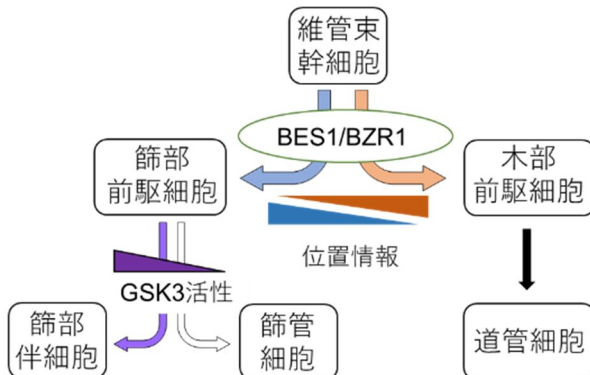
VISUALにおいても葉のAdaxial-Abaxialの位置情報が維管束幹細胞の運命に影響するため、レーザーマイクロダイセクションによりVISUAL誘導後の子葉をAdaxial側とAbaxial側にわけて微小空間トランスクリプトームをおこない、分化誘導時(33時間目)においてAbaxial側でのみ発現する遺伝子を見出した(右図)。この遺伝子はAbaxial側で発現するため、篩部分化に関わる可能性が考えられた。そこで誘導過剰発現株を作製し、VISUAL誘導をおこなったところ、期待どおり維管束幹細胞の運命を篩部細胞へと優先的に変化させることに成功した。現在ゲノム編集を用いて機能欠損変異体の作出を進めている。加えて、さきほどの比較トランスクリプトーム解析の結果からAdaxial側とAbaxial側でサイトカニン応答遺伝子の発現に差があることを見出した。実際に、シロイヌナズナの根における発光レポーターを用いたタイムラプス観察からサイトカニン応答と維管束幹細胞活性化との関連性が見出された。これらの結果から、サイトカニンが維管束幹細胞の分化ポテンシャルと関連している可能性が考えられるため、引き続き研究を進めていく予定である。



VISUALの分化誘導条件を改変することで、篩部伴細胞を誘導することのできるVISUAL-CCを開発し、論文発表(Communication Biology誌)とプレスリリース「細胞の職業選択を決めるスイッチの発見」を公表した。篩要素と篩部伴細胞は共通の前駆細胞から不等分裂を経て作られると考えられているが、この論文においてはこれら2種類の細胞運命とGSK3のキナーゼ活性の間に相関があることを明らかにした。VISUAL-CC誘導条件においては、篩要素はGSK3キナーゼ活性が低い時に形成され、篩部伴細胞はGSK3キナーゼの活性が高い時に形成される傾向が見出された。そこで内生のGSK3活性を強めたり弱めたり操作ができる遺伝学的ツールを作成、形質転換植物を取得し、遺伝学的検証をおこなった。bin2-1変異体を用いてGSK3活性を篩部特異的に強めた場合、胚軸の維管束において篩部伴細胞の割合が増えることが分かり、またGSK3活性が弱まったgsk6重変異体では、篩部伴細胞の割合が減ることが分かった。このことからGSK3活性が篩部分化運命を決定する分子スイッチであることが示唆された(右図)。現在、GSK3がどの因子をターゲットにしているかを生化学、遺伝学解析からさせている。また、VISUAL-CCより篩部伴細胞関連遺伝子群が明らかとなった。特に分化初期マーカーに着目し、プロモーター:ELUCの形質転換株の作成を進めている。今後、作成したマーカーを用いて発光輝度を指標とすることで、更に効率の良い伴細胞誘導系の実現を目指していきたい。また、得られたトランスクリプトームデータから、篩部伴細胞で発現する遺伝子として多くの共受容体が見出された。今後、篩部伴細胞の機能解明もあわせて進めていく。



これら2つの結果をあわせて、現在、維管束幹細胞運命決定において以下の制御モデルを考えている。維管束幹細胞の分化はBES/BZR転写因子によって制御され、それらが木部・篩部細胞へと運命が決定される過程ではAdaxial/Abaxialなどの位置情報が重要であると考えられる。篩部前駆細胞へと運命を決めた細胞はその後、細胞内のGSK3のキナーゼ活性に応じて、篩要素と篩部伴細胞へとそれぞれと分化運命を決めると考えられる(右図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Furuya Tomoyuki, Nishihama Ryuichi, Ishizaki Kimitsune, Kohchi Takayuki, Fukuda Hiroo, Kondo Yuki	4. 巻 39
2. 論文標題 A glycogen synthase kinase 3-like kinase MpGSK regulates cell differentiation in <i>Marchantia polymorpha</i> ;	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 65 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.21.1219a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kondo Yuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Competitive action between Brassinosteroid and tracheary element differentiation inhibitory factor in controlling xylem cell differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 59 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.21.1109a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwase Akira, Kondo Yuki, Laohavisit Anuphon, Takebayashi Arika, Ikeuchi Momoko, Matsuoka Keita, Asahina Masashi, Mitsuda Nobutaka, Shirasu Ken, Fukuda Hiroo, Sugimoto Keiko	4. 巻 232
2. 論文標題 WIND transcription factors orchestrate wound induced callus formation, vascular reconnection and defense response in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 734 ~ 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17594	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furuya Tomoyuki, Saito Masato, Uchimura Haruka, Satake Akiko, Nosaki Shohei, Miyakawa Takuya, Shimadzu Shunji, Yamori Wataru, Tanokura Masaru, Fukuda Hiroo, Kondo Yuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Gene co-expression network analysis identifies BEH3 as a stabilizer of secondary vascular development in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2618 ~ 2636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koab151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuoka Keita, Sato Ryosuke, Matsukura Yuki, Kawajiri Yoshiki, Iino Hiromi, Nozawa Naoyuki, Shibata Kyomi, Kondo Yuki, Satoh Shinobu, Asahina Masashi	4. 巻 4
2. 論文標題 Wound-inducible ANAC071 and ANAC096 transcription factors promote cambial cell formation in incised Arabidopsis flowering stems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01895-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hanano Shigeru, Tomatsu Hajime, Ohnishi Ai, Kobayashi Koichi, Kondo Yuki, Betsuyaku Shigeyuki, Takita Eiji, Ogata Yoshiyuki, Ozawa Keishi, Suda Kunihiro, Hosouchi Tsutomu, Nagase Takahiro, Suzuki Hideyuki, Sakurai Nozomu, Masumoto Hiroshi, Fukuda Hiroo, Shibata Daisuke	4. 巻 23
2. 論文標題 An Artificial Conversion of Roots into Organs with Shoot Stem Characteristics by Inducing Two Transcription Factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101332 ~ 101332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamaki Takayuki, Oya Satoyo, Naito Makiko, Ozawa Yasuko, Furuya Tomoyuki, Saito Masato, Sato Mayuko, Wakazaki Mayumi, Toyooka Kiminori, Fukuda Hiroo, Helariutta Yka, Kondo Yuki	4. 巻 3
2. 論文標題 VISUAL-CC system uncovers the role of GSK3 as an orchestrator of vascular cell type ratio in plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0907-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tomoyuki Furuya, Yuki Kondo
2. 発表標題 Competitive action among BES/BZR transcription factors enables the robust control of vascular stem cells
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤侑貴
2. 発表標題 維管束幹細胞の運命はどのようにして決まるのか？
3. 学会等名 樹木の生態に対するシンクベースの生理的機序からの探求 III (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤侑貴
2. 発表標題 VISUALを用いた維管束細胞運命決定機構の研究
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会 (学会賞講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤良介, 松岡啓太, 遠藤章成, 神長恵太, 柴田恭美, 近藤侑貴, 佐藤忍, 朝比奈雅志
2. 発表標題 異所的な 維管束細胞分化に関するシロイヌナズナANAC及びDOF転写因子の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島津舜治, 古谷朋之, 伊藤(大橋) 恭子, 石崎公庸, 深城英弘, 福田裕穂, 近藤侑貴
2. 発表標題 サイトカイニンによる維管束幹細胞の運命制御
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村美友, 光田展隆, 坂本真吾, 近藤侑貴, 上坂一馬, 高木優, 山篠貴史
2. 発表標題 サイトカイニン情報伝達を介した二次成長誘導機構
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古谷朋之, 山岡尚平, 石崎公庸, 西浜竜一, 荒木崇, 河内孝之, 福田裕穂, 近藤侑貴
2. 発表標題 ゼニゴケにおける植物特異的BZR転写因子の役割
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前原菜穂, 加藤大貴, 酒井友希, 近藤侑貴, 三村徹郎, 深城英弘, 石崎公庸
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるLAX PANICLE2相同遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井友希, 高見英幸, 塚本成幸, 山岡尚平, 近藤侑貴, 深城英弘, 三村徹郎, 石崎公庸
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるR2R3-MYB転写因子SHOTGLASSの機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤侑貴
2. 発表標題 植物の「管」を創って調べる
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤侑貴
2. 発表標題 維管束細胞運命の操作と理解
3. 学会等名 2020年度（第9回）近畿植物学会講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古谷朋之，山岡尚平，石崎公庸，西浜竜一，荒木崇，河内孝之，福田裕穂，近藤侑貴
2. 発表標題 ゼニゴケにおける植物特異的BZR転写因子ファミリーの役割
3. 学会等名 2020年度（第9回）近畿植物学会講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島津舜治，福田裕穂，近藤侑貴
2. 発表標題 維管束幹細胞の運命分岐を生み出す分子基盤の探究
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古谷朋之, 齊藤真人, 内村悠, 佐竹暁子, 野崎翔平, 宮川拓也, 島津舜治, 矢守航, 田之倉優, 福田裕穂, 近藤侑貴
2. 発表標題 BES/BZR転写因子の競争的關係性は維管束幹細胞制御の堅牢性に貢献する
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Kondo
2. 発表標題 GSK3 kinases orchestrate vascular cell type ratio
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 朝比奈雅志, 松岡啓太, 佐藤良介, 天貝綾花, 豊田佑子, 吉田紗斗美, 遠藤章成, 神長恵太, 柴田恭美, 近藤侑貴, 佐藤忍
2. 発表標題 シロイヌナズナ切断花茎の癒合と胚軸間接ぎ木におけるANAC転写因子の機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>細胞の職業選択を決めるスイッチの発見 https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2020_04_22_01.html 植物が持つ高い自己治癒力の仕組みを解明 https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2021_03_22_01.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------