

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570046

研究課題名（和文） 孔辺細胞の背腹性・形態構築を制御する信号伝達系の解明

研究課題名（英文） Signal Transduction Pathway Regulating Dorsal-Ventral Axis Formation in Guard Cells

研究代表者

中川 強 (NAKAGAWA TSUYOSHI)

島根大学・総合科学研究支援センター・教授

研究者番号：30202211

研究成果の概要（和文）：植物の葉の表面には気孔と呼ばれる小さい穴が存在し、光合成における二酸化炭素の取り込む役割を果たしている。気孔は植物の生存、大気環境の維持など、我々の生活にも大きな貢献をしている重要な器官であり、研究対象として興味がつきない。気孔はソラマメの形をした孔辺細胞 2 個が向かい合うことによって形成される。孔辺細胞は最初は一様な形をしているが、発達に伴いソラマメのように曲がってゆき、腹側（曲がった内側）、背側（曲がった外側）の区別がはっきりしてくる。これに伴い、細胞壁の成分や細胞骨格も背と腹で違いが生じる。本研究ではこのような 1 個の細胞における極性（背と腹の違い）を生じさせるタンパク質を発見し、その仕組みの解明を行った。背と腹の違いは、受容体型キナーゼと呼ばれるタンパク質が、まず孔辺細胞の背側の細胞膜にのみ存在することで生じることが明らかになった。また、背側細胞膜にのみ存在するため、特別なタンパク質構造が必要であることも明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Stomata are small pores exist on the surface of leaf in plants. Stomata work for intake of carbon dioxide necessary for photosynthesis from atmosphere. Stomata are important organs for plant growth and maintenance of environment. They are also interesting research targets in plant development. Stomata are formed by oppositely positioned two guard cells. The development of guard cell starts from protodermal cell. During development, guard cell becomes longer and bent outside to make pore. At this stage guard cell obtains dorsal-ventral polarity. According to this polarity, cell wall and cytoskeleton begin to distribute to make specific cell shape. In this study, we found a factor contributing polarity formation and analyzed its function. The polarity of guard cell was firstly established by asymmetric localization of a receptor like kinase on the cell membrane of guard cell. We also found that the specific localization pattern was caused by the kinase domain of the receptor like kinase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学
キーワード：植物ホルモン・成長整理・全能性

1. 研究開始当初の背景

植物の気孔を形成する孔辺細胞は現表皮細胞-メリステモイド母細胞-メリステモイド-孔辺母細胞-孔辺細胞という段階（気孔系譜）を経て発達する。この過程は主に植物の葉の表面でおこるため、観察が容易で、植物細胞の発達を研究する良いモデルとなっている。上記の気孔系譜において、メリステモイド母細胞の運命決定や孔辺母細胞から孔辺細胞への発達については、関与する発現調節因子が単離されその解析が進んでいた。一方、発達段階の最後に孔辺母細胞が分裂してできる孔辺細胞がそれぞれ対称的に形態構築を行う過程、すなわち、孔辺細胞の背腹性（極性）を制御し、それに従った形態構築を行うための遺伝子については何も知られていなかった。そこで、本研究では孔辺細胞の特殊な形づくりに働く遺伝子、特に背腹性を制御する新たな遺伝子の解析を行うことにした。

2. 研究の目的

植物は分裂組織の細胞が分裂し、特殊化して器官を構築してゆく。表皮においては現表皮細胞から表皮細胞や孔辺細胞の分化がおこる。この過程は植物体の表面でおこり、観察が容易である。孔辺細胞では背腹の明確な極性が形成されそれに従った形態構築が進行する。そのため、極性形成の制御と形態構築の細解析に適した細胞であることが考えられた。本研究は、孔辺細胞の形づくりの最初のステップである背腹極性形成を決定する遺伝子を新規に単離し、その働きを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 突然変異処理を行ったシロイヌナズナ集団を材料に用いて、顕微鏡観察により孔辺細胞の形が異常な変異体を探した。その中に、孔辺細胞が正常に湾曲しなかったり、前後・左右の長さの比が異常になった変異体が見つかった。本突然変異体について孔辺細胞の細胞骨格の状態、孔辺細胞開閉における細胞運動方向などの解析を行った結果、孔辺細胞の極性制御が異常になっていると考えられた。次いで原因遺伝子のマッピングと探索を行った。その結果発見された遺伝子について発現部位、局在部位、相互作用因子の解析を進めた。

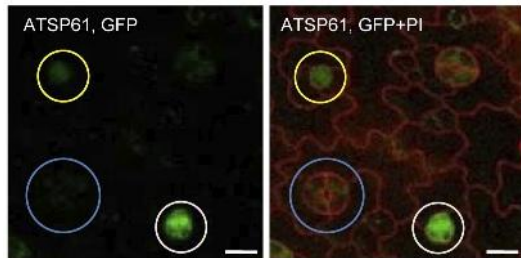
(2) 取得された原因遺伝子が受容体型キナーゼをコードしていたことから、信号伝達に関与する因子として、この受容体型キナーゼが受容する因子（リガンド）の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 孔辺細胞の極性が異常になったと考えられた突然変異体の原因遺伝子は受容体型キナーゼを作るためのものであった。受容体型キナーゼは細胞膜に局在し、細胞外部からの信号を受け取り、細胞内でタンパク質リン酸化を行うことで情報を伝達する性質を持つ。植物にはいくつかのタイプの受容体型キナーゼが存在しているが、本突然変異の原因遺伝子は植物で最も多く存在するタイプの受容体型キナーゼであった。このグループには、植物の発達制御に関わる遺伝子が数多く見出されており、本受容体型キナーゼも細胞の発達を制御する働きを持つと期待された。本受容体型キナーゼ遺伝子と GFP 緑色蛍光タンパク質の融合体を植物に導入し、発現部位と細胞内局在を調べた。その結果、本受容体型キナーゼは孔辺細胞の前駆細胞（メリステモイド、孔辺母細胞）の時期にのみ発現し、またその細胞膜に局在していることがわかった。この局在部位は、将来の孔辺細胞の背側に相当する領域であった。一方、孔辺母細胞が分裂した後の分裂面（将来の孔辺細胞の腹側）には局在することはなかった。このことから、この受容体型キナーゼが将来の背側から何らかの信号を発することで背側が決定され、背腹極性が形成されることが示された。さらに、分裂面（将来の腹側）に局在しない仕組みとして、キナーゼ領域の構造が必要であることもわかった。以上のことより、この受容体型キナーゼが将来を将来の背側にのみ局在することで、背腹極性が生み出されていることが考えられ、植物細胞の形づくりのユニークな仕組みが見えてきた。

(2) 原因遺伝子として受容体型キナーゼが発見されたことから、信号の発信元である受容因子（リガンド）についても探索を進めた。本受容体型キナーゼと同タイプのものには、低分子分泌タンパク質をリガンドとして発達制御に関わっている者が多い。そこで本受容体型キナーゼのリガンドも低分子量分泌タンパク質であると仮定し、シロイヌナズナゲノム情報より低分子分泌タンパク質遺伝子を探索し、約 150 個についてプロモーター：レポーター遺伝子を構築した。それらをシロイヌナズナに遺伝子導入し、それぞれの低分子分泌タンパク質遺伝子の発現部位を解析した。本受容体型キナーゼのリガンドと考えられる孔辺細胞前駆体で発現するものも含め数多くの低分子分泌タンパク質遺伝子の発現パターンを明らかにすることができた。図は低分子量分泌タンパク質 ATSP61

プロモーターを GFP に連結した遺伝子を導入したシロイヌナズナ葉の観察結果である。孔辺母細胞 (黄色の円) が緑色の蛍光を発しており、ATSP61 が孔辺母細胞の段階で発現する低分子分泌タンパク質であることがわかった。



(3) 受容体型キナーゼは細胞内のリン酸化部位で標的タンパク質をリン酸化することで信号を伝達する。そこで本受容体型キナーゼの標的タンパク質を探索するために、酵母2-ハイブリッド法、共沈殿法、リン酸化タンパク質プロテオーム解析を行った。

酵母2-ハイブリッド法はDNA結合ドメインと転写活性化ドメインにそれぞれタンパク質を融合して同時発現させ、もしそれぞれのタンパク質が結合すればDNA結合ドメインと転写活性化ドメインが接近してレポーター遺伝子の転写が起こる、という方法である。本研究では受容体型キナーゼタンパク質のキナーゼ部分をおとりに用いて相互作用する遺伝子の探索を行った。その結果、翻訳慎重因子の部分配列が特異的に相互作用していたが、生物学的な意義のない相互作用であると判断した。共沈殿実験においては、本受容体型キナーゼと複合体を形成して共沈殿するタンパク質がいくつか見出されたが、同定には到らなかった。リン酸化タンパク質プロテオーム解析では、野生型と突然変異体から総タンパク質を抽出し、リン酸化タンパク質アフィニティーカラムでリン酸化されているタンパク質を調製した。それぞれ別種の蛍光標識を行い、混合後に2次元電気泳動で分離して、タンパク質スポットの蛍光を比較した。突然変異体で蛍光が消失しているスポット、即ち突然変異体でリン酸化状態が低下しているタンパク質がいくつか同定されたが、それらはグルタチオンSトランスフェラーゼなど、極性形成には関与しないと考えられるものであった。

(4) 上記解析に必要な植物形質転換システムの開発を行った。本システムにより種々プロモーター、cDNA、レポーターを自在にクローニングし、植物に導入することが可能となった。遺伝子破壊株や一度遺伝子導入が行われている植物にさらに遺伝子導入を行うため、種々のマーカーのベクターシリーズを揃えた。また分割レポーターを利用した相互作

用解析用ベクターも構築した。開発を行ったシステムについての総説も出版し、普及に務めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Nakamura, S., Suzuki, T., Kawamukai, M. and Nakagawa, T.: Expression analysis of *Arabidopsis thaliana* small secreted protein genes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76: 436-446 (2012)
- ② Hino, T., Tanaka, Y., Kawamukai, M., Nishimura, K., Mano, S. and Nakagawa, T.: Two Sec13 homologs, AtSec13A and AtSec13B, redundantly contribute to the formation of COPII transport vesicle in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75: 1848-1852 (2011)
- ③ Tanaka, Y., Nakamura, S., Kawamukai, M., Koizumi, N., Nakagawa, T.: Development of a series of Gateway binary vectors possessing a tunicamycin resistance gene as a marker for the transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75: 804-807 (2011)
- ④ Nakamura, S., Mano, S., Tanaka, Y., Ohnishi, M., Nakamori, C., Araki, M., Niwa, T., Nishimura, M., Kaminaka, H., Nakagawa, T., Sato, Y. and Ishiguro, S.: Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene bar, as a selection marker for plant transformation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74:

- 1315-1319 (2010)
- ⑤ Nakamura, S., Nakao, A., Kawamukai, M., Kimura, T., Ishiguro, S. and Nakagawa, T.: Development of Gateway binary vectors, R4LpGWBs, for promoter analysis in higher plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73: 2556-2559 (2009)
- ⑥ Nakagawa, T., Ishiguro, S. and Kimura, T.: Gateway vectors for plant transformation. *Plant Biotechnology*, 26: 275-284 (2009)

〔学会発表〕(計7件)

- ① Nakao, A., Shibahara, K., Kato, K., Tachiki, K., Kimura T., Nakagawa, T.: Recycling vector system for multi-gene construct - Stable expression of multi-gene in plant cells-. 第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月14日 (パシフィコ横浜)
- ② 中尾彰秀、加藤 晃、立木賢輔、木村哲哉、中川 強:植物形質転換用リサイクルベクターシステムの開発. 日本農芸化学会2011年度大会. 2011年3月5日(大会講演要旨集)
- ③ 田中優史、中村真也、真野昌二、大西真人、川向 誠、佐藤 豊、石黒澄衛、小泉 望、中川 強:ピアラフォス、ツニカマイシン選択が可能な植物形質転換用 Gateway バイナリベクターシリーズの開発. 日本農芸化学会2011年度大会. 2011年3月5日(大会講演要旨集)
- ④ 田中優史、中村真也、真野昌二、大西真人、佐藤 豊、石黒澄衛、中川 強:ピアラフォス耐性遺伝子(bar)をもった植物形質転換用 Gateway バイナリベクターの開発. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月8日(神戸ポートアイランド)
- ⑤ 中村真也、川向 誠、中川 強:植物の気孔形成に働く受容体型キナーゼ信号伝達系の解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月12日(神戸ポートアイランド)
- ⑥ 中尾彰秀、中村真也、川向 誠、木村哲哉、中川 強:植物用2遺伝子クロニングシステムの開発と利用. 日本農芸化学会2010年度大会. 2010年3月29日(東京大学)

- ⑦ 中村真也、川向 誠、中川 強:植物の気孔形成に働く受容体型キナーゼ信号伝達系の解析. 第32回日本分子生物学会. 2009年12月12日(パシフィコ横浜)

〔図書〕(計2件)

- ① Tanaka, Y., Kimura, T., Hikino, K., Goto, S., Nishimura, M., Mano, S. and Nakagawa, T.: Gateway vectors for plant genetic engineering: Overview of plant vectors, application for Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) and multigene construction. Genetic Engineering, ed. Hugo A. Barrera-Saldana. Intech Open Access Publisher, 35-58 (2011) (ISBN 978-953-307-790-1)
- ② 中村真也、中川 強:植物ベクター開発への応用「Gateway を用いた遺伝子導入マニュアル」(今本文男編) Springer Japan, pp61-73 (2009)

〔その他〕

ホームページ等

<http://shimane-u.org/nakagawa/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 強 (NAKAGAWA TSUYOSHI)

島根大学・総合科学研究支援センター・教授
研究者番号: 30202211

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: