

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23227001

研究課題名(和文) 維管束幹細胞の発生運命制御機構の解明

研究課題名(英文) Studies on regulation of developmental fates of plant vascular stem cells

研究代表者

福田 裕穂 (FUKUDA, HIROO)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：10165293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 165,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は維管束メリステムの組織構築機構を明らかにすることを目的に、維管束幹細胞の維持、維管束幹細胞の成立、維管束幹細胞からの木部細胞分化の3つの観点から解析した。その結果、維管束幹細胞維持を支配するTDIFペプチドの細胞内シグナル伝達系の全体像、2つのbHLH型転写因子のヘテロダイマーによる維管束幹細胞の分裂制御機構、木部分化開始時の細胞膜の非対称性を作り出す分子機構などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In meristems, stem cells proliferate to maintain their number and differentiate into specific cells. In this study we aimed at understanding the regulation of vascular stem cell fates. First, we succeeded in revealing a novel glycogen synthase 3 kinase-dependent intracellular signaling pathway downstream of TDIF peptide signal, which functions in suppression of xylem differentiation. Secondly, we found a stem cell regulation mechanism in which a heterodimer of bHLH transcription factors promotes stem cell proliferation through induction of cytokinin biosynthesis-related genes. Finally, we demonstrated a mechanism in which asymmetric plasma membrane structure in developing xylem cells is produced by spontaneously activated small G protein and microtubules. This asymmetric plasma membrane structure plays a role in patterned secondary wall formation.

研究分野：植物生理学

キーワード：成長生理 植物 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

植物における組織構築は茎頂、根端、維管束メリステムにより行われる。メリステム内では固有の幹細胞が分裂し、自らを維持しながら、同時に他の細胞へと分化する。この幹細胞における増殖と分化のバランスがメリステムにおける無限の組織構築を支えているが、そのしくみは明らかになっていなかった。そうした中で、私たちは、TDIF ペプチド-TDR 受容体キナーゼのシグナルが、維管束幹細胞の分裂を促進するとともに、そこからの木部分化を阻害するという2つのプロセスを同時に制御していることを明らかにした。また、LHW 転写因子が維管束幹細胞の形成に必要であることを見いだした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物成長の鍵となる植物メリステムの組織構築機構を、維管束幹細胞の発生運命制御の解明を通して明らかにすることにある。特に、すでに私たちが発見した TDIF-TDR シグナル伝達と LHW 転写因子を対象に、その働きと制御システムを解析し、維管束幹細胞の発生運命の制御を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、この維管束幹細胞の発生運命の制御機構を、(1) 維管束幹細胞の維持機構、(2) 維管束幹細胞の成立の分子機構、(3) 維管束幹細胞からの木部道管分化機構の3つに分けて解析した。

4. 研究成果

(1) 維管束幹細胞の維持機構

TDIF-TDR のシグナル伝達経路を解析した。

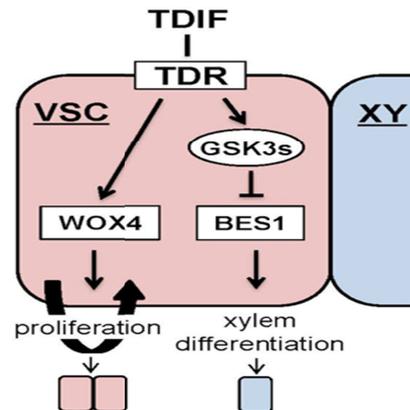
酵母ツーハイブリッド法を用いて、TDR と結合するシロイヌナズナタンパク質の探索を行い、GSK3s の1種 BIN2 を見いだした。

TDR とシロイヌナズナ 10 種の GSK3 タンパク質との結合を調べ、6 種のタンパク質が TDR と結合をすることを明らかにした。

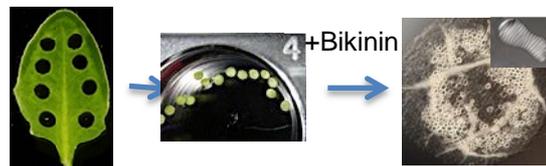
4 重、6 重変異体を作成して表現型解析を行い、GSK3 タンパク質は冗長的に TDIF-TDR シグナルを伝達していること、本経路は維管束幹細胞からの木部分化阻害のみに働き、

分裂経路とは独立であることが示された。

下流因子の探索を行い、BES1 転写因子が GSK3 の下流因子であることを明らかにした。以上の結果をまとめ下図のモデルを提唱した。



植物 GSK3 キナーゼの特異的阻害剤である bikinin を用いて、人為的に木部分化を高頻度かつ同調的に誘導できる leaf disk 系の開発に成功した(下図)。



さらに高効率かつ安定的な培養系の開発を試みた結果、leaf disk の代わりに子葉を用いる分化系の開発に成功し、Vascular Cell Induction Culture System Using Arabidopsis Leaves (VISUAL) と名付けた。これにより、実生致死の変異体へも本実験系が適用可能となった。

新たに作成した培養を用いて、マイクロアレイ解析を行い、維管束幹細胞分化初期に発現する様々な遺伝子を同定した。その詳細な解析により、この実験系では、木部だけでなく篩部の分化も誘導されることが明らかとなった。

WOX4 ターゲット候補遺伝子について、マイクロアレイおよびチップシーケンス解析を行い探索した。その結果、多くの候補遺伝子が明らかになった。

(2) 維管束幹細胞の成立の分子機構

維管束幹細胞の成立の解明に向けて、bHLH 型の転写因子 LHW および TMO5/T5L1 の機能解析を行った。

LHW の欠損型変異体および LHW の過剰発現植物におけるオーキシン関連遺伝子 (*MP*, *PIN1*, *AiHB8*) の発現解析を行い、LHW がこれらの遺伝子の発現を上昇させることを明らかにした。LHW の欠損型変異体の初期胚では維管束幹細胞数が減少することが明らかとなった。その他の結果も総合し、仮説を提出した。LHW はオーキシンシグナルの上流で機能し、胚形成初期にオーキシン運河化を誘導する。その結果としてオーキシンの流れに沿った維管束幹細胞が形成される。

詳細な解析から、LHWはTMO5あるいはそのホモログであるT5L1とヘテロダイマーを形成し、幹細胞の形成に働くことが明らかとなった。そこで、これら2つの遺伝子を同時に誘導できるシロイヌナズナ培養系を作出し、これを用いて2つの転写因子に誘導される遺伝子群を明らかにした。

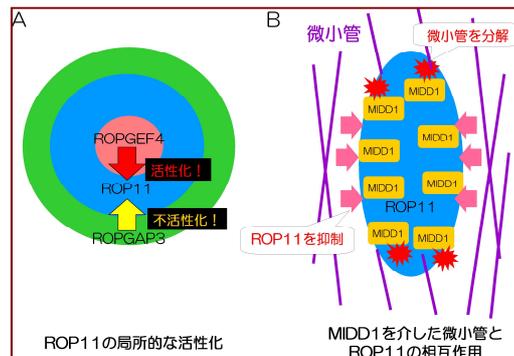
維管束幹細胞維持の観点からLHW-T5L1ヘテロダイマーの働きを解析した。その結果、LHWとT5L1は木部前駆細胞で発現し、この両者の発現の結果、サイトカイニン合成の鍵酵素遺伝子*LOG3, 4*の発現を木部前駆細胞で誘導することが明らかになった。合成されたサイトカイニンは周辺の維管束幹細胞の分裂を誘導する。一方で、木部前駆細胞は自らがサイトカイニンシグナルの抑制因子を合成することで、分裂が起きない状態に保たれた。

LHW-T5L1シグナル伝達の制御過程を解析したところ、以下のネガティブフィードバック機構が明らかになった。LHW-T5L1は*ACL5*の遺伝子発現を通して、サーモスペルミン合成を促進する。サーモスペルミدينは*SACL3*の翻訳を促進する。*SACL3*はLHWヘテロダイマーを形成することで、LHW-T5L1機能を抑制する。

(3) 維管束幹細胞からの木部道管分化機構

木部分化過程初期の分子機構について、VND6 発現木部分化誘導系を用いて、分化初期の形態形成制御に関係する遺伝子 MIDD1 を同定した。MIDD1 タンパク質を指標として植物細胞内での極性をもった構造の構築原理を解析した。この際、様々なタンパク質を導入して、その *in vivo* での働きを調査するた

めの再構築系を開発した。解析の結果、ROP11 (small G タンパク質)の自発的な活性化と活性化 ROP11 による MIDD1 タンパク質のリクルートが局所的な細胞膜上の非対称性を生じさせること、この MIDD1 によるキネシン 13A のリクルートが局所的な微小管破壊を引き起こし、これが木部細胞壁のパターンを作り出すことが明らかとなった (下図)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計34件)(全て査読有)

Katayama, H., Iwamoto, K., Kariya, Y., Asakawa, T., Kan, T., Fukuda, H., and Ohashi-Ito, K: A negative feedback loop controlling bHLH complexes is involved in vascular cell division and differentiation in the root apical meristem. **Curr. Biol.** 25: 3144-50, 2015.

DOI: 10.1016/j.cub.2015.10.051.

Oda, Y., Iida, Y., Ebine, K., Ueda, T., and Fukuda, H.: Novel coiled-coil proteins regulate exocyst association with cortical microtubules in xylem cells via conserved oligomeric Golgi-complex 2 protein. **Plant Cell Physiol.** 56: 277-286, 2015.

DOI: 10.1093/pcp/pcu197

Kondo, Y., Fujita, T., Sugiyama, M., and Fukuda, H.: A novel system for xylem cell differentiation in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Plant** 8: 612-621, 2015.

DOI: 10.1093/mp/ssu122

Kondo, Y. and Fukuda, H.: The TDIF signaling network. **Curr. Opin. Plant Biol.** 28: 106-110, 2015.

DOI: 10.1016/j.pbi.2015.10.002

Kondo, Y., Ito, T., Nakagami, H., Hirakawa,

- Y., Saito, M., Tamaki, T., Shirasu, K., and Fukuda, H.: Plant GSK3s regulate stem cell differentiation downstream of TDIF-TDR signalling. **Nature Com.** 5: e4505, 2014.
DOI:10.1038/ncomms4504
- Ohashi-Ito, K., Saegusa, M., Iwamoto, K., Oda, Y., Katayama, H., Kojima, M., Sakakibara, H., and Fukuda, H.: A bHLH complex activates vascular cell division via cytokinin action in root apical meristem. **Curr. Biol.** 24: 2053-2058, 2014.
DOI: 10.1016/j.cub.2014.07.050
- Endo, S., Betsuyaku, S., and Fukuda, H.: Endogenous peptide ligand-receptor systems for diverse signaling networks in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** 21C: 140-146, 2014.
DOI: 10.1016/j.pbi.2014.07.011
- Naramoto, S., Otegui, M.S., Kutsuna, N., de Rycke, R., Dainobu, T., Karampelias, M., Fujimoto, M., Feraru, E., Miki, D., Fukuda, H., Nakano, A., and Friml, J.: Insights into the localization and function of the membrane trafficking regulator GNOM ARF-GEF at the Golgi apparatus in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 26: 3062-3076, 2014.
DOI: 10.1105/tpc.114.125880
- Naramoto, S., Nodzynski, T., Dainobu, T., Takatsuka, H., Okada, T., Friml, J., and Fukuda, H.: *VAN4* encodes a putative TRS120 that is required for normal cell growth and vein development in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiol.** 55: 750-763, 2014.
DOI: 10.1093/pcp/pcu01
- Araya, T., Miyamoto, M., Wibowo, J., Suzuki, A., Kojima, S., Tsuchiya, Y.N., Sawa, S., Fukuda, H., von Wirén, N., and Takahashi, H.: CLE-CLAVATA1 peptide- receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 111: 2029-2034, 2014.
DOI:10.1073/pnas.13199531
- Tamaki, T., Betsuyaku, S., Fujiwara, M., Fukao, Y., Fukuda, H., and Sawa, S.: SUPPRESSOR OF LLP1 1-mediated C-terminal processing is critical for CLE19 peptide activity. **Plant J.** 76:970-981, 2013.
DOI: 10.1111/tpj.12349
- Oda, Y. and Fukuda, H.: Rho of plant GTPase signaling regulates the behavior of *Arabidopsis* Kinesin-13A to establish secondary cell wall patterns. **Plant Cell** 25: 4439-4450, 2013. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.117853>
- Endo, S., Shinohara, H., Matsubayashi, Y., and Fukuda, H.: A novel pollen-pistil interaction conferring high temperature tolerance during reproduction via CLE45 signaling. **Curr Biol.** 23: 1670-1676, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.06.060>
- Oda, Y. and Fukuda, H.: Spatial organization of xylem cell walls by ROP GTPases and microtubule-associated proteins. **Curr. Opin. Plant Biol.** 16: 743-748, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2013.10.010>
- Ohashi-Ito, K., Matsukawa, M., and Fukuda, H.: An atypical bHLH transcription factor regulates early xylem development downstream of auxin. **Plant Cell Physiol.** 54: 398-405, 2013.
DOI: 10.1093/pcp/pct013
- Ohashi-Ito, K., Obuchi, M., Kojima, M., Sakakibara, H., and Fukuda, H.: Auxin-associated initiation of vascular cell differentiation by LONESOME HIGHWAY. **Development** 140: 765-769, 2013.
DOI: 10.1242/dev.087924
- Oda, Y. and Fukuda, H.: Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. **Science** 337: 1333-1336, 2012.
DOI: 10.1126/science.1222597
- Oda, Y. and Fukuda, H.: Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. **Curr. Opin. Plant Biol.** 15: 38-44, 2012.
DOI: 10.1016/j.pbi.2011.10.005
- Yaginuma, H., Hirakawa, Y., Kondo, Y., Ohashi-Ito, K., and Fukuda, H.: A novel function of TDIF-related peptides: Promotion of axillary bud formation. **Plant Cell Physiol.** 52: 1354-1364, 2011.
DOI: 10.1093/pcp/pcr081

その他 15 件

[学会発表] (計 157 件)

Fukuda, H.: Signaling that regulates stem cell fates in plants. ICAR 2016 Korea, Gyeongju, Korea, June 30-July 3, 2016.

(基調講演)

Fukuda, H.: Intracellular signaling governing vascular stem cell fates. Plenary symposium "Plant Signaling", American Society of Plant Biology Annual Meeting, Portland, Oregon, USA, July 12-17, 2014.

(基調講演)

Fukuda, H.: Plant vascular stem cell fates are controlled by GSK3s downstream of the TDIF peptide-TDR signaling. IPGSA, Symposium in 21th International Conference on Plant Growth Substances, Shanghai, China, June 20, 2013.

(基調講演)

Fukuda, H.: Regulation of microtubule organization directing spatial patterning of wall assembly during xylem cell formation in *Arabidopsis*, Gordon Conference "Plant & Microbial Cytoskeleton", Proctor Academy, Andover, NH, USA, August 12-17, 2012.

(招待講演)

Fukuda, H.: Vascular stem cell fates controlled by small peptides, The Croucher Advanced Study Institute Symposium "Frontier in Cell Biology Research", The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, January 4-6, 2012.

(基調講演)

その他、国際学会 31 件、国内学会 121 件

[図書] (計 2 件)

福田裕穂、稲田のりこ (編): スーパーバイオマス 植物に学ぶ、植物を活かす、慶應義塾大学出版会、pp.159, 2016.

ISBN : 978-4-7664-2303-7

Fukuda, H. (ed.): "Plant cell wall patterning and cell shape", Wiley-Blackwell publishing. pp.415, 2014.

[その他]

主な報道発表

2012 年 10 月 5 日 科学新聞「植物細胞の形を決める遺伝子を発見：東大」

2012 年 9 月 18 日 日経産業新聞「植物の形を左右、東大、4 遺伝子特定、バイオ燃料開発に応用」

2012 年 9 月 18 日 日本経済新聞「東京大学、植物細胞の形を決める 4 遺伝子 (Science & Tech フラッシュ)」

2012 年 9 月 18 日 朝日新聞 夕刊 2 ページ「歯ごたえ・食感は私次第 東大、植物細胞の形を決める遺伝子発見」

2012 年 9 月 17 日 日本経済新聞電子版ニュース「細胞の形を決める遺伝子発見 東大」

2012 年 9 月 14 日 化学工業日報「東大、植物細胞の形を決める 4 つの遺伝子を発見」

2012 年 9 月 14 日 日刊工業新聞「東大、植物の細胞壁形状に関する 4 遺伝子を特定」

2012 年 9 月 14 日 午前 5 時 NHK ニュース「植物細胞壁の形 東大研究班 “4 遺伝子で決まる” 植物資源開発に期待」

主な一般向け講演

2012 年 3 月 29 日 「道管の科学から植物の体づくりのしくみを解く」東大理学部 高校生のための春休み講座 2012

受賞

紫綬褒章(平成 24 年 11 月 3 日)

ホームページ

<http://www.riken.go.jp/eng/JINJI/000712.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

福田裕穂 (FUKUDA, Hiroo)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：10165293

(2) 連携研究者

伊藤(大橋)恭子 (OHASHI-ITO, Kyoko)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：90451830