

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440128

研究課題名(和文) RopGTPaseと表層微小管の自己組織化に着目した細胞形態形成の基本原理の解析

研究課題名(英文) Self-organization of ROP GTPases and cortical microtubules in plant cell morphogenesis

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物の形態形成は細胞壁による個々の細胞の形態制御に大きく依存しています。本研究課題では壁孔を伴って二次細胞壁を沈着する木部道管をモデルとして、ROP GTPaseおよび表層微小管の相互作用が細胞壁の沈着を空間的に制御する仕組みを明らかにしようとしてきました。その結果MIDD1がKinesin-13AやBDR1を介して表層微小管と排他的に作用していること、表層微小管がVETH-COG2複合体を介して細胞壁成分を輸送している可能性が示されました。これらの因子のファミリーは道管以外の組織でも発現しており、植物の形態形成の理解にも貢献すると期待されます。

研究成果の概要(英文)：Plant development largely depends on well-organized cell walls which determines the shape of each plant cell. I focused on how plant cortical microtubules and ROP GTPases spatially interact each other to determine the deposition pattern of cell walls in xylem vessels cells. I revealed that ROP GTPases mutually inhibit cortical microtubules through MIDD1-Kinesin-13A complex and possibly through BDR1, a novel protein of unknown function. I also found that VETH1 may mediate membrane trafficking of cell wall components along cortical microtubules. These findings may contribute to our further understanding of plant and plant cell morphogenesis.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：表層微小管 木部道管分化 二次細胞壁 低分子量GTPase

1. 研究開始当初の背景

植物の体は細胞壁で覆われた細胞が積み重なるようにして作られています。個々の細胞の形は細胞壁に大きく依存しており、個々の細胞の形態制御が植物の体全体の形を決める上で重要です。植物細胞は吸水により膨張するように成長しますが、細胞壁の主成分であるセルロース微繊維が細胞の“タガ”となって細胞伸張を抑制し、細胞が決まった形になります。このセルロース微繊維の沈着を制御するのが細胞膜直下に並ぶ表層微小管ですが、表層微小管の並び方を時空間的に制御する分子的な仕組みはほとんど分かっていませんでした。先行研究では低分子量 GTPase である ROP GTPase が局所的に細胞骨格や細胞膜輸送経路を制御すること、また表層微小管が様々な微小管付随タンパク質により制御されていること、表層微小管同士の相互作用により微小管の並びがある程度制御されていることなどが報告されていました。しかしながら表層微小管の並び方や ROP GTPase の活性化が、細胞形態形成の最も初期の段階でどのようにして細胞内で時間的、空間的に制御され、細胞の形態を決定してゆくのかという問題はほとんど明らかになっていませんでした。研究代表者は木部道管分化において局所的に ROP GTPase が活性化し、微小管付随タンパク質 MIDD1 を介して表層微小管と排他的に作用することにより、二次細胞壁の沈着パターンを自発的に決定していることを明らかにしました (Oda and Fukuda, 2012)。この現象を詳しく解析することにより、ROP GTPase と表層微小管がどのようにして細胞壁、さらには植物の形態を制御しているのか明らかにできると考えられました。

2. 研究の目的

本研究課題では、木部道管分化で働く ROP GTPase や MIDD1 といった細胞骨格制御因子に着目し、細胞が自律的に形態形成を実現する仕組みを明らかにすることを目的としました。特に、MIDD1 がどのようにして表層微小管に作用するのか、表層微小管がどのようにして ROP GTPase シグナルに影響するのか、どのようにして ROP GTPase と表層微小管が排他的に相互作用するのかという問題にフォーカスし、さらにこの仕組みがどのように植物全体の形作りに寄与しているのか明らかにすることを目指しました。

3. 研究の方法

主な手法として、研究代表者が開発した *in vitro* での道管分化誘導系 (Oda et al. 2010) を用いました。この実験系はシロイヌナズナの培養細胞に転写因子 VND6 を一過的に発現させることにより、全ての細胞を強制的に道管細胞へと分化させる実験系です。この実験系を用いたトランスクリプトーム解析より、道管分化に特異的な新規の遺伝子群を同定し、その中から MIDD1 や ROP GTPase と関連の

ある遺伝子を探しました。候補となった遺伝子は培養細胞を用いて細胞内の局在を調べるとともに RNAi 法を用いてその機能を検証しました。ROP GTPase や MIDD1 とそのタンパク質間相互作用には BiFC 法、および FRET 法を用いました。これには培養細胞に加え、一過的な遺伝子発現が容易なタバコ (*N. benthamiana*) も用いました。さらに、植物での機能を明らかにするためにシロイヌナズナ (*A. thaliana*) Col-0 系統を用いて、RNAi 法による遺伝子発現抑制、T-DNA 挿入変異体による遺伝子破壊、過剰発現による形質変化を調べました。冗長性があると考えられた遺伝子に関しては多重変異系統を作出することにより、その機能を調べました。

4. 研究成果

MIDD1 の微小管に対する作用を明らかにするために、MIDD1 と道管細胞内で共局在するタンパク質を探索した結果、Kinesin-13A を同定しました。Kinesin-13A は MIDD1 と同様に、壁孔 (二次細胞壁が沈着しない領域) 内の表層微小管にのみ局在し、微小管の先端部に顕著に蓄積していました。BiFC 法によって MIDD1 との相互作用を検証した結果、Kinesin-13A と壁孔において局所的に MIDD1 と相互作用している様子が観察されました。Kinesin-13A の役割を明らかにするために培養細胞に kinesin-13A の RNAi を導入した結果、壁孔が顕著に小さくなりました。Kinesin-13A のシロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体を入手して観察したところ、培養細胞と同様に壁孔が小さくなっており、逆に Kinesin-13A を過剰発現すると壁孔が大きくなりました。これらのことから Kinesin-13A は MIDD1 とともに壁孔の形成に寄与することが分かりました。微小管に対する作用を明らかにするために GST を付加したりコンビナントタンパク質を精製し、*in vitro* で微小管と反応させました。その結果、ATP 依存的に微小管を脱重合する活性があることがわかりました。一方、MIDD1 にはそのような活性はありませんでした。MIDD1 と Kinesin-13A との関連をより詳細に明らかにするために、培養細胞にこれらの遺伝子を単独あるいは共発現させました。その結果、Kinesin-13A は MIDD1 に依存的に表層微小管にアクセスし、表層微小管を脱重合していることが分かりました (Oda and Fukuda 2013)。

Kinesin-13A の探索をしている間に、微小管の先端に局在する新規のタンパク質 VETH1 および VETH2 を発見しました。これらのタンパク質は小胞様の丸い構造に局在し、表層微小管の先端部に局在するだけでなく、表層微小管上を移動している様子も観察されました。相互作用データベースを用いて相互作用因子を探索したところ、COG2 (Conserved Oligomeric Golgi2) タンパク質が候補因子として見つかりました。BiFC 法により COG2 が VETH1 および VETH2 と相互作用することが分

かりました。さらに、これらのタンパク質は細胞膜輸送経路を制御する exocyst 複合体のサブユニット Exo70A1 と共局在することがわかりました。重要なことに Exo70A1 は VETH および COG2 に依存して表層微小管に局在することがわかりました。Exo70A1 の変異体を調べたところ壁孔が小さく、異常な形態になっていたことから、VETH1、VETH2 および COG2 は Exo70A を介して表層微小管に沿って細胞壁成分を運ぶ膜輸送経路を制御している可能性が示唆されました (Oda et al. 2015)。

木部道管細胞において ROP GTPase と関連する因子を探索した結果、壁孔に局在する機能未知遺伝子 BDR1 を候補として同定しました。BiFC 法により BDR1 が活性型の ROP GTPase と相互作用する ROP エフェクタータンパク質であることが示されました。興味深いことに BDR1 は壁孔の縁に顕著に局在していました。このことから、BDR1 は活性型 ROP11 と表層微小管の境界領域に局在し、両者の排他的な相互作用を媒介している可能性が考えられました。

これらの新規因子の解析に加え、局所的な ROP GTPase の活性化を ROP エフェクターを用いて観測しました。その結果、道管分化時に de novo に ROP GTPase の活性化領域が出現することを見出しました。ROP GTPase は道管以外でも様々な細胞で局所的に活性化し、表層微小管を制御していると考えられています。また、MIDD1 や Kinesin-13A、VETH1、BDR1 あるいはそのファミリーの遺伝子は木部道管以外の組織でも発現していることから、本研究で得られた知見は道管分化のみならず、植物全体でどのように ROP GTPase の活性化が制御され、表層微小管と相互作用しているかを考える重要な手がかりとなり、植物の形態形成の理解に貢献すると期待されます。

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 12 件)

1. Oda, Y. (2015) Cortical microtubule rearrangements and cell wall patterning. *Front. Plant Sci.* 6: 236. 査読有り
doi.org/10.3389/fpls.2015.00236
2. Oda, Y. (2015) Cortical microtubule rearrangements and cell wall patterning. *Front. Plant Sci.* 6: 236. 査読有り
doi.org/10.3389/fpls.2015.00236
3. Oda, Y., Iida, Y., Nagashima, Y., Sugiyama, Y., and Fukuda, H. (2015) Novel coiled-coil proteins regulate exocyst association with cortical microtubules in xylem cells via the Conserved Oligomeric Golgi-complex 2 protein. *Plant Cell Physiol.* 56: 277-286. 査読有り
4. Ohashi-Ito, K., Saegusa, M., Iwamoto, K., Oda,

Y., Katayama, H., Kojima, M., Sakakibara, H., and Fukuda, H. (2014) A bHLH Complex Activates Vascular Cell Division via Cytokinin Action in Root Apical Meristem. *Curr. Biol.* 24: 2053-2058. 査読有り

5. Oda, Y., and Fukuda, H. (2014) Emerging roles of small GTPases in secondary cell wall development. *Front. Plant Sci.* 5: 428 査読有り
doi.org/10.3389/fpls.2014.00428

6. Oda, Y., and Fukuda, H. (2013) The dynamic interplay of plasma membrane domains and cortical microtubules in secondary cell wall patterning. *Front. Plant Sci.* 4: 511. 査読有り
doi.org/10.3389/fpls.2013.00511

7. Oda, Y., and Fukuda, H. (2013) Rho of Plant GTPase signaling regulates the behavior of Arabidopsis Kinesin-13A to establish secondary cell wall patterns. *Plant Cell* 25: 4439-4450. 査読有り

8. Oda, Y., and Fukuda, H. (2013) Spatial organization of xylem cell walls by ROP GTPases and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 743-748. 査読有り

9. 小田祥久 (2014) 細胞膜ドメインの再構築. *細胞工学* Vol.33 No.6 査読無し

10. 小田祥久, 福田裕穂 (2013) 二次細胞壁パターンの制御機構. *化学と生物* vol 51, No.12 795-801. 査読有り

11. 小田祥久, 福田裕穂 (2013) 二次細胞壁のパターン形成を支配する分子機構. *Cellu. Commu*, 20: 125-129. 査読無し

12. 小田祥久, 福田裕穂 (2013) 二次細胞壁パターン形成のイメージング解析. *Plant Morph.* 25: 45-50. 査読有り

[学会発表] (計 27 件)

1. 二次細胞壁パターンの獲得における新規微小管付随タンパク質の機能解析
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
第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年 3 月 19 日 岩手大学、盛岡、岩手
2. 道管において二次細胞壁パターンを協調的に制御する ROP GTPase シグナルの解析
長島 慶宜, 福田 裕穂, 小田 祥久
第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年 3 月 18 日 岩手大学、盛岡、岩手
3. Two-dimensional microtubule organization in plant xylem cells
Yoshihisa Oda
NIG International Symposium 2016 "Quantitative Biology: force, information and dynamics: X factors shaping living systems" 2016 年 1 月 12 日 Mishima, Japan
4. Cortical microtubule patterning in xylem cells
Yoshihisa Oda
Biochemistry and Molecular Biology 2015 (BMB2015) 2015 年 12 月 4 日 Port Island, Kobe, Japan

5. Molecular basis of plant cell wall patterning: a Rho GTPase-driven symmetry breaking in the two-dimensional microtubule organization

Yoshihisa Oda

iCeMS International Symposium Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter 2015年9月26日 Kyoto University, Kyoto, Japan

6. Spontaneous pattern formation of Rho GTPase in xylem vessel cells

Yoshinobu Nagashima, Hiroo Fukuda, Yoshihisa Oda

iCeMS International Symposium Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter 2015年9月24日 Kyoto University, Kyoto, Japan

7. 表層微小管の動態制御に基いた二次細胞壁の空間構築

杉山友希, 福田裕穂, 小田祥久

日本植物学会第79回大会 2015年9月8日 朱鷺メッセ、新潟市

8. 道管において壁孔の空間配置を制御する ROP GTPase シグナルの解析

長島慶宜, 福田裕穂, 小田祥久

日本植物学会第79回大会 2015年9月8日 朱鷺メッセ、新潟市

9. 木部道管への片道切符: 細胞壁の不可逆的な機能転換

小田祥久, 長島慶宜, 杉山友希, 佐々木武馬, 福田裕穂

日本植物学会第79回大会 2015年9月6日 朱鷺メッセ、新潟市

10. Secondary cell wall patterning in metaxylem vessels

Yoshihisa Oda

The 26th International Conference on Arabidopsis Research 2015年7月5日 Palais Des Congress, Paris, France

11. Secondary cell wall patterning in metaxylem vessels

Yoshihisa Oda

Front Lines of Plant Cell Wall Research 2015年3月20日 Todaiji temple Culture Center, Nara

12. 二次細胞壁パターン形成の理解に向けた新規微小管付随タンパク質の解析

杉山友希, 福田裕穂, 小田祥久

第56回 日本植物生理学会年会 2015年3月16日 東京農業大学世田谷キャンパス、世田谷区

13. 道管の二次細胞壁パターンを制御する新規 ROP エフェクターの解析

長島慶宜, 福田裕穂, 小田祥久

第56回 日本植物生理学会年会 2015年3月16日 東京農業大学世田谷キャンパス、世田谷区

14. Novel Coiled-Coil Proteins Regulate Exocyst Association with Cortical Microtubules in Xylem Cells

Yoshihisa Oda, Yuki Iida, Yoshinobu Nagashima,

Yuki Sugiyama, Hiroo Fukuda,

第56回 日本植物生理学会年会 2015年3月15日 東京農業大学世田谷キャンパス、世田谷区

15. The molecular basis of secondary cell wall patterns: Dynamic interplay of Rho GTPase and cortical cytoskeleton

Yoshihisa Oda, Yoshinobu Nagashima, Yuki Sugiyama, Hiroo Fukuda

Naito Conference "Molecule-based biological systems" 2014年10月9日 Gateaux kingdom SAPPORO, Sapporo, Hokkaido

16. 植物細胞のライブセルイメージング ~ 細胞内空間シグナルの実体を追う ~

小田祥久

日本植物学会年会第78回大会 2014年9月13日 川崎市, 明治大学生田キャンパス

17. 二次細胞壁のパターン構築を制御する新規微小管付随タンパク質の同定

杉山友希, 福田裕穂, 小田祥久

日本植物学会第78回大会 2014年9月12日 川崎市, 明治大学生田キャンパス

18. 道管の二次細胞壁パターンを制御する新規 ROP シグナル因子の解析

長島慶宜, 福田裕穂, 小田祥久

日本植物学会第78回大会 2014年9月12日 川崎市, 明治大学生田キャンパス

19. Live cell imaging of xylem differentiation: dissecting the molecular basis of secondary cell wall patterning

Yoshihisa Oda

International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium 2014 "Plant Live-Cell Imaging and Microdevices" 2014年9月9日 Nagoya, Nagoya University

20. A novel actin microfilament-binding protein mediates spatial interaction between cortical microtubules and ROP GTPases in xylem cell wall patterning

Yuki Sugiyama, Hiroo Fukuda, Yoshihisa Oda Gordon Research Conference (Plant & Microbial Cytoskeleton 2014) 2014年8月10日 Andover, NH, USA

21. Self-organization of cell wall patterns through the Rho GTPase-cortical microtubule interplay

Yoshihisa Oda

EMBO/ESF Conference "Cell polarity and membrane trafficking" 2014年5月12日 Polonia Castle (Dom Polonii), Pułtusk, Poland

22. 道管分化における新規壁孔局在因子の解析

長島慶宜, 小田祥久, 福田裕穂

第55回 日本植物生理学会年会 2014年3月19日 富山市, 富山大学

23. 細胞壁パターンを導く空間シグナルの動態

小田祥久, 長島慶宜, 杉山友希, 福田裕穂

第55回 日本植物生理学会年会 2014年3月18日 富山市, 富山大学

24. 二次細胞壁形成時に機能する新規微小管付随タンパク質の同定
杉山友希, 小田祥久, 福田裕穂
第55回 日本植物生理学会年会 2014年3月18日 富山市、富山大学
25. WOX4 導入シロイヌナズナ培養細胞系を用いた WOX4 下流因子の探索
玉置貴之, 小田祥久, 福田裕穂
日本植物学会第77回大会 2013年9月13日 札幌市、北海道大学札幌キャンパス
26. Secondary cell wall patterning by Rop- and microtubule-driven symmetry breaking
小田祥久, 福田裕穂
日本植物学会第77回大会 2013年9月13日 札幌市、北海道大学札幌キャンパス
27. Initiation of Cell Wall Pattern by a Rho GTPase- and Microtubule-Driven Symmetry Breaking
小田祥久, 福田裕穂
第46回日本発生生物学会 2013年5月18日 島根, くにびきメッセ

[図書] (計1件)

1. Oda, Y., and Fukuda, H. (2014) Xylem cell wall pattern formation regulated by microtubule-associated proteins and ROP GTPases. The Plant Cell Wall Pattern and Cell Shape. 1st ed, by Hiroo Fukuda, Chapter 7: 191-214, Wiley.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<https://www.nig.ac.jp/labs/CellDyna/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

一・准教授

研究者番号： 30583257

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：