

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：14603

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24114002

研究課題名(和文)オミクス解析による細胞外情報処理空間構築の統合的理解

研究課題名(英文)Comprehensive omics analysis of plant cell wall formation

研究代表者

出村 拓 (DEMURA, Taku)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：40272009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 96,000,000円

研究成果の概要(和文)：道管分化のマスター転写因子VND7の下流で展開する二次細胞壁形成、および、プロトプラストからの細胞壁再生について、オミクス解析を行った。トランスクリプトーム/メタボローム解析により、二次細胞壁形成時に一次代謝経路の活性化が起こること、プロテオーム解析により、リグニン合成とペクチン分解に関連する酵素タンパク質の蓄積量が大きく変動すること、細胞壁再生過程のトランスクリプトーム解析からは、KOR2タンパク質の一次細胞壁再生への関与を示した。さらに、ヒメツリガネゴケのVND7遺伝子ホモログ(VNS遺伝子群)が、通水細胞ハイドロイドと支持細胞ステライドの細胞分化を制御することを示した。

研究成果の概要(英文)：We performed a series of omics analyses on plant cell wall formation. Transcriptome/metabolome analysis revealed that the primary metabolism is strongly activated during secondary cell wall formation. Also, proteome analysis showed that the amount of several enzymes related to lignin biosynthesis and pectin degradation is drastically changed during secondary cell wall formation. On the analysis of primary cell wall formation, we established a system in which primary cell wall regeneration is induced from protoplasts of Arabidopsis cultured cells and mesophyll cells, using which we showed that KORRIGAN2 protein is closely associated with primary cell wall regeneration through transcriptome analysis and mutant analysis. Furthermore, we succeeded in indicating that in a moss plant, Physcomitrella patens, differentiation of water conducting cells (hydrioids) and supporting cells (stereids) is positively controlled by VNS genes, P. patens homologues of VND7.

研究分野：植物生理学、植物分子生物学

キーワード：細胞壁形成 道管 転写ネットワーク シロイヌナズナ ヒメツリガネゴケ オミクス解析 ハイドロイド ステライド

1. 研究開始当初の背景

本新学術領域「植物細胞壁の情報処理システム(植物細胞壁機能)」が理解しようとする「植物細胞壁の情報処理システム」の主な舞台である細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン、リグニン、構造タンパク質などを含む超構造の高分子化合物であり、その構成は植物の種類、発生過程、細胞の種類によって大きく異なる。多くの植物細胞は薄く伸展性のある一次細胞壁をもつ。一方で維管束木部組織などの一部の細胞は一次細胞壁の内側に特殊化した厚い二次細胞壁をもつ。研究開始当初までの研究から、一次細胞壁と二次細胞壁の個々の細胞壁成分の生合成に関わる酵素等の遺伝子が相次いで見出され、細胞壁形成メカニズムの理解は急速に深まりつつあった。しかしながら、細胞ごとに多様化した細胞壁の構築がどのように統御されているかについては、ごく一部の細胞における遺伝子発現(転写)ネットワークが明らかにされてきた以外はほとんどわかっていなかった。

申請者らはトランスクリプトーム解析と逆遺伝学的解析を中心に、維管束木部の道管と繊維細胞の二次細胞壁の形成を制御する転写ネットワークの解明に取り組んできた。その結果、この転写ネットワークではごく少数のマスター転写因子が複数の下流の転写因子を介して間接的に、あるいは直接的に、細胞壁成分の生合成に関わる遺伝子の発現を制御していることを明らかにした(Caño-Delgado et al., 2010)。しかしながら、この転写ネットワーク全体を統御するシステムの理解には至っていなかった。本研究ではこういった研究成果を活かしつつ、プロテオームとメタボロームをも対象とした統合的なオミクス解析を取り入れることで、植物細胞壁における情報処理システムの構築機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究ではまず、道管分化のマスター転写因子である VND7 (Kubo et al., 2005) の下流で展開する二次細胞壁形成について、転写ネットワークの調和システムをオミクス解析により明らかにする。また、一次細胞壁形成のメカニズムを明らかにする。とくに、プロトプラストからの細胞壁再生過程のオミクス解析を行い、一次細胞壁形成のマスター転写因子を同定するとともに、マスター転写因子を起点とした転写ネットワークとその調和システムを明らかにする。さらに、上記の細胞壁形成システムが進化的にどのように変化・保存されてきたのかをコケ植物から大型被子植物(樹木)までの幅広い植物を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 二次細胞壁形成のオミクス解析

道管分化のマスター転写因子である VND7

の下流で展開する二次細胞壁形成システムをオミクス解析により明らかにする。とくに VND7 など転写因子のリン酸化のメカニズムと機能を明らかにする。また、二次細胞壁形成の制御過程における、プロテオーム・メタボローム解析を行う。研究材料として主に、VND7 の転写活性を薬剤(DEX、デキサメタゾン)依存的に誘導することで、高頻度で二次細胞壁形成を誘導できる形質転換タバコ BY-2 培養細胞を用いる(Yamaguchi et al., 2010)。

(2) 一次細胞壁形成のオミクス解析

一次細胞壁形成のメカニズムを明らかにする。とくに、プロトプラストからの細胞壁再生過程のオミクス解析を行い、一次細胞壁形成のマスター転写因子を同定するとともに、マスター転写因子を起点とした転写ネットワークとその調和システムを明らかにする。また、プロトプラストへの一過的遺伝子導入による in vitro 培養系を確立し、遺伝子機能解析に供する。研究材料としてはシロイヌナズナに加えて、タバコ BY-2 も用いる。

(3) 細胞壁形成転写ネットワークの進化

細胞壁形成のシステムの進化を理解する。上記の研究成果をもとに、コケ植物から大型被子植物(樹木)までの幅広い植物を用いて、細胞壁形成の転写ネットワークがどのように進化したかを明らかにする。コケ植物としてヒメツリガネゴケ、ゼニゴケ、オオミズゴケ、シダ植物としてイヌカタヒバとリチャードミズウラビ、裸子植物としてスプルスとテダマツ、単子葉植物としてイネとブラキポディウム、双子葉植物としてタバコとミヤコグサ、大型被子植物(樹木)としてポプラとユーカリ、を対象とする。まずは二次細胞壁形成のマスター転写因子 VND7 ホモログの機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 二次細胞壁形成のオミクス解析

道管分化のマスター転写因子である VND7 の下流で展開する二次細胞壁形成について、転写ネットワークの調和システムの解析に取り組んだ。まず、VND7 がタンパク質分解による活性・安定性制御を受けている可能性について解析し、VND7 の活性制御にリン酸化が関与すること、そして、その VND7 のリン酸化に MAP キナーゼが関与することを示唆するデータを得た。また、VND7 タンパク質が S-ニトロシル化修飾を受けることを明らかにした。

また、二次細胞壁形成の制御過程における、プロテオーム解析を行った。まず、二次元電気泳動法によるプロテオーム解析を行い、形質転換タバコ BY-2 において、二次細胞壁形成の誘導直後から多数のタンパク質種の蓄積量が大きく変動することを示した。さらに、経時的な定量的プロテオーム解析を行い、二

次細胞壁の主要成分であるリグニンの生合成関連酵素の蓄積量がダイナミックに変化することを明らかにした。また、二次細胞壁形成と同時に一次細胞壁の部分的な分解が起こることが知られているが、この現象に関わると予想されるペクチン分解関連酵素の蓄積が確認された。加えて、メルボルン大学との共同研究として、エンドメンブレン画分のプロテオーム解析手法の確立を進めるとともに、プロテオームデータの統計解析手法を確立した。

二次細胞壁形成過程におけるメタボローム解析として、熱分解 GC-MS、NMR、TG/DTA 解析、糖鎖分析のシステムを構築した。さらに、理化学研究所・平井優美博士らとの共同研究として、700 種程度の代謝産物が検出可能なワイドターゲット解析を行った。その結果、定量的データが得られた合計 490 の代謝産物のうち 128 の代謝産物の蓄積量が二次細胞壁形成誘導処理によって変動することを明らかにした。とくに、道管分化の初期に glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) が速やかに減少すること、分化が進むと Phe や Arg などのアミノ酸が蓄積することを見出すとともに、これらの変化が関連酵素遺伝子の転写レベルでの制御と相関していることを示し、道管分化の過程で一次代謝が積極的に調節されていることを明らかにした (Ohtani et al., 2016; Li et al., 2016)。

また、VND7 活性誘導による二次細胞壁形成が可能なシロイヌナズナ T-87 培養細胞形質転換株を確立し、詳細な経時的トランスクリプトーム解析を行うとともに、バイオインフォマティクスによる VND7 下流の転写ネットワークの推定を行い、Gaussian Graphical Models (GGM) と Dynamic Bayesian Networks (DBN) が有効であることを示した。

さらに、VND7 活性の誘導によって異所的な道管細胞分化を誘導できるシロイヌナズナ (Yamaguchi et al., 2010) を用いて、二次細胞壁形成時のセルロース合成コンプレックスの動態を追跡し、一次細胞壁形成時と比較して、その密度が高く、移動速度 (セルロース合成の速度に相当) も速いことが示された (Watanabe et al., 2015)。

(2) 一次細胞壁形成のオミクス解析

一次細胞壁形成のメカニズムを解析するためのモデルとして、プロトプラストが一次細胞壁を再生する過程をモデルとした解析を行った。まず、シロイヌナズナ T-87 培養細胞のプロトプラストが一次細胞壁を再生する過程をカルコフロー染色等によって詳細に観察した。その結果、一次細胞壁の再生開始直後にパッチ上のセルロース生合成が起こり、その後、繊維状のセルロース生合成に変化し、4 日間後にはプロトプラスト化を行う前のレベルまでセルロース量が回復することを明らかにした。続いて、この過程のトランスクリプトーム解析を行った。当初、一

次細胞壁成分 (セルロース、ヘミセルロース、ペクチン) の生合成酵素遺伝子の発現上昇を予想したが、予想とは異なり、数多くの細胞壁成分の分解酵素遺伝子の発現が強く抑制されることを見出した。このことは、通常の細胞では一次細胞壁の活発な合成と分解が同時に起こっており、プロトプラスト化によって一次細胞壁が失われた場合、一次細胞壁の分解を抑制することで、細胞壁の再生を進めている可能性が示唆された。さらに、このトランスクリプトーム解析の結果から、セルロース生合成に関与することが知られている グルカナーゼ/セルラーゼ KORRIGAN のアイソザイムである KOR2 をコードする KOR2 遺伝子の発現が一次細胞壁再生時に上昇することを見出した。そこで、kor2 遺伝子変異体を用いて、本葉の葉肉細胞由来のプロトプラストからの一次細胞壁再生を詳細に観察したところ、kor2 変異体の葉肉細胞由来のプロトプラストでは一次細胞壁の再生が遅れる傾向があることがわかり、KOR2 の一次細胞壁形成への関与が示唆された。

また、原形質分離した細胞におけるプロトプラストの一次細胞壁再生について詳細に観察したところ、プロトプラストと元々の一次細胞壁を繋ぐように形成される繊維状構造であるヘクチアンストランドが残っているとき、プロトプラストの一次細胞壁再生は起こらず、ヘクチアンストランドをフェムト秒レーザーなどで人為的に切断することにより一次細胞壁の再生が開始されることを細川陽一郎教授 (奈良先端科学大学院大学) との共同研究で見出した。

さらに、セルロース合成酵素などの一次細胞壁関連遺伝子の発現を制御するマスター遺伝子の探索を行い、一次細胞壁形成で機能するセルロース合成酵素活性サブユニット CesA 遺伝子群と共発現する ERF 転写因子遺伝子群を見出し、それらの機能解析を行った。その結果、ERF34、ERF35、ERF38、ERF39 の 4 遺伝子が一次細胞壁 CesA 遺伝子の発現を正に制御する機能を持つことを明らかにした。

(3) 細胞壁形成転写ネットワークの進化

細胞壁形成システムの進化の理解を目的として、コケ植物のヒメツリガネゴケとオオミズゴケ、裸子植物のテーダマツを対象にした発生進化学的研究を進めた。ヒメツリガネゴケを用いた研究では、VND7 のヒメツリガネゴケホモログ (VNS1 ~ VNS8) のうち、VNS1、VND4、VNS6、VNS7 が通水細胞として機能するハイドロイド (道束) と支持細胞として機能するステライドの分化を制御することを見出した (Xu et al., 2014)。また、VNS 遺伝子はいずれも、ヒメツリガネゴケにおいてプログラム細胞死を強く誘導する能力を持つことが分かり、VND7 の祖先遺伝子は植物進化の初期にプログラム細胞死の制御機能を持っていたことが示唆された (Xu et

al., 2014)。また、ハイドロイドの通水機能には、隣り合った細胞間の細胞壁分解が必要であることが予想されるが、この細胞壁分解に特定のポリガラクトンナーゼ遺伝子が機能することを見出した。

さらに、オオミズゴケを用いた研究では、オオミズゴケのVND7ホモログ遺伝子がオオミズゴケにおいて水の貯蔵（吸水、補水）機能を持つ死細胞である透明細胞の分化過程で発現する可能性を示した。また、透明細胞の分化過程における遺伝子発現の網羅的解析のために、茎葉体の未成熟器官由来のプロトプラストをガラスキャピラリーを用いて1つずつ分離してからの1細胞トランスクリプトーム（RNA-seq）解析技術を開発し、発現レベルが統計的に有意に変化する多数の遺伝子を見出すことに成功した。

また、テーダマツを用いた解析から、VND7のテーダマツホモログが、裸子植物の通水細胞である仮道管の細胞分化を制御することが示唆された。

これらの結果から、VND7 遺伝子とそのホモログ遺伝子を核とした細胞壁形成の転写ネットワークが進化の過程で保存されてきたことが示された。

<参考文献>

Caño-Delgado et al. (2010) *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 605.
Kubo et al. (2005) *Genes Dev.* 19, 1855.
Li et al. (2016) *Plant Physiol.* 172, 1334.
Ohtani et al. (2016) *Plant Physiol.* 172, 1612.
Watanabe et al. (2015) *Science* 350, 198.
Xu et al. (2014) *Science* 343, 1505.
Yamaguchi et al. (2010) *Plant Physiol.* 153, 906

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42件）

Ohtani, M., Akiyoshi, N., Takenaka, Y., Demura, T. (2017) Evolution of plant conducting cells: perspectives from key regulators of vascular cell differentiation. *J. Exp. Bot.* 68, 17–26 査読有

DOI: 10.1093/jxb/erw473

Ohtani, M., Morisaki, K., Sawada, Y., Sano, R., Uy, A.L.T., Yamamoto, A., Kurata, T., Nakano, Y., Suzuki, S., Matsuda, M., Hasunuma, T., Hirai, M.Y., Demura, T. (2016) Primary metabolism during biosynthesis of secondary wall polymers of protoxylem vessel elements. *Plant Physiol.* 172, 1612–1624 査読有

DOI: 10.1104/pp.16.01230

Li, Z., Omranian, N., Neumetzler, L., Wang, T., Herter, T., Usade, B., Demura, T., Giavalisco, P., Nikoloski, Z., Persson, S. (2016) A transcriptional and metabolic framework for

secondary wall formation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 172, 1334–1351 査読有

DOI: 10.1104/pp.16.01100

Rejab, N.A., Nakano, Y., Yoneda, A., Ohtani, M., Demura, T. (2015) Possible contribution of TED6 and TED7, secondary cell wall-related membrane proteins, to evolution of tracheary element in angiosperm lineage. *Plant Biotechnol.* 32, 343–347 査読有

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.0826a

Watanabe, Y., Meents, M.J., Mcdonell, L., Barkwill, S., Sampathkumar, A., Cartwrights, H., Demura, T., Ehrhardt, D., Samuels, L., Mansfield, S. (2015) Visualization of Cellulose Synthases in Arabidopsis Secondary Cell Walls. *Science* 350, 198–203 査読有

DOI: 10.1126/science.aac7446

Yamaguchi, M., Nagahage, I.S.P., Ohtani, M., Ishikawa, T., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M., Demura, T. (2015) Arabidopsis NAC domain proteins VND-INTERACTING1 and ANAC103 interact with multiple NAC domain proteins. *Plant Biotechnol.* 32, 119–123 査読有

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.0208a

Endo, H. 他 11 名、11 番目 (2015) Multiple classes of transcription factors regulate the expression of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, a master switch of xylem vessel differentiation. *Plant Cell Physiol.* 56, 242–254 査読有

DOI: 10.1093/pcp/pcu134

Schuetz, M., Benske, A., Smith, R.A., Watanabe, Y., Tobimatsu, Y., Ralph, J., Demura, T., Ellis, B., Samuels, L. (2014) Laccases Direct Lignification in the Discrete Secondary Cell Wall Domains of Protoxylem. *Plant Physiol.* 166, 798–807 査読有

DOI: 10.1104/pp.114.245597

Xu, B. 他 16 名、16 番目 (2014) Contribution of NAC Transcription Factors to Plant Adaptation to Land. *Science* 343, 1505–1508 査読有

DOI: 10.1126/science.1248417

Demura, T. (2014) Tracheary element differentiation. *Plant Biotechnol. Rep.* 8, 17–21 査読有

DOI: 10.1007/s11816-013-0293-0

出村拓、大谷美沙都、日本農芸化学会「化学と生物」、セミナー室・植物細胞壁の情報処理システム「植物細胞壁：細胞壁形成の設計図、転写制御機構」、2015、Vol. 53, No 5, 313–318 査読有

DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.53.313

Goué, N., Mortimer, J.C., Nakano, Y., Zhang, A., Josserand, M., Ohtani, M., Dupree, P., Kakegawa, K., Demura, T. (2013) Secondary cell wall characterization in a BY-2 inductive system. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 115, 223–232 査読有

DOI: 10.1007/s11240-013-0354-7

Nakano, Y., Nishikubo, N., Sato-Izawa, K., Mase, K., Kitano, K., Kajita, S., Demura, T.,

Katayama, Y. (2013) Transcription profiling identifies candidate genes for secondary cell wall formation and hydroxycinnamoyl-arabinoxylan biosynthesis in the rice internode. *Plant Biotechnol.* 30, 433-446 査読有
DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.0620a
他 2 9 件

〔学会発表〕(計 160 件)

出村拓、「植物細胞壁形成におけるメカノバイオロジー」日本植物学会第 80 回大会シンポジウム「植物独自のメカノバイオロジー」2016 年 9 月 18 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

Demura, T. “Regulation of secondary cell wall formation/patterning during differentiation of xylem vessel elements” XIV Cell Wall Meeting, 2016 年 6 月 13 日, Chania (ギリシャ)

Demura, T. “Transcriptional regulation during primary and secondary cell wall formation” 11th International Congress of Plant Molecular Biology, 2015 年 10 月 29 日, Iguazú Falls(ブラジル)

出村拓、「植物細胞壁を構築するための遺伝的プログラム」第 67 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「作って壊して～植物は細胞壁で考える～」2015 年 6 月 30 日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Demura, T. “Transcriptional switches controlling wood cell fates” 35th New Phytologist Symposium, 2015 年 6 月 17 日, Boston (アメリカ合衆国)

Demura, T. “Transcriptional Regulation of Cellulose Synthase” OIST mini symposium “Unraveling the mysteries of cellulose: From biosynthesis & biological diversity to biomaterials”, 2015 年 4 月 21 日, 沖縄科学技術大学院大学(沖縄県・恩納村)

出村拓、「スーパー樹木の創出 - 遺伝子組換え育種とゲノム育種の行方 - 」BioJapan 2016 主催者セミナー「地球温暖化防止の切り札：樹木のバイオテクノロジー」2014 年 10 月 15 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

平成 28 年度他 30 件

平成 27 年度他 33 件

平成 26 年度他 45 件

平成 25 年度他 25 件

平成 24 年度他 20 件

〔図書〕(計 2 件)

大谷美沙都, 出村拓 (2015) セルロース系バイオマスの生産に向けた GM 早生樹木の研究開発「セルロースナノファイバーの調製、分散・複合化と製品応用」株式会社技術情報協会出版

Ohtani, M., Nakano, Y., Sano, R., Kurata, T., Demura, T. (2017) Chapter 6. Toxic Substances in *Jatropha* Seeds and Biosynthesis of Phorbol Esters, the Most Problematic Toxic Compounds

in *The Jatropha Genome* ed. Tsuchimoto T, Springer, ISBN 978-3-319-49651-1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出村 拓 (DEMURA Taku)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：40272009

(2) 研究分担者

倉田 哲也 (KURATA Tetsuya)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任准教授

研究者番号：50360540

(3) 連携研究者

米田 新 (YONEDA Arata)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50553715

(4) 連携研究者

山口 雅利 (YAMAGUCHI Masatoshi)

埼玉大学大学院・理工学研究科・准教授

研究者番号：20373376

(5) 連携研究者

檜本 悟史 (NARAMOTO Satoshi)

東北大学大学院・生命科学研究科・助教

研究者番号：30612022