

## 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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2012

課題番号：19060009

研究課題名（和文）

情報統御分子の伝搬器官としての維管束系の分化

研究課題名（英文）

Development of vascular bundles as a center of the signaling transport

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

研究成果の概要（和文）：

私たちは、これまでに維管束の形成に関わる様々な因子を単離同定してきた。本研究においては、これら因子の生体内での機能と因子間の相互作用を分子レベルで明らかにすることにより、維管束メリステムの機能と形成の制御機構を明らかにすることを目指した。研究は、(1) CLE ペプチド細胞間シグナルによる維管束メリステム形成制御、(2) 転写因子による維管束分化制御、(3) 細胞内の空間制御による維管束パターン制御、の3つの大きなテーマに分けて行われた。その結果、(1) については複数の CLE ペプチドを介した維管束メリステム形成にいたる細胞間のシグナル伝達機構と細胞内伝達機構の一端が明らかになった。同時に、同一のペプチドが維管束メリステム形成だけでなく、花芽メリステムの形成にも関与するというメリステムの共通性に関わるしくみが明らかになった。(2) については、後生木部道管形成のマスター遺伝子である VND6 による転写制御機構が明らかになるとともに、維管束分化の初期に関与する bHLH 遺伝子のオーキシンを介した制御機構が明らかとなった。(3) については、道管分化における細胞内輸送系と細胞骨格をそれぞれ制御する新規因子が同定された。これらのアプローチにより、維管束メリステムの根幹をなす維管束幹細胞の発生運命が、篩部に由来する細胞間シグナル伝達に始まり、細胞内での受容体カイネース、細胞内キナーゼさらには特異的な転写因子にシグナルが伝達されて制御されるという道筋が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We have identified various factors involved in vascular tissue formation. In this study, we attempted to understand the function of these factors and their interrelationship at a molecular level, in view of following three aspects: (1) Regulation of vascular meristem formation by intercellular CLE peptides, (2) Regulation of vascular tissue formation by transcription factors, (3) Regulation of vascular pattern formation by spatial control of subcellular components. As a result, (1) we found intercellular and intracellular signaling pathways of CLE peptides regulating vascular meristem formation. In addition, we also indicated that TDIF functions in not only vascular but also axillary meristem formation. (2) Machinery of transcriptional regulation by VND6 via the TERE sequence was uncovered. Moreover, it was shown that bHLH transcription factors act at the initiation of vascular differentiation probably by inducing auxin transport. (3) We identified VAN3-ARF-GAP and MIDD1 as crucial factors governing cell polarity. In conclusion, we succeeded in demonstrating that vascular stem cell fates are determined by a specific transcription factor(s) regulated by a CLE peptide-dependent intracellular signaling pathway composed of a receptor kinase and a cellular kinase.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	18,300,000	0	18,300,000
2008年度	18,300,000	0	18,300,000
2009年度	18,300,000	0	18,300,000
2010年度	18,300,000	0	18,300,000
2011年度	18,300,000	0	18,300,000
2012年度	18,300,000	0	18,300,000
総計	109,800,000	0	109,800,000

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：成長生理、植物、発生・分化

### 1. 研究開始当初の背景

研究開始当時までに、私たちのグループは維管束形成に関与する因子の探索を行い、維管束の連続性の促進因子としてアラビノガラクタンタンパク質 *xylogen* (Nature 2004)、管状要素分化の阻害因子として 12 個のアミノ酸からなる TDIF ペプチド (Science 2006)、また、維管束連続性に関わる細胞内のシグナル伝達として小胞輸送に関連する VAN3 タンパク質 (Development 2005)、管状要素分化のマスター遺伝子として VND 転写因子群 (Genes Dev. 2005)、維管束幹細胞から木部細胞への分化のトリガーとなるブラシノステロイド(PCP, 2005)などの鍵因子を単離同定した。興味深いことに、これらの因子の多くはその関連分子がシュート頂/根端メリステム形成あるいはシュート頂/根端メリステム機能と関連していることが示されているものであった。

### 2. 研究の目的

上記の研究の背景を受け、本研究においては、すでに私たちが世界に先駆けて発見した維管束分化の鍵因子の生体内での機能と因子間の相互作用を分子レベルで明らかにすることにより、維管束メリステムの機能と形成の制御機構を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

基本的には、分子生物学的手法、遺伝学的手法、植物生理学的手法、生化学的手法、細胞生物学的手法、すべてを用いて解析を行った。特に、本特定領域支援班で購入したDNAチップ解析装置を最大限に利用して、様々な細胞あるいは分化過程での遺伝子発現の網羅的な解析を行い、遺伝子の同定とその働きの推定に用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) GLE ペプチド細胞間シグナルによる維管束メリステム形成制御機構

##### ① TDIF シグナル伝達の解析：

これまでの研究により、木部道管分化抑制に関与する TDIF ペプチドの機能とシグナル伝達に関する研究を進めた。まず、TDIF ペプチドの受容体 TDR を同定し、これが維管束幹細胞にあることを明らかにした。次いで、この下流で働く転写因子の同定を試みた。その結果、シグナルのターゲットである転写因子 *WOX4* を見いだした。この *WOX4* は、維管束幹細胞の自己複製の促進と木部細胞への分化の抑制のうち、自己複製の促進を正に制御していることが分かった。一方で、木部分化の阻害は別の因子が支配していると予想された。また詳細な突然変異体の解析から、維管束幹細胞の維持には、幹細胞の 2 つの性質、自己複製能の維持と分化の抑制がともに必要で、この両方が欠けると維管束幹細胞は木部へと消費され、その後の維管束の発達は

停止してしまうことが分かった。

また、TDIF の木部分化抑制に関連すると考えられる因子について、酵母ツーハイブリッド法により同定を試み、細胞内キナーゼであることを明らかにした。

### ② TDIF の新規機能の解析：

TDIF の多様な機能を調べたところ、TDIF は維管束形成制御機能の他に、腋芽形成の促進効果を持つことを見出した。TDIF ペプチド群はシロイヌナズナゲノム中では CLE41、CLE42、CLE44 の3 遺伝子にコードされているが、このうち CLE42 が茎頂および腋生メリステムで働くことが分かった。TDIF ペプチド群の植物体への効果を詳しく観察したところ、腋芽形成の開始時および成長時の両方において促進効果を持っていた。これに伴って、腋芽形成に関与する STM 遺伝子の発現上昇が見られた。これらの結果から、腋芽形成の促進という TDIF ペプチド群の新しい働きが明らかとなった。

### ③ 原生木部形成に関与する新規 CLE ペプチドの機能解析：

TDIF 以外の CLE ペプチドが維管束形成の制御に関与する可能性を、合成ペプチドの投与実験により検討した。その結果、複数の CLE ペプチドが根における原生木部分化を阻害することが示された。GUS コンストラクトを作成し調べたところ、これらの内の少なくとも3つの遺伝子は根の維管束で強く発現していた。次に、木部分化阻害の分子機構を知る目的で、CLE ペプチドを投与した植物

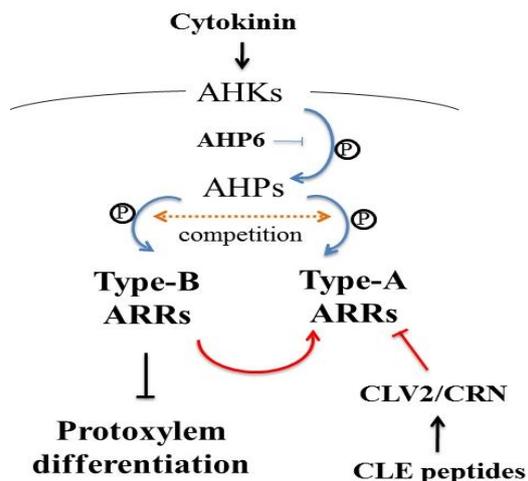


図1. CLE ペプチドとサイトカイニンのクロストーク

体の根を用いてマイクロアレイを行った。その結果、CLE ペプチドとサイトカイニンとの

関連性が明らかになった。サイトカニンシグナルの変異体を用いた解析から、CLE ペプチドはサイトカニンシグナルの抑制に働く A タイプ-ARR の転写抑制を通して、サイトカニンシグナルを活性化し、その結果として、原生木部道管形成 (図1) の阻害を引き起こすことが明らかとなった。これにより、原生木部道管の形成において、CLE ペプチドシグナルとサイトカニンシグナルがクロストークしていることが明らかとなった。

### (2) 転写因子による維管束分化制御機構

#### ① 木部繊維と道管-の分化制御の解析

木部繊維細胞のマスター遺伝子 NST1 と後生木部道管のマスター遺伝子 VND6 をエストロゲン誘導型にしてシロイヌナズナ培養細胞に導入し、形質転換ラインを作成した。これらラインを用いてマイクロアレイを行い、マスター遺伝子により直接支配される遺伝子群を同定した。これら遺伝子の解析から、多くの遺伝子は共通に発現誘導されるが、それぞれのマスター遺伝子特異的に特定機能の遺伝子群の発現が制御されていることが明らかとなった。

#### ② LHW 転写因子の解析

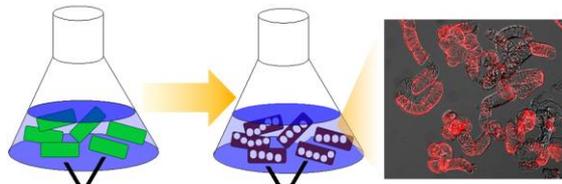
維管束のパターン形成の初期に働く LHW について研究を進めた。その結果、この bHLH 転写因子遺伝子は、胚では維管束組織形成に先立ち発現し、維管束前駆細胞の初期分裂を制御することが明らかとなった。また、側根においても、同様の働きをすることが明らかとなった。オーキシンとの関連でさらに解析を進めた。その結果、LHW は、MP, ATHB8, PIN1 などの遺伝子を速やかに誘導すること、DR5 などのオーキシン極大を示すマーカーの過剰蓄積を誘導するが、オーキシン量そのものの増加は誘導しないことが分かった。また、lhw 突然変異体では PIN1 の分布が幅広くなることが明らかになった。他の結果も総合して、LHW はオーキシン canalization を誘導ないし促進する因子であると考えられた。また、3種のホモログ遺伝子も維管束で働き、その2重突然変異体がより重篤な表現型を示すことから、パラログ遺伝子も維管束形成に重要な働きをすることが明らかとなった。

### (3) 細胞内の空間制御による維管束パターン制御

#### ① 細胞壁空間パターンの制御機構の解析

表層微小管は、細胞膜中を移動するセルロース合成酵素複合体の軌道をコントロールす

ることによって、細胞壁の構造を制御している。本研究では、二次細胞壁が局所的に肥厚する道管分化をモデルとし、表層微小管による細胞壁の制御機構を解析した。私たちはまず、後生木部道管のマスター因子である *VND6* をシロイヌナズナ培養細胞に導入することにより、*in vitro* の道管分化誘導系を新たに開発した (図 2)。この分化誘導系では、



培養細胞 道管細胞 道管細胞の写真  
図 2. 新規道管細胞分化誘導系

わずか 48 時間の間に 80% もの細胞が後生木部道管へと分化する。分化過程において表層微小管は局所的に消失し、その領域が壁孔 (二次細胞壁が肥厚しない領域) になることが分かった。次に、マイクロアレイデータを解析し、この現象に関わる新規の微小管結合タンパク質 MIDD1 (*Microtubule depletion domain 1*) を発見した。MIDD1 は細胞膜ドメインにアンカーされることによって、壁孔領域の表層微小管に特異的に結合し、表層微小管を局所的に分解していることが分かった。壁孔領域において、MIDD1 は微小管のプラス端に顕著に蓄積し、微小管を崩壊へと向かわせた。本研究により、木部細胞は、細胞膜ドメインを介し、表層微小管のダイナミクスを局所的に制御することで、特徴的な細胞壁構造を作り上げていることが明らかになった。

## ② *VAN3* の維管束連続性に対する働き

私たちは維管束の連続的な形成には、*VAN3* という、小胞輸送の調節に関与するタンパク質が必要であることを明らかにしてきた。本研究では *VAN3* の細胞内での局在と機能、さらには機能調節のしくみを解析した。その結果、*VAN3* はトランスゴルジネットワークと細胞膜に局在し、この間の小胞輸送に関連していることを示唆した。また、*VAN3* は小 G タンパク質である *ARF-GTP* の加水分解活性をもつことを明らかにした。さらに、この *VAN3* の調節に関する因子を探索したところ、*VAN3* に結合する未知のタンパク質 *VAB* と 5-脱リン酸化酵素である *CVP2* (*cotyledon vascular pattern2*) が同定された。詳細な解析の結果、*VAB* は *VAN3* の局在化に関与すること、また、*CVP2* 5-脱リン酸化酵素により *PI(4,5)P* からつくられる *PI(4)P* が、

*VAN3* の局在と活性化に重要な働きをすることが明らかとなった。

## 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 43 件のうち主なもの)

- ① Ohashi-Ito, K., Obuchi, M., Kojima, M., Sakakibara, H., Fukuda, H.: Auxin-associated initiation of vascular cell differentiation by LONESOME HIGHWAY. *Development* 140: 765-769, 2013. 査読有, DOI: 10.1242/dev.087924
- ② Ohashi-Ito, K., Matsukawa, M., Fukuda, H.: An atypical bHLH transcription factor regulates early xylem development downstream of auxin. *Plant Cell Physiol.* 54: 398-405, 2013. 査読有, DOI: 10.1093/pcp/pct013
- ③ Han, J. J., Lin, W., Oda, Y., Cui, K. M., Fukuda, H., He, X. Q.: The proteasome is responsible for caspase-3-like activity during xylem development. *Plant J.* 72: 129-41, 2012. 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05070.x
- ④ Oda, Y., Fukuda, H., Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. *Science*, 337:1333-1336, 2012. 査読有, DOI: 10.1126/science.1222597
- ⑤ Oda, Y., and Fukuda, H.: Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:38-44, 2012. 査読有, DOI: 10.1016/j.pbi.2011.10.005
- ⑥ Hirakawa Y., Kondo, Y., Fukuda, H.: Establishment and maintenance of vascular cell communities through local signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:17-23, 2011. 査読有, DOI: 10.1016/j.pbi.2010.09.011
- ⑦ Oda, Y., Fukuda, H.: Dynamics of Arabidopsis SUN proteins during mitosis and involvement in nuclear shaping. *Plant J.* 66: 629-641, 2011. 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04523.x
- ⑧ Horiguchi, G., Nakayama, H., Ishikawa N., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Tsukaya, H.: *ANGUSTIFOLIA3* plays roles in adaxial/abaxial patterning and growth in leaf morphogenesis. *Plant Cell Physiol.* 52:112-124, 2011. 査読有, DOI: 10.1093/pcp/pcq178
- ⑨ Kondo, Y., Hirakawa, Y., Kieber, J., Fukuda, H.: CLE peptides can negatively regulate protoxylem vessel formation via cytokinin signaling. *Plant Cell Physiol.*, 52: 37-48, 2011. 査読有, DOI: 10.1093/pcp/pcq129
- ⑩ Betsuyaku, S., Takahashi, F., Kinoshita, A., Miwa, H., Shinozaki, K., Fukuda, H., Sawa, S.: Mitogen-Activated Protein Kinase regulated by

the CLAVATA receptors contributes to the shoot apical meristem homeostasis. *Plant Cell Physiol.*, 52: 14-29, 2011. 査読有, DOI: 10.1093/pcp/pcq157

⑪ Oda, Y., Iida, Y., Kondo, Y., Fukuda, H.: Wood cell-wall structure requires local 2D-microtubule disassembly by a novel plasma membrane-anchored microtubule-associated protein. *Curr. Biol.* 20: 1197-1202, 2010. 査読有, DOI:10.1016/j.cub.2010.05.038

⑫ Ohashi-Ito, K., Fukuda, H.: Transcriptional regulation of vascular cell fates. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 670-676, 2010. 査読有, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.011>

⑬ Sakaguchi, J., Itoh, J.-I., Ito, Y., Nakamura, A., Fukuda, H., Sawa, S.: COE1, an LRR-RLK responsible for commissural vein pattern formation in rice. *Plant J.*, 63:405-416, 2010. 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04250.x

⑭ Ohashi-Ito, K., Oda, Y., Fukuda, H.: Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates genes that govern programmed cell death and secondary wall formation in a coordinated way during xylem differentiation. *Plant Cell*, 22:3461-3473, 2010. 査読有, DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.075036>

⑮ Hirakawa Y., Kondo, Y., Fukuda, H.: TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the *wox4* homeobox gene in Arabidopsis. *Plant Cell*, 22: 2618-2629, 2010. 査読有, DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.076083>

⑯ Naramoto, S., Kleine-Vehn, J., Robert, S., Fujimoto, M., Dainobu, T., Paciorek, T., Ueda, T., Nakano, A., Van Montagu, M. C. E., Fukuda, H., Friml, J.: ADP-ribosylation factor (ARF), guanine nucleotide exchange factor (GEF), and GAPase-activating protein (GAP) function in endocytosis of plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 107: 21890-21895, 2010. 査読有, DOI: 10.1073/pnas.1016260107

⑰ Miyazawa, H., Oka-Kira, E., Sato, N., Takahashi, H., Wu, G.J., Sato, S., Hayashi, M., Betsuyaku, S., Nakazono, M., Tabata, S., Harada, Y., Sawa, S., Fukuda, H., Kawaguchi, M.: A receptor-like kinase, KLAVIER, mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. *Development* 137: 4317-4325, 2010. 査読有, DOI 10.1242/dev.058891

⑱ Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., Sawa, S.: RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*.

*Development*, 137: 3911-3920, 2010. (selected in this issue) 査読有, DOI: 10.1242/dev.048199

⑲ Motose, H., Iwamoto, K., Endo, S., Demura, T., Sakagami, Y., Matsubayashi, Y., Moore, K. L., Fukuda, H.: Involvement of phytosulfokine in the attenuation of stress response during the transdifferentiation of *Zinnia mesophyll* cells into tracheary elements. *Plant Physiol.* 150: 437-447, 2009. 査読有, DOI: [org/10.1104/pp.109.135954](http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.135954)

⑳ Naramoto, S., Sawa, S., Koizumi, K., Uemura, T., Ueda, T., Friml, J., Nakano, A., Fukuda, H.: Phosphoinositide-dependent regulation of VAN3 ARF-GAP localization and activity essential for vascular tissue continuity in plants. *Development* 136: 1529-1538, 2009. 査読有, DOI: 10.1242/dev.030098

▪ Hirakawa Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., Sawa, S., Ohashi-Ito, K., Matsubayashi, Y., Fukuda, H.: Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fates by a CLE peptide/receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 15208-15213, 2008. 査読有, DOI: 10.1073/pnas.0808444105

▪ Yamaguchi, M., Kubo, M., Fukuda, H., Demura, T.: VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in differentiation of all types of xylem vessels in Arabidopsis roots and shoots. *Plant J.* 55: 652-664, 2008. 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03533.x

▪ Sakaguchi, J., Fukuda, H.: Cell differentiation in the longitudinal veins and formation of commissural veins in rice (*Oryza sativa*) and maize (*Zea mays*). *J. Plant Res.* 121: 593-602, 2008. 査読有, DOI: 10.1007/s10265-008-0189-1

▪ Endo, S., Pesquet, E., Tashiro, G., Kuriyama, H., Goffner, D., Fukuda, H., Demura, T.: Transient transformation and RNA silencing in *Zinnia* tracheary element differentiating cell cultures. *Plant J.* 53: 864-875, 2008. 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03377.x

[学会発表] (計 139 件のうち主なもの)

① Fukuda, H. and Oda, Y., A mechanism determining cell wall pattern. International Symposium of Plant Science “Plant Science for the future”, 理化学研究所横浜研究所、鶴見, 2012/11/20.

② Fukuda, H. and Oda, Y., Regulation of microtubule organization directing spatial patterning of wall assembly during xylem cell formation in Arabidopsis. Gordon Conference “Plant & Microbial Cytoskeleton”, Andover, NH, USA, 2012/8/12-17.

③ Fukuda, H., Tamaki, T., Hirakawa, Y., Kondo, Y., Inter- and intra-signaling regulating vascular stem cell maintenance. *Plant Vascular Development*, 2012, Vienna, Austria, 2012/7/1-2.

④ Fukuda, H., Ohashi-Ito, K., Oda, Y.: A novel membrane-associated protein regulating secondary wall patterns in an Arabidopsis cell culture harboring inducible VND6. Cold Spring Harbor Asia Symposium "From Plant Biology to Crop Biotechnology", CSH Asia, Suzhou, China, 2010/10/25-29.

⑤ Fukuda, H., Oda, Y., Ohashi-Ito, K.: Cellular and transcriptome analyses of xylem formation with Arabidopsis cell culture systems harboring inducible VND6 and SND1. Plant Vascular Biology 2010, Ohio State University, Ohio, USA, 2010/7/23-28.

⑥ Fukuda, H., Kondo, Y., Hirakawa, Y.: CLE peptides regulating vascular stem cell fates. 21st International Conference on Arabidopsis Research, Yokohama, Japan, 2010/6/6-10.

⑦ Fukuda, H., Kondo, Y., Hirakawa, Y.: Peptide signals governing vascular stem cell fates. Keystone symposia 2010, Granlibakken Resort, Tahoe City, California, USA, 2010/3/14-19.

⑧ Fukuda, H., Kondo, Y., Hirakawa, Y.: Crosstalk between xylem and phloem production through a peptide. Plant Vascular Biology and Agriculture 2009, Chongqing, China, 2009/6/22.

⑨ Fukuda, H.: Cell-cell communication governing vascular tissue organization. The XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. Tampere, Finland, 2008/8/21.

[図書] (計 9 件のうち主なもの)

① Fukuda, H., Peptide regulating vascular development. In "Plant Signaling Peptides" (eds. H. R. Irving and C. Gehring), p.59-75, Springer, 2012. 284pp.

ISBN: 978-3-642-27602-6 (Print)

978-3-642-27603-3 (Online)

② Kärkönen, A., Santanen, A., Iwamoto K., Fukuda, H.: Plant tissue cultures. In "Methods in Molecular Biology: The Plant Cell Wall"(eds. Z. A. Popper), vol. 715, p.1-20, Springer, 2011. 310pp.

DOI: 10.1007/978-1-61779-008-9\_1

ISBN 9781617790072

③ Fukuda, H.: Plant tracheary elements. In "Encyclopedia of Life Sciences", Wiley Online Library, Wiley-Blackwell, 2010.

DOI:10.1002/9780470015902.a0001814.pub2

④ 平川有宇樹、近藤侑貴、福田裕穂: CLE ペプチドによる維管束形成の制御、植物のシグナル伝達 — 分子と応答 (柿本、高山、福田、松岡編), 共立出版, p.172-177, 2010. 238pp. ISBN: 9784320057036

[その他]

ホームページ等

URL:

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/seigyolab.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: 1 0 1 6 5 2 9 3

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

伊藤 恭子 (ITO KYOKO)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 9 0 4 5 1 8 3 0