

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30日現在

機関番号： 14301
 研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2007～2012
 課題番号： 19060016
 研究課題名（和文） メリステムにおける遺伝子産物の発現と細胞内動態の高感度解析
 研究課題名（英文） High-sensitivity analysis of expression profile and subcellular dynamics of gene products in shoot apical meristem
 研究代表者
 荒木 崇（ARAKI TAKASHI）
 京都大学・大学院生命科学研究科・教授
 研究者番号：00273433

研究成果の概要（和文）： 班員からの依頼を受け、網羅的な遺伝子発現解析を行い、そのデータを提供することによる支援をおこなった（のべ39研究室・計143件）。これらの解析から、ペプチドと植物ホルモンとのシグナル伝達のクロストークの発見をはじめとする、植物メリステム研究に寄与する数多くの成果が挙げられた。また、BiFCベクターの配布と共焦点レーザー顕微鏡によるイメージング解析支援（15研究室・計15件）により、メリステム機能に関わる重要な制御蛋白質間の植物細胞内における相互作用が明らかになり、植物メリステム研究に寄与する成果に結びついた。

研究成果の概要（英文）： Arabidopsis microarray analysis was performed in Fukuda Lab upon request from project members (total of 143 analyses from 39 laboratories). Based on these support, novel findings were obtained to advance our understanding of plant meristems, such as cross-talk of signaling pathways of peptide and plant hormones. Support for imaging by confocal laser scanning microscope and provision of BiFC vectors (15 request from 15 laboratories) resulted in important demonstration *in planta* of protein-protein interaction between key regulators of plant meristem function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	42,000,000	0	42,000,000
2008年度	10,900,000	0	10,900,000
2009年度	10,900,000	0	10,900,000
2010年度	10,900,000	0	10,900,000
2011年度	10,900,000	0	10,900,000
2012年度	10,900,000	0	10,900,000
総計	96,500,000	0	96,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物生理・分子

キーワード：植物、生体分子、網羅的遺伝子解析、分子間相互作用、イメージング、マイクロアレイ、タイリングアレイ、ジーンチップ

1. 研究開始当初の背景

植物の発生研究は、代表的な発生過程や形態形成に関わる多くの遺伝子が単離される

とともに、遺伝子発現の網羅的解析も進められている。また、多数の低分子 RNA の関与が明らかになるとともに、DNAメチル化など

によるエピジェネティックな制御が、植物固有の様式で重要な役割を果たすことが示されている。研究開始当初の時点で、今後の研究においては、(1) ゲノム全体にわたって遺伝情報・エピジェネティックな情報を取得し、メリステム形成・維持における役割を解析すること、また、(2) 個々の遺伝子の機能解析においても、それぞれがコードするタンパク質の組織・細胞内における機能を動的に解析すること、の2つが必要不可欠となることが想定された。

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本支援研究においては、シロイヌナズナのタイリングアレイを利用して、低分子 RNA の発現、および chip-on-chip によるゲノムの化学修飾を網羅的に解析する方法を確立し、この技術を計画研究・公募研究の班員に提供することを目的とした。これにより、ゲノム発現データの蓄積されることを目指すことにした。また、タンパク質の組織内・細胞内局在の解析の技術情報や、植物細胞内におけるタンパク質間相互作用解析のためのベクター、茎頂メリステムの細胞動態を解析するための材料などを整備し、計画研究・公募研究の班員に提供するとともに、必要な班員には設備利用の便を図ることも目的とした。さらに、先端的な研究を進める班員や領域外の研究者から広く情報を収集し、技術交流などを通して本特定領域研究全体でそれを共有する体制を構築することも目指した。

3. 研究の方法

網羅的な遺伝子発現解析に関しては、

- ・シロイヌナズナ 26K-DNA チップ
- ・シロイヌナズナ 23K-DNA チップ
- ・ヒヤクニチソウ DNA チップ
- ・シロイヌナズナタイリングアレイ

を用いて、解析支援をおこなった。班員にウェブサイトから支援申し込みをもらった上で、あらかじめ設定した基準の質の RNA 試料を東京大学・福田研究室に送付してもらい、アレイデータを返送した。

Bi-molecular Fluorescent Complementation (BiFC, split YFP) に関しては、YFP タンパク質の N 末断片 (nYFP) と C 末側断片 (cYFP) のそれぞれの N 末側と C 末側とに、相互作用を調べたいタンパク質をクローニングし、計 8 通りの組み合わせすべてを検討できるベクター・セットを作製した。ポジティブ・コントロールとして、核における FT タンパク質と FD タンパク質の相互作用を可視化できる 1 組 2 種のプラスミドを用意した。

共焦点レーザー顕微鏡によるイメージング解析支援は、顕微鏡を設置している京都大学・荒木研究室に出向いてもらうことでおこ

なった。

4. 研究成果

初年度 (2007 年度) に班員に対する支援体制の整備をおこない、公募研究の班員が加わった二年度目 (2008 年度) から、支援業務を開始した。

網羅的な遺伝子発現解析に関しては、のべ 39 研究室・計 143 件の解析をおこない、これらの解析から、

- ・ 特殊な発生過程で働く新規遺伝子の発見
 - ・ ペプチドと植物ホルモンとのシグナル伝達のクロストークの発見
 - ・ ペプチドのターゲット遺伝子の発見
 - ・ エピジェネティクスに関与する遺伝子の発見
 - ・ メリステム関連遺伝子の発現プロファイルの取得
 - ・ 側根形成を支配する遺伝子の発現パターンの解明
 - ・ *WOX4* 下流遺伝子の同定
 - ・ 篩部関連遺伝子の同定
 - ・ 新規オーキシン関連遺伝子の同定
 - ・ 膜交通関連遺伝子の発現プロファイルの取得
 - ・ 側根形成を支配する遺伝子の発現パターンの解明
 - ・ 維管束転写因子の下流遺伝子発現のプロファイル取得
 - ・ 感染におけるシグナル遺伝子の同定、ペプチド誘導性遺伝子の発見
- など、植物メリステム研究に寄与する数多くの成果があがった。

また、BiFC (split YFP) 法による植物細胞内におけるタンパク質間相互作用解析のためのベクター・セットを作成し、2009 年 1 月からこれまでに、要請があった 14 研究室に提供し、技術的な支援もおこなった。蛍光タンパク質の細胞内局在のイメージングに関する共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた技術支援を 2 研究室のべ 4 件おこなった。これらの支援により、フロリゲン FT タンパク質と側芽メリステムの鍵制御因子 BRC1 タンパク質の相互作用など、メリステム機能に関わる重要な制御蛋白質間の植物細胞内における相互作用が明らかになり、植物メリステム研究に寄与する成果に結びついた。これらと合わせて、タンパク質の細胞内動態を可視化するための新規の蛍光タグのうち、タンパク質の機能や輸送を阻害しにくいと予想される小分子のタグとして、テトラシステインタグや iLOV と phiLOV の有用性を検討し、phiLOV に関して、利用可能という見通しを得た。

支援事業の一環として、連携研究者 (奈良

先端科学技術大学院大学・島本 功教授)がオーガナイザーとなり、以下のテクニカル・ワークショップ(奈良先端大との共催)をおこない、班員を含む多くの参加者を得て、先端的なイメージング技術やプロテオミクス技術の紹介と交流を図った。

2008年11月「視る生物学3」

2009年11月「視る生物学4」

2010年11月「視る生物学5」

(以上、奈良先端大・植物支援事業との共催)

2011年11月「プロテオミクスを生命科学に活かす10の方法」

(以上、奈良先端大・植物科学グローバルトップ教育推進プログラムとの共催)

最終年度には、同じく奈良先端大・植物科学グローバルトップ教育推進プログラムとの共催により、

シンポジウム「明日の植物科学を探る -ゲノムから細胞機能の統合を目指して-」

(2012年11月)

を開催し、班員を含む参加者が、植物科学の今後の方向性について議論を深める場を持った。

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54件)

- ① Yoo, S.-C., Chen, C., Rojas, M., Daimon, Y., Ham, B.-K., Araki, T., and Lucas, W. Phloem long-distance delivery of FLOWERING LOCUS T (FT) to the apex. *Plant Journal*, 査読あり、Vol. 74、2013、(印刷中)
DOI: 10.1111/tpj.12213
- ② Niwa, M., Daimon, Y., Kurotani, K., Higo, A., Pruneda-Paz, J.L., Breton, G., Mitsuda, N., Kay, S.A., Ohme-Takagi, M., Endo, M., and Araki, T. (2013) BRANCHED1 interacts with FLOWERING LOCUS T to repress the floral transition of the axillary meristems in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 査読あり、Vol. 25、No. 4、2013、pp. 1228-1242.
DOI: 10.1105/tpc.112.109090
- ③ Ohashi-Ito, K., Matsukawa, M., and Fukuda, H. An atypical bHLH transcription factor regulate early xylem development downstream of auxin. *Plant & Cell Physiology*, 査読あり、Vol. 54、No. 3、2013、pp. 398-405.
DOI: 10.1093/pcp/pct013
- ④ Hiraoka, K., Yamaguchi, A., Abe, M., and

Araki, T. The florigen genes *FT* and *TSF* modulate lateral shoot outgrowth in *Arabidopsis thaliana*.

Plant & Cell Physiology, 査読あり、Vol. 54、No. 3、2013、pp. 352-368.

DOI: 10.1093/pcp/pcs168

- ⑤ Machida, Y., Fukaki, H., and Araki, T. Plant meristems and organogenesis: the new era of plant developmental research. (Editorial) *Plant & Cell Physiology*, 査読なし、Vol. 54、No. 3、2013、pp. 295-301.
DOI: 10.1093/pcp/pct034
- ⑥ Ohashi-Ito, K., Obuchi, M., Kojima, M., Sakakibara, H., and Fukuda, H. Auxin-associated initiation of vascular cell differentiation by LONESOME HIGHWAY. *Development*, 査読あり、Vol. 140、No. 4、2013、pp. 765-769.
DOI: 10.1242/dev.087924
- ⑦ Han, 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 Journal*, 査読あり、Vol. 72、No. 1、2012、pp. 129-141.
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05070.x
- ⑧ Oda, Y., Fukuda, H. Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. *Science*, 査読あり、Vol. 337、No. 6100、2012、pp. 1333-1336.
DOI: 10.1126/science.1222597
- ⑨ Imura, Y., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Furutani, M., Tasaka, M., Abe, M., and Araki, T. CRYPTIC PRECOCIOUS/MED12 is a novel flowering regulator with multiple target steps in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology*, 査読あり、Vol. 53、No. 2、2012、pp. 287-303.
DOI: 10.1093/pcp/pcs002
- ⑩ Iwata, H., Gaston, A., Remay, A., Thouroude, T., Jeauffre, J., Kawamura, K., Oyant, L.H., Araki, T., Denoyes, B., and Foucher, F. The *TFL1* homologue *KSN* is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *Plant Journal*, 査読あり、Vol. 69、No. 1、2012、pp. 116-125.
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04776.x
- ⑪ Oda, Y. and Fukuda, H. Dynamics of *Arabidopsis* SUN proteins during mitosis and involvement in nuclear shaping. *Plant Journal*, 査読あり、Vol. 66、No. 4、2011、pp. 629-641.
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04523.x
- ⑫ Oda, Y., Iida, Y., Kondo, Y. and Fukuda, H. Wood cell-wall structure requires local 2D-microtubule disassembly by a novel

- plasma membrane-anchored microtubule-associated protein. *Current Biology*, 査読あり、Vol. 20, No. 13, 2010, pp. 1197-1202.
DOI: 10.1016/j.cub.2010.05.038
- ⑬ Nishikawa, F., Endo, T., Shimada, H., Fujii, H., Shimizu, T., Kobayashi, Y., Araki, T., and Omura, M. Transcriptional changes in *CiFT*-introduced transgenic trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Tree Physiology*, 査読あり、Vol. 30, No. 3, 2010, pp. 431-439.
DOI: 10.1093/treephys/tpp122
- ⑭ Motose, H., Iwamoto, K., Endo, S., Demura, T., Sakagami, Y., Matsubayashi, Y., Moore, K. L. and Fukuda, H. Involvement of phytosulfokine in the attenuation of stress response during the transdifferentiation of *Zinnia mesophyll* cells into tracheary elements. *Plant Physiology*, 査読あり、Vol. 150, No. 1, 2009, pp. 437-447.
DOI: 10.1104/pp.109.135954
- ⑮ Endo, S., Pesquet, E., Yamaguchi, M., Tashiro, G., Sato, M., Toyooka, K., Nishikubo, N., Motose-U., M., Kubo, M., Fukuda, H., and Demura, T. Identifying new components participating in the secondary cell wall formation of vessel elements in *Zinnia* and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 査読あり、Vol. 21, No. 4, 2009, pp. 3152-3169.
DOI: 10.1105/tpc.108.059154
- ⑯ Notaguchi, M., Daimon, Y., Abe, M., and Araki, T. Adaptation of a seedling micro-grafting technique to the study of long-distance signaling in flowering of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 査読あり、Vol. 122, No. 2, 2009, pp. 201-214.
DOI: 10.1007/s10265-008-0209-1
- ⑰ 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読あり、Vol. 105, No. 39, 2008, pp. 15208-15213
DOI: 10.1073/pnas.0808444105
- ⑱ Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M., and Araki, T. Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant & Cell Physiology*, 査読あり、Vol. 49, No. 11, 2008, pp. 1645-1658.
DOI: 10.1093/pcp/pcn154
- ⑲ Pyo, H., Demura, T., and Fukuda, H. TERE; a novel *cis*-element responsible for a coordinated expression of genes related to programmed cell death and secondary wall formation during tracheary element differentiation. *Plant Journal*, 査読あり、Vol. 51, No. 6, 2007, pp. 955-965.
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03180.x
- ⑳ 大門靖史, 荒木 崇 生命現象はどこまで視覚化できるか (4) BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) 法. *化学と生物*, 査読なし、Vol. 45, No. 10, 2007, pp. 718-725.
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu1962.45.718
- [学会発表] (計 268 件)
- ① 荒木 崇、花成研究の動向と今後の展望 - モデル植物を中心に- (招待講演)、第 85 回日本生化学会年会 シンポジウム「フロリゲン研究の新展開：その分子構造と新規な機能」、2012.12.14-16、福岡市・福岡国際会議場, マリンメッセ福岡
- ② 酒井友希・宮下結衣・宇山和樹・辻井由香・山口礼子・荒木 崇、Role of LEAFY in gametophyte development and function (招待講演)、International Marchantia Workshop 2012、2012. 11.15-17、熊本県阿蘇郡・ホテルグリーンピア南阿蘇
- ③ 小田祥久・福田裕穂、超解像イメージングで挑む木部細胞分化の分子ダイナミクス (招待講演)、日本植物学会 第 76 回大会、2012. 9.15-17、姫路市・兵庫県立大学姫路書写キャンパス
- ④ 小田祥久・福田裕穂、二次細胞壁パターンの数理解析にむけて (招待講演)、日本植物学会 第 76 回大会、2012. 9.15-17、姫路市・兵庫県立大学姫路書写キャンパス
- ⑤ 伊藤 (大橋) 恭子・福田裕穂、開始から完了まで - 維管束分化の統合的理解に向けて - (招待講演)、日本植物学会 第 76 回大会、2012. 9.15-17、姫路市・兵庫県立大学姫路書写キャンパス
- ⑥ 福田裕穂・小田祥久、Regulation of microtubule organization directing spatial patterning of wall assembly during xylem cell formation in *Arabidopsis* (招待講演)、Gordon Conference "Plant & Microbial Cytoskeleton"、2012. 8.12-17、Proctor Academy, Andover, New Hampshire, USA
- ⑦ 荒木 崇、*Arabidopsis* FT florigen in floral transition and beyond (招待講演)、日本植物生理学会 2012 年度年会 シンポジウム

- 「Open Questions on Rhythmic Response Systems in Plants」、2012. 3.16-18、京都市・京都産業大学
- ⑧ 酒井友希・荒木 崇、植物の成長相転換における制御因子の祖先的機能の探索（招待講演）、日本植物生理学会 2012 年度年会 シンポジウム「モデル植物ゼニゴケで探る陸上植物の普遍原理と多様性」、2012. 3.16-18、京都市・京都産業大学
- ⑨ 福田裕穂、Vascular stem cell fates are controlled by a CLE peptide secreted from the stem cell niche（招待講演）、10th TLL Life Sciences symposium “Chemical Communication”、2012.1.30-31、Singapore
- ⑩ 福田裕穂・近藤侑貴・平川有宇樹 Vascular stem cell fates controlled by small peptides（招待講演）、The Croucher Advanced Study Institute Symposium "Frontier in Cell Biology Research", The Chinese University of Hong Kong、2012.1.4-6、Hong Kong, China
- ⑪ 荒木 崇、花成研究の動向と今後の展望 -モデル植物を中心に-（招待講演）、園芸学会平成 23 年度秋季年会 シンポジウム「植物の花成制御機構に関する最新の研究動向と園芸作物への活用方策」、2011.9.24-26、岡山市・岡山大学津島キャンパス
- ⑫ 福田 裕穂、MIDD1 a novel membrane-associated MAP regulating secondary wall patterns（招待講演）、18th International Botanical Congress (IBC2011)、2011.7.23-30、Melbourne, Australia
- ⑬ 福田裕穂、Maintenance of vascular stem cells by a peptide（招待講演）、A symposium “Recent Advances in Plant and Microbial Biology” Institute of Plant and Microbial Biology、2011.6.6、Academia Sinica, Taipei, Taiwan
- ⑭ 荒木 崇、Regulation of flowering by the FT florigen（招待講演）、The Eighth International Conference on "Plant Biology Frontiers: Cells and Signals"、2010.9.23-27、Wuyishan, Fujian, China
- ⑮ 福田裕穂、CLE peptides govern vascular stem cell fate（招待講演）、The Eighth International Conference on "Plant Biology Frontiers: Cells and Signals"、2010.9.23-27、Wuyishan, Fujian, China
- ⑯ 大門靖史・荒木 崇、BiFC 法を用いた植物細胞内における蛋白質間相互作用の可視化と細胞内局在の数値化への試み、第一回「光塾」（光イメージング若手の会）、2009. 8.15-16、神戸市・情報通信研究機構神戸研究所 未来 ICT 研究センター
- ⑰ 荒木 崇、Long-distance and local signaling in the regulation of flowering in *Arabidopsis*（招待講演）、Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Plant Sensing, Response and Adaptation to the Environment"、2009.1.11-16、Big Sky, Montana, USA
- ⑱ 貴船永津子・岩本訓知・十時 泰・豊田敦・持田恵一・出村 拓・福田裕穂、管状要素分化転換過程における遺伝子発現に対する DNA メチル化・ヒストン脱アセチル化阻害の影響、日本植物生理学会 2008 年度年会、2008.3.20-22、札幌市・札幌コンベンションセンター
- ⑲ 荒木 崇、Long-distance and local signaling in the regulation of flowering in *Arabidopsis*（招待講演）、SigNet International Symposium 2008、2008.2.20-21、Korea University, Seoul, Korea
- ⑳ 荒木 崇、Long-distance signals of flowering in *Arabidopsis*（招待講演）、Plant Vascular Biology 2007、2007.5.7-11、Academia Sinica, Taipei, Taiwan
- 〔図書〕（計 10 件）
- ① A. J. Kastin (ed.), Elsevier, *Handbook of Biologically Active Peptides, 2nd Edition*, 2013, pp. 71-75.
- ② Z. A. Popper (ed.), Springer, *Methods in Molecular Biology Vol. 715: The Plant Cell Wall*, 2011, pp. 1-20.
- ③ 柿本 辰男、高山 誠司、福田裕穂、松岡信（編）、共立出版、2010、植物のシグナル伝達 - 分子と応答、2011、pp. 172-177.
- ④ R. Irving and C. Gehring (eds.), Springer, *Plant Signaling Peptides*, 2010, pp. 59-76.
- ⑤ 神谷勇治・小柴共一（編）、講談社サイエンティフィク、新しい植物ホルモンの科学 第 2 版、2010、pp.169-182.
- ⑥ A. M. Hetherington (ed.), Wiley、*Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, 2010、DOI:10.1002/9780470015902.a0001814.pub 2, Wiley Online Library
- ⑦ 塚谷裕一・荒木 崇（編）、放送大学教育振興会、植物の科学、2009、270 pp.
- ⑧ 海老原史樹文・井澤 毅（編）、シュプリンガー・フェアラーク東京、光周性の分子生物学、2009、pp.53-63.
- ⑨ 日本植物生理学会（監修）、荒木 崇（責任編集）、西村尚子（著）、化学同人、花はなぜ咲くの？（植物まるかじり叢書 3）、2008、pp. 25-26, 60-61, 137-138, 143-149.
- ⑩ 「植物の軸と情報」特定領域研究班（編）、朝日新聞社、植物の生存戦略 - 「じっとしているという知恵」に学ぶ -、2007、

pp. 3-10, 51-72, 161-183.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 崇 (ARAKI TAKASHI)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：00273433

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

町田 泰則 (MACHIDA YASUNORI)
名古屋大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：80175596

深城 英弘 (FUKAKI HIDEHIRO)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：80324979

島本 功 (SHIMAMOTO KO)
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：10263427
(平成 23 年度まで)

山本 興太郎 (YAMAMOTO KOTARO)
北海道大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：80142008