

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770041

研究課題名 (和文) 道管分化マスター因子が制御する下流遺伝子発現機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of downstream genes regulated by a master gene of xylem vessel differentiation

研究代表者

山口 雅利 (YAMAGUCHI MASATOSHI)

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：20373376

研究成果の概要 (和文)：私は、道管分化機構を分子レベルで明らかにすることを目的に、道管分化マスター因子である VND7 についての機能解析を行った。まず、マクロアレイ解析により VND7 が制御する多数の下流遺伝子を明らかにし、それらの中から VND7 が直接制御する候補遺伝子を見いだした。また、VND7 は VND タンパク質とダイマーを形成することが明らかとなった。さらに、VND7 と相互作用する因子として、VNI2 を同定し、VND7 の転写活性を負に制御することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：In order to understand a molecular mechanism underlying xylem vessel differentiation, I characterized VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 (VND7) which plays a master regulator of xylem vessel differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：,植物分子機能、維管束分化、道管、NAC 転写因子

1. 研究開始当初の背景

道管細胞や繊維細胞などにより構成される木質器官は、支柱としての役割を果たし、また様々な物質を植物体の内外へと通導する等、植物が成長・維持していくために重要な機能を担っている。一方、木質器官は紙や資材の原料となる樹木の材の大部分を占めていることから、バイオマスの質的・量的な向上に向けた、応用的な視点による研究対象

としても注目されている。木質器官を構成する細胞は、細胞膜と細胞壁（一次壁）の間に二次壁を形成することで頑強な構造を獲得する。つまり、この二次壁形成がどのような遺伝子により制御されているか、またそれら遺伝子発現はどのように制御されているかを明らかにすることは、基礎研究、応用研究のいずれにおいても、重要な研究課題であると考えられる。

私たちはシロイヌナズナの培養細胞より、高頻度かつ同調的に、水分を通導する道管要素へと分化誘導する実験系を開発した。そしてマイクロアレイを用いた発現解析により、この培養過程において特徴的な発現パターンを示す遺伝子を多数見つけだすことに成功した。得られた遺伝子には細胞壁修飾酵素をはじめ、転写因子、シグナル伝達や細胞死に関わると考えられる因子等、多岐にわたっており、それらの遺伝子が様々な発現様式により規定されることで、道管細胞への分化は厳密に制御されていると推測された。さらに、道管特異的に発現する遺伝子群の中から、植物特有の転写因子である NAC ドメインタンパク質をコードする *VND7* を過剰発現させた形質転換体では、木質器官以外の様々な細胞が、二次壁肥厚や核消失を伴った、道管細胞へと分化転換することを明らかにし、マスター因子として機能していることを突き止めた (Kubo *et al.*, *Gene & Dev.* 2005)。

2. 研究の目的

VND7 について、多面的なアプローチによりそれらの機能を解析することが、道管分化制御機構の解明につながると期待された。そこで本研究においては、まずマスター因子 *VND7* により発現が制御される下流遺伝子の同定を行った。次に得られた下流遺伝子の中から直接発現が *VND7* により制御される遺伝子を見つけ出し、その発現を規定する DNA 配列を明らかにすることを試みた。さらに、*VND7* と相互作用する因子を探索し、その作用機構を解析した。これらの研究を通じて、*VND7* を起点とした道管分化制御の分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

まず、*VND7* を過剰発現させた形質転換体を作成し、マイクロアレイ法により発現量に変化する遺伝子を解明した。

グルココルチコイドレセプター (GR) を融合させた転写因子の過剰発現体は、通常は不活性型として機能できないのに対し、誘導剤であるデキサメタゾン (DEX) を加えることで GR の立体構造が変化し、その結果転写因子は活性型として機能することが可能となる。この post-translational な誘導システムは、DEX と同時にタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを導入することで、転写因子に直接制御される標的遺伝子の転写反応までは進行するものの、それらのタンパク質合成以降のステップは阻害されることから、直接発現が制御される標的遺伝子を同定する手法として広く利用されている (Sablowski and Meyerowitz, *Cell* 1998; Sakai *et al.*, *Science* 2001; Okushima *et al.*, *Plant Cell* 2007)。そこで、GR を融合させた *VND7*

(*GR-VND7*) を導入した形質転換体を作成し、道管細胞への分化誘導活性が高く、さらに DEX 処理により分化誘導が厳密にコントロールされるラインを選抜した。次に、選抜したラインを用いて、シクロヘキシミドと同時に DEX を処理した、もしくはシクロヘキシミドのみを処理した植物体より RNA を抽出し、マイクロアレイ法により、*VND7* が直接発現を制御する遺伝子を探索する。候補遺伝子については、トランジェントアッセイやゲルシフトアッセイにより、*VND7* が結合する DNA コンセンサス配列の決定を試みた。

さらに *VND7* と相互作用する因子を two-hybrid 法によりに探索し、得られた因子については、作用機構を、分子生物学的、および逆遺伝学的手法により解析を行った。

4. 研究成果

まず、*VND7* と YFP の融合タンパク質を 35S プロモーターに連結させたコンストラクトを導入した形質転換体を用いて、マイクロアレイ法による発現解析を行った。その結果、コントロール植物体と比較して 4 倍以上発現量に変化した遺伝子が 132 個存在した (Yamaguchi *et al.*, *Plant Cell* 2010)。得られた遺伝子の中には、セルロース、ヘミセルロース、リグニンなどの二次細胞壁構成成分の生合成酵素や、細胞死に関与する酵素、転写因子などが含まれていた。

次に *VND7* にグルココルチコイドレセプター (GR) を融合させた過剰発現体を作成した。マイクロアレイ法を行ったところ、DEX と同時にタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド処理下で発現が上昇する、つまり *VND7* により発現が直接制御されると考えられる 50 以上の候補遺伝子を同定した。得られた候補遺伝子の中から複数のプロモーター領域を用いてトランジェントアッセイを行ったところ、多くのプロモーターについて *VND7* によりレポーター遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった (図 1)。*XCPI* 遺

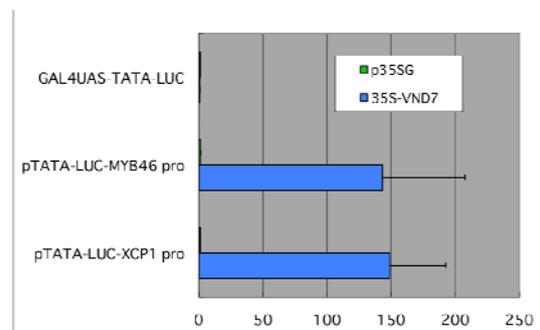


図 1 *VND7* は *MYB46*, *XCPI* の発現を制御する

伝子については *VND7* により発現が制御される領域を約 100 bp に絞り込んだ。さらにこの *XCPI* プロモーターに *VND7* が直接結合することを、ゲルシフト解析により確認した。

VND7 の機能を制御する機構を明らかにする目的で、相互作用因子の探索とその機能解析を行った。まず、VND7 は VND7 自身とホモダイマー、もしくは他の VND タンパク質とヘテロダイマーを形成することが明らかとなった (Yamaguchi *et al.*, Plant J. 2008)。さらに、two-hybrid 法によるスクリーニングの結果、これまで解析がなされていない、VND-INTERACTING1 (VNI1) と VNI2 が単離された。特に VNI2 は道管分化過程の初期段階で強く発現していることが明らかとなった。そこで、この VNI2 の役割を突き止めるために、VND7 に制御される遺伝子のプロモーターを用いたトランジェントアッセイを行ったところ、VNI2 は VND7 の転写活性を著しく抑制することが明らかとなった。さらに、VNI2 の発現を亢進させた形質転換体を作成したところ、植物体は矮化し、さらに道管形成が著しく損なわれていた (図 2)。このことから、VNI2 は VND7 と結合し、活性を抑制することで、道管分化を負に制御していることが明らかとなった (Yamaguchi *et al.*, Plant Cell 2010)。この成果は 5 紙の新聞社で掲載された。

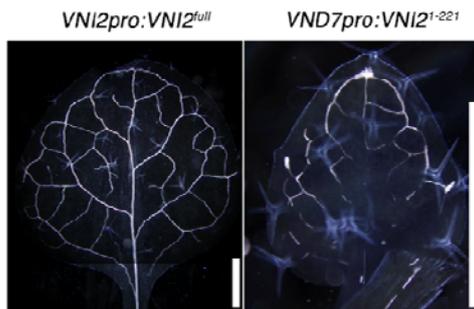


図 2 葉の道管パターン。左がコントロール、右が VNI2 過剰発現体

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 4 件)

- ① Masatoshi Yamaguchi, Misato Ohtani, Nobutaka Mitsuda, Minoru Kubo, Masaru Ohme-Takagi, Hiroo Fukuda, Taku Demura, (VND-INTERACTING2, a NAC Domain Transcription Factor, Negatively Regulates Xylem Vessel Formation in *Arabidopsis*.) Plant Cell, 2010, in press (査読有り)
- ② Satoshi Endo, Edouard Pesquet, Masatoshi Yamaguchi, Gen Tashiro, Mayuko Sato, Kiminori Toyooka, Nobuyuki Nishikubo, Makiko Udagawa-Motose, Minoru Kubo, Hiroo Fukuda, Taku Demura, (Identifying new components

participating in the secondary cell wall formation of vessel elements in *Zinnia* and *Arabidopsis*.) Plant Cell, 2009, vol. 21, 1155-1165 (査読有り)

- ③ Kohsuke Hashimoto, Hisako Igarashi, Shoji Mano, Chikako Takenaka, Takashi Shiina, Masatoshi Yamaguchi, Taku Demura, Mikio Nishimura, Teruo Shimmen, Etsuo Yokota, (An isoform of *Arabidopsis* myosin XI interacts with small GTPases in its C-terminal tail region.) J. Exp. Bot. 2008, vol. 59, 3523-3531 (査読有り)
- ④ Masatoshi Yamaguchi, Minoru Kubo, Hiroo Fukuda, Taku Demura, (Vascular-related NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in *Arabidopsis* roots and shoots.) Plant J. 2008, vol. 55, 652-664 (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Masatoshi Yamaguchi and Taku Demura (Key regulators in xylem vessel differentiation in plant.) Joint Seminar (NAIST-MU-NU) on Bioscience & Biotechnology, 2010 年 2 月 (Bangkok, Thailand) (Invited, Oral)
- ② Masatoshi Yamaguchi (Transcriptional regulation of cell wall biosynthesis.) Cell Wall Biology Workshop 2009 年 5 月 (Stensnäs, Sweden) (Oral)
- ③ Masatoshi Yamaguchi and Taku Demura (Transcriptional regulation of cell wall biosynthesis.) JSPS Colloquium "Green Chemistry" 2009 年 5 月 (Stockholm, Sweden) (Poster)
- ④ 山口雅利、久保稔、光田展隆、高木優、福田裕穂、出村拓 (VNI2 は VND7 の転写活性機能を抑制することで道管分化を制御する) 日本植物生理学会 2009 年 3 月 (愛知) (Oral)
- ⑤ 山口雅利 (道管分化を制御する転写因子) 日本園芸学会細胞壁研究小集会 2009 年 3 月 (東京) (Oral)
- ⑥ 山口雅利、久保稔、福田裕穂、出村拓 (NAC ドメインタンパク質 VND ファミリーによる協調的な道管分化の制御機構) 日本植物学会 2008 年 9 月 (高知) (Oral)
- ⑦ Masatoshi Yamaguchi, Minoru Kubo, Hiroo Fukuda and Taku Demura (Role of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN7 during xylem vessel differentiation.) XVI Congress of the FESPB 2008 年 8 月 (Tampere, Finland) (Poster)
- ⑧ Masatoshi Yamaguchi, Minoru Kubo, Hiroo Fukuda and Taku Demura

(VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in differentiation of all types of xylem vessels in Arabidopsis roots and shoots.) 19th International Conference on Arabidopsis Research 2008 年7月 (Montreal, Canada) (Poster)

[その他]

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/demura/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 雅利 (Yamaguchi Masatoshi)

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：20373376

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：