

## 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24年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870005

研究課題名（和文） 木部細胞分化を制御する細胞膜・細胞骨格間クロストークの分子実体の解明

研究課題名（英文） Analysis of molecular cross-talk between plasma membrane and cytoskeleton during xylem cell differentiation

研究代表者

小田 祥久 (ODA YOSHIHISA)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：30583257

研究成果の概要（和文）：木部道管の二次細胞壁パターンの制御機構を明らかにするために、細胞膜と表層微小管に相互作用するタンパク質 MIDD1 の機能に着目して研究を行いました。その結果、局所的に活性化した ROP GTPase が MIDD1 を細胞膜にアンカーし、MIDD1 が表層微小管の脱重合を促進することによって壁孔が形成されることが判明しました。さらに、MIDD1 を介して ROP GTPase と表層微小管が排他的に相互作用することによって、二次細胞壁のパターンが調節されることが明らかになりました。

研究成果の概要（英文）：To analyze the regulatory mechanism of patterned deposition of secondary cell walls in xylem vessels, I focused on the function of MIDD1, which interacts with both plasma membrane and cortical microtubules. I found that ROP GTPase is locally activated to recruit MIDD1 at the plasma membrane, which results in disassembly of cortical microtubules for formation of secondary cell wall pits. I also found that a mutual inhibitory interaction between ROP GTPase and cortical microtubules via MIDD1 induces the distinct pattern of secondary cell walls.

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

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：細胞分化・細胞壁・細胞骨格・細胞膜・イメージング・バイオマス

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は分化過程において適した形態に変形し、新たな機能を獲得します。植物細胞は硬い細胞壁に包まれているため、分化する過程において細胞壁の性質を厳密に制御する必要があります。細胞壁の主成分であるセルロース微繊維は、細胞膜中を移動するセルロース合成酵素複合体によって合成されますが、セ

ルロース合成酵素複合体の軌道は、細胞膜直下に局在する表層微小管によって制御されるため、表層微小管の配向を適切に制御することが細胞の形態形成に必須です。

表層微小管はチューブリンの重合・脱重合による伸長・収縮および表層微小管同士の間相互作用により自己組織化されると考えられるようになりました。しかし、これまでの知見では細胞分化において見られる多様な表

層微小管の配向を説明するには不十分です。このような現状を打開するために、細胞分化における多様な表層微小管の制御機構を解明する必要があります。

木部道管の分化過程では表層微小管が高度に組織化されることにより、特徴的なパターンに二次細胞壁が沈着されます。このようなパターンが形成されるメカニズムを解明することによって、植物細胞が表層微小管の配向を制御し、さまざまな細胞形態を作り出すメカニズムの解明につながると考えられます。

## 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでにシロイヌナズナ培養細胞を用いた高頻度・同調的な木部道管の分化誘導系を開発し、二次細胞壁のパターンを制御する分子機構を解析してきました。その結果、MIDD1 (Microtubule Depletion Domain1) と名付けた新規微小管付随タンパク質が局所的に表層微小管の脱重合を促進することで壁孔を作り出していることを明らかにしました (図 1)。MIDD1 は 2 つのコイ

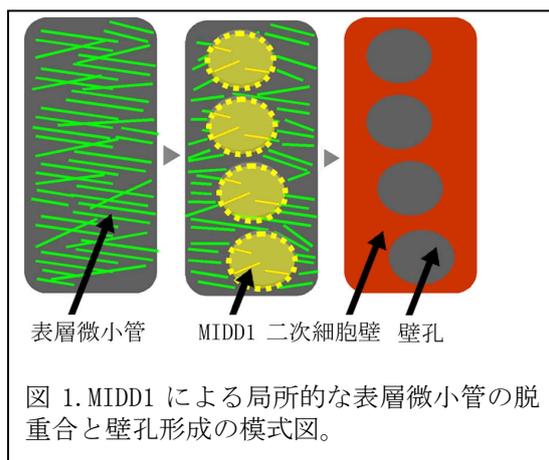


図 1. MIDD1 による局所的な表層微小管の脱重合と壁孔形成の模式図。

ルドコイルドメインを持ち、N 末側のコイルドコイルドメインを含む領域で表層微小管に結合し、C 末側のコイルドコイルドメインを含む領域が細胞膜ドメインにアンカーされます。本研究では MIDD1 を細胞膜にアンカーする細胞膜ドメインの分子実体を明らかにすることを目指しました。

## 3. 研究の方法

主な材料として研究代表者が新規に開発したシロイヌナズナ培養細胞の木部道管分化誘導系を用いました。この実験系では、道管分化のマスター転写因子 VND6 を発現させることで、80%もの細胞を後生木部道管へ同調

的に分化させることが可能です。さらに、アグロバクテリウムによる遺伝子導入法を改善し、複数の外来遺伝子を高頻度で発現させることも可能になりました。

MIDD1 が ROP GTPase と相互作用することが判明したため、本研究では ROP GTPase の木部道管分化における細胞内局在とダイナミクス、および MIDD1 との相互作用を検証しました。

## 4. 研究成果

ROP GTPase は植物に特異的に存在する Rho タイプの small GTPase です。シロイヌナズナのゲノムには 11 の ROP GTPase がコードされており、それらは花粉管や根毛、表皮細胞の局所的な生長において重要な役割を果たしています。しかしながら木部道管の二次細胞壁形成においてどのような役割を果たしているのかはほとんど明らかになっていませんでした。

ROP GTPase の木部道管における局所的な二次細胞壁の形成との関わりを検証するために、木部道管において発現している 4 つの ROP GTPase を選び、それぞれ GFP と融合させたものを、シロイヌナズナ培養細胞に導入し、木部道管への分化過程における ROP GTPase の局在を観察しました。その結果、4 つの ROP GTPase すべてが細胞膜に均一に局在しました。しかしながら詳細な観察を続けたところ、4 つの ROP GTPase のうちの 1 つ ROP11 が壁孔の内部において微小管様の繊維構造にも局在していることがわかりました (図 2)。

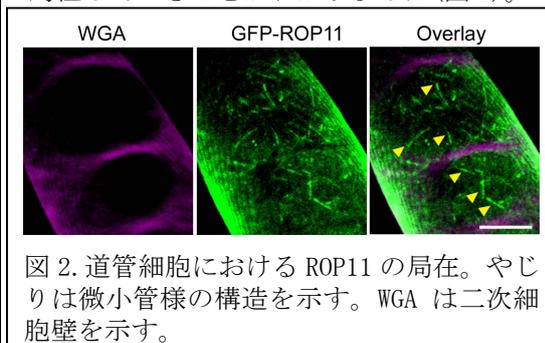


図 2. 道管細胞における ROP11 の局在。やじりは微小管様の構造を示す。WGA は二次細胞壁を示す。

ROP11 のダイナミクスを観察したところ、脱重合している微小管様構造の先端に顕著に局在していることがわかりました。このような局在は MIDD1 の局在に極めて類似していました。

tagRFP-MIDD1 と GFP-ROP GTPase を同時に発現させると、両者は壁孔内の微小管に沿って共局在しました (図 3)。MIDD1 と ROP GTPase が直接結合しているかどうかを明らかにするために、微小管結合ドメインを削除した MIDD1 (以後 MIDD1  $\Delta$ N) と ROP11 を用いて bi-molecular fluorescent

complementation (BiFC) 法 および fluorescence resonance energy transfer (FRET) 法によって検証しました。なお FRET は acceptor photo-bleaching 法によって検出しました。タバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉の表皮にアグロバクテリウムインフィルトレーション法を用いて ROP11 と MIDD1  $\Delta$ N を一過的に発現させた結果、どちらの方法においても ROP11 と MIDD1 が相互作用していることがわかりました。恒常的活性型および恒常的不活性型に変換した ROP11 をもちいて同様の実験を行った結果、MIDD1 は活性型の ROP11 と相互作用し、不活性型の ROP11 とは相互作用しないことがわかりました。次に活性型の ROP11 が MIDD1 を細胞膜にアンカーすることができるかどうか検証するために、野生型、恒常的活性型、および不活性型 ROP11

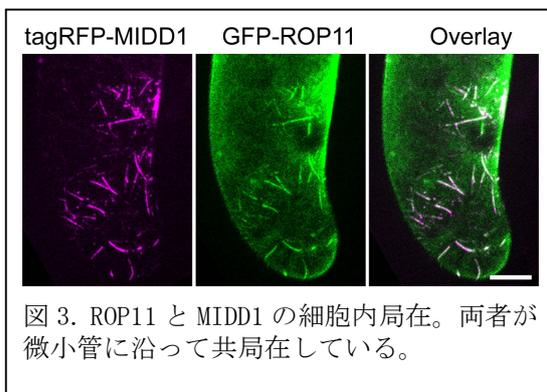


図 3. ROP11 と MIDD1 の細胞内局在。両者が微小管に沿って共局在している。

とともに GFP-MIDD1  $\Delta$ N をタバコの表皮に発現させました。その結果、野生型あるいは恒常的活性型の ROP11 を共発現させた場合に MIDD1  $\Delta$ N が細胞膜に局在し、不活性型の ROP GTPase を共発現させた場合には細胞質に局在しました。この結果は活性化の ROP11 が MIDD1 を細胞膜にアンカーすることを示しています。

次に、ROP11 と MIDD1  $\Delta$ N の相互作用を、木部道管に分化しているシロイヌナズナ培養細胞において検証しました。その結果、BiFC 法においても FRET 法においても、ROP11 と MIDD1 が壁孔内の細胞膜において相互作用していることが示されました(図 4)。これらの結果は細胞膜において局所的に ROP11 が活性化し、活性化 ROP11 が MIDD1 をリクルートすることにより、MIDD1 が局所的に表層微小管に作用できる可能性を示唆しています。そこで、木部道管に分化しているシロイヌナズナ培養細胞に恒常的活性型の ROP11 を発現させたところ、MIDD1 が均一に局在し、二次細胞壁も壁孔を失った均一なものが形成されました(図 4)。シロイヌナズナの根において同様の実験を行った結果、後生木部道管の二次細胞壁の壁孔が失われました。これらの結果は局所的な ROP GTPase の活性化が二次細胞

壁のパターン形成において決定的な役割を果たしていることを強く示唆しています。

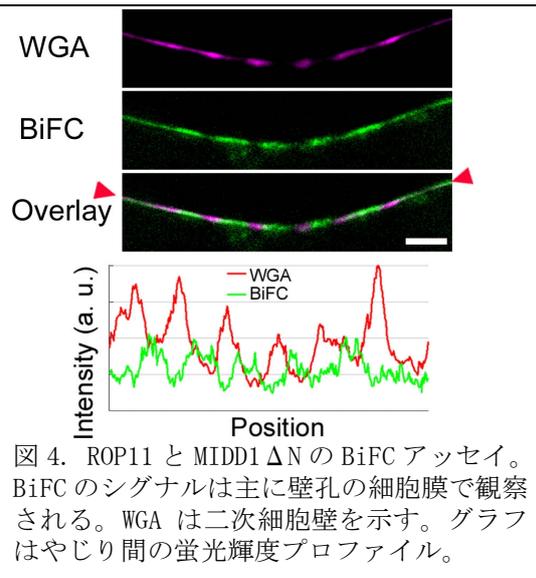


図 4. ROP11 と MIDD1  $\Delta$ N の BiFC アッセイ。BiFC のシグナルは主に壁孔の細胞膜で観察される。WGA は二次細胞壁を示す。グラフはやりり間の蛍光輝度プロファイル。

これまでの結果から、ROP11 の局所的な活性化によって二次細胞壁のパターンが決定されることが示唆されました。しかしながら、微小管安定化剤 taxol を用いて分化している木部道管の微小管を安定化したところ、ROP GTPase が活性化した細胞膜ドメインが表層微小管の影響を受けて通常よりも細長くなることを見出しました。一方、微小管重合阻害剤である oryzalin を用いて微小管を破壊したところ、MIDD1  $\Delta$ N がアンカーされる細胞膜ドメインが消失しました。oryzalin を加えた直後の細胞を詳細に観察した結果、細胞膜ドメインにアンカーされていた MIDD1  $\Delta$ N が拡散するようにして消失してゆく様子が観察されました。これらの結果は活性化 ROP GTPase の細胞膜ドメインが一方的に二次細胞壁のパターンを決定しているのではなく、表層微小管と細胞膜ドメインの間に排他的な相互作用が存在する可能性を示唆しています。この可能性を確かめるために、CFP-MIDD1  $\Delta$ N に ROP11 の細胞膜アンカードメインを結合し、MIDD1  $\Delta$ N を恒常的に細胞膜にターゲットしました。その結果、細胞膜にアンカーされた MIDD1  $\Delta$ N は表層微小管から排除されることが判明しました。

今後は ROP GTPase を局所的に活性化する仕組みと、表層微小管が MIDD1 を排除する仕組みを解析することで、二次細胞壁のパターンと表層微小管の配向を制御するメカニズムに迫ることができると考えられます。

## 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4件)

① Oda Y, Fukuda H (2012) Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. **Current Opinion in Plant Biology** Vol.15, pp.38-44. 査読有り, 研究代表者は co-corresponding author.  
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.10.005

② Oda Y, Fukuda H (2011) Dynamics of Arabidopsis SUN proteins during mitosis and their involvement in nuclear shaping. **Plant Journal** Vol.66, pp.629-641, 査読有り, 研究代表者は corresponding author.  
DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04523.x

③ Ohashi-Ito K, Oda Y, Fukuda H (2010) Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 Directly Regulates the Genes That Govern Programmed Cell Death and Secondary Wall Formation during Xylem Differentiation. **Plant Cell** Vol.22, pp.3461-3473, 査読有り.  
DOI:http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.075036

④ Oda Y, Iida Y, Kondo Y, Fukuda H (2010) Wood cell-wall structure requires local 2D-microtubule disassembly by a novel plasma membrane-anchored protein. **Current Biology** Vol.20, pp.1197-1202, 査読有り, 研究代表者は co-corresponding author.  
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.038

〔学会発表〕(計9件)

① 小田祥久、福田裕穂  
道管分化における二次細胞壁パターンの制御機構(S20-2(S0129))  
第53回日本植物生理学会年会  
2012年3月18日、京都産業大学

② 小田祥久  
シロイヌナズナ培養細胞の新規道管分化誘導系を基盤とした微小管による細胞内空間制御機構の解析(若手奨励賞受賞講演)  
日本植物学会第75回大会  
2011年9月17日  
東京大学駒場キャンパス

③ 伊藤(大橋)恭子、小田祥久、福田裕穂

道管分化のマスター遺伝子 VND6 による下流遺伝子制御機構の解析(1pF17)  
日本植物学会第75回大会  
2011年9月17日  
東京大学駒場キャンパス

④ 小田祥久、福田裕穂  
細胞膜ドメインと表層微小管の排他的相互作用による木質細胞壁の空間パターン制御(1aC01)  
日本植物学会第75回大会  
2011年9月17日  
東京大学駒場キャンパス

⑤ 馬屋原靖子、平川有宇樹、小田祥久、伊藤(大橋)恭子、福田裕穂  
WOX4 遺伝子の転写調節制御についての解析(3aD03)  
第52回日本植物生理学会年会  
2011年3月22日、東北大学

⑥ 小田祥久、福田裕穂  
細胞膜ドメインに局在する新規微小管付随タンパク質MIDD1による表層微小管と二次細胞壁のパターン制御(1aF08)  
第52回日本植物生理学会年会  
2011年3月20日、東北大学

⑦ 小田祥久、福田裕穂  
細胞膜ドメインに局在する新規微小管結合タンパク質 MIDD1 が二次細胞壁パターンを制御する(1pF08)  
日本植物学会第74回大会  
2010年9月9日、中部大学

⑧ Kyoko Ohashi-Ito, Yoshihisa Oda, Hiroo Fukuda  
“Analysis of downstream genes regulated by master regulators of vascular differentiation”  
21st international conference on Arabidopsis research  
June 6-10, 2010, Pacifico Yokohama

⑨ Yoshihisa Oda, Hiroo Fukuda  
“Wood cell-wall structure requires local 2D-microtubule disassembly by a novel plasma membrane-anchored microtubule-associated protein”  
21st international conference on Arabidopsis research  
June 6-10, 2010, Pacifico Yokohama

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 祥久 (ODA YOSHIHISA)  
東京大学・大学院理学系研究科・助教  
研究者番号：30583257 研究者番号：

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし