

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440137

研究課題名(和文) 維管束分化を制御する細胞間情報伝達機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of cell-cell interaction involved in vascular differentiation

研究代表者

本瀬 宏康 (Hiroyasu, Motose)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：70342863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：木部分化を促進するxylogenの輸送機構を解析し、ゴルジ体から細胞膜への輸送過程を明らかにした。また、Xylogenの相互作用因子の探索を行った。木部分化を抑制するサーモスペルミンの合成阻害剤を開発することに成功し、xyleminと名付けた(Yoshimoto et al. 2016)。Xyleminとオーキシン類縁体を添加すると、様々な植物で顕著に木部分化が促進された。

研究成果の概要(英文)：We identified a transport pathway of xylogen from golgi to the plasma membrane. Furthermore, several xylogen interactors were determined. We developed a inhibitor of thermospermine biosynthesis and named it xylemin (Yoshimoto et al. 2016). Addition of xylemin and auxin analog strongly promotes xylem differentiation in various plants.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：維管束 木部分化 糖タンパク質 ポリアミン サーモスペルミン

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生過程では、個々の細胞が様々なシグナル分子を介して連絡を密に取り合い、協調的な成長と分化を行っている。しかし、植物の細胞間シグナル伝達については不明な点が多い。本研究では、協調的な細胞分化に不可欠な細胞間情報伝達機構を明らかにするため、植物の維管束に着目して解析を行う。維管束は、連続した位置にある細胞が次々に維管束構成細胞へと分化することにより形成され、植物体中に複雑なネットワークを形成する。また、維管束内には道管や師管、繊維細胞や柔細胞、幹細胞として機能する形成層など、多様な細胞が規則正しい位置に形成される。この維管束分化の過程には、さまざまなシグナル分子を介した細胞間相互作用が存在すると考えられるが、未だ不明な点が多く残されている。

申請者らは、ヒヤクニチソウの単離葉肉細胞から管状要素（道管・仮道管を構成する細胞）が分化する細胞培養系を用いて、局所的な細胞間相互作用を検出する系を開発し、その実体を明らかにした(Motose ら *Planta* 2001, *Plant Cell Physiol.* 2001)。管状要素に分化しつつある細胞は、拡散性の分化促進因子を分泌し、隣接した細胞を管状要素分化経路へと引き込むことを示した。この分化促進因子を xylogen と名付け、単離・精製を行ったところ、脂質輸送ドメインを持つ新規のアラビノガラクトタンパク質であることがわかった(Motose ら *Nature* 2004)。Xylogen は、分化しつつある細胞から極性を持って分泌され、隣接した細胞を道管細胞へと分化させることで、維管束の連続的な分化に関わると考えられる。本研究では、xylogen がどのように細胞間相互作用を仲介し、近接した細胞の分化を促進するのかを明らかにする。

近年の研究から、維管束分化を抑制する因子が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。ポリアミンの一種であるサーモスペルミンは道管分化を抑制し、茎伸長を促進する (Kakehi ら *Plant Cell Physiol.* 2008, *FEBS Lett.* 2010、図 1)。サーモスペルミンはスペルミンの構造異性体で、合成酵素である ACAULIS5(ACL5)により

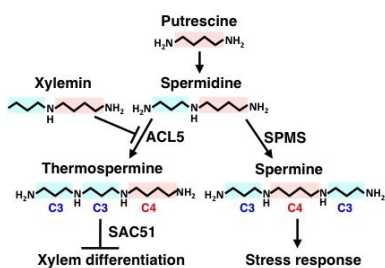


図 1. 植物のポリアミンの合成経路

が過剰になり、茎伸長が抑制される。

申請者らは、*acl5* 変異体において、オーキシン類縁体の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸イソオクチルエステル(2,4-D IOE)が過剰な道管分化を誘導することを発見した (Yoshimoto ら *Plant Cell Physiol.* 2012, 図 2)。2,4-D IOE はオーキシンのプロドラッグ(プロオーキシン)である。つまり、2,4-D IOE 自体は不活性だが、細胞内に入るとエステラーゼにより IOE が除去され、活性型のオーキシン 2,4-D を生じる。2,4-D IOE の分化促進効果は、サーモスペルミンにより抑制されるので、サーモスペルミンがオーキシンによる道管分化の促進効果を抑制すると考えられる。本研究では、サーモスペルミンとオーキシンの相互作用の解析を進める。また、サーモスペルミン合成阻害剤を開発し、様々な植物におけるサーモスペルミンの機能、特にオーキシンとの相反作用を解析する。

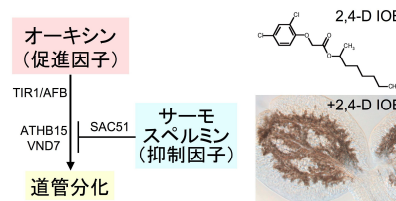


図 2. サーモスペルミンの作用モデル(左)と 2,4-D IOE による道管分化誘導(右)

2. 研究の目的

本研究では、植物の生存と進化に不可欠な、維管束分化を制御する細胞間情報伝達の機構を解明する。特に、研究背景で述べた、道管分化を促進する xylogen の作用機構、道管分化を抑制するサーモスペルミンに着目して研究を進め、維管束形成を制御するシグナル伝達経路を明らかにする。

Xylogen は極性輸送され、道管分化を促進するが、その輸送機構はわかっていない。本研究では Xylogen の輸送過程とその仕組みをライブセルイメージングにより解析する。Xylogen の作用機構として、受容体に結合して分化を促進することが考えられるが、受容体単離の試みはうまく行っていない。また、xylogen 過剰発現株は顕著な表現型を示さないため、その機能には他の因子が関与していると考えられる。本研究では、xylogen と相互作用するタンパク質や化合物を同定し、その機能を解析することで xylogen の作用機構を解明する。

我々は、サーモスペルミンを欠損した *acl5* 変異体において、オーキシン類縁体の 2,4-D IOE が過剰な道管分化を引き起こすことを見出した。この系を用いて、オーキシンとサーモスペルミンの相反作用に関わる新たな遺伝子を明らかにする。

サーモスペルミンの合成阻害剤は未だ

見出されていないが、サーモスペルミンの作用機構の解析や、効率的な道管分化の誘導系の開発に極めて有効である。本研究では、サーモスペルミン合成阻害剤を開発し、維管束分化や遺伝子発現に及ぼす影響を解析する。

また、シグナル因子を組み合わせて添加することで、維管束分化を効率的に誘導する系の開発を試みる。分化誘導系を用いて、道管などに多量に蓄積するセルロースや細胞壁構成成分の生産増大を試みる。

植物の形態形成には未知のシグナル因子が関与している可能性が高い。本研究では、維管束分化に影響を及ぼす新奇な生理活性物質をケミカルライブラリーから探索し、その作用機構を解析する。これにより、細胞分化を制御する新たなシグナル伝達経路を明らかにする。この方法はケミカルバイオロジーと呼ばれ、近年植物科学に適用されているが、維管束分化に応用された例はほとんどなく、新たな知見をもたらすことが期待できる。

3. 研究の方法

(1) xylogen の輸送機構・作用機構の解析

Xylogen の輸送機構を明らかにするため、GFP を融合した xylogen タンパク質 (XYP1, XYP2) を発現するシロイヌナズナ形質転換体を用いて解析を行った。XYP1, XYP2 の輸送過程を小胞輸送の阻害剤や変異体を用いて解析した。XYP1-GFP, XYP2-GFP を発現するシロイヌナズナを変異原処理し、xylogen 輸送が欠損した変異体を単離・解析した。

Xylogen の作用機構を明らかにするため、xylogen と結合する脂質やペプチド・タンパク質を、免疫沈降法やヤリブ試薬共沈法により回収し、質量分析により同定する。

(2) サーモスペルミンとオーキシンの相反作用の解析

オーキシンとサーモスペルミンの相反作用に関わる新奇な遺伝子を明らかにするため、2,4-D IOE を投与した *ac15* 変異体と野生株の遺伝子発現解析を行った。有望な遺伝子については、変異体や過剰発現体を作成し、その表現型を解析した。

(3) サーモスペルミン合成阻害剤の開発と解析

サーモスペルミン合成阻害剤を開発するため、スペルミジン類縁体を化学合成し、サーモスペルミン合成に対する効果を検討する。その生理作用と遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。

(4) ケミカルスクリーニングによる新規生理活性物質の解析

化合物ライブラリーから、シロイヌナズナの木部分化を促進または阻害する化合物をスクリーニングした。有望な化合物について、生理作用の特徴づけを行った。

(5) 効率的な維管束分化系の開発

効率的な維管束分化系を開発するため、2,4-D IOE などを投与する道管分化誘導系の条件検討を行った。

4. 研究成果

(1) Xylogen の作用機構・輸送機構の解析

シロイヌナズナ XYP1-GFP, XYP2-GFP 発現株を観察し、その輸送過程を解析した。小胞輸送の阻害剤である Brefeldin A で処理すると、XYP1-GFP, XYP2-GFP が細胞内のエンドソームに局在したことから、brefeldin A に感受性の ARF-GEF の関与が示唆された。ARF-GEF の 1 つである GNOM の変異体でも同様に、XYP1-GFP, XYP2-GFP が細胞内の膜系に部分的に局在することから、GNOM とそれ以外の ARF-GEF の輸送への関与が示された。また、brefeldin A や GNOM 以外の阻害剤・変異体においても同様に、XYP1-GFP, XYP2-GFP の局在を検討した。更に、阻害剤の添加と洗浄による輸送過程の可視化を試み、ゴルジ体から細胞膜への輸送を一部検出することに成功した。

XYP1, 2 の C 末端には GPI アンカーが存在し、輸送において重要であることが示唆された。独自に単離した GPI アンカー合成変異体における XYP1-GFP, XYP2-GFP の局在を観察したところ、細胞内に蓄積することが示唆された。また、GPI アンカーを切断するホスホリパーゼで細胞を処理すると、XYP1-GFP, XYP2-GFP が細胞外に放出されることが示唆された。これらのことから、GPI アンカーは xylogen の輸送と分泌に重要な役割を果たしていることが明らかになった。GPI アンカータンパク質はステロールとスフィンゴ脂質に富む脂質ラフトに乗って輸送され機能すると考えられており、脂質ラフトとの共局在や膜成分との相互作用について検討中である。

Xylogen の作用機構を明らかにするため、XYP1-GFP, XYP2-GFP を免疫沈降して精製し、質量分析により相互作用因子の探索を行った。精製法や質量分析の方法を検討したところ、XYP1-GFP, XYP2-GFP と共沈するタンパク質の一部を同定することができた。これらのタンパク質には、細胞壁に関連したものが含まれており、xylogen が木部分化時の細胞壁形成に関与することが示唆された。これらのタンパク質が特異的に XYP1, 2 と結合するかどうかを検討中である。また、相互作用の機能的な意義についても解析を行っている。

(2) サーモスペルミンとオーキシンの相反作用の解析

サーモスペルミンとオーキシンの作用機構を明らかにするため、*ac15* 変異体と野生

株の網羅的な遺伝子発現解析を行った。*ac15* 変異体では、木部分化に関与する転写制御因子、細胞壁の形成に必要な酵素、オーキシンの合成・輸送・情報伝達に関わるタンパク質、タンパク質分解や情報伝達に関与するものの発現が顕著に増大していた (Tong et al. 2014)。これらの遺伝子の発現は、サーモスペルミンを投与することで抑制された。サーモスペルミンによる発現抑制には、アミノプロピル基が2つ並んだ構造と4つのアミノ基 (テトラアミンであること) が必須であることがわかった。また、2,4-D IOE を投与した *ac15* 変異体と野生株の遺伝子発現解析を行ったところ、これらの遺伝子の発現が増大することが示された。以上のことから、サーモスペルミンによるオーキシン経路の抑制に関わる遺伝子が明らかになった。これらの遺伝子の機能解析を更に進め、サーモスペルミンの作用機構を明らかにしたい。

(3) サーモスペルミン合成阻害剤の開発と解析

サーモスペルミンは高度好熱菌と植物に存在するが、その機能は上述のシロイヌナズナ以外ではほとんどわかっていない。様々な生物におけるサーモスペルミンの機能と作用機構を明らかにするため、サーモスペルミン合成阻害剤を開発することにした。サーモスペルミンの生合成は、スペルミジンの C3 側のアミノ基にアミノプロピル基が結合することで達成される (図1)。そこで、アミノプロピル基が結合するアミノ基を欠失したプロピルブトレシンが拮抗阻害剤として機能すると考えられる。プロピルブトレシンは他のポリアミンと同様にシンプルな構造の化合物であるが、高極性のアミンであるため扱いが難しく、アミノ基の保護と活性化により特異的な反応を行う必要がある。そこで、岡山大の高村浩由先生と門田功先生に協力していただき、静岡県立大の菅先生らにより開発されたニトロベンゼンスルホニル基 (ノシル基) を活性化と保護の両方に使用する合成戦略 (Ns-strategy) を適用し、プロピルブトレシンの化学合成に成功した (Yoshimoto et al. 2016)。

合成したプロピルブトレシンをシロイヌナズナ野生株に投与して培養すると、サーモスペルミンの合成が抑制された。また、プロピルブトレシンを投与したシロイヌナズナは茎伸長が抑制され、木部分化が過剰になっており、サーモスペルミンを欠失した *ac15* 変異体の表現型を再現することが示された。プロピルブトレシンによる木部 (xylem) の分化誘導 (induction) にちなみ、プロピルブトレシンを xylemin と命名した (Yoshimoto et al. 2016)。

Xylemin は木部分化に関与する遺伝子の発現を誘導することが示された。また、xylemin による木部分化と遺伝子発現の促進は、サーモスペルミンを同時添加することで抑制された。このことから、xylemin の効果はサーモスペルミンの合成阻害によるものであることが示された。

Xylemin と 2,4-D IOE を同時添加すると、木部道管がより過剰に形成された。木部や道管で特異的に発現するマーカー遺伝子の発現パターンを観察すると、本来の分化領域からはみ出るように木部や道管が分化して拡大していることがわかった (図3)。定量的な遺伝子発現解析から、Xylemin と 2,4-D IOE の同時添加により、木部分化関連遺伝子の発現が約 10-100 倍に増大することがわかった。この木部分化と遺伝子発現の促進は、サーモスペルミンを同時添加することで抑制された。これらのことから、サーモスペルミンはオーキシンの経路を抑制することで、木部分化領域を狭めることが明らかになった。

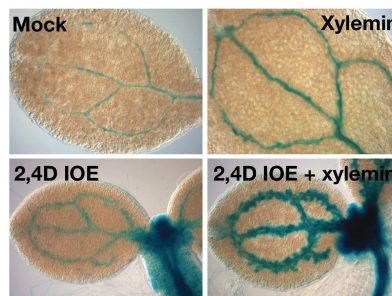


図3. Xylemin とオーキシンの相乗効果。青く染色された部分が木部。

これまでの解析から、サーモスペルミンは根の伸長と側根の形成を抑制することが示されている (Tong et al. 2014)。そこで、xylemin の根における効果を検討したところ、サーモスペルミンとは逆に、根の伸長と側根形成を促進した。この効果は、サーモスペルミンとの同時添加により抑制された。これらのことから、サーモスペルミンは木部形成だけでなく、根の成長を抑制する機能があることが示された。

Xylemin と 2,4-D IOE の効果が他の植物種でも見られるか調べた。Xylemin はタバコの植物体やハクニチソウ木部分化系において、道管分化を促進することがわかった。次に、xylemin と 2,4-D IOE を同時添加し、道管分化が誘導されるか検討した。特に、タバコの子葉では道管細胞が一様に敷き詰められたように分化するという顕著な表現型を示した (図4)。また、この分化誘導系はハクニチソウやイネにも適用できることがわかった。現在、木本植物のポプラや、維管束をもたないコケ植物に対する効果を検討している。

以上のことから、xylemin は世界初のサ

ーモスペルミン合成阻害剤であり、様々な植物や生物に適用可能であると考えられる。Xylemin を用いることで、サーモスペルミンの機能や作用機構が明らかになると期待される。また、オーキシンの同時添加法により、木質バイオマスの研究促進と増産につながる可能性がある。

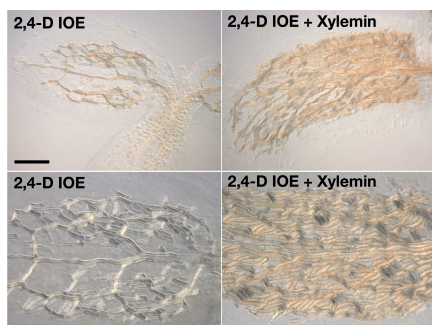


図4. タバコの子葉における Xylemin とオーキシンの木部分化促進。

(4) ケミカルスクリーニングによる新規生理活性物質の解析

化合物ライブラリーから、シロイヌナズナの木部分化を促進または阻害する化合物をスクリーニングし、有望な化合物を同定した。この内、葉酸合成阻害剤の解析を進めた。

葉酸は核酸合成やアミノ酸代謝・メチオン合成・光呼吸などで機能し、炭素を1つ転移させる反応(C1代謝)の補酵素として機能する。葉酸の代謝経路における機能は詳しく研究されているが、植物の形態形成における役割はほとんどわかっていない。本研究において、葉酸合成阻害剤のスルファニルアミド(サルファ剤)が維管束分化を抑制することが明らかになった。スルファニルアミドはパラアミノ安息香酸の構造類縁体で、葉酸合成の初期段階を触媒するジヒドロプテリン酸合成酵素の拮抗阻害剤として作用する。本研究では、スルファニルアミドを制御物質として用い、植物の成長と分化における葉酸の機能を解析した。

まず、様々なスルファニルアミド類縁体をシロイヌナズナに添加し、成長に対する効果を調べ、構造活性相関を明らかにした。また、スルファニルアミドによる成長抑制が葉酸の同時添加によりほぼ完全に回復した。

スルファニルアミドの細胞分裂への影響を調べるため、細胞周期で特異的に発現するサイクリンの発現を調べた。スルファニルアミドを添加すると、分裂組織におけるサイクリンの発現が増加することから、葉酸が欠如すると細胞周期の特定の段階で停滞することが示唆された。

次に、維管束分化と細胞分裂を制御するオーキシンとサイトカニンへの効果を解析した。オーキシン応答性の遺伝子発現はスルファニルアミド添加により増加したが、サ

イトカニン応答性の遺伝子発現はスルファニルアミドにより抑制された。以上の結果から、葉酸が植物ホルモンを介して細胞周期の進行に関わることが考えられた。

(5) 効率的な維管束分化系の開発

*ac15*変異体に2,4-D IOEを投与する道管分化誘導系の条件検討と改良を行った。また、様々な植物において同様の実験系が構築できないか調べるため、(3)において述べたxyleminとオーキシンの同時添加による木部分化誘導系の開発を進めた。この分化誘導系はヒヤクニチソウやイネにも適用できることがわかった。現在、木本植物のポプラや、維管束をもたないコケ植物に対する効果を検討している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Yoshimoto K, Takamura H, Kadota I, Motose H*, Takahashi T* (2016) Chemical control of xylem differentiation by thermospermine, xylemin, and auxin. *Sci. Rep.* 6, 21487; doi: 10.1038/srep21487. (*Corresponding authors)

Takatani S, Otani K, Kanazawa M, Takahashi T, Motose H (2015) Structure, function, and evolution of plant NIMA-related kinases: Implication for phosphorylation-dependent microtubule regulation. *J. Plant Research* 128, 875-891. DOI:10.1007/s10265-015-0751-6

Takatani S, Hirayama T, Hashimoto T, Takahashi T, Motose H (2015) Abscisic acid induces ectopic outgrowth in epidermal cells through cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports* 5:11364. doi:10.1038/srep11364

Tong W, Yoshimoto K, Kakehi J, Motose H, Niitsu M, Takahashi T (2014) Thermospermine modulates expression of auxin-related genes in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* doi: 10.3389/fpls.2014.00094

Hayashi K, Nakamura S, Fukunaga S, Nishimura T, Jenness MK, Murphy AS, Motose H, Nozaki H, Furutani M, Aoyama T (2014) Auxin transport sites are visualized in planta using fluorescent auxin analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 11557-11562.

Inoue G, Kaneta T, Takayanagi T, Kakehi J, Motose H, Takahashi T (2013) Determination of polyamines in *Arabidopsis thaliana* by capillary electrophoresis using salicylaldehyde-5-sulfonate

as a derivatizing reagent. Anal. Methods 5, 2854-2859

〔学会発表〕(計 12 件)

蔡青々・本瀬宏康・高橋卓
シロイヌナズナのサーモスペルミン応答における SAC51 ファミリーの機能
第 57 回日本植物生理学会年会(岩手) 2015 年 3 月 18 日

山本真衣・本瀬宏康・高橋卓
シロイヌナズナのサーモスペルミン欠損変異 *acl5* に対する新奇抑圧変異の解析
第 57 回日本植物生理学会年会(岩手) 2015 年 3 月 18 日

古本拓也・大谷健人・石崎公庸・河内孝之・本瀬宏康・高橋卓
ゼニゴケにおけるサーモスペルミンの応答解析
第 57 回日本植物生理学会年会(岩手) 2015 年 3 月 18 日

大谷健人・石崎公庸・西浜竜一・河内孝之・高橋卓・本瀬宏康
ゼニゴケ NIMA 関連キナーゼは仮根細胞の伸長方向を制御する
第 57 回日本植物生理学会年会(岩手) 2015 年 3 月 18 日

高谷彰吾・高橋卓・本瀬宏康
NIMA 関連キナーゼ 6 は表層微小管の切断と脱重合に関与する
第 57 回日本植物生理学会年会(岩手) 2015 年 3 月 19 日

Takatani S, Ozawa S, Yagi N, Hotta T, Takahashi Y, Hashimoto T, Takahashi T, Motose H
Arabidopsis NEK6 depolymerizes cortical microtubules by tubulin phosphorylation during directional cell growth
26th International Conference on Arabidopsis Research, Paris, France, July 5th – 9th, 2015

本瀬宏康
維管束分化のケミカルバイオロジー
岡山大学と慶應義塾大学の若手交流シンポジウム - 化学と生物学の融合を目指して - (神奈川・慶應義塾大学・矢上キャンパス) 2015 年 6 月 26 日(招待講演)

Motose H, Yoshimoto K, Kobayashi C, Hayashi K, Noutoshi Y, Takamura H, Kadota I, Takahashi T (Invited)
Chemical biology of vascular development
第 56 回日本植物生理学会年会(東京) 2015 年 3 月 17 日

Motose H, Takatani S, Sakai T, Ozawa S, Takahashi Y, Takahashi T
Tubulin phosphorylation by NIMA-related kinases is involved in cell growth and

division.
25th International Conference on Arabidopsis Research, Vancouver, Canada, July 28th – August 1st, 2014

Takatani S, Hirayama T, Hashimoto T, Takahashi T, Motose H
Abscisic acid induces ectopic outgrowth and cortical microtubule reorganization in epidermal cells of *Arabidopsis thaliana*.

25th International Conference on Arabidopsis Research, Vancouver, Canada, July 28th – August 1st, 2014
本瀬宏康・高谷彰吾・小澤真一郎・高橋裕一郎・高橋卓

NIMA 関連キナーゼによるチュープリンのリン酸化は細胞成長に関与する
第 55 回日本植物生理学会年会(富山) 2014 年 3 月 18 日

吉本香織・高村浩由・門田功・本瀬宏康・高橋卓
シロイヌナズナの道管分化に対するサーモスペルミン合成阻害剤の効果
第 55 回日本植物生理学会年会(富山) 2014 年 3 月 18 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
本瀬 宏康(MOTOSE HIROYASU)
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号: 70342863

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
高橋 卓(TAKAHASHI TAKU)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 20271710