

1. 研究題目

シロイヌナズナを用いた維管束形成機構の 分子遺伝学的解析と樹木への応用

A molecular genetic analysis on vascular formation and application for woods.

2. 代表研究者名： 澤 進一郎 Shinichiro Sawa

役職： 准教授 Associate Professor

所属機関名： 東京大学大学院理学系研究科生物学専攻

Graduate School of Science, Department of Biological
Sciences, The University of Tokyo

3. 和文アブストラクト

植物は、器官を切除して培養することや、分化全能性をひきだすことが容易であることから、いかにも各器官、組織、細胞が自律分散的に生きているように見える。しかし、中枢神経系を持つ動物のような中央管理型の生命形態ではないにもかかわらず、各器官の間では確実に情報のやりとりを行っており、個体としての統一性を保っている。本研究では、どのようにして各器官(細胞)の間で情報のやりとりを行っているのか、また、各細胞は、細胞自身の位置情報や、環境、発生プログラムをどのように認識して自分自身を分化させ”個体”を形作っているのかという問題に対して、維管束細胞の形成(分化)の分子遺伝学的な解析を進める。このような細胞(組織)の分化における分子メカニズムの解析結果をふまえて、維管束組織の人工的な分化制御が可能であるかという調査、研究を行っていく。

4. 英文アブストラクト

The plant vascular tissue forms a continuous network throughout the plant body and provides transport pathways for water, dissolved materials, and signaling molecules. Within the leaf of vascular plants, the vascular system is constructed in a complex venation pattern. Venation shows a rich variety among different groups of plants, but it has been thought that a common basic mechanism underlies this spatial arrangement.

In this study, we tried to understand the molecular mechanisms of vascular formation, and tried the genetic manipulation on vascular formation in plant.

5-1. 研究目的

維管束は栄養分の通路としての役割を担うのみならず、エネルギーや情報のネットワークとしても働き、植物の形作りに重要な役割を担っている。この維管束は全ての器官に存在し、それぞれ秩序正しくつながって、血管や神経のように個体全体にネットワークを形成しているが、空間的にどのように維管束を配置するかといった空間認識に関する分子メカニズムは全くわかっていない。さらに、維管束形成パターンが決定された後の維管束細胞分化機構も未知の部分が多い。維管束細胞は物理的に単離することが困難であり、個体レベルでの細胞生理学的な解析はあまり進んでいない。また、培養系を用いた解析は空間的なネットワーク形成に関する解析等に限界があった。本研究は、シロイヌナズナを用いて、逆遺伝学的、遺伝学的手法を用いた網羅的な解析を開始することで、維管束形成に関する遺伝子を網羅的に単離することを第一の目的としている。第二の目的は環境問題を視野に入れた応用的性質を持つ物である。昨今の森林伐採に伴う地球温暖化は地球規模の極めて重大な環境問題の一つである。“木”の改良はこの問題を解決する一つの糸口になると考えている。第一の目的として解析した維管束形成における基礎データにより、どのような遺伝子がどのような改良につながるかは容易に予測可能となる。この基礎データをもとにしてポプラ（遺伝子操作が可能である樹木）等の材質改良が第二の目的である。改良のポイントとしては2つある。一つは、温暖化現象の根本である二酸化炭素の固定効

率を上げる樹木の作出であり、もう一つはリグニン合成を制御するなどした効率的なパルプ生成を可能にする樹木の作出である。これらの改良樹木は将来環境問題解決の鍵となる可能性が十分高いと考えられる。

5-2. 研究経過

5-2-1. gene trap lineの解析

約 47800 ラインから維管束細胞においてレポーター活性の観察される 183 ラインから、染色パターンによりこれらのラインをクラス分けし、機能を予測した。また、原因遺伝子の特定により、個々の因子の解析を進めた。

5-2-2. Xlanase::YFPを用いた解析

維管束形成途中のマーカーとなる Xylanase::YFP レポーター活性が維管束以外でも検出される突然変異体を単離し、解析を行った。

5-2-3. 維管束形成を抑制する細胞外ペプチドの単離・解析

単離葉肉細胞の液体培養系のうち、葉肉細胞を維管束細胞へと分化転換させる系を用いて、液体培地中に放出される維管束分化抑制因子の単離・同定を行った。

5.3. 研究成果

5-3-1. gene trap lineの解析

gene trap line スクリーニングの結果、GM 細胞から染色されるラインが3ライン、前形成層細胞から染色される2ラインが得られた。これらの原因遺伝子を全て特定し、プロモーター::GUS ライン作製により、ジーントラップラインによる発現パターンを確認した。そのうちの1ラインは葉酸のグルタミン酸鎖切

断酵素であり、葉酸が維管束形成を含む未分化細胞から成熟状態への分化過程に与えることを分子遺伝学的に証明した。

5-3-2. Xylanase::YFPを用いた解析

維管束での発現が見られるマーカー遺伝子が異所的に発現するシロイヌナズナの突然変異体、ate を単離した。この突然変異体では葉の非維管束細胞での異所的な Xylanase 遺伝子発現が観察される他、リグニンの異所的な沈着などの表現型が観察され、維管束細胞が異所的に分化していることを示唆した。これらから、ATE 遺伝子は維管束分化を負に制御する因子であることが明らかになった。また、この遺伝子発現を制御することでリグニン沈着を人為的に操作する可能性も示唆された。

5-3-3. 維管束形成を抑制する細胞外ペプチドの単離・解析

我々は、オーキシンのみを含む培地で単離葉肉細胞を培養した培地成分中に管状要素分化を阻害する高い活性があることを見だし、このような管状要素の分化阻害因子を TDIF と名付けた。TDIF は管状要素分化を阻害するが、単離葉肉細胞の分裂活性は逆に促進しており、TDIF が細胞に毒性的な影響を与えているわけではなく、分化過程を特異的に抑制する因子であることが示唆された。TDIF によって管状要素分化を抑制し、これらステージマーカー遺伝子の発現プロファイルを調べたところ、ステージ 2 のマーカー遺伝子群の発現は誘導されていたものの、管状要素分化の最終段階であるステージ 3 のマーカー遺伝子は発現しなかった。このことから、TDIF はステージ 2 の管状要素前駆細胞の状態での分化を抑

制する機能を持つことが明らかとなった。

次に、この TDIF の単離を行った。TDIF を管状要素分化系の生物検定を指標として精製し、MS/MS 解析を行った結果、TDIF はヒドロキシル化プロリンを 2 残基含む 12 アミノ酸から成るペプチド、HEVHypSGHypNPISN、であることが明らかになった。

TDIF の構造をもとに化学合成した TDIF は数十 pM という低い濃度で機能的であることが明らかとなった。化学合成したペプチドが機能的であることから、様々な合成ペプチドの機能を検討した。その結果、二つのヒドロキシル化は活性に不必要であること、TDIF の前駆体の C 末に存在するアルギニンを付加すると、成熟型に比べて活性が 15% 程度に低下することが明らかとなった。

5-4. 今後の課題と発展

今後、これらのペプチドがどのように関与し、空間的に維管束を配置していくのかをさらに解析し、最終的には維管束パターン形成を人為的に操作することを目指す。その結果として、より強度の高い樹木へと改良し、リグニン合成を施す。リグニンはバクテリアなどによる代謝の難しい炭酸同化産物であるため、大気中の二酸化炭素を分解されない形で固定することが可能となる。その結果として、大気中の二酸化炭素濃度は激減するはずである。一方でリグニン沈着を抑制した木はパルプの原料として環境負荷の小さい物となるであろう。今後これらの応用的目標のためにもさらなる基礎データの蓄積とモデル樹木を用いた検証を進めていこうと考えている。

5-5. 発表論文リスト

1) Masa-aki Ohto, Shingo Hayashi, Shinichiro

- Sawa, Akiko Hashimoto-Ohta, and Kenzo Nakamura. (2006) Involvement of HLS1 in sugar and auxin signaling in Arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiol.* 47: 1603-1611
- 2) Nagawa Shingo, Sawa Shinichiro, Sato Syusei., Kato Tomohiko, Tabata Satoshi, and Fukuda Hiroo. (2006) Gene trapping in Arabidopsis reveals genes involved in vascular development. *Plant Cell Physiol.* 47, 1394-1405.
- 3) 澤進一郎, 福田裕穂 (2007) 植物の維管束形成/ 茎頂分裂組織の構築に関するCLEペプチドホルモン 蛋白質核酸酵素 52: 18-24
- 4) Shinichiro Sawa#, Atsuko Kinoshita, Ikuko Nakanomyo, and Hiroo Fukuda. (2006) CLV3/ESR-related (CLE) Peptides as Intercellular Signaling Molecules in Plant. *The Chemical Record*, 6: 303-310
- 5) 澤進一郎, 福田裕穂 形態形成に関する植物のCLEペプチドホルモン. 科学 (2007) In Press
- 6) Takashi Kondo*, Shinichiro Sawa#, Atsuko Kinoshita, Tatsuo Kakimoto, Hukuda Fukuda, Youji Sakagami. A Plant Peptide Encoded by *CLV3* Identified by In Situ MALDI TOF-MS Analysis. *Science*, 313, 845-848, 2006.
- 7) Yasuko Ito, Ikuko Nakanomyo, Hiroyasu Motose, Kuninori Iwamoto, Shinichiro Sawa, Naoto Dohmae, Hiroo Fukuda. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell. *Science*, 313, 842-845, 2006
- 8) Shinichiro Sawa#, Hirokazu, Fukunaga, Yutaka Sawa (2006). *Lecanorchis amethystea* (Orchidaceae), A New species from Kochi . *Acta Phytotax. Geobot.* 57, 123-128.
- 9) 東山哲也, 澤進一郎 植物の発生と形態形成、バイオサイエンス (2 0 0 6) バイオサイエンス研究会編 (オーム社) in Press
- 10) 澤進一郎ら共著 植物ゲノム科学事典 (2007) (朝倉書店) in Press
- 11) 澤進一郎ら共訳 Principles of Development (2006) (Norton publisher ; 東京化学同人)
- 12) Claire Woodward, Shannon M Bemis, Emi J Hill, Shinichiro Sawa, Tomokazu Koshiba, and Keiko U Torii (2005). Interaction of auxin and ERECTA in elaborating Arabidopsis inflorescence architecture revealed by the activation-tagging of a new member of the YUCCA-family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiol.* 139. 192-203
- 13) Shinichiro Sawa#, Koji Koizumi, Satoshi Naramoto, Taku Demura, Takashi Ueda, Akihiko Nakano and Hiroo Fukuda (2005). DRP1A is responsible for vascular continuity synergistically working with VAN3 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138; 819-826
- 14) Koji Koizumi*, Satoshi Naramoto*, Shinichiro Sawa*, Natsuko Yahara, Takashi Ueda, Akihiko Nakano, Munetaka Sugiyama, and Hiroo Fukuda (2005). VAN3 ARF-GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation. *Development* 132: 1699-1711.; * Co-first author.
- 15) Shinichiro Sawa#, Taku Demura, Gorou Horiguchi, Minoru Kubo, and Hiroo Fukuda (2005) The ATE genes are responsible for the repression of the transdifferentiation into xylem cells in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137; 141-148
- 16) Makoto Hashimoto, Larisa Kisseleva, Shinichiro Sawa, Toshiko Furukawa, Setsuko Komatsu, Tomokazu Koshiba (2004) A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant Cell Physiol.*; 45, 550-559
- *co-first author and #corresponding author**