

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570051

研究課題名(和文)表皮細胞層による成長協調化機構の研究

研究課題名(英文)Study for coordinated growth by epidermal cell layer in Arabidopsis

研究代表者

倉田 哲也(Kurata, Tetsuya)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：50360540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多細胞体制の植物における、組織最外層の表皮による器官成長の制御機構の解明を目的に以下のような結果を得た。シロイヌナズナの伸長が魚花茎を用いて、外側から表皮、皮層、内皮及び花茎全体の切片から、レーザーによる特定の細胞層を切断、回収後、微量RNAサンプルによるRNAシーケンス法により、遺伝子発現情報を取得した。表皮細胞層で高発現している1,700程度の遺伝子を特定した。その後、細胞伸長がさかんな暗所芽生えのマイクロアレイデータを公共データから取得し、器官成長が活発で且つ表皮細胞層特異的な73遺伝子を特定できた。現在、これらの遺伝子の機能解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：Organ growth of multicellular plant is coordinated among cells/tissues. Old and recent physiological studies showed the outer-most cell layer, epidermis, have restrictive and promotive effects on organ growth in plants.

In this study, we defined the genes whose expression were up-regulated in the epidermis layers and under the dark condition in Arabidopsis stem and/or hypocotyl tissue. For epidermis-enriched genes, specific cell layers were dissected from paraffin-embedded slices by laser. After linear amplification of small amount RNA from dissected samples, RNA-sequencing was conducted. Informatic analysis revealed that gene expression profiling was appropriate. Combined analysis with our RNA-sequencing and public microarray data defined 73 genes were up-regulated in the epidermis of stem and under the dark condition which enhances cell growth in hypocotyl (juvenile stem-like structure).

研究分野：植物分子生物学

キーワード：シロイヌナズナ 器官成長 表皮細胞 RNA-sequencing 協調化

1. 研究開始当初の背景

多細胞体制を持つ被子植物においては、組織間の相互作用を介した細胞分裂や細胞伸長の協調化が発生・成長過程において重要だと考えられる。これまでの150年にわたる関連研究から、植物の器官成長において、表皮を含む外側の細胞層が“たが”のように器官全体の成長を律速していることが支持されてきたが (Kutschera, Bot Acta, 1992) 最近の細胞伸長に関わる植物ホルモン変異体を用いた解析により、表皮細胞層から内側細胞層へ何らかの物理的もしくは化学的シグナル (特定分子の移動等) が伝達され、協調的な成長をもたらしていることが示された (Savaldi-Goldstein et al., Nature, 2007; Hacham et al., Development, 2011)。

2. 研究の目的

植物の地上部器官においては、表皮細胞層による協調的な成長制御が示唆されてきているが、その分子レベルのメカニズムは明らかにされていない。本研究では、シロイヌナズナの花茎伸長や胚軸伸長をモデル系にして、全転写産物を対象にした次世代シーケンサーによる細胞層特異的発現解析と、それに続く体系的な高速機能解析を行い、表皮細胞層由来の成長協調化に関わる因子の同定を行う。

3. 研究の方法

まずは、伸長が盛んな花茎領域を切り出し、固定後、パラフィン切片を作成する。レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法により、特定の細胞層の細胞群を切り取り、回収する。これらの切り出し切片から、total RNA を抽出し、Ovation システム (NuGen 社) により、線形増幅を行い、次世代シーケンス用ライブラリーを作成する。35 bp 分のシーケンスを GAIIx (illumina) により行い、以降、情報解析を行う。One-way ANOVA 解析後、各サンプル間で2倍以上の発現変動する遺伝子群を抽出し、表皮、皮層、内皮細胞層特異的な遺伝子群を抽出する。また、公共データベースのマイクロアレイデータを用いて、細胞伸長により器官 (胚軸) 成長が促進されている暗所芽生えで明所より発現が上昇しているものを抽出し、上述の表皮細胞層で高発現の遺伝子情報と合わせて、解析を行う。抽出できた遺伝子群について、T-DNA 挿入株や、強制発現株により、体系的な機能スクリーニングを、胚軸や花茎の成長を指標に行う。

4. 研究成果

LMD 法により、切り出しを行ったサンプルにおける RNA-sequencing を行った。35 bp の塩基配列決定後、シロイヌナズナの参照ゲノム配列にマッピング後、アノテーション情報に基づいて、各遺伝子の相対発現量を算出した。その後、花茎全体の切り出しサンプルのデータも入れた解析より、表皮、皮層、内皮細胞

層特異的な遺伝子群を抽出した。結果、1,767 遺伝子群が、表皮細胞層で高発現していることが分かった。その後、Gene ontology (GO) 解析により、表皮で合成が盛んなワックス関連の GO タームが濃縮していることが分かった。また、すでに表皮での特異的発現が論文で報告されている遺伝子群について、リストの中にも含まれていることも確認できた。以上のように、本解析が十分機能していると考えられた。次に、ワックス合成やその他の代謝系でなく、器官成長に関与し、協調的な作用に必要な因子を絞り込むために、公共データベースのマイクロアレイデータを用いて、細胞伸長により器官 (胚軸) 成長が促進されている暗所芽生えで明所より発現が上昇しているものを抽出した。その結果、550 遺伝子が暗所で明所より有意に発現上昇していることを見出した。次に、上述の表皮細胞層で高発現遺伝子群と暗所上昇遺伝子群で共通している 73 遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子群の GO 解析を行うと、“Cell Growth” のタームが濃縮されており、目的の因子が濃縮できていると期待できる。これらの遺伝子には、推定分泌ペプチド、転写因子や細胞壁関連因子などが含まれていた。現在、これらの遺伝子群に関して、T-DNA 挿入株や、強制発現株により、体系的な機能スクリーニングを、胚軸や花茎の成長を指標に行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

A bioinformatics approach to distinguish plant parasite and host transcriptomes in interface tissue by classifying RNA-Seq reads
Daisuke Ikeue, Christian Schudoma, Wenna Zhang, Yoshiyuki Ogata, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Takeshi Furuhashi, Friedrich Kragler and Koh Aoki
Plant Methods 11, 34 (2015), doi:10.1186/s13007-015-0066-6、査読有

FT-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice
Shojiro Tamaki, Hiroyuki Tsuji, Ayana Matsumoto, Akiko Fujita, Zenpei Shimatani, Rie Terada, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata and Ko Shimamoto
PNAS 112, E901-E910 (2015), doi: 10.1073/pnas.1417623112、査読有

Two different rickettsial bacteria invading *Volvox carteri*
Kaoru Kawafune, Yuichi Hongoh, Takashi Hamaji, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Shunsuke Hirooka, Shin-ya

Miyagishima and Hisayoshi Nozaki
PLoS ONE 10(2): e0116192 (2015) , doi:
10.1371/journal.pone.0116192、査読有

A plant U-box protein, PUB4, regulates asymmetric cell division and cell proliferation in the root meristem
Atsuko Kinoshita, Colette A. ten Hove, Ryo Tabata, Masashi Yamada, Noriko Shimizu, Takashi Ishida, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Yumiko Takebayashi, Satoshi Iuchi, Masatomo Kobayashi, Tetsuya Kurata, Takuji Wada, Mitsunori Seo, Mitsuyasu Hasebe, Ikram Blilou, Hiroo Fukuda, Ben Scheres, Renze Heidstra, Yuji Kamiya and Shinichiro Sawa
Development 142, 444-453 (2015) , 査読有

WOX13-like genes are required for reprogramming of leaf and protoplast cells into stem cells in the moss *Physcomitrella patens*
Keiko Sakakibara, Pascal Reisewitz, Tsuyoshi Aoyama, Thomas Friedrich, Sayuri Ando, Yoshikatsu Sato, Yosuke Tamada, Tomoaki Nishiyama, Yuji Hiwatashi, Tetsuya Kurata, Masaki Ishikawa, Hironori Deguchi, Stefan A. Rensing, Wolfgang Werr, Takashi Murata, Mitsuyasu Hasebe and Thomas Laux
Development 141, 1660-1670 (2014) , 査読有

Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land.
Bo Xu, Misato Ohtani, Masatoshi Yamaguchi, Kiminori Toyooka, Mayumi Wakazaki, Mayuko Sato, Minoru Kubo, Yoshimi Nakano, Ryosuke Sano, Yuji Hiwatashi, Takashi Murata, Tetsuya Kurata, Arata Yoneda, Ko Kato, Mitsuyasu Hasebe and Taku Demura
Science 343, 1505-1508 (2014) , 査読有

System for stable β -estradiol-inducible gene expression in the moss *Physcomitrella patens*.
Minoru Kubo, Akihiro Imai, Tomoaki Nishiyama, Masaki Ishikawa, Yoshikatsu Sato, Tetsuya Kurata, Yuji Hiwatashi, Ralf Reski and Mitsuyasu Hasebe
PLoS ONE, 8(9): e77356 (2013) , doi:
10.1371/journal.pone.0077356、査読有

High-resolution mapping of in vivo genomic transcription factor binding sites using in situ DNase I footprinting and ChIP-seq.
Onuma Chumsakul, Kensuke Nakamura, Tetsuya Kurata, Tomoaki Sakamoto, Jon L.

Hobman, Naotake Ogasawara, Taku Oshima and Shu Ishikawa
DNA Res. 20, 325-338 (2013) , 査読有

Digital gene expression profiling by 5'-end sequencing of cDNAs during reprogramming in the moss *Physcomitrella patens*.
Tomoaki Nishiyama, Kaori Miyawaki, Masumi Ohshima, Kari Thompson, Akitomo Nagashima, Mitsuyasu Hasebe and Tetsuya Kurata
PLoS ONE 7(5): e36471 (2012) , doi:
10.1371/journal.pone.0036471、査読有

¹⁰ FLC: a hidden polycomb response element shows up in silence.
Diana M. Buzas, Yosuke Tamada and Tetsuya Kurata
Plant Cell Physiol. 53, 785-793 (2012) , 査読有

〔学会発表〕(計4件)
Tetsuya Kurata,
Coordinated leaf growth through the action of sister Zn-finger transcription factors in *Arabidopsis*. 第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18日、富山大学(富山県、富山市)

倉田 哲也、大島 真澄、
シロイヌナズナの器官成長に必要な Zn フィンガー転写因子の解析、第77回日本植物学会大会、2013年9月13日、北海道大学(北海道、札幌市)

坂本 智昭、倉田 哲也、
伸長成長における細胞層間の協調化機構解明に向けた INTACT 発現解析系の確立、第77回日本植物学会大会、2013年9月14-15日、北海道大学(北海道、札幌市)

倉田 哲也、稲田 のりこ、深尾 陽一朗、藤原 正幸、梅田 正明、田坂 昌生、島本 功、
NAISTにおける植物科学グローバルトップ教育推進プログラム、第54回日本植物生理学会年会、2013年3月21日、岡山大学(岡山県、岡山市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 哲也 (KURATA, Tetsuya)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・准教授
研究者番号：50360540

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

坂本 智昭 (SAKAMOTO, Tomoaki)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・博士研究員
研究者番号：10600132