

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291062

研究課題名(和文)木部細胞分化を決定づける分子実態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular events determining xylem cell differentiation

研究代表者

出村 拓 (Demura, Taku)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：40272009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：木部道管細胞の分化において、NAC転写因子であるVND7による転写制御ネットワークの重要性が明らかになってきた。本研究ではVND7の発現と機能の制御について、VND7遺伝子領域のエピジェネティック修飾、シス/トランス因子、機能制御、道管分化過程のRNAの動態、に着目した。その結果、VND7遺伝子の発現がDNAメチル化とヒストンH3K27トリメチル化により抑制されていること、GATA転写因子がVND7のトランス因子であること、VND7のS-ニトロシル化修飾によりVND7の転写活性が変化する可能性、VND7遺伝子の関わる転写ネットワークで多様なmiRNAによる転写制御が存在する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：It has been revealed that the transcriptional network controlled by the NAC transcription factor VND7 is crucial for the differentiation of xylem vessel cells. In this research, to understand the regulatory mechanisms underlying the expression and function of VND7 gene, we elucidated the epigenetic modification of VND7 gene region, cis- and trans-factors for VND7 gene expression, functional regulation of VND7, and dynamics of small RNA during the vessel differentiation. As a result, it was revealed that the expression of VND7 gene is negatively controlled by DNA methylation and histone H3K27 trimethylation, that a GATA transcription factor is a possible trans-factor of VND7, that VND7 could alter its transactivation activity through the S-nitrosylation modification, and that various miRNA species could regulate transcriptional network in which VND7 gene is participating.

研究分野：植物生理学、植物分子生物学

キーワード：細胞分化 道管 転写制御 エピジェネティクス 小分子RNA

1. 研究開始当初の背景

維管束系は原形成層と維管束形成層を由来とする木部組織と師管組織の多種類の細胞から構成される複合組織である。これら維管束系を構成する細胞のうちで水やミネラルの通導に働く木部道管細胞については、その分化のしくみが近年の研究で急速に明らかになってきた。研究代表者らはこれまでに、NAC 転写因子をコードする VND7 とそのファミリー遺伝子が木部道管細胞の分化を制御するマスター因子であることを世界に先駆けて発見した (Kubo et al. Genes Dev 2005)。この発見を契機に、研究代表者らを含む国内外の複数の研究グループによって、VND7 と同じサブグループに属する NAC 転写因子遺伝子 (SND1/NST3, NST1) による木部繊維細胞の分化制御 (Mitsuda et al. 2007, Zhong et al. 2006) や、これら NAC 転写因子を起点にした多数の転写因子 (MYB, ASL, NAC, KNAT など) が関わる転写ネットワーク (Zhong et al. 2008, Nakano et al. 2010, Yamaguchi et al. 2011, Ohashi-Ito et al. 2010) が明らかとなった。一方で、これら木部細胞の分化において、上記 NAC 転写因子は道管や繊維細胞に時空間特異的に発現するものの、その発現を制御する上流シグナルについての知見は極めて断片的であった。そこで、本研究では、道管分化における VND7 の発現制御のメカニズムを探ること、道管形成制御の上流シグナルにアプローチすることとした。

2. 研究の目的

研究代表者らは、VND7 転写因子の発見をもとに、木部道管の分化のしくみについて、VND7 転写因子が直接的・間接的に制御する下流遺伝子群の同定とその機能解析、VND7 転写因子を利用した道管分化誘導系の開発、ヒメツリガネゴケとポプラにおける VND/NST/SND ファミリーホモログ遺伝子の機能解析、VND7 遺伝子の発現制御機構の解析、などの様々な研究を展開してきた (Yamaguchi et al. 2010, Ohtani et al. 2011)。この中で「VND7 遺伝子の発現制御機構の解析」として、VND7 遺伝子プロモーター上のシス領域の同定とトランス因子の探索を行った。その結果、VND7 遺伝子の道管特異的発現には転写開始点の上流 500 bp のプロモーター領域で十分であることが示された。さらに、VND7 遺伝子と共発現する転写因子遺伝子群に対してこの領域を用いたトランジェント LUC アッセイを行ったところ、GATA 転写因子である GATA5 (At5g66320) を含むいくつかのトランス因子候補が見出された。これらトランス因子を過剰発現させたシロイヌナズナでは、VND7 遺伝子の発現誘導を介した異所的な道管分化の誘導が起こると期待されるが、実際には、いずれの過剰発現シロイヌナズナでも異所的な道管分化の頻度は極めてく、VND7 遺

子の発現誘導にこれらトランス因子候補の単独での過剰発現が十分ではないことが示唆された。近年、様々な遺伝子の発現がエピジェネティックに制御されていることが示されている。また、VND7 遺伝子の第 2 エキソンの DNA 配列が高度にメチル化されているとの報告もあり (Zilberman et al. 2007)、VND7 の遺伝子発現もエピジェネティックな制御を受けている可能性が示唆されることから、本研究では、VND7 遺伝子の発現におけるエピジェネティック制御に着目した。

研究代表者らは、VND7 遺伝子の発見後、VND7 がマスター因子としての機能を発揮するためのメカニズムの解明に向けて、VND7 の強制発現による異所的な道管分化誘導が抑制される突然変異体の作出と解析を進めてきた。そこで本研究では、異所的な道管分化誘導が抑制される劣性の変異体である 2B-8 についての分子遺伝学的解析を行うことで、VND7 の機能発現に関する新知見へのアプローチを進めた。さらに、新規の道管分化誘導系を立上げ、mRNA と small RNA の RNA-seq 解析を行うことで、VND7 遺伝子の発現と機能に関わりうる網羅的な RNA 動態を解析した。そして、これらの成果を受けて、VND7 遺伝子の発現と機能の制御機構を明らかにし、木部道管細胞の分化決定に関わる分子実態を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) VND7 遺伝子の発現におけるエピジェネティック制御

in silico 解析により VND7 遺伝子領域の DNA メチル化とヒストン修飾の可能性を調べ、McrBC-PCR 法と ChIP-qPCR 等による検証を行う。また、道管分化と VND7 遺伝子の発現に対するエピジェネティック制御の阻害剤の効果を明らかにする。このために、シロイヌナズナ芽生えへの植物ホルモンの投与による異所的な道管分化の誘導系の確立を目指す。さらにエピジェネティクス制御に関連する突然変異体を用いた解析を行い、VND7 遺伝子の転写に対する DNA メチル化と H3K27 トリメチル化の関与を検証する。

(2) VND7 遺伝子のシス因子とトランス因子

シロイヌナズナにおいて VND7 遺伝子と共発現する転写因子遺伝子の解析から VND7 遺伝子の発現を正に制御するトランス因子の候補として、GATA5 等を同定している。本研究では、GATA5 やそのホモログの機能を明らかにするために、プロモーター解析、過剰発現解析、EMSA による VND7 プロモーター領域への結合解析、などを行い、VND7 遺伝子のトランス因子を同定する。

(3) VND7 の機能制御メカニズム

VND7 の機能制御に関わる新規遺伝子を探索するために、突然変異体の解析を行う。VND7 の強制発現によって異所的な道管分

化を誘導することができる形質転換シロイヌナズナを利用した順遺伝学解析から、VND7 の機能制御に関わる新たな遺伝子の探索を行う。

(4) 維管束木部分化における RNA の動態

VND7 が関わる転写ネットワークにおける RNA の動態に関する新知見を得るために、植物ホルモンによる異所的な道管分化誘導系における、mRNA と small RNA の RNA-seq 解析を行う。得られたデータから維管束木部分化と VND7 遺伝子の発現における small RNA の関与について検証を行う。

4. 研究成果

(1) VND7 遺伝子の発現におけるエピジェネティック制御

VND7 遺伝子の発現 (転写レベル) におけるエピジェネティクス制御について検証を行った。まず、UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) による in silico 解析を行い、VND7 遺伝子の第 2 エキソンに強い DNA メチル化と VND7 遺伝子のプロモーター領域に強いヒストン H3K27 のトリメチル化の可能性を見出した。



図 1 . UCSC Genome Browser の結果

そこで、McrBC-PCR 法による DNA メチル化解析を行ったところ、VND7 遺伝子第 2 エキソン領域が DNA メチル化を受けていることが確認された。また、抗トリメチル化ヒストン H3K Lys27 抗体を用いた ChIP-qPCR によって VND7 遺伝子のプロモーター領域と第 2 エキソン付近のヒストン H3K27 トリメチル化を確認した。次に、この結果を受けて、DNA メチル化阻害剤である 5-aza-dC の投与による VND7 遺伝子の発現への影響を調べたところ、シロイヌナズナ芽生えにおいて、1 μg/mL の 5-aza-dC の投与で VND7 mRNA 量が 2 倍以上上昇することがわかった。以前の研究において、シロイヌナズナ芽生えをオーキシン、サイトカイニン、ブラシノステロイド (2,4-D, kinetin, brassinolide) の 3 つの植物ホルモンで同時に処理することによって VND7 遺伝子の転写レベルが上昇することが分かっていた。そこでこの系を用いて VND7 遺伝子の転写における DNA メチル化 H3K27 トリメチル化の影響をさらに解析した。H3K27 トリメチル化については、H3K27 トリメチル化が抑制されている FIS-PRC2 複合体のコンポーネントである FIE の変異体 (pFIE:FIE-GFP/fie-1) を用いた。その結果、次の結果が得られた。1) FIE

変異体の芽生えに 3 種の植物ホルモンの同時処理を行うと異所的な道管要素の分化が強く誘導される。2) この時、5-aza-dC の投与でさらに多くの異所的な道管要素が分化する。3) VND7 遺伝子の転写量は FIE 変異体に 3 種の植物ホルモンと 5-aza-dC を同時に処理した時に最も高いレベルとなる。

これらのことから、VND7 遺伝子の転写には、少なくとも DNA メチル化と H3K27 トリメチル化が関わっていることが示唆された。

さらに、このような VND7 遺伝子発現の細胞エピジェネティック制御 (DNA メチル化と H3K27 トリメチル化の解除) が細胞特異的に起こる可能性を検証するために、維管束細胞特異的のマーカを用いたセルソーティングと ChIP-seq を試みた。これまでに、道管前駆細胞特異的のマーカでのセルソーティングと ChIP-seq を行ったが、VND7 遺伝子領域の道管前駆細胞特異的な H3K27 トリメチル化の解除を示す結果は得られなかった。(2) VND7 遺伝子のシス因子とトランス因子

VND7 遺伝子のトランス因子の候補として選抜された GATA5、GATA12、ANAC075 の機能検証を行った。VND7pro:GUS 導入シロイヌナズナの本葉にパーティクルボンバードメント法で 35Spro:各遺伝子を発現させたところ、いずれの場合も GUS 活性が誘導された。また、各遺伝子プロモーター:レポーター (YFP-NLS、GUS) を導入したシロイヌナズナはいずれも、根の未成熟な道管にシグナルが検出された。次に、エストロゲン誘導系を用いて各遺伝子の発現を誘導したところ、GATA12 と ANAC075 による異所的な道管分化が確認された。さらに、EMSA 解析によって、GATA12 が VND7 プロモーター領域 (ATG より 603bp) に結合しうることを明らかにした。これらの結果は GATA12 が VND7 のトランス因子である可能性を示唆しているが、GATA12 の過剰発現誘導による異所的な道管分化の際に内生の VND7 遺伝子の発現が上昇しないことも明らかとなり、内生の VND7 遺伝子発現の更なる制御因子の存在が示唆され、その可能性として、上記 (1) で解析したエピジェネティクス制御の可能性が強く予想されるに至った。

(3) VND7 の機能制御メカニズム

VND7 の機能制御に関わる新規遺伝子の探索として、突然変異体の解析を行った。本研究の開始前までに、DEX 処理によって人為的に異所的な道管分化を誘導できる VND7-VP16-GR (Glucocorticoid Receptor) を過剰発現させたシロイヌナズナを基にした突然変異体集団から、異所的な道管分化が強く抑制された 8 系統の突然変異体を単離していた。本研究では、それらの中で、劣性の変異体である 2B-8 について、詳細な表現型解析と責任遺伝子の同定を進めた。2B-8 変異

体は子葉などの葉脈に途切れができるほか、矮性となる、本葉がやや細長で下側にカールする、といった表現型を示すことがわかった。次世代シーケンサーを用いたりシーケンスによって責任遺伝子を探索したところ、*S-NITROSOGLUTATHIONE REDUCTASE 1* (*GSNOR1*) 遺伝子に点変異 (180 番目の塩基 G が A、36 番目のアミノ酸 E が K) が候補として見つかった。相補性試験の結果、*GSNOR1* が原因遺伝子であることが判明した。*S*-nitrosoglutathione Reductase は *S*-ニトロシル化修飾されたタンパク質を脱ニトロシル化する酵素で、シロイヌナズナには 1 遺伝子のみ存在する。*VND7* タンパク質には 4 か所の *S*-ニトロシル化修飾を受ける可能性があるシステイン残基があり、ピオチンスイッチ法による解析の結果、264 番目のシステインが *S*-ニトロシル化修飾を受ける可能性が見いだされ、*VND7* の機能制御に *S*-ニトロシル化が関わる可能性が新たに示された。

(4) 維管束木部分化における RNA の動態
VND7 が関わる転写ネットワークにおける RNA の動態に関する新知見を得るために、道管分化過程における mRNA と small RNA の動態を解析した。(1) に記載の通り、シロイヌナズナ芽生えに対する 3 つの植物ホルモン同時処理 (以後、KDB 処理) によって異所的な道管要素の分化を誘導できるが、最初にこの系の最適化を進めた。その結果、播種後 6 日目の芽生え子葉を切り出し、連続光下で KDB 処理を行うことで約 4 日後までに高頻度の道管要素分化を誘導できることを見出した。この系を用いて、mRNA と small RNA の変動を RNA-seq により解析した。まず、*VND7* とそのホモログ遺伝子群 (*VND1* ~ *VND6*) の mRNA レベルの変動を調べたところ、いずれの *VND* 遺伝子も KDB 処理でコントロールのモック処理よりも強い発現誘導を受けることが分かり、この誘導系での道管分化にすべての *VND* 遺伝子が関わる可能性が示唆された。そこで次に、いくつかの単独・多重変異体に対する KDB 処理を行ったところ、*VND1* ~ *VND3* の三重変異体 *vnd1/2/3* において極めて強い異所的な道管分化の抑圧が観察された。この時、維管束分化初期の制御遺伝子 (*MP*, *TMO5*, *LHW*, *ATHB8*, 他) の発現が抑制されなかったことから、*VND1* ~ *VND3* の機能ポイントは維管束分化初期制御遺伝子の下流であることが示唆された。また、mRNA の RNA-seq データの解析から、この実験系で *VND* 遺伝子群よりも上流の制御遺伝子群から下流の制御遺伝子群 (*MYB63* や *MYB83*) や形態形成に関連した遺伝子群 (セルロース合成酵素サブユニット遺伝子 *CesA4/7/8* や細胞死に関わるシステインプロテアーゼ遺伝子 *XCP1* など) の発現変動を詳細に追跡できることが示された。さらに、small RNA の RNA-seq データの解析から、KDB 処理で発現レベルが有意に変動する miRNA が多数見出された。

道管分化に關与する既知の miRNA である miR165/166 に加えて、*VND7* 遺伝子の下流遺伝子である *MYB63* や *MYB83* をターゲットとする miR858 などの発現レベルが減少することが分かり、*VND* 遺伝子の下流でも miRNA による遺伝子発現制御が存在する可能性が示された。

<参考文献>

Kubo et al. (2005) *Genes Dev* 19, 1855
Mitsuda et al. (2007) *Plant Cell* 19, 270
Nakano et al. (2010) *Plant Biotechnol* 27, 267
Ohashi-Ito et al. (2010) *Plant Cell* 22, 2461
Ohtani et al. (2011) *Plant J* 67, 499
Yamaguchi et al. (2011) *Plant J* 66, 579
Yamaguchi et al. (2010) *Plant Physiol* 153, 906
Zhong et al. (2006) *Plant Cell* 18, 3158
Zhong et al. (2008) *Plant Cell* 20, 2763
Zilberman et al. (2007) *Nature Genet* 38, 61

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32件)

Rejab, N.A., Nakano, Y., Yoneda, A., Ohtani, M., Demura, T. (2015). Possible contribution of TED6 and TED7, secondary cell wall-related membrane proteins, to evolution of tracheary element in angiosperm lineage. *Plant Biotechnol.* 32, 343–347 査読有

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.0826a

Watanabe, Y., Meents, M.J. McDonnell, L., Barkwill, S., Sampathkumar, A., Cartwrights, H., Demura, T., Ehrhardt, D., Samuels, L., Mansfield, S. (2015) Visualization of Cellulose Synthases in Arabidopsis Secondary Cell Walls. *Science* 350, 198–203 査読有

DOI: 10.1126/science.aac7446

Yamaguchi, M., Nagahage, I.S.P., Ohtani, M., Ishikawa, T., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M., Demura, T. (2015) Arabidopsis NAC domain proteins VND-INTERACTING1 and ANAC103 interact with multiple NAC domain proteins. *Plant Biotechnol.* 32, 119–123 査読有

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.0208a

Endo, H. 他 11 名、11 番目 (2015) Multiple classes of transcription factors regulate the expression of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, a master switch of xylem vessel differentiation. *Plant Cell Physiol.* 56, 242–254 査読有 DOI: 10.1093/pcp/pcu134

Schuetz, M., Benske, A., Smith, R.A., Watanabe, Y., Tobimatsu, Y., Ralph, J., Demura, T., Ellis, B., Samuels, L. (2014) Laccases Direct Lignification in the Discrete Secondary Cell Wall Domains of Protoxylem. *Plant Physiol.* 166, 798–807. 査読有 DOI: 10.1104/pp.114.245597

Xu, B. 他 16 名、16 番目 (2014) Contribution of NAC Transcription Factors to Plant Adaptation to Land. *Science* 343, 1505–1508. 査読有 DOI: 10.1126/science.1248417

Demura, T. (2014) Tracheary element differentiation. *Plant Biotechnol. Rep.* 8, 17–21. 査読有 DOI: 10.1007/s11816-013-0293-0

出村拓、大谷美沙都、日本農芸化学会「化学と生物」₁、セミナー室・植物細胞壁の情報処理システム「植物細胞壁：細胞壁形成の設計図、転写制御機構」₁、2015、Vol. 53, No 5, 313–318. 査読有

DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.53.313

Goué, N., Mortimer, J.C., Nakano, Y., Zhang, A., Jossierand, M., Ohtani, M., Dupree, P., Kakegawa, K., Demura, T. (2013) Secondary cell wall characterization in a BY-2 inductive system. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 115, 223–232. 査読有

DOI: 10.1007/s11240-013-0354-7

⑩ Nakano, Y., Nishikubo, N., Sato-Izawa, K., Mase, K., Kitano, K., Kajita, S., Demura, T., Katayama, Y. (2013) Transcription profiling identifies candidate genes for secondary cell wall formation and hydroxycinnamoyl-arabinoxylan biosynthesis in the rice internode. *Plant Biotechnol.* 30, 433–446. 査読有

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.0620a
他 22 件

〔学会発表〕(計 108 件)

Demura, T. “Transcriptional regulation during primary and secondary cell wall formation” 11th International Congress of Plant Molecular Biology, 2015 年 10 月 29 日, Iguazú Falls (ブラジル)

出村拓、「植物細胞壁を構築するための遺伝的プログラム」₁、第 67 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「作って壊して～植物は細胞壁で考える～」₁、2015 年 6 月 30 日、タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)

Demura, T. “Transcriptional switches controlling wood cell fates” 35th New Phytologist Symposium, 2015 年 6 月 17 日, Boston (アメリカ合衆国)

Demura, T. “Transcriptional Regulation of Cellulose Synthase” OIST mini symposium “Unraveling the mysteries of cellulose: From biosynthesis & biological diversity to biomaterials”, 2015 年 4 月 21

日、沖縄科学技術大学院大学 (沖縄県・恩納村)

出村拓、「スーパー樹木の創出ー遺伝子組換え育種とゲノム育種の行方ー」₁、BioJapan 2016 主催者セミナー「地球温暖化防止の切り札：樹木のバイオテクノロジー」₁、2014 年 10 月 15 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

平成 25 年度他 25 件

平成 26 年度他 45 件

平成 27 年度他 33 件

〔図書〕(計 1 件)

大谷美沙都、出村拓、技術情報協会出版、「セルロースナノファイバーの調製、分散・複合化と製品応用」₁、セルロース系バイオマスの生産に向けた GM 早生樹木の研究開発、2015、535 ページ (58–64).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出村 拓 (DEMURA, Taku)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：40272009