

シロイヌナズナ NAC 型転写因子 VND7 の活性調節を介した  
道管細胞分化制御の分子機構の解明

平井 理作  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 植物代謝制御研究室  
(出村 拓 教授)

令和2年7月27日提出

## 目次

1. 序論 .....	6
1-1 VND ファミリーによる道管細胞分化の制御機構 .....	6
1-2. 道管細胞分化を抑制する転写因子 .....	7
1-3. ストレスに応答した道管細胞分化制御 .....	7
1-4. ストレス応答とエピジェネティックな発現制御 .....	9
1-5. 本研究の目的 .....	9
2. 方法 .....	10
2-1. 植物材料と育成条件 .....	10
2-2. 道管細胞分化誘導のための DEX 添加処理 .....	10
2-3. クロロフィル定量 .....	10
2-4. 組織学的解析 .....	11
2-5. 顕微鏡観察 .....	11
2-6. 子葉の面積を元にした二次壁形成細胞率測定 .....	11
2-7. RNA 抽出 .....	12
2-8. 逆転写反応 .....	12
2-9. 発現量解析 .....	12
2-10. 発現パターンのクラスタリング解析 .....	13
2-11. 白化度合い指標とした道管細胞分化に影響を及ぼす細胞ストレス誘導剤の探索 .....	13
2-12. KDB 処理 .....	13
3. 結果 .....	15
3-1. VND7 活性レベル変化がもたらす道管細胞分化誘導への影響の解析 .....	15
3-1-1. DEX 濃度依存的なクロロフィル量変動 .....	15
3-1-2. DEX 濃度依存的な二次壁形成変動 .....	15
3-1-3. DEX 濃度依存的な VND7 下流遺伝子の発現量変動 .....	16
3-2. 細胞ストレス誘導剤処理が道管細胞分化に与える影響の解析 .....	17
3-2-1. VND7 による道管細胞分化をかく乱する細胞ストレス誘導剤の探索 .....	17
3-2-2. ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤が道管細胞分化に与える影響の解析 .....	18
3-2-2-1. HDAC 阻害剤による道管細胞分化阻害 .....	18
3-2-2-2. 道管細胞分化関連遺伝子の発現量に与える影響 .....	18
3-2-2-3. KDB システムをもちいた道管細胞分化への knat7 変異の影響の解析 .....	19

4. 考察 .....	20
4-1. DEX 濃度が VND7-VP16-GR の核移行へ与える影響の推定 .....	20
4-2. VND7 活性レベルに依存した道管細胞分化制御 .....	20
4-3. ヒストンアセチル化制御を介した道管細胞分化制御 .....	21
4-4. KNAT7 を含む転写抑制複合因子による道管細胞分化抑制 .....	22
4-5. OFP1/4-MYB75-KNAT7-BLH6 転写抑制複合体による VND7 の転写活性抑制メカニズム .....	23
4-6. エピジェネティックな遺伝子発現制御と道管細胞分化制御 .....	24
4-7. まとめ .....	24
5. 図表 .....	26
6. 参考文献 .....	56
7. 謝辞 .....	70

所属 (主指導教員)	植物代謝制御研究室 (出村 拓)		
氏名	平井 理作	提出	令和2年6月24日
題目	シロイヌナズナ NAC 型転写因子 VND7 活性調節を介した道管細胞分化制御の分子機構の解明		

被子植物がもつ道管は水の輸送を担う重要な組織である。所属研究室では、シロイヌナズナ道管細胞分化のマスター制御転写因子である VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN (VND) ファミリー (VND1~7) を同定し、その分子機能解析を行ってきた。VND タンパク質は転写活性化因子であり、道管細胞分化の重要な要素である二次細胞壁 (二次壁) 形成およびプログラム細胞死に関連する遺伝子群の発現を誘導することが明らかにされてきた。また、VND ファミリーの下流には複数の転写因子が存在しており、道管細胞分化は、VND ファミリーを起点とした複雑な転写制御によって達成されると考えられている。

これまでの植物分子生物学的研究は、植物が環境ストレスや病原菌感染に応答し、エピゲノム制御、転写制御、転写後制御といったさまざまな方法で自らの発生・成長を調節していることを明らかにしている。水輸送効率の制御も重要な制御要素の一つであり、例えば、病原菌感染や塩ストレス応答時には、VND7 発現誘導による異所的な道管細胞分化が起こることが示されている。また、VND7 の転写活性化活性はタンパク質 S-ニトロシル化修飾を通して直接的に細胞内レドックス状態の影響を受けることも示唆された。以上は、植物にとって、環境条件に適応した水輸送効率を実現するための鍵過程の一つが、VND 活性調節による道管細胞分化調節であることを想像させるが、VND 活性の変動自体が道管細胞分化にどのように影響するのか、また、どのような細胞ストレスが VND 活性およびその下流転写制御ネットワークを調節するのか、その分子的理解は十分ではない。

そこで本研究では、VND 活性調節による道管細胞分化制御の解明を目指して、

- 1) VND 活性レベルが道管細胞分化の転写制御ネットワークに与える影響の解析
- 2) VND 活性調節に寄与する細胞ストレスの探索とその作用機序の解析

を行った。実験材料としては、VND7 に転写活性化ドメイン VP16 およびグルココルチコイド受容体 (GR) を結合させたキメラタンパク質の過剰発現体である、シロイヌナズナ VND7-VP16-GR 植物体を使用した。この VND7-VP16-GR では、グルココルチコイド (例えば DEX) を添加処理することによって、VND7 活性が誘導され、全身的に異所的道管細胞分化誘導が起こる。この系では同調性高く、かつ再現性高く道管細胞分化を誘導できることから、VND7 活性調節の詳細解析に最適であると考え、以下の解析に用いた。

#### 1) VND7 活性レベルが転写制御ネットワークに与える影響の解析

先行研究によって、GR を利用した転写因子活性誘導系には、DEX 濃度依存性があることが示されている。そこで播種後7日目の VND7-VP16-GR を 0、1、10、100 nM DEX で処理し、プログラム細胞死の指標としてクロロフィル量の減少度を、また子葉総面積当たりの二次壁形成率を、それぞれ 24 時間ごとに観察した。その結果、1 nM DEX 処理は二次壁形成を弱く誘導する一方で、プログラム細胞死は誘導しないことがわかった。これに対し、10 nM および 100 nM DEX 処理では、有意な二次壁形成とプログラム細胞死の誘導が観察された。また、クロロフィル量の減少は、100 nM DEX 処理時には 24 時間後から、10 nM

DEX 処理の場合には 48 時間後に確認された。これらの結果から、道管細胞分化プロセスは低濃度 DEX 処理時には遅くなることも示された。

さらに、VND7 下流遺伝子の発現解析の結果、下流遺伝子の発現誘導のタイミングは DEX 濃度の低下に伴って遅くなること、VND7 下流遺伝子の発現ピークは DEX 濃度の低下によって有意に低くなること、も明らかとなった。また DEX 濃度低下の影響は、VND7 下流遺伝子の転写制御ネットワーク内の位置 (VND7 からの距離) に依存することも示され、転写制御ネットワーク内の階層依存的な影響が示唆された。

これらの結果は、VND タンパク質は、従来想定されてきたような道管細胞分化の誘導開始スイッチとして機能するだけでなく、転写活性依存的に下流遺伝子発現のタイミングとレベルを制御する、道管細胞分化プロセス調節因子でもあることを示唆している。

## 2) VND7 活性調節に寄与する細胞ストレスの探索とその作用機序の解析

次に、道管細胞分化に影響を与える細胞ストレス誘導剤の同定を行った。既知の細胞ストレス誘導剤 50 種類を、VND7-VP16-GR に対して 1 nM あるいは 10 nM の DEX と同時に添加処理し、クロロフィル量および二次壁形成率を調べた。その結果、道管細胞分化を促進する細胞ストレス誘導剤は見出されなかった一方で、道管細胞分化を阻害する細胞ストレス誘導剤として、グルタチオン、酸化型グルタチオン、Trichostatin A (TSA)、Sirtinol およびクエン酸ナトリウムが同定された。このうち、グルタチオンおよび酸化型グルタチオンは、VND7 活性制御への関与が既に報告されていることから、本試験の妥当性を支持する結果であると考えられた。

そこで、今回新たに見出された、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の活性阻害剤 TSA および Sirtinol について、詳細解析を行った。TSA および Sirtinol の添加タイミングを変えて分化への影響を調べたところ、TSA および Sirtinol は、いずれも DEX 誘導後 0~6 時間目までの分化誘導初期に作用することが分かった。また、TSA および Sirtinol 添加によって、直接標的遺伝子を含む下流遺伝子の多くについて発現低下が観察され、そのパターンは、1) で見られた VND7 活性レベルに依存した発現パターンと概ねよく似ていた。以上から、TSA および Sirtinol は、道管細胞分化誘導初期において VND7 活性を低下させる効果があると考えられた。また、HDAC 阻害による道管細胞分化の負の転写制御因子の発現を調べたところ、TSA 処理によって MYB75 と OVATE FAMILY PROTEIN1 (OFP1) が、Sirtinol によって OFP4 が、それぞれ発現上昇していた。MYB75、OFP1 および OFP4 は、KNAT7 および BLH6 と結合し、転写抑制複合体として機能することが知られており、このうち KNAT7 が木部形成特異的な制御因子である。そこで、HDAC 阻害による道管細胞分化の抑制に対する *knat7-1* 変異の影響を、ホルモン処理によって道管細胞分化を誘導する KDB システムを用いて調べた。この結果、TSA 処理は野生型において KDB システムによる道管細胞分化を強く抑制する一方で、*knat7-1* 変異体では TSA による道管細胞分化抑制が有意に緩和されており、HDAC 阻害による道管細胞分化阻害には KNAT7 が関与していることが示された。興味深いことに、KNAT7 自体の発現レベルは HDAC 阻害剤によって強い影響を受けないことも示された。すなわち、HDAC 阻害は、道管細胞分化初期の転写抑制複合体の基礎活性を上昇させることで VND7 活性に影響し、以降の転写制御ネットワークおよび道管細胞分化プロセスを調節することが示唆された。

以上、本研究では、VND7 活性レベルが道管細胞分化制御の重要な要素であることを実験的に示し、さらに VND7 活性制御因子として新たに HDAC を同定することに成功した。HDAC は、植物環境ストレス応答の重要制御因子であることはよく知られている。すなわち、本研究結果から、植物は HDAC による VND7 活性制御を通して、環境に適した道管形成を実現しているという新規の植物環境応答戦略が示唆されたと考えている。

## 1. 序論

### 1-1 VND ファミリーによる道管細胞分化の制御機構

陸上維管束植物がもつ道管は、水の輸送と植物体の支持を担う重要な組織である。道管細胞は、その分化途中に、セルロース、ヘミセルロース、リグニンからなる肥厚した二次細胞壁（二次壁）を発達させ、さらに最終的にはプログラム細胞死が起こり、中空構造になる、という複雑なプロセスを経て形成される (Turner et al., 2007)。分子生物学的研究の進展によって、道管細胞分化の分子メカニズムについては多くのことが明らかになってきた。その道管細胞分化研究進展の契機の一つは、人工的道管細胞分化誘導系の開発と利用である (Tan et al., 2019)。1980年に Fukuda and Komamine によって、ヒヤクニチソウの単離葉肉細胞を用いた道管細胞分化系が開発され (Fukuda and Komamine 1980)、これを用いた研究が進展し、細胞的特徴と遺伝子発現プロファイルに基づいた、道管細胞分化のステージ分けがなされた

(Demura and Fukuda, 1994; Turner et al., 2007)。さらに2005年には、シロイヌナズナ培養細胞を用いた人工的道管細胞分化系が確立され、道管細胞分化に伴うゲノムワイドトランスクリプトームデータが取得された (Kubo et al., 2005)。さらに Kubo ら (2005) は、得られたトランスクリプトームデータから、道管細胞分化初期に発現が上昇する NAC 型転写因子群 *VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN* (VND) ファミリーと名付けた (Kubo et al., 2005)。VND ファミリーは VND1~VND7 を含んでおり、VND 遺伝子は発達中の道管細胞に発現すること (Kubo et al., 2005; Yamaguchi et al., 2008)、また VND 遺伝子の過剰発現は二次壁の肥厚とプログラム細胞死を誘導する (Kubo et al., 2005; Yamaguchi et al., 2008, 2010a; Zhou et al., 2014; Endo et al., 2015) 一方で、VND 機能の人工的な機能抑制が道管細胞分化を抑制すること (Kubo et al., 2005; Yamaguchi et al., 2010b) から、VND ファミリーは道管細胞分化のマスタースイッチとして機能していることが示唆された。また、VND7 の過剰発現が強い道管細胞分化誘導を起こすこと (Kubo et al., 2005) や、全てのタイプの道管細胞で発現していること (Yamaguchi et al., 2008)、さらに VND1~VND6 は VND7 発現を誘導すること (Endo et al., 2015)、などから、現在のところ、VND ファミリーの中でも VND7 が、道管細胞分化を決定づける中心的な役割をもっていると考えられている

(Hussey et al., 2013; Nakano et al., 2015; Ohtani and Demura et al. 2019)。

2010年には、VND 遺伝子発現誘導系を用いたゲノムワイドトランスクリプトーム解析が行われ、VND タンパク質の直接標的因子が明らかとなった (Ohashi-Ito et al., 2010; Zhong et al., 2010; Yamaguchi et al., 2011; 図1)。この解析によって、VND7 は、二次壁形成に関わる遺伝子群、例えば二次壁特異的セルロース合成酵素である *CELLULOSE SYNTHASE A 4* (*CesA4*) や *CesA7* (Brown et al., 2005)、キシラン合成酵素である *IRREGULAR XYLEM 8* (*IRX8*) や *IRX10* (Peña et al., 2007) や、プログラム細胞死に働くプロテアーゼ *XYLEM CYSTEINE PEPTIDASE 1* (*XCPI*) (Funk et al.,

2002) や *METACASPASE 9 (MC9)* (Bollhöner et al., 2013) などの、道管細胞分化に機能する遺伝子群を制御することが明らかとなった (Ohashi-Ito et al., 2010; Zhong et al., 2010; Yamaguchi et al., 2011; 図 1)。また、*VND7* の下流には、*LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 30 (LBD30)*、*LBD15*、*LBD18* (Soyano et al., 2008; Ohashi-Ito et al., 2018) や *MYB46*、*MYB83*、*MYB63* (Zhou et al., 2009; Ko et al., 2009; Zhong et al., 2012) などの転写因子が多く含まれていることも分かった。上記の LBD タンパク質は *VND7* 発現を正に制御することから、*VND7* と *LBD* の間には正のフィードバック制御の存在が示唆されている (Soyano et al., 2008; Ohashi-Ito et al., 2018)。また、*MYB46* および *MYB83* は、*VND7* が標的とする *CesA* 遺伝子など二次壁関連遺伝子の発現を誘導し (Zhong et al., 2012)、*VND7* といわゆる feed-forward loop を形成している (Taylor-Teeple et al., 2015; Turco et al., 2019)。

### 1-2. 道管細胞分化を抑制する転写因子

*VND* ファミリー遺伝子は道管細胞分化を正に制御するが、*VND* ファミリーの下流には道管細胞分化や二次壁形成を抑制する転写因子も知られている。例えば、NAC 型転写因子に分類される *VND-INTERACTING2 (VNI2)* (Yamaguchi et al., 2010b)、*XYLEM NAC DOMAIN1 (XND1)* (Zhao et al., 2007; Zhang et al., 2019) や、ホメオボックス転写因子である *BEL1-LIKE HOMEODOMAIN6 (BLH6)* (Liu et al., 2014; Liu and Douglas, 2015) や *KNOTTED ARABIDOPSIS THALIANA3 (KNAT3)* (Wang et al., 2020)、*KNAT7* (Bhargava et al., 2010; Li et al., 2011, 2012; Liu and Douglas, 2015)、OVATE FAMILY PROTEIN に属する *OFF1* や *OFF4* (Li et al., 2011; Liu and Douglas, 2015)、MYB 転写因子である *MYB4*、*MYB5*、*MYB7*、*MYB32*、*MYB75* (Preston et al., 2004; Ko et al., 2009; Bhargava et al., 2010, 2013) である。これらのうち NAC 型転写因子である *VNI2* と *XND1* は *VND7* とヘテロダイマーを形成してその機能を抑制する可能性が示唆されている (Yamaguchi et al., 2010b; Zhang et al., 2019)。また、ホメオボックス型転写因子の *BLH6*、*KNAT7* と MYB 転写因子である *MYB4*、*MYB7*、*MYB32* は、前述の *MYB46* の下流遺伝子であると考えられている (Ko et al., 2009; Zhong and Ye 2012; 図 1)。すなわち、道管細胞分化過程では、*VND7* を中心とした正の制御と、上記の道管細胞分化を負に制御する転写因子群の複雑な転写制御ネットワークが形成されており、この転写制御ネットワークによって、様々な状況に合わせた道管細胞分化が達成されていると考えられる (Ohashi-Ito and Fukuda, 2010; Hussey et al., 2013; Nakano et al., 2015; Ohtani and Demura, 2019; McCahill and Hazen, 2019)。

### 1-3. ストレスに応答した道管細胞分化制御

さまざまなストレスによって道管細胞分化が影響を受けることは古くから報告されている。例えば、wound vessel members と呼ばれる損傷によって誘導される異所的な道管細胞 (Jacobs, 1952; Comer, 1987) や塩ストレスを受けたダイズの根における道管細胞数増加 (Hilal et al., 1998) などが知られており、真菌病原体 *Verticillium*

*longisporum* の感染によって、維管束鞘細胞の道管細胞化が起こること (Reusche et al., 2012) も報告されている。興味深いことに、シロイヌナズナの根では塩ストレス処理が VND7 発現を上昇させ (Taylor-Teeple et al., 2015)、また、*V. longisporum* 感染時には VND7 発現が有意に上昇する (Reusche et al., 2012)。さらに ATTED-II (Obayashi et al., 2018) を用いた遺伝子共発現データベース解析からは、VND ファミリーを含む道管細胞分化に関する転写因子遺伝子の発現パターンは、塩や乾燥といったストレス存在下と非存在下では異なっていることも示唆された (Ohtani and Demura, 2019)。すなわち、こうした生物的・非生物的ストレスは VND ファミリー遺伝子の発現変化を通して、道管細胞分化に影響を与えていると考えられる。さらに、分子遺伝学的研究からも、VND ファミリー遺伝子を介した環境に適した道管細胞分化制御の重要性が示唆されている。VND ファミリーの中でも、VND1、VND2、VND3 は分子系統樹上でサブグループを形成しており、根の分裂組織領域でも発現するという特徴をもつ (Kubo et al., 2005; Yamaguchi et al., 2008)。*vnd1 vnd2 vnd3* 三重変異体の表現型解析の結果、*vnd1 vnd2 vnd3* は明条件下では野生型と同様の葉脈を形成する一方、暗条件では葉脈パターンが単純化し、二次葉脈以降が形成されないことが分かった (Tan et al., 2018)。さらに *vnd1 vnd2 vnd3* では VND 遺伝子発現パターンの光応答性が乱れ、また光に応答した側根形成促進が起こらないことも示された (Tan et al., 2018)。この結果は、VND1~VND3 が光環境と道管形成や芽生えの発生をつなぐ、重要因子であることを示唆している。また、VND7 活性を人工的に誘導する VND7-VP16-GR システム (Yamaguchi et al., 2010a; 図 2) を導入したシロイヌナズナを用いた順遺伝学的解析から、道管細胞分化抑制変異体 *suppressor of ectopic vessel cell differentiation induced by VND7 (seiv)* 変異体が単離され、そのうち *seiv1* は細胞内の一酸化窒素 (NO) 代謝に関わる酵素 *S-NITROSOGLUTATHIONE REDUCTASE 1 (GSNOR1)* の機能欠損型変異体であることが分かった (Kawabe et al., 2018; Ohtani et al., 2018)。この解析の結果、VND7 タンパク質は S-ニトロシル化修飾を受けることや、S-ニトロシル化されるシステイン残基は、VND7 の転写活性に重要であることも示された。加えて、道管細胞分化を抑制する転写因子である XND1 は VND7 とヘテロダイマーを作ることが示唆され、細菌感染の際にその遺伝子発現が上昇することが知られている。また、この XND1 のノックアウト変異体である *xnd1-5* は細菌感染への抵抗性が低下することも報告されている (Tang et al., 2018)。こうした研究結果は、細菌感染や NO 代謝といった細胞内環境の変化が VND7 の翻訳後制御に作用し、直接的に VND7 活性を変化させ道管細胞分化を制御する可能性を示している。

以上の情報を統合すると、VND ファミリーは通常発生時の道管細胞分化マスタースイッチとして機能するだけでなく、環境状況に応じてその発現レベルやタンパク質活性を変化させ、環境に応じて道管細胞分化を調節する鍵因子としても機能していると考えられるが、その詳細メカニズムについては、いまだ分っていないことが多いのが現状である。



#### 1-4. ストレス応答とエピジェネティックな発現制御

植物は環境変化や植物ホルモンに応答してヒストン修飾を介したクロマチン再構成や、遺伝子発現制御を介して環境への応答を達成している。例えば RPD3-like ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) のうち、Class I サブファミリーに分類される *HDA19* の変異体 *hda19-3* ではストレス応答遺伝子の発現と耐塩性が上昇し、逆に Class II に分類される HDAC の変異体である *hda5/14/15/18* 四重変異体では耐塩性が低下することが報告されている (Ueda et al., 2017; 2019)。また、光応答はヒストンアセチル化酵素 (HAT) である *GENERAL CONTROL NONDEREPRESSIBLE5*

(*GCN5*)、*TBP-ASSOCIATED FACTOR 1* (*TAF1*) と HDAC である *HDA19* によって拮抗的に制御され、*HDA15* の細胞内局在は光環境によって制御されていることが報告されている (Benhamed et al., 2006; Alinsug et al., 2012)。植物ホルモンへの応答では、*HDA6* と *HAD9* はオーキシシグナル (Yuan et al., 2019)、*Sirtuin1* (*SRT1*) と *SRT2* はエチレンシグナルに関わることが報告されている (Zhang et al., 2018)。道管細胞形成にはオーキシンやエチレンシグナル、光応答が重要な役割を果たす

(Fukuda and Komamine 1980, Kubo et al., 2005, Pesquet et al., 2011; 2013; Tan et al., 2018) ことを考慮すると、これらのエピジェネティックな遺伝子発現制御が道管細胞分化に関わることが推測されるが、道管細胞分化とエピジェネティックな発現制御の関連性は明らかになっていないことが多い。

#### 1-5. 本研究の目的

以上を背景に、本研究では、「道管細胞分化制御における VND 活性調節の役割の解明」を目的に、

- 1) VND 活性レベルが道管細胞分化の転写制御ネットワークに与える影響の解析
- 2) VND 活性調節に寄与する細胞ストレスの探索とその作用機序の解析

を行った。実験材料としては、VND7 に転写活性化ドメイン VP16 およびグルココルチコイド受容体 (GR) を結合させたキメラタンパク質を過剰発現させた、シロイヌナズナ *VND7-VP16-GR* 植物体を使用した。この *VND7-VP16-GR* では、グルココルチコイド (例えば DEX : デキサメタゾン) を添加処理することによって、VND7 活性が誘導され、全身的に異所的な道管細胞分化誘導が起こる (図 2, 図 3)。この道管細胞分化誘導は DEX 添加依存的で同調性が高く、かつ再現性が高いことから、VND7 活性調節の詳細解析に最適であると考え、本博士論文研究の解析材料として用いた。

## 2. 方法

### 2-1. 植物材料と育成条件

植物材料として、所属研究室で確立された 35S:VND7-VP16-GR 導入シロイヌナズナ形質転換体 (Col 背景、以降 VND7-VP16-GR と表記; Yamaguchi et al., 2010) と 35S:VP16-GR 導入シロイヌナズナ形質転換体 (Col 背景、以降 VP16-GR と表記; Yamaguchi et al., 2010) と Columbia-0 (Col-0) および *knat7-1* 変異体 (Col 背景) を用いた。本研究では作成された VND7-VP16-GR のうち、特にもっとも強く道管細胞分化が誘導されるライン 6II-8-2 を用いた。種子滅菌は、70% (v/v) エタノールで 1 分間処理、上清を捨て滅菌水で 2 回洗浄、10% (v/v) 次亜塩素酸で 15 分処理、滅菌水で 2 回洗浄、により行った。滅菌した種子は 24~72 時間 4°C にて遮光低温処理した後、以下に示す発芽培地を角型プレート (栄研化学) に 30 ml 分注したものに播種し、22~23°C の連続光のインキュベーター (EZ-220、日本医化器械製作所) で育成した。次世代の種子を得る際には、約 2 週間発芽培地で育てた芽生えを、ピートモスを主原料にした育苗ポット (ジフィー7、Jiffy Product International AS) に移植し、22~23°C の 18 時間明期/6 時間暗期に設定したインキュベーター (LH-220S、日本医化器械製作所) で育成した。

発芽培地 (pH を 5.7 に KOH で調整)

1 L 用 Murashige & Skoog 培地用混合塩類 (Wako)	1 袋
Sucrose (ナカライテスク)	10 g
2- (N-Morpholino) ethanesulfonic acid (ナカライテスク)	0.5 g
Gellan gum (Wako)	0.6 g
RO 水	Up to 1L

### 2-2. 道管細胞分化誘導のための DEX 添加処理

エタノールに溶解した 10  $\mu$ M DEX (SIGMA) ストック溶液をエタノールまたは滅菌水で希釈し、目的の濃度になるように調製した。エタノール濃度は終濃度で 0.1% (v/v) になるように調製した。DEX 処理は角型プレートで作成した発芽培地上で 7 日間育成した芽生え (上記条件で育成) に 20 ml の DEX 溶液を加え、通常育成と同様のインキュベーター内で水平静置することで行った。

### 2-3. クロロフィル定量

5-9 個体の DEX 処理した芽生え全体を、キムワイプを詰めた 1.5 ml チューブに入れ 1,000 rpm, 4°C 3 分で遠心し水気を取ったあと、計量し、生重量を算出した。計量した芽生えを 2 ml チューブに移し、1 ml あたり生重量が 1.7 mg 以下になるようジメチルホルムアミド (ナカライ) を加え、4°C に一晚静置しクロロフィル抽出した。クロロフィル定量は分光法によって行い、分光光度計 (DU640, Beckman もしくは INFINITE

MNANO, Tecan) を用いて A480、A646.8、A663.8、A750 を計測し、Porra ら (1989) の式に従ってクロロフィル量を算出した。

#### 2-4. 組織学的解析

透明化観察のための固定処理は、芽生えを要時調製した固定液 (10% (v/v) 酢酸、90% (v/v) エタノールの混合液) の入った 1.5 ml チューブに回収し、4°Cで一晩以上静置し行った。固定したサンプルは、90、70、50、30% (v/v) エタノール中で 20 分ずつ静置したのちに滅菌水に移して水和した。

VND7-VP16-GR および VP16-GR の観察および二次壁形成細胞率の測定には水和後のサンプルを 5 ng/ml の濃度の PI (Sigma) 水溶液染色液に入れ一晩遮光条件で転倒混和したのち、滅菌水で 2 回洗浄し PI 染色を行った。透明化およびスライドガラスへの封入は以下に示す TOMEI 液を用いた (Hasegawa et al., 2016)。

KDB 処理 (2-12.に記載) を行った子葉については固定液で固定した後、上記のエタノールシリーズで水和し、以下に示す透明化液でスライドガラスとカバーグラスに封入し、マニキュアシールプレパラートを作成した。

##### ストック溶液 A

没食子酸プロピル (ナカライテスク)	25 mg
EtOH (ナカライテスク)	Up to 1 ml

##### TOMEI 液

1/10 ストック溶液 A (PBS で希釈)	100 $\mu$ l
PBS	200 ml
2,2'-チオジエタノール (Sigma-Aldrich)	9.7 ml

##### 透明化液

抱水クロラル (ナカライテスク)	8 g
グリセロール (ナカライテスク)	1 ml
RO 水	2 ml

#### 2-5. 顕微鏡観察

作製した観察用サンプルは共焦点顕微鏡デジタル撮影システム (FV10i, Olympus) を用いて観察・撮影した。芽生えの観察・撮影には実体顕微鏡デジタル撮影システム (SXZ16 および DP72, Olympus) を用いた。

#### 2-6. 子葉の面積を元にした二次壁形成細胞率測定

FV10i を用いて撮影した顕微鏡画像を Image J を用い Max intensity で Z スタック画像を 1 枚にしたのち、Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) のプラグインである

Mosaic J (Thévenaz and Unser, 2007) を用いて結合させた。結合させた画像から子葉の面積および二次壁が形成されている領域を計算した。二次壁形成細胞率は二次壁が形成されている面積/子葉の面積とした。

## 2-7. RNA 抽出

9-10 個体ずつ回収し、キムワイプを用いて水気を取り除いたあと、2 ml ビーズショッカー破砕用チューブに入れ、液体窒素を用いて凍結させたのち-20°Cで保存した。回収したサンプルはビーズショッカー (Tissuelyser II, Qiagen) を用いて破砕したのち、1 ml TRIzol (Invitrogen) を加え、手でよく攪拌したのち、5 分間静置した。その後、200 ml クロロフォルム (ナカライテスク) を加え、15 秒攪拌し、120,000g, 4°C, 15 分で遠心分離した。上清を 450 ml とり、同量の 450 ml の 70 %エタノール (v/v) を加え、RNeasy (QIAGEN) を用いて RNA を精製し、-80°Cで保存した。

## 2-8. 逆転写反応

回収した RNA を Nanodrop (Thermo Fisher scientific) を用いて RNA 量を測定し、1-2 mg の RNA に対し RQ DNase (Thermo Fisher Scientific) を用いて DNase 処理を行った。RQ DNase のプロトコルに従い DNase の不活化を行ったのち、3 M NaOAc を 10 ml、70%エタノール (v/v) を 500 ml 加え-80°Cで一晩静置しエタノール沈殿を行った。エタノール沈殿を行ったサンプルを 150,000 rpm, 4°C, 20 分で遠心し、上清を取り除き、70 %エタノール (v/v) で洗浄したのち、10 ml 滅菌水に RNA を溶解した。溶解した RNA を Nanodrop で濃度測定したのち、1 mg になるように各サンプルを PCR チューブへ分注し、12 ml になるように滅菌水でメスアップした。この RNA を Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche) とオリゴ dT (18 mer) を用いてプロトコルに従い逆転写反応を行った。

## 2-9. 発現量解析

発現解析には Light Cycler 480 II (Roche) を用いて以下に示す反応液組成の 10  $\mu$ l の系で行った。プライマーは表 1 のものを用いて以下に示す反応条件で定量 PCR を行なった。内在性コントロールは UBIQ10 とし、 $\Delta\Delta C_t$  法を用いて計算し UBIQ10 に対する相対定量を行った。また、プライマーはすべて北海道システムサイエンス (<https://www.hssnet.co.jp/>) に合成を依頼した。

### 反応液組成

---

Light cycler 480 SYBR Green I Master (Roche)	5 $\mu$ l
Forward primer	0.5 $\mu$ l

Reverse primer	0.5 $\mu$ l
cDNA (RO 水で 5 倍希釈したもの)	2 $\mu$ l

#### qPCR 反応条件

	Target ( $^{\circ}$ C)	Ramp rate ( $^{\circ}$ C/second)	
Pre-incubation	95	4.8	
Amplification Denature (45 cycles)	95	4.8	
	Annealing	60	2.5
	Extension	72	4.8
Cooling	50	2.5	

#### 2-10. 発現パターンのクラスタリング解析

UBQ10 によって標準化された RT-qPCR のデータを DEX 濃度もしくは阻害剤処理区ごとに分け、生物学的反復の平均値を計算に用いた。標準化を行ったのち、MeV ver. 4.9.0 (Saeed et al., 2003) を用いてヒートマップの作図とピアソン相関係数による遺伝子ごとの発現パターンをクラスタリングした (Pearson correlation; average linkage clustering method)。

#### 2-11. 白化度合い指標とした道管細胞分化に影響を及ぼす細胞ストレス誘導剤の探索

細胞ストレス剤処理には、1 well あたり 1 ml の発芽培地を入れた 12 well プレート (Corning) に滅菌した種子を 9 粒播種し、七日間生育させた VND7-VP16-GR を用いた。細胞ストレス誘導剤処理は七日齢の VND7-VP16-GR に DEX と表 2 に示す細胞ストレス誘導剤入りの溶液を 1 ml 加えることによって行った。細胞ストレス誘導剤の濃度は表 2 に示した、基準濃度を元に 3 つの濃度 (基準濃度を 1 とした場合、1/10、1、10) に分けて 3 日間処理を行った。また、細胞ストレス誘導剤のストック溶液は処理時に溶媒の終濃度が 0.1% (v/v) になるように調製した。道管細胞分化を亢進する細胞ストレス誘導剤の探索には 1 nM DEX 処理が処理後 3 日で視認できる白化を示さない事、クロロフィル量の低下を示さず、子葉面積の約 40% が異所的な道管細胞を形成することからこれを用いた。道管細胞分化を亢進する細胞ストレス誘導剤の探索には、10 nM DEX が視認できる程度の白化を誘導する事と子葉面積の約 80% が異所的な道管細胞を形成することから、これを用いた。

#### 2-12. KDB 処理

角型プレートに播種し栽培した発芽後 7 日目の芽生えからハサミを用いて子葉を切り出し、6 well plate (Corning) を用いて以下に示す KDB 溶液につけ 22~23 $^{\circ}$ C の連

続光のインキュベーター (EZ-220、日本医化器械製作所) で KDB 処理を行った (Tan et al., 2018)。これらの植物ホルモンの溶媒には DMSO を用いた。

#### KDB 用植物ホルモンストック溶液

---

Kinetin (ナカライテスク)	5 mg/ml
2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Wako)	50 mg/ml
Brassinolide (Wako)	10 mM

---

#### KDB 溶液

---

Kinetin ストック溶液	0.5 $\mu$ l
2,4-dichlorophenoxyacetic acid ストック溶液	0.5 $\mu$ l
Brassinolide ストック溶液	5 $\mu$ l
1/2 液体発芽培地	Up to 50 ml

---

### 3. 結果

#### 3-1. VND7 活性レベル変化がもたらす道管細胞分化誘導への影響の解析

先行研究では、*VND7-VP16-GR* (35S::*VND7-VP16-GR*) を 10  $\mu$ M DEX で処理することで、播種後 7 日目の芽生え全身的に異所的道管細胞分化が起きることが報告されている (Yamaguchi et al., 2010a)。このシステムの基盤となっているグルココルチコイドレセプター (GR) システムについては、0~1  $\mu$ M DEX の範囲で、DEX 濃度と誘導される転写因子活性の間に正の相関がある事が報告されている (Aoyama and Chua, 2000)。そこで、VND7 活性レベルの大小が道管細胞分化にもたらす影響を明らかにするため、*VND7-VP16-GR* において DEX 濃度変化が VND7 活性誘導を変化させ道管細胞分化率に影響することを期待し、*VND7-VP16-GR* およびベクターコントロール *VP16-GR* (35S::*VP16-GR*; Yamaguchi et al., 2010a) を材料として 0、1、10、100 nM DEX 処理による道管細胞分化の様子を調べた (図 3A-H)。処理後 3 日目の様子を観察した結果、*VP16-GR* ではどの濃度の DEX 処理でも芽生えの成長が継続して起こった一方で、*VND7-VP16-GR* では 10 nM および 100 nM DEX 処理時に、明瞭な子葉の白化と、芽生えの成長阻害が見られた (図 3G, H)。また、100 nM DEX では芽生えが完全に白化し枯死することも分かった (図 3H)。これに対して、0 nM および 1 nM DEX 処理の場合には *VND7-VP16-GR* はそのまま成長を続けることも分かった (図 3E, F)。

以上の結果を受けて、0、1、10、100 nM といった DEX 濃度変化が道管細胞分化に与える影響について詳細解析を行った。

#### 3-1-1. DEX 濃度依存的なクロロフィル量変動

*VND7-VP16-GR* および *VP16-GR* の播種後 7 日目の芽生えを 0、1、10、100 nM DEX で処理し、処理後 0、24、48、72 時間目にサンプリングを行った。回収した芽生えサンプルからクロロフィルを抽出し定量した結果、*VP16-GR* においてはどの時点においても、クロロフィル量の大きな変動は見られなかった (図 3I-L)。その一方、*VND7-VP16-GR* では、DEX 濃度依存的なクロロフィル量変動が見いだされた (図 3I-L)。0 nM と 1 nM DEX 処理では植物体の白化や有意なクロロフィル量低下は見られなかったが (図 3E, F, I, J)、10 nM DEX 処理では 72 時間後に、100 nM では 24 時間後から、クロロフィル量が有意に低下していた (図 3K, L)。クロロフィル量の低下は、道管細胞分化によって引き起こされるプログラム細胞死によると考えられることから、この結果は、プログラム細胞死の誘導は、DEX 濃度の影響を受けることを示している。

#### 3-1-2. DEX 濃度依存的な二次壁形成変動

さらに二次壁形成への DEX 濃度の影響を調べるため、*VND7-VP16-GR* および *VP16-GR* の播種後 7 日目の芽生えを 0、1、10、100 nM DEX で処理し、0、24、48、72 時間目に回収した。PI 染色および TOMEI 法による透明化サンプルを観察した結果、*VP16-*

GR では DEX 濃度に関わらず異所的な道管細胞分化は全く見られなかった (図 4 E, J, O, T)。これに対して、*VND7-VP16-GR* では、0 nM DEX 処理では 72 時間後にごく少数の異所的二次壁の形成が、それ以外の濃度では明瞭な異所的二次壁形成が、処理後 24~48 時間以降に観察された (図 F-I, K-N, P-S)。二次壁形成は、1 nM DEX 処理した *VND7-VP16-GR* では処理後 48 時間から (図 4H)、10 nM および 100 nM DEX 処理した *VND7-VP16-GR* では処理後 24 時間 (図 4L, Q, U) から、それぞれ観察された。また、10 nM DEX 処理 24 時間目の *VND7-VP16-GR* の二次壁形成細胞は、二次壁を示す蛍光シグナルが弱く、また核を持つ細胞が多く観察されたことから (図 4Q)、10 nM DEX 処理 24 時間目では、道管細胞分化途中の細胞が多いと考えられる。

また、子葉における二次壁形成細胞率を定量化するため、子葉について得られた複数の共焦点画像を貼り合わせて子葉全体像を作製し、子葉総面積あたりの二次壁形成細胞面積が占める割合を測定した (図 5)。この結果、1 nM DEX 処理では処理 72 時間後に約 40% の、10 nM および 100 nM DEX 処理では約 80~100% の二次壁形成細胞率が観察された (図 5)。以上から、DEX 濃度が低下すると二次壁分化のタイミングが遅れ、さらに最終的な分化効率も低下することが分かった。

### 3-1-3. DEX 濃度依存的な *VND7* 下流遺伝子の発現量変動

続いて、*VND7* 下流因子の遺伝子発現への影響を明らかにするため、*VND7-VP16-GR* および *VP16-GR* の播種後 7 日目の芽生えを 0、1、10、100 nM DEX で処理し、0 時間目から 6 時間おきに 72 時間目まで回収し、定量的 RT-PCR 解析を行った。*VND7* 下流因子としては、*LBD30* (Soyano et al., 2008)、二次壁合成制御のマスター転写因子である *MYB46* (Zhong et al., 2007; Kim et al., 2012; Zhong et al., 2012; Ko et al., 2014)、リグニン生合成制御転写因子である *MYB63* (Zhou et al., 2009)、プログラム細胞死に関わるプロテアーゼ *XCP1* および *MC9* (Bollhöner et al., 2013)、セルロース合成酵素 *CesA7* (Brown et al., 2005; Persson 2005)、ヘミセルロース合成酵素 *IRX8* (Peña et al., 2008)、リグニン合成関連酵素 *CAFFEOYL COENZYME A ESTER O-METHYLTRANSFERASE7* (*CCoAOMT7*) (Raes et al., 2003) を選び、これらに加えて内在性 *VND7* についても発現を調べた。その結果、*CCoAOMT7* 以外の全ての遺伝子について、DEX 濃度が高いほど発現のピークのタイミングが早く、ピーク時の発現量が高くなるという傾向が見いだされた (図 6, 7)。また、*CCoAOMT7* では、10 nM DEX と 100 nM DEX の間に大きな違いが見いだされなかった (図 6)。

これらの遺伝子のうち、*LBD30*、*MYB46*、*MC9* および *XCP1* は *VND7* のダイレクトターゲットであり (Ohashi-Ito 2010; Yamaguchi et al., 2010a)、*MYB63*、*CesA7*、*IRX8*、*CCoAOMT7* は *MYB46* のダイレクトターゲットであると考えられている (Kim et al., 2012; Zhou et al. 2009; Zhong et al., 2012)。こうした転写制御ネットワーク構造関係と遺伝子発現パターンに関連があるかを調べるため、遺伝子発現パターンの階層的クラスタリングを行った (図 8)。その結果、*VND7*、*LBD30*、*XCP1*、*MC9* からなるグループ



1、*MYB46*, *CesA7*, *IRX8*, *CCoAOMT7* からなるグループ 2、*MYB63* のみのグループ 3 に明確に分けることができた (図 8)。

### 3-2. 細胞ストレス誘導剤処理が道管細胞分化に与える影響の解析

#### 3-2-1. VND7 による道管細胞分化をかく乱する細胞ストレス誘導剤の探索

VND7 による道管細胞分化に影響を与える新たな因子を同定するため、*VND7-VP16-GR* における道管細胞分化をかく乱する細胞ストレス誘導剤の探索を行った。既知の細胞ストレス誘導剤 50 種類 (表 2) について、植物に影響することが報告されている濃度に加え、その 1/10 倍および 10 倍の合計 3 段階の濃度で、1 nM あるいは 10 nM DEX 処理と同時に播種後 7 日目の *VND7-VP16-GR* 芽生えに 3 日間処理を行った。処理個体の白化程度を指標に分化程度を判定した結果、1 nM DEX 処理下で道管細胞分化を促進すると判定された細胞ストレス誘導剤が 25 種、10 nM DEX 処理下で道管細胞分化を抑制すると判定された細胞ストレス誘導剤が 12 種、それぞれ見いだされた (表 3)。しかしながら、道管細胞分化を促進すると判定された細胞ストレス誘導剤 25 種について、処理個体の子葉を顕微鏡観察したところ、ほとんどの場合に異所的二次壁形成が起こっていないことが分かった。さらに DEX 未処理時やコントロール個体においても、これら細胞ストレス誘導剤の処理によって子葉が白化する様子が観察されたことから、これら白化促進は道管細胞分化とは関連しないストレス誘導による細胞死 (ネクロシス) によると推測された。また、ネクロシスを引き起こさないと思われた細胞ストレス誘導剤 3 種類 (Ethylenediaminetetraacetic acid、Streptomycin、5-Fluorouracil) について、二次壁形成細胞率を測定したところ、いずれの細胞ストレス誘導剤も二次壁形成促進効果はないことが分かった (図 9)。以上から、今回調べた細胞ストレス誘導剤の中には、*VND7-VP16-GR* において道管細胞分化を促進する化合物は含まれていないと結論した。

一方、道管細胞分化を抑制する細胞ストレス誘導剤 12 種について、同様に子葉における二次壁形成細胞率を調べたところ、Citrate acid、酸化型グルタチオン、還元型グルタチオン、Trichostatin A (TSA) および Sirtinol の 5 種について、有意に二次壁形成細胞率を抑制することが示された (図 10)。これら 5 種の細胞ストレス誘導剤のうち、TSA および Sirtinol はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の機能阻害剤である (Grozing et al., 2001; Chang and Pikaard, 2005; Bourque et al., 2011; Liu et al., 2017; Mengel et al., 2017; Ueda et al., 2017)。また、酸化型グルタチオンおよび還元型グルタチオンは細胞内チオール環境をかく乱する化合物であるが、すでに所属研究室の先行研究によって、VND7 が直接的に S-ニトロシル化修飾を受けること、この S-ニトロシル化が VND7 の転写活性制御において重要であることが示されている (Kawabe et al. 2018; Ohtani et al. 2018)。タンパク質 S-ニトロシル化は、酸化型グルタチオンおよび還元型グルタチオンの影響を受けるため、本研究で得られた酸化型グルタチオンおよび還元型グルタチオンによる道管細胞分化の抑制効果は、こうした VND7 の機能かく乱を反映していると考えられた。HDAC 阻害剤である TSA は、同時に、タンパク質

の S-ニトロシル化を促進する事も報告されている (Mengel et al., 2017)。そこで、TSA およびタンパク質 S-ニトロシル化を抑制する NO スカベンジャー 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) の同時処理を行い、TSA による道管細胞分化の抑制効果が、酸化型グルタチオンおよび還元型グルタチオンと同様に VND7 の S-ニトロシル化に関連しているのかを調べた (図 11)。その結果、TSA による道管細胞分化の抑制は、cPTIO 添加による影響を受けなかった見られなかった (図 11C) ことから、TSA による道管細胞分化抑制はタンパク質 S-ニトロシル化ではなく、主には HDAC 機能阻害にあると推測した。

### 3-2-2. ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤が道管細胞分化に与える影響の解析

これまでに、HDAC 機能と道管細胞分化制御の関係についてはほとんど知られていない。そこで以降は TSA と Sirtinol に関して詳細な解析を行うことにした。

#### 3-2-2-1. HDAC 阻害剤による道管細胞分化阻害

2-1. で見いだした TSA および Sirtinol について、3-1-1. および 3-1-2. と同様に、二次壁形成細胞率への影響を調べた (図 12, 13)。その結果、TSA の場合には調べた全ての濃度で、Sirtinol では 10  $\mu$ M のときのみ、有意な白化程度の低下と二次壁形成細胞率の低下が観察された (図 12, 13)。また、TSA および Sirtinol が作用するタイミングを明らかにするため、DEX 処理後 0、6、12 時間後に 5  $\mu$ M TSA あるいは 10  $\mu$ M Sirtinol を添加し、その影響を調べたところ、いずれも DEX 添加と同時に処理した場合のみ、白化程度の抑制と有意な二次壁形成細胞率の低下が観察された (図 14, 15)。このことから、TSA および Sirtinol による HDAC 機能阻害は、VND7 によって誘導される道管細胞分化の初期過程に作用し、道管細胞分化を阻害していると考えられる。

#### 3-2-2-2. 道管細胞分化関連遺伝子の発現量に与える影響

HDAC 阻害剤が VND7 による下流遺伝子発現誘導に与える影響を明らかにするため、VND7-VP16-GR を 10 nM DEX と 5  $\mu$ M TSA、あるいは 10 nM DEX と 10  $\mu$ M Sirtinol で処理し、処理後 0、6、12、18、24、48、72 時間目のサンプルを用いて定量的 RT-PCR 解析を行った。1-3. と同様の VND7 下流遺伝子 (図 6) について調べた結果、MC9 と MYB63 を除くすべての遺伝子の発現が抑制されることが分かった (図 16, 17)。このことから、HDAC 阻害剤は VND7 そのもの (あるいは VND7 のごく近傍) に作用し、VND7 を起点とした転写制御ネットワークをかく乱している可能性が示唆された。そこで、HDAC 阻害剤処理が上記 1. で示した DEX 濃度低下と同様の効果をもたらしているのか調べるため、1 nM DEX および 10 nM DEX 処理時の遺伝子発現データを元にした階層的クラスタリング解析結果と、10 nM DEX への HDAC 阻害剤添加および非添加の遺伝子発現データを元にした階層的クラスタリング解析結果を比較した (図 18)。その結果、TSA 処理と Sirtinol 処理はほぼ同じクラスタリング結果をもたらして

おり (図 18B, C)、両者が転写制御ネットワークに類似の作用をもたらしていることが分かった。さらに、いずれの場合でも *MC9* と *MYB63* のグループとそれ以外の遺伝子からなるグループに分かれる点は共通している一方で、HDAC 阻害剤処理では、低濃度 DEX 処理時に見いだされた転写制御ネットワーク内の位置に依存した遺伝子発現制御の変化とは異なる、転写制御ネットワークとは関連の見られないパターンを示した (図 18)。以上から、HDAC 阻害剤処理は、下流遺伝子発現パターンに VND7 活性低下とよく似た影響だけを与えるものの、それだけでは説明出来ない側面もあることが示唆された。

HDAC 機能の阻害は、ヒストンの過剰アセチル化を引き起こし、遺伝子発現を亢進する方向に働くと期待される (Jenuwein and Allis, 2001; Wang et al., 2014) が、上記の結果は、VND7 下流遺伝子の発現が抑制されることを示した。そこで、HDAC 阻害剤処理は、道管細胞分化の負の制御因子の発現を上昇させるのではないかと考え、既知の 11 の転写因子、すなわち *VND-INTERACTING 2* (*VNI2*, Yamaguchi et al., 2010b)、*MYB75* (Bhargava et al., 2010, 2013)、*KNOTTED ARABIDOPSIS THALIANA 7* (*KNAT7*, Bhargava et al., 2010; Li et al., 2011, 2012; Liu and Douglas, 2015)、*Xylem NAC domain 1* (*XND1*, Zhao et al., 2007)、*BELI-LIKE HOMEODOMAIN 6* (*BLH6*, Liu et al., 2014; Liu and Douglas, 2015)、*MYB 4* (Preston et al., 2004; Ko et al., 2009)、*MYB 5*・*MYB 7*・*MYB 32* (Preston et al., 2004)、および、*OVATE FAMILY PROTEIN 1* (*OFP1*)・*OFP4* (Li et al., 2011; Liu and Douglas, 2015) について、発現解析を行った (図 19, 20)。その結果、TSA 処理によって *MYB75* と *OFP1* の発現が、Sirtinol 処理によって *OFP4* の発現が、それぞれ DEX 処理誘導後 6 時間目以降に上昇していた (図 19, 20)。OFP1、OFP4 および MYB75 は *KNAT7* や *BLH6* と複合体を形成し、木部細胞形成を抑制する転写抑制することが知られている (Bhargava et al., 2010; Li et al., 2011, 2012; Liu and Douglas, 2015)。すなわち、HDAC 阻害によって、OFP1/4-MYB75-KNAT7-BLBH6 転写抑制複合体の発現が誘導され、道管細胞分化が阻害されている可能性が示唆された。

### 3-2-2-3. KDB システムをもちいた道管細胞分化への *knat7* 変異の影響の解析

最後に、HDAC 阻害は OFP1/4-MYB75-KNAT7-BLBH6 転写抑制複合体の機能を介して道管細胞分化を阻害しているという上記の可能性を検証するため、転写抑制複合体の中でも木部形成特異的因子である *KNAT7* に注目し (Zhong et al., 2008; Li et al., 2011; 2012)、*knat7-1* 変異が異所的な道管細胞分化にもたらす影響についてホルモン処理によって道管細胞分化を誘導する KDB システム (Tan et al., 2018) を用いて調べた。この結果、TSA および Sirtinol 処理は、野生型で見られる KDB システムによる道管細胞分化を強く抑制することが分かった (図 21B, C)。一方で、*knat7-1* 変異体では TSA による道管細胞分化抑制が緩和されており (図 22D)、HDAC 阻害による道管細胞分化阻害には、少なくとも部分的に、*KNAT7* が関与していることが示された。

## 4. 考察

### 4-1. DEX 濃度が VND7-VP16-GR の核移行へ与える影響の推定

先行研究により、VND7-VP16-GR は 10 mM という高濃度の DEX 処理によって植物体全身に異所的な道管細胞分化による二次壁の肥厚とプログラム細胞死が起こった結果として、白化することが報告されている (Yamaguchi et al., 2010a)。これまでに GR を結合させたタンパク質の挙動は動物細胞を用いて研究されており、beta galactosidase-GR は 10 mM DEX 処理で 5 分以内、green fluorescent protein-GR は 1 nM DEX 処理で 3 分以内に核移行が起こること、GR と結合したタンパク質の活性に DEX 濃度依存性があることが報告されている (Picard et al., 1987; Htun et al., 1996)。これらの報告から、幅広い DEX 濃度で GR を結合させたタンパク質の核移行が数分単位の素早い反応として起こると予想される。したがって、VND7-VP16-GR においてその核移行は分単位の反応であることが推測され、本研究で観察された VND7-VP16-GR の濃度依存性は VND7-VP16-GR タンパク質の核移行速度によるものではなく、VND7-VP16-GR タンパク質の核移行量によるものだと考えられる。本研究の発現量解析において低濃度 (1 nM および 10 nM) DEX 処理では VND7 下流遺伝子の発現ピークの遅延だけでなく、最大発現量が低下していることが観察されており (図 6-8)、この考察を支持している。

### 4-2. VND7 活性レベルに依存した道管細胞分化制御

シロイヌナズナ VND7 は、その過剰発現によって、ほとんどすべての種類の細胞を道管細胞へと分化転換させること (Kubo et al., 2005; Yamaguchi et al., 2010; Endo et al., 2015)、VND7 は二次壁形成やプログラム細胞死といった道管細胞分化過程で機能する遺伝子発現を誘導すること (Ohashi-Ito et al., 2010; Yamaguchi et al., 2011; Zhou et al., 2014) などから、道管細胞分化開始のマスター制御因子であると考えられてきた (Kubo et al., 2005; Yamaguchi et al., 2008.; Zhong et al., 2010; Endo et al., 2015; Nakano et al., 2015; Ohtani and Demura, 2019)。本研究では、VND7 自身の活性レベルに着目し、人工的 VND7 活性誘導システムである VND7-VP16-GR (Yamaguchi et al., 2010) を利用して、VND7 活性レベルを変化させた際の道管細胞分化への影響を明らかにすることを試みた。

VND7-VP16-GR に処理する DEX 濃度を低下することで誘導する VND7 活性レベルを低下させたところ、プログラム細胞死誘導によるクロロフィル量減少 (図 3I-L) および二次壁形成 (図 4-5) のいずれについても、開始のタイミングが遅れることが分かった。同様の様子は VND7 下流因子の遺伝子発現解析でも観察され、下流遺伝子の発現誘導のタイミングは DEX 濃度の低下に伴って遅くなること、VND7 下流遺伝子の発現ピークは DEX 濃度の低下によって有意に低くなること、が見いだされた (図 6)。以上の結果から、VND7 活性レベルの変化は、道管細胞分化過程の進行を大きく

変化させる重要要素であることが示された。

さらに、1 nM DEX 処理ではクロロフィル量減少と芽生え発生阻害が起こらない(図 3F, J) 一方で、二次壁形成はその進行速度は遅いものの誘導される様子が観察された(図 4F-I, 図 5)。すなわち、道管細胞分化に関わる各プロセスの進行を可能にする VND7 活性レベルは、プロセスごとに異なっており、二次壁形成はより低い VND7 レベルでも進行しうることが示唆された。VND7 下流遺伝子の発現解析からは、他の VND7 下流遺伝子と比較して、とくにプログラム細胞死に関わるメタカスパーゼをコードする *MC9* 遺伝子 (Escamez et al., 2016) の発現パターンに対する DEX 濃度低下の影響が大きいことが示されている(図 6-8)。先行研究により、*MC9* 遺伝子プロモーターに存在する推定 VND7 認識配列の配列保存性は、他の VND7 標的遺伝子に比べて低いことが分かっているため (Tamura et al., 2019)、こうした発現パターンへの影響の違いは、VND7 によるプロモーター配列結合性の強弱に依存していると考えられる。また、遺伝子発現データを用いた階層的クラスタリング解析結果は、DEX 濃度低下の影響は転写制御ネットワーク内の位置、つまり VND7 からの制御関係距離に依存することを示している(図 8)。プログラム細胞死関連遺伝子群は VND7 の直接的発現誘導制御を受ける一方で、二次壁関連遺伝子群は、VND7 に加えて二次壁形成マスター制御転写因子である MYB46 や MYB83 の転写制御を強く受ける (Ko et al., 2009, 2014; Zhong et al., 2012; Kim et al., 2014)。こうした転写制御ネットワーク内の階層構造が、各プロセスの VND7 活性レベル依存性の違いを生み出し、より精緻な道管細胞分化制御を達成していると考えられる。

以上、本研究の結果から、VND タンパク質は、従来想定されてきたような道管細胞分化の誘導開始スイッチとして機能するだけでなく、転写活性依存的に下流遺伝子発現のタイミングとレベルを制御する、道管細胞分化プロセス調節因子でもあることが示唆された。不要なプログラム細胞死は植物発生において避けねばならないことを考えると、プログラム細胞死の進行により高い VND7 活性が必要とされる(図 8) という結果は生理学的には妥当であり、非常に興味深い。また、VND 活性レベルの強弱が二次壁形成プロセス進行に影響することで、最終的に形成される道管細胞の性質が決定されている可能性が浮上した。VND7 の転写活性が細胞内レドックス環境の影響を受けること (Kawabe et al., 2018, Ohtani et al., 2018)、各 VND ファミリーの発現強度は道管細胞の種類ごとに異なること (Yamaguchi et al., 2008)、VND7 および VND6 の上流制御遺伝子である *E2Fc* は活性依存性があることが報告されていることから (Taylor-Teeples et al., 2015)、生体内での道管細胞分化の際にもこれらの遺伝子の制御による VND7 活性レベルの違いが生まれていると考えられる。今後の詳細解析による VND 活性レベルの具体的貢献についてのさらなる解明を期待したい。

#### 4.3. ヒストンアセチル化制御を介した道管細胞分化制御

先行研究によって、道管細胞分化はさまざまな環境ストレス、例えば損傷ストレス (Jacobs, 1952; Comer, 1987)、塩ストレス (Hilal et al., 1998; Taylor-Teeples et al., 2015)、

細菌感染 (Reusche et al., 2012)、光環境 (Tan et al., 2018) などの影響を受けることが明らかにされてきた。また、道管細胞分化に影響を与える環境因子として、グルタチオン (Henmi et al., 2001, 2005) や NO (Kawabe et al., 2018; Ohtani et al., 2018) が報告されている。とくに Kawabe ら (2018) は、VND7 が S-ニトロシル化を受けること、この S-ニトロシル化が VND7 の転写活性に大きく影響することを示し、細胞内チオール環境が直接的に道管細胞分化に反映される可能性を示唆している (Kawabe et al., 2018; 図 23)。本研究でも、VND7-VP16-GR における異所的道管細胞分化に影響する細胞ストレス誘導剤として、グルタチオンや酸化型グルタチオンが同定され (表 3, 図 10)、VND7 による道管細胞分化誘導における細胞内チオール環境の重要性を支持する結果となった。以上から、道管細胞分化時には、さまざまな環境情報が VND タンパク質の活性制御に反映され、状況に応じた道管細胞が作られていると考えられる。

本研究では新たに、HDAC の阻害剤である TSA と Sirtinol による VND7 による道管細胞分化抑制を見いだした (図 13, 20)。シロイヌナズナゲノムには 22 個の HDAC 遺伝子が存在しており、これらは *REDUCED POTASSIUM DEFICIENCY 3 (RPD3) -like HDAC* (16 個)、*HD-tuin* (4 個)、*Sirtuin* (2 個) の 3 種類に分類される (Hollender et al., 2008)。このうち、TSA は PRD3-like HDAC および HD-tuin を阻害し、Sirtinol は Sirtuin を特異的に阻害する (Chang and Pikaard, 2005; Ueda et al., 2017; Bourque et al., 2011; Grozinger et al., 2001, Liu et al., 2017)。遺伝子発現解析の結果は、TSA と Sirtinol は VND7 下流遺伝子群によく似た影響をもたらすことを示しており (図 18)、本研究からは HDAC クラスと道管細胞分化との関わりについては更なる情報を得ることはできなかった。

#### 4-4. KNAT7 を含む転写抑制複合因子による道管細胞分化抑制

HDAC の阻害はヒストンの過剰アセチル化を引き起こし、遺伝子発現を上昇させると考えられる。そこで、道管細胞分化を抑制する転写因子の発現を調べたところ、興味深いことに、TSA および Sirtinol 処理は、*MYB75* や *OFP1*、*OFP4* といった道管細胞分化の負の制御因子の発現を上昇させることが分かった (図 19, 20)。*MYB75* や *OFP1*、*OFP4* は *KNAT7* と *BLH6* とともに *OFP1/4-MYB75-KNAT7-BLH6* 転写抑制複合体を形成することが知られている (Bhargava et al., 2010; Li et al., 2011, 2012; Liu and Douglas, 2015)。これらのうち木部特異的因子は *KNAT7* であり (Zhong et al., 2008; Li et al., 2011, 2012)、*KNAT7* および *BLH6* のノックアウト変異体 *knat7-1* および *blh6-1* では、道管細胞の二次壁形成異常に起因する道管が潰れる表現型 (*irregular xylem*, *irx* 表現型と呼ばれる、Li et al., 2012; Liu and Douglas, 2015; Wang et al., 2020) の程度が比較的マイルドに現れる一方で、*knat7 blh6* 二重変異体では *irx* 表現型が亢進され、強い道管異常が起こる (Liu et al., 2014)。本研究では、*knat7-1* 変異体では KDB システムにおける TSA による道管細胞分化の抑制が緩和されることを見だし (図 22)、TSA による道管細胞分化阻害の少なくとも一部は、*KNAT7* を含む *OFP1/4-MYB75-KNAT7-BLH6* 転写抑制複合体によって起こっている可能性が示された (図 23)。すなわち、HDAC 活性が

低下すると、*MYB75* および *OFPI/4* の発現が道管細胞分化初期に上昇し、これによって *OFPI/4*-*MYB75*-*KNAT7*-*BLH6* 転写抑制複合体の形成が促進されることで *VND7* の転写活性化が阻害され、道管細胞分化が負に制御される、と考えられる。

*KNAT7* は ChIP-PCR の結果から、*VND7* 上流の転写因子である *REVOLUTA (REV)* のプロモーターに直接結合し、*REV* の発現を抑制することが報告されている (Liu et al., 2014)。KDB 処理によっても *REV* の発現は誘導されるが (Tan et al., 2018)、本研究では野生型と *knat7-1* 変異体の間に Mock 処理では有意な道管細胞数の違いは見られなかった (図 22)。Liu ら (2014) の行った ChIP-PCR は、*MYB75* や *OFPI/4* が発現している花茎を用いていることから (Bhargava et al., 2010; Li et al., 2011)、*KNAT7* による *REV* の発現抑制にも *MYB75* や *OFPI/4* が関わっているかもしれない。

#### 4-5. *OFPI/4*-*MYB75*-*KNAT7*-*BLH6* 転写抑制複合体による *VND7* の転写活性抑制メカニズム

*OFPI* および *OFPI4* は Ovate ファミリーに属する転写因子である。転写抑制ドメイン Ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression (EAR) を持つものの (Ohta et al., 2001; Wang et al., 2007)、明確な DNA 結合モチーフを持たず単体では核内移行せず、*BLH* 転写因子と結合することによって核内へ移行することが報告されている (Hackbusch et al., 2005, Wang et al., 2007)。*MYB75* は単独では弱い転写活性化因子として働き、*MYB75* の過剰発現はアントシアニンの高蓄積を誘導することが知られている (Borevitz et al., 2000; Bhargava et al., 2010)。ポプラの *PtrMYB6* は *MYB75* に近い *MYB* 転写因子で、*MYB75* と同様に過剰発現ではアントシアニンを蓄積し、*KNAT7* と結合し二次壁肥厚を抑制することが報告されている (Wang et al., 2019)。*PtrMYB6* による二次壁肥厚の抑制では *PtrMYB6* が二次壁関連遺伝子のプロモーターに結合し二次壁肥厚が抑制されると考えられることから、シロイヌナズナの *MYB75* による抑制も同様に *MYB75* が二次壁関連遺伝子プロモーターに結合しているかもしれない。本研究で発現解析を行った遺伝子のプロモーター領域に *MYB75* 結合モチーフ (C/T)CNCCAC(A/G)(A/T)(G/T) または (C/T)(A/C)NCCACN(G/T)(G/T) (Dare et al., 2008) があるか調べたところ、TSA 処理によって発現が低下していた、*VND7* (2 kb, Kubo et al., 2005; -1423~-1432, -1585~-1594)、*XCPI* (705 bp, Yamaguchi et al., 2011, -690~-699)、*MYB46* (3 kb, Zhong et al., 2007; -1567~-1576)、*CesA7* (1.5 kb, Taylor et al., 1999, -1175~-1184, -1224~-1235)、のプロモーター上には *MYB75* 結合モチーフが存在した。また、*LBD30* (Soyano et al., 2008, -2587~-2596) には開始コドンから 3 kb 以内に *MYB75* 結合モチーフが存在した。このうち、*XCPI*、*LBD30* および *MYB46* は *VND7* のダイレクトターゲットである。また、*VND7* プロモーターには *VND7* が結合しうることを報告されている (Endo et al., 2015) ことから、TSA によるこれらの遺伝子の発現低下は、*MYB75* が *VND7* プロモーターに直接結合し、*KNAT7*、*OFPI* や *BLH6* との転写抑制複合体を形成し *VND7* による転写の抑制を引き起こすためかもしれない。また、*CesA7* は *VND7* のダイレクトターゲットではなく、*MYB46* によって制御される

(Kim et al., 2012) と考えられるため、MYB75 を含む転写因子複合体は MYB46 による転写も抑制するかもしれない。これらのことから、OFP1/4-MYB75-KNAT7-BLH6 複合体は MYB46 を含む VND7 のダイレクトターゲットの発現を低下させることによって分化率を低下させていると考えられる。一方、TSA により発現が低下する *IRX8* (2.7 kbp, Peña et al., 2007)、*CCoAOMT7* (1.5 kbp, Zhong et al., 2012)、TSA による影響を受けない *MC9* (1500 bp, Tsiatsiani et al., 2013)、*MYB63* (3 kb, Zhou et al., 2009) のプロモーター上および上流 3 kb 以内に MYB75 結合モチーフは存在しなかった。*IRX8* および *CCoAOMT7* は MYB46 による制御を受けていると考えられているため、この転写抑制複合体によるこれらの遺伝子への影響は MYB46 を介した間接的なものであるかもしれない。TSA によって発現が低下しない *MC9* および *MYB63* の上流配列が MYB75 結合モチーフを持たないこと、*myb75-1* 変異体で VND7 と MYB46 のダイレクトターゲットを含む二次壁合成関連遺伝子の発現が上昇することは、この考察を支持している (Bhargava et al., 2010)。これらの情報を用いて *OFP1/4* や *MYB75* の発現上昇が VND7 の転写活性化機構へ与える影響の解析は今後の課題の一つである。

#### 4-6. エピジェネティックな遺伝子発現制御と道管細胞分化制御

*VND7* プロモーターおよび第一イントロンから第二エクソン領域は DNA メチレーション修飾を受けており、ヒストンも H3K27me3 修飾を受けていることが報告されている。DNA メチル化阻害剤である 5-adC の存在下では *VND7* の発現が上昇することが報告されている (Endo, 2014)。一方、本研究では 5-adC による道管細胞分化の亢進は見られなかった (表 2, 3)。本研究では七日齢の芽生えに阻害剤を処理しているが、子葉の細胞分裂は発芽後 3 日以内に終わるとされていること (Stoynova-Bakalova et al., 2003)、5-adC による DNA メチレーションの阻害は細胞分裂の際に起こるとされていることから、本研究の実験条件では子葉細胞において 5-adC による DNA メチル化阻害は起こらなかったため道管細胞分化への影響が観察されなかったのかもしれない。また、DNA メチル化もヒストンアセチル化と同様にストレス応答に関わることが報告されている (Dowen et al., 2012; Le et al., 2014)。今後、これらのエピジェネティックな発現制御と環境に応じた道管細胞分化の制御メカニズムの理解は今後の課題の一つである。

#### 4-7. まとめ

本研究で得られた結果を総合すると、植物は環境の変化に応じて HDAC 活性を制御しているが、この HDAC 活性の強弱を OFP1/4-MYB75-KNAT7-BLH6 転写抑制複合体の活性に反映することで、環境に適した道管細胞分化を実現している、と推測される。以上、本研究によって、「植物は HDAC による VND7 活性制御を通して、環境に適した道管形成を実現している」、という新規の植物環境応答戦略を示唆することが出来たと考えている。





5. 図表

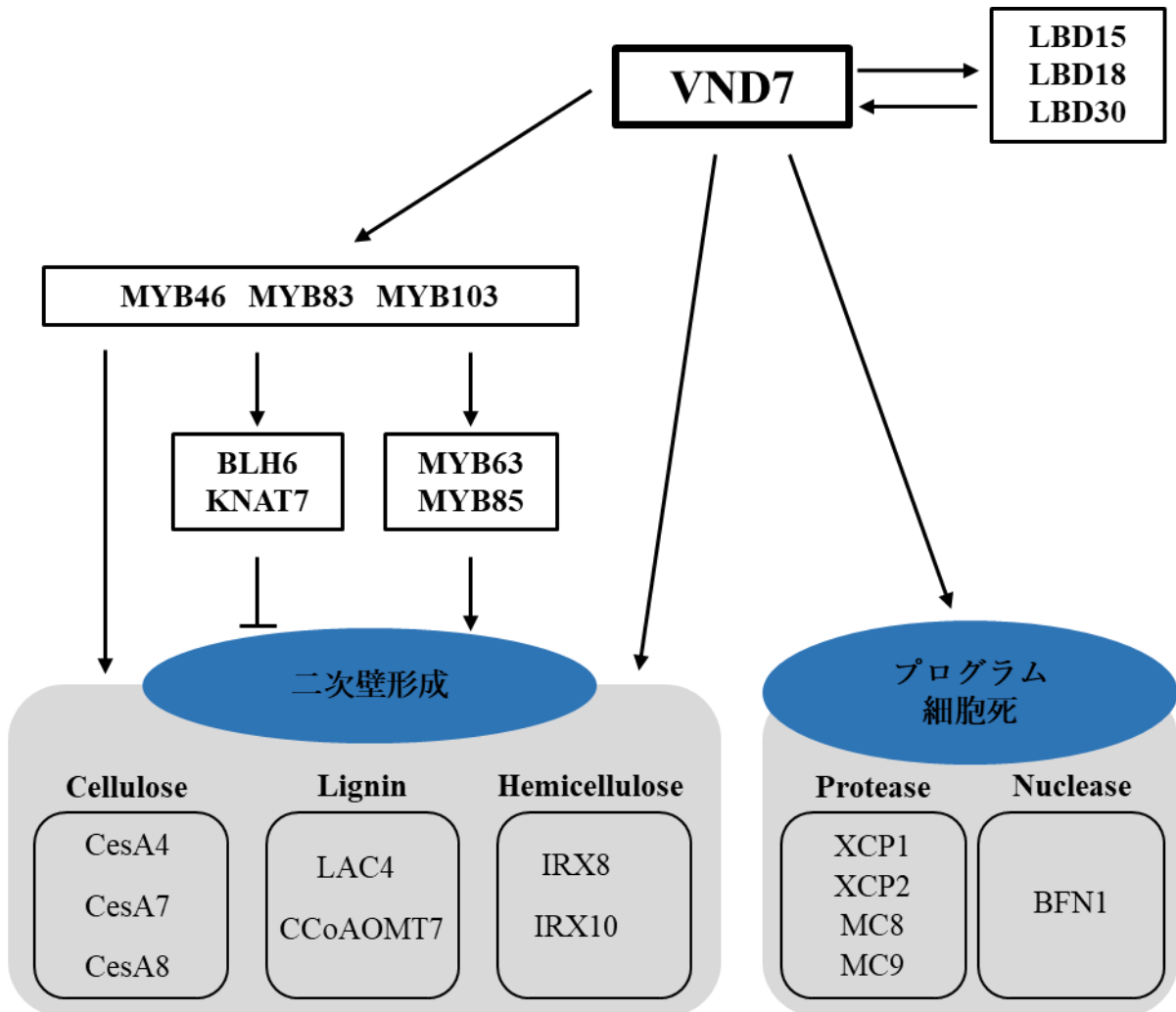


図1. VND7を基点とした NAC-MYB 転写ネットワーク構造

VND7はLBD転写因子群とポジティブフィードバックを形成する。また、VND7は直下のMYB転写因子（MYB46、MYB83、MYB103）と二次壁形成とプログラム細胞死の実行因子（酵素群）の遺伝子発現を直接活性化する。VND7直下のMYB転写因子は二次壁形成実行因子とMYB転写因子（MYB63、MYB85）やホメオボックス転写因子（BLH6、KNAT7）を含む多数の転写因子の遺伝子発現を活性化する。この転写ネットワークにはBLH6とKNAT7などによる二次壁形成の抑制経路も含まれている。図中には本研究における遺伝子発現解析の対象とした代表的な転写因子と実行因子を示した。

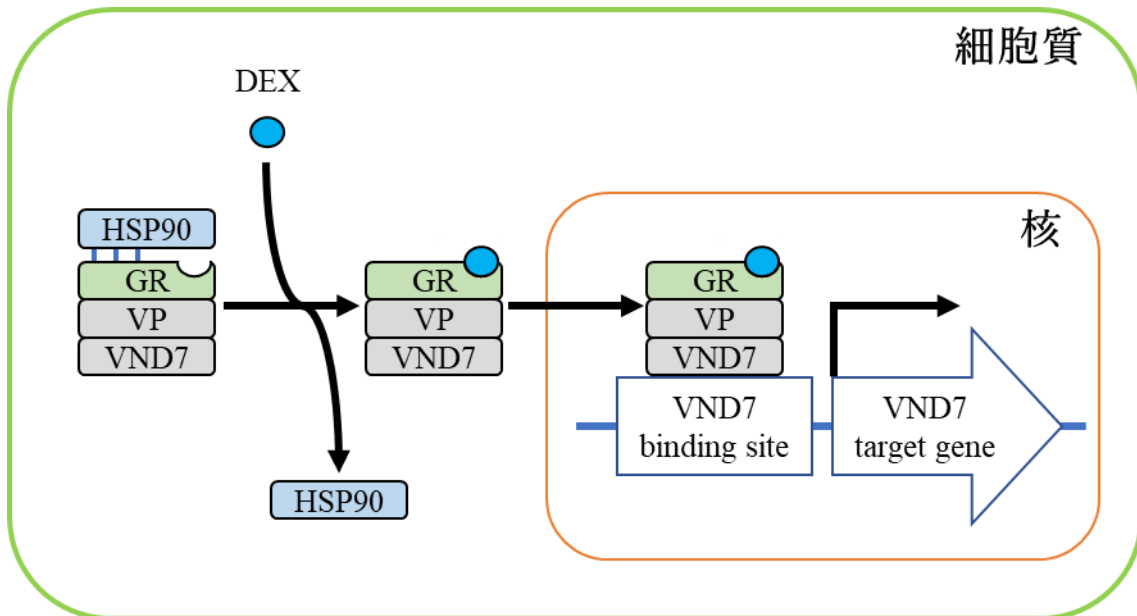


図 2. VND7-VP16-GR システムの作用機序模式図

グルココルチコイド非存在下では VND7-VP16-GR タンパク質は HSP90 と結合し巨大複合体を形成するため核への移行が出来ず、転写活性化能を発揮できない。グルココルチコイド（例えば DEX）存在下では、グルココルチコイドが GR と結合することで立体構造が変化して HSP90 が外れ、その結果 VND7-VP16-GR の核移行が可能となり、VND7 が転写活性化能を発揮し、ターゲット遺伝子の発現を誘導する。

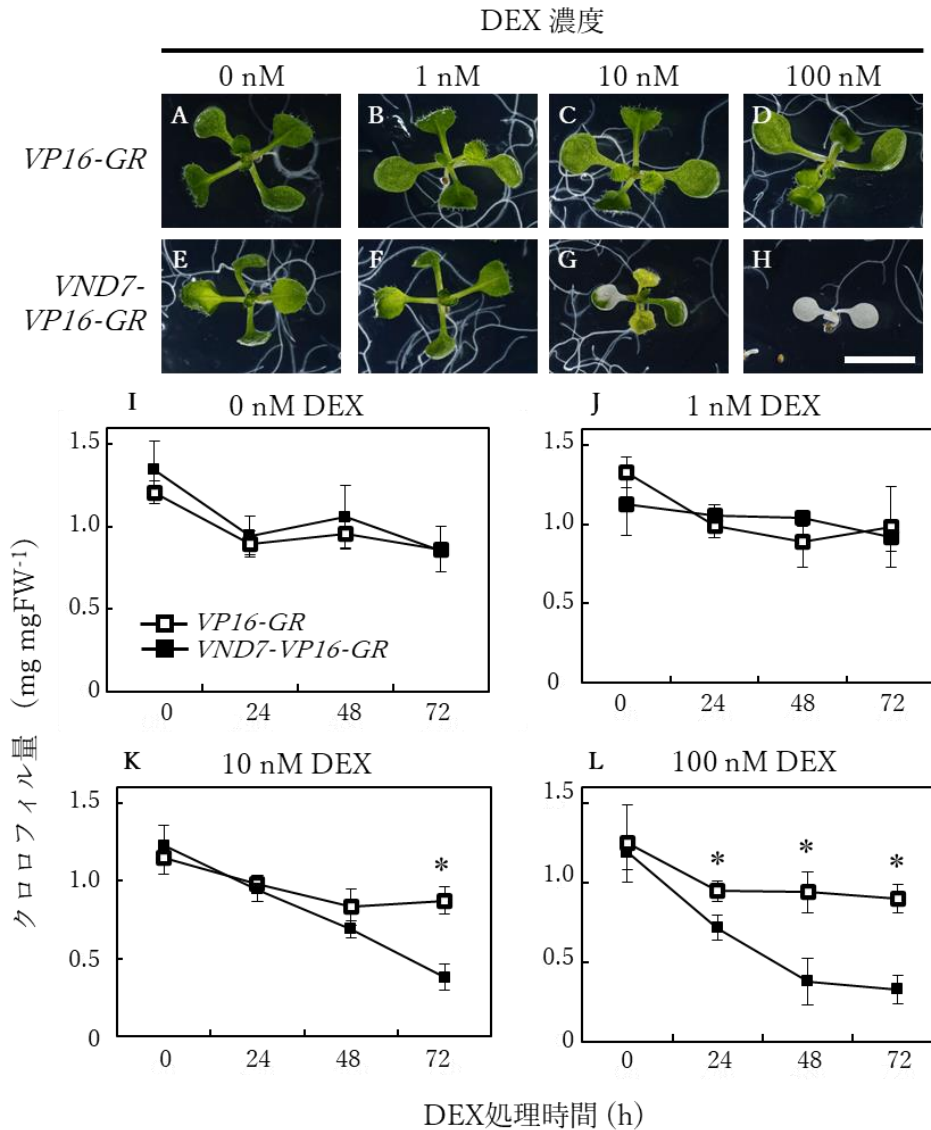


図3. シロイヌナズナ *VND7-VP16-GR* において DEX の濃度はプログラム細胞死の進行に影響する

(A-H) *VP16-GR* (ベクターコントロール) および *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えの成長と形態に異なる DEX 濃度が与える影響

7日齢の *VP16-GR* (A-D) および *VND7-VP16-GR* (E-H) シロイヌナズナを終濃度 0、1、10、100 nM の DEX で3日間処理した。Bar = 5 mm。

(I-L) *VP16-GR* および *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えにおけるクロロフィル量の変化

7日齢の *VP16-GR* および *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナを終濃度 0、1、10、100 nM DEX で処理した後、24時間ごとに72時間目までサンプリングし、クロロフィル量を測定した。Student-t 検定で統計的有意差が検出されたタイムポイントをアスタリスクであらわした ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ )。

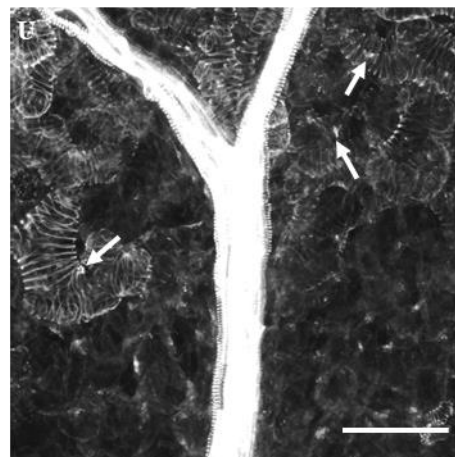
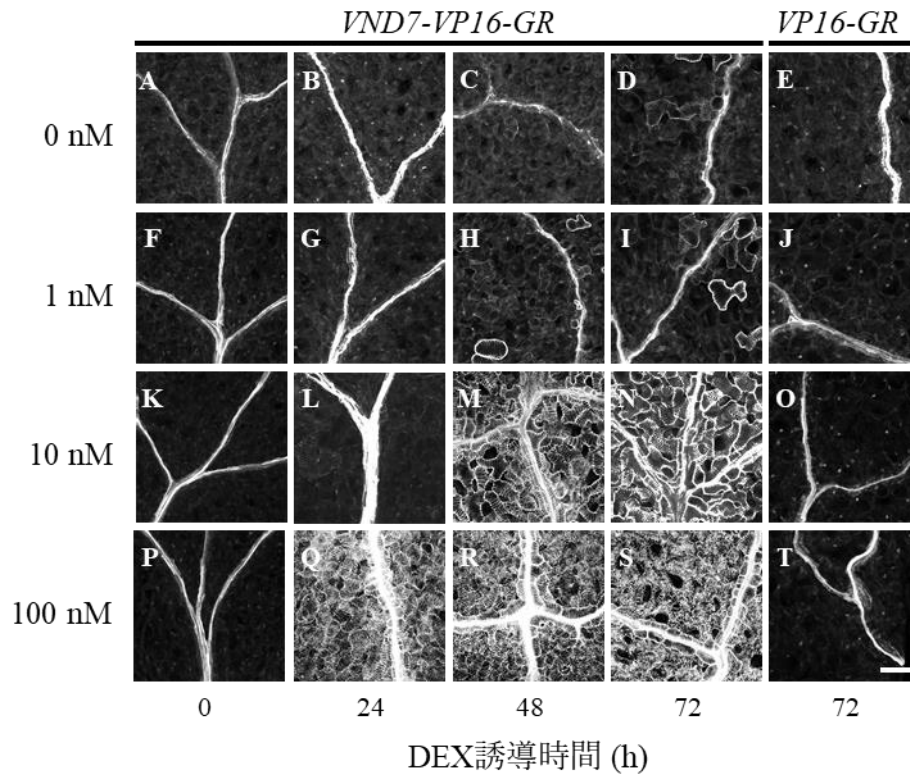


図4. シロイヌナズナ *VND7-VP16-GR* において DEX の濃度は二次壁形成の進行に影響する

(A-T) 7日齢の *VP16-GR* (E, J, O, T) および *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えを終濃度 0 nM (A-D)、1 nM (F-I)、10 nM (K-N)、100 nM (P-S) の DEX で処理した後、24 時間ごとに 72 時間目までサンプリングした。サンプリングした芽生えの子葉を固定した後、二次壁を可視化するために PI 染色と透明化処理を行い、FV10i を用いて顕微鏡観察を行った。U は L のコントラストを強くし拡大したものの。矢印は二次壁形成中の細胞核を示している。Bar = 100  $\mu$ m。

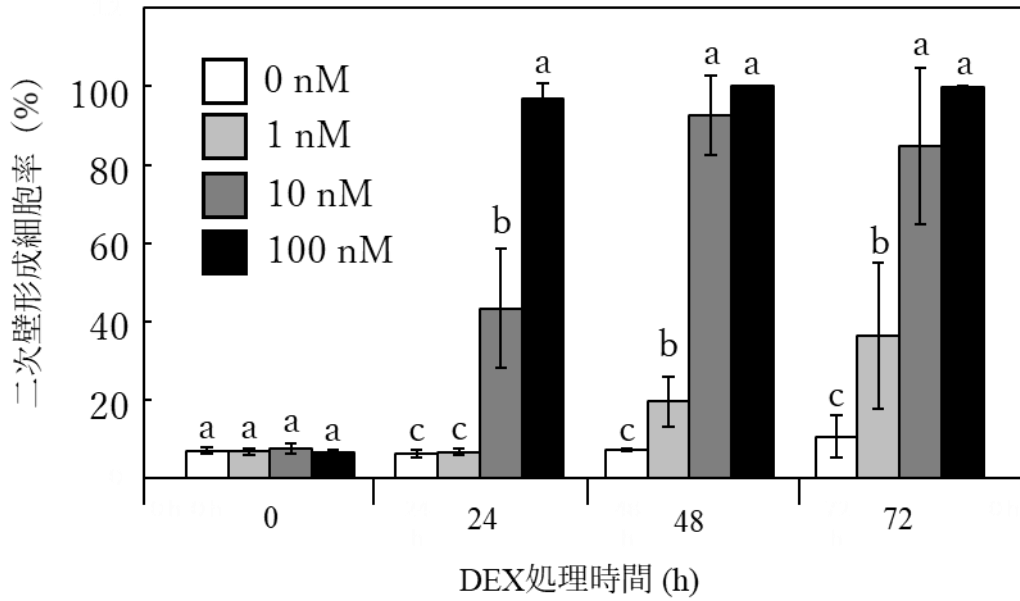


図 5. DEX 濃度依存的に子葉における二次壁を持つ細胞の相対的な比率は上昇する 7 日齢の *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えを終濃度 0、1、10、100 nM DEX で処理した後、24 時間ごとにサンプリング・固定し、PI 染色と透明化、顕微鏡観察を行った。これら子葉における二次壁を持つ細胞の比率を、ImageJ を用いて算出した。Tukey 多重検定により統計的有意差が検出された組み合わせを異なる文字で示した ( $P < 0.05$ ,  $n = 5$ )。エラーバーは SD を示す。

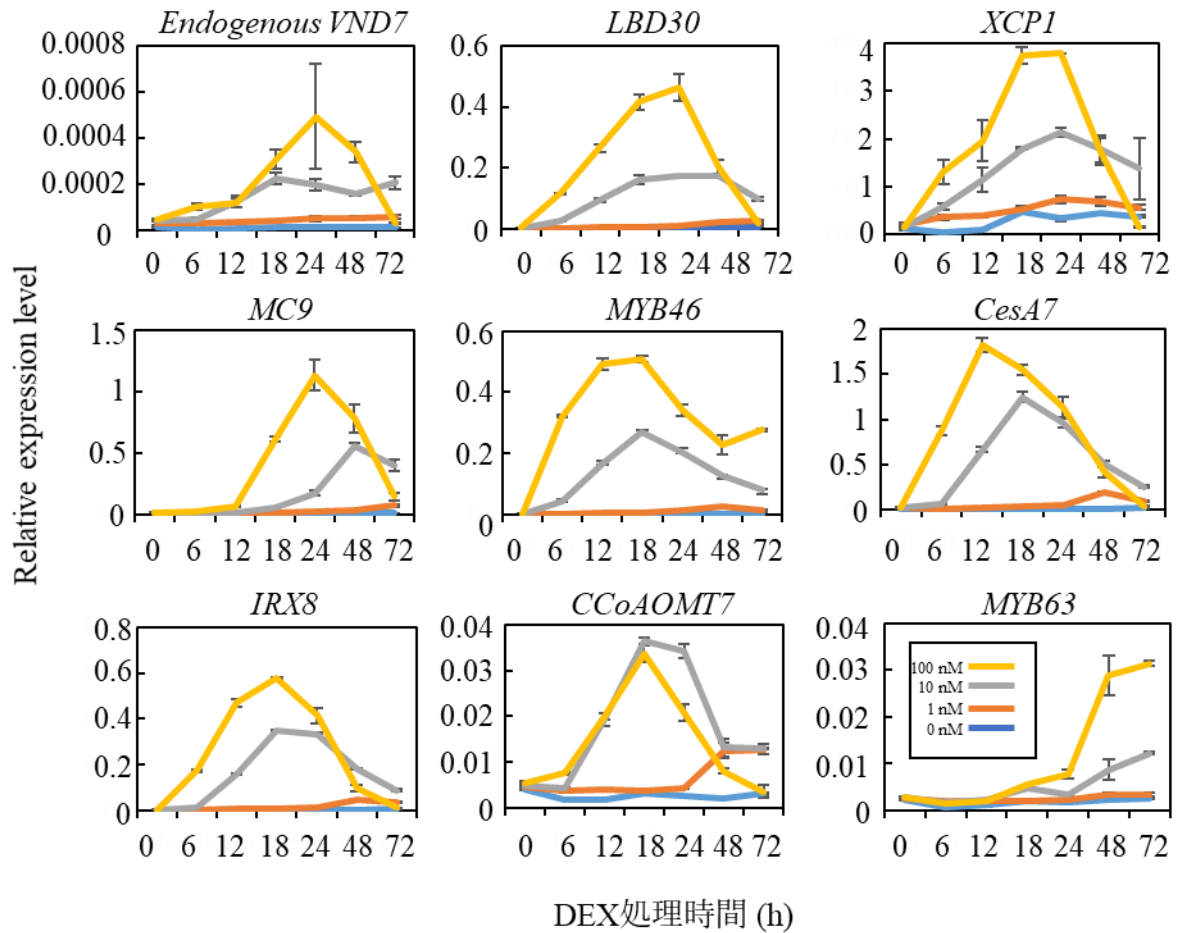


図6. DEX濃度依存的に VND7 下流遺伝子は誘導される  
 7日齢の VND7-VPI6-GR シロイヌナズナ芽生えを終濃度 0、1、10、100 nM DEX で処理した後、0、6、12、18、24、48、72 時間目に芽生え全体をサンプリングし、RT-qPCR を行った。UBQ10 をリファレンスとした相対値を表記している。三回の反復実験を行い、この図には代表的なデータを表記した。エラーバーは SD を示す。

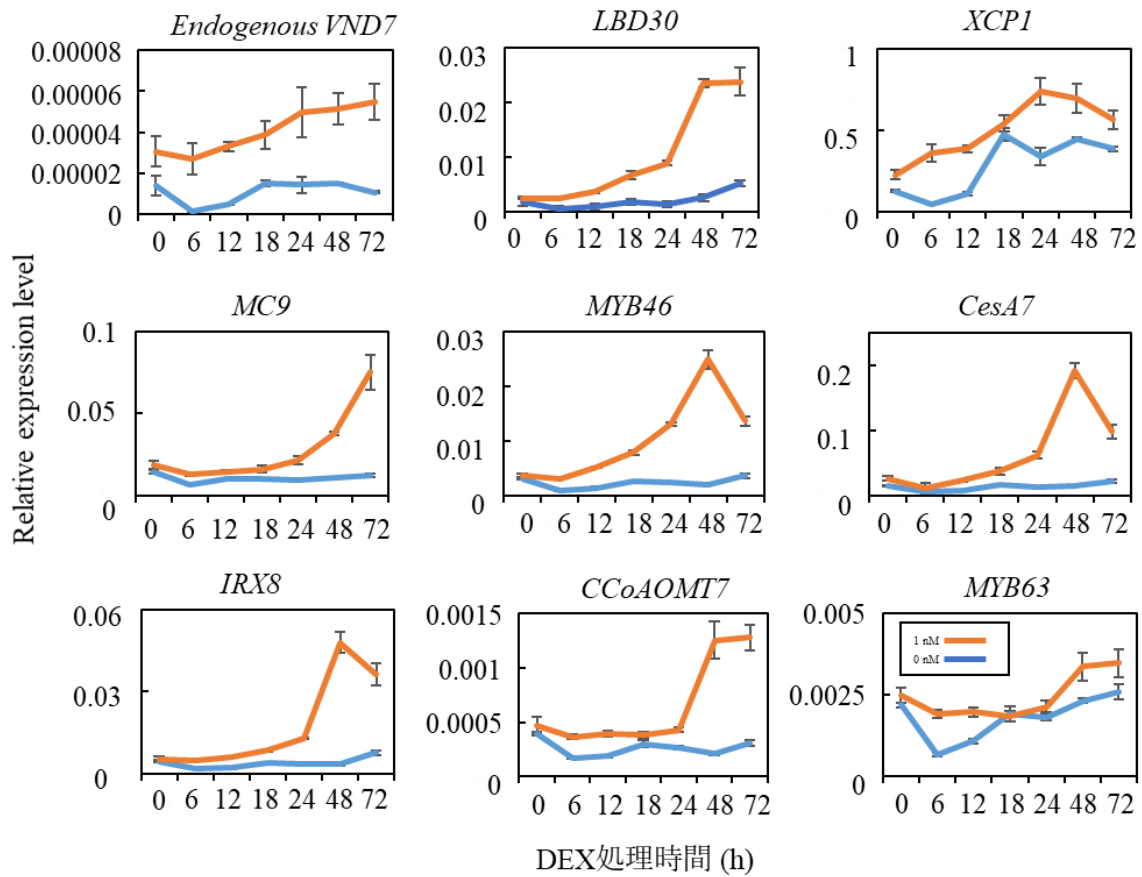


図7. 低濃度の DEX 処理でも VND7 による下流遺伝子の発現誘導は起きる  
 図6のデータから終濃度0、1 nMのDEXで処理したサンプルのデータを表記した。  
 エラーバーはSDを示す。



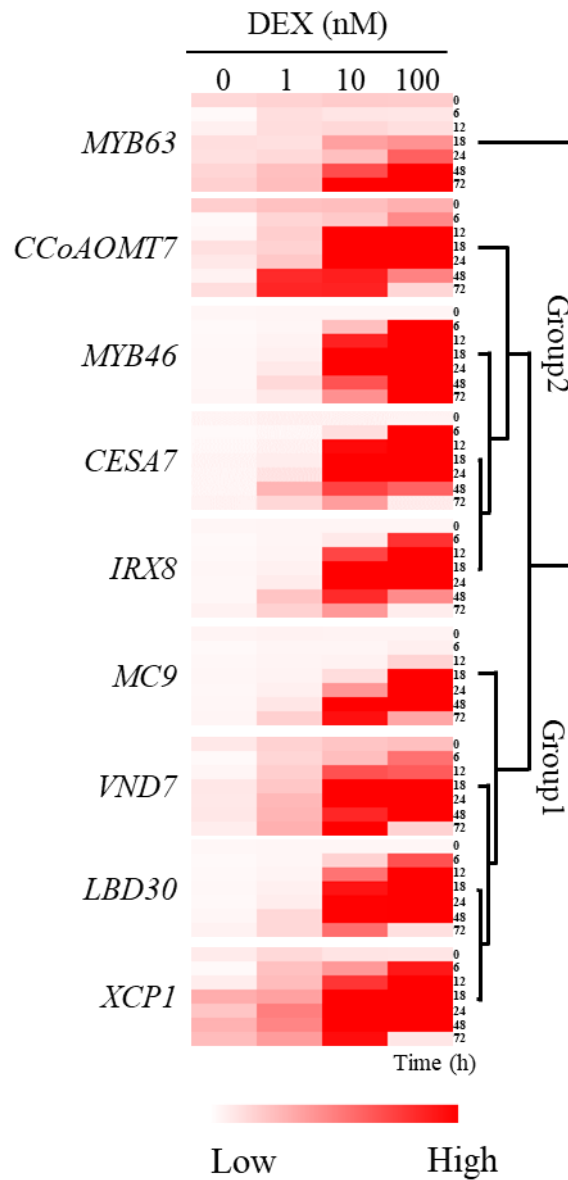


図 8. DEX 濃度が道管細胞分化関連遺伝子の発現パターンを変化させる  
 図 6 で行った三回反復分のデータから、その平均値を用いてクラスター解析を行った。遺伝子ごとに標準化を行ったのち、MeV ver. 4.9.0 を用いてヒートマップの作成、ピアソン相関係数を計算し発現パターンをクラスタリングした。グループ 1~3 の明瞭なクラスターが形成された。

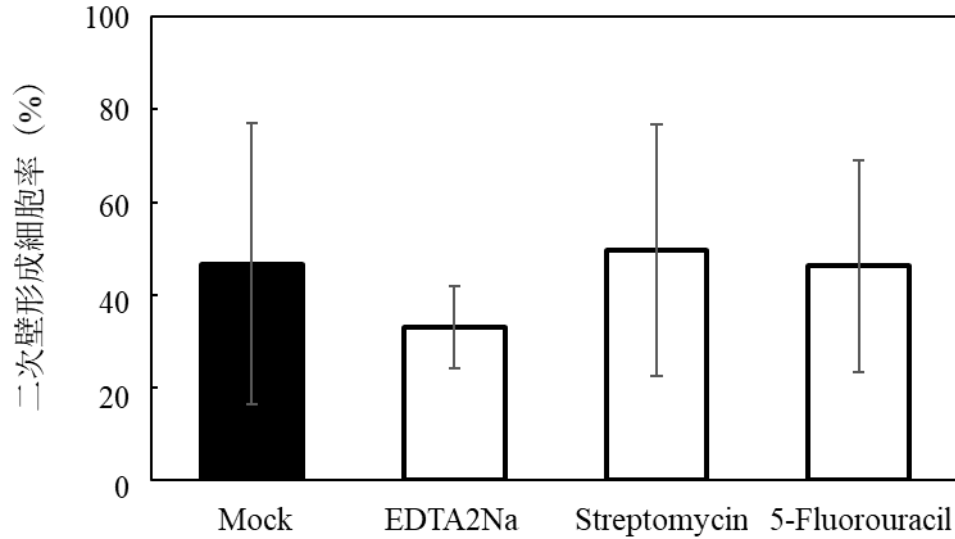


図 9. 白化を亢進する細胞ストレス誘導剤である EDTA、Streptomycin、5-fluorouracil は道管細胞分化を促進しない

7 日齢の *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えを終濃度 1 nM DEX と細胞ストレス誘導剤で同時に処理し、72 時間目に Mock 処理よりも子葉の白化を亢進する細胞ストレス誘導剤 (25 種; 表 3) を見出した。これらの子葉を顕微鏡で観察し、二次壁形成が確認できた 1 nM DEX と 10 mM EDTA、20 mg/L Streptomycin、450  $\mu$ M 5-fluorouracil をそれぞれ加えて処理した子葉について、図 5 の方法で二次壁形成細胞率を計算した。n = 10。いずれも、Mock に対する統計的有意差はなかった (Student t-test,  $p < 0.05$ )。エラーバーは SD を示す。

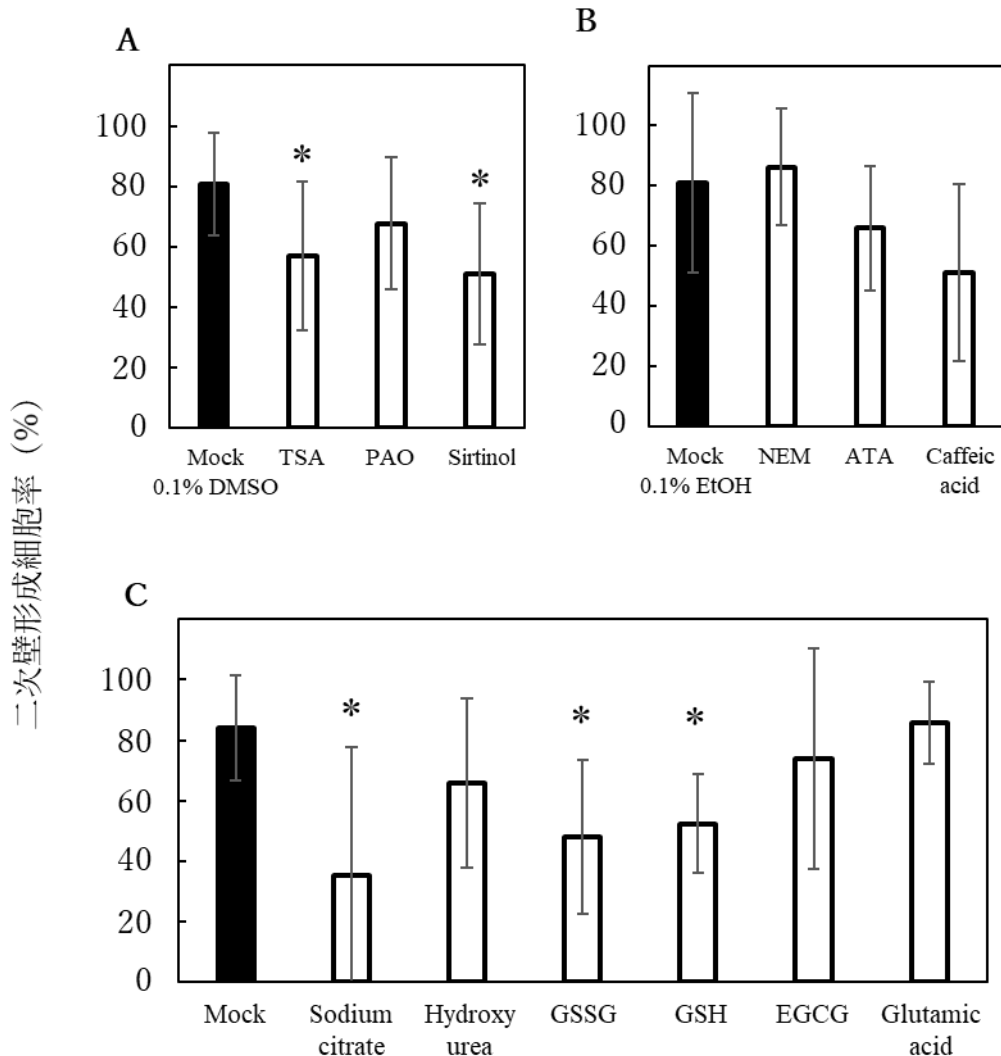


図 10. 白化を抑制する細胞ストレス誘導剤である Citrate acidNa、酸化型グルタチオン、還元型グルタチオン、Trichostatin A、Sirtinol は道管細胞分化を抑制する

(A-C) 7日齢の *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えを 10 nM DEX と細胞ストレス誘導剤で同時に処理し、72 時間目に Mock 処理よりも子葉の白化を抑制する細胞ストレス誘導剤 (12 種; 表 3) を見出した。これらのサンプルを図 5 と同様の方法で二次壁形成細胞率を計算した。(A) 溶媒が DMSO の細胞ストレス誘導剤 5  $\mu$ M Trichostatin A (TSA)、10  $\mu$ M Sirtinol、1  $\mu$ M Phenylarsine Oxide (PAO) (B) 溶媒がエタノールの細胞ストレス誘導剤 20  $\mu$ M N-ethylmaleimide (NEM)、50  $\mu$ M Aurintricarboxylic acid (ATA)、1 mM Caffeic Acid

(C) 溶媒が水の細胞ストレス誘導剤 50 mM Sodium citrate、3 mM 酸化型グルタチオン (GSSG)、3 mM 還元型グルタチオン (GSH)、1 mM Hydroxy urea、1  $\mu$ M Epigallocatechin gallate (EGCG)、1 mM Glutamic acid

ストレス誘導剤の溶媒の種類ごとに Mock に対する統計検定を行い、アスタリスクは統計的有意差を示す  $n = 10$  (Student t-test,  $p < 0.05$ )。エラーバーは SD を示す。

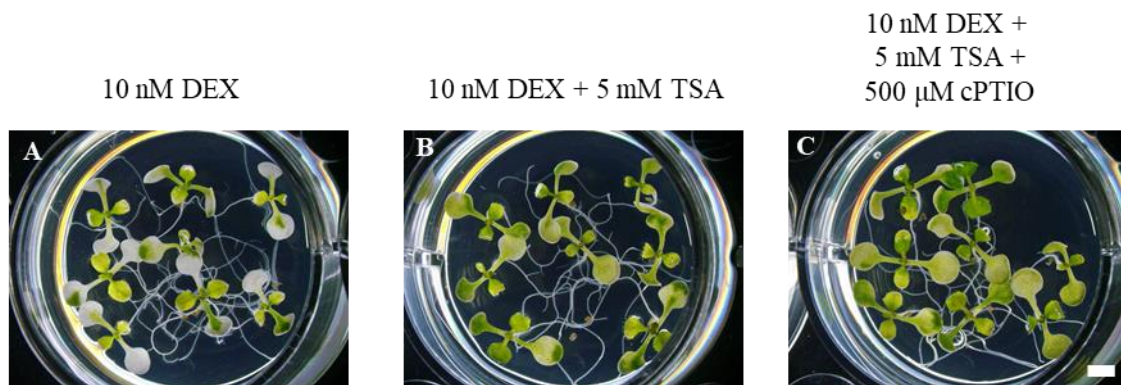
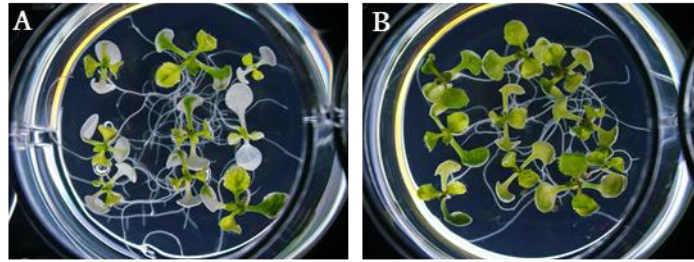


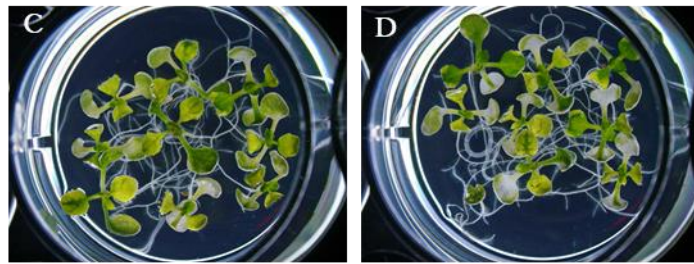
図 11. TSA による道管細胞分化抑制はタンパク質 S-ニトロシル化によるものではない

(A-C) 子葉の白化と道管分化を抑制する TSA (終濃度 5 μM) と NO スカベンジャーの cPTIO (500 μM) が 7 日齢の *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えに対する終濃度 10 nM の DEX 処理 (72 時間目) による白化に与える影響を観察した。(A) 10 nM DEX (B) 10 nM DEX+5 μM TSA (C) 10 nM DEX+5 μM TSA+500 μM cPTIO  
Bar = 1 mm。

10 nM DEX + 0.1% DMSO    10 nM DEX + 50  $\mu$ M TSA



10 nM DEX + 5  $\mu$ M TSA    10 nM DEX + 0.5  $\mu$ M TSA



10 nM DEX + 10  $\mu$ M Sirtinol    10 nM DEX + 1  $\mu$ M Sirtinol

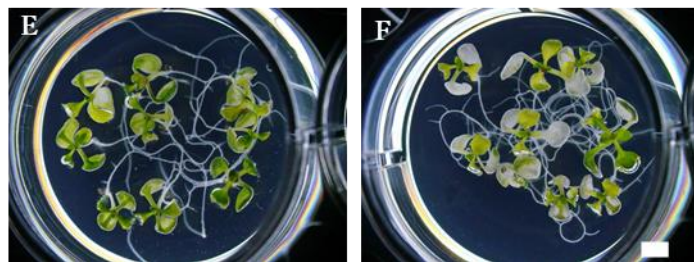


図 12 VND7 による白化は 0.5、5、50  $\mu$ M TSA もしくは 10  $\mu$ M Sirtinol によって抑制される

(A-F) 7 日齢の *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えを 10 nM の DEX とそれぞれ終濃度が 0.5、5、50  $\mu$ M TSA もしくは 10  $\mu$ M、10  $\mu$ M Sirtinol になるように処理し、72 時間目に観察した。Bar = 1 mm。

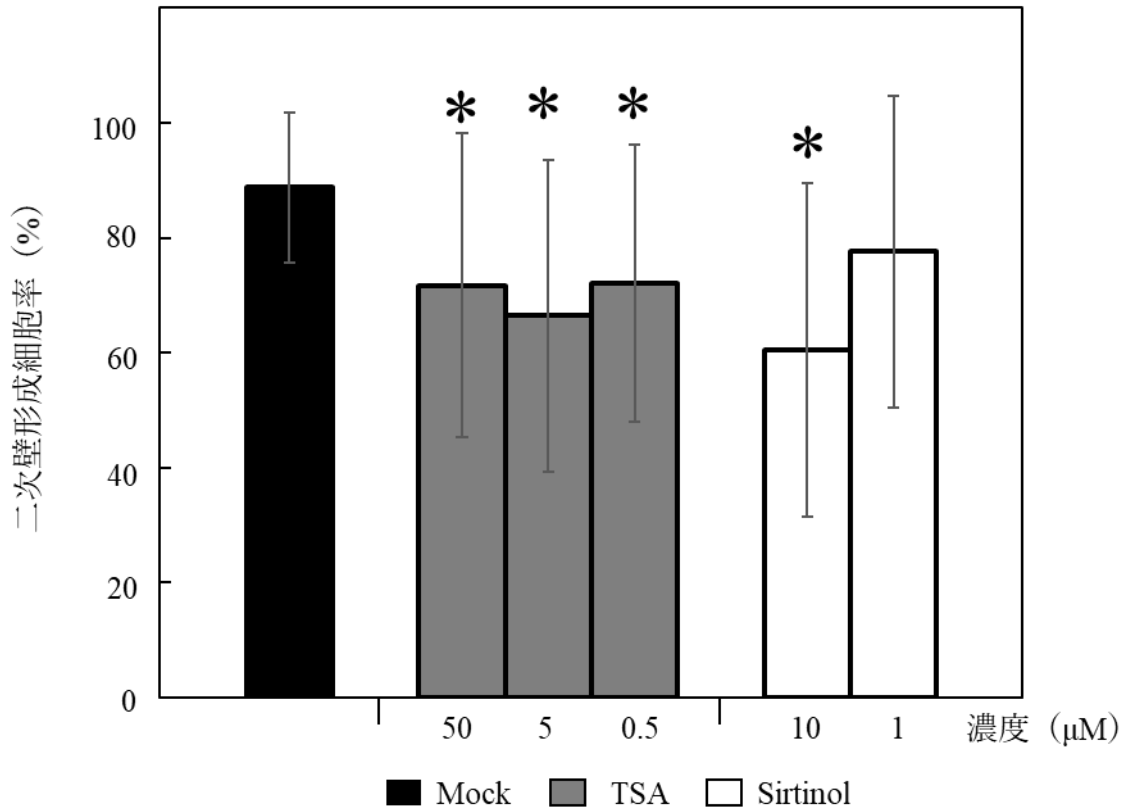


図 13 VND7 による二次壁形成は 0.5、5、50 μM TSA および 10 μM Sirtinol によって抑制される

7 日齢の VND7-VP16-GR シロイヌナズナ芽生えに 10 nM DEX と 0.5、5、50 μM TSA もしくは 10 μM、10 μM Sirtinol になるように処理し、3 日後にサンプリングし図 5 と同様の方法で二次壁形成細胞率を測定した。n ≥ 10。アスタリスクは統計的有意差を示す (Student t-test, p < 0.05)。エラーバーは SD を示す。

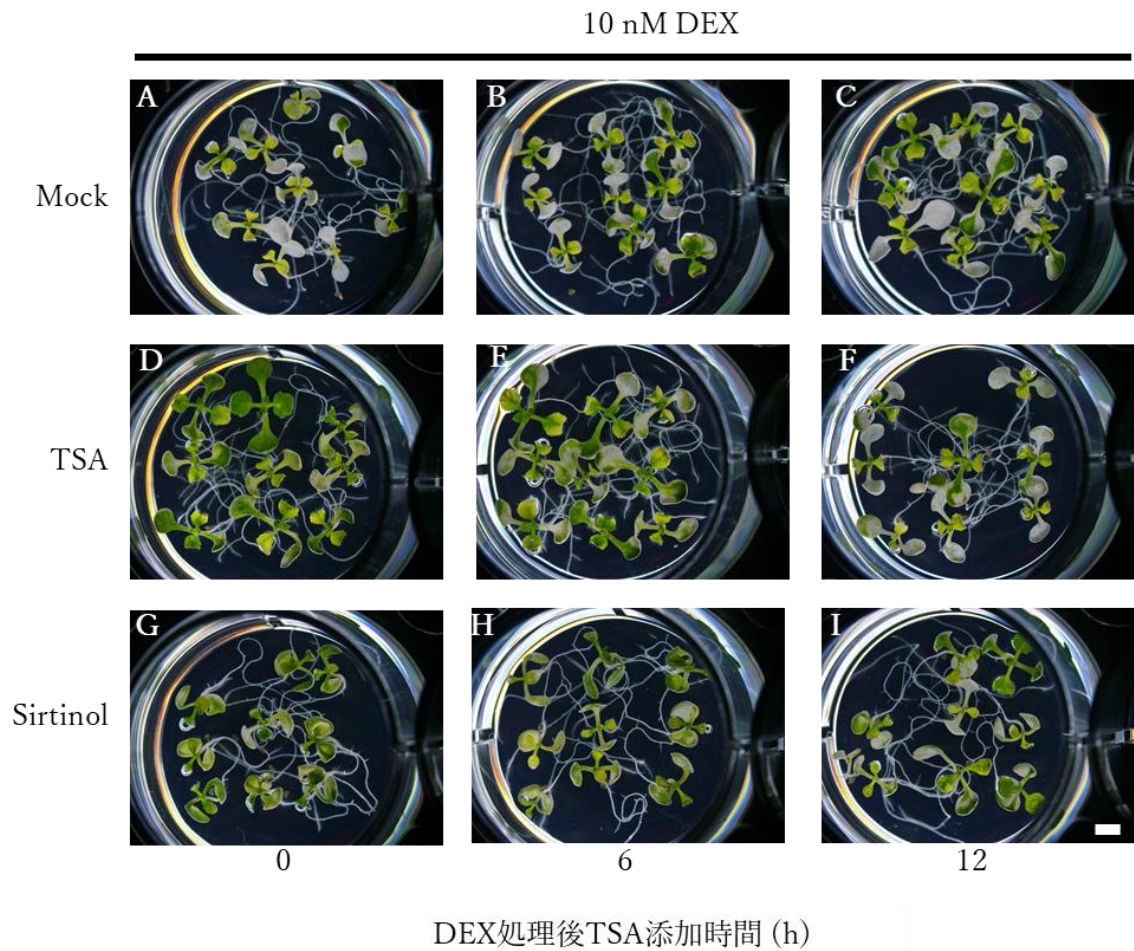


図 14. HDAC 阻害による白化の抑制は VND7 誘導初期でのみ起こる

(A-I) 7 日齢の *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えを 10 nM DEX を処理し、DEX 処理後 0、6、12 時間目に終濃度が 5  $\mu$ M TSA (D-F) もしくは 10  $\mu$ M Sirtinol (G-I) になるように加えた。Mock 処理では HDAC 阻害剤の代わりに DMSO を加えた (A-C)。3 日間処理後、観察した。

Bar = 1 mm

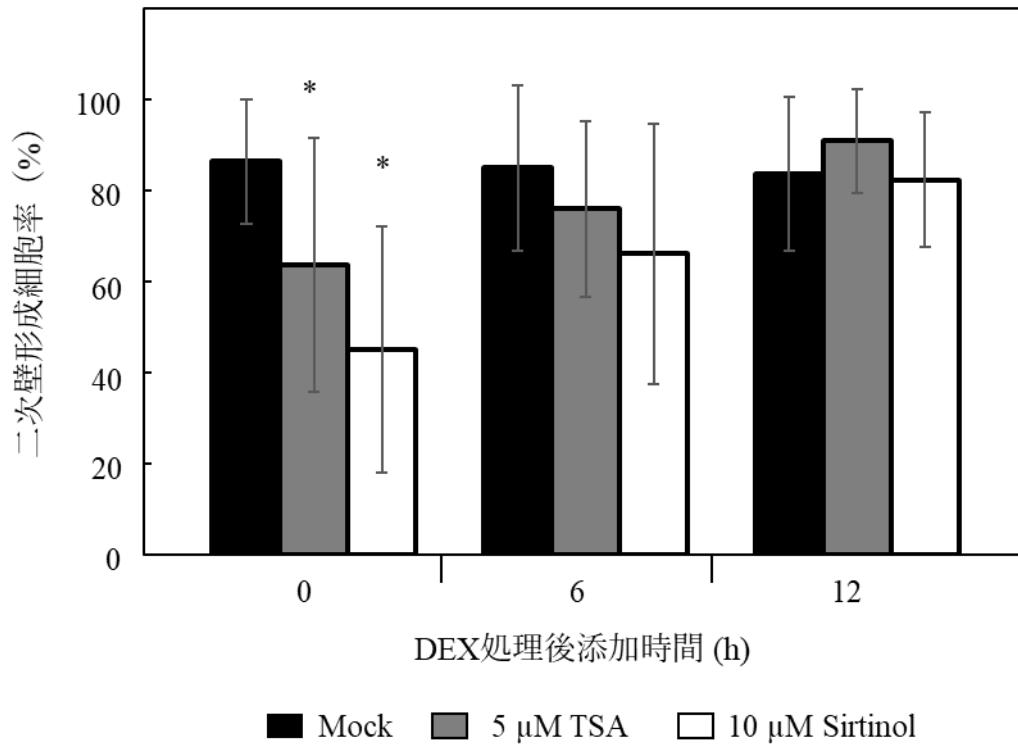


図 15. HDAC 阻害による道管細胞分化の抑制は VND7 誘導初期でのみ起こる  
 7 日齢の VND7-VP16-GR シロイヌナズナ芽生えに 10 nM DEX を処理し、DEX 処理後 0、6、12 時間目に終濃度が 5 μM TSA もしくは 10 μM Sirtinol になるように各阻害剤を加えた。Mock 処理では HDAC 阻害剤の代わりに DMSO を加えた。3 日間処理後 サンプルングし、図 5 と同様の方法で二次壁形成細胞率を測定した。n = 15 (Student t-test,  $p < 0.05$ )。エラーバーは SD を示す。



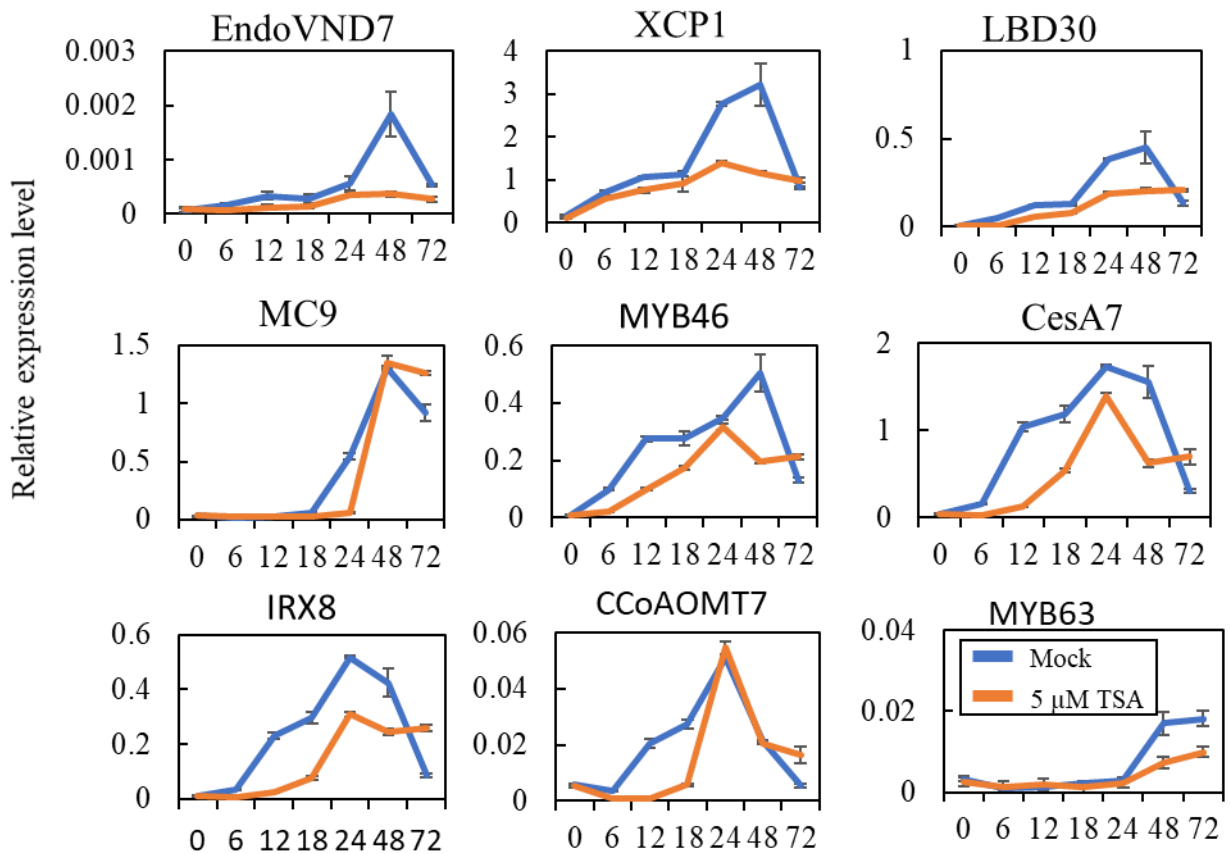


図 16. TSA は VND7 下流遺伝子の発現を抑制する

7日齢の *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えを 10 nM DEX または 10 nM DEX+5 μM TSA で処理し、0、6、12、18、24、48、72 時間目に芽生え全体をサンプリングし、RT-qPCR を行った。*UBQ10* をリファレンスとした相対値を表記している。三回の反復実験を行い、この図には代表的なデータを表記した。エラーバーは SD を示す。

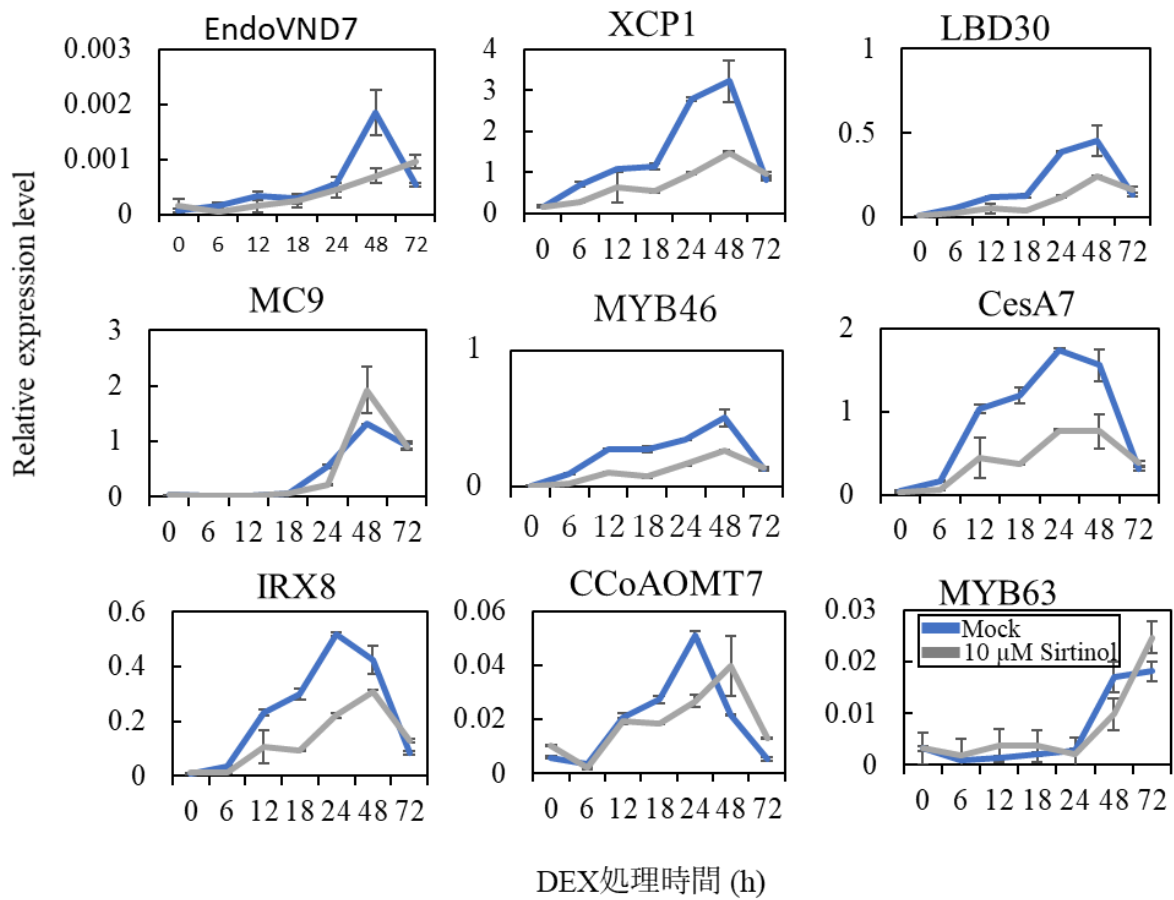


図 17. Sirtinol は VND7 下流遺伝子の発現を抑制する

7日齢の *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えを 10 nM DEX または 10 nM DEX+10 μM Sirtinol で処理し、0、6、12、18、24、48、72 時間目に芽生え全体をサンプリングし、RT-qPCR を行った。*UBQ10* をリファレンスとした相対値を表記している。三回の反復実験を行い、この図には代表的なデータを表記した。また、Mock 処理は図 16 と同様のデータを用いている。エラーバーは SD を示す。

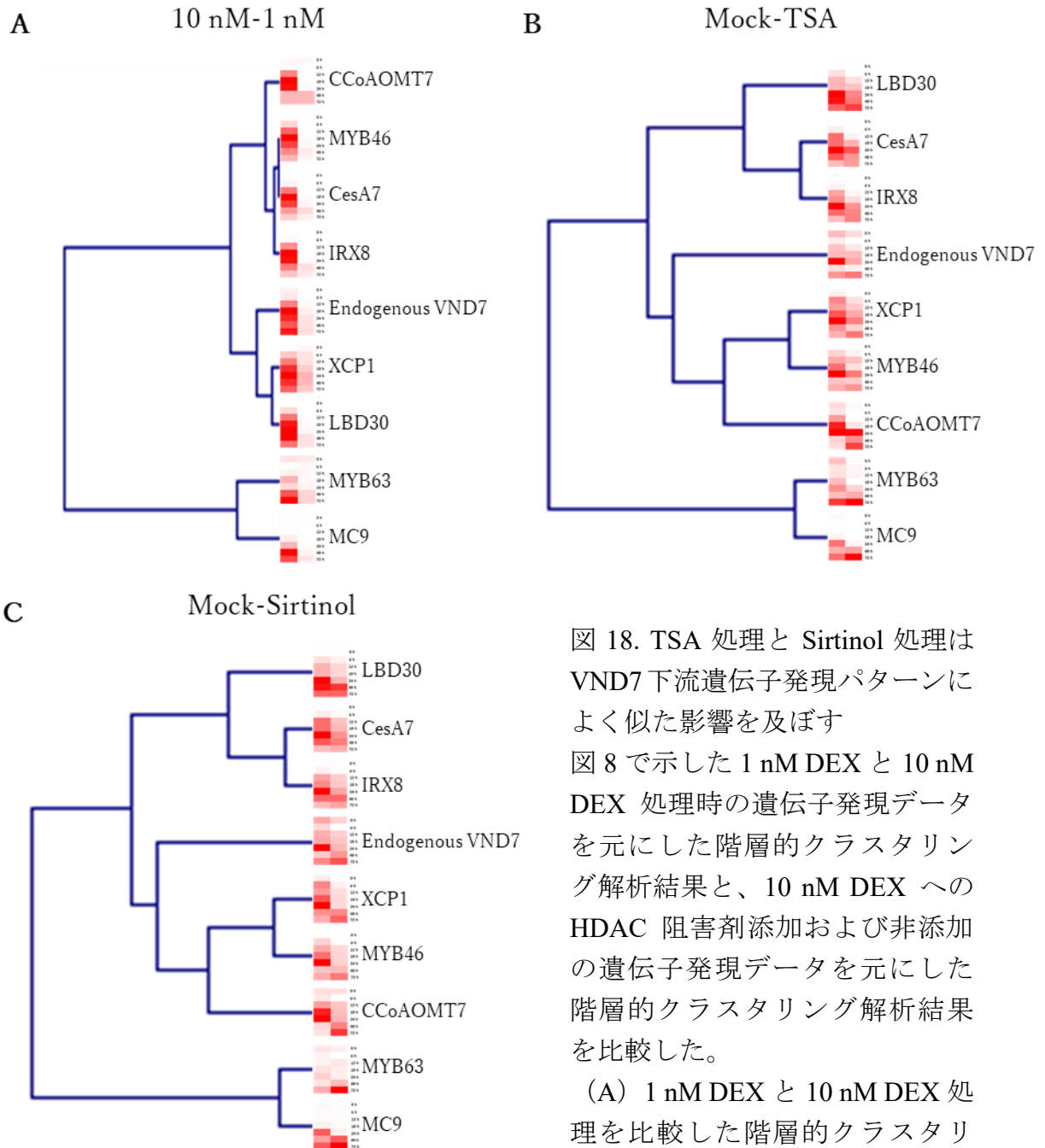


図 18. TSA 処理と Sirtinol 処理は VND7 下流遺伝子発現パターンによく似た影響を及ぼす

図 8 で示した 1 nM DEX と 10 nM DEX 処理時の遺伝子発現データを元にした階層的クラスタリング解析結果と、10 nM DEX への HDAC 阻害剤添加および非添加の遺伝子発現データを元にした階層的クラスタリング解析結果を比較した。

(A) 1 nM DEX と 10 nM DEX 処理を比較した階層的クラスタリング結果。(B) 10 nM DEX および 10 nM DEX + 5 μM TSA 処理を比較した階層的クラスタリング結果。(C) 10 nM DEX と 10 μM DEX + 10 mM Sirtinol 処理を比較した階層的クラスタリング結果。

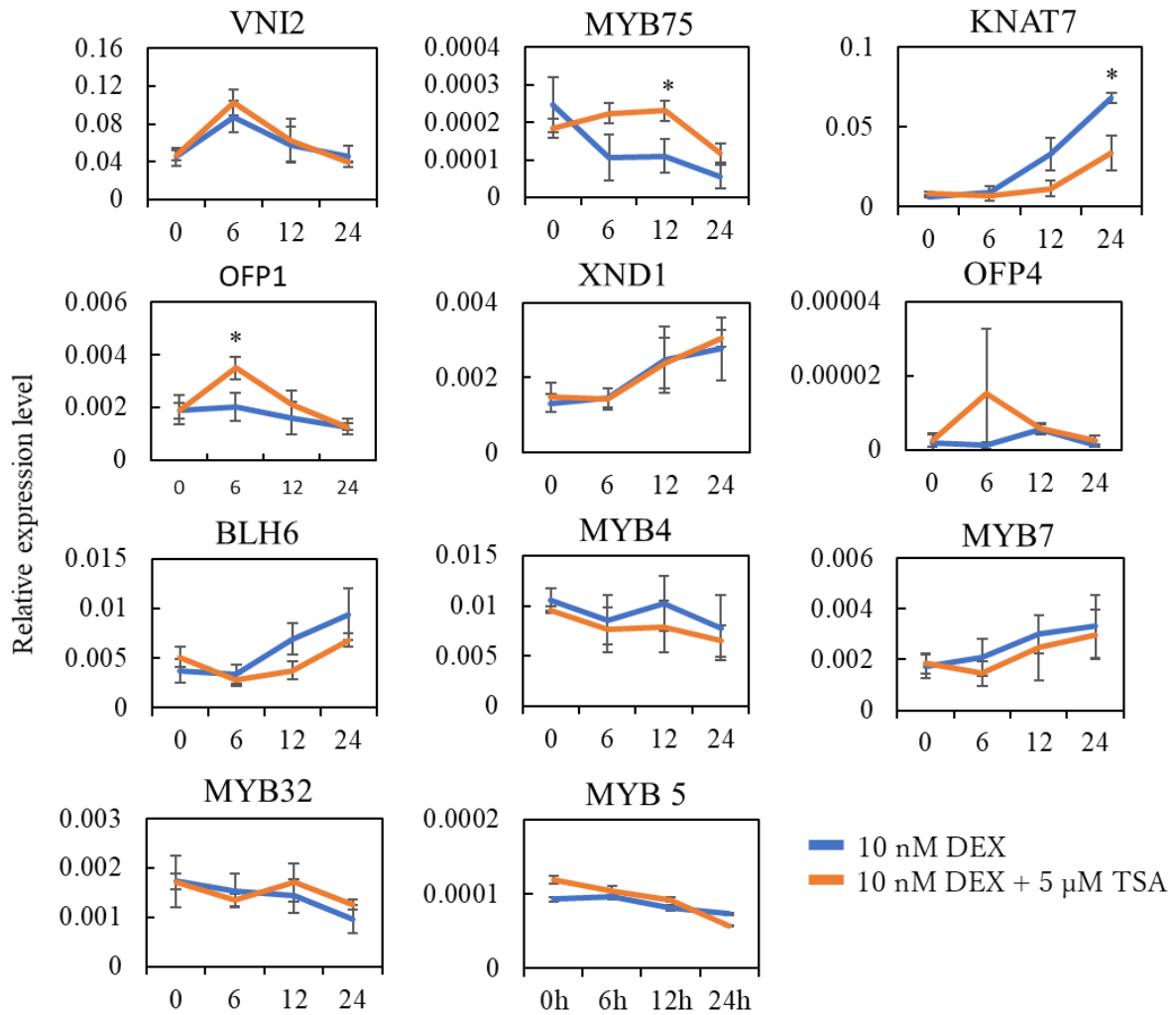


図 19. TSA 処理によって *MYB75* と *OFP1* の遺伝子発現が上昇する

7 日齢の *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えを 10 nM の DEX と 5 μM の TSA で処理し、0、6、12、24 時間目に芽生え全体をサンプリングし、RT-qPCR を行った。*UBQ10* をリファレンスとした相対値を表記している。アスタリスクは統計的有意差を示す (Student t-test,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ) エラーバーは SD を示す。

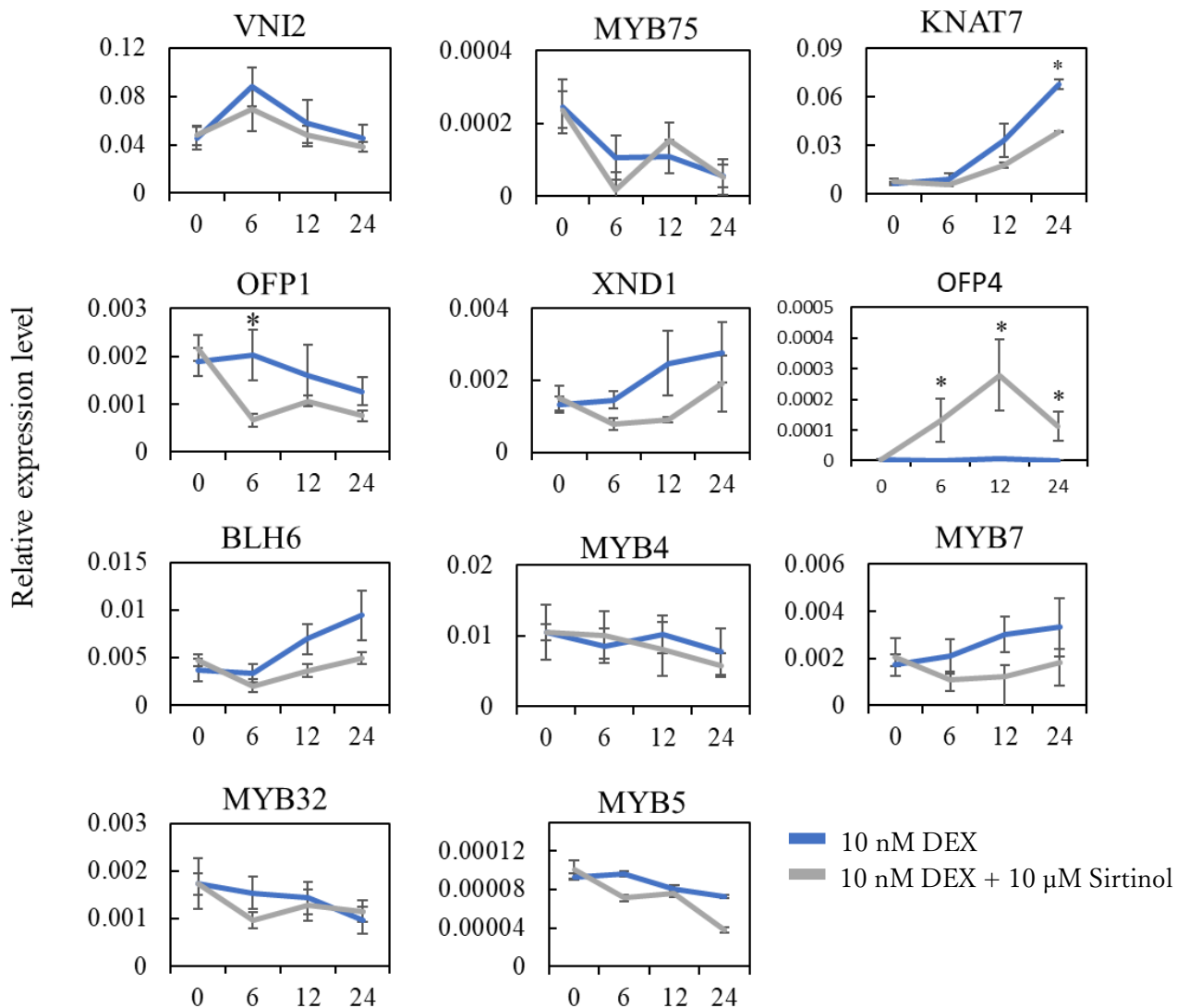


図 20. Sirtinol 処理によって *OFP4* の遺伝子発現が上昇する

7 日齢の *VND7-VP16-GR* シロイヌナズナ芽生えを 10 nM の DEX と 10 μM の Sirtinol で処理し、0、6、12、24 時間目に芽生え全体をサンプリングし、RT-qPCR を行った。UBQ10 をリファレンスとした相対値を表記している。アスタリスクは Mock 処理との比較での統計的有意差を示す (Student t-test,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ )。エラーバーは SD を示す。

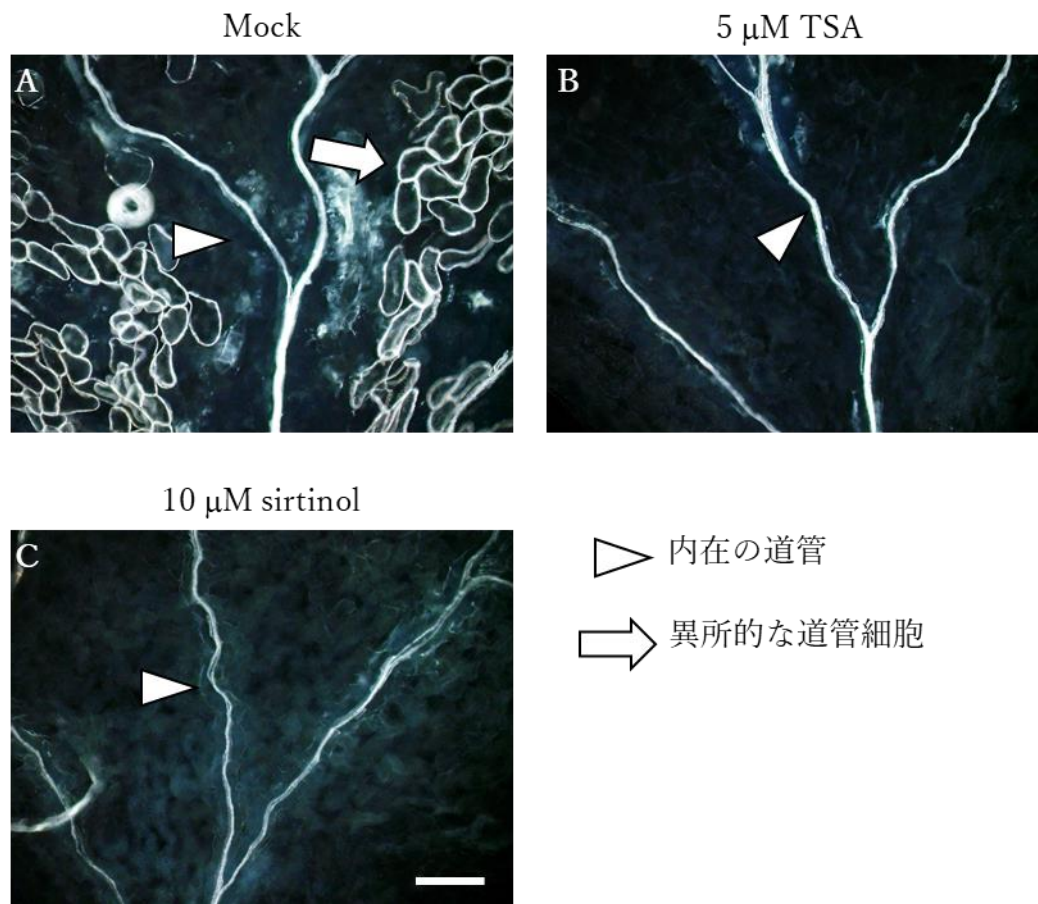


図 21. HDAC 阻害剤は KDB システムによる道管細胞分化を抑制する

(A-C) 7 日齢の野生型 (Col-0) シロイヌナズナの子葉を切り出し、KDB 処理と同時に DMSO もしくは 5  $\mu\text{M}$  もしくは 10  $\mu\text{M}$  になるよう TSA または Sirtinol を加え、5 日間培養した。

Bar = 200  $\mu\text{m}$

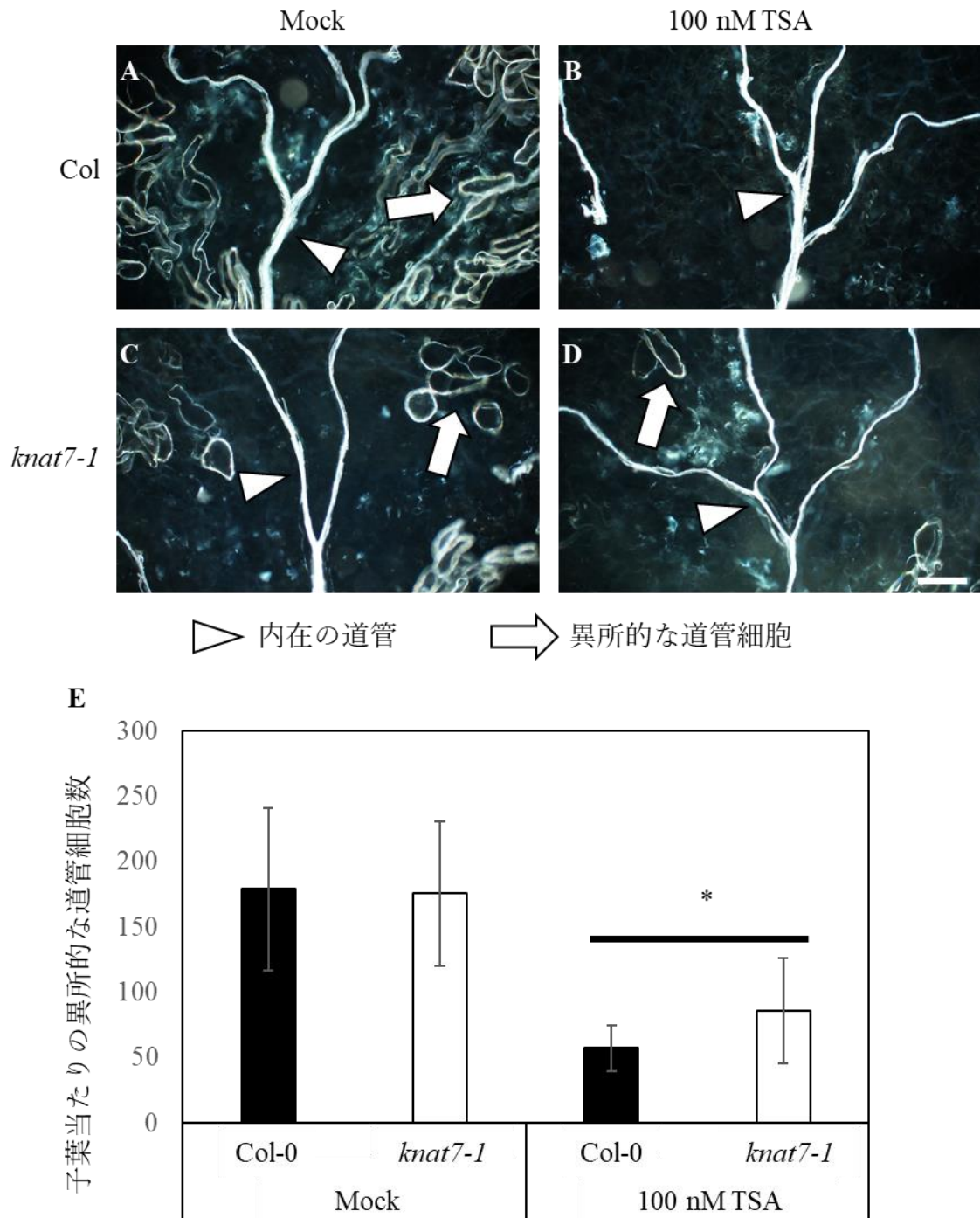


図 22. *knat7-1* 変異は TSA による道管細胞分化抑制を緩和する

(A-D) 7 日齢の野生型 (Col-0) シロイヌナズナもしくは *knat7-1* シロイヌナズナの子葉を切り出し、KDB 処理と同時に DMSO もしくは終濃度が 100 nM になるよう TSA を加え、6 日間培養した。Bar = 200  $\mu$ m

(E) A-D で示した KDB 処理を行ったサンプルの子葉一枚当たりの異所的な道管細胞数を測定したもの。n  $\geq$  19。 (Student t-test, p < 0.05)。エラーバーは SD を示す。

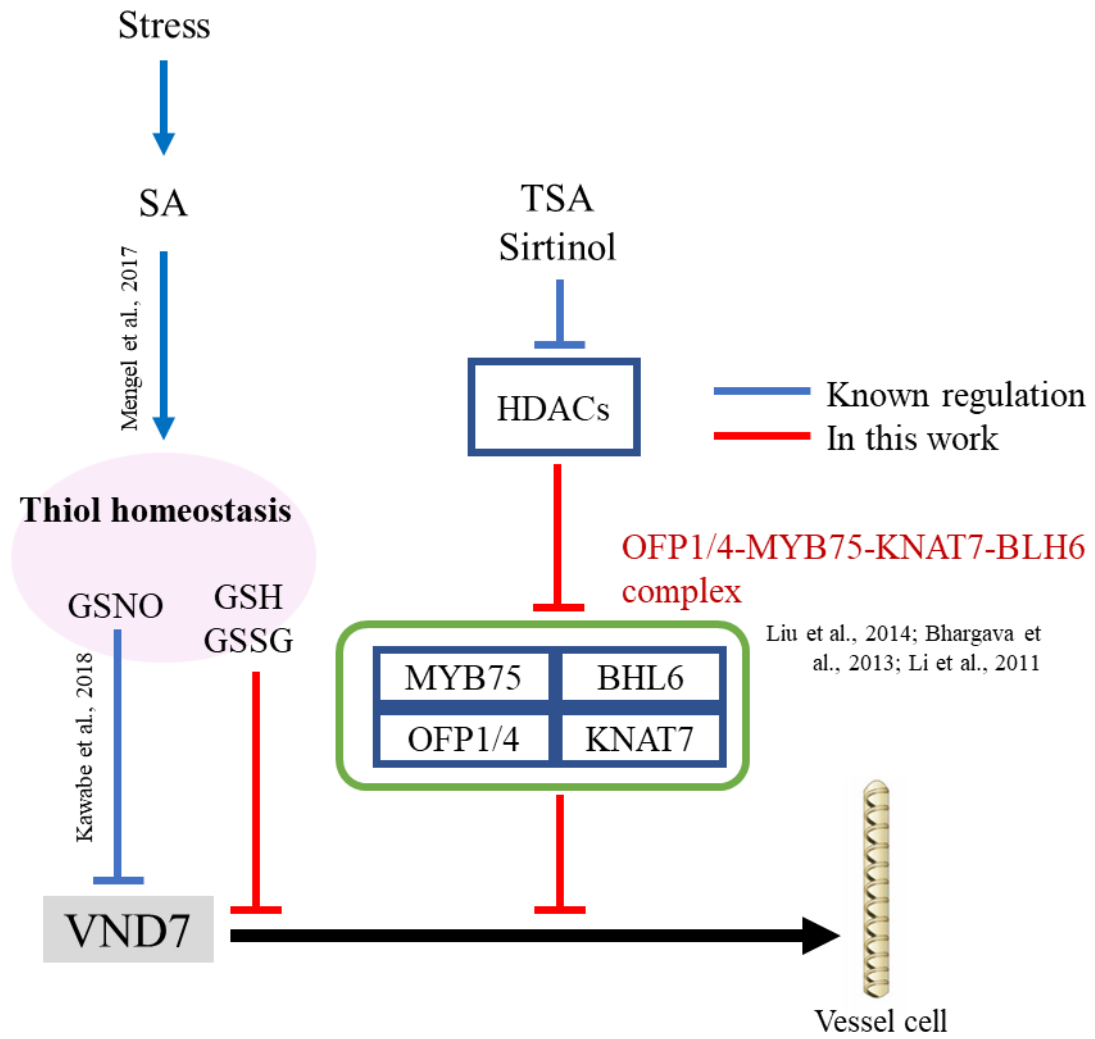


図 23. 本研究で新たに見出された VND7 による道管細胞分化制御経路



表 1. プライマーリスト

プライマー名	配列 (5'-3')	目的
MC9-qRT F	GTGCCATGAAGAACAAGCAA	RT-qPCR
MC9-qRT R	AGAAAGGAACGTCGCGTCT	RT-qPCR
CCoAOMT7-qRT F	GGAAACTAAGACTTCAGTCATCTGAG	RT-qPCR
CCoAOMT7-qRT R	GAGCTCTTCACTTTTCAGCAATC	RT-qPCR
MYB63-qRT F	AACAGCTCAGGCTCAAGAGCAAC	RT-qPCR
MYB63-qRT R	ATGTATCATGAGCTCGTAGTTCTT	RT-qPCR
BLH6-qRT F	CAAGACAAACGGGCTTGAG	RT-qPCR
BLH6-qRT R	TTCCTCCTTGTATATCTCCTCCA	RT-qPCR
SRT1 qRT F	AGACCTGAAATGGAAGCTGG	RT-qPCR
SRT1 qRT R	CTATGCCTTGGTTTCTTCTGCC	RT-qPCR
SRT2 qRT F	TCATGAGGCTGGTGCTATGAC	RT-qPCR
SRT2 qRT R	CTAGAGAGCTGGGACACTGAG	RT-qPCR
MYB75 qRT R	AAGCCTATGAAGGCGAAGAA	RT-qPCR
MYB75 qRT L	TGGCACCAAGTTCCTGTAAG	RT-qPCR
OFP1 qRT R	GAATCTTCAGAGCCAACCAAA	RT-qPCR
OFP1 qRT L	GTAGGGACTGCGTGGTGTTT	RT-qPCR
KNAT7 qRT F	CGAGAATCGAAGATGTAAGAG	RT-qPCR
KNAT7 qRT R	GTGTTTGCGCTTGGACTTCAA	RT-qPCR
XND1-qRT F	ATTACGATCCTTGGGACCTTC	RT-qPCR
XND1-qRT R	TGCTTGTCACTCTCTCTTGTC	RT-qPCR
OFP4 qRT F	CATTCATCAAAGCCATGATTCT	RT-qPCR
OFP4 qRT R	CAGAAGAAATGACTTTCAAGTTGG	RT-qPCR
MYB4 qRT F	ACTATCTCCGGCCTGACCTT	RT-qPCR
MYB4 qRT R	CGGCAATAAGCGACCATT	RT-qPCR
MYB7 qRT F	TGTTGGCGATCTCTTCCTAGA	RT-qPCR
MYB7 qRT R	AAGACGGCAGCTTTTACCG	RT-qPCR
MYB32 qRT F	CTTGTC AAGATTCTCTCTTTGGTC	RT-qPCR
MYB32 qRT R	AATTCTCTCGTCCCCGAAAT	RT-qPCR
MYB5 qRT F	AATTACGTCGGACGAGGAAG	RT-qPCR
MYB5 qRT R	CTTCCCGCGATCAATGAC	RT-qPCR

表 1. プライマーリスト (つづき)

プライマー名	配列 (5'-3')	目的
XCP1-for1	TTGACCCATGAAGAGTTCAAAGGAAGA	RT-qPCR
XCP1-rev1	GAAAGCGAACTCAGATTCCCTGTTG	RT-qPCR
MYB046-for2	GAATGTGAAGAAGGTGATTGGTACA	RT-qPCR
MYB046-rev4	CGAAGGAACCTCAGTGTTTCATCA	RT-qPCR
LBD30-for4	CTATCTACGGCTGCGTCTCTCACATCGT	RT-qPCR
LBD30-rev7	TAGAGATCCTGAAGATGACACCGGAAC	RT-qPCR
Ubq10-for1	AACTTTGGTGGTTTGTGTTTTGG	RT-qPCR
Ubq10-rev1	TCGACTTGTCATTAGAAAGAAAGAGATAA	RT-qPCR
CesA7-RT-for1	ATGGGTAGACAGAACAGAACACCAA	RT-qPCR
CesA7-RT-rev1	CTTCAGCAGTTGATGCCACACTT	RT-qPCR
IRX8-RT-for1	TCAAGAGCTGTCACATTAGAGCAT	RT-qPCR
IRX8-RT-rev1	ATGATCCGGTAGAGAAGTGAAAAC	RT-qPCR
endo_VND7_RT_F	AATACGTTTATAGGATCATCGTGG	RT-qPCR
endo_VND7_RT_R	TTTGATAGTACCGCCTTGTCTCTAC	RT-qPCR

表 2. 道管細胞分化に影響を与える細胞ストレス誘導剤の同定に用いた化合物

分類	阻害剤名	溶媒	基準濃度	参考文献	ベンダー
Redox	cPTIO	水	500 mM	Terrile et al., 2011	CAYMAN
	還元剤ジチオオスレイトール	水	2 mM	Ohbayashi et al., 2017	ナカライ
	硝酸カリウム	水	250 mM	Wang et al., 2003	ナカライ
	Chlorpromazine, Hydrochloride	水	50 mM	Locy et al., 2000	ナカライ
	酸化型グルタチオン	水	3 mM	Borsan et al., 2001	WAKO
	還元型グルタチオン	水	3 mM	Borsan et al., 2001	ナカライ
	Caffeic Acid	EtOH	100 mM	Batish et al., 2008	東京化成
	Citrate acid/Na	水	50 mM	Kiba et al., 2006	ナカライ
	NG-Nitro-L-arginine				
	Methyl Ester, Hydrochloride	水	10 mM	Santa-Cruz et al., 2010	ナカライ
Phosphate					
homeostasis	Okadaic acid	DMSO	1 nM	Zhang et al., 2002	WAKO
	U0126	DMSO	10 μM	Mockaitis and Howell, 2008	CAYMAN
	Staurosporine	DMSO	1 μM	Zhang et al., 2002	WAKO
	Ku55933 (LATM)	DMSO	10 μM	Amiard et al., 2011	Abcam
	Indomethacin	EtOH	10 μM	Kuśnierczyk et al., 2011	ナカライ
	PD98059	DMSO	10 μM	Clarke et al., 2000	CAYMAN

表 2. 道管細胞分化に影響を与える細胞ストレス誘導剤の同定に用いた化合物 (つづき 2)

分類	阻害剤名	溶媒	基準濃度	参考文献	ベンダー
Transport	N-ethylmaleimide	EtOH	200 mM	Lu et al., 2004	東京化成
	Verapamil	DMSO	10 $\mu$ M	野田 修士論文, 2018	東京化成
	Diethyl-stilbestrol	EtOH	100 $\mu$ M	Mitsukawa et al., 1997	東京化成
	バチジン酸 Na	水	100 $\mu$ M	Lin et al., 2015	関東化学
	ツニカマイシン	DMSO	5 $\mu$ g/ml	Kamauchi et al., 2005	WAKO
	N,N'-dicyclohexyl -carbodiimide	EtOH	5 $\mu$ M	Staal et al., 2011	東京化成
Genome	Hydroxy urea	水	1 mM	Cools et al., 2010	WAKO
	ゼオシン	水	10 $\mu$ M	Adachi et al., 2011	Invivogen
	Aurintricarboxylic acid	EtOH	50 $\mu$ M	Kiba et al., 2006	Sigma
Ca signaling	W-7 Hydrochloride	DMSO	50 $\mu$ M	Fujiki et al., 2005	CAYMAN
	sodium butyrate	水	100 mM	Gudesblat et al., 2006	東京化成
Epigenetics	5-aza-2-deoxycytidine	EtOH	20 mg/L	Murfett et al., 2001	WAKO
	Trichostatin A	DMSO	0.5 $\mu$ M	Chang and Pikaard, 2005	CAYMAN
	Anacardic acid	DMSO	20 $\mu$ M	Velanis et al., 2016	CAYMAN
	クルクミン	DMSO	40 $\mu$ M	Velanis et al., 2016	東京化成 Santa Cruz
	Sirtinol	DMSO	10 $\mu$ M	Grozinger et al., 2001	Biotechnology

表 2. 道管細胞分化に影響を与える細胞ストレス誘導剤の同定に用いた化合物 (つづき 3)

分類	阻害剤名	溶媒	基準濃度	参照文献	ベンダー
Transport	N-ethylmaleimide	EtOH	200 mM	Lu et al., 2004	東京化成
	Verapamil	DMSO	10 $\mu$ M	野田 修士論文, 2018	東京化成
	Diethyl-stilbestrol	EtOH	100 $\mu$ M	Mitsukawa et al., 1997	東京化成
	バチジン酸 Na	水	100 $\mu$ M	Lin et al., 2015	関東化学
	ツニカマイシン	DMSO	5 $\mu$ g/mL	Kamauchi et al., 2005	WAKO
	N,N'-dicyclohexyl -carbodiimide	EtOH	5 $\mu$ M	Staal et al., 2011	東京化成
Genome	Hydroxy urea	水	1 mM	Cools et al., 2010	WAKO
	ゼオニン	水	10 $\mu$ M	Adachi et al., 2011	Invivogen
	Aurintricarboxylic acid	EtOH	50 $\mu$ M	Kiba et al., 2006	Sigma
Ca signaling	W-7 Hydrochloride	DMSO	50 $\mu$ M	Fujiki et al., 2005	CAYMAN
Epigenetics	sodium butyrate	水	100 mM	Gudesblat et al., 2006	東京化成
	5-aza-2-deoxycytidine	EtOH	20 mg/L	Murfett et a., 2001	WAKO
	Trichostatin A	DMSO	0.5 $\mu$ M	Chang and Pikaard, 2005	CAYMAN
	Anacardic acid	DMSO	20 $\mu$ M	Velanis et al., 2016	CAYMAN
	クルクミン	DMSO	40 $\mu$ M	Velanis et al., 2016	東京化成
	Sirtinol	DMSO	10 $\mu$ M	Grozinger et al., 2001	Santa Cruz Biotechnology

表 2. 道管細胞分化に影響を与える細胞ストレス誘導剤の同定に用いた化合物 (つづき 4)

分類	阻害剤名	溶媒	基準濃度	参照文献	ベンダー
cAMP/cGMP signaling	8-Br-cAMP IH-[1,2,4]Oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one	水 DMSO	10 mM 4 $\mu$ M	Jiang et al., 2005 Nan et al., 2014	CAYMAN CAYMAN
Metal ion homeostasis	EDTA2Na o-phenanthroline	水 水	10 mM 2 mM	Rodriguez-Serrano et al., 2014 Hegeman et al., 2005	WAKO チカライ
Cell cycle Folic acid biosynthesis	Cdk4/6 Inhibitor IV Trimethoprim	DMSO DMSO	1 mM 50 mM	Maudet et al., 2014 Navarrete et a., 2012	CAYMAN チカライ
Shikimate pathway	グリホセート	水	0.5 mM	Klee et al., 1987	Sigma
Others	1-Triacontanol Glutamic acid	クロロフォルム 水	0.5 $\mu$ M 1 mM	He et a., 2002 Dennison and Spalding, 2000	CAYMAN チカライ

表 3. 道管細胞分化に影響をおよぼすと考えられた細胞ストレス誘導剤候補

促進する細胞ストレス誘導剤候補	抑制する細胞ストレス誘導剤候補
2 mM 還元剤ジチオスレイトール	5 $\mu$ M Trichostatin A
500 $\mu$ M Chlorpromazine, Hydrochloride	10 $\mu$ M Sirtinol
30 mM 酸化型グルタチオン	1 $\mu$ M PAO
30 mM 還元型グルタチオン	20 $\mu$ M N-ethylmaleimide
500 mM Citrate acidNa	50 $\mu$ M Aurintricarboxylic acid
1 mM バナジン酸 Na	1 mM Caffeic Acid
5 $\mu$ g/L ツニカマイシン	50 mM Citrate acid
100 $\mu$ M Verapamil	3 mM 酸化型グルタチオン
20 mg/L Streptomycin	3 mM 還元型グルタチオン
10 mM Hydroxy urea	1 mM Hydroxy urea
10 mM EDTA2Na	1 $\mu$ M Epigallocatechin gallate
50 $\mu$ M グリホセート	1 mM Glutamic acid
60 $\mu$ M Silver Thiosulfate	
10 $\mu$ M Pladinoride B	
450 $\mu$ M 5-fluorouracil	
5 $\mu$ M Trimethoprim	
10 $\mu$ M Wortmannin	
10 $\mu$ M PAO	
500 nM W-7 Hydrochloride	
10 $\mu$ M Staurosporine	
10 $\mu$ M PD98059	
100 $\mu$ M Indomethacin	
400 $\mu$ M クルクミン	
5 $\mu$ M 1-Triacontanol	

## 6. 参考文献

- Adachi, S., Minamisawa, K., Okushima, Y., Inagaki, S., Yoshiyama, K., Kondou, Y., Kaminuma, E., Kawashima, M., Toyoda, T., Matsui, M., Kurihara, D., Matsunaga S. and Umeda, M. (2011). Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *108*, 10004–10009.
- Alinsug, M. V., Chen, F.F., Luo, M., Tai, R., Jiang, L. and Wu, K. (2012). Subcellular Localization of Class II HDAs in Arabidopsis thaliana: Nucleocytoplasmic Shuttling of HDA15 Is Driven by Light. PLoS One *7*, e30846.
- Amiard, S., Depeiges, A., Allain, E., White, C.I. and Gallego, M.E. (2011). Arabidopsis ATM and ATR kinases prevent propagation of genome damage caused by telomere dysfunction. Plant Cell *23*, 4254–4265.
- Aoyama, T. and Chua, N.-H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. Plant J. *11*, 605–612.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Kaur, S., Kohli, R.K. and Yadav, S.S. (2008). Caffeic acid affects early growth and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). J. Plant Physiol. *165*, 297–305.
- Benhamed, M., Bertrand, C., Servet, C. and Zhou, D.X. (2006). Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. Plant Cell *18*, 2893–2903.
- Bhargava, A., Ahad, A., Wang, S., Mansfield, S.D., Haughn, G.W., Douglas, C.J. and Ellis, B.E. (2013). The interacting MYB75 and KNAT7 transcription factors modulate secondary cell wall deposition both in stems and seed coat in Arabidopsis. Planta *237*, 1199–1211.
- Bhargava, A., Mansfield, S.D., Hall, H.C., Douglas, C.J. and Ellis, B.E. (2010). MYB75 functions in regulation of secondary cell wall formation in the Arabidopsis inflorescence stem. Plant Physiol. *154*, 1428–1438.
- Bollhöner, B., Zhang, B., Stael, S., Denancé, N., Overmyer, K., Goffner, D., Van Breusegem, F. and Tuominen, H. (2013). Post mortem function of AtMC9 in xylem vessel elements. New Phytol. *200*, 498–510.



- Borevitz, J. O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. A. and Lamb, C. (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*, *12*(12), 2383–2394
- Borsani, O., Valpuesta, V. and Botella, M.A. (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* *126*, 1024–1030.
- Bourque, S., Dutartre, A., Hammoudi, V., Blanc, S., Dahan, J., Jeandroz, S., Pichereaux, C., Rossignol, M. and Wendehenne, D. (2011). Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. *New Phytol.* *192*, 127–139.
- Brown, D.M., Zeef, L.A.H., Ellis, J., Goodacre, R. and Turner, S.R. (2005). Identification of Novel Genes in *Arabidopsis* Involved in Secondary Cell Wall Formation Using Expression Profiling and Reverse Genetics. *Plant Cell* *17*, 2281–2295.
- Chang, S. and Pikaard, C.S. (2005). Transcript Profiling in *Arabidopsis* Reveals Complex Responses to Global Inhibition of DNA Methylation and Histone Deacetylation. *J. Biol. Chem.* *280*, 796–804.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T. and Neill, S.J. (2000). NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J.* *24*, 667–677.
- Comer, A.E. (1978). Pattern of cell division and wound vessel member differentiation in coleus pith explants. *Plant Physiol.* *62*, 354–359.
- Cools, T., Iantcheva, A., Maes, S., Van den Daele, H. and De Veylder, L. (2010). A replication stress-induced synchronization method for *Arabidopsis thaliana* root meristems. *Plant J.* *64*, 705–714.
- Dare, A. P., Schaffer, R. J., Lin-Wang, K., Allan, A. C. and Hellens, R. P. (2008). Identification of a cis-regulatory element by transient analysis of co-ordinately regulated genes. *Plant Methods*, *4*, 17.
- Demura, T., and Fukuda, H. (1994). Novel vascular cell-specific genes whose expression is regulated temporally and spatially during vascular system development. *Plant Cell* *6*, 967–981.
- Dennison, K.L. and Spalding, E.P. (2000). Glutamic acid-Gated Calcium Fluxes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *124*, 1511–1514.

Downen, R.H., Pelizzola, M., Schmitz, R.J., Lister, R., Downen, J.M., Nery, J.R., Dixon, J.E. and Ecker, J.R. (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109.

Endo (2014) Regulatory Mechanisms of Master Gene Expression in Xylem Vessel Formation  
Ph.D. thesis

Endo, H., Yamaguchi, M., Tamura, T., Nakano, Y., Nishikubo, N., Yoneda, A., Kato, K., Kubo, M., Kajita, S., Katayama, Y., Ohtani, M. and Demura, T. (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.

Fujiki, Y., Nakagawa, Y., Furumoto, T., Yoshida, S., Biswal, B., Ito, M., Watanabe, A. and Nishida, I. (2005). Response to darkness of late-responsive dark-inducible genes is positively regulated by leaf age and negatively regulated by calmodulin-antagonist-sensitive signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 46, 1741–1746.

Fukuda, H. and Komamine, A. (1980). Establishment of an Experimental System for the Study of Tracheary Element Differentiation from Single Cells Isolated from the Mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* 65, 57–60.

Funk, V., Kositsup, B., Zhao, C. and Beers, E.P. (2002). The *Arabidopsis* xylem peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog. *Plant Physiol.* 128, 84–94.

Gladman, N.P., Marshall, R.S., Lee, K.-H. and Vierstra, R.D. (2016). The Proteasome Stress Regulon Is Controlled by a Pair of NAC Transcription Factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28, 1279–1296.

Grozinger, C.M., Chao, E.D., Blackwell, H.E., Moazed, D. and Schreiber, S.L. (2001). Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J. Biol. Chem.* 276, 38837–38843.

Gudesblat, G.E., Iusem, N.D. and Morris, P.C. (2007). Guard cell-specific inhibition of *Arabidopsis* MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytol.* 173, 713–721.

- Hackbusch, J., Richter, K., Müller, J., Salamini, F. and Uhrig, J.F. (2005). A central role of *Arabidopsis thaliana* ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 4908–4912.
- Hasegawa, J., Sakamoto, Y., Nakagami, S., Aida, M., Sawa, S. and Matsunaga, S. (2016). Three-Dimensional Imaging of Plant Organs Using a Simple and Rapid Transparency Technique. *Plant Cell Physiol.* *57*, 462–472.
- He, Y. and Loh, C. (2002). Induction of early bolting in *Arabidopsis thaliana* by triacontanol, cerium and lanthanum is correlated with increased endogenous concentration of isopentenyl adenosine (iPA<sub>dos</sub>). *J. Exp. Bot.* *53*, 505–512.
- Hegeman, C.E., Hayes, M.L. and Hanson, M.R. (2005). Substrate and cofactor requirements for RNA editing of chloroplast transcripts in *Arabidopsis* in vitro. *Plant J.* *42*, 124–132.
- Hilal, M., Zenoff, A.M., Ponessa, G., Moreno, H. and Massa, E.M. (1998). Saline stress alters the temporal patterns of xylem differentiation and alternative oxidase expression in developing soybean roots. *Plant Physiol.* *117*, 695–701.
- Hong, G., Wang, J., Hochstetter, D., Gao, Y., Xu, P. and Wang, Y. (2015). Epigallocatechin-3-gallate functions as a physiological regulator by modulating the jasmonic acid pathway. *Physiol. Plant.* *153*, 432–439.
- Htun, H., Barsony, J., Renyi, I., Gould, D.L. and Hager, G.L. (1996) . Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 4845–4850.
- Hussey, S.G., Mizrachi, E., Creux, N.M. and Myburg, A.A. (2013). Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. *Front. Plant Sci.* *4*, 1–21.
- Jacobs, W.P. (1952). The Role of Auxin in Differentiation of Xylem Around a Wound. *Am. J. Bot.* *39*, 301.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001). Translating the Histone Code. *Science* *293*, 1074-1080.
- Jiang, J., Fan, L.W. and Wu, W.H. (2005). Evidences for involvement of endogenous cAMP in *Arabidopsis* defense responses to *Verticillium* toxins. *Cell Res.* *15*, 585–592.

- Kamauchi, S., Nakatani, H., Nakano, C. and Urade, R. (2005). Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* 272, 3461–3476.
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G. and Mullineaux, P. (1999). Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284, 654–657.
- Kawabe, H., Ohtani, M., Kurata, T., Sakamoto, T. and Demura, T. (2018). Protein S-Nitrosylation Regulates Xylem Vessel Cell Differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 59, 17–29.
- Kiba, A., Takata, O., Ohnishi, K. and Hikichi, Y. (2006). Comparative analysis of induction pattern of programmed cell death and defense-related responses during hypersensitive cell death and development of bacterial necrotic leaf spots in eggplant. *Planta* 224, 981–994.
- Kim, W.-C., Ko, J.-H. and Han, K.-H. (2012). Identification of a cis-acting regulatory motif recognized by MYB46, a master transcriptional regulator of secondary wall biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 78, 489–501.
- Ko, J.-H., Jeon, H.-W., Kim, W.-C., Kim, J.-Y. and Han, K.-H. (2014). The MYB46/MYB83-mediated transcriptional regulatory programme is a gatekeeper of secondary wall biosynthesis. *Ann. Bot.* 114, 1099–1107.
- Ko, J.-H., Kim, W.-C. and Han, K.-H. (2009). Ectopic expression of MYB46 identifies transcriptional regulatory genes involved in secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 60, 649–665.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H. and Demura, T. (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* 19, 1855–1860.
- Kuśnierczyk, A., Tran, D.H.T., Winge, P., Jørstad, T.S., Reese, J.C., Troczyńska, J. and Bones, A.M. (2011). Testing the importance of jasmonate signalling in induction of plant defences upon cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. *BMC Genomics* 12, 423.
- Le, T.N., Schumann, U., Smith, N.A., Tiwari, S., Khang Au, P.C., Zhu, Q.H., Taylor, J.M., Kazan, K., Llewellyn, D.J., Zhang, R., Dennis, E. S. and Wang, N. (2014). DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 15, 1–18.

- Li, E., Bhargava, A., Qiang, W., Friedmann, M.C., Forneris, N., Savidge, R.A., Johnson, L.A., Mansfield, S.D., Ellis, B.E. and Douglas, C.J. (2012). The Class II KNOX gene KNAT7 negatively regulates secondary wall formation in Arabidopsis and is functionally conserved in Populus. *New Phytol.* *194*, 102–115.
- Li, E., Wang, S., Liu, Y., Chen, J.-G. and Douglas, C.J. (2011). OVATE FAMILY PROTEIN4 (OFP4) interaction with KNAT7 regulates secondary cell wall formation in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* *67*, 328–341.
- Lin, C.Y., Huang, L.Y., Chi, W.C., Huang, T.L., Kakimoto, T., Tsai, C.R. and Huang, H.J. (2015). Pathways involved in vanadate-induced root hair formation in Arabidopsis. *Physiol. Plant.* *153*, 137–148.
- Liu, Y. and Douglas, C.J. (2015). A role for OVATE FAMILY PROTEIN1 (OFP1) and OFP4 in a BLH6-KNAT7 multi-protein complex regulating secondary cell wall formation in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal. Behav.* *10*, e1033126
- Liu, Y., You, S., Taylor-Teeple, M., Li, W.L., Schuetz, M., Brady, S.M. and Douglas, C.J. (2014). BEL1-LIKE HOMEODOMAIN6 and KNOTTED ARABIDOPSIS THALIANA7 interact and regulate secondary cell wall formation via repression of REVOLUTA. *Plant Cell* *26*, 4843–4861.
- Liu, X., Wei, W., Zhu, W., Su, L., Xiong, Z., Zhou, M., Zheng, Y. and Zhou, D.-X. (2017). Histone Deacetylase AtSRT1 Links Metabolic Flux and Stress Response in Arabidopsis. *Mol. Plant* *10*, 1510–1522.
- Locy R.D. et al. (2000) The Regulation of GABA Accumulation by Heat Stress in Arabidopsis. In: Cherry J.H., Locy R.D., Rychter A. (eds) *Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering*. NATO Science Series (Series 3: High Technology), vol 83. Springer, Dordrecht
- Lu, Y., Steichen, J.M., Weise, S.E. and Sharkey, T.D. (2006). Cellular and organ level localization of maltose in maltose-excess Arabidopsis mutants. *Planta* *224*, 935–943.
- Maudet, C., Mano, M., Sunkavalli, U., Sharan, M., Giacca, M., Förstner, K.U. and Eulalio, A. (2014). Functional high-throughput screening identifies the miR-15 microRNA family as cellular restriction factors for Salmonella infection. *Nat. Commun.* *5*, 4718.

- McCahill, I.W. and Hazen, S.P. (2019). Regulation of Cell Wall Thickening by a Medley of Mechanisms. *Trends Plant Sci.* *24*, 853–866.
- Mengel, A., Ageeva, A., Georgii, E., Bernhardt, J., Wu, K., Durner, J. and Lindermayr, C. (2017). Nitric Oxide Modulates Histone Acetylation at Stress Genes by Inhibition of Histone Deacetylases. *Plant Physiol.* *173*, 1434–1452.
- Mitsukawa, N., Okumura, S., Shirano, Y., Sato, S., Kato, T., Harashima, S. and Shibata, D. (1997). Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 7098–7102.
- Mockaitis, K. and Howell, S.H. (2000). Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* *24*, 785–796.
- Murfett, J., Wang, X.-J., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (2001). Identification of *Arabidopsis* Histone Deacetylase HDA6 Mutants That Affect Transgene Expression. *Plant Cell* *13*, 1047–1061.
- Nan, W., Wang, X., Yang, L., Hu, Y., Wei, Y., Liang, X., Mao, L. and Bi, Y. (2014). Cyclic GMP is involved in auxin signalling during *Arabidopsis* root growth and development. *J. Exp. Bot.* *65*, 1571–1583.
- Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, N.A. and Ohtani, M. (2015). NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Front. Plant Sci.* *6*, 1–18.
- Navarrete, O., Van Daele, J., Stove, C., Lambert, W., Storozhenko, S. and Van Der Straeten, D. (2013). Isolation and characterisation of an *antifolate insensitive* (*afi1*) mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* *15*, 37–44.
- Obayashi, T., Aoki, Y., Tadaka, S., Kagaya, Y. and Kinoshita, K. (2018). ATTED-II in 2018: A Plant Coexpression Database Based on Investigation of the Statistical Property of the Mutual Rank Index. *Plant Cell Physiol.* *59*, e3–e3.
- Ohashi-Ito, K. and Fukuda, H. (2010). Transcriptional regulation of vascular cell fates. *Curr. Opin. Plant Biol.* *13*, 670–676.

Ohashi-Ito, K., Iwamoto, K. and Fukuda, H. (2018). LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 15 Positively Regulates Expression of VND7, a Master Regulator of Tracheary Elements. *Plant Cell Physiol.* *59*, 989–996.

Ohashi-Ito, K., Oda, Y. and 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* *22*, 3461–3473.

Ohbayashi, I., Lin, C., Shinohara, N., Matsumura, Y., Machida, Y., Horiguchi, G., Tsukaya, H. and Sugiyama, M. (2017). Evidence for a Role of ANAC082 as a Ribosomal Stress Response Mediator Leading to Growth Defects and Developmental Alterations in Arabidopsis. *Plant Cell* *29*, 2644–2660.

Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M. (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell*, *13*(8), 1959–1968.

Ohtani, M. and Demura, T. (2019). The quest for transcriptional hubs of lignin biosynthesis: beyond the NAC-MYB-gene regulatory network model. *Curr. Opin. Biotechnol.* *56*, 82–87.

Ohtani, M., Kawabe, H. and Demura, T. (2018). Evidence that thiol-based redox state is critical for xylem vessel cell differentiation. *Plant Signal. Behav.* *13*, e1428512.

Peña, M.J., Zhong, R., Zhou, G.K., Richardson, E.A., O'Neill, M.A., Davill, A.G., York, W.S. and Yeb, Z.H. (2007). Arabidopsis irregular xylem8 and irregular xylem9: Implications for the complexity of glucuronoxylyan biosynthesis. *Plant Cell* *19*, 549–563.

Persson, S., Wei, H., Milne, J., Page, G.P. and Somerville, C.R. (2005). Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 8633–8638.

Picard, D. and Yamamoto, K.R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* *6*, 3333–3340.

Preston, J., Wheeler, J., Heazlewood, J., Li, S.F. and Parish, R.W. (2004). AtMYB32 is required for normal pollen development in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* *40*, 979–995.

Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted

with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 975, 384–394.

Pesquet, E. and Tuominen, H. (2011). Ethylene stimulates tracheary element differentiation in *Zinnia elegans* cell cultures. *New Phytol.* 190, 138–149.

Pesquet, E., Zhang, B., Gorzsás, A., Puhakainen, T., Serk, H., Escamez, S., Barbier, O., Gerber, L., Courtois-Moreau, C., Alatalo, E., Paulin, L., Kangasjärvi, J., Sundberg, B., Goffner, D. and Tuominen, H. (2013). Non-cell-autonomous postmortem lignification of tracheary elements in *Zinnia elegans*. *Plant Cell* 25, 1314–1328.

Rodríguez-Serrano, M., Pazmiño, D.M., Sparkes, I., Rochetti, A., Hawes, C., Romero-Puertas, M.C. and Sandalio, L.M. (2014). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid promotes S-nitrosylation and oxidation of actin affecting cytoskeleton and peroxisomal dynamics. *J. Exp. Bot.* 65, 4783–4793.

Raes, J., Rohde, A., Christensen, J.H., Van de Peer, Y. and Boerjan, W. (2003). Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133, 1051–1071.

Reusche, M., Thole, K., Janz, D., Truskina, J., Rindfleisch, S., Drübert, C., Polle, A., Lipka, V. and Teichmann, T. (2012). *Verticillium* Infection Triggers VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN7-Dependent de Novo Xylem Formation and Enhances Drought Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 3823–3837.

Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., A. Sturn1, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush, and J. Quackenbush(2003). TM4: A Free, Open-Source System for Microarray Data Management and Analysis. *Biotechniques* 34, 374–378.

Santa-Cruz, D.M., Pacienza, N.A., Polizio, A.H., Balestrasse, K.B., Tomaro, M.L. and Yannarelli, G.G. (2010). Nitric oxide synthase-like dependent NO production enhances heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B-irradiated soybean plants. *Phytochem.* 71, 1700–1707.

Soyano, T., Thitamadee, S., Machida, Y. and Chua, N.-H. (2008). ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE19/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN30 and ASL20/LBD18 Regulate Tracheary Element Differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 3359–3373.



- Staal, M., De Cnodder, T., Simon, D., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D., Verbelen, J.-P., Elzenga, T. and Vissenberg, K. (2011). Apoplastic Alkalinization Is Instrumental for the Inhibition of Cell Elongation in the Arabidopsis Root by the Ethylene Precursor 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid. *Plant Physiol.* *155*, 2049–2055.
- Stoynova-Bakalova, E., Karanov, E., Petrov, P., Hall, M.A. and Stoynova-Bakalova, E. (2004). Cell division and cell expansion in cotyledons of Arabidopsis seedlings. *New Phytol.* *162*, 471–479.
- Swinburne, J., Balcells, L., Scofield, S.R., Jones, J.D.G. and Coupland, G. (1992). Elevated levels of Activator transposase mRNA are associated with high frequencies of Dissociation excision in Arabidopsis. *Plant Cell* *4*, 583–595.
- Tan, T.T., Demura, T. and Ohtani, M. (2019). Creating vessel elements in vitro: Towards a comprehensive understanding of the molecular basis of xylem vessel element differentiation. *Plant Biotechnol.* *36*, 1–6.
- Tan, T.T., Endo, H., Sano, R., Kurata, T., Yamaguchi, M., Ohtani, M. and Demura, T. (2018). Transcription Factors VND1-VND3 Contribute to Cotyledon Xylem Vessel Formation. *Plant Physiol.* *176*, 773–789.
- Tang, N., Shahzad, Z., Lonjon, F., Loudet, O., Vailliau, F. and Maurel, C. (2018). Natural variation at XND1 impacts root hydraulics and trade-off for stress responses in Arabidopsis. *Nat. Commun.* *9*, 1–12.
- Taylor, N.G., Scheible, W.R., Cutler, S., Somerville, C.R. and Turner, S.R. (1999) The irregular xylem3 Locus of Arabidopsis Encodes a Cellulose Synthase Required for Secondary Cell Wall Synthesis. *The Plant Cell*, *11*, 769–779
- Taylor-Teeples, M., Lin, L., de Lucas, M., Turco, G., Toal, T.W., Gaudinier, A., Young, N.F., Thévenaz, P. and Unser, M. (2007). User-friendly semiautomated assembly of accurate image mosaics in microscopy. *Microsc. Res. Tech.* *70*, 135–146.
- Terrile, M.C., París, R., Calderón-Villalobos, L.I.A., Iglesias, M.J., Lamattina, L., Estelle, M. and Casalagué, C.A. (2012). Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the Arabidopsis TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *Plant J.* *70*, 492–500.

Trabucco, G.M., Veling, M.T., Lamothe, R., Handakumbura P. P., Xiong G., Wang C., Corwin J., Tsoukalas A., Zhang L., Ware D., Pauly M., Kliebenstein D. J., Dehesh K., Tagkopoulos I., Breton G., Pruneda-Paz J. L., Ahnert S. E., Kay S.A., Hazen S. P. and Brady S. M. (2015). An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* 517, 571–575.

Tsiatsiani, L., Timmerman, E., De Bock, P.J., Vercammen, D., Stael, S., van de Cotte, B., Staes, A., Goethals, M., Beunens, T., Van Damme, P., et al. (2013). The arabidopsis METACASPASE9 degradome. *Plant Cell* 25, 2831–2847.

Turco, G.M., Rodriguez-Medina, J., Siebert, S., Han, D., Valderrama-Gómez, M.Á., Vahldick, H., Shulse, C.N., Cole, B.J., Juliano, C.E., Dickel, D.E., Savageau M. A. and Brady S.M.(2019). Molecular Mechanisms Driving Switch Behavior in Xylem Cell Differentiation. *Cell Rep.* 28, 342-351.e4.

Turner, S., Gallois, P. and Brown, D. (2007). Tracheary Element Differentiation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 407–433.

Ueda, M., Matsui, A., Tanaka, M., Nakamura, T., Abe, T., Sako, K., Sasaki, T., Kim, J.-M., Ito, A., Nishino, N., et al. (2017). The Distinct Roles of Class I and II RPD3-Like Histone Deacetylases in Salinity Stress Response. *Plant Physiol.* 175, 1760–1773.

Ueda, M., Matsui, A., Watanabe, S., Kobayashi, M., Saito, K., Tanaka, M., Ishida, J., Kusano, M., Seo, M. and Seki, M. (2019). Transcriptome Analysis of the Hierarchical Response of Histone Deacetylase Proteins That Respond in an Antagonistic Manner to Salinity Stress. *Front. Plant Sci.* 10, 1323.

Velanis, C.N., Herzyk, P. and Jenkins, G.I. (2016). Regulation of transcription by the Arabidopsis UVR8 photoreceptor involves a specific histone modification. *Plant Mol. Biol.* 92, 425–443.

Wang, S., Chang, Y., Guo, J. and Chen, J.-G. (2007). Arabidopsis Ovate Family Protein 1 is a transcriptional repressor that suppresses cell elongation. *Plant J.* 50, 858–872.

Wang, S., Yamaguchi, M., Grienberger, E., Martone, P.T., Samuels, A.L. and Mansfield, S.D. (2020). The Class II KNOX genes KNAT3 and KNAT7 work cooperatively to influence deposition of secondary cell walls that provide mechanical support to Arabidopsis stems. *Plant J.* 101, 293–309.

Wang, L., Lu, W., Ran, L., Dou, L., Yao, S., Hu, J., Fan, D., Li, C. and Luo, K. (2019). R2R3-MYB transcription factor MYB 6 promotes anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis but inhibits secondary cell wall formation in *Populus tomentosa*. *Plant J.* *99*, 733–751.

Wang, R., Okamoto, M., Xing, X. and Crawford, N.M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron and sulfate metabolism. *Plant Physiol.* *132*, 556–567.

Wang, Y.-C., Peterson, S.E. and Loring, J.F. (2014). Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res.* *24*, 143–160.

Yamaguchi, M., Goué, N., Igarashi, H., Ohtani, M., Nakano, Y., Mortimer, J.C., Nishikubo, N., Kubo, M., Katayama, Y., Kakegawa, K., Dupree P. and Demura T.(2010a). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 effectively induce transdifferentiation into xylem vessel elements under control of an induction system. *Plant Physiol.* *153*, 906–914.

Yamaguchi, M., Kubo, M., Fukuda, H. and Demura, T. (2008). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in *Arabidopsis* roots and shoots. *Plant J.* *55*, 652–664.

Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Ohtani, M., Ohme-Takagi, M., Kato, K. and Demura, T. (2011). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation. *Plant J.* *66*, 579–590.

Yamaguchi, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Kubo, M., Ohme-Takagi, M., Fukuda, H. and Demura, T. (2010b). VND-INTERACTING2, a NAC Domain Transcription Factor, Negatively Regulates Xylem Vessel Formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *22*, 1249–1263.

Yuan, L., Chen, X., Chen, H., Wu, K. and Huang, S. (2019). Histone deacetylases HDA6 and HDA9 coordinately regulate valve cell elongation through affecting auxin signaling in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *508*, 695–700.

Zhang, B., Ramonell, K., Somerville, S. and Stacey, G. (2002). Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact.* *15*, 963–970.

Zhang, F., Wang, L., Ko, E.E., Shao, K. and Qiao, H. (2018). Histone Deacetylases SRT1 and SRT2 Interact with ENAP1 to Mediate Ethylene-Induced Transcriptional Repression. *Plant Cell* 30, 153–166.

Zhang, Q., Luo, F., Zhong, Y., He, J. and Li, L. (2019). Modulation of NST1 activity by XND1 regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 1–10.

Zhao, C., Avci, U., Grant, E.H., Haigler, C.H. and Beers, E.P. (2007). XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem. *Plant J.* 53, 425–436.

Zhou, J., Lee, C., Zhong, R. and Ye, Z.H. (2009). MYB58 and MYB63 Are Transcriptional Activators of the Lignin Biosynthetic Pathway during Secondary Cell Wall Formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 21(1), 248–266.

Zhong, R., Lee, C. and Ye, Z.-H. (2010). Global Analysis of Direct Targets of Secondary Wall NAC Master Switches in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 3, 1087–1103.

Zhong, R., Lee, C., Zhou, J., McCarthy, R.L. and Ye, Z.H. (2008). A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 2763–2782.

Zhong, R. and Ye, Z.-H. (2012). MYB46 and MYB83 Bind to the SMRE Sites and Directly Activate a Suite of Transcription Factors and Secondary Wall Biosynthetic Genes. *Plant Cell Physiol.* 53, 368–380.

Zhou, J., Lee, C., Zhong, R. and Ye, Z.-H. (2009). MYB58 and MYB63 Are Transcriptional Activators of the Lignin Biosynthetic Pathway during Secondary Cell Wall Formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 248–266.

Zhou, J., Zhong, R. and Ye, Z.-H. (2014). *Arabidopsis* NAC Domain Proteins, VND1 to VND5, Are Transcriptional Regulators of Secondary Wall Biosynthesis in Vessels. *PLoS One* 9, e105726.

Zhong, R., and Ye, Z.-H. (2012). MYB46 and MYB83 Bind to the SMRE Sites and Directly Activate a Suite of Transcription Factors and Secondary Wall Biosynthetic Genes. *Plant Cell Physiol.* 53, 368–380.

野田 千尋 (2018)道管細胞分化過程における細胞膜健全性の役割の解明 修士論文

向井 麻衣 (2018)pre-mRNA スプライシング制御と脱分化制御をつなぐ新規転写因子  
CELL POTENCY-RELATED NAC-DOMAIN の機能解析 修士論文

## 7. 謝辞

本研究において終始ご指導下さいました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物代謝制御研究室の出村拓教授ならびに大谷美沙都助教（現東京大学准教授）、加藤晃准教授、久保稔助教（現熊本大学特任講師）、國枝正助教、中田未友希助教、津川暁特任助教、Yoichiro Watanabe 特任助教、米田新元助教、佐野亮輔研究員、山崎将太郎研究員、川邊陽文研究員、Uy Abigail Loren Tung 研究員に深く感謝します。また、東京理科大学松永幸大教授、坂本勇貴研究員（現大阪大学助教）、長谷川淳子博士には顕微鏡観察や TOMEI 法について詳しくご指導いただきましたこと、感謝いたします。ここにすべての方のお名前を挙げることは出来ませんが、植物代謝制御研究室の皆様の御指導、御助言、御協力に対し、心から御礼申し上げます。本学で出会うことのできた友人達にも大変お世話になりました。日々の研究生活で行き詰った時にも、友人たちが支えとなり何度も助けられました。最後に、日頃から自分の意思を尊重し、大学院への進学も快諾し、暖かく見守ってくれた家族と、予想外のデータを見せて研究意欲をかきたててくれた植物達に心から感謝します。この場を借りて深く御礼申し上げます。本当にありがとうございました。

奈良先端科学技術大学院大学梅田正明教授ならびに吉田聡子特任准教授には本論文の精読と審査をして頂きました。心より感謝申し上げます。