

個体統合解析研究チーム

Laboratory for Interdisciplinary Analysis of Plant Development

チームリーダー 和田 拓治

WADA, Takuji

当研究チームでは、高等植物の細胞分化の機構を理解するために、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の表皮細胞の分化を制御している遺伝子の作用機構の研究を行っている。シロイヌナズナの表皮細胞は根では根毛、葉ではトライコームや気孔といった器官に分化する。またアントシアニン色素も表皮細胞に蓄積する。

根では、非根毛細胞で翻訳された CAPRICE タンパク質が根毛細胞に細胞間移行し、*GLABRA2* 遺伝子の発現を抑制することによって根毛細胞の分化を促進する。この細胞間移行の機構と表皮細胞分化への関連づけを行うと同時に、MYB 遺伝子 bHLH 遺伝子を中心とした他の表皮細胞の分化因子の詳細な解析も行っている。これらの実験結果を元にして、植物個体や器官の形成に関わる細胞間のシグナル伝達の機構や位置情報の性質を明らかにし、シロイヌナズナ以外の植物の多様な細胞の分化の研究にも応用させていきたいと考えている。

1. シロイヌナズナ CAPRICE タンパク質の細胞間移行に関する研究 (倉田, 石田, 野口, 服部, 木村^{*1}, 和田)

シロイヌナズナの根の表皮細胞は根毛細胞、非根毛細胞の2種類の細胞が存在する。根毛形成を正に制御している CAPRICE (CPC) 遺伝子 (MYB タンパク質をコードする) は、非根毛細胞で発現しているが、CPC タンパク質は非根毛細胞から根毛細胞に細胞間移行し、根毛形成を促進することが分かっている。我々は CPC タンパク質内の、N 末端の9 アミノ酸と Myb 領域内の4 アミノ酸がこの細胞間移行に必要な領域であることを示した。また Myb 領域内の4 アミノ酸は CPC タンパク質の核移行にも必要な領域であった。

また CPC 遺伝子を根の他の細胞で異所的に発現させたところ、CPC タンパク質は根毛細胞から非根毛細胞へも移行するが、中心柱から外側の細胞層へ移行することはできなかった。SHORT-ROOT (SHR) タンパク質は中心柱から内皮へ移行することが報告されているので、CPC タンパク質の細胞間移行の機構は SHR タンパク質の移行の機構とは異なったものであると考えられる。

現在、原形質連絡を介しての移行を示唆するデータもあるので、CPC タンパク質と相互作用し CPC タンパク質の移行に関わっている因子を酵母の two-hybrid スクリーニングにより分離している。また CPC タンパク質の細胞間移行を制御する因子を遺伝学的に分離するために、*CPC::CPC::GFP* を持った形質転換シロイヌナズナを変異原処理し、GFP の蛍光のパターンが異なった株のスクリーニングを行い突然変異体候補を分離している。

2. シロイヌナズナの表皮細胞分化に関わる MYB 遺伝

子の解析 (富永, 岩田, 和田)

シロイヌナズナゲノム上には CPC 遺伝子様の R3 リピートしか持たない短い MYB 遺伝子が4つ存在した。そのうちの1つはトライコーム形成に関わる *TRIPTYCHON (TRY)* 遺伝子であった。我々は残りの3つの遺伝子を *CPC-LIKE MYB (CPL)-1, 2, 3* 遺伝子と名付けた。この3遺伝子の過剰発現体の表現型は CPC 遺伝子過剰発現株の表現型と同じで、トライコーム数が減少し根毛数が増加した。一方、*cpl3* 突然変異体では根毛数が減少している。また *cpc cpl3* 突然変異体では、二遺伝子変異の相乗的な効果によりトライコーム数が著しく増加する。

引き続き各遺伝子の発現部位および遺伝子産物の局在についての解析を行った。*CPL1* 遺伝子はトライコームと非根毛細胞で発現していたが、*CPL2*, *CPL3* タンパク質は気孔に強く局在することが分かった。

また CPC 遺伝子プロモーターを使った形質転換体の解析より、各 CPL 遺伝子産物および TRY タンパク質は細胞間移行しない可能性が高いことを示した。また *CPL2* タンパク質と TRY タンパク質は根での安定性が弱いことから、根で特異的に働いているタンパク質分解系によりその蓄積が制御されていることが示唆された。

各 CPL 遺伝子が、CPC 遺伝子、TRY 遺伝子との協調的な働きによって、根毛、トライコーム、気孔の孔辺細胞の分化に関して重複した働きを持つことが明らかとなった。

3. シロイヌナズナの表皮細胞で発現している bHLH 遺伝子の解析 (佐野, 長坂, 富永, 岩田, 和田)

トウモロコシの bHLH 遺伝子である *R* 遺伝子と全長にわたって相同性を持つ遺伝子として *GLABRA3 (GL3)* 遺伝子、*AtMYC1* 遺伝子、*ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3)* 遺伝子がシロイヌナズナのゲノム上に存在し、根毛細胞と葉の表皮細胞で発現していた。*gl3-1*, *atmyc1-27660* 各突然変異体では、根毛数が野生型の1.5倍程度に増加しているのに対し、*gl3-1 atmyc1-27660*, *gl3-1 egl3-5712* 各二重突然変異体では根毛数が野生型の2倍程度にまで増加していた。また *atmyc1-27660* 突然変異体ではトライコーム数が減少し、*gl3-1* 突然変異体ではトライコーム数が減少するとともに、トライコームの分枝数も減少していた。*gl3-1 atmyc1-27660* 二重突然変異体ではトライコームがほぼなくなり、*gl3-1 egl3-5712* 二重突然変異体ではトライコームが完全に消失する。以上の結果より *GL3* 遺伝子、*AtMYC1* 遺伝子は協調して表皮細胞の分化に関与し、*EGL3* 遺伝子も補助的な作用を及ぼしていると考えられる。さらに *GFP* 遺伝子と融合させた形質転換体の実験により、*GL3* タンパク質と *EGL3* タンパク質は根毛細胞から非根毛細胞に移行し *GL2* 遺伝子の発現を促進していることが明らかとなった。

また各 bHLH タンパク質は、GL3 > EGL3 > AtMYC1 の強さの順で CPC タンパク質や WEREWOLF タンパク質（根毛形成を負に制御する MYB タンパク質）と酵母内でタンパク質間相互作用することを示した。WD40 領域を持つ TRANSPARENT TESTA GLABRA1 タンパク質に対しては、GL3 タンパク質と EGL3 タンパク質は結合したが、AtMYC1 タンパク質との間には結合活性は観察されなかった。

4. WRKY 領域を持った TRANSPARENT TESTA GLABRA2 (TTG2) 遺伝子の解析（石田，服部，和田）
GL2 遺伝子と TTG2 遺伝子の間にはそれぞれの発現に関して上下関係がない。当研究チームでは GL2 遺伝子に依存していない経路を明らかにするために、WRKY 領域を持った TTG2 遺伝子の解析を行っている。TTG2 遺伝子は地上部では葉原基とトライコームで発現し、根では非根毛細胞で発現していた。TTG2 遺伝子の非根毛細胞での発現は WER 遺伝子によって正に、CPC 遺伝子によって負に制御されていた。TTG2 遺伝子のプロモーター領域に Myb タンパク質の結合配列を見いだしたので、現在 TTG2 遺伝子の発現に関する Myb タンパク質の作用機構について解析中である。

ttg2-1 try-82 二重突然変異体では、分枝数は ttg2-1 突然変異体のように少なくなるが、トライコーム数に関しては 2 つの突然変異体の中間であった。また ttg2-1 gl3-2 二重突然変異体では、表現型は付加的になり非常に小さな突起状のトライコームが少数観察された。

5. ブドウ培養細胞におけるアントシアニン合成制御因子の研究（郷原，富永，北浦^{*2}，和田）

ブドウやイチゴの赤色の原因であるアントシアニン色素は表皮細胞に蓄積し、Myb 領域や bHLH 領域を持った転写因子によってアントシアニン合成系の酵素の転写が制御されていることがトウモロコシで報告されていた。シロイヌナズナで解析を行っている表皮細胞分化制御因子がアントシアニン合成も制御していることを調べるために、ブドウ表皮細胞由来の培養細胞に遺伝子を導入する実験を行い、bHLH 領域を持ったトウモロコシの R 遺伝子とシロイヌナズナの TRANSPARENT TESTA8 遺伝子、EGL3 遺伝子、GL3 遺伝子がアントシアニン蓄積を高めることを示した。この項目の研究は栽培植物等の他植物への応用となる研究であり、植物科学研究センターのセンター長ファンドにより行っている。またイチゴでのアントシアニン合成制御の研究は神奈川県農業総合研究所との共同研究として行っている。

6. 細胞分化に関わる新規突然変異体の分離（倉田，石田，野口，服部，久保^{*2}，西村^{*1}，和田；市川，松井（GSC 植物ゲノム機能情報研究グループ））

様々な変異原で作出されたシロイヌナズナ株をスクリーニングし、トライコームの形態が異常になった株、根毛形成が異常になった株を既に分離している。その中の 1 つである yore-yore-1 (yre-1) 突然変異体では、トライコームがよじれてサイズが小さくなっているだけでなく、ワックスの合成能の低下、雄性不稔、器官の接着などの表現型も

観察された。YRE 遺伝子は、ワックス生合成に関わっている ECERIFERUM1 遺伝子に相同な遺伝子であることが分かった。

またゲノム科学総合研究センター 植物ゲノム機能情報研究グループが Fox Hunting System (Full-length cDNA Over-eXpressor gene hunting system) により作製した一遺伝子過剰発現株の中より、根毛数が減少した mouse-tail 突然変異体を分離し遺伝学的な解析を進めている。

7. シロイヌナズナのトランスポゾン挿入株のフェノーム解析（湯口，横内，和田；黒森，平山，篠崎（GSC 植物ゲノム機能情報研究グループ））

ゲノム科学総合研究センター 植物ゲノム機能情報研究グループ（篠崎一雄グループディレクター）と理研内のセンター間連携研究として、トウモロコシのトランスポゾンである Ds を挿入したシロイヌナズナの表現型を網羅的に解析している。解析したデータの一部は、理研内で既に公表している。

^{*1} ジュニア・リサーチ・アソシエイト，^{*2} 共同研究員

Research in this laboratory focuses on the interactions of genes which control cellular differentiation, particularly those which affect differentiation of epidermal cells in *Arabidopsis thaliana*. In this species, root epidermal cells differentiate into root-hair cells or hairless cells. Leaf epidermal cells differentiate into trichomes, guard cells, or pavement cells. All of these epidermal cell types can accumulate anthocyanin pigments.

One of the regulators of epidermal cell differentiation, the MYB gene *CAPRICE* (*CPC*), represses the expression of the homeodomain-leucine zipper gene *GLABRA2* (*GL2*) in root-hair cells. Analysis of *CPC::CPC::GFP* transgenic plants indicated that the CPC protein moves from hairless cells to root-hair cells. We expressed CPC ectopically using promoters specific for other cell-types, showing that CPC also moved from root-hair cell to hairless cells, but not from stele to epidermis. We identified a sequence in CPC which is responsible for cell-to-cell movement. Using yeast two-hybrid screening, we isolated CPC-interacting factors which might regulate the cell-to-cell movement of CPC. We screened plants grown from mutagenized *CPC::CPC::GFP* seeds for mutants which showed deviating patterns of GFP fluorescence. The CPC-like MYB genes *CPL2* and *CPL3* were expressed preferentially in guard cells, whereas *CPL1* was expressed in hairless cells and trichomes. Another CPC-homologous gene, *TRIPTYCHON* (*TRY*), is involved in the development of trichomes and root-hairs. The stability of CPL2 and TRY proteins was low in roots, as could be judged from observations of *CPC* promoter::*CPL2::GFP* and *CPC* promoter::*TRY::GFP* transgenic plants. TRY and the CPL proteins did not show cell-to-cell movement. We concluded that CPC, TRY, and the three CPLs control epidermal cell differentiation including root-hair formation, trichome formation, and stomatal patterning.

Overexpression of the maize bHLH gene, *R*, affects epidermal cell differentiation in *Arabidopsis*. We are characterizing *R*-homologous bHLH genes in *Arabidopsis*, including *GLABRA3* (*GL3*), *AtMYC1*, and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*). *gl3-1* and *atmyc1-27660* devel-

oped more root-hairs than wild-type plants. In addition, *gl3-1 atmyc1-27660* and *gl3-1 egl3-5712* double mutants had more root-hairs than each single-gene mutant. All three genes were expressed in root-hair cells, but only the GL3 and EGL3 proteins moved from root-hair cells to hairless cells, where they activated *GL2* expression. We also demonstrated that WEREWOLF, an R2-R3 type Myb and negative regulator of root-hair development, interacted with GL3 more strongly than with EGL3, which was consistent with the fact that the *gl3-1* mutant developed more root-hairs than the *egl3-5712* mutant. We also showed that GL3 and EGL3 enhance the anthocyanin pigmentation in cultured grape cells.

We are attempting to isolate new factors involved in epidermal cell differentiation in *Arabidopsis*. To elucidate GL2-independent pathways, we are analyzing *TRANSPARENT TESTA GLABRA2* which is expressed in leaf trichomes and hairless cells. The *yore-yore (yre)* mutation affects trichome size, wax synthesis, male fertility, and organ adhesion. *YRE* resembles *ECERIFERUM1*, which is also involved in wax synthesis in *Arabidopsis*. Furthermore, we isolated the *mouse-tail* mutant from the full-length cDNA overexpressing lines.

Collaborating with the Plant Functional Genomics Research Group at RIKEN Genomic Sciences Center, we produce a comprehensive description of the phenotype of the Ds transposon-tagging line.

Our ultimate goal is to develop a more complete understanding of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* by elucidating the mechanisms of intercellular signal transduction and by characterizing the role cell position plays in determining cell fate. We hope that the results of our research will provide insights into the diverse ways in which cellular differentiation is carried out by plants, and will also enable us improve the growth of crops.

Research Subjects and Members of Laboratory for Interdisciplinary Analysis of Plant Development

1. Analysis of cell-to-cell movement of CAPRICE (CPC)
2. Analysis of CPC-type MYB genes in *Arabidopsis*
3. Characterization of epidermis-specific bHLH genes of *Arabidopsis*
4. Molecular genetic analysis of *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*
5. Regulatory factors for anthocyanin biosynthesis in grape cell culture
6. Isolation of new mutants with altered cell differentiation
7. Phenotypic analysis of Ds transposon-tagging line in *Arabidopsis*

Laboratory Head

Dr. Takuji WADA

Research Scientist

Dr. Tetsuya KURATA

Dr. Ryosuke SANO

Dr. Rumi TOMINAGA

Dr. Tetsuya ISHIDA

Technical Staff

Ms. Mineko IWATA

Ms. Ryoko NAGASAKA

Mr. Masahiro YUGUCHI

Mr. Takuro YOKOUCHI

Ms. Sayoko HATTORI

Mr. Masahiro NOGUCHI

Mr. Takeshi GOHARA

Assistant

Ms. Tomoko YOSHIMITSU

in collaboration with

Dr. Takanari ICHIKAWA (Plant Functional Genomics Research Group, GSC)

Dr. Minami MATSUI (Plant Functional Genomics Research Group, GSC)

Dr. Takashi KUROMORI (Plant Functional Genomics Research Group, GSC)

Dr. Takashi HIRAYAMA (Plant Functional Genomics Research Group, GSC)

Dr. Kazuo SHINOZAKI (Plant Functional Genomics Research Group, GSC)

Visiting Members

Mr. Takeo KITAURA (Kanagawa Pref. Agric. Res. Inst.)

Mr. Yoshihiro KOSHINO-KIMURA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Ms. Miyuki KUBO (Kanagawa Pref. Agric. Res. Inst.)

Mr. Taisuke NISHIMURA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Nishimura T., Yokota E., Wada T., Shimmen T., and Okada K.: "An *Arabidopsis ACT2* dominant-negative mutation, which disturbs F-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development", *Plant Cell Physiol.* **44**, 1131–1140 (2003). *

Kurata T., Awai C., Sakuradani E., Shimizu S., Okada K., and Wada T.: "The *YORE-YORE* gene regulates multiple aspects of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis*", *Plant J.* **36**, 55–66 (2003). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Wada T., Yuguchi M., Yokouchi T., Okada K., Kuromori T., Hirayama T., Kamiya A., Takabe H., and Shinozaki K.: "Phenome analysis of Ds transposon line in Ara-

- bidopsis”, RIKEN GSC Int. Symp. 2003: New Frontiers of Plant Functional Genomics, (RIKEN GSC), Yokohama, May (2003).
- Sano R., Nagasaka R., Inoue K., Shirano Y., Hayashi H., Shibata D., Sato S., Kato T., Tabata S., Okada K., and Wada T.: “Analysis of bHLH (MYC) genes involved in root hair and trichome differentiation”, 14th Int. Conf. on Arabidopsis Research, (The North American Arabidopsis Steering Committee (NAASC)), Madison, USA, June (2003).
- Wada T., Kurata T., Tominaga R., and Okada K.: “Analysis of R3-type MYB genes for epidermal cell differentiation”, 14th Int. Conf. on Arabidopsis Research, (The North American Arabidopsis Steering Committee (NAASC)), Madison, USA, June (2003).
- Nishimura T., Yokota E., Wada T., Shimmen T., and Okada K.: “A semi-dominant mutation in the ACT2 gene disturbs initiation and growth of root hairs, extension of root epidermal cells and actin polymerization in Arabidopsis”, 7th Int. Congr. of Plant Molecular Biology (ISPMB 2003), (The International Society for Plant Molecular Biology), Barcelona, Spain, June (2003).
- Wada T., Sano R., Tominaga R., and Okada K.: “Analysis of epidermis specific MYB and bHLH genes of Arabidopsis”, 7th Int. Congr. of Plant Molecular Biology (ISPMB 2003), (The International Society for Plant Molecular Biology), Barcelona, Spain, June (2003).
- Kurata T., Awai C., Sano R., Okada K., and Wada T.: “Cell to cell movement of CPC regulates epidermis differentiation in Arabidopsis”, 7th Int. Congr. of Plant Molecular Biology (ISPMB 2003), (The International Society for Plant Molecular Biology), Barcelona, Spain, June (2003).
- Wada T.: “Cell-to-cell movements of transcription factors control the epidermal cell differentiation in Arabidopsis”, 16th Plant Biotechnology Symp., (The Botanical Society of Korea and the Crop Functional Genomics Center), Daejeon, Korea, Aug. (2003).
- Nishimura T., Wada T., and Okada K.: “A key factor of translational re-initiation, ribosomal protein L24, is involved in gynoecium development in *Arabidopsis*”, RNA 2003 Kyoto on the New Frontier of RNA Science, (The RNA Society of Japan), Kyoto, Nov. (2003).
- (国内会議)
- 佐野亮輔, 長坂亮子, 井上加代子, 白野由美子, 林浩昭, 柴田大輔, 佐藤修正, 加藤友彦, 田畑哲之, 岡田清孝, 和田拓治: “シロイヌナズナの根毛形成に関わる 3 つの bHLH 遺伝子の発現解析”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).
- 和田拓治, 倉田哲也, 佐野亮輔, 富永るみ, 石田哲也, 岡田清孝: “シロイヌナズナの根毛形成制御因子の解析”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).
- 富永るみ, 岩田美根子, 佐野亮輔, 関原明, 篠崎一雄, 岡田清孝, 和田拓治: “シロイヌナズナの表皮細胞分化に関与する MYB 遺伝子の解析”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).
- 石田哲也, 服部紗代子, 岡田清孝, 和田拓治: “シロイヌナズナの表皮細胞分化に関与する TTG2 遺伝子の分子遺伝学的解析”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).
- 湯口雅大, 横内卓郎, 神谷麻子, 井村優子, 高部寛子, 平山隆志, 黒森崇, 篠崎一雄, 岡田清孝, 和田拓治: “トランスポゾンタグラインを用いたシロイヌナズナのフェノーム解析 2”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).