

# 形態制御研究チーム

## Laboratory for Gene Regulation

チームリーダー 出村 拓  
DEMURA, Taku

植物が独自に持つ特徴として、成熟した細胞から植物個体を再生する能力（分化全能性）を挙げることができる。この分化全能性の基底には細胞の分化転換過程が存在するが、この過程を制御する分子メカニズムは未だ解明されてはいない。当研究チームでは、ヒヤクニチソウの単離葉肉細胞から維管束組織構成細胞である管状要素（道管、仮道管）への分化転換 *in vitro* 培養系をモデルとして、植物の分化全能性と形態形成を制御する分子メカニズムにアプローチする。具体的な研究手法としては、この *in vitro* 維管束細胞分化転換過程で発現する遺伝子群のカタログ化、マイクロアレイを用いた発現解析、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた reverse genetics により、植物の分化全能性と形態形成に関わる遺伝子発現調節機構とシグナル伝達機構を解析する。

### 1. 維管束細胞分化転換のマスター遺伝子の探索（久保，山口<sup>\*1</sup>，井原，小川，出村）

昨年度に引き続き、維管束分化特異的に発現して遺伝子発現制御やシグナル伝達を司ると予想される遺伝子群の機能解析を進めた。本年度は植物特有の転写制御因子である NAC ドメインタンパク質をコードする遺伝子群の詳細な解析により、過剰発現によって根の皮層や胚軸の表皮などに異所的な道管分化を誘導する 2 種類の遺伝子（VND6 および VND7）を同定した。また、昨年度に酵母の 2 ハイブリッドスクリーニングによって見いだした VND7 タンパク質と結合する NAC ドメインタンパク質（VNDIP1 および VNDIP2）の詳細解析を行った。興味深いことに VNDIP2 の過剰発現により原生木部道管の分化が特異的に抑制されたことから、これらの NAC ドメインタンパク質が協調して木部細胞の分化を制御していることが示唆された。

### 2. 維管束分化転換特異的遺伝子群の機能解析（遠藤，栗山<sup>\*1</sup>，田代，出村）

分化転換特異的に発現する機能未知遺伝子群の詳細な機能解析を進めた。ZeTED6 および ZeTED7 と名付けたお互いに類似した膜局在型のタンパク質をコードする遺伝子の機能を集中的に解析したところ、両者が同時に発現することにより分化が促進されることが明らかになった。シロイヌナズナホモログである AtTED6 と AtTED7 の解析も始めており、これら遺伝子の機能抑制によって道管形成が異常になった。また、新規のリパーゼ遺伝子の機能解析を進めたところ、核に局在すること、過剰発現によって子葉葉脈の道管形成が強く抑制されることなどが分かり、このリパーゼが道管分化の過程で脂質シグナルを介した情報伝達に関わる可能性が示唆された。また、本年度は、フルゲノムジーンチップ（アフィメトリクス社）を用いて得られたシロイヌナズナ継代培養細胞から道管要素への *in vitro* 分化転換過程での遺伝子発現情報をもとに、シロイヌナズナの道管分化転換特異的遺伝子群の網羅的機能解析に着手した。これまでに、およそ 100 種類のシロイヌナズナ完全長 cDNA を過剰発現する形質転換シロイヌナズナを作成した。

### 3. 維管束細胞分化特異的遺伝子群の発現制御機構の解析（佐々，表<sup>\*2</sup>，福田<sup>\*3</sup>，出村）

昨年度までに酵母 1 ハイブリッドスクリーニングにより同定した維管束細胞分化特異的シス因子に結合する転写制御因子の解析を進めた。特に道管特異的なシステインプロテアーゼ遺伝子とセルロース合成酵素遺伝子の維管束分化特異的シス因子に、それぞれ、bZIP タンパク質と GAGA 結合タンパク質が特異的に結合することを明らかにした。また、VND7 遺伝子など重要遺伝子の道管特異的発現に関わるシス因子の探索も継続して進めた。

### 4. 道管分化特異的細胞壁関連遺伝子群の機能解析（西窪，荒木，出村）

昨年度に引き続き、維管束細胞分化過程で特異的に発現するシロイヌナズナ細胞壁関連遺伝子の詳細解析を行った。本年度は、特に、細胞壁成分の生合成に関わると予想される glycosyl hydrolase 遺伝子群に着目して、発現様式、過剰発現体、RNAi による機能抑制体、T-DNA 挿入変異体の表現型を詳細に解析するとともに、形態構築研究チームとの共同研究として、タバコ BY-2 細胞での過剰発現による機能解析を進めた。

<sup>\*1</sup> 基礎科学特別研究員，<sup>\*2</sup> 研修生，<sup>\*3</sup> グループディレクター

### 1. Identification of master genes regulating vascular differentiation

We have found a lot of vascular-specific Arabidopsis genes encoding proteins with putative regulatory functions such as transcription factors and protein kinases. Functional analysis of these genes revealed that over-expression of VND6 and VND7 encoding NAC-domain proteins resulted in ectopic vessel formation in root cortex and hypocotyl epidermis. In addition, over-expression of VNDIP2 encoding a NAC-domain protein that interacts with the VND7 suppressed vessel formation. These results suggested that these NAC-domain proteins regulate vessel formation coordinately.

## 2. Functional analysis of novel vessel differentiation-specific genes

We carried out functional analysis of genes expressed specifically during vascular differentiation. As a result, we found that ZeTED6 and ZeTED7 genes and their Arabidopsis homologues, AtTED6 and AtTED7, encoding putative membrane-bound proteins, regulate vessel differentiation positively. Further analysis of a gene encoding a novel lipase with differentiating vessel-specific expression suggested that the gene might be associated with signal transduction during vessel formation. Based on the gene expression profiles during in vitro vessel formation obtained with the full genome Affymetrix GeneChips, we started comprehensive functional analysis of vessel formation-specific genes. We prepared transgenic Arabidopsis plants with over-expression of full length cDNAs of about 100 of the genes.

## 3. Analysis of trans-factors binding to vessel-specific cis-elements

To reveal gene regulatory systems during vascular differentiation, we isolated bZIP transcription factors and a GAGA-binding protein that bind to the cis-elements of vessel-specific genes. Also, we carried out isolating trans-factors that bind to the cis-element that is important for the vessel-specific expression of VND7 gene.

## 4. Analysis of vessel-differentiation-specific genes associated with secondary wall formation

To reveal molecular mechanisms underlying secondary wall formation during vessel cell differentiation, we analyzed the expression patterns and function of Arabidopsis genes encoding glycosyl hydrolases. Also, we analyzed the function of some of these genes with transgenic tobacco BY-2 cells over-expressing the genes in collaboration with the Laboratory for Structural Construction.

### Staff

#### Laboratory Head

Dr. Taku DEMURA

#### Research Scientist

Dr. Satoshi ENDO

Dr. Minoru KUBO

Dr. Nobuyuki NISHIKUBO

#### Research Associate

Dr. Naomi SASSA

#### Special Postdoctoral Researcher

Dr. Hideo KURIYAMA

Dr. Masatoshi YAMAGUCHI

#### Technical Staff

Mr. Mitsutaka ARAKI

Ms. Ayumi IHARA

Ms. Hiromi OGAWA

Mr. Gen TASHIRO

#### Assistant

Ms. Fumiko SUSAKI

#### Trainees

Ms. Hyun Jin PYO (Fac. Sci., Univ. Tokyo)

### 誌 上 発 表 Publications

#### [雑誌]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文

Endo M., Tsuchiya T., Saito H., Matsubara H., Hakoizaki H., Masuko H., Kamada M., Higashitani A., Takahashi H., Fukuda H., Demura T., and Watanabe M.: "Identification and molecular characterization of novel anther-specific genes in *Oryza sativa* L. by using cDNA microarray", *Genes Genet. Syst.* **79**, 213–226 (2004). \*

Matsuoka K., Demura T., Galis I., Horiguchi T., Sasaki M., Tashiro G., and Fukuda H.: "A comprehensive gene expression analysis toward the understanding of growth and differentiation of tobacco BY-2 cells", *Plant Cell Physiol.* **45**, 1280–1289 (2004). \*

Pyo H., Demura T., and Fukuda H.: "Spatial and temporal tracing of vessel differentiation in young *Arabidopsis* seedlings by the expression of an immature tracheary element-specific promoter", *Plant Cell Physiol.* **45**, 1529–1536 (2004). \*

Narita N. N., Moore S., Horiguchi G., Kubo M., Demura T., Fukuda H., Goodrich J., and Tsukaya H.: "Over-expression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis thaliana*", *Plant J.* **38**, 699–713 (2004). \*

Sawa S., Demura T., Horiguchi G., Kubo M., and Fukuda H.: "The *ATE* genes are responsible for repression of transdifferentiation into xylem cells in Arabidopsis", *Plant Physiol.* **137**, 141–148 (2005). \*

### 口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Endo S., Kubo M., Fukuda H., and Demura T.: "Key regulators of vessel formation revealed by transcriptome analysis in zinnia and *Arabidopsis*", URGV-RIKEN Genome Sciences Center Meet, (RIKEN GSC, URGV, and others), Evry, France, May (2004).

Yamaguchi M., Kubo M., Fukuda H., and Demura T.: "Isolation and characterization of the genes interacting with VND7 (Vascular-related NAC Domain Protein 7)", 15th Int. Conf. on Arabidopsis Research, Berlin, Germany, July (2004).

Kubo M., Yamaguchi M., Fukuda H., and Demura T.: "VND7, a NAC-domain protein regulates xylem vessel formation in Arabidopsis", 15th Int. Conf. on Arabidopsis Research, Berlin, Germany, July (2004).

Demura T., Kubo M., Endo S., and Fukuda H.: "Key regulators of vessel differentiation in zinnia and Arabidopsis", Int. Arabidopsis Vascular Development Conf. 2004,

- Canmore, Canada, Aug. (2004).
- Sawa S., Demura T., Horiguchi G., Kubo M., and Fukuda H.: “The *ATE* genes are responsible for the repression of the transdifferentiation into xylem cells in *Arabidopsis*”, Int. *Arabidopsis* Vascular Development Conf. 2004, Canmore, Canada, Aug. (2004).
- Endo S., Fukuda H., and Demura T.: “Transient transfection analysis in *in vitro* tracheary element differentiation for characterization of genes with unknown functions”, Int. *Arabidopsis* Vascular Development Conf. 2004, Canmore, Canada, Aug. (2004).
- Nishikubo N., Araki M., Fukuda H., and Demura T.: “Expression and function of glycosyl hydrolase families during the vascular development”, 10th Int. Cell Wall Meet., (Italian Phytopathological Society), Sorrento, Italy, Aug.-Sept. (2004).
- (国内会議)
- 宮崎さおり, 住川直美, 三島美佐子, 木谷雅和, 久保稔, 出村拓, 福田裕穂, 長谷部光泰: “アラビドプシスの花粉管ガイダンスに関わる受容体様キナーゼの網羅的検索”, 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 伊藤 (大橋) 恭子, 出村拓, 久保稔, 福田裕穂: “木部分化に関わるヒャクニチソウ HD-Zip III homeobox 遺伝子 ZeHB-12 標的遺伝子の検索”, 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 本瀬宏康, 杉山宗隆, 松林嘉克, 出村拓, 坂神洋次, 福田裕穂: “分泌性因子による維管束分化の制御機構”, 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 山口雅利, 梅田正明, 福田裕穂, 出村拓: “ヒャクニチソウサイクリン依存性キナーゼ A の単離と管状要素分化誘導過程におけるその発現及びリン酸化活性の挙動”, 第 22 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 秋田, 8 月 (2004).
- 南淳, 杉原伸一, 出村拓, 松岡健, 福田裕穂: “フェニルプロパノイド代謝に関わる新奇プロテアーゼ”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 小澤靖子, 小原圭介, 出村拓, 福田裕穂: “管状要素穿孔形成における細胞壁分解酵素の解析”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 出村拓, 久保稔, 山口雅利, 大谷奈緒美, 西窪伸之, 福田裕穂: “道管分化の遺伝子発現制御”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 大谷奈緒美, 福田裕穂, 出村拓: “道管特異的遺伝子発現に関わる転写因子の探索”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 山口雅利, 久保稔, 福田裕穂, 出村拓: “道管分化機構に関与する VND7 と相互作用する因子の探索およびそれらの機能解析”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 今村千琴, 岩本訓知, 中名生幾子, 出村拓, 福田裕穂: “ヒャクニチソウ管状要素分化過程におけるブラシノステロイド応答性遺伝子のマイクロアレイ解析”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 遠藤暁詩, 田代玄, 本瀬 (宇田川) 真樹子, 福田裕穂, 出村拓: “管状要素分化過程で発現する機能未知遺伝子群の解析”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 久保稔, 西窪伸之, 山口雅利, 福田裕穂, 出村拓: “シロイヌナズナの VND7 は道管形成を制御する”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 山口雅利, 久保稔, 福田裕穂, 出村拓: “道管分化のマスター制御因子 VND7 と相互作用する新規 NAC ドメインタンパク質の機能解析”, 第 46 回日本植物生理学会年会, 新潟, 3 月 (2005).
- 遠藤暁詩, 田代玄, 福田裕穂, 出村拓: “管状要素分化過程で発現する機能未知遺伝子 ZeTED6 および ZeTED7 の細胞および個体レベルにおける解析”, 第 46 回日本植物生理学会年会, 新潟, 3 月 (2005).
- 西窪伸之, 荒木光孝, 福田裕穂, 出村拓: “道管形成に関わる glycoside hydrolase family 遺伝子の発現および機能解析”, 第 46 回日本植物生理学会年会, 新潟, 3 月 (2005).