

シロイヌナズナにおける道管分化誘導系の発達

小田 祥久

国立遺伝学研究所新分野創造センター

〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111

Yoshihisa Oda

Experimental systems for xylem differentiation using Arabidopsis cells

Key words: Arabidopsis, cell culture, secondary cell wall, tracheary element, xylem vessel

Center for Frontier Research, National Institute of Genetics

Yata 1111, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan

1. はじめに

植物の体は多様な細胞が集積するようにして発達する。それぞれの細胞の形態や機能は細胞を取り囲む細胞壁に大きく依存しており、細胞壁の成分や沈着パターン、厚みは細胞の形態や機能に強く影響する。道管や木部繊維などの木部組織は、木部細胞が二次細胞壁を厚く沈着することにより個体を支え導管液の輸送に耐える物理的な強度を獲得しており、細胞壁による細胞の機能分化の分かりやすい例と言える。さらに、道管における二次細胞壁の沈着は細胞内で厳密に制御されており、原生木部道管では環状や螺旋状、後生木部道管では網目状や孔紋状に二次細胞壁を沈着することにより異なった性質の道管を作り出している。道管細胞は二次細胞壁を形成した後細胞内容を消化することにより中空の死細胞である管状要素となり、穿孔および壁孔を介して導管液を通すことができるようになる。残された二次細胞壁はリグニン化することにより物理的にも化学的にも強固なものとなり、長期間にわたって通同組織の支えとして機能する (図 1)。

このように道管は木部細胞の非可逆的な分化により形成されているが、このような細胞分化のプロセスを解析することは、道管分化が深部の限られた領域で起こることから技術的な困難を伴う。ヒヤクニチソウの単離葉肉細胞を用いた管状要素分化誘導系 (Fukuda & Komamine 1980) は高頻度かつ同調的に管状要素分化を誘導することが可能であり、その高い再現性

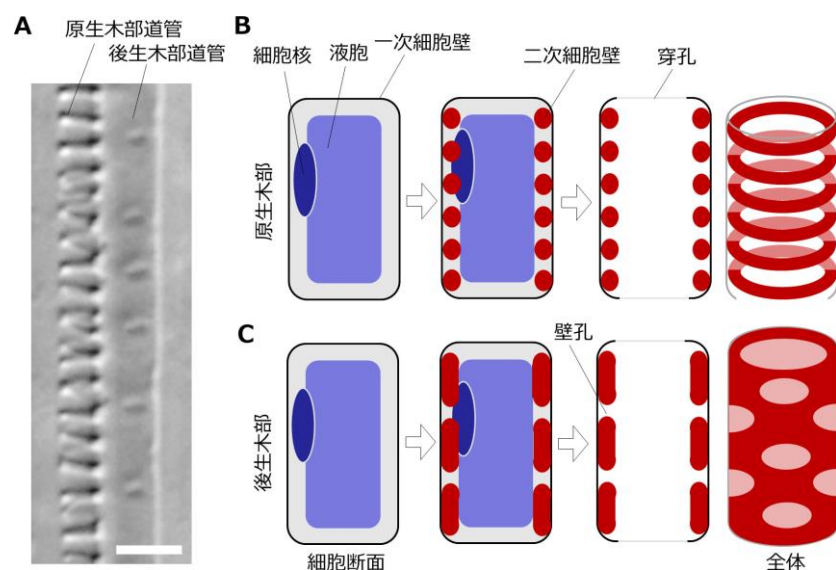


図 1. シロイヌナズナの道管 (A) シロイヌナズナの根の道管。(B, C) 原生木部 (B) と後生木部 (C) における管状要素分化の模式図。ここでは環状と孔紋状の二次細胞壁パターンを示す。Bar = 10 μ m.

から国内外で長く利用され、道管を含む維管束形成機構の解明に大きく貢献してきた。2000年代に入ると、シロイヌナズナを用いた研究が維管束形成の遺伝子レベル、分子レベルでの理解に貢献するようになってきた。その中で、シロイヌナズナを用いて道管分化を *in vitro* で誘導する試みもなされてきた。本稿では、シロイヌナズナを用いた道管分化誘導法とその成果について概説する。

2. 継代培養細胞を用いた分化誘導系

シロイヌナズナの継代培養細胞は Col-0 株, MM2d 株, T87 株等が知られているが, これらはオーキシン存在下で培養することにより半永久的に継代することが可能である。一般的に, 培養細胞は均一な細胞集団の調製が容易なこと, 自家蛍光が少なく顕微鏡での蛍光観察がし易いことから, 細胞生物学的, 生化学的アプローチに有用な材料である。また, 細胞株によっては, ヒヤクニチソウでは困難であったアグロバクテリウム法による遺伝子導入が容易であることも重要な利点である。これまでにシロイヌナズナの継代培養細胞を用いた管状要素分化誘導系が複数の研究グループから報告された。一例目は筆者が携わった研究のひとつであり, Col-0 培養細胞株を用いて開発した実験系である。この実験系では細胞を 2,4-D, brassinolide 存在下で培養することにより, 36-48 時間で 30%程度の細胞を管状要素に分化させることができた (Oda et al. 2005)。この細胞株には微小管マーカである GFP-TUB6 を恒常的に発現させており, 管状要素分化における表層微小管の挙動を生きた状態で観察することがはじめて可能となった。これまで管状要素分化における表層微小管の観察は電子顕微鏡あるいは間接蛍光抗体染色法による静止状態での観察に限られていたが, この実験系により表層微小管が徐々に束となってゆく様子, 微小管に沿って二次細胞壁の沈着が進む様子が明らかとなった (Oda et al. 2005, Oda & Hasezawa 2006)。同時期に Col-0 培養細胞をホウ酸と brassinolide の存在下で培養することにより, 7日間で 50%ほどの細胞を管状要素に分化させる手法が報告された (Kubo et al. 2005)。この実験系を用いたマイクロアレイ解析により, NAC ファミリーに属する VND 1 ~ VND7 が木部道管に特異的に発現する転写因子群として同定された。これらの転写因子のうち VND7 あるいは VND6 を異所的に発現させると, それぞれ原生木部道管様, 後生木部道管様の二次細胞壁肥厚を誘導し, 逆に SRDX を付加したドミナントネガティブ型の導入により道管の分化が遅延した。このことから VND7 および VND6 がそれぞれ原生木部道管, 後生木部道管の分化を誘導する転写因子であることが示された。後に, VND7 は後生木部を含む道管分化に広く関わっており, 道管分化を制御する主要な転写因子であることが報告された (Yamaguchi et al. 2011)。ホウ酸を用いた管状要素の分化誘導はカルスにも用いられた (Kwon et al. 2010)。この研究ではシロイヌナズナの野生型および *RabG3b* の変異体から新たにカルスを単離し, ホウ酸と brassinolide 存在下で培養することにより管状要素の分化を誘導している。野生型由来のカルスでは 15%程度の細胞が管状要素に分化したのに対し, 恒常活性型 *RabG3b* 導入株由来のカルスでは 40%以上, 不活性型 *RabG3b* 導入株および *RabG3b RNAi* 導入株由来のカルスでは 5%以下の細胞が管状要素に分化したことから, *RabG3b* が管状要素分化を促進していると考えられている (Kwon et al. 2010)。

2010 年には新規のシロイヌナズナ培養細胞株を用いた管状要素分化誘導系が報告された (Pesquet et al. 2010)。この研究ではシロイヌナズナの植物体から新規に培養細胞株を樹立し, NAA,

BAP (6-benzylaminopurine), epibrassinolide を培養液に添加することにより 96 時間で 30~40%の細胞を管状要素へ分化させている。植物の継代培養細胞株は多くの場合オーキシン存在下で細胞の増殖を維持するが、この培養細胞株はオーキシン非存在下で増殖する細胞をカルスから選抜して樹立したものであり、ホルモンフリーの培地で維持されている。この性質がこの細胞株の分化能と何らかの関係があるのかもしれない。Pesquet ら (2010) はこの実験系を用いて微小管付随タンパク質の発現を網羅的に調べ、MAP70-5 が管状要素分化時に特異的に発現することを突き止めた。この実験系では螺旋型、網目および孔紋型の二次細胞壁が混在して形成されるが、MAP70-5、あるいはその相互作用因子である MAP70-1 の発現を抑制すると孔紋型の二次細胞壁の割合が増加し、逆にこれらの遺伝子を過剰に発現させると、螺旋型の二次細胞壁の頻度が増加した。このことから、MAP70-5 が二次細胞壁の沈着パターンの制御因子の一つであることが示唆された (Pesquet et al. 2010)。最近になり、この実験系を用いた微小管付随タンパク質のプロテオミクス解析により、MAP65 や AIR9, CSII など多数の微小管付随タンパク質も二次細胞壁のパターンに関与していることが報告された (Derbyshire et al., 2015)。このプロテオミクス解析は細胞を多量に調製することが容易な培養細胞の特性を活かした研究例と言えよう。

2010 年には分化誘導に転写因子の活性を利用した新しいタイプの分化誘導系が報告された。Yamaguchi ら (2010) は VND7 に転写活性化因子およびグルココルチコイド受容体を融合した VND7-VPI6-GR をタバコ BY-2 細胞株に導入し、その培養液に dexamethasone を添加することにより、4~5 日で 80%を超える高頻度で原生木部様の管状要素を分化誘導することに成功した (Yamaguchi et al. 2010)。筆者は共同研究者らと共に、Col-0 培養細胞に VND6 を発現させることにより管状要素を分化させる実験系の開発に取り組んだ。その結果、VND6 をエストロゲンによる発現誘導系の制御下に置き、17 β -estradiol および brassinolide を培養細胞の培養液に添加することにより、およそ 36 時間で 80%ほどの細胞を後生木部道管様の管状要素に分化させることができるようになった (図 2, Oda et al. 2010)。また、アグロバクテリウム法による高頻度の遺伝子導入も可能になり、抗生物質による選抜をすることなく数日で GFP 等との融合タンパク質の局在を分化過程の細胞内で観察することができるようになった。筆者らはこの方法を用いて道管分化時に

顕著に発現するタンパク質の細胞内局在を網羅的に解析し、微小管付随タンパク質 MIDD1 が局所的に表層微小管の脱重合を促進することにより壁孔の形成を誘導していることを突き止めた。さらに、MIDD1 は局所的に活性化した ROP GTPase により細胞膜にアンカーされ、微小

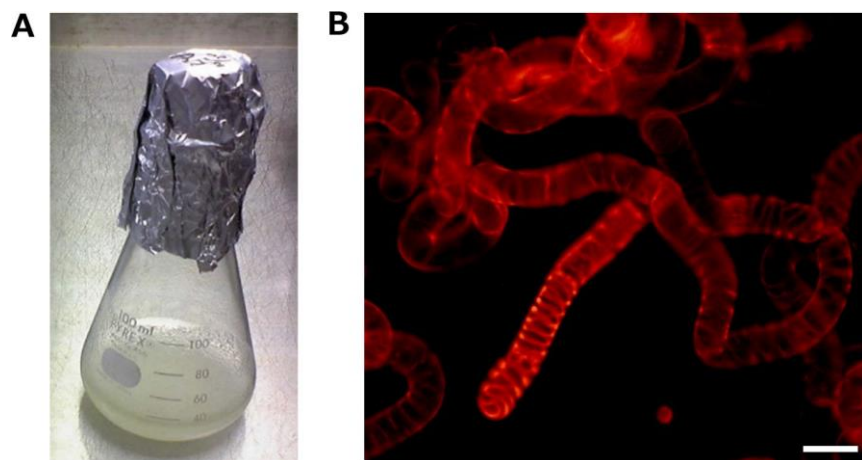


図 2. VND6 導入 Col-0 株を用いた管状要素分化誘導系 (A) VND6 を導入した Col-0 培養細胞株。(B) 分化誘導後の蛍光顕微鏡像。赤いシグナルは蛍光色素で染色した二次細胞壁。Bar = 20 μ m

管脱重合活性を持つ Kinesin-13A と相互作用することにより働いていることを明らかにした (Oda & Fukuda 2012, 2013)。また、機能未知の coiled-coil タンパク質である VETH1 および VETH2 が COG2 タンパク質と相互作用することにより、表層微小管に exocyst 複合体サブユニットである Exo70A1 をリクルートしていることを報告した (Oda et al. 2015)。exocyst 複合体は膜輸送経路の目的地の決定に関わっており、EXO70A1 の機能欠損変異体では二次細胞壁の沈着パターンに異常を生じたことから、VETH 経路は表層微小管に沿った細胞壁成分の輸送に関わっているのと考えられる。これらの研究に加え、この実験系は道管分化におけるプログラム細胞死に関する知見にも寄与した (Han et al. 2012, Ohashi-Ito et al. 2010)。

3. 植物体を用いた実験系

シロイヌナズナの個体や組織を用いた実験系として、胚軸を用いた実験系が報告された (Sawa et al. 2005)。この実験系では、暗所で育てたシロイヌナズナの芽生えから胚軸を切り出し、2,4-D, kinetin, brassinolide を含む培地中で6日ほど培養することにより、管状要素が胚軸内に異所的に形成される。

最近になり、葉の組織を用いた斬新な分化誘導法が報告された (Kondo et al. 2015)。この手法では、シロイヌナズナの本葉から直径 1 mm のディスク状に組織を切り出し、2,4-D, kinetin に加え、GSK3 キナーゼの阻害剤である bikinin を添加した培地中で培養することにより、3日程で葉肉細胞を管状要素へと分化させている。GSK3 キナーゼは、CLE ペプチドシグナル下流のブラシノステロイドシグナル経路で働く BES1 転写因子を介して道管分化を阻害している (Kondo et al. 2014)。bikinin はこのシグナル経路を阻害することにより木部道管への分化を促進していると考えられている (Kondo et al. 2014)。この実験系では培養開始後 24 時間ほどで前形成層マーカーの発現が見られ、48 時間後では木部細胞マーカーの発現が見られるようになる。従って、この実験系は前形成層細胞から道管へ至る全過程を再現していると考えられ、木部細胞分化の仕組みを明らかにする上で強力なツールになると期待される。

シロイヌナズナの個体に転写因子を一過的に発現させることにより異所的に体細胞の道管分化を誘導する手法も成果を上げている。Yamaguchi ら (2010) は *VND6-VPI6-GR* あるいは *VND7-VPI6-GR* を導入したシロイヌナズナの芽生えを 4 日間 dexamethasone で処理することにより、個体内で広い範囲の体細胞をそれぞれ後生木部道管様、原生木部道管様の管状要素に分化させている。特に *VND7* を用いた誘導系では個体全体の白化を引き起こすほど大部分の体細胞が道管に分化する (Yamaguchi et al., 2010)。この実験系を用い、二次細胞壁のリグニン化について新知見が報告された。この研究ではリグニンの合成に必要な酸化酵素である LAC4 および LAC17 が二次細胞壁合成部位に特異的に局在していることが示され、木部道管において二次細胞壁が特異的にリグニン化される仕組みの一端が明らかとなった (Schuetz et al. 2014)。また、この分化誘導系は高精細なライブイメージングにも用いられた。セルロース合成酵素複合体のマーカーを導入し、道管へと分化している表皮細胞を観察することにより、二次細胞壁形成におけるセルロース合成酵素複合体の詳細な挙動が明らかにされた (Watanabe et al. 2015)。この観察によると、二次細胞壁の合成領域では一次細胞壁を合成している領域に比べ、セルロース合成酵素複合体の密度が高く、また細胞膜上での移動速度も速い。細胞膜上でのセルロース合成酵素複合体の移動はセルロース

微繊維の合成に依存していると考えられており、この結果は二次細胞壁の形成を担うセルロース合成酵素複合体の高いセルロース合成能を示唆していると言える。このような二次細胞壁のセルロース合成酵素複合体の性質が管状要素分化における急速な二次細胞壁形成を可能にしていると考えられている (Watanabe et al. 2015)。

このように木部細胞分化を制御する転写因子が明らかとなってきたことから、転写因子の活性を人為的に制御し、特定のタイプの木部細胞を様々な細胞から分化させることが可能となってきた。さらに、道管を含む通同組織の細胞分化を制御する転写因子は VNS (VND/NST/SMB) ファミリーとして陸上植物に広く保存されており (Xu et al. 2014)、転写因子を利用した通同組織の分化誘導はシロイヌナズナのみならず幅広い植物で応用できると期待される。

4. 今後の展望

これまで述べてきたように、この 10 年の間にシロイヌナズナを用いた様々な道管分化誘導系が発達してきた。材料としては個体や組織、培養細胞といった選択肢があり、誘導法に関しても植物ホルモンや阻害剤に加え、転写因子の発現を誘導する方法がある。植物ホルモンと阻害剤を用いて誘導する手法は、既存のマーカーラインや変異系統をそのまま利用することができる強みがある。一方、転写因子を利用した方法では特定のタイプの木部道管を高頻度で分化させる特異性に秀でている。材料に培養細胞を用いた実験系は、ハンドリングの速さやイメージング、生理学的な実験との親和性が高い一方で、安定した培養を維持するには実験者の修練が必要な点、長期保存の難しさが欠点と言える。実験系の性質を考慮し、状況に適した実験系を導入することが効果的に成果を得る上で重要であろう。道管分化を研究するためのツールは明らかに充実しており、以前と比較して容易に道管分化の研究に取り組むことができる環境が整いつつある。今後、これらの実験系のユーザーが増えることにより、その再現性や効率がさらに改善され、道管分化の研究に一層貢献すると期待される。また、今後は木部道管以外の維管束組織の分化誘導系や、シロイヌナズナ以外の植物種での分化誘導系など、新しい実験系の開発も望まれる。このような取り組みにより、道管分化のみならず維管束全体の形成機構やその進化的な側面、さらには細胞分化という現象の根本的な理解にも繋がると期待される。

謝辞

本稿で述べた Col-0 培養細胞の管状要素分化誘導系は馳澤盛一郎教授 (東京大学) のご指導の下で開発したものです。また、VND6 導入 Col-0 株を用いた後生木部道管分化誘導系の開発とそれを用いた一連の研究は福田裕穂教授 (東京大学) のご指導、ご支援の下で行いました。VND6 の扱いに関して出村拓教授 (奈良先端科学技術大学院大学)、山口雅利准教授 (埼玉大学) にご助言、ご支援を頂きました。培養細胞の扱いや形質転換に関しては三村徹郎教授 (神戸大学)、梅田正明教授 (奈良先端科学技術大学院大学) にご助言を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

引用文献

Derbyshire, P., Menard, D., Green, P., Saalbach, G., Buschmann, H., Lloyd, C.W., & Pesquet, E. 2015. Proteomic Analysis of Microtubule Interacting Proteins over the Course of Xylem Tracheary Element

- Formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 27: 2709-2726.
- Fukuda, H. & 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.
- Han, J.J., Lin, W., Oda, Y., Cui, K.M., Fukuda, H., & He, X.Q. 2012. The proteasome is responsible for caspase-3-like activity during xylem development. *Plant J.* 72: 129-141.
- Kondo, Y., Fujita, T., Sugiyama, M., & Fukuda, H. 2015. A novel system for xylem cell differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 8: 612-621.
- Kondo, Y., Ito, T., Nakagami, H., Hirakawa, Y., Saito, M., Tamaki, T., Shirasu, K., & Fukuda, H. 2014. Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF-TDR signalling. *Nat. Commun.* 5: 3504.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H., & Demura, T. 2005. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* 19: 1855-1860.
- Kwon, S.I., Cho, H.J., Jung, J.H., Yoshimoto, K., Shirasu, K., & Park, O.K. 2010. The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in Arabidopsis. *Plant J.* 64: 151-164.
- Oda, Y. & Fukuda, H. 2012. Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. *Science* 337: 1333-1336.
- Oda, Y. & Fukuda, H. 2013. Rho of plant GTPase signaling regulates the behavior of Arabidopsis kinesin-13A to establish secondary cell wall patterns. *Plant Cell* 25: 4439-4450.
- Oda, Y. & Hasezawa, S. 2006. Cytoskeletal organization during xylem cell differentiation. *J. Plant Res.* 119: 167-177.
- Oda, Y., Iida, Y., Kondo, Y., & Fukuda, H. 2010. Wood cell-wall structure requires local 2D-microtubule disassembly by a novel plasma membrane-anchored protein. *Curr. Biol.* 20: 1197-1202.
- Oda, Y., Iida, Y., Nagashima, Y., Sugiyama, Y., & Fukuda, H. 2015. Novel coiled-coil proteins regulate exocyst association with cortical microtubules in xylem cells via the conserved oligomeric Golgi-complex 2 protein. *Plant Cell Physiol.* 56: 277-286.
- Oda, Y., Mimura, T., & Hasezawa, S. 2005. Regulation of secondary cell wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in Arabidopsis cell suspensions. *Plant Physiol.* 137: 1027-1036.
- Ohashi-Ito, K., Oda, Y., & 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.
- Pesquet, E., Korolev, A.V., Calder, G., & Lloyd, C.W. 2010. The microtubule-associated protein AtMAP70-5 regulates secondary wall patterning in Arabidopsis wood cells. *Curr. Biol.* 20: 744-749.
- Sawa, S., Demura, T., Horiguchi, G., Kubo, M., & Fukuda, H. 2005. The ATE genes are responsible for repression of transdifferentiation into xylem cells in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137: 141-148.

- Schuetz, M., Benske, A., Smith, R.A., Watanabe, Y., Tobimatsu, Y., Ralph, J., Demura, T., Ellis, B., & Samuels, A.L. 2014. Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. *Plant Physiol.* 166: 798-807.
- Watanabe, Y., Meents, M.J., McDonnell, L.M., Barkwill, S., Sampathkumar, A., Cartwright, H.N., Demura, T., Ehrhardt, D.W., Samuels, A.L., & Mansfield, S.D. 2015. Visualization of cellulose synthases in Arabidopsis secondary cell walls. *Science* 350: 198-203.
- Xu, B., Ohtani, M., Yamaguchi, M., Toyooka, K., Wakazaki, M., Sato, M., Kubo, M., Nakano, Y., Sano, R., Hiwatashi, Y., *et al.* 2014. Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land. *Science* 343: 1505-1508.
- Yamaguchi, M., Goue, N., Igarashi, H., Ohtani, M., Nakano, Y., Mortimer, J.C., Nishikubo, N., Kubo, M., Katayama, Y., Kakegawa, K., *et al.* 2010. 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., Mitsuda, N., Ohtani, M., Ohme-Takagi, M., Kato, K., & Demura, T. (2011). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation. *Plant J.* 66: 579-590.