

シロイヌナズナを用いた維管束細胞形成機構の解析
Study on the vascular development in Arabidopsis
(植物学会推薦)

代表研究者 東京大学 澤 進一郎
University of Tokyo, Shinichirosawa shinichiro

[英文サマリー]

In most of dicotyledonous plants, vascular tissues in the leaf present a reticulate venation pattern. We have isolated and characterized an *Arabidopsis* mutant defective in vascular network defective mutants, *van3*. *van3* mutants showed discontinuous vascular pattern, and the *VAN3* encodes an ARF GAP protein regulating the membrane trafficking in the trans Golgi network. To elucidate the molecular natures controlling vein patterning process through membrane trafficking, we searched *VAN3*-interacting proteins. by using a yeast two hybrid system. As a result, we isolated the plant dynamin, *DRP1A* as a *VAN3* interacting protein. Spatial and temporal expression pattern by *DRP1A::GUS* and *VAN3::GUS* were similar to each other. Subcellular localization of *VAN3* is completely overlapped to that of the *DRP1A*. *drp1a* showed disconnected vascular network, and *drp1a* mutation

enhanced the phenotype of vascular discontinuity of the *van3* mutant in the *drp1a van3* double mutant. Furthermore, the *drp1* mutation enhanced discontinuous vascular pattern of the *gnom* mutant, which is the same effect as that of *van3* mutation. These results indicated that *DRP1* modulates the *VAN3* function in vesicle budding from TGN, regulating vascular formation in *Arabidopsis*.

[本文]

研究目的

植物の"体"は動物の"体"に比べて比較的単純だが、植物種によってはユニークな器官を形成したり、様々な他生物と様々な形でコミュニケーションも行っている。「種の多様性」は生物学者にとって大きな魅力のある研究テーマの一つだと考えられるが、その起源を進化的にとらえることも可能になるだろうし、形態学的、生理科学的に自然のファインアートのタッチを探ることもできる。この大きなテーマに対する第一歩として、私は形態形成機構の基本原理を解明することを第一の目標にしている。

植物における形態形成機構の基本原理を解明する上で、空間認識機構の解析は大きな命題となる。植物は、器官を切除して培養することや、分化全能性をひきだすことが容易であることから、いかにも各器官、組織、細胞が自律分散的に生きているように見える。しかし、中枢神経系を持つ動物のような中央管理型の生命形態ではないにもかかわらず、各器官（細胞）の間では確実に情報のやりとりを行っていて、個体としての統一性を保っている。それでは、どのようにして各器官（細胞）の間で情報のやりとりを行っているのか。また、各細胞は、細胞自身の位置情報や、環境、発生プログラムをどのように認識して自分自身を分化させ"個体"を形作っているのか。現在までに動物の空間認識には拡散性の物質がモルフォゲンとして重要な機能を持つことがよく知られてい

る。しかし、植物ではモルフォゲンとは同定されておらず、唯一の候補としてオーキシシンがあがっているのみである。本研究では、モルフォゲンを念頭に置き、しかし、それだけにとらわれず植物の空間認識機構にはどのような分子機構が存在するのかという大きな命題に近づくことを目的としている。

研究経過

空間認識機構の解析には最も分子遺伝学的解析の基盤が整っているシロイヌナズナの葉脈パターン形成機構を材料系とした。葉脈パターンは種ごとに特徴的なパターンを示すことから、葉脈パターン形成は、各植物種に応じて遺伝的に高度に制御されており、2次元空間認識機構の解明のための材料としては極めて適切であると考えられる。まず、葉脈パターン形成に異常を示す突然変異体として、van1-van7 を単離した。そのうち、ポジショナルクローニングによって、van1, 3, 4, 7 の原因遺伝子を特定した。VAN1 遺伝子は、一回膜貫通型の機能未知の蛋白質を、VAN3 遺伝子は ARF-GAP 蛋白質を、VAN4 遺伝子はエンドソームに局在するような機能未知の蛋白質を、最後に、VAN7 は ARF-GEF をコードしている GNOM とアレリックであることを確認した。このように、van 突然変異体で現在単離できた全ての遺伝子産物が、細胞内膜系における輸送機構に関与することが示唆された。VAN3 蛋白質のさらなる解析により、VAN3 蛋白質はたしかに、ARF-GAP 活性を持つこと、BAR ドメインを介してホモダイマーを形成しうること、PH ドメインを介して脂質と結合することが明らかとなった。また、GFP 等の蛍光蛋白質を融合させることにより、VAN3 蛋白質は TGN に局在することが示唆された。さらに、VAN3 を用いた yeast two hybrid screening の結果、ダイナミン (DRP1A) が単離された。DRP1A 単独の突然変異体では際だった表現型を示さないが、van3 との二重突然変異体では葉脈がほとんど形成されなくなるなどの遺伝学的相互作用が認められた。さらに、VAN3 と DRP1A の空間的発現パターンをプロモーターGUS 形質転換体を作成することにより確認すると、お互い区別できないほどその発現パターンが酷似していた。また、細胞内局在を GFP 及び YFP 蛍光蛋白質を融合させ、同一の細胞において強制的に発現させると同じ細胞内オルガネラ上に存在することが明らかとなり、組織レベルでも細胞レベルでも共局在することを示した。

考察

これらの解析から、VAN 遺伝子は全て細胞内膜系の輸送に関与する蛋白質であることが示唆された。また、とくに VAN3 に関してはダイナミンである DRP1A と協調的に機能し、葉脈パターン形成に寄与することが示唆された。今後は VAN3 を含めた VAN 蛋白質群がどのような蛋白質の輸送を担っているのか、そのカーゴ蛋白質を特定することで、葉脈パターン形成に必要な空間認識機構に関わる重要な因子を特定することができると考えている。

研究発表

口頭発表

1. Shinichiro Sawa, Koji Koizumi, Satoshi Naramoto, Natsuko Yahara, Takashi Ueda, Akihiko Nakano, Munetaka Sugiyama, and Hiroo Fukuda “VAN3 ARF-GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation”; international symposium plant axin formation and signal transduction. (Tokyo, 2005)
2. 小林祐樹、岩本訓知、本瀬宏泰、澤進一郎、福田裕穂”シロイヌナズナにおける管状要素分化因子 xylogen の解析”日本植物生理学会（筑波、2006）
3. 海老根一生、堂前直、澤進一郎、福田裕穂、中野明彦、上田貴志”シロイヌナズナにおける RAB5 と AtVAM3 の分子遺伝学的解析” 日本植物生理学会（筑波、2006）
4. 澤進一郎”葉脈パターン形成に関与するシロイヌナズナ VAN3 遺伝子の単離・解析日本植物学会（富山、2005）
5. 上嶋右子、名川信吾、榎本悟史、澤進一郎、福田裕穂”シロイヌナズナ van1 突然変異体を用いた葉脈形成の解析”日本植物学会（富山、2005）
6. 榎本悟史、高塚大和、澤進一郎、小泉好司、上田貴志、中野明彦、福田裕穂”葉脈形成に関与するシロイヌナズナ VAN3 遺伝子の細胞生物学的研究”（富山、2005）
7. 坂口潤、澤進一郎、伊藤純一、福田裕穂”葉脈パターンに異常を持つイネ突然変異体を用いた維管束形成機構の研究”（富山、2005）
8. 岩本訓知、小林祐樹、澤進一郎、本瀬宏泰、福田裕穂”管状要素分化に関与する xylogen のドメイン機能解析”（富山、2005）
9. 榎本悟史、澤進一郎、小泉好司、久保稔、出村拓、上田貴志、中野明彦、福田裕穂”葉脈形成に関与するシロイヌナズナ VAN3 遺伝子及びそのホモログの分子遺伝学的解析” 日本植物

生理学会 (新潟、2005)

10. 坂口潤、澤進一郎、伊藤純一、福田裕穂”葉脈パターンに異常を持つイネ突然変異体を用いた維管束形成機構の研究” (新潟、2005)
11. 名川信吾、澤進一郎、佐藤修生、加藤友彦、田畑哲、福田裕穂”維管束形成初期過程で働く遺伝子の同定及び機能解析 (新潟、2005)
12. 田中亮一、澤進一郎、小保方潤一、田中歩”色素合成およびプラスチドの形態に異常のあるシロイヌナズナ chlorina5 変異体の解析 (新潟、2005)

誌上発表

1. 東山哲也、澤進一郎 植物の発生と形態形成、バイオサイエンス (2006) バイオサイエンス研究会編 (オーム社) in Press
2. 澤進一郎ら共著 植物ゲノム科学事典 (2006) (朝倉書店) in Press
3. Claire Woodward, Shannon M Bemis, Emi J Hill, Shinichiro Sawa, Tomokazu Koshiba, and Keiko U Torii (2005). Interaction of auxin and ERECTA in elaborating Arabidopsis inflorescence architecture revealed by the activation-tagging of a new member of the YUCCA-family putative flavin monooxygenases. Plant Physiol. 139. 192-203
4. Shinichiro Sawa, Koji Koizumi, Satoshi Naramoto, Taku Demura, Takashi Ueda, Akihiko Nakano and Hiroo Fukuda (2005). DRP1A is responsible for vascular continuity synergistically working with VAN3 in Arabidopsis. Plant Physiol. 138; 819-826
5. 澤進一郎ら共訳 Principles of Development (2005) (Wilt and Hake, Norton publisher) (東京化学同人)
6. Koji Koizumi*, Satoshi Naramoto*, Shinichiro Sawa,* Natsuko Yahara, Takashi Ueda, Akihiko Nakano, Munetaka Sugiyama, and Hiroo Fukuda (2005). VAN3 ARF-GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation. Development **132**: 1699-1711.;
* Co-first author.
7. Shinichiro Sawa, Taku Demura, Gorou Horiguchi, Minoru Kubo, and Hiroo Fukuda (2005). The ATE genes are responsible for the repression of the transdifferentiation into xylem cells in Arabidopsis. Plant Physiol. 137; 141-148
8. Makoto Hashimoto, Larisa Kisseleva, Shinichiro Sawa, Toshiko Furukawa, Setsuko Komatsu, Tomokazu Koshiba (2004) A novel rice PR10 protein, RS0sPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. Plant Cell Physiol.; 45, 550-559