

様 式 Z-7

平成26年度科学研究費助成事業 実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号

1

4

6

0

3

2. 研究機関名

奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名

基盤研究(B)

4. 研究期間

平成25年度～平成27年度

5. 課題番号

2

5

2

9

1

0

6

2

6. 研究課題名

木部細胞分化を決定づける分子実態の解明

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
40272009	デムラ タク 出村 拓	バイオサイエンス研究科	教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

1. VND7遺伝子の発現におけるエピジェネティック制御：VND7遺伝子発現のエピジェネティック制御について、DNAメチル化とヒストンH3K27メチル化について詳細に解析した。その結果、VND7の遺伝子発現にVND7第2エキソンのDNAメチル化とVND7のプロモーター領域のヒストンH3K27メチル化が抑制的に働いていることを確認した。さらに、細胞特異的なエピジェネティック制御を明らかにするために、維管束特異的なマーカーを用いたセルソーティングを試み、ソーティングの条件を確定するに至った。

2. VND7遺伝子のシス因子とトランス因子：GATA5やそのホモログの機能を明らかにするために変異体等の表現型解析を行った。また、蛍光相関分光法FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)を用いたDNA-転写因子の結合解析システムを用いて、VND7に加えて繊維細胞マスター因子SND1の機能解析を進めた。

3. VND7の機能制御メカニズム：VND7-VP16-GRを過剰発現させたシロイヌナズナをDEX処理することによって、植物体全体で人為的に異所的な道管分化を誘導することができる。この植物体での異所的な道管分化が抑制された復帰突然変異体の責任遺伝子として同定されたS-nitrosogluthathione reductase遺伝子とplant U-box遺伝子を同定し、機能解析を進めた。

4. 維管束木部分化におけるsmall RNAの動態：昨年度までに確立した植物ホルモン投与によってシロイヌナズナ子葉を用いた木部細胞の分化誘導系におけるsmall RNAの動態を次世代高速DNAシーケンサーを用いて解析した。その結果、道管分化過程で道管分化を正に制御する転写因子遺伝子の一部の発現を制御する可能性をもつmicro RNAを見出すことができた。

10. キーワード

(1) 細胞分化

(2) 道管

(3) 転写制御

(4) エピジェネティクス

(5) 小分子RNA

(6)

(7)

(8)

11. 現在までの達成度

(区分) (2) おおむね順調に進展している。 (理由) VND7遺伝子の発現におけるエピジェネティック制御の解析について、ヒストンH3K4メチル化とヒストンH3K9アセチル化の影響に関する解析がやや遅れている。一方で、セルソーティングのセットアップが済むなどの進展があり、この項目についてはおおむね順調に進んだと考えている。VND7の機能制御メカニズムの解析については、責任遺伝子としてS-nitrosoglutathione reductaseとplant U-boxが同定できたため、それらの機能解析を含めて予想以上の進展があった。さらに、維管束木部分化におけるsmall RNAの動態の解析についても、small RNAのRNAシーケンスを終了し、トランスクリプトーム解析の結果と合わせて、micro RNAによって、道管分化制御に関わる転写因子の発現が制御されている可能性を見出すなど進展があった。以上のことから、本研究はおおむね順調に進展していると判断している。
--

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策) 1. VND7遺伝子の発現におけるエピジェネティック制御：VND7遺伝子発現のエピジェネティック制御について、DNAメチル化、ヒストンH3K27メチル化、ヒストンH3K4メチル化、ヒストンH3K9アセチル化の解析を継続する。また、関連の阻害剤（5-aza-dC、HDAC阻害剤：TSA・パルプロ酸など）と関連遺伝子（HDAC、HAT、LSD、MET1等）の突然変異体を用いた、表現型（異所的道管形成頻度）解析とVND7遺伝子・下流遺伝子の発現解析を継続する。昨年度までに条件検討を終えた、維管束特異的マーカーを用いたセルソーティングを用いて、細胞特異的なエピジェネティック制御を明らかにする。 2. VND7遺伝子のシス因子とトランス因子：GATA5やそのホモログの機能解析を継続する。また、蛍光相関分光法FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)を用いたDNA-転写因子の結合解析システムを用いて、VND7のターゲット遺伝子と繊維細胞マスター因子のSN-D1のターゲット遺伝子のシス因子の比較を継続し、その成果を論文発表する。 3. VND7の機能制御メカニズム：VND7-VP16-GRを過剰発現させたシロイヌナズナをDEX処理することによって、植物体全体で人為的に異所的な道管分化を誘導することができる。この植物体での異所的な道管分化が抑制された復帰突然変異体の責任遺伝子として同定されたS-nitrosoglutathione reductase遺伝子の機能解析を行うとともに、VND7タンパク質がS-ニトロシル化を受けているかについての検証を進める。 4. 維管束木部分化におけるsmall RNAの動態：シロイヌナズナ子葉における植物ホルモン投与による木部細胞分化誘導過程で取得したsmall RNAの動態をもとに、特定のsmall RNAの木部細胞分化における役割を検討する。
(次年度使用額が生じた理由と使用計画) (理由) 研究の進捗状況に合わせて、一部の消耗品の購入を翌年度に持ち越すことにしたため。 (使用計画) 翌年度に消耗品費として使用する。

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計(2)件 うち査読付論文 計(2)件

著 者 名		論 文 標 題 【掲載確定】			
Ohtani M, Takebayashi A, Hiroyama R, Xu B, Kudo T, Sakakibara H, Sugiyama M, Demura T		Cell dedifferentiation and organogenesis in vitro require more snRNA than does seedling development in Arabidopsis thaliana			
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
J Plant Res		有	128	2 0 1 5	371-380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)					
10.1007/s10265-015-0704-0					

著 者 名		論 文 標 題 【掲載確定】			
Endo H, Yamaguchi M, Tamura T, Nakano Y, Nishikubo N, Yoneda A, Kato K, Kubo M, Kajita S, Katayama Y, Ohtani M, Demura T		Multiple Classes of Transcription Factors Regulate the Expression of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, a Master Switch of Xylem Vessel Differentiation			
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Plant Cell Physiology		有	56	2 0 1 5	242-254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)					
10.1093/pcp/pcu134					

〔学会発表〕 計(11)件 うち招待講演 計(2)件

発 表 者 名		発 表 標 題	
Yoshimi Nakano, 他		Promoting the Secondary Cell Wall Formation in Secondary Xylem in Poplar to Enhance Carbon Sink Potential	
学 会 等 名		発表年月日	発 表 場 所
5th International Conference Plant Cell Wall Biology		2014年07月27日～2014年07月31日	Palm Cove (オーストラリア)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Masahiro Noguchi, 他	Comprehensiveproteomic Analysis for Understanding Xylem Vessel Element Differentiation	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
5th International Conference Plant Cell Wall Biology	2014年07月27日～2014年07月31日	Palm Cove (オーストラリア)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Taku Demura, 他	NAC transcription factors regulating cell wall formation and programmed cell death in moss <i>Physcomitrella patens</i>	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
5th International Conference Plant Cell Wall Biology (招待講演)	2014年07月27日～2014年07月31日	Palm Cove (オーストラリア)

発 表 者 名	発 表 標 題	
平井理作, 他	道管細胞分化の新規制御因子の遺伝学的探索	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第486回日本農芸化学会関西支部大会	2014年09月20日	奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県生駒市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
大谷美沙都, 他	陸上植物進化におけるNAC転写因子ファミリーVNSの役割	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第78回日本植物学会シンポジウム (招待講演)	2014年09月12日～2014年09月14日	明治大学 (神奈川県川崎市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
川邊陽文、他	道管細胞分化におけるタンパク質S-ニトロシル化修飾の役割の解明	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第78回日本植物学会	2014年09月12日～2014年09月14日	明治大学(神奈川県川崎市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
平井理作、他	道管細胞分化の新規制御因子の遺伝学的探索	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第78回日本植物学会	2014年09月12日～2014年09月14日	明治大学(神奈川県川崎市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Tian Tian Tan、他	RNA-seq analysis of initial stage of xylem vessel differentiation	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
道管細胞分化の新規制御因子の遺伝学的探索	2014年09月12日～2014年09月14日	明治大学(神奈川県川崎市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
遠藤仁、他	道管細胞分化マスター制御因子VND7はタイトにその発現が制御される	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第37回日本分子生物学会年会	2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
田村泰造、他	道管細胞と繊維細胞を作り分けるシス配列一転写因子結合制御の分子基盤の解明	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第37回日本分子生物学会年会	2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
中野仁美、他	Promoting secondary cell wall formation in poplar xylem to enhance CO2 assimilation	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第56回日本植物生理学会年会	2015年03月16日～2015年03月18日	東京農業大学(東京都世田谷区)

(図書) 計(1)件

著 者 名	出 版 社		
大谷美沙都、出村拓	技術情報協会出版		
書 名	発行年	総ページ数	
セルロースナノファイバーの調製、分散・複合化と製品応用「セルロース系バイオマスの生産に向けたGM早生樹木の研究開発」	2015	7	

14.研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計 (0) 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15.備考