

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07508

研究課題名(和文) 樹木の心材形成を制御する自己分解酵素の挙動に関する細胞生物学的研究

研究課題名(英文) Cell biological studies on behavior of autolytic enzymes that control heartwood formation in trees

研究代表者

半 智史 (Satoshi, Nakaba)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40627709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ショットガンプロテオーム解析により、ドロノキ辺材中の放射柔細胞に含まれるタンパク質の放射方向における変動を明らかにし、辺材の内層において増加する放射柔細胞の細胞死過程における自己分解に関わると予想される複数のプロテアーゼを選抜した。さらに、これらのプロテアーゼについて、辺材中の放射柔細胞における放射方向での遺伝子発現量の変動パターンをリアルタイムPCR解析により明らかにした。また、短命の木部細胞である管状要素の細胞死において重要な役割を果たすタンパク質分解酵素であるxylem cysteine peptidase(XCP)に関するポプラ形質転換体を作成し、XCPの局在解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we showed radial variation of the content of proteins in ray parenchyma cells in sapwood of *Populus suaveolens* by shotgun proteomic analysis. In addition, we found that contents of several proteases increase towards inner part of sapwood. This result suggests that these proteases might be involved in autolysis in the process of cell death in ray parenchyma cells. Then, we showed radial variation of gene expressions of these proteases in ray parenchyma cells by real-time PCR analysis. Moreover, we made transgenic plants of *P. tremula* x *P. tremuloides* to understand expression and localization of xylem cysteine peptidase (XCP), which is a kind of important autolytic enzyme in programmed cell death of short-lived tracheary element. Then, we showed localization of the expression of genes of XCP in ray parenchyma cells in these transgenic plants.

研究分野：木質科学

キーワード：心材形成 放射柔細胞 細胞死 自己分解酵素 ショットガンプロテオーム解析 遺伝子発現解析 形質転換体 ポプラ

1. 研究開始当初の背景

二次木部細胞は、形成層に由来する細胞であり、再生可能な資源である木質バイオマスを構成している。二次木部細胞の分化および細胞死の過程は、二次木部細胞の性質を決定づけており、木質バイオマスの利用上重要な特性の発現を制御する。長命細胞である放射柔細胞の細胞死は、超多年生植物の樹木に特有な心材形成に深く関与する。心材とは樹幹内方に含まれ、辺縁部に位置する辺材より一般的に濃く着色し、耐久性の高い部位である。これら心材のもつ性質は、木質バイオマスの利用上重要な特性であり、心材形成機構を理解する上では、放射柔細胞の細胞死発現機構を解明する必要がある。

しかしながら、放射柔細胞の細胞死発現が、どのような機構によって制御されているのか未だ詳細な理解に至っていない。したがって本研究では、放射柔細胞の細胞死発現機構を解明することを最終目標とした。

木部細胞の細胞死研究では、これまで草本植物であるヒヤクニチソウ培養系やシロイヌナズナにおいて通水要素として働く短命細胞である管状要素をモデルとして多くの知見が蓄積されてきた。しかしながら、放射柔細胞は、短命細胞である管状要素とは生存期間も機能も異なるため、放射柔細胞の細胞死発現機構が、既存の細胞死モデルのみで説明できるとはいえない。

これまで申請者は、自己分解酵素遺伝子に着目し、既知遺伝子を中心に放射柔細胞の細胞死のマーカーとなるものを探索してきた。管状要素の細胞死で重要な自己分解酵素 *xylem cysteine peptidase (XCP)* 遺伝子は、ポプラ放射柔細胞が生存している間継続して発現すること、細胞死を迎える辺材の最内年輪において *XCP* 遺伝子の発現量が低下することが明らかになった (Nakaba et al. 2015)。つまり、放射柔細胞の死は管状要素の死とは異なり、細胞死直前における *XCP* 遺伝子の発現量の劇的な増加では説明できない。さらにこの結果は、自己分解酵素の長期間に渡る蓄積あるいは細胞間輸送など管状要素の細胞死とは異なるプロセスの存在を示唆しており、遺伝子の発現解析のみでは細胞死に関わる自己分解酵素を選抜することが困難であることを示している。

したがって、放射柔細胞の細胞死を理解する上では、(1) 探索範囲を広げた上でのタンパク質を対象とした網羅的解析に加え、(2) 自己分解酵素の蓄積や輸送に関する解析が必要と考えた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、樹木特有の長命細胞である放射柔細胞の細胞死発現機構を解明し、心材形成機構の理解において重要な情報を与えることである。本研究期間では、(1) 放射柔細胞の死を特徴付ける自己分解酵素の網羅的手法による探索、(2) ライブイメ

ージング解析および免疫染色法による自己分解酵素の局在・動態の解明に焦点を絞り、以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) 放射柔細胞の細胞死過程における発現タンパク質の網羅的解析

本課題では、放射柔細胞を対象として発現タンパク質の網羅的解析を行い、細胞死過程にある放射柔細胞内での発現タンパク質の変化を網羅的に明らかにすることを目的とした。得られた結果から、放射柔細胞の細胞死過程において特異的に発現する自己分解酵素をスクリーニングすることができる。加えて、これまで知られている植物細胞におけるプログラム細胞死に関する情報との比較解析を行うことで、放射柔細胞の細胞死発現機構とその他の植物細胞におけるプログラム細胞死の発現機構との違いも明らかにできる。さらに、発現タンパク質の網羅的解析に用いた試料の形態観察を行うことにより、放射柔細胞の形態の変化と細胞死に深く関与する自己分解酵素の発現との関係性について知見を得ることができる。

(2) 放射柔細胞の自己分解酵素の蓄積および輸送に関する解析

本課題では、免疫染色および形質転換体作出技術を駆使した解析を行い、放射柔細胞における自己分解酵素の蓄積および細胞間輸送について明らかにすることを目的とした。蛍光タンパク質でラベルした自己分解酵素を発現する形質転換体を作成し、蛍光シグナルの細胞内局在および細胞間の移動についてライブイメージング解析を行うことで、自己分解酵素の蓄積および輸送に関する動的挙動を明らかにできる。さらに、心材を含む成木中の放射柔細胞を用いた自己分解酵素の免疫染色により、インタクトな組織内での自己分解酵素の挙動を理解する上で重要な局在情報に加え、辺材中のいつどこから自己分解酵素が生合成されるのかといった時間的・空間的情報を得ることができる。

3. 研究の方法

(1) 放射柔細胞の細胞死過程における発現タンパク質の網羅的解析

①放射柔細胞の死を特徴付ける自己分解酵素の網羅的手法による探索

2013年10月に森林総合研究所林木育種センター(茨城県日立市)に生育するドロノキ (*Populus suaveolens*) 2個体より採取した円板を用いた。タンパク質抽出用試料は直ちに液体窒素により凍結させ、顕微鏡観察用試料はグルタルアルデヒドにより化学固定を行った。当年形成木部を除いた辺材を三分割して外層、中央部、内層とし、それぞれからタンパク質を抽出し、nano-LC-MS/MSにより分析を行った。タンパク質の同定には MASCOT search engine (Matrix Science) を、半定量解

析には Progenesis Q1 (Nonlinear Dynamics) を用いた。タンパク質の機能分類は、Bevan et al. (1998) に従った。放射方向において変動しているタンパク質は、辺材中の各部位間で比較を行った際に、ANOVA ($p < 0.05$) かつ fold change (> 2.0) を示すものとした。また、固定試料から 40 μm 厚の柎目面切片を切り出し、酢酸カーミン溶液により核を染色し、核の有無を指標に放射柔細胞の生死を判別した。

②放射柔細胞の自己分解に関わると予想されるプロテアーゼの遺伝子発現解析

2013 年 10 月に森林総合研究所林木育種センター (茨城県日立市) に生育するドロノキ (*P. suaveolens*) 2 個体より採取した円板を用いた。total RNA 抽出用試料は液体窒素により凍結させ、顕微鏡観察用試料はグルタルアルデヒド溶液により化学固定を行った。辺材試料を放射方向に三分割して辺材外層、辺材中央部、辺材内層とし、さらにそれぞれを三分割して合計 9 個の試料を得た。形成層側から辺心材境界にむけて試料番号を 1 から 9 とした。各試料より total RNA を抽出し、逆転写反応により 1 本鎖 cDNA を合成し、リアルタイム PCR 解析を行った。また、化学固定試料からは 40 μm 厚の柎目面切片を切り出し、酢酸カーミン溶液により核を染色し、核の有無を指標に放射柔細胞の生死を判別した。

(2) 放射柔細胞の自己分解酵素の蓄積および輸送に関する解析

短命の木部細胞である管状要素の自己分解過程において重要な役割を果たす自己分解酵素である Xylem Cysteine Peptidase (XCP) と相同性をもつポプラの XCP2B をターゲットとした。

XCP2B のプロモーターに緑色蛍光タンパク質 (GFP) および β -グルクロニダーゼ (GUS) を連結した遺伝子 (XCP2BPro::GFP-GUS) あるいは XCP2B のプロモーターに XCP2B および光変換型蛍光タンパク質の Dendra2 を連結した遺伝子 (XCP2BPro::XCP2B-Dendra2) をアグロバクテリウム法により導入した交雑ポプラ (*P. tremula* x *P. tremuloides*) を個体再生したものを用いた。形質転換体は、1 ヶ月程度 *in vitro* において育成させたポプラの葉、茎、根を用いて解析を行った。

また、心材を含む成木中の放射柔細胞を用いた自己分解酵素の免疫染色を行うことを目的として、プロテオーム解析を通じて明らかになった自己分解に関与すると予想されるプロテアーゼのアミノ酸配列情報をもとにペプチド抗体を作製した。抗体の特異性を確認するために、葉および辺材より抽出したタンパク質を用いて、ウェスタンブロッティングを実施した。

4. 研究成果

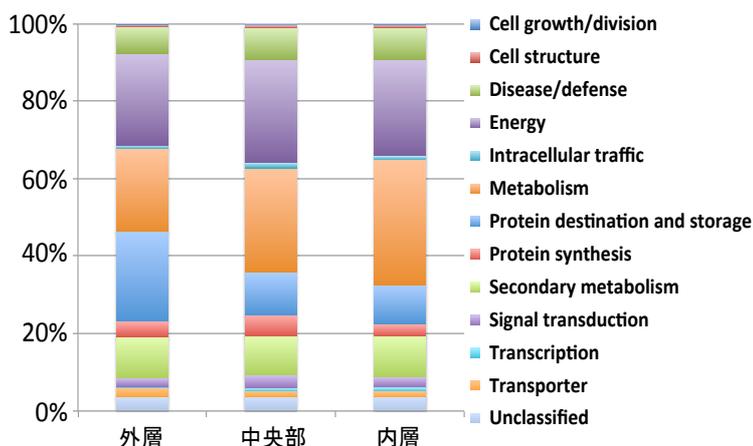
(1) 放射柔細胞の細胞死過程における発現タンパク質の網羅的解析

①放射柔細胞の死を特徴付ける自己分解酵素の網羅的手法による探索

辺材外層ではすべての放射柔細胞が生存していたが、辺材中央部ではわずかに細胞死が認められた。また、辺材内層はすべての細胞が死滅している心材を一部含んでいた。

辺材より抽出されたタンパク質についてショットガンプロテオーム解析を行った結果、783 種のタンパク質が同定された。これらについて機能分類を行い、タンパク質の存在量に基づいて辺材中の各部位における機能ごとのタンパク質の割合を算出した (図)。辺材外層から内層にかけて、Metabolism に分類されるタンパク質は増加し、Protein destination and storage に分類されるタンパク質は減少することが明らかになった。これらの結果から、辺材中において各機能のタンパク質の全体に占める割合が変化しているといえる。したがって、放射柔細胞は、放射方向における位置により果たす役割が異なると考えられる。

さらに、ドロノキ辺材のショットガンプロテオーム解析によって得られたデータを通じて、辺材内層にて統計的に有意に増加するシステインプロテアーゼ 2 種 (PsuCP1、PsuCP2) およびセリンプロテアーゼ 1 種 (PsuSP1) を明らかにした。



図：タンパク質の存在量に基づく辺材中の各部位における機能ごとのタンパク質の割合 (%)

②放射柔細胞の自己分解に関わると予想されるプロテアーゼの遺伝子発現解析

放射柔細胞の細胞死は、辺材中央部で初めて観察された。最終的には、辺材内層ですべての放射柔細胞の死滅が観察された。total RNA は心材部である試料 9 を除いたすべての試料から抽出することができ、顕微鏡観察の結果と一致していた。

PsuCP1、PsuCP2 および PsuSP1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した。これらのプロテアーゼの量は、辺材内層において辺材外層と比べて統計的に有意に増加することがショットガンプロテオーム解析の結果から明らかになっている。しかしながら、

いずれの遺伝子も辺材中において発現量の大きな変動を示すことはなく、辺材内層において発現量の顕著な増大は認められなかった。以上の結果より、今回解析した放射柔細胞の自己分解に関与すると予想されるプロテアーゼの辺材内層におけるタンパク質レベルでの蓄積は、遺伝子発現量の増加では説明できないことが明らかになった。

(2) 放射柔細胞の自己分解酵素の蓄積および輸送に関する解析

XCP2B のプロモーターに緑色蛍光タンパク質 (GFP) および β -グルクロニダーゼ (GUS) を連結した遺伝子 (XCP2BPro::GFP-GUS) を導入した交雑ポプラ (*P. tremula* x *P. tremuloides*) の形質転換体を用いて解析を行った。1ヶ月 *in vitro* において育成させた交雑ポプラの葉、茎、根を用いて GUS 活性の組織内局在について解析を行った。葉や根においては、維管束において GUS 活性が認められたことから、シロイヌナズナの XCP の局在と類似しているといえる。茎においては、二次師部、形成層および二次木部が発達しているのが観察された。二次木部における GUS 活性は、木部繊維および放射柔細胞において散見された。GFP の観察においても同様の局在が認められた。続いて、XCP2B のプロモーターに光変換型蛍光タンパク質の Dendra2 を連結した遺伝子 (XCP2BPro::XCP2B-Dendra2) を導入した形質転換体についても同様に解析を行ったが、Dendra2 の蛍光シグナルを観察することができなかった。ゲノム DNA を用いた PCR 解析によりゲノムへの目的遺伝子の導入については確認されたため、解析した個体において導入遺伝子の発現量が低い可能性が考えられる。

また、心材を含む成木中の放射柔細胞を用いた自己分解酵素の免疫染色を行うことを目的として、プロテオーム解析を通じて明らかになった放射柔細胞の自己分解に関与すると予想されるプロテアーゼ (PsuCP1) のアミノ酸配列情報をもとに作製したペプチド抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった。その結果、目的とする PsuCP1 の分子量付近において抗体による標識が得られなかった。したがって、作製したペプチド抗体が PsuCP1 を認識できなかったと考えられる。

(3) まとめ

本研究のドロノキ辺材における放射柔細胞のショットガンプロテーム解析を通じて、放射柔細胞における放射方向でのタンパク質の量的変動を明らかにすることができた。この結果を通じて、放射柔細胞は放射方向における位置により果たす役割が異なる可能性があるという重要な知見を得た。加えて、今回の網羅的解析により、放射方向において特徴的な変動を示すタンパク質に関する情報を得た。このような情報は、今後の放射柔

細胞の機能発現および細胞死に関わる研究に有益な情報となると考えられる。

さらに、心材形成に伴う細胞死の自己分解に関与することが予想されるプロテアーゼの辺材内層における増加が、遺伝子の発現量の増加によっては説明できないことが明らかになった。この結果は、自己分解に関与することが予想されるプロテアーゼは、長期間蓄積されるあるいは細胞間を輸送されるという仮説を支持する。したがって、放射柔細胞の細胞死過程においては、短命の木部細胞の細胞死とは異なるプロセスが存在する可能性が高いといえる。

また、放射柔細胞の細胞死における自己分解酵素の局在・動態の解明には至らなかったものの、ポプラ形質転換体を用いたライブイメージングのための手法の検討を進めることが出来た。本研究を通じて検討した観察手法は、放射柔細胞の細胞死発現機構や心材形成機構を明らかにする上で今後も活かすことができる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Izumi Arakawa, Ryo Funada, Satoshi Nakaba (2018) Changes in the morphology and functions of vacuoles during the death of ray parenchyma cells in *Cryptomeria japonica*. *Journal of Wood Science* 64:177-185 (査読有)

2. Satoshi Nakaba, Hikaru Morimoto, Izumi Arakawa, Yusuke Yamagishi, Ryogo Nakada, Ryo Funada (2017) Responses of ray parenchyma cells to wounding differ between earlywood and latewood in the sapwood of *Cryptomeria japonica*. *Trees – Structure and Function* 31: 27-39 (査読有)

3. Satoshi Nakaba, Izumi Arakawa, Hikaru Morimoto, Nobumasa Bito, Takanori Imai, Ryogo Nakada, Ryo Funada (2016) Agatharesinol biosynthesis-related changes of ray parenchyma in sapwood sticks of *Cryptomeria japonica* during cell death. *Planta* 243: 1225-1236 (査読有)

4. Satoshi Nakaba, Asami Hirai, Kayo Kudo, Yusuke Yamagishi, Kenichi Yamane, Katsushi Kuroda, Widyanto Dwi Nugroho, Peter Kitin, Ryo Funada (2016) Cavitation of intercellular spaces is critical to establishment of hydraulic properties of compression wood of *Chamaecyparis obtusa* seedlings. *Annals of Botany* 117: 457-463 (査読有)

[学会発表] (計14件)

1. 宮田晴香、橋田 光、小林 真、吉田俊也、

高橋直樹、船田 良、半 智史「オニグルミ樹幹におけるフェノール含有量の放射方向での変動」第 68 回日本木材学会大会 京都 2018 年 3 月

2. Satoshi Nakaba, Hikaru Morimoto, Izumi Arakawa, Yusuke Yamagishi, Ryogo Nakada, Ryo Funada: Changes over time in ray parenchyma cells after wounding in *Cryptomeria japonica*, IUFRO Tokyo 2017, Tokyo, Japan, October 2017

3. Izumi Arakawa, Koh Yasue, Ryo Funada, Satoshi Nakaba: Initiation of starch accumulation in ray parenchyma cells in *Larix kaempferi*, The 9th Pacific Regional Wood Anatomy Conference (PRWAC) . Bali, Indonesia, September 2017

4. 半 智史、高橋大輔、梅澤泰史、春日 純、高田直樹、中田了五、上村松生、船田 良「ショットガンプロテオミクスを用いたドロノキ放射柔細胞の放射方向におけるタンパク質変動の解析」：第 81 回日本植物学会大会 野田 2017 年 9 月

5. Satoshi Nakaba, Izumi Arakawa, Hikaru Morimoto, Nobumasa Bito, Takanori Imai, Ryogo Nakada, Ryo Funada: Relationship between cytological changes and biosynthesis of agatharesinol in ray parenchyma in sapwood sticks of *Cryptomeria japonica* during cell death, IUFRO Conference Division 5 Forest Products, Vancouver, Canada, June 2017

6. Izumi Arakawa, Ryo Funada, Satoshi Nakaba: Relationship between vacuole rupture and morphological change in nuclei in ray parenchyma cells during heartwood formation in *Cryptomeria japonica*, IUFRO Conference Division 5 Forest Products, Vancouver, Canada, June 2017

7. 半 智史、高田直樹、高橋大輔、中田了五、上村松生、船田 良「ドロノキ放射柔細胞の細胞死に関連するプロテアーゼの遺伝子発現解析」：第 67 回日本木材学会 福岡 2017 年 3 月

8. 三ツ屋佑樹、荒川 泉、船田 良、半 智史「スギ辺材部小片の含水率の低下が放射柔細胞の細胞死過程に与える影響」：第 67 回日本木材学会大会 福岡 2017 年 3 月

9. 宮田晴香、荒川 泉、安江 恒、船田 良、半 智史「オニグルミの木部柔細胞における心材形成に伴う細胞内容物の変化」：第 67 回日本木材学会大会 福岡 2017 年 3 月

10. 半 智史、高橋大輔、梅澤泰史、春日 純、高田直樹、中田了五、上村松生、船田 良「ド

ロノキ木部放射柔細胞の放射方向におけるタンパク質変動のショットガンプロテオーム解析」：第 66 回日本木材学会大会 名古屋 2016 年 3 月

11. 荒川 泉、船田 良、半 智史「スギ放射柔細胞の細胞死過程における液胞の崩壊と核の形態変化」：第 66 回日本木材学会大会 名古屋 2016 年 3 月 優秀ポスター賞受賞

12. 三ツ屋佑樹、清水友梨、今井貴規、荒川 泉、船田 良、半 智史「スギ辺材部小片を用いた異なる温度条件における放射柔細胞の細胞死過程の解析」：第 66 回日本木材学会大会 名古屋 2016 年 3 月

13. Satoshi Nakaba, Yusuke Yamagishi, Yuzou Sano, Ryo Funada: Analysis of localization of heartwood substances in the pith region of a hardwood, *Robinia pseudoacacia* var. *inermis*, by fluorescence microspectroscopy, The second East-Asia Microscopy Conference, Hyogo, Japan, November 2015

14. Satoshi Nakaba: Analysis of heartwood formation by fluorescence microspectroscopy. International Microscopy Workshop on Plant Sciences 2015, Hyogo, Japan, November 2015 (招待講演)

〔図書〕 (計 1 件)

1. Ryo Funada, Yusuke Yamagishi, Shahanara Begum, Kayo Kudo, Eri Nabeshima, Widyanto Dwi Nugroho, Yuichiro Oribe, Satoshi Nakaba (2016) Xylogenesis in trees: from cambial cell division to cell death. In: Kim, Y.S., Funada, R., Singh, A. (eds.) Secondary xylem biology, Elsevier, pp 25-43

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~tokusei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

半 智史 (NAKABA, Satoshi)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：40627709

(2) 連携研究者

高田 直樹 (TAKATA, Naoki)

森林総合研究所・森林バイオ研究センター・主任研究員

研究者番号：90605544