

令和元年6月10日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18734

研究課題名（和文）木部細胞において表層微小管の空間構造を制御する新規転写因子の機能解明

研究課題名（英文）Functional characterization of novel transcription factors that regulate distribution of cortical microtubules in wood fibers in poplar

研究代表者

高田 直樹 (Takata, Naoki)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 森林バイオ研究センター・主任研究員 等

研究者番号：90605544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ポプラにおいて表層微小管の空間構造を制御する新規遺伝子（TF26遺伝子）の機能解析を行なった。TF26遺伝子およびそのパラログ（TF26b遺伝子）は木部組織で高発現しており、TF26遺伝子過剰発現ポプラでは木部繊維の細胞壁が厚くなった。一方で、TF26遺伝子およびTF26b遺伝子を破壊したポプラでは木部繊維の細胞壁厚が薄くなっていた。また、TF26遺伝子およびTF26b遺伝子の遺伝子発現制御解析の結果、両遺伝子は二次壁形成のマスター転写因子であるNST/SND遺伝子と正の転写フィードバックループを形成することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で同定した転写因子（TF26遺伝子およびTF26b遺伝子）は、木部繊維の二次壁形成のマスター転写因子NST/SND遺伝子（VNS09およびVNS10）と正の転写フィードバックループを形成している。新たに発見した本制御機構は、木部繊維が二次壁を厚く堆積するためのシステムであると推察される。本研究成果により、支持細胞（木部繊維）が巨大な樹体を支えるために細胞壁を厚く発達させ物理的強度を獲得する分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we characterized transcription factors, TF26 and TF26b, which were identified as novel regulators of cortical microtubule distribution in poplar. TF26 and the paralogous gene, TF26b, were preferentially expressed in the xylem tissues of poplar. Overexpression of TF26 enhanced cell wall formation in wood fiber cells. We generated double knockout poplars, tf26 tf26b. Histological analysis of xylem tissues showed that secondary cell wall of wood fibers was depressed in the knockout mutants. Microarray analysis and quantitative real-time PCR analysis using TF26 overexpressors and double knockout mutants demonstrated that TF26 and TF26b form a positive transcriptional feedback loop with NST/SND orthologues, master regulators of secondary cell wall formation in wood fibers.

研究分野：樹木分子生物学

キーワード：組織構造 表層微小管 二次壁 木部繊維 転写フィードバックループ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 表層微小管が制御するセルロースマイクロフィブリル (MF) の配向

樹木はその巨大な樹体を永年的に維持するために、高度に分化した細胞壁を形成する。細胞壁は一次壁と二次壁に大別され、一次壁は細胞が伸長・拡大中に堆積する薄い細胞壁、二次壁は細胞が伸長・拡大停止後に堆積する厚い細胞壁である。広葉樹の木部繊維や針葉樹の仮道管の場合、二次壁はS1層、S2層、S3層の3層に区別される。二次壁の各壁層では細胞長軸に対するMFの配向角度が異なっており、S1層では緩傾斜、S2層では急傾斜、S3層では緩傾斜として配向している(文献1)。MFの連続的な配向変化は、細胞膜直下に局在する繊維状の表層微小管により制御されることが知られている。しかし、二次壁形成中に生じるMF及び表層微小管の配向変化が、どのような細胞内分子機構により制御されているのか未だ詳細な理解には至っていない。そこで、本研究では、MF及び表層微小管の空間構造を制御する細胞内分子機構を解明することを最終目標とする。

#### (2) 木部分化過程に生じる表層微小管の空間構造の変化

表層微小管の空間構造は、木部繊維や仮道管の発達段階によって変化する。形成層帯の紡錘形細胞においては、表層微小管は細胞内全体にランダムに配置している。一次壁堆積中の細胞になると、表層微小管に平行性が認められるようになり、らせん状の配向を示す(文献2)。さらに分化が進行した二次壁堆積中の細胞では、微小管は密に配置し平行性がより強くなる。また、二次壁のS1層、S2層、S3層を比較すると、S2層での微小管の密度が最も高いことが報告されている。しかし、表層微小管の空間構造を制御する機構(例えば、配向角度の決定機構、S1層からS2層、S2層からS3層への配向角度を変化させる機構、平行性の維持機構、密度の制御機構など)に関しては未だ多くの疑問が残されている。

#### (3) 木部細胞において表層微小管の空間構造を制御する新規因子

研究開始当初、ポプラにおいて表層微小管の空間構造(平行性と密度)を制御する新規遺伝子(TF26遺伝子)を同定していた。TF26遺伝子は転写因子をコードすることから、下流のターゲット因子を介して表層微小管の配向や密度を制御していると推察される。しかし、TF26遺伝子が木部のどの細胞でどのように機能しているのか、さらには表層微小管の空間構造をどのように制御しているのかについては未だ詳細な理解に至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、分化中の木部細胞においてMF及び表層微小管の空間構造を制御する細胞内分子機構の解明を最終目標とする。そのために、表層微小管の配向と密度を変化させる新規転写因子(TF26遺伝子)に着目し、「木部細胞の発達過程においてTF26遺伝子がMFおよび表層微小管の配向を制御する機構の解析」、「TF26遺伝子が表層微小管の動的変化に与える影響の評価」を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) TF26遺伝子およびTF26<sup>b</sup>遺伝子の遺伝子発現解析

ポプラには、TF26遺伝子のパラログとしてTF26<sup>b</sup>遺伝子が保存されている。そこで、TF26遺伝子およびTF26<sup>b</sup>遺伝子が発現する細胞を詳細に調べるために、各遺伝子のプロモーター領域(TF26<sup>pro</sup>およびTF26<sup>b</sup><sup>pro</sup>)にレポーター遺伝子(GFP-GUS)を融合したバイナリーベクターをポプラに導入した。作成した形質転換体(TF26<sup>pro</sup>:GFP-GUSおよびTF26<sup>b</sup><sup>pro</sup>:GFP-GUS)についてGUS染色を行なったのち、顕微鏡により観察した。

#### (2) 木部細胞の発達過程におけるTF26遺伝子およびTF26<sup>b</sup>遺伝子の機能解析

TF26遺伝子過剰発現ポプラ(TF26<sup>ox</sup>)をポット苗として生育させたのち、主幹サンプルを用いて顕微鏡観察を行なった。CRISPR/Cas9システムを利用し、TF26遺伝子およびTF26<sup>b</sup>遺伝子を破壊したTF26 TF26<sup>b</sup>遺伝子欠損ポプラ(*tf26 tf26<sup>b</sup>*)を作成した。*tf26 tf26<sup>b</sup>*の無菌株を鉢上げしたのち、主幹を用いて顕微鏡観察および細胞壁構成成分の化学分析を行なった。

#### (3) TF26遺伝子およびTF26<sup>b</sup>遺伝子の転写制御ネットワークの解析

TF26遺伝子過剰発現ポプラおよびコントロール個体を用いてマイクロアレイ解析を行い、TF26遺伝子過剰発現体において変動する遺伝子群を同定した。そのうち一部の遺伝子については、*tf26 tf26<sup>b</sup>*を用いてreal time PCR解析を行った。

TF26遺伝子およびTF26<sup>b</sup>遺伝子がNST/SND遺伝子を直接的または間接的に転写制御するかどうかを調べるために、各遺伝子にグルコシルコイド受容体ドメイン(GR)を連結した遺伝子(TF26-GR、TF26<sup>b</sup>-GR)を作成しポプラへ導入した。作成した形質転換体について、グルコシルコイドおよびシクロヘキシミドを単独もしくは同時に添加し、NST/SND遺伝子の発現変動をreal time PCRにより解析した。

#### (4) TF26遺伝子が制御する表層微小管の動態解析

TF26<sup>ox</sup>では、微小管を生体内で可視化するための遺伝子(GFP-AtTUA6)が発現している。そ

ここで、共焦点レーザー顕微鏡により表層微小管を連続的に観察し、微小管の動態を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子の遺伝子発現解析

TF26<sub>pro</sub>:GFP-GUS および TF26<sup>b</sup><sub>pro</sub>:GFP-GUS の無菌培養株を鉢上げしたのち、主幹を用いて GUS 染色を行なった。その結果、TF26<sup>b</sup> プロモーターは木部繊維、木部放射柔細胞、道管、および師部繊維において GUS 活性が観察された。一方で、TF26<sub>pro</sub>:GFP-GUS では形質転換体のラインにより染色性が異なっていた。その理由として、TF26 プロモーターの長さが短いことが考えられたため、さらに長鎖の TF26 プロモーター (TF26<sub>proL</sub>) を単離し、TF26<sub>proL</sub>:GFP-GUS 個体を作成した。研究開始当初までの成果として TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子が二次木部で高発現していることを明らかにしている。GUS 染色の結果も考慮すると TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子は二次壁形成が生じる細胞で機能すると推察された。

##### (2) 木部細胞の発達過程における TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子の機能解析

TF26<sub>ox</sub> の主幹を用いた顕微鏡観察の結果、木部繊維の細胞壁が厚くなること、細胞壁構成成分 (セルロース、ヘミセルロース、リグニン) が髓の柔細胞において異所的に蓄積することが明らかになった。tf26 tf26<sup>b</sup> の主幹についても顕微鏡観察を行なったところ、道管要素の細胞壁厚には大きな変化が見られず、木部繊維の細胞壁厚が約半分に薄くなっていた。そこで、二次壁の各壁層 (S1 層、S2 層および S3 層) の厚さを定量的に解析するために、透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて tf26 tf26<sup>b</sup> の木部組織の観察に着手した。また、tf26 tf26<sup>b</sup> の木部サンプルを用いて細胞壁構成成分の化学分析を行なったところ、tf26 tf26<sup>b</sup> では S2 層および S3 層に高蓄積する細胞壁成分が減少することが明らかになった。これらの結果より、TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子は木部繊維の二次壁形成、特に S2 層および S3 層の堆積に関与する可能性が示唆された。

##### (3) TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子の転写制御ネットワークの解析

マイクロアレイ解析および real time PCR 解析の結果、TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子は木部繊維の二次壁形成のマスター転写因子である NST/SND 遺伝子 (VNS09 および VNS10) の遺伝子発現を正に制御していることが明らかになった。次に、TF26-GR および TF26<sup>b</sup>-GR を導入したポプラをグルココルチコイドやシクロヘキシミドにより処理したところ、TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子は VNS09 および VNS10 を直接的に転写制御する可能性が示唆された。研究開始当初までの成果として、VNS09 および VNS10 は TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子の遺伝子発現を正に制御することが分かっている。これらの結果を考慮すると、TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子は VNS09 および VNS10 と正の転写フィードバックループを形成すると推察される (図 1)。

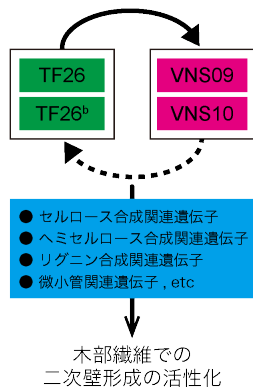


図1 TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子の転写制御ネットワークと二次壁形成のモデル図

##### (4) TF26 遺伝子が制御する表層微小管の動態解析

TF26<sub>ox</sub> およびコントロール個体の葉の表皮細胞において、光褪色後蛍光回復法により表層微小管の動態解析を行なった。その結果、TF26<sub>ox</sub> とコントロール個体では同様の蛍光強度の回復が観察された。このことから、二次壁形成中の細胞においても表層微小管のターンオーバーが頻繁に生じていると考えられる。

以上の結果から、本研究で同定した転写因子 (TF26 遺伝子および TF26<sup>b</sup> 遺伝子) は二次壁形成のマスター転写因子である NST/SND 遺伝子 (VNS09 および VNS10) と正の転写フィードバックループを形成することにより、木部繊維の二次壁形成や表層微小管の空間構造を制御していると考えられる。本研究成果により、樹木が巨大な樹体を支えるために支持細胞 (木部繊維) の細胞壁を厚くする分子メカニズムの一部を明らかにすることができた。

<引用文献>

- ① Funada R. (2008) Microtubules and the control of wood formation. In: Nick, P. (ed.) Plant Microtubules: Development and Flexibility, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 83-119.
- ② Chaffey N, Barlow P, Sundberg B. (2002) Understanding the role of the cytoskeleton in wood formation in angiosperm trees: hybrid aspen (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) as the model species. Tree Physiology, 239-249.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Takata N, Awano T, Nakata MT, Sano Y, Sakamoto S, Mitsuda N, Taniguchi T. (2019) *Populus* NST/SND orthologs are key regulators of secondary cell wall formation in wood fibers, phloem fibers and xylem ray parenchyma cells. Tree Physiology 39, 514-525. (doi:10.1093/treephys/tpz004) (査読有)
- ② Osako Y, Takata N, Nuoendagula, Ishikawa S, Umezawa T, Taniguchi T, Kajita S. (2019) Expression analysis of cellulose synthases that comprise the Type II complex in hybrid aspen. Plant Biology 21, 361-370. (doi:10.1111/plb.12921) (査読有)
- ③ Edwards KD, Takata N, Johansson M, Jurca M, Novák O, Hényková E, Liverani S, Kozarewa I, Strnad M, Millar AJ, Ljung K, Eriksson ME. (2018) Circadian clock components control daily growth activities by modulating cytokinin levels and cell division-associated gene expression in *Populus* trees. Plant and Cell Environment 41, 1468-1482. (doi: 10.1111/pce.13185) (査読有)
- ④ Nuoendagula\*, Tsuji Y\*, Takata N\*, Sakamoto S, Nakagawa-Izumi A, Taniguchi T, Ralph J, Mitsuda N, Kajita S. (2018) Change in lignin structure, but not in lignin content, in transgenic poplar overexpressing the rice master regulator of secondary cell wall biosynthesis. Physiologia Plantarum 163, 170-182. (\* These authors equally contributed to this work.) (doi:10.1111/ppl.12684) (査読有)
- ⑤ Takata N, Sakamoto S, Mitsuda N, Taniguchi T. (2017) The *Arabidopsis* NST3/SND1 promoter is active in secondary woody tissue in poplar. Journal of Wood Science 63, 396-400. (doi:10.1007/s1008) (査読有)

[学会発表] (計10件)

- ① Takata N. Wood formation and engineering in poplar. JST-ALCA the 2nd Symposium of Plant Cell Wall Engineering —Toward Low Carbon Society— (2019)
- ② Takata N. CRISPR/Cas9 approaches to understand secondary cell wall formation in wood fibers in poplar. Bioengineering of Lignocellulose for Clean Energy Production: Perspectives and Opportunities (2019)
- ③ 高田直樹, 堀千明, 松本謙一郎, ラム イン プイ, 飛松裕基, 永野聡一郎. R3 MYB 遺伝子の過剰発現によるポプラ木質の酵素糖化性の改良. 第60回日本植物生理学会大会 (2019)
- ④ 高田直樹, 栗野達也, 佐野雄三, 中田未友希, 坂本真吾, 光田展隆, 谷口亨. ポプラ NST 四重変異体の組織構造. 植物細胞壁研究者ネットワーク定例研究会 (2018)
- ⑤ Takata N, Awano T, Sano Y, Nakata MT, Sakamoto S, Mitsuda N, Taniguchi T. NST/SND-independent secondary cell wall formation in wood fibers in the vicinity of vessel element in poplar. International Symposium on Forest Tree Molecular Biology and Biotechnology 2018 (2018)
- ⑥ 高田直樹, 栗野達也, 朽名夏磨, 谷口亨. Feedback regulation in secondary cell wall thickening in poplar. 第59回日本植物生理学会大会 (2018)
- ⑦ 高田直樹, 栗野達也, 中田未友希, 坂本真吾, 光田展隆, 佐野雄三, 谷口亨. ゲノム編集技術により見出された新たな木部繊維の存在. 第68回日本木材学会大会 (2018)
- ⑧ 高田直樹, 谷口亨. イネの遺伝子を使ってポプラの木質バイオマスの増産に成功. 第15回環境研究シンポジウム (2017)
- ⑨ 高田直樹, 谷口亨. ポプラにおいて見出された二次壁形成の正の転写フィードバックループ. 第67回日本木材学会大会 (2017)
- ⑩ Takata N, Taniguchi T. Positive feedback loop in secondary cell wall formation in poplar. 第58回日本植物生理学会大会 (2017)

[図書] (計1件)

- ① Arakawa K, Kasuga J, Takata N. (2018) Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation, Adaptation Mechanisms and Their Applications: Mechanism of overwintering in trees. Springer, p.129-147.

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：栗野 達也

ローマ字氏名：Tatsuya Awano

研究協力者氏名：山岸 祐介

ローマ字氏名：Yusuke Yamagishi

研究協力者氏名：飛松 裕基

ローマ字氏名：Yuki Tobimatsu

研究協力者氏名：鈴木 史朗

ローマ字氏名：Shiro Suzuki

研究協力者氏名：ラム イン プイ

ローマ字氏名：Pui Ying Lam

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。