

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19286

研究課題名(和文)あて材細胞がまるい形になる仕組みとその役割

研究課題名(英文)The mechanism that reaction wood cell has a circular shape

研究代表者

吉田 正人(Yoshida, Masato)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30242845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：針葉樹あて材細胞の横断面はまるい形をしており、細胞間の一部には隙間が存在している。細胞間の接着が十分でないことが、このような形状を作っているのではなかろうか。細胞間を接着するペクチン・ホモガラクトuronanと、それに接着機能を付与するペクチンメチルエステラーゼに着目して研究した。苗木を傾斜生育し、その傾斜度合いを変化させることで、まるみが弱いあて材細胞から、まるみが強いあて材細胞までを調整し、まるみの程度とペクチンメチルエステラーゼの量を調べた。まるい細胞ほど、細胞間のペクチンメチルエステラーゼ量が少なくなっており、推測と矛盾しない結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹木は、あて材細胞をつくって姿勢を調整している。あて材細胞の断面はまるい形をしている。一方、通常の細胞は四角い形をしている。この結果、できた木材の構造と性質は均一でなくなり、木材利用での問題になっている。本研究成果は、あて材細胞のまるい形がどのように作られるのかを明らかにした。これは問題の克服に向けた一歩であり、樹木の健全な成長を妨げることなく克服する展開へとつながる成果である。

研究成果の概要(英文)：The transverse section of compression wood tracheids has a circular shape and intercellular spaces. We hypothesized that peeling of the cell wall adhesion would cause cellular intervals, resulting in circularity of the transverse section of tracheids. Homogalacturonan, a type of pectin, functions in cell wall adhesion. Further, pectin methylesterase (PME) is involved in functionalization of homogalacturonan. We quantitated PME gene expression levels in differentiating xylem cells using different degrees of compression wood samples and examined the correlation with circularity of the transverse section of tracheids in each sample. We found that lower gene expression level of the sample corresponded with increasing circularity of the transverse section of tracheids. It is considered that the transverse section of compression wood tracheids becomes circular by suppression of PME gene expression during differentiation.

研究分野：木質科学

キーワード：あて材 二次壁

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

樹木は、あて材細胞をつくって姿勢を調整している。あて材細胞の断面はまるい形をしている。一方、通常の細胞は四角い形をしている。この結果、できた木材の構造と性質は均一でなくなり、木材利用での問題になっている。

あて材は、木材利用には問題となるが、樹木の健全な成長には必要である。したがって、あて材を形成しない品種改良や技術開発は行えない。

応募者は、次世代シーケンサーを用いて、あて材でペクチンメチルエステラーゼ遺伝子の発現が抑制されていることを明らかにした。この遺伝子は細胞間の接着にかかわっている。細胞形成の途中で細胞間の接着が不十分になるから、あて材細胞はまるい形になるのだろうか。

2. 研究の目的

あて材細胞のまるい形はどのように作られるのだろうか。ペクチンメチルエステラーゼの減少と関係があるのだろうか。本研究は、この疑問に答える研究を行う。

3. 研究の方法

あて材細胞がまるい形になる仕組みと、まるい形の姿勢調整への寄与を明らかにするため、次の項目を行なった。

試料には樹高 100 cm のヒノキ苗を用いた。鉛直から 5°, 10°, 20°, 30° 傾斜角度でそれぞれ 4 個体ずつ生育した。当年の成長旺盛な時期に分化中木部細胞を含む組織を取得し、直ちに液体窒素で凍結したのち、-80°C で保存した。また、木部仮道管横断面のまるみ程度を測定するための組織観察試料を採取し、3%グルタルアルデヒド・りん酸緩衝液中で 1 週間、4°C で化学固定した。

(1) -80°C で保存した組織から、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子発現量を定量 PCR 解析の比較 Ct 法により定量した。化学固定した試料から滑走式マイクロトームを用いて横断面切片を作成し、1%サフラン溶液で染色後、プレパラートを作成した。ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子発現量と細胞のまるい形との相関分析をおこなった。

(2) ペクチンメチルエステラーゼが細胞形成のいつ、どこで働いているかを明らかにする。ペクチンメチルエステラーゼ抗体を作成した。抗ペクチンメチルエステラーゼ抗体を作製するために、cDNA クローニングとシーケンスによって分化中木部細胞で発現する PME 遺伝子の正確な塩基配列を特定した。ヒノキ正常材の分化中木部細胞から得た Total RNA を逆転写した cDNA を PCR 反応によって増幅させた。プライマー配列は、Hinoki_PME_ORF_F, 5' -AATTAACGGCAAGCAAATCG-3' ; Hinoki_PME_ORF_R, 5' -GAGTGC GCGAGTATTCCTTC-3'。プライマーペアと TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa) を用いて ORF 領域を増幅した。液体窒素中で試料を粉末化し、常法によりタンパクを抽出した。以上の情報を用いて、ウサギ抗ペクチンメチルエステラーゼ IgG 抗体を作成した。作成した抗体を用いて免疫染色を行なった。二次抗体には Alexa Fluor 647 を用いた。観察にはオリンパス製 Fluoview FV10i 共焦点レーザー顕微鏡を使用した。

4. 研究成果

(1) 木部仮道管横断面の円形度と遺伝子発現量との関係

樹幹の傾斜角度を 5 段階に分けて生育した試料において木部仮道管横断面の円形度を測定した。その結果、樹幹の傾斜角度が 10° 以上の試料において圧縮あて材の特徴である仮道管横断面の円みが観察された。樹幹の傾斜角度が大きい試料ほど木部仮道管横断面の円形度は大きくなった。また各試料において、定量的リアルタイム PCR で定量した分化中木部細胞でのペクチンメチルエステラーゼ遺伝子発現量と木部仮道管横断面の円形度を照合した。その結果、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子発現量が相対的に少ない試料ほど木部仮道管横断面の円形度が大きくなった。円形度平均が 0.95 付近の試料、すなわち木部仮道管の横断面が円みを帯びていた試料では、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子の相対発現量が木部仮道管の横断面が四角形の試料のその 10 分の 1 以下だった。

(2) ウェスタンブロッティング

抗 CoPME 抗体がヒノキ PME を特異的に認識するかどうか確認するために、正常材および圧縮あて材の分化中木部から抽出したタンパク質に対して抗 CoPME 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。抗 CoPME 抗体はヒノキの分化中木部から抽出したタンパク質に対して反応した。正常材から抽出されたタンパク質では、2 つのシグナルが検出された。分子量 55~60kDa の範囲で強いシグナルを示し、分子量 37~39kDa の範囲で弱いシグナルを示した。また、圧縮あて材から抽出されたタンパク質においても正常材から抽出したタンパク質と同様の結果が得られた。一方で、抗原で吸収した抗 CoPME 抗体はヒノキの分化中木部から抽出したタンパク質に対して反応しなかった。

(3) 抗 CoPME 抗体を用いた分化中木部仮道管でのペクチンメチルエステラーゼの免疫局在決定

抗 CoPME 抗体を免疫標識に用いて、形成層帯から木部仮道管までの分化中木部仮道管の横断面を観察した。正常材切片では、形成層帯から拡大帯までの複合細胞間層において標識を示した。拡大帯が終了し、二次壁の肥厚が開始された以降では細胞壁の全周にわたって標識を示した。セルコーナーにおいても標識を示した。また、圧縮あて材切片では、形成層帯から成熟細胞までの細胞壁でまばらに標識を示した。形成層帯から成熟細胞にかけて正常材切片の方が圧縮あて材切片よりも強い標識を示した。どちらの切片においても、肥厚が完了した段階の二次壁では標識は見られなかった。コントロールとして、抗原で吸収した抗 CoPME 抗体を用いたところ、正常材切片、圧縮あて材切片ともに標識は見られなかった。また、抗 CoPME 抗体を除去したコントロールにおいても、正常材切片、圧縮あて材切片ともに標識は見られなかった。

(4) LM19、LM20 抗体を用いた分化中木部仮道管でのホモガラクトツロナン免疫局在決定

抗ホモガラクトツロナン抗体 LM19、LM20 を免疫標識に用いて、形成層帯から木部仮道管までの分化中木部仮道管の横断面を観察した。LM19 は低メチル化度ホモガラクトツロナンを認識し、LM20 は高メチル化度ホモガラクトツロナンを認識する。LM19 抗体を用いて正常材切片を観察したところ、形成層帯から拡大帯までの複合細胞間層において標識を示した。特に放射壁において強い標識を示した。拡大帯が終了し二次壁の肥厚が開始された以降では、放射壁において標識は弱くなり、接線壁において標識は見られなかった。セルコーナーにおいて標識は見られなかった。肥厚が完了した段階の二次壁では標識は見られなかった。また、圧縮あて材切片においては形成層帯から拡大帯までの中間層において正常材切片よりも弱い標識を示した。拡大帯が終了し二次壁の肥厚が開始された以降では、正常切片と同様に放射壁において標識は弱くなり、接線壁において標識は見られなかった。コントロールとして、1mg/ml ポリガラクトツロン酸溶液で吸収した LM19 抗体を用いたところ、正常材、圧縮あて材切片ともに標識は見られなかった。LM20 抗体を用いて正常材切片を観察したところ、形成層帯から拡大帯までの中間層において標識を示した。特に放射壁において強い標識を示した。拡大帯が終了し二次壁の肥厚が開始された以降では、放射壁において標識を示したが、接線壁では標識は弱くなった。セルコーナーにおいては強い標識を示した。肥厚が完了した段階の二次壁では標識は見られなかった。また、圧縮あて材切片においても正常材切片と同様の標識パターンを示した。コントロールとして、1mg/ml ペクチン溶液で吸収した LM20 抗体を用いたところ、正常材、圧縮あて材切片ともに標識は見られなかった。また、LM19、LM20 を除去したコントロールにおいても、正常材、圧縮あて材切片ともに標識は見られなかった。

木部仮道管横断面の円形度と遺伝子発現量との関係

ヒノキ分化中木部細胞でのペクチンメチルエステラーゼ遺伝子発現量の相対値と木部仮道管横断面の円形度平均値との関係を示したグラフより、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子の発現量が少なくなるほど木部仮道管横断面がより円みを帯びてくるということが分かった。したがって、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子の発現抑制が一因となり、木部仮道管横断面が円みを帯びてくる可能性がある。本研究では、形成層帯から拡大帯までの領域の分化中木部細胞を採取し遺伝子発現量を定量した。そのため、仮道管横断面が円みを帯びる以前にペクチンメチルエステラーゼ遺伝子の発現が抑制されたのではないかと考えられる。

抗 CoPME 抗体特異性の検討

ウエスタンブロッティングにより抗 CoPME 抗体の特異性を検討した。正常材サンプルおよび圧縮あて材サンプルにおいて分子量 55~60kDa 付近で強いシグナルが検出された。シーケンスにより獲得した分化中木部で機能するペクチンメチルエステラーゼ遺伝子の cDNA 配列をアミノ酸配列に変換し、そして EXPasy - ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) で解析したところ、そのタンパク質の総分子量は少なくとも 53 kDa 以上であると判明した。したがって、抗 CoPME 抗体は分化中木部に存在するペクチンメチルエステラーゼを認識して結合したことが示唆される。

また、正常材サンプルおよび圧縮あて材サンプルにおいて分子量 37~39kDa 付近でもシグナルが検出された。このシグナルは、プロテアーゼによりアミノ酸領域のある部位で切断されたペクチンメチルエステラーゼを認識したものであると考えられる。しかしながら、抗 CoPME 抗体が抗原のペプチド配列 (ASEGSNGNEN) に似た配列を持つ異なるタンパク質に対して非特異的に結合した可能性も考えられる。抗 CoPME 抗体が検出したタンパク質を特定するためには、抗 CoPME 抗体と結合したタンパク質を回収して、そのタンパク質のアミノ酸配列を調べる必要がある。一方で、抗原により吸収した抗 CoPME 抗体は分化中木部から抽出したタンパク質を認識しなかった。したがって、検出されたシグナルは、抗 CoPME 抗体が分化中木部に存在するペクチンメチルエステラーゼを認識したものであると考えられる。

分化中木部仮道管での CoPME の局在

抗 CoPME 抗体を用いた免疫標識により、分化中木部仮道管横断面での CoPME の局在を検討した。CoPME 標識は、正常材切片および圧縮あて材切片において形成層帯から拡大帯までの複合細胞

間層で観察された。そして拡大帯から成熟細胞にかけて主に複合細胞間層で標識が観察された。この結果より、CoPME は形成層帯から成熟細胞までの複合細胞間層に存在することが考えられる。ポプラの枝の分化中木部においてペクチンメチルエステラーゼは、放射壁の複合細胞間層やセルコーナ一部に存在したことが示されている (Guglielmino *et al.* 1997a)。本研究では同様の結果が得られた。抗原により吸収した抗 CoPME 抗体を用いて免疫標識を行ったところ、標識が観察されなかった。したがって標識は、抗 CoPME 抗体が分化中木部仮道管に存在する CoPME を認識したものであると考えられる。

分化中木部仮道管でのホモガラクトツロノンの局在

抗ホモガラクトツロナン抗体 LM19、LM20 を用いた免疫標識により、分化中木部仮道管横断面でのホモガラクトツロノンの局在を検討した。LM20 は高メチル化度ホモガラクトツロナンを認識する。高メチル化度ホモガラクトツロナンはペクチンメチルエステラーゼが機能する際の基質である。LM19 は低メチル化度ホモガラクトツロナンを認識する。低メチル化度ホモガラクトツロナンはペクチンメチルエステラーゼが機能した際の生成物である。

LM20 標識は、正常材切片および圧縮あて材切片において形成層帯から拡大帯までの複合細胞間層で観察された。そして、拡大帯から成熟細胞にかけて放射壁の複合細胞間層で標識が観察された。この結果より、ペクチンメチルエステラーゼが機能する際の基質である高メチル化度ホモガラクトツロナンは形成層帯から成熟細胞までの複合細胞間層に十分に存在するのではないかと考えられる。ポプラの枝の分化中木部において高メチル化度ホモガラクトツロナンは、形成層帯では放射壁および接線壁の中間層に存在したと報告されており (Guglielmino *et al.* 1997b)、本研究では同様の結果が得られた。ペクチン溶液で吸収した LM20 抗体を用いて免疫標識を行ったところ、標識が観察されなかった。したがって標識は、LM20 抗体が分化中木部仮道管に存在する高メチル化度ホモガラクトツロナンを認識したものであると考えられる。

LM19 標識は、正常材切片および圧縮あて材切片において形成層帯から拡大帯までの複合細胞間層で観察された。そして、拡大帯から成熟細胞にかけて標識の強さは弱くなった。LM19 抗体は、細胞壁同士の接着機能を果たすペクチンゲルを構成する低メチル化度ホモガラクトツロナンを認識しなかった可能性が考えられる。ポプラの枝の分化中木部において低メチル化度ホモガラクトツロナンは、形成層帯では放射壁中間層に存在したと報告されており (Guglielmino *et al.* 1997b)、本研究では同様の結果を得られなかった。ポリガラクトツロン酸溶液で吸収した LM19 抗体を用いて免疫標識を行ったところ、標識が観察されなかった。したがって標識は、LM19 抗体が分化中木部仮道管に存在する低メチル化度ホモガラクトツロナンを認識したものであると考えられる。

成熟細胞の細胞壁で高メチル化度ホモガラクトツロナンが低メチル化度ホモガラクトツロナンよりも多く存在している可能性も考えられる。成熟細胞では、細胞壁に存在するホモガラクトツロナンの大部分を高メチル化度ホモガラクトツロナンが占めており低メチル化度ホモガラクトツロナンはわずかしこ存在しないのかもしれない。複合細胞間層で高メチル化度ホモガラクトツロナンが低メチル化度ホモガラクトツロナンよりも多く標識が検出された結果は、オウシュウアカマツ成熟木部でのホモガラクトツロナンの免疫組織化学染色による観察結果 (Hafren *et al.* 2000) と同様であった。木化した後の細胞壁で高メチル化度ホモガラクトツロナンが低メチル化度ホモガラクトツロナンよりも多く存在している理由について、いくつかの仮説が提案されている。低メチル化度ホモガラクトツロナンのカルボキシル基と架橋結合するといわれている Ca^{2+} について、 Ca^{2+} の存在はコニフェリルアルコールの一電子酸化を起こし、木化に関与していると報告された (Westmerck 1982)。すなわちホモガラクトツロナンからの Ca^{2+} の遊離は、拡大帯終了後木化の開始に必要であると報告された。また、 Ca^{2+} の存在下で低メチル化度ホモガラクトツロナンはリグニンの重合を司るイソペルオキシダーゼと親和性を有するという報告もなされた (Penel and Greppin 1994)。これらの報告から、低メチル化度ホモガラクトツロナンおよび遊離した Ca^{2+} は細胞壁の木化に何らかの形で関与しているのではないかと考えられる。

正常材と圧縮あて材仮道管での CoPME の局在の違い

CoPME の局在分布を正常材切片と圧縮あて材切片との間で比較すると、形成層帯から拡大帯にかけての複合細胞間層で正常材の方が圧縮あて材よりも強い標識が観察された。この結果は、分化中木部における正常材の CoPME の存在量が圧縮あて材のそれよりも多いということを示唆している。そしてこの結果は、分化中木部細胞でのペクチンメチルエステラーゼ遺伝子の発現量が少ないと仮道管横断面の円形度が大きくなるという関係を支持している。また、正常材では細胞壁の全周にわたって標識が観察された。一方で、圧縮あて材では細胞壁の全周にわたって標識が観察されず、まばらに観察された。この結果より、正常材では CoPME が細胞壁の全周に存在するが、圧縮あて材では CoPME が細胞壁の全周には存在していないことが考えられる。圧縮あて材の細胞壁形成過程において、以下のプロセスで細胞の形状が円くとなると考えられる。CoPME が機能した部位では形成されたペクチンゲルによる細胞壁同士の接着が十分である。しかし、CoPME が機能しない部位では細胞壁同士の接着が不十分になるだろうと考えられる。拡大帯が終了した時に、仮道管の膨圧の低下のため細胞の体積が減少し、そして仮道管の水分収縮が求心的に起こることにより細胞壁同士の接着が不十分な箇所でき裂が剥がれ始めるのではないかと考えられる。そして、接着が剥がれた部分から細胞間隙が生じ始め、細胞の形状が円

くなると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 1 件）

太田旭紀, 吉田正人, 佐藤彩織, 平出秀人, 松尾美幸, 山本浩之 (2018/3/14-16) ヒノキ分化中木部細胞壁におけるホモガラクトツロナンの局在分布, 日本木材学会, 京都

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：太田 旭紀

ローマ字氏名：OTA, Akinori

研究協力者氏名：佐藤 彩織

ローマ字氏名：SATO, Saori

※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。