

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06289

研究課題名（和文）植物細胞の分化に伴うセルロース合成酵素の細胞内動態変化

研究課題名（英文）Regulation of Subcellular Localization of Cellulose Synthases during Cell Differentiation

研究代表者

國枝 正（Kunieda, Tadashi）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：90566077

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：植物細胞壁の主要な構成成分であるセルロース微繊維は、セルロース合成酵素（CESA）によって細胞膜上で形成される。本研究では、CESAの細胞膜局在を制御する仕組みの解明を目的として、細胞壁形成異常を示す変異体から見出した候補因子の解析を行った。その結果、候補因子とCESAとの間にタンパク質間相互作用が存在し、CESAの細胞内局在を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物細胞壁は細胞の形態維持から個体の機械支持まで多岐に渡って貢献している細胞の構造体であり、セルロース微繊維はその中でも構造的に重要な役割を担う分子である。また、人類の活動においてもセルロースは有用物質として幅広い分野で利用されている。本研究によって、セルロース微繊維の形成を支える制御因子の一つが明らかとなったことは、多様な植物の形態形成の仕組みを理解するための大きな手掛かりとなるとともに、バイオマスとしてのセルロースの増産技術確立などにおいて貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cellulose microfibril is one of main components of plant cell wall. CELLULOSE SYNTHASE A (CESA) plays a role of biosynthesis of cellulose on the plasma membrane. In this study, we analyzed a candidate factor in order to elucidate how CESA can be localized to the plasma membrane. Our results suggest that the factor would regulate subcellular localization of CESA via protein-protein interaction.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：セルロース合成酵素 細胞壁 細胞内局在制御

## 1. 研究開始当初の背景

植物細胞は細胞膜外にセルロース微繊維やヘミセルロース、ペクチン、リグニンを主要な構成成分とする細胞壁をもつ。セルロースを合成するセルロース合成酵素 (CELLULOSE SYNTHASE A, CESA) は 36 分子からなる巨大なタンパク質複合体 (Cellulose Synthase Complex, CSC) を形成し、細胞膜直下の表層微小管に沿って移動しながら、セルロースを繊維状に合成する。細胞膜に局在する一方で、CESA は細胞内においてゴルジ装置をはじめ、small CESA Compartment (smaCC) や Microtubule-Associated Cellulose Synthase compartment (MACS) と呼ばれる細胞内膜系区画に局在する。

細胞壁は組織や細胞の発達段階によってその構成成分を変化させることで、植物の形態形成や生育環境への適応に大きく貢献している。とりわけ成長・分化の過程では、“一次細胞壁”と“二次細胞壁”の構造が異なる細胞壁が形成され、それら細胞壁のセルロース合成は一次細胞壁タイプ CSC と二次細胞壁タイプ CSC がそれぞれ独立に担っている。そのため、一次細胞壁から二次細胞壁へと細胞壁の形成が切り替わるタイミングでは、細胞膜上の CSC を入れ替えるために CESA の局在分布が大きく変化すると考えた。

我々はこれまでに、シロイヌナズナの種皮細胞が形成するムシレージと呼ばれる特殊な細胞壁を対象にして、細胞壁の形成メカニズムの解析を進めてきた。その過程で、細胞内膜系輸送の制御因子の異常がムシレージにセルロース微繊維の減少傾向を引き起こすことを見出しており、この内膜系輸送制御因子が CSC の局在制御に関与することが示唆されていた。

## 2. 研究の目的

CESA は細胞内膜系区画と細胞膜の間をシャトリングしていると考えられているが、その分子メカニズムには不明な点が多い。本研究では、CESA の細胞内膜系区画から細胞膜に向けた動態および局在制御、特に一次細胞壁から二次細胞壁へと細胞の分化が進むことで形成する細胞壁の構造が劇的に変化するタイミングでの CESA の選択的な細胞内輸送制御の分子メカニズムの解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナを用いて、下記の 2 つの解析を行った。

- (1) CESA タンパク質の細胞内局在制御に必要な配列モチーフ解析
- (2) 細胞内膜系輸送制御因子変異体における細胞壁形成の解析

## 4. 研究成果

- (1) CESA タンパク質の細胞内局在制御に必要な配列モチーフ解析

シロイヌナズナに 10 遺伝子存在する CESA のうち、一次細胞壁の形成に必須な CESA1 を黄色蛍光タンパク質 (YFP) で可視化した形質転換体を作成した。自己プロモーター制御下で発現する YFP-CESA1 によって *cesa1* 変異体の一つである *rsw1-1* の根の伸長および根端肥大化異常が回復したことから、YFP-CESA1 は CESA として機能的であることが確認できた (図 1)。

CESA タンパク質の細胞質側ドメインを標的にして行った酵母ツーハイブリッド解析によって、セルロース微繊維が減少した変異体の原因遺伝子として本研究で着目している細胞内膜系輸送制御因子と CESA の 2 つのモチーフとの間でタンパク質間相互作用が起こっている可能性が示唆された。それらモチーフにアミノ酸変異を導入した変異型 YFP-CESA1 (YFP-CESA1<sup>mut</sup>) をシロイヌナズナに発現させ、その細胞内局在を検証した。細胞内において YFP-CESA1 が顆粒状の構造体への局在を示した一方で、YFP-CESA1<sup>mut</sup> ではそのような局在がほとんど観察されなかった (図 2)。YFP-CESA1 の顆粒状構造は、その大きさと先行研究による知見からゴルジ装置であると予想される。したがって、本結果から当該輸送制御因子が CESA のゴルジ装置への局在化制御を担うことが示唆された。CESA1 の 2 つのモチーフは二次細胞壁タイプ CSC を構成する CESA タンパク質にも保存されていることから、当該輸送制御因子は一次細胞壁タイプのみならず、二次細胞壁タイプ CESA のゴルジ装置への局在化制御においても関与していると考えられる。

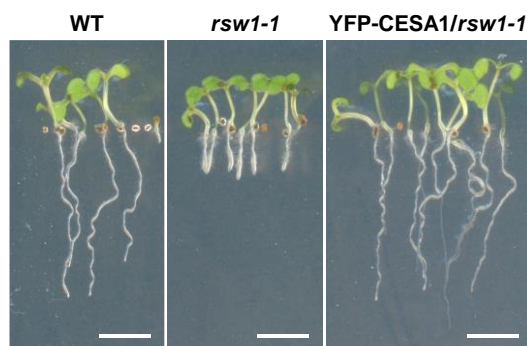


図 1. YFP-CESA1 による *rsw1-1* 変異体の相補性実験

28°C で引き起こされる *rsw1-1* の根の伸長および根端の肥大化異常が、CESA1 プロモーター制御下で発現する YFP-CESA1 の導入によって野生型 (WT) と同程度に回復した。スケールバーは 0.5 cm。

## (2) 細胞内膜系輸送制御因子変異体における細胞壁形成の解析

当該輸送制御因子の T-DNA 挿入による遺伝子欠損変異体において、花茎の維管束間繊維細胞の二次細胞壁肥厚が抑制されることを以前の研究より見出していた。通水組織である木部道管細胞も、維管束間繊維細胞と同じく二次細胞壁を形成する。シロイヌナズナの木部道管細胞において、原生木部道管は主にらせん状、後生木部道管はピット状のそれぞれ独特な二次細胞壁の沈着パターンを示す。当該輸送制御因子の変異体でこれら道管細胞の二次細胞壁のパターンを観察したが、野生型のものとは顕著な相違は見られなかった。したがって、当該輸送制御因子は少なくとも細胞膜上でのセルロース微繊維の沈着部位の決定には関与していないと考えられる。

一次細胞壁から二次細胞壁へと形成される細胞壁タイプが変化するタイミングでのセルロース微繊維の沈着の過程、すなわち CESA の動態を検証するために、原生木部道管分化のマスター転写因子である VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 (VND7) による木部道管細胞分化誘導系 VND7-VP16-GR を変異体に導入したが、細胞死による組織の白化が起こらないなど誘導系が機能しなかった。これには誘導系遺伝子のサイレンシングが原因として考えられる。木部道管細胞分化は植物ホルモンの添加によっても人為的に操作可能であることから、今後は植物ホルモンを利用した分化誘導過程での解析することで、一次細胞壁と二次細胞壁のそれぞれのタイプの CSC の入れ替わりのタイミングでの当該輸送制御因子の関与を検証する。

VND7-VP16-GR 木部道管細胞誘導系の伸長中の暗所胚軸を用いて、細胞内膜系輸送経路を阻害する薬剤処理下での木部道管細胞の二次細胞壁形成を検証した。Brefeldin A などの代表的な内膜系輸送阻害剤とともに、当該輸送制御因子の機能を阻害する薬剤においても二次細胞壁沈着パターンの形成が乱されたことから、木部道管細胞分化誘導系による一次細胞壁から二次細胞壁の急激な形成される細胞壁タイプの切り替えにおいては当該輸送制御因子が CESA の輸送制御を担うことが示唆された。

以上の結果から、本研究で着目した内膜系輸送制御因子が一次細胞壁および二次細胞壁の CESA の細胞内局在制御において重要な役割を担うことが示唆された。今後、当該輸送制御因子の変異体での CESA の動態観察や、同因子と二次細胞壁タイプの CESA とのタンパク質相互作用について詳細に解析することで、植物の生存に必要な不可欠な細胞壁構成成分の一つであるセルロース微繊維の形成メカニズムを明らかにする。

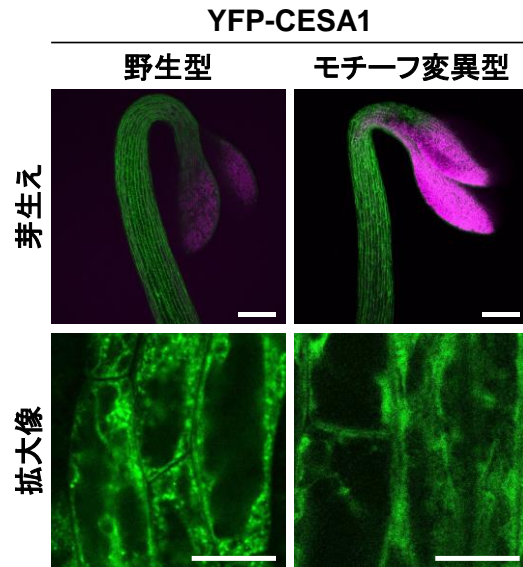


図 2. YFP-CESA1 の細胞内局在解析

細胞伸長に伴う一次細胞壁形成が活発な暗所胚軸の細胞において、YFP-CESA1 の局在解析を行った。当該細胞内輸送制御因子との物理的相互作用に関与すると予想される CESA1 タンパク質配列上の 2 つのモチーフにアミノ酸置換変異を導入すると、野生型 CESA1 で観察されていた顆粒状構造体への局在がほとんど検出されなくなった。

緑色は YFP-CESA1 の蛍光シグナル、マゼンタ色は葉緑体の自家蛍光を示す。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  (芽生え) および 20  $\mu\text{m}$  (拡大像)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kunieda Tadashi, Kishida Keisuke, Kawamura Jumpei, Demura Taku	4. 巻 37
2. 論文標題 Influence of osmotic condition on secondary cell wall formation of xylem vessel cells induced by the master transcription factor VND7	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 465 ~ 469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.1127a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tadashi Kunieda, Ikuko Hara-Nishimura, Taku Demura, George W. Haughn	4. 巻 61
2. 論文標題 Arabidopsis FLYING SAUCER 2 Functions Redundantly with FLY1 to Establish Normal Seed Coat Mucilage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 308-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takenaka Yuto, Kato Kohei, Ogawa-Ohnishi Mari, Tsuruhama Kana, Kajiura Hiroyuki, Yagyuu Kenta, Takeda Atsushi, Takeda Yoichi, Kunieda Tadashi, Hara-Nishimura Ikuko, Kuroha Takeshi, Nishitani Kazuhiko, Matsubayashi Yoshikatsu, Ishimizu Takeshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Pectin RG-I rhamnosyltransferases represent a novel plant-specific glycosyltransferase family	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 669 ~ 676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-018-0217-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimada Tomoo, Kunieda Tadashi, Sumi Sakura, Koumoto Yasuko, Tamura Kentaro, Hatano Kyoko, Ueda Haruko, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 59
2. 論文標題 The AP-1 Complex is Required for Proper Mucilage Formation in Arabidopsis Seeds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2331 ~ 2338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshinari Akira, Hosokawa Takuya, Amano Taro, Beier Marcel Pascal, Kunieda Tadashi, Shimada Tomoo, Hara-Nishimura Ikuko, Naito Satoshi, Takano Junpei	4. 巻 179
2. 論文標題 Polar Localization of the Borate Exporter BOR1 Requires AP2-Dependent Endocytosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1569 ~ 1580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.01017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Kazuki, Kunieda Tadashi, Tamura Kentaro, Hatano Kyoko, Hara-Nishimura Ikuko, Shimada Tomoo	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of Periplasmic Root-Cap Mucilage in Developing Columella Cells of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 國枝正, 地福海月, George W. Haughn, 西村いくこ, 出村拓
2. 発表標題 NAC転写因子VND7は道管細胞においてユビキチンE3リガーゼFLYの発現を制御する
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水元康裕, 國枝正, 出村拓
2. 発表標題 木部道管様細胞の二次壁形成における一次細胞壁の役割
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川村純平, 國枝正, 岸田佳祐, 秋田絵理, 岡野和宣, 細川陽一郎, 出村拓
2. 発表標題 シロイヌナズナ木部道管細胞分化における細胞の力学的強度変化の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西垣南歩, 吉見圭永, 國枝正, 高橋大輔, 円谷陽一, 小竹敬久
2. 発表標題 KONJAC1タンパク質のグルコマンナン合成における役割
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川村純平, 國枝正, 岸田佳祐, 秋田絵理, 細川陽一郎, 出村拓
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いた二次細胞壁形成過程における細胞の力学的強度変化の解析
3. 学会等名 第9回近畿植物学会講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水元康裕, 國枝正, 出村拓
2. 発表標題 シロイヌナズナ木部道管様細胞において原形質分離は二次細胞壁形成を抑制する
3. 学会等名 第9回近畿植物学会講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國枝正, 佐藤雅彦, George W. Haughn, 西村いくこ
2. 発表標題 シロイヌナズナ種皮表皮細胞における細胞膜型SNAREタンパク質の機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國枝正, 地福海月, George W. Haughn, 西村いくこ, 出村拓
2. 発表標題 VND7はユビキチンE3リガーゼFLY1およびFLY2の遺伝子発現を制御する
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田和輝, 國枝正, 田村謙太郎, 西村いくこ, 嶋田知生
2. 発表標題 シロイヌナズナの根冠再外層の脱離を制御するペクチン修飾因子PME11の解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸田佳祐, 國枝正, 細川陽一郎, 出村拓
2. 発表標題 VND7木部道管細胞誘導系を用いたシロイヌナズナの二次細胞壁パターン形成制御の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 地福海月, 國枝正, George W. Haughn, 西村いくこ, 出村拓
2. 発表標題 木部道官細胞分化におけるユピキチンE3リガーゼFLYの発現制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田和輝, 國枝正, 田村謙太郎, 幡野恭子, 西村いくこ, 嶋田知生
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける根冠ムシレージの蓄積と放出機構の解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川卓也, 吉成晃, 國枝正, 嶋田知生, 西村いくこ, 高野順平
2. 発表標題 アダプタータンパク質複合体AP-4はハウ酸トランスポーターBOR1のTGNから液胞への輸送において重要である
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------