

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：32503

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03021

研究課題名(和文)ミトコンドリアゲノムから探る樹木の形成層活動と二次木部形成

研究課題名(英文)Cambium activity and secondary xylem formation of trees investigated through mitochondrial genome analysis

研究代表者

渡邊 宇外 (Watanabe, Ugai)

千葉工業大学・先進工学部・教授

研究者番号：70337707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、樹木の二次木部形成におけるミトコンドリアの役割を明らかにすることを目的とし、日本産針葉樹2樹種についてミトコンドリアの顕微鏡観察やゲノム解析などを行った。樹木形成層内におけるミトコンドリアの分布を可視化することができ、その分布は変動していることが認められた。いずれの樹種についてもミトコンドリアの完全長ゲノムを解読することはできなかったが、一部のタンパク質遺伝子についてアノテーションがなされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは、すべての高等生物において細胞の活性やアポトーシスを左右する最も重要な細胞小器官である。本研究により、樹木のミトコンドリアゲノムの情報を得ることができ、これと二次木部形成における形成層細胞の活性および木化におけるアポトーシスの関係を明らかにできる。また、ミトコンドリアゲノム情報に基づき高い二次木部生産能を有する樹木を効果的に選抜でき、高い材質特性を有する木材の安定的な生産・供給につなげることができる。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to clarify the roles of mitochondria in the secondary xylem formation of tree. The mitochondria in the cambiums were observed and the mitochondrial genomes were sequenced for the two conifers grown in Japan. The visualization of mitochondria revealed their distribution and variation in tree cambium. Although the full length of mitochondrial genomes could not be analyzed, some coding regions of proteins were annotated.

研究分野：木質科学

キーワード：樹木ミトコンドリア ゲノム解析 樹木形成層 二次木部形成

1. 研究開始当初の背景

樹木は、主要な木質バイオマス資源である木材を生産する。樹木内で木材となる部分は二次木部であり、この組織構造は木材の材質特性を決定する最も重要な形質である。二次木部は、形成層細胞の分裂・成熟・木化の過程を経て形成され、この過程における細胞の代謝活性レベルは、組織構造の形成と材質特性の発現に大きく影響する。

ミトコンドリアは高等生物に共通に存在する細胞小器官で、アデノシン三リン酸 (ATP) を産生し、またプログラム細胞死を引き起こす。植物細胞のミトコンドリアは、これらに加えて、主要な生体分子の代謝に関わる。核やプラスチドと同様に、ミトコンドリアは独自のゲノムを有し、呼吸などの反応を制御している。植物ミトコンドリアゲノムについては、そのサイズや遺伝子配置が種間や品種間で大きく異なる。これらは植物の形質発現に大きく関与し、雄性不稔の発現はその代表例である。したがって、植物ミトコンドリアゲノムを詳しく解析することは、植物の成長特性や継室が現れる仕組みの解明につながる。

樹木の二次木部は、形成層細胞の分裂・拡大に始まり、二次細胞壁形成に関わる代謝活動とプログラム細胞死である木化を経て形成される。ミトコンドリアの機能を考えると、この一連のプロセスにはミトコンドリアが関与し、形成層細胞の活性制御を通して樹木の成長および二次木部形成に大きく関係していると考えられる。他の植物と同様に、樹木についてもミトコンドリアのゲノム構造が二次木部の形質発現・決定に大きく関与していると考えられる。しかしながら、ミトコンドリアゲノムが樹木の二次木部形成にどのように関わっているかについては、ほとんど研究されていない。

2. 研究の目的

本研究課題は、樹木のゲノムが成長を制御し二次木部の形質を決定する仕組みを明らかにすることを大きな目標とし、特にミトコンドリアゲノムに焦点を当て、樹木におけるミトコンドリアゲノムと形成層活動、二次木部形成の関係を明らかにすることを目的とした。具体的には、「針葉樹ミトコンドリアゲノムの構造決定と特徴抽出」および「針葉樹ミトコンドリアゲノムの遺伝情報の発現、形成層活動、組織構造の關係の解析」の2つの課題を設定した。これらの課題を実行し、樹木ミトコンドリアゲノムが重要な形質である二次木部の組織構造の決定に果たす役割を明らかにすることを目指した。

植物ミトコンドリアゲノムは、呼吸反応とともに光合成の反応活性や茎の伸長成長と大きく関わっている。さらに樹木の場合、ミトコンドリアゲノムは、形成層細胞の活動によるいわゆる二次肥大成長に影響を与え、木材の組織構造の決定に関わると考えられる。二次肥大成長は木質形成の本質といえ、ミトコンドリアゲノミクスを通して形成層細胞の生理機能と木材の組織構造の形成の関係を明らかにすることは、この樹木の持つ本質的な生理機構の解明につながる。この機構の解明は、優れた材料特性を有する木質素材を効率的に生産することにつながる。また、樹木ミトコンドリアのゲノム解析を進めることで、ゲノム情報と木材の構造的特徴、材質特性を明確に関連づけることができ、新規な木材識別・材質特性評価のシステムを構築できる。これらをふまえ、本研究課題では、生物学のみならず材料学を指向したゲノミクス研究を遂行し、学術的独自性のある研究を目指した。

3. 研究の方法

本研究課題では、上記2.に示した課題を実行するため、具体的に以下の方法で行った。

本研究課題では、アカエゾマツ (*Picea glehnii*) およびカラマツ (*Larix kaempferi*) を実験試料とした。アカエゾマツについては、外見上の成長の良否をもとに、3個体を選んだ。また、カラマツについては、産地が異なる2個体を選んだ。成長当年の開葉時期に、葉芽および新葉を採取した。これらを洗浄および滅菌したのち、カルス誘導培地上に静置し、カルスの誘導および増殖を行った。誘導されたカルス細胞をミトコンドリアの分画と、それに続くゲノムDNAの抽出に供した。

各個体から誘導・増殖されたカルス細胞をホモジナイズした後、Percoll密度勾配遠心によりミトコンドリアを分画した。精製されたミトコンドリア画分に混入した核ゲノムDNAを除去するため、DNase Iを用いて精製画分にあるDNAを分解させた。最終的に分画・精製されたミトコンドリアから、市販の植物DNA抽出試薬を用いてゲノムDNAを抽出・精製した。得られた樹木ミトコンドリアゲノムDNAについて、Phi29 DNA polymeraseによる増幅の後、次世代シーケンサーによる塩基配列解析を行い、さらに、遺伝子、tRNA および rRNA のアノテーションを行った。リードデータにはプラスチド由来と考えられる塩基配列が含まれていたことから、GetOrganelleを用いてミトコンドリアに由来するリードを抽出・アセンブルした。タンパク質やtRNA、rRNAをコードする領域のアノテーションについては、Prokka および ARAGORNを使用した。

各個体から形成層を含む組織ブロックを採取し、化学固定を行った。化学固定された組織ブロックから形成層領域を含む厚さ 50 μm の柁目面切片を作製し、これをミトコンドリア蛍光染

色試薬を用いて染色した。染色切片の観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行い、形成層内でのミトコンドリアの分布状態や細胞内におけるミトコンドリアの集合状態などについて観察した。

4. 研究成果

化学固定された形成層試料から作製した切片を専用試薬を用いて蛍光染色し、樹木形成層内におけるミトコンドリアの存在状態等を観察することができた。ミトコンドリアの分布は、分裂過程にある領域から拡大過程・二次細胞壁形成過程にある領域にかけて増加する傾向が認められた。放射組織では、ミトコンドリアがより多く存在する傾向が認められた。また、ミトコンドリアは小さい粒状ではなく、それらが集合化して存在していた。これらの結果から、樹木ミトコンドリアは形成層細胞の活性に応じてその存在量や状態が変化し、またその変動から、二次細胞壁の形成と必要な ATP の供給の関係が示唆された。

本研究課題で用いた 2 種の針葉樹について、いずれもカルス細胞の誘導を行うことができた。しかしながら、それらの増殖が遅く、また安定的な維持が困難であった。そのため、ミトコンドリアゲノム解析に十分量のカルス細胞を得ることができなかった。そこで、ミトコンドリア画分から抽出・精製されたゲノム DNA に対して増幅を行い、次世代シーケンズ解析の基準をクリアできるだけの DNA 量を確保した。本研究課題で得られたミトコンドリアのゲノムサイズは、これまでに解析された他樹種のデータから想定されるサイズと比べると、おおよそ半分程度であったと考えられた。得られたリード長および contig 長から、シーケンズ解析に供する前までの過程でミトコンドリアゲノム DNA が断片化したものと考えられた。当初は葉芽などから誘導されたカルス細胞を使用することで葉緑体の分化を大きく抑制でき、ミトコンドリアのみを効果的に分画できると考えた。しかし実際には、供試個体からカルスを増殖・維持することが困難であり、予定通り進めることができなかった。これらのことから、今後は樹木の葉芽から直接的にミトコンドリアを分画し、ミトコンドリアゲノム DNA を抽出・精製することが有効であると考えられた。

今回の研究ではミトコンドリアゲノムの完全長 DNA 配列を得ることはできなかったが、得られた contig データに対してアノテーションを行った。供した 2 樹種のいずれの個体についても、tRNA について同定することができた。また rRNA については、部分的に配列を同定することができた。一方、タンパク質コード領域については、大半が同定できず、hypothetical proteins となった。ただし、いずれの供試個体についても、ATP 合成酵素サブユニットやシトクロム c オキシダーゼサブユニットなどについては同定された。産地が異なるカラマツ 2 個体間でアノテーションされたタンパク質の遺伝子配列を比較し、両者の間で一致した。2 樹種間で同じタンパク質のアミノ酸配列を比較し、互いに高い相同性を示した。アカエゾマツの 3 個体間で比較すると、成長が劣る個体では、取得できた塩基配列数の割にアノテーションできた遺伝子が少なかった。

取得できた塩基配列数が想定よりも少なかったにもかかわらず、限定されたタンパク質サブユニットについて同定されたことは、ミトコンドリアゲノムのマルチパート構造が反映されているものと考えられる。今回の解析で同定された ATP 合成酵素サブユニットは、文字通り、生体エネルギーである ATP を合成・産生に寄与する。また、シトクロム c オキシダーゼサブユニットは、ミトコンドリア電子伝達系の最後を担い、プロトン輸送を行って膜間の電気化学ポテンシャルの形成に寄与する。これら両者は、互いに連動してミトコンドリアの重要な機能を支えている。これらのように特にミトコンドリアの機能維持に不可欠なタンパク質の遺伝子については、それらの塩基配列を含む小さな環状 DNA を形成し、またそれらを高いコピー数で維持しているものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺 宇外, 高田 克彦, 安江 恒, 内海 泰弘
2. 発表標題 細胞分画およびDNase処理によるミトコンドリアゲノムDNAの精製の検討
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 渡辺 宇外, 高田 克彦, 安江 恒, 内海 泰弘
2. 発表標題 樹木形成層におけるミトコンドリアの分布と変動
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年～2020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
研究分担者	高田 克彦 (Takata Katsuhiko) (50264099)	秋田県立大学・木材高度加工研究所・教授 (21401)	
研究分担者	安江 恒 (Yasue Koh) (00324236)	信州大学・学術研究院農学系・准教授 (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	内海 泰弘 (Utsumi Yasuhiro) (50346839)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	

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