

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03022

研究課題名（和文）単一細胞転写誘導システムが切り拓く木部細胞の細胞壁形成機構の解明

研究課題名（英文）Molecular approaches to the layer formation of secondary cell wall in xylem cells using a transcriptional induction system

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） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：二次壁はセルロースマイクロフィブリルの配向角度の違いにより3層に分けられる。しかし、二次壁の壁層構造がどのような細胞内分子機構により構築されるのかについては未だ不明な点が多い。本研究では木部細胞の二次壁形成過程でセルロースマイクロフィブリルの空間配置を制御する分子機構の解明を目標として、表層微小管のライブセルイメージングおよび壁層構造の構築に關与する転写因子の機能解析を行った。その結果、新たに同定した転写因子がS2層形成を制御するキー転写因子であること、S1層形成中の細胞とS2層形成中の細胞では表層微小管の空間配置を維持する機構が異なる可能性があ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

樹木に固定される炭素のうち約50%が木材に蓄積すると言われており、脱炭素社会や循環型社会の実現には木材の高度有効利用が重要となる。また、木材を建築材料として利用する場合、物理的強度の高い建材ほど付加価値が高い。二次壁の壁層構造は木材強度を決定する重要な要素であり、その形成過程を理解することは木材の高度利用に直結する課題である。本研究の成果により、世界で初めて壁層構造の構築を制御するキー遺伝子の同定に成功した。さらに、単一細胞を用いて各壁層を形成している細胞の模倣にも成功した。これらの成果は、高強度を実現した優良樹木の開発と育成に繋がる結果であると言える。

研究成果の概要（英文）：Secondary cell wall (SCW) consists of S1, S2, and S3 layers in tracheids and wood fibers in many woody species. S1, S2, and S3 layers are distinguished by the arrangement of the cellulose microfibrils to the longitudinal cell axis; microfibrils in the S1, S2, and S3 layers are arranged in flat helices, steep helices, and flat helices, respectively. However, little is known about the molecular regulation of the SCW layer formation in xylem cells. In this study, we analyzed the function of transcriptional factors that are associated to the SCW layer formation and performed live cell imaging of cortical microtubules in *Populus* suspension cells using a transcriptional induction system. Our results indicate that the transcriptional factors, which are isolated from *Populus* species, have a key role in the S2 layer formation in wood fibers and that spatiotemporal dynamics of cortical microtubules would be different between in S1 layer-forming cells and S2 layer-forming cells.

研究分野：樹木分子生物学

キーワード：二次壁 表層微小管 壁層構造 培養細胞 木材

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞壁は一次壁と二次壁に大別され、細胞の伸長・拡大停止後に堆積する二次壁が細胞壁の大部分を占めている。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。各壁層ではセルロースマイクロフィブリルの配向角度が異なっており、S₁層では細胞軸に対して緩傾斜、S₂層では急傾斜、S₃層では緩傾斜として配向している。このうち、S₂層は細胞壁の約70~80%を占めており、S₂層のセルロースマイクロフィブリルの配向角度が木材の力学的特性を決定する重要な要素である。

セルロースマイクロフィブリルの配向は、細胞骨格である表層微小管により制御されている。これは、細胞膜直下の表層微小管の配列に沿って、セルロース合成酵素が移動するためである。木部繊維や仮道管の発達過程では、表層微小管の空間的配置が大きく変動し、それに伴いセルロースマイクロフィブリルの配向も変化する。しかし、二次壁の形成過程において、表層微小管の空間配置を制御する機構(例えば、S₁層からS₂層およびS₂層からS₃層へ配向角度が変化する機構、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。

研究代表者は、ポプラにおいて木部繊維の二次壁形成を制御する新規転写因子遺伝子(TF²⁶およびそのパラログTF^{26b})を同定している。TF²⁶を過剰発現させたポプラでは通常ランダムに配向する表層微小管が平行かつ密に配置し、TF²⁶およびTF^{26b}を欠損させたポプラでは木部繊維の細胞壁が約50%薄くなる。これらのことから、TF²⁶およびTF^{26b}が二次壁の壁層構築の過程で重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

木部繊維は維管束形成層の内側(つまり、幹の内部)で分化するため、細胞の生理活性を維持したまま分化・発達の過程を観察することは非常に困難である。そのため、細胞を単一化し、制御条件下で目的の細胞へと分化させる誘導系が有効である。誘導系の1つとして、誘導剤により転写因子の機能をオンにし、目的の細胞を誘導することのできる転写誘導システムがある。近年、道管発達の制御因子を利用した転写誘導システムが開発され、単一細胞を管状要素へと効率的に誘導できることが報告されている。木部繊維についても転写制御機構の解明が進んでおり、培養細胞を用いた転写誘導システムの開発に道が拓けてきている。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、木部細胞の二次壁形成過程におけるセルロースマイクロフィブリルの空間配置を制御する分子機構を解明することである。本課題では、セルロースマイクロフィブリルの配向を制御する表層微小管に着目し、(1)ポプラを用いた木部繊維の単一細胞転写誘導システムの開発、(2)二次壁形成中の表層微小管の空間配置および動態の解析、(3)表層微小管の空間的・時間的変化を制御する因子の探索と機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ポプラを用いた木部繊維の単一細胞転写誘導システムの開発

微小管を可視化するための遺伝子[α -チューブリン(TUA)と緑色蛍光タンパク質(GFP)の融合遺伝子]および転写誘導するための遺伝子[TF²⁶およびTF^{26b}とグルコシルコイド受容体(GR)の融合遺伝子]を同一のバイナリーベクター上に連結し、ポプラに導入した。得られたポプラ形質転換体から懸濁培養細胞を誘導し、誘導剤(デキサメタゾン)処理前後での表層微小管の空間配置を蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) 二次壁形成中の表層微小管の空間配置および動態の解析

(1)で開発した転写誘導システムを用いて、誘導剤処理した細胞の表層微小管を数日おきに共焦点レーザー顕微鏡により観察した。また、誘導剤処理を数日行った細胞を一定時間おきに顕微鏡観察することにより、表層微小管のライブセルイメージングを行った。

(3) 表層微小管の空間的・時間的変化を制御する因子の探索と機能解析

TF²⁶過剰発現ポプラの2イベントおよびコントロール個体からtotal RNAを抽出し、RNA-seq解析を行った。バイオインフォマティクス解析により、TF²⁶過剰発現ポプラの2イベントで共通して発現増大もしくは発現減少する微小管関連遺伝子を同定した。このうち、12個の微小管関連遺伝子について組織ごとの発現パターンや木部発達過程での発現変動を解析した。

(4) ポプラおよびスギにおけるTF²⁶遺伝子ファミリーの機能解析

研究開始当初、(1)~(3)を研究課題として計画していたが、それに追加してTF²⁶遺伝子ファミリーの機能解析を行った。まず、TF²⁶およびTF^{26b}を欠損させたポプラを用いて、S₁層、S₂層、S₃層の細胞壁厚およびセルロースマイクロフィブリルの配向角度を透過型電子顕微鏡により観察した。また、針葉樹に保存されているTF²⁶の相同遺伝子の機能を調べるために、スギのTF²⁶オルソログを標的としたCRISPR/Cas9用バイナリーベクターを作製し、スギに形質転換を行った。作製したスギ変異体を用いて、幼植物体の木部構造を顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) ポプラを用いた木部繊維の単一細胞転写誘導システムの開発

ポプラ形質転換体 (TUA-GFP+TF²⁶-GR および TUA-GFP+TF^{26b}-GR) について各2イベントずつ作製し、懸濁培養細胞を誘導した。4イベントのうち、培養液中で単一細胞が多く観察される TUA-GFP+TF²⁶-GR の1イベントについて、デキサメタゾンにより処理を行い、表層微小管を共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。その結果、デキサメタゾン処理前にランダムに配置していた表層微小管が、処理後1~2日後には平行かつ密に配置することを見出した。そこで、これ以降の解析では TUA-GFP+TF²⁶-GR の懸濁培養細胞を用いて、顕微鏡観察を行った。

(2) 二次壁形成中の表層微小管の空間配置および動態の解析

TUA-GFP+TF²⁶-GR をデキサメタゾンで処理し、1日おきに表層微小管の空間配置を観察した。その結果、処理後1日目から表層微小管の密度が増加し、2日目には表層微小管が細胞長軸に対して約90度の角度で高密度に配置していた (図1左)。その後、表層微小管の配向角度は約90度を数日間維持し、処理後4日目には細胞長軸に対してより平行に配向する細胞が確認された (図1右)。一方で、後者の細胞が出現する割合は数%と非常に低かった。

次に、細胞長軸に対して表層微小管の配向角度が約90度の細胞と平行に配向する細胞を用いて、ライブセルイメージングを行った。その結果、前者の細胞と後者の細胞では、表層微小管の伸長方向性が異なることを見出した。表層微小管が約90度に配向する細胞はS₁層形成中の細胞、平行に配向する細胞はS₂層形成中の細胞である可能性がある。このことは、二次壁の形成段階により表層微小管の動態が異なる可能性を示唆している。

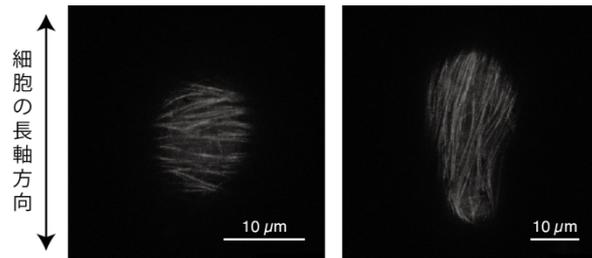


図1 デキサメタゾンで4日間処理した培養細胞 (TUA-GFP+TF²⁶-GR) の表層微小管の顕微鏡像。左の細胞では表層微小管が細胞長軸に対して約90度に配向しており、右の細胞では細胞長軸に対して平行に配向している。

(3) 表層微小管の空間的・時間的変化を制御する因子の探索と機能解析

TF²⁶過剰発現ポプラの2イベントおよびコントロール個体から total RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。パイオインフォマティクス解析により、TF²⁶過剰発現ポプラの2イベントで共通して発現増大する遺伝子を900遺伝子 (padj < 0.01)、発現減少する遺伝子を403遺伝子 (padj < 0.01) 同定した。さらに、発現増大する遺伝子のうち、26遺伝子は微小管関連遺伝子であることを明らかにした。次に、RNA-seq 解析により発現量の差が大きかった12個の微小管関連遺伝子について遺伝子発現パターンの解析を行った。その結果、すべての遺伝子が葉、根、師部、シュートと比較して木部での発現量が高いことを明らかにした。そこで、これらの遺伝子を特異的に破壊する CRISPR/Cas9 用バイナリーベクターを作製し、ポプラへ形質転換を行い、ゲノム編集個体を獲得した。

(4) ポプラおよびスギにおける TF²⁶ 遺伝子ファミリーの機能解析

TF²⁶ および TF^{26b} を欠損させたポプラ二重変異体を透過型電子顕微鏡により観察した結果、変異体では二次壁S₂層の厚さが約8割薄くなっていた。さらに、S₂層のセルロースミクロフィブリルの配向性は、野生型では急傾斜である一方、二重変異体では緩傾斜に変化していた。このことから、TF²⁶ および TF^{26b} はS₂層形成を制御する重要な転写因子であることが示唆された。

次に、スギの TF²⁶ オルソログのゲノム編集個体を用いて、茎の木部組織を観察した結果、S₂層のセルロースミクロフィブリルの配向角度が変化する傾向が見られた。この結果は、針葉樹においても TF²⁶ 遺伝子ファミリーが壁層構造の形成に関与する可能性を示唆している。

本研究課題の最終目標は、木部細胞の二次壁形成過程におけるセルロースミクロフィブリルの空間配置を制御する分子機構の解明である。本課題の成果として、樹木の二次壁形成に関して2つの新知見を提供することができた。1つ目は、TF²⁶ および TF^{26b} が二次壁のS₂層形成を制御するキー転写因子であり、その機能が針葉樹においても保存されている可能性があることである。この結果は、広葉樹においても針葉樹においても壁層構造の構築過程で類似した制御機構が関与することを示唆している。2つ目は、表層微小管の配向角度が異なる2種類の細胞 (表層微小管が細胞長軸に対して約90度に配向する細胞と平行に配向する細胞) では、表層微小管の動態が異なる可能性があることである。この結果は、S₁層およびS₂層を形成している細胞においては表層微小管の空間配置を維持する機構が異なることを示唆している。これら、本課題で得られた知見については国内や国際学会で発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takata Naoki, Tsuyama Taku, Nagano Soichiro, Baba Kei'ichi, Yasuda Yuko, Sakamoto Shingo, Mitsuda Nobutaka, Taniguchi Toru	4. 巻 108
2. 論文標題 Prior secondary cell wall formation is required for gelatinous layer deposition and posture control in gravi stimulated aspen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 725 ~ 736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15466	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 Toh Shigeo, Takata Naoki, Ando Eigo, Toda Yosuke, Wang Yin, Hayashi Yuki, Mitsuda Nobutaka, Nagano Soichiro, Taniguchi Toru, Kinoshita Toshinori	4. 巻 12
2. 論文標題 Overexpression of Plasma Membrane H ⁺ -ATPase in Guard Cells Enhances Light-Induced Stomatal Opening, Photosynthesis, and Plant Growth in Hybrid Aspen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 766037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.766037	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 高田直樹	4. 巻 38
2. 論文標題 (続)隣り合う細胞が辿る異なる運命 木部繊維は細胞壁の堆積量を感知する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 林木育種情報	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Jurca Manuela, Sjolander Johan, Ibanez Cristian, Matrosova Anastasia, Johansson Mikael, Kozarewa Iwanka, Takata Naoki, Bako Laszlo, Webb Alex A. R., Israelsson-Nordstrom Maria, Eriksson Maria E.	4. 巻 13
2. 論文標題 ZEITLUPE Promotes ABA-Induced Stomatal Closure in Arabidopsis and Populus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 829121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.829121	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 Hori Chiaki, Takata Naoki, Lam Pui Ying, Tobimatsu Yuki, Nagano Soichiro, Mortimer Jenny C., Cullen Dan	4. 巻 10
2. 論文標題 Identifying transcription factors that reduce wood recalcitrance and improve enzymatic degradation of xylem cell wall in Populus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78781-6	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 該当する

[学会発表] 計13件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takata Naoki, Tsuyama Taku, Nagano Soichiro, Baba Kei ' ichi, Yasuda Yuko, Sakamoto Shingo, Mitsuda Nobutaka, Taniguchi Toru
2. 発表標題 Prior secondary cell wall formation is required for gelatinous layer deposition and posture control in gravi-stimulated aspen.
3. 学会等名 International Conference on Plant Cell Wall Biology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hori Chiaki, Takata Naoki, Pui Ying Lam, Tobimatsu Yuki, Nagano Soichiro, Jenny C. Mortimer, Dan Cullen
2. 発表標題 Identifying transcription factors that reduce wood recalcitrance and improve enzymatic degradation of xylem cell wall in poplar.
3. 学会等名 International Conference on Plant Cell Wall Biology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takata Naoki, Tsuyama Taku, Nagano Soichiro, Baba Kei ' ichi, Yasuda Yuko, Sakamoto Shingo, Mitsuda Nobutaka, Taniguchi Toru
2. 発表標題 Prior secondary cell wall formation is required for gelatinous layer deposition and posture control in gravi-stimulated aspen.
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田直樹、津山濯、永野聡一郎、馬場啓一、安田悠子、坂本真吾、光田展隆、谷口亨
2. 発表標題 二次壁を形成しないポプラ木繊維は傾斜刺激に応答してG層を形成するか
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤良介、七里吉彦、永野聡一郎、武津英太郎、高田直樹
2. 発表標題 ロングリード次世代シーケンサーを用いたゲノム編集樹木のDNA変異パターン解析のスキーム構築
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Takata, Tatsuya Awano, Pui Ying Lam, Shiro Suzuki, Yuki Tobimatsu, Nobutaka Mitsuda, Natsumaro Kutsuna, Yusuke Yamagishi, Toru Taniguchi
2. 発表標題 Identification of transcription factor involving in S2 layer formation of secondary cell wall (SCW) in Populus.
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田直樹、粟野達也、Pui Ying Lam、飛松裕基、鈴木史朗、光田展隆、朽名夏磨、山岸祐介、永野聡一郎、谷口亨
2. 発表標題 S2層形成を制御する転写因子の探索と機能解析
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田直樹、小長谷 賢一、七里 吉彦
2. 発表標題 バイオテクノロジーを利用した樹木の形質改良
3. 学会等名 日本学術振興会植物バイオ第160委員会 第5期 第13回研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田直樹
2. 発表標題 細胞壁厚を定量化する手法の提案
3. 学会等名 第14回植物細胞壁研究者ネットワーク定例研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 TAKATA Naoki, Pui Ying Lam, SUZUKI Shiro, TOBIMATSU Yuki, KUTSUNA Natsumaro, TANIGUCHI Toru
2. 発表標題 Positive transcriptional feedback loop in secondary cell wall (SCW) formation in poplar.
3. 学会等名 IUFRO Tree Biotechnology 2019 Meeting -Forests, Technology & Society- (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田直樹、光田展隆、坂本真吾、馬場啓一、谷口亨
2. 発表標題 二次壁による裏打ち構造がG層の形成に必要である
3. 学会等名 植物細胞壁研究者ネットワーク定例研究会(2018)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田直樹, 馬場啓一, 光田展隆, 坂本真吾, 谷口亨
2. 発表標題 G層の形成には二次壁による裏打ち構造が必要である
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田直樹, 馬場啓一, 光田展隆, 坂本真吾, 谷口亨
2. 発表標題 ゲノム編集技術で作成したポプラ変異体を用いたあて材形成への新たな視点の提供
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 高田直樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 104
3. 書名 月刊 アグリバイオ 2021年7月臨時増刊号	

1. 著者名 Mikael Johansson, Takata Naoki, Cristian Ibanez, Maria E. Eriksson	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 245
3. 書名 Plant Circadian Networks: Methods and Protocols.	

〔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	永野 聡一郎 (Nagano Soichiro) (50753836)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	山岸 祐介 (Yamagishi Yusuke) (80770247)	北海道大学・農学研究院・助教 (10101)	

	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
研究協力者	粟野 達也 (Awano Tatsuya) (40324660)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	
研究協力者	ラム プイ イン (Lam Pui Ying)	京都大学・生存圏研究所・外国人特別研究員	
研究協力者	飛松 裕基 (Tobimatsu Yuki) (20734221)	京都大学・生存圏研究所・准教授 (14301)	
研究協力者	鈴木 史朗 (Suzuki Shiro) (70437268)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	
研究協力者	光田 展隆 (Mitsuda Nobutaka) (80450667)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長 (82626)	

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			
スウェーデン	Umea Plant Science Centre			
米国	Forest Products Laboratory	Joint BioEnergy Institute		