

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23753

研究課題名（和文）植物器官の力学的特性を調節する遺伝子群の網羅的探索

研究課題名（英文）Aiming for a comprehensive search for genes that regulate the mechanical properties of plant organs

研究代表者

高原 未友希（中田未友希）（Nakata, Miyuki）

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：60707579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：植物器官の力学特性の定量評価技術を高スループット化し、同方法を用いて、標準系統であるCol-0と比較してヤング率および木質組織の配置が異なる1系統を見出した。また、曲げ剛性やヤング率の系統内でのばらつきが系統間の違いの検出精度を下げる可能性も示唆された。そのため、既知の二次細胞壁形成に影響する遺伝子の変異体花茎を解析し、曲げ剛性やヤング率のばらつきの程度やそれによる検出の可否について検証した。予想しなかったことに、解析した変異体では曲げ剛性・ヤング率ともに変化が見られなかった。内部構造の解析から、木質部の面積の増加にもかかわらず木質部の断面二次モーメントへの影響が小さいことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得た力学特性が変化するシロイヌナズナ自然多型系統を標準系統であるCol-0と遺伝子多型解析することにより、力学特性および木質配置に関わる遺伝子同定につながることを期待される。また、十分な検出感度を得るためには力学特性のみではなく内部構造も同時に調べる必要性を見出したことは、今後の改良に向けた指針となるだろう。さらに、花茎の木質配置やその定量化にマイクロフォーカスX線CTを用いた方法を確立したこと、同方法がユーカリにも適用可能であることを見出したことは、今後の力学特性と木質配置を組み合わせたスクリーニング法の確立につながるるとともに、将来的に様々な植物種への展開が期待できる成果である。

研究成果の概要（英文）：Increase of the throughput of the quantitative evaluation technique for the mechanical properties of plant organs was achieved and by using the same method, we found one natural variation accession with a different Young's modulus and wood tissue arrangement compared to the standard accession Col-0. It was also suggested that the variation in Young's modulus within a strain may affect the detection accuracy of the difference between strains. Therefore, we analyzed the mutant of genes that affect the formation of known secondary cell walls, and verified the degree of variation in flexural rigidity and Young's modulus and whether or not they could be detected. Unexpectedly, there was no change in flexural rigidity or Young's modulus in the analyzed stems of the mutant. From analyses of the internal structure, it was found that the influence on the moment of inertia of the xylem is small despite the significant increase in the area of the xylem.

研究分野：植物形態発生学

キーワード：力学特性 曲げ剛性 ヤング率 木質配置 断面二次モーメント マイクロフォーカスX線CT

### 1. 研究開始当初の背景

植物の力学的特性は植物種や器官、生育環境によって様々に変化する。植物の力学的特性は細胞が外側に膨らもうとする膨圧の強さと、膨圧を抑えている細胞壁の性質に依って決まると考えられている。植物器官の力学特性を調節する分子メカニズム解明の糸口を掴むため、力学特性の調節に関わる遺伝子群の網羅的な探索を行う必要があるが、スクリーニングスケールで適用可能なハイスループットな解析方法の報告例は非常に少なかった。

### 2. 研究の目的

本研究では植物器官の力学的特性をハイスループットに定量評価する技術の開発を行い、遺伝的多型を含むシロイヌナズナ集団を材料に力学的特性の網羅的な定量評価を実施することを目的とした。

### 3. 研究の方法

クリープメーター Yamaden Rheoner II を用いた 3 点曲げ試験の方法を採用し、20 cm 以上に伸長したシロイヌナズナ花茎の基部 4 cm を用いて、台座間隔 3 cm で測定を行なった(図 1)。荷重-変位曲線の線形領域から傾きを算出し、曲げ剛性を算出した。また、同時に精密ノギスにより直径の測定も行い、ヤング率も算出した。データ解析によるこれらの値の算出過程を Python プログラムにより自動化し、スループットをスクリーニングに適用可能なレベルに改善した。また、以前に開発していた自由振動による解析手法と比較し、それらによって求められる力学量の関係を調べた。さらに、同自由振動による解析方法の適用範囲を広げるための改良も行なった。また、3 点曲げ試験のために作成したプログラムを圧縮試験用にも改変し、画像撮影と組み合わせ、力学的負荷に対して垂直な方向への伸展性を測定できる方法を確立した。

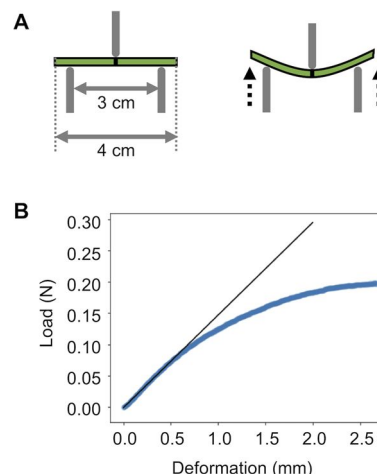


図 1 3 点曲げ試験の詳細

Nakata et al., Plant Biotech.  
2020 より抜粋

シロイヌナズナ自然多型系統 1001Genomes を用いたスクリーニングを、前述の方法により実施した。また、遺伝子組換え系統としては遠藤らが開発した AtTED プロモーターで木部関連遺伝子の初期木部細胞における発現を促進または抑制した系統を用いた (Endo et al., Plant Biotech. J., 2018)。また、既知の変異体として、二次細胞壁形成が髓細胞で異所的にみられることが知られている *wrky12* 変異体の解析も合わせて行った。

内部構造の解析には組織切片をモイレ染色することによってリグニン可視化する方法と、マイクロフォーカス X 線 CT で木部を可視化する方法を用いた。後者は Maeno and Tsuda, Bio-protocol, 2018 を参考にし、サンプルの造影剤や観察方法の検討を行なった。また、マイクロフォーカス X 線 CT には Shimazu InspeXio SMX-100CT を、3D 再構築には VGSTUDIO MAX ソフトウェア (VOLUME GRAPHICS) を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 3 点曲げ試験と自由振動解析法

1001 Genomes の 53 系統 137 個体に対し 3 点曲げ試験と自由振動法による解析の両方を実施した。3 点曲げ試験により算出された曲げ剛性 EI と自由振動法により見積もられた k の値の比較を図 2 に示す。k は 0.027~0.810 (N m<sup>-1</sup>) の範囲であり、EI は 5.18~148.16 (Nmm<sup>2</sup>) の範囲であった。このように一番小さい値と大きい値の間に約 30 倍の違いが検出され、k と EI とともに個体ごとに大きなばらつきを持つことがわかった。k と EI の間には強い正の相関が検出された (r<sup>2</sup> = 0.8582)。回帰方程式は、最小二乗法により EI = 154.8k+6.2 と推定された。推定精度を評価するため、3 点曲げ試験から得られた EI と k に基づいて予測された EI との間の相対誤差を計算した。相対誤差は、次の式を使用して計算した。

$$[\text{Relative error}] = \frac{[\text{Measured EI}] - [\text{Predicted EI}]}{[\text{Predicted EI}]}$$

相対誤差の分布を図 2B に示す。この実験では、サンプルの 50% が約 15% の誤差範囲内にあり、

75%が約 25%の誤差範囲内にあり、誤差範囲は全体のばらつきよりもはるかに小さいことがわかる。一方で、剛性  $k$  は曲げ剛性  $EI$  とは完全に一致しない要因としては、それぞれの方法に用いる花茎の長さが異なっていたことや、そのほかの実験条件やタイミングの違いによる花茎性状の変化、剛性  $k$  には剪断強度などの曲げ剛性以外の力学的な要因も含まれている可能性などが考えられる。

自由振動による方法をより短い花茎に適用できる改良も行なった。支持方法やマーク位置といった撮影方法の改良に加え、解析プログラムの改良も行なった。改良前のバージョンでは、減衰固有振動数は 30 Hz 未満であったところ (Nakata et al. Front Plant Sci, 2018) 改良バージョンでは、減衰固有振動数は 30~50 Hz であった (図 3)。サンプリング周波数に対する減衰固有振動数の比率 (30-50 : 240) は、ナイキスト-シャノンサンプリング定理による周波数分析を基準にすると妥当であると判断された。これらの成果を Nakata et al., Plant Biotech, 2020 において発表した。

### (2) 3点曲げ試験によるスクリーニング

1001 Genomes の系統および AtTED プロモーター遺伝子組換え系統を用いて、曲げ剛性・ヤング率を算出し、うち一つの系統について、標準系統である Col-0 との間にヤング率に違いが見られたことから、組織学的解析による比較を行なった。その結果、当該系統と Col-0 系統との間に木質組織の配置の違いを見出した。一方、各系統内でのばらつきの程度と、系統間での違いの検出の可否について調べたところ、系統内でのばらつきが無視できないほど大きく、曲げ剛性とヤング率だけを基準にすると、スクリーニングで実施している少数サンプルでの比較では、十分に系統間の力学特性の違いを検出することができていないことが予想された。そこで次に、木質部の変化がすでに報告されている *wrky12* 変異体と、*AtTED4* プロモーター遺伝子組換え系統のうち木部二次細胞壁形成制御遺伝子である *MYB46* 遺伝子および *MYB83* 遺伝子の過剰発現系統を用いて、より詳細な解析を行なった。

### (3) *wrky12* 変異体、*pAtTED4::MYB46*、*pAtTED4::MYB83* 過剰発現系統の解析

これら系統に対して3点曲げ試験を実施し、曲げ剛性およびヤング率を算出した。その結果、いずれの系統についても、野生型との間に曲げ剛性の統計的に有意な違いが見られなかった。ヤング率については、*pAtTED4::MYB83* の1系統でのみ46%の増加が見られた。*wrky12* 変異体について、顕著な木部の変化が観察されるにも関わらず、予想に反して、曲げ剛性、ヤング率ともに変化が見られなかったことから、横断切片をモイレ染色し、内部構造の観察と、木質化した部分の断面二次モーメント定量を試みた。その結果、木質部の断面二次モーメント ( $I_{xylem}$ ) には、Col-0 と *wrky12* 変異体間で統計的に有意な違いは見られなかったが、木質部の断面積 ( $A_{xylem}$ ) に対する  $I_{xylem}$  の相対値 ( $I_{xylem}/A_{xylem}$ ) は *wrky12* 変異体では Col-0 と比較して低い値を示す個体が多いことがわかった。これは、同じ木質部の断面積を持つ Col-0 と *wrky12* 変異体を比較した場合、*wrky12* 変異体では断面二次モーメントの値が小さいことを示している。これらの結果の一部を日本植物学会第 84 回大会(仲尾ら、2020 年)にて発表した。

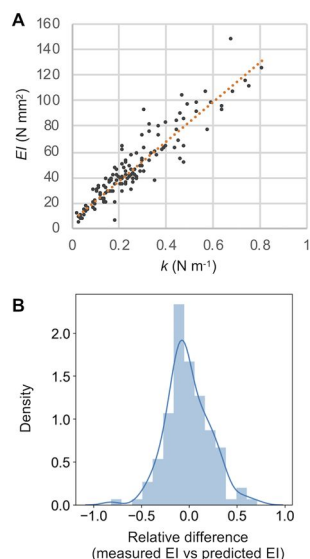


図 2 剛性  $k$  と曲げ剛性  $EI$  の比較  
Nakata et al., Plant Biotech, 2020 より抜粋

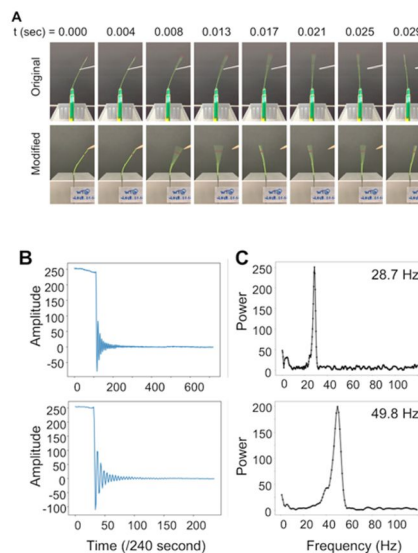
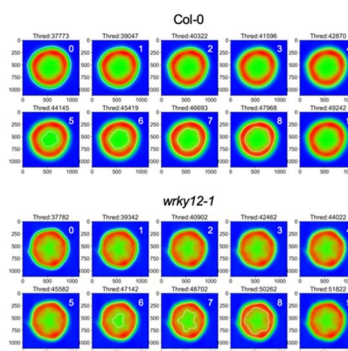


図 3 自由振動による方法の改良  
Nakata et al., Plant Biotech, 2020 より抜粋

#### (4) マイクロフォーカス X 線 CT によるシロイヌナズナ花茎断面構造の観察

力学特性の変化を検出するには、曲げ剛性やヤング率とともに、内部構造の違いも合わせて考える必要があることが示唆された。切片を用いた方法は得られるデータの解像度は高いものの、軸に完全に垂直な横断面をとれているか証明する方法がないため、正確な断面二次モーメントの算出と、系統間の比較が困難であること、またスループットがそれほど高くないという問題があった。そこで、マイクロフォーカス X 線 CT による木質部の可視化と、3D 再構築画像からの軸に垂直な横断面の抽出を試みた。その結果、ヨウ素およびタンゲステンを含む染色液で木質部が可視化できることを見出した。3D 再構築画像から軸に垂直な横断面の抽出し、Col-0 と *wrky12-1* 変異体の比較を行なった結果を図 4 に示す。グレーバリュー閾値を様々に設定したのち、それぞれの領域の面積と断面二次モーメントを算出したところ、Col-0 と *wrky12-1* 変異体の違いについて、面積と断面二次モーメントで異なる結果となり、*wrky12* 変異体で面積が大きい閾値において、断面二次モーメントには統計的に有意な違いが見られなかった。この結果は前項で調べたモイレ染色の結果と一致しており、マイクロフォーカス X 線 CT による木質部の可視化と断面二次モーメント算出結果が妥当であると結論づけた。この結果を第 63 回日本植物生理学会年会(中田ら、2022 年)にて発表した。また、本方法をユーカリ側枝に適用し、木質部の二次元分布の定量化の試みを進めており、その結果を含む内容の原稿が 2022 年度日本建築学会大会に採択されており、2022 年 9 月に発表予定である。このように、シロイヌナズナ以外の植物にもこの方法が適用可能であることを確認しており、今後さらに様々な植物種への展開が期待できる。



#### (5) 圧縮試験による負荷と垂直方向への伸展性の解析

物体は一般的に圧縮力を適用した場合には負荷と同じ軸方向では短くなり、垂直な方向については伸びる(引張力を適用した場合にはこの逆の現象が起こる)。この現象はポアソン効果と呼ばれており、それらの比率はポアソン比と呼ばれる。本研究ではこの効果を利用し、組織・器官の伸展性を調査する方法を考案した。本方法を活用し、マメ科植物の葉枕と、その他軸性器官の伸展性を調査した結果を、Takahara et al., bioRxiv, 2022 にて公開した。本方法は、引張試験の適用が難しい、太くて短い器官の伸展性の調査に活用できる点で、学術的な意義があるであろう。

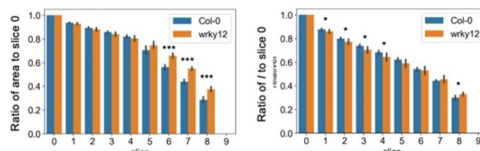


図 4 X 線 CT による木質部の解析  
下左図は閾値よりグレーバリュー値が高い領域の面積を、下右図は断面二次モーメントを表す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakata Miyuki T., Nakao Mao, Denda Asuka, Onoda Yusuke, Ueda Haruko, Demura Taku	4. 巻 37
2. 論文標題 Estimating the flexural rigidity of Arabidopsis inflorescence stems: Free-vibration test vs. three-point bending test	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 471 ~ 474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.20.1214a	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 Takahara Masahiro, Tsugawa Satoru, Sakamoto Shingo, Demura Taku, Nakata Miyuki T	4. 巻 -
2. 論文標題 Pulvinar Slits: Cellulose-deficient and De-esterified Homogalacturonan-rich Structures in a Legume Motor Cell	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2022.03.10.483846	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仲尾真男, 中田未友希, 出村拓
2. 発表標題 シロイヌナズナ花茎における細胞壁の変化がヤング率に与える影響
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 中田未友希, 仲尾真男, 佐野亮輔, 出村拓
2. 発表標題 マイクロX線CTを用いたシロイヌナズナ花茎の組織別断面二次モーメントの算出
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中田未友希, 出村拓
2. 発表標題 ユーカリの側枝形状を決定する力学的メカニズムの解析
3. 学会等名 2022年度日本建築学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------