

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03049

研究課題名（和文）植物細胞壁S2層形成の制御メカニズム

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of S2 layer formation of the cell wall in plants

研究代表者

津山 濯（Tsuyama, Taku）

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：40786183

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：植物細胞壁は木材の物性やバイオマスの利用性を決定づける。植物細胞壁は多層構造を持ち、中でも二次壁S2層は物性に最も大きな影響を与えているが、S2層形成制御機構に関する知見はほとんど無い。

細胞壁形成を追った解析から、モウソウチク繊維細胞のS2層形成時にフェルロイルアラビノキシランが活発に堆積すると示唆された。キシランのフェルロイル化酵素BAHD1のモウソウチクホモログ、PeBAHD1;1-1;3をクローニングした。イネ転写因子ライブラリーの中から、PeBAHD1;1-1;3の発現制御を行う37の転写因子を発見した。二次壁形成に伴い発現するものもあり、これらはS2層形成制御に関与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹木細胞壁のS2層は木材の力学的強度を左右すると知られているが、その形成制御メカニズムは不明である。本研究はS2層形成時に堆積が活発になるヘミセルロースに着目し、その生合成制御機構からS2層形成制御機構に迫ったものである。本研究で発見された遺伝子はS2層形成制御への関与が期待され、今後更なる研究により、S2層形成制御メカニズムの解明につながる可能性がある。

植物細胞壁の多層構造制御は、様々な力学特性を持った木材や全く新たな植物素材の創成に展開し得る。本研究成果は、植物の多層構造形成メカニズム解明に向けた糸口になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Plant cell walls determine the physical properties of wood and the availability of biomass. Plant cell walls have a multilayered structure, with the secondary wall S2 layer having the greatest influence on physical properties. However, little information is available on the regulatory mechanism of S2 layer formation.

Immunohistochemical analyses of specimens with different cell wall formation suggested that feruloyl arabinoxylan is actively deposited during S2 layer formation in vascular fiber cells in moso bamboo. We cloned PeBAHD1;1-1;3, homologs in moso bamboo of the xylan feruloylation enzyme BAHD1. From the rice transcription factor library, we found 37 transcription factors that activate PeBAHD1;1-1;3 expression. Some of the transcription factors found were expressed during secondary wall formation, and these may be involved in the regulation of S2 layer formation.

研究分野：木質科学

キーワード：細胞壁 二次壁 S2層 ヘミセルロース

### 1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁は木材の物性やバイオマスの利用性を決定づける。植物細胞壁は外側から一次壁、二次壁と分けられ、さらに二次壁の中でも多層構造を持つ。木材の力学的特性を決定づけるのは細胞壁の中でも、特に大部分を占める二次壁中層 ( $S_2$  層) である。この壁層は、セルロース分子鎖の集合体であるセルロースマイクロフィブリルの配向がランダムな一次壁、緩傾斜配向を持つ二次壁外層 ( $S_1$  層) や二次壁内層 ( $S_3$  層) とは異なり、急傾斜のマイクロフィブリル配向を持つ (図 1)。この  $S_2$  層のマイクロフィブリル傾角は、木材の強度と密接に関連していることが知られている (Cave and Walker 1994; Yang and Evans 2001; Kijidani and Kitahara 2009)。これまで道管二次壁形成を制御する VND や木部繊維二次壁形成を制御する NST といった転写因子が発見されてきている (Kubo et al. 2005; Mitsuda et al. 2007; Zhong et al. 2007)。これら NAC ドメインを持つ転写因子は VNS ファミリーを形成しており、様々な植物種に保存され、二次壁形成を制御していることが明らかになってきている。しかしこれまで二次壁中での劇的な壁層変化についての制御メカニズムはほとんど解明されていなかった。

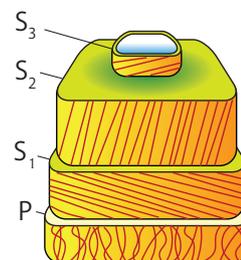


図1 植物細胞壁の構造  
P; 一次壁,  $S_1$ ; 二次壁外層,  $S_2$ ; 二次壁中層,  $S_3$ ; 二次壁内層。

### 2. 研究の目的

本研究では様々な角度から  $S_2$  層形成に関わる因子を探索することで、 $S_2$  層形成制御メカニズムの解明に迫ることを目的とした。 $S_2$  層形成時に特異的に堆積するヘミセルロースを詳細な解析により明らかにし、その生合成関連遺伝子の発現制御機構に迫ることを試みた。

$S_1$  層から  $S_2$  層または  $S_2$  層から  $S_3$  層形成への移行時に焦点を当てて解析するために、細胞特異的な遺伝子発現解析手法の確立が必須である。そこで本研究では光化学反応を用いた、細胞組織特異的な遺伝子発現解析手法を、植物組織へ応用することを目指した。

また二次壁の肥厚および  $S_2$  層セルロースマイクロフィブリル配向に、オーキシンやサイトカニンなどの植物ホルモンが関与している可能性も報告されている (Ranocha et al. 2010; Kijidani et al. 2014; Kijidani et al. 2016)。そこで各壁層形成段階における植物ホルモン量の変動に関する知見を得ることを試みた。

さらに二次壁生合成能が欠損した変異体を用いるなどして、 $S_2$  層形成を制御する候補遺伝子を絞り込むことができる。上記で絞り込んだ他の遺伝子も含めた、各遺伝子の変異体の作出と解析により、 $S_2$  層形成を制御する候補遺伝子の機能解析を行うことを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) モウソウチクにおけるヘミセルロース堆積の変化を細胞壁形成段階ごとに詳細に分析した。細胞壁形成段階が異なるモウソウチク当年稈を採取し、複数の抗糖鎖モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法により、細胞壁層への各種ヘミセルロースの堆積過程を明らかにした。

(2) モウソウチクにおけるフェルロイル化関連遺伝子の発現制御機構に迫った。キシランのフェルロイル化には BAHD1 が関与することが知られている (de Souza et al. 2018)。モウソウチク BAHD1 ホモログを探索、クローニングし、プロモーター領域を取得した。モウソウチク BAHD1

の機能解析のため、過剰発現体を作成し表現型を観察した。また、二次壁生合成に関与すると考えられる NST や MYB のモウソウチクにおけるホモログを探索し、クローニングした。これらの遺伝子が BAHD1 遺伝子の発現に与える影響を、イネプロトプラストを用いたトランジェントアッセイにより検証した。さらに、イネの転写因子から成るライブラリーを用いたハイスループット酵母ワンハイブリッドスクリーニング法により、モウソウチク BAHD1 遺伝子プロモータに結合する転写因子の探索を行った。

(3) 光化学反応を利用した組織特異的発現解析法を、植物組織へ応用することを試みた。この手法は研究分担者である京都大学の沖らが既に哺乳類において確立している (特願 2019-094216; Honda et al. 2021; Honda et al. 2022)。まずはスライドグラス上での RNA の逆転写に適した切片の種類および固定時間を検討した。次に、光化学反応による組織特異的な発現解析を試みた。

(4) 細胞壁形成段階が異なるモウソウチク当年稈の異なる節間を用いて、各種植物ホルモン量の定量を行った。細胞壁形成が進んでいる稈の下部、および細胞壁形成段階が初期の組織を多く含む稈の上部から、4 種類の節間を採取し、各種植物ホルモン量を定量した。

(5) 木部繊維または放射柔細胞の二次壁生合成能が欠損したポプラ VNS 多重変異体を用いて、RNAseq による発現解析を行い、二次壁生合成関連遺伝子を絞り込んだ。VNS 四重変異体は、木部繊維および放射柔細胞の二次壁がほぼ完全に無くなるのが分かっている (Takata et al. 2019)。木部繊維の二次壁が薄くなる VNS 三重変異体も加え、これら変異体の発現解析により二次壁生合成関連遺伝子を明らかにした。またいくつかの候補遺伝子に関してゲノム編集ポプラを作成し、植物体を長期間生育させその表現型を観察した。さらに、S<sub>2</sub>層形成制御に関連すると絞り込まれたモウソウチクの転写因子を、過剰発現または発現抑制させたイネの作出を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 様々な細胞壁形成段階のモウソウチク試料を、免疫蛍光標識法または免疫電子顕微鏡法に供し、各種ヘミセルロースの堆積過程を明らかにした。その結果、一次壁形成中の主要なヘミセルロースは  $\beta$ -(1,3; 1,4)グルカンとキシログルカンであることが明らかになった。キシログルカンはイネ科植物では一次壁にほとんど含まれないとされるが、成長段階ごとの詳細な観察から、一次壁形成直後は広く分布し、その後シグナルが弱くなっていくことが明らかとなった。

イネ科植物の一次壁および二次壁で主要なヘミセルロースとして知られるアラビノキシランは、一次壁形成段階では堆積しておらず、二次壁形成が始まった細胞の細胞壁で堆積が見られるようになった。このことからアラビノキシランの生合成は二次壁生合成制御下にあると考えられる。

さらにアラビノキシランにフェルラ酸が結合したフェルロイルアラビノキシランの堆積は、アラビノキシランよりやや遅れ、細胞壁の内腔側に見られた。免疫電子顕微鏡法による詳細な観察の結果、フェル

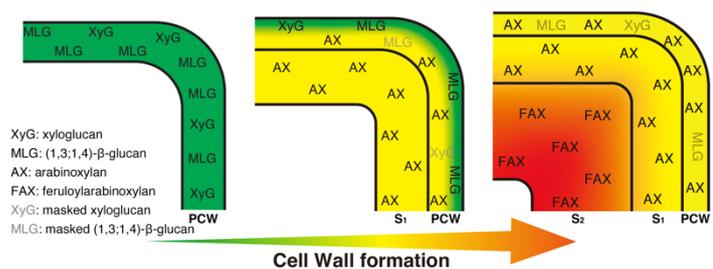


図2 モウソウチクにおける細胞壁層形成とヘミセルロースの堆積  
二次壁 S<sub>2</sub>層形成が開始された後 PCW; 一次壁, S<sub>1</sub>; 二次壁外層, S<sub>2</sub>; 二次壁中層

に S<sub>2</sub> 層に特に強く見られた。このことから、フェルロイルアラビノキシランの生合成は二次壁生合成制御下にあるだけでなく、S<sub>2</sub> 層生合成制御下にあることが示唆される。これらの研究成果は論文として発表した (図 2; Munekata et al. 2022)。

(2) キシランのフェルロイル化には BAHD1 が関与することが知られている (de Souza et al. 2018)。系統樹解析によりモウソウチクにおける BAHD1 ホモログが 3 つ存在することが明らかになった。このモウソウチク BAHD1 ホモログを PeBAHD1;1-1;3 と名付け、クローニングした結果、PeBAHD1;3 の CDS 配列はデータベースとは一部異なることが明らかになった。3 つの遺伝子の CDS 配列は類似性が高かったが、UTR の配列が異なったことから、3 つの遺伝子は独立した遺伝子と考えられる。次に、PeBAHD1;1-1;3 のプロモーター領域を取得した。その結果、塩基配列は大きく異なり、この点からもこの 3 つの遺伝子は独立した遺伝子であることが示唆される。

PeBAHD1;1-1;3 の機能解析に向け、PeBAHD1;1-1;3 の過剰発現イネおよびシロイヌナズナを作成した。このうち PeBAHD1;1 のみ T1 世代まで生育させたが、特徴的な表現型は見られなかった。今後、PeBAHD1;2、および PeBAHD1;3 の過剰発現体についても解析を進める必要がある。

二次壁生合成に関与すると考えられる NST や MYB のモウソウチクにおけるホモログを探索したところ、4 つの NST ホモログが見つかり、うち 2 つのクローニングに成功した。また二次壁生合成に関与すると予想される PeMYB35 と PeMYB37 (Yang et al. 2019) のうち、二次壁生合成が活発なモウソウチク当年稈で発現が見られた PeMYB35 のクローニングに成功した。イネプロトプラストを用いたトランジェントアッセイにより、PeBAHD1;1 プロモーターに対する、二次壁生合成関連候補転写因子の活性を測定した。その結果、候補として用いた PeNST3、PeNST4、PeMYB35 はいずれも単独では転写活性化を行わなかったが、転写活性化因子である VP16 を付加した PeMYB35 は PeBAHD1;1 プロモーターに対する転写活性化を示した。このことから、PeMYB35 は他の転写活性化因子の存在下で、PeBHAD1;1 の転写を活性化させる可能性が考えられる。

PeBHAD1 の発現制御を行う転写因子を網羅的に探索するため、イネの転写因子から成るライブラリーを用いたハイスループット酵母ワンハイブリッドスクリーニング法を行った。その結果、37 の転写活性化因子が見つかった。このうち BAHD1;1-1;3 に共通して転写活性化を行うと考えられる遺伝子は 3 つだけであった。この結果からも、3 つの遺伝子が独立した遺伝子であることが示唆される。PeBAHD1;1-1;3 の発現解析の結果、二次壁生合成が活発になる前後で発現量は変化していなかった。PeBAHD1 は複数の転写因子により発現制御され、フェルロイルアラビノキシラン生合成以外の代謝にも関与しているのかもしれない。PeBAHD1;1-1;3 のうち、二次壁形成が活発な稈で最も発現量が多かったのは PeBHAD1;3 であった。PeBAHD1;3 の転写活性化に関わる 15 の転写因子の発現パターンを調べたところ、いくつかの転写因子が二次壁生合成と共に発現が上昇していた。これらの転写因子は二次壁生合成に関与すると考えられ、特に S<sub>2</sub> 層形成に関与することが期待される。今後これらの転写因子の機能解析を進めることで、S<sub>2</sub> 層形成制御機構解明にさらに迫ることが重要である。

(3) 新たな組織特異的な発現解析法の植物組織への応用を試みた。まずはスライドガラス上での RNA の逆転写に適した切片の作製法および固定時間を検討した。モウソウチク凍結横断面切片を用いて条件検討を行った結果、PFA による固定を行わない方が、得られる逆転写産物は多くなった。切片 1 枚からも、スライド上での逆転写反応を行うことで、検出可能な逆転写産物が得

られた。次に UV 照射の有無により *in vitro* 転写反応の進行を制御することを試みた。モウソウチク凍結横断面切片を用いて逆転写反応を行い、UV 照射領域を変えて組織別に *in vitro* 転写反応を行ったところ、それぞれ転写産物のライブラリー調製に成功した。今後それぞれのシーケンス解析を進めることで、組織特異的な発現解析が可能か検証する必要がある。

(4) 細胞壁形成段階が異なるモウソウチク当年稈の異なる節間を用いて、オーキシンおよびアブシシン酸量の定量を行った。細胞壁形成が進み細胞壁の肥厚が活発な繊維細胞を持つ稈の下部、および細胞壁形成段階が初期の組織を多く含む稈の上部から、4 種類の節間をそれぞれ 3 個体から採取した。抽出した植物ホルモン量を定量比較したところ、上部の節間と下部の節間で有意にオーキシンおよびアブシシン酸量が異なった。このことから細胞壁層の形成制御にオーキシンやアブシシン酸が関与する可能性が考えられるが、細胞分裂および分化、ならびに細胞伸長成長など、複数の現象に関与している可能性も考えられる。細胞壁層形成への植物ホルモンの関与については、今後更なる詳細な検討が必要とされる。

(5) 木部繊維または放射柔細胞の二次壁生合成能が欠損したポプラ VNS 多重変異体を用いて、RNAseq による発現解析を行った。VNS 三重変異体は木部繊維の二次壁が薄くなり、VNS 四重変異体は木部繊維および放射柔細胞の二次壁がほぼ完全になくなる。これらの変異体を用いて RNAseq による網羅的な発現変動を明らかにした。その結果、二次壁生合成関連遺伝子の発現が VNS 多重変異体で抑制されていた。一方で、四重変異体ではオーキシン応答関連遺伝子やフラボノイド生合成関連遺伝子の発現が上昇しており、二次壁欠損による成長や代謝の変化を表していると考えられる。これらの研究成果は論文として発表した (Takata, Tsuyama et al. 2021)。

上記 RNAseq の結果から新たに多くの二次壁生合成関連候補遺伝子を絞り込むことに成功し、一部の遺伝子についてゲノム編集により欠損ポプラを作出した。植物体を再生し、長期間生育させた 1 つの候補遺伝子変異体では、成長が大きく阻害される表現型が観察されたものの、木部繊維の細胞壁層に明確な差異は認められなかった。今後他の候補遺伝子の欠損ポプラについても表現型を解析し、二次壁生合成に与える影響について検証する必要がある。

S<sub>2</sub> 層形成制御に関連すると絞り込まれたモウソウチクの転写因子を、過剰発現あるいは発現抑制させた組換え体イネの作出を試みた。何度か試みたが、組換え体の作出効率は低かった。その他の候補遺伝子も含め、今回発見された候補遺伝子の機能解析に向けて、今後更なる研究が必要とされる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Munekata Noriaki, Tsuyama Taku, Kamei Ichiro, Kijidani Yoshio, Takabe Keiji	4. 巻 256
2. 論文標題 Deposition patterns of feruloylarabinoxylan during cell wall formation in moso bamboo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-022-03970-8	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 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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 宗像典哲、津山 濯、雉子谷佳男、高田直樹、坂本真吾、光田展隆
2. 発表標題 モウソウチクにおけるフェルラ酸転移酵素候補遺伝子PeBAHD1の発現制御に関与する転写因子の探索 .
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Noriaki Munekata, Taku Tsuyama*, Ichiro Kamei, Yoshio Kijidani, Keiji Takabe
2. 発表標題 Deposition patterns of hemicelluloses during cell wall formation in moso bamboo.
3. 学会等名 7th International Conference on Plant Cell Wall Biology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Takata, Taku Tsuyama, Soichiro Nagano, Kei ' ichi Baba, Yuko Yasuda, Shingo Sakamoto, Nobutaka Mitsuda, Toru Taniguchi
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 7th International Conference on Plant Cell Wall Biology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宗像典哲、津山 濯、雉子谷佳男
2. 発表標題 モウソウチクにおけるフェルロイルアラビノキシラン生合成関連候補遺伝子PeBAHD1のクローニング。
3. 学会等名 2021細胞壁ネット
4. 発表年 2021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 Naoki Takata, Taku Tsuyama, Soichiro Nagano, Kei ' ichi Baba, Yuko Yasuda, Shingo Sakamoto, Nobutaka Mitsuda and Toru Taniguchi
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回植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宗像典哲、津山 濯、雉子谷佳男
2. 発表標題 モウソウチクにおけるフェルロイルアラビノキシラン生合成関連候補遺伝子PeBAHD1のクローニング及び発現解析.
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 宗像典哲、津山 濯、亀井一郎、雉子谷佳男、高部圭司
2. 発表標題 モウソウチク細胞壁形成過程におけるヘミセルロースの堆積
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021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	雉子谷 佳男  (Kijidani Yoshio)  (10295199)	宮崎大学・農学部・教授   (17601)	
研究分担者	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)	
研究分担者	沖 真弥  (Oki Shinya)  (90452713)	京都大学・医学研究科・特定准教授   (14301)	

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	高田 直樹  (Takata Naoki)  (90605544)	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    (82105)	

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