

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32503

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380103

研究課題名(和文)レーザーマイクロダイセクション法による樹木細胞壁の形成機構の局所解析

研究課題名(英文)Local analysis of wood cell wall formation by using laser microdissection

研究代表者

渡邊 宇外 (WATANABE, Ugai)

千葉工業大学・工学部・准教授

研究者番号：70337707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：樹木形成層における細胞壁形成の分子機構を明らかにすることを目的とし、細胞試料の局所採取および微量発現遺伝子の定量解析の方法について検討した。樹木形成層内の細胞拡大領域および細胞分裂領域それぞれから細胞試料を採取でき、発現遺伝子を抽出することができた。さらに、その遺伝子発現量を高精度で定量することができた。得られた結果から、樹木細胞壁形成に関連するタンパク質の発現構成比は形成層内で変動することが示され、このことが細胞壁形成の分子機構に影響を与えたと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the molecular mechanism of cell wall formation in the cambium of tree, the procedures for local sampling of cambial cells and quantitative analysis of the expressed genes were investigated. The cells could be locally collected from the regions of cell division and cell expansion in the cambium. A trace of genes expressed in each region could be extracted and their amounts could be determined with high accuracy. The results obtained indicated that the expression ratio of proteins involved in wood cell wall formation varied within the cambium, which affected the molecular mechanism of cell wall formation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：樹木形成層 レーザーマイクロダイセクション 定量PCR解析

1. 研究開始当初の背景

樹木細胞の重要な構造的特徴のひとつは、一次細胞壁に加えて二次細胞壁を有し、厚壁化することである。樹木細胞壁の力学特性は、樹木の機械的支持機能や水分通道機能を直接的に担っている。また、非常に特徴的な木材の諸物性の発現は、この細胞壁構造に大きく依存する。樹木細胞壁は、形成層における細胞分化の過程で段階的に形成されるが、その分子レベルでの生理機構については未解明の点が多い。特に、細胞壁の主要構成成分でセルロースマイクロフィブリルについて、その配向方向が一次細胞壁形成から二次細胞壁形成に移行する過程で変換する機構については、未だ明らかとなっていない。樹木の形成層は、非常に狭い領域である。その内部で起こる生理機構を詳細に解析するためには、関連する遺伝子やタンパク質の発現の定量解析を局所的に行うことが必要である。そのためには、樹木形成層内からの局所的な細胞試料の採取が、最初の重要課題であった。また、抽出される生体分子が非常に微量であることを考慮することが求められた。樹木形成層における細胞壁形成の生理機構の詳細な解析に向け、「局所的な細胞試料の採取」ならびに「微量発現遺伝子の定量解析」の2点について、方法の確立が必要であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、樹木形成層における細胞壁形成機構の解析手法の確立を目的とし、レーザーマイクロダイセクション(LMD)による形成層細胞の局所採取を行い、その中に含まれる発現遺伝子の定量解析を行った。解析の対象としては、セルロースマイクロフィブリルの堆積制御を担うとする表層微小管の形成層内における動態に注目し、その構成タンパク質であるチューブリンの遺伝子とした。遺伝子発現解析方法の検討においては、従来型のリアルタイム定量PCRに加え、新たな方法としてデジタルPCRによる微量遺伝子発現解析を採用し、その有効性を評価した。

3. 研究の方法

(1) スギ形成層で発現するチューブリンの配列解析

(独) 森林総合研究所の苗畑に生育するスギ(*Cryptomeria japonica*) 個体に由来するcDNAライブラリーのEST情報をもとに、既知のチューブリンと類似性の高いcDNAクローンの塩基配列を解析した。cDNAの塩基配列から予測されるアミノ酸配列をもとに、チューブリン保存ドメインなどについて解析を行った。

(2) スギ苗木の生育および形成層帯の凍結固定

スギの苗木を人工光室内(明期:14h・25℃、暗期:10h・20℃)で生育させた。この苗木から、形成層帯を含む小片を採取し、液体フ

レオン中で急速凍結固定させた。

(3) レーザーマイクロダイセクションによるスギ形成層細胞の局所採取

急速凍結固定させた小片試料を凍結包埋したのち、凍結マイクロトーム(CM3050 S, Leica Microsystems)を用いて20μm厚の凍結柱目切片を作製した。40枚の切片を凍結乾燥させ、専用のスライドガラスに貼り付け、LMD(LMD7000, Leica Microsystems)を用いて形成層領域から局所的に細胞試料を採取した。採取は、細胞分裂領域と細胞拡大領域の2箇所について行った。

(4) スギ・チューブリン遺伝子の形成層内における発現解析

採取された細胞試料から全RNAを抽出し、cDNAを合成した。これをテンプレートとし、3.1で同定されたスギ・チューブリン遺伝子について、局所的に発現解析を行った。発現量の定量解析は、従来型の定量PCR解析(StepOne™ system, Applied Biosystems)およびデジタルPCR(QX200, Bio-Rad Laboratories)により行った。

4. 研究成果

(1) スギ・チューブリンの配列解析

スギEST情報をもとに、既知のチューブリンと類似性の高い9つの完全長cDNAクローンを単離し、これらの塩基配列について解析を行った。Open Reading Frameは、1335~1356bpであった。BLAST解析の結果から、9つの完全長cDNAのうち、5つは5種類のαチューブリンを、4つは3種類のβチューブリンをそれぞれコードしていることが明らかとなった。これらcDNAから予想されるアミノ酸配列のいずれにおいても、重要な保存ドメイン、すなわちα/β domain interface、β/α domain interface、nucleotide binding siteが確認された。

(2) LMDによる細胞の局所採取

図1に、LMDによるスギ形成層細胞の採取を示す。植物細胞は細胞壁を有するため、LMDによる試料切削では、動物細胞の場合と比べてより高いレーザー照射エネルギーが必要であった。樹木形成層の場合、平均出力約0.8mWでレーザー照射することにより、比較的良好に細胞試料を採取することができた。これよりも低い平均出力では細胞試料の切削ができず、また大きい平均出力では、切削時における試料損傷が大きかった。図1に示すとおり、スギ形成層内の細胞分裂領域および細胞拡大領域それぞれにおいて、分割しながら試料採取することができた。

(3) デジタルPCRによる遺伝子発現定量解析

LMDにより採取された形成層細胞試料から全RNAを抽出後、cDNAを合成し、従来型のリアルタイム定量PCR解析を行った。内

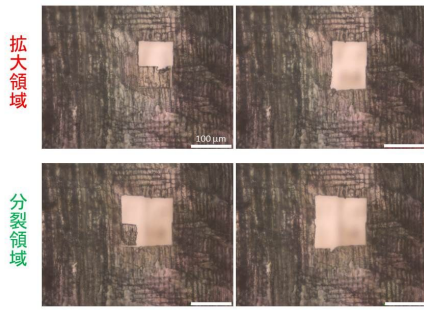


図1. LMDによるスギ形成層細胞試料の採取.

在性コントロールとして18S rRNAの発現量を調べたところ、40サイクルまでのPCR反応過程で、おおよそ26サイクルで定量可能なDNA増幅量を得ることができた。5段階の10倍希釈系列のcDNA溶液を作製し、最薄濃度における18S rRNAの含有量を調べたところ、おおよそ37サイクルで定量可能なDNA増幅量を得ることができた。この希釈系列から作成された検量線については、 $R^2 = 0.99$ を下回る場合があった。検量線プロットから求められるPCR効率を調べると、それが120%を超える場合があった。ターゲットであるスギ・チューブリン遺伝子の発現量を調べたところ、最も発現量が多い遺伝子については約35サイクルで定量可能な増幅量を得ることができ、その他の遺伝子は、37サイクル以上でなければ定量可能な増幅量を得ることができなかった。これらの結果から、LMDにより樹木形成層から局所的に採取された細胞試料に対して、従来型のリアルタイム定量PCR解析では、その形成層内部での局所的な遺伝子発現量を十分な精度で定量することが困難であることが示された。

従来型のリアルタイム定量PCR解析に供したcDNA試料について、デジタルPCRによるスギ・チューブリン遺伝子の発現解析を行った。この解析方法により、1 μ lのPCR反応液中に数コピー程度存在するチューブリン遺伝子の検出を行うことができた(図2)。また、この方法で検出された発現遺伝子コピー数については、コピー数が非常に少ない場合においても、その結果の再現性が高いこと

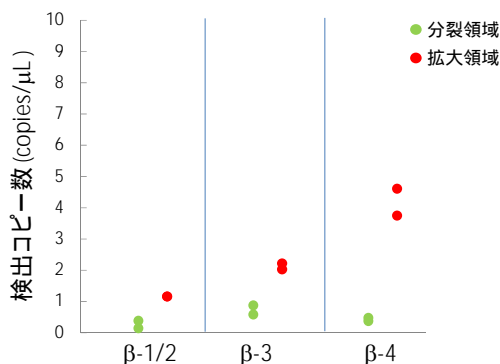


図2. スギ・ β チューブリン遺伝子の検出コピー数.

が示された。これらの結果から、デジタルPCRによる遺伝子発現解析は、樹木形成層における局所的な微量発現遺伝子の定量解析において有効に機能すると考えられた。

スギ形成層内での α チューブリン遺伝子の発現量比(18S rRNAの発現量に対するチューブリン遺伝子の発現量の比)を見ると、3つの遺伝子では、細胞分裂領域より細胞拡大領域で発現量が多かった(図3)。これは、チューブリンの発現は、活動中の細胞であっても、細胞間で常に一定ではなく、分化ステージ等に依存してその発現量は変動することを示している。また、スギ・ α チューブリン遺伝子には、形成層帯で発現が認められないものがあり、さらに、発現はするものの、局所的に発現量に差がないものがあることが明らかとなった。スギ・ β チューブリン遺伝子についても、細胞分裂領域よりも細胞拡大領域でその発現量が多かった(図3)。 α チューブリン遺伝子と β チューブリン遺伝子の間で比較すると、前者のほうが形成層内での発現量が多い傾向が示された。

スギ形成層内の細胞拡大領域と細胞分裂領域の間で、 α チューブリン遺伝子の発現構成比が異なることが明らかとなった(図3)。例えば、細胞拡大領域における α -1と α -2の発現構成比はおおよそ1.0:1.1であったが、細胞分裂領域では、おおよそ1.0:1.9となり、 α -2の発現量が多くなった。また、細胞拡大領域における β -1/2と β -4の発現構成比はおおよそ1.0:1.6であったが、細胞分裂領域では、おおよそ1.0:3.6となり、 β -4の発現量が顕著に多くなった。 β -4のアミノ酸配列は、他の β チューブリンのそれよりもやや短かった。特にC末端領域のアミノ酸配列が短く、他の配列で見られるグルタミン酸の配列が欠けていた。これより、 β -4がコードするチューブリンは、翻訳後にポリグルタミル化を受けないことが示唆された。*Eucalyptus grandis*では、木部繊維の二次壁形成過程で、 β -チューブリン遺伝子のうちのひとつの発現量が顕著に増加することが示されている。以上より、樹木形成層における細胞壁形成段階でのチューブリン・アイソタイプの発現構成比の変動が、表層微小管本体の構造、さらに微小管結合タンパク質やその他の微小管関連タンパク質との間の相互作用に与える影響が示

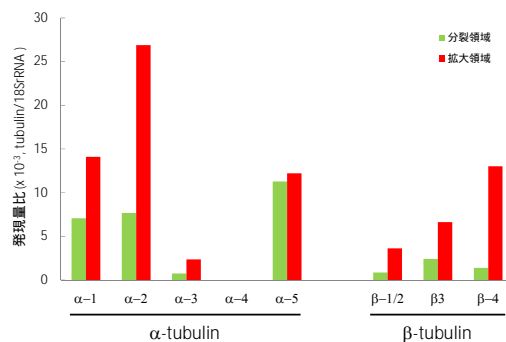


図3. スギ・チューブリン遺伝子間の発現量の比較.

唆された。今後は、チューブリン・アイソタイプの変現構成比と樹木細胞壁形成との関係を分子構造レベルで詳しく明らかにする必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Y. Yamagishi, J. Yoshimoto, H. Uchiyama, E. Nabeshima, S. Nakaba, U. Watanabe, R. Funada, In vitro induction of secondary xylem-like tracheary elements in calli of hybrid poplar (*Populus sieboldii* x *P. grandidentata*), *Planta*, 査読有, 237, 2013, 1179-1185

[学会発表](計5件)

渡辺宇外、安部久、二村典宏、篠原健司、LMD・デジタルPCRによる樹木形成層発現遺伝子の解析手法の検討、日本木材学会大会、2014年3月、愛媛大学(松山市) 山岸祐介、北村圭、吉本靖東、渡辺宇外、半智史、船田良、交雑ポプラ培養細胞からの管状要素分化に対する乾燥処理の影響、日本木材学会大会、2014年3月、愛媛大学(松山市)

U. Watanabe, M. Sekiguchi, K. Kojima, H. Tsujimura, H. Abe, Mechanical load-induced secondary cell wall formation and its regulation in plant cell, IUFRO conference division 5 forest products, 2012. 7, Estoril Portugal

Y. Yamagishi, H. Uchiyama, J. Yoshimoto, S. Nakaba, U. Watanabe, R. Funada, In vitro induction of secondary xylem like tracheary elements from hybrid poplar cultured cells, IUFRO conference division 5 forest products, 2012. 7, Estoril Portugal

渡辺宇外、安部久、二村典宏、篠原健司、スギの α チューブリンおよび β チューブリンの塩基配列およびアミノ酸配列の解析、日本木材学会大会、2012年3月、北海道大学(札幌市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 宇外 (WATANABE Ugai)
千葉工業大学・工学部・准教授
研究者番号：70337707

(2)研究分担者

安部 久 (ABE Hisashi)
独立行政法人森林総合研究所・木材特性研究領域・主任研究員
研究者番号：80343812

(3)連携研究者

河合 剛太 (KAWAI Gota)
千葉工業大学・工学部・教授
研究者番号：70211860