

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23770054

研究課題名(和文)ケミカルジェネティクスによる二次細胞壁成分合成機構の解明

研究課題名(英文)Chemical genetics analysis of secondary cell wall formation in protoxylem

研究代表者

米田 新(Yoneda, Arata)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50553715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：木部道管を構成する道管細胞は、周囲に硬く厚い二次細胞壁を形成するという特徴がある。この二次細胞壁形成制御機構を明らかにするために、本研究では二次細胞壁形成に変化を起こす新奇生理活性小分子化合物のケミカルスクリーニングを行った。その結果、サルファメチゾール(SMZ)という、本来らせん模様の二次細胞壁に多数の分岐や湾曲をもたらす新規の生理活性物質を発見した。また、道管細胞分化過程特異的に微小管束を湾曲・分岐させることから、SMZは原生木部道管形成時に微小管の配向制御因子の阻害剤であると考えられる。SMZは道管細胞における二次細胞壁形成機構を研究する上で有用なツールになると期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanisms of secondary cell wall (SCW) formation during xylem vessel differentiation, we have screened the chemicals which affect the SCW formation. As a result, we could identify a compound sulfamethizole (SMZ), which had a novel bioactivity to induce abnormal branching and bending in spiral protoxylem SCWs. SMZ induced aberrant branching and bending cortical microtubules specifically during vessel cell differentiation, meaning that SMZ is a novel inhibitor against SCW formation mechanism in protoxylem and that SMZ could be a novel tool to investigate it further.

研究分野：植物細胞壁

キーワード：ケミカルバイオロジー 道管 原生木部道管 二次細胞壁 サルフォンアミド サルファメチゾール
表層微小管

1. 研究開始当初の背景

現在、地球温暖化が世界的な懸案となっており、二酸化炭素排出量の抑制は急務である。そこで注目されているのが、従来の石油や石炭などに代わるバイオ燃料である。バイオ燃料は、二酸化炭素を吸収して生長する植物を原料に、燃料となるエタノールなどを生成して使用するため、実質的に二酸化炭素排出量をゼロに近く抑えることが出来る。このため、バイオ燃料の利活用が期待されている。その一方で、現在バイオ燃料を生産する原料には、トウモロコシ、さとうきび、大豆、ナタネなど、植物バイオマスのうち本来食用である「糖質・油脂バイオマス」が転換されて用いられており、その結果世界的な食糧価格の高騰という問題も引き起こしている。そのため、植物バイオマスのうち、食糧と競合しない木質バイオマスの生産性向上と有効利用は重要なテーマである。

木質バイオマスの大部分は木部細胞の厚い細胞壁(二次細胞壁)である。木質組織を構成する道管細胞や繊維細胞などの細胞は、細胞膜と一次細胞壁の間に二次細胞壁を形成することで、より強固な構造を形成する。これらは植物全体の支柱としての役割を果たし、また水分や養分その他の様々な物質の通導組織として働くなど、植物の生長と維持に重要な機能を担っている。そのため、二次細胞壁の形成がどのように制御されているのかを明らかにすることは、生物学的な基礎研究においても工業的な応用を見越した研究としても重要であると言える。

二次細胞壁は、主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンから構成されている。これまでに、これら構成成分の合成に関わる多くの酵素遺伝子が、主に遺伝学的手法によって明らかにされてきた。一方で、これら二次細胞壁合成や沈着を制御する分子機構は不明な点が多く残されていた。これは、植物細胞にとって二次細胞壁が植物体の支持組織や水の通

導組織として働くため必須の構造であり、1) 欠損変異体が極度の矮性や致死性を示す、2) 機能重複した遺伝子を複数持つ、3) 植物の内部組織にあり観察が困難など、遺伝学的手法では解析が困難な面が多く存在した。そこで、遺伝学に代わる新たな実験手法による二次細胞壁の形成機構の解明が必要であった。

2. 研究の目的

ケミカルジェネティクスは、従来の遺伝学における欠点を相補して未知の生物学的現象を研究する手法として、また新規の創薬に繋がる手法として、注目されている。ケミカルジェネティクスでは、機能未知の小分子化合物を生体試料に作用させ、その結果現われてくる表現型を解析する手法である。一般的に、小分子化合物は似た構造を持つタンパク質全てに作用することから、遺伝子の機能重複性の問題を克服でき、また与える時期や濃度を任意に調節できることから、変異体致死性の問題も解決できると期待できる。

また、私たちの研究室ではこれまでに、タバコ培養細胞 BY-2 やシロイヌナズナ培養細胞において、道管細胞分化のマスター遺伝子として考えられる NACドメインタンパク質 VND7 (Kubo *et al.* Gene & Dev. 2005) を機能誘導することにより、高頻度かつ同調的に道管細胞分化を誘導することが出来る実験系の確立に成功した。この培養細胞分化誘導系を用いることで、個々の細胞の形態観察が容易になり、また生長が速いためハイスループットな研究や網羅的なオミックス解析のための大量培養が可能になると考えられる。この道管細胞分化誘導可能なタバコ培養細胞 BY-2 とケミカルジェネティクスの組み合わせは、道管細胞分化に関わる未知の分子機構の解明に有効な実験系となると期待される。

そこで本研究では、上記の培養細胞道管分化誘導系にケミカルジェネティクスを応用することにより、新規の二次細胞壁成分の合成

促進剤無いし合成阻害剤の同定と、二次細胞壁成分の合成および制御機構の解明を目指した。現在、数種類のセルロース合成阻害剤は知られているものの、その作用機構が明らかで無いものが多く、またそれ以外の細胞壁多糖合成に影響を及ぼす阻害剤や促進剤などは知られていない。近年のゲノム研究により、植物細胞は多くの細胞壁合成酵素様タンパク質を持つことが分かってきたが、これらは非常に大きな遺伝子ファミリーを形成し、遺伝学的にそれらの機能を明らかにすることは困難であり、この分野でケミカルジェネティクスの手法を用いて研究を行うことの意義は大きい。また、これらの合成機構に作用する新規化学物質を発見することは、基礎生物学的観点からも、先に述べたバイオ燃料生産研究などの応用的側面からも、大きな意義があると言える。さらに、これまでセルロース合成阻害剤として広く用いられてきた 2,6-dichlorobenzonitrile の標的因子が、セルロース合成酵素自体ではなく、二次細胞壁形成において働く微小管結合タンパク質 MAP20 であるという報告がなされた (Rajangam *et al.* Plant Physiol. 2008)。このことから、二次細胞壁成分の合成促進剤ないし阻害剤を発見することは、合成酵素そのものだけでなく、合成制御機構に関わる因子の研究においても重要なツールを提供することにつながると期待する。

3. 研究の方法

生物材料としては、先に記述した当研究室で確立したタバコ培養細胞 BY-2 やシロイヌナズナ培養細胞 T87 における VND7 機能誘導型道管細胞分化誘導系を用いる。

化合物ライブラリには、理研・NPDepo の収集したライブラリと、カリフォルニア大学の Cutler 博士らのグループから供されたライブラリを用いた。前者は天然化合物を中心とした化合物で前選抜は行われていないのに対し、後者は天然化合物・人工合成化合物を含む

より大きなライブラリ群からシロイヌナズナの胚軸の伸長を 30% 以上阻害する化合物を前選抜したライブラリである。特に後者のライブラリは、植物において何かしらの影響を及ぼすことが実証済みであるため、植物におけるケミカル・スクリーニングにはより効果的であると期待される。

道管細胞分化誘導系に化合物ライブラリ由来の化合物を個別に加え、その後に細胞の分化率、二次細胞壁沈着パターン、二次細胞壁成分の分析を行い、道管細胞分化・二次細胞壁合成に影響を及ぼす新規生理活性物質の探索を行った。

4. 研究成果

およそ 2,000 種の化合物からスクリーニングを行った結果、二次細胞壁の形成に異常を引き起こした候補化合物が 13 種、道管細胞への分化率に異常を起こした候補化合物が 9 種得られた。

二次細胞壁形成異常を引き起こした化合物の中に、共通の部分構造を持つ 2 つの類縁化合物、Sulfamethizole (SMZ) と Sulfaphenazole が含まれていた (図 1)。そこでこの共通部分構造が生理活性に寄与しているのではないかと考え、同じ共通部分構造を持つ別の 2 種の化合物、Sulfanilamide と Benzenesulfonamide についても調べたところ、同様に二次細胞壁形成に異常を示した。このことから、sulfonamide と呼ばれるこの共通部分構造を持つ化合物が、植物の木部道管細胞における二次細胞壁形成に対する新規阻害剤であると結論づけた。

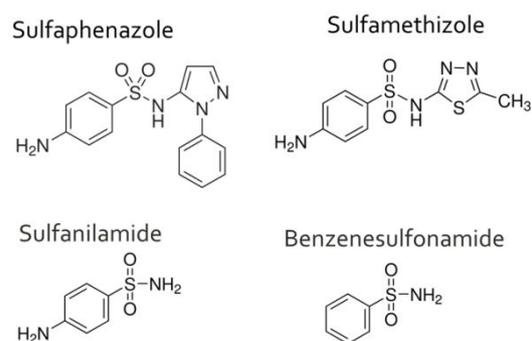


図 1 共通部分構造を持つ候補化合物

これら候補化合物のうち、SMZ は特に顕著な表現型を示したため、以降の研究には SMZ を主に用いた。VND7 機能誘導型道管細胞分化誘導系タバコ培養細胞を用いて道管細胞分化を誘導すると、原生木部道管様のらせん模様の二次細胞壁が形成される (図 2 mock)。そこに 100 μ M の SMZ を加えると、らせん模様の二次細胞壁形成が阻害され、大きく湾曲して多数の小環状構造を取り、また分岐の増えた網目状に二次細胞壁が沈着した (図 2, SMZ)。

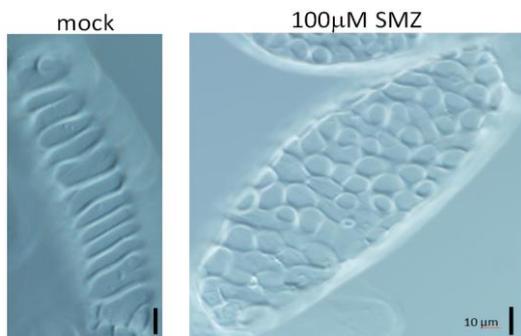


図 2 SMZ の二次細胞壁形成に対する影響

これまでに、細胞壁の沈着パターンの形成には、細胞膜直下に存在する植物特異的な細胞骨格構造である表層微小管が重要な役割を担うことが知られている。特に細胞壁の主成分であるセルロースについては、セルロース合成酵素複合体が表層微小管によって移動方向を規定されることにより、表層微小管の配向と同じ方向にセルロース微繊維の沈着方向が制御されることが知られており、微小管阻害剤により二次細胞壁のパターンが異常になることが報告されている (Falconer and Seagull, 1985; Oda et al., 2005)。実際、本研究で得られた 13 種の二次細胞壁形成異常を示す候補化合物の中には、propryzamide など既知の微小管阻害剤、また微小管阻害剤としての報告は無いものの微小管を破壊した化合物が数種含まれていた。このことから、改めて二次細胞壁の形成における表層微小管の重要性が確認された。一方で、SMZ は表層微小管を破壊することはなく (図 3)、既知の微小管阻害

剤とは異なる作用機序を持つことが示唆された。

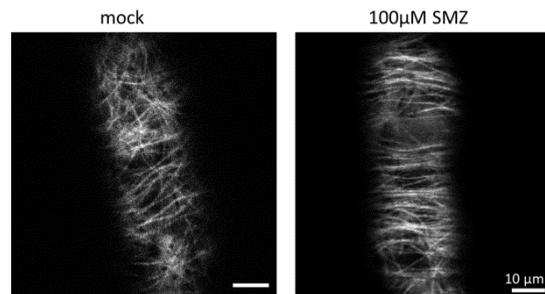


図 3 SMZ の一次細胞壁関連表層微小管に対する影響

興味深いことに、SMZ は二次細胞壁形成中の表層微小管特異的に配向を変化させた。通常的植物細胞は一次細胞壁のみを持っており、その時表層微小管は細胞の伸長方向に垂直な向きに配向する (図 3, mock)。SMZ 処理は、先に述べた通り微小管を破壊せず、また細胞の伸長方向に垂直な微小管の配向にも影響を与えなかった (図 3, SMZ)。一方で、二次細胞壁を形成しつつある細胞では、表層微小管が束化してらせん状に集積し、その後その直下に二次細胞壁が沈着する (図 4, mock)。結果的に、表層微小管と二次細胞壁は互いに平行に配向した。二次細胞壁形成中の細胞を SMZ で処理すると、表層微小管は大きく湾曲して小さな環状構造を多数形成し、また分岐の増えた複雑な配向を示した (図 4, SMZ)。この時、二次細胞壁は大きく乱れた表層微小管束の直下に形成され、表層微小管と二次細胞壁の平行性は保たれていた。このことから、SMZ は表層微小管が二次細胞壁の沈着方向を規定する機構には作用せず、二次細胞壁形成中の細胞において表層微小管がらせん状に配向する過程のみを阻害した。

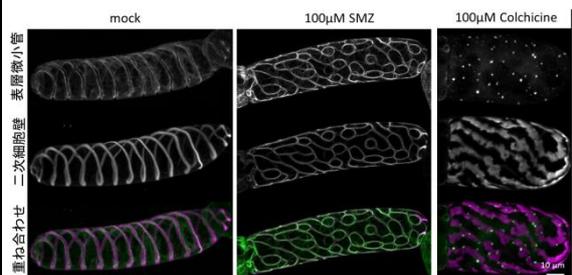


図 4 SMZ の二次細胞壁形成中の表層微小管に対する影響

微小管の制御には、MAPs や+TIPs などの微小管結合タンパク質、微小管重合・脱重合制御因子などの存在も知られている (Bisgrove et al., 2004; Hamada, 2007 ; Pesquet et al., 2010)。特に後生木部道管形成においては、植物特有の微小管結合タンパク質 MIDD1 や膜局在性の ROP、モータータンパク質の Kinesin13A の働きにより、局所的に微小管が排除される領域が形成され、後生木部道管特有の孔を持った二次細胞壁パターンが形成されることが報告されている (Oda et al., 2010; Oda and Fukuda 2012; Oda et al., 2013)。つまり、二次細胞壁のパターン形成には、表層微小管とそれを制御する因子が重要となる。しかしながら、原生木部道管におけるらせん状の二次細胞壁合成制御に関わる表層微小管制御因子は未だ明らかになっていない。これまでに、動物細胞において、SMZ を含む sulfonamide 類は、チューブリンタンパク質の colchicine 結合サイトに結合し、微小管の重合を阻害し、抗癌剤として機能することが報告されている (Yoshimatsu et al., 1997; Banerjee et al., 2005; Liu et al., 2012)。しかし、植物細胞において SMZ は表層微小管を破壊せず、二次細胞壁形成中の表層微小管特異的に配向を乱した。また、この作用は植物細胞においても微小管を破壊した colchicine とは大きく異なっていた (図 4)。このことから、SMZ は原生木部道管における表層微小管制御因子に対する新規生理活性を持つことが考えられる。

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 3 件)

1. Endo H, Yamaguchi M, Tamura T, Nakano Y, Nishikubo N, Yoneda A, Kato K, Kubo M, Kajita S, Katayama Y, Ohtani M, Demura T “Multiple classes of transcription factors regulate the

expression of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, a master switch of xylem vessel differentiation” *Plant Cell Physiol.* 56: 242–254 (2015) 査読有り

2. Xu, B., Ohtani, M., Yamaguchi, M., Toyooka, K., Wakazaki, M., Sato, M., Kubo, M., Hiwatashi, Y., Murata, T., Kurata, T., Yoneda, A., Kato, K., Hasebe, M., Demura, T. “Contribution of NAC Transcription Factors to Plant Adaptation to Land” *Science* 343: 1505–1508 (2014) 査読有り
3. Ueda, K., Okawara, R., Yamasaki, S., Sanada, Y., Kinoshita, E., Yoneda, A., Demura, T. and Kato, K. “Efficient transgene expression by alleviation of translational repression in plant cells” *J. Biosci. Bioeng.* 118: 434–440 (2014) 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

1. Yoneda A, Kamon E, Demura T “Chemical genetic approach for plant cell wall patterning” 第55回日本植物生理学会年会, シンポジウム口頭発表, 2015年3月17日, 東京農業大学(東京都世田谷区)
2. Kamon E, Pesquet E, Kubo M, Ohtani M, Kato K, Yoneda A, Demura T “Chemical genetic analysis of secondary cell wall patterning during xylem vessel cell differentiation” The 5th symposium on International Collaborative Laboratories “Front Lines of Plant Cell Wall Research”, ポスター発表, 2015年3月20日, 東大寺総合文化センター(奈良県奈良市)
3. Yoneda A, Demura T “Molecular mechanism of primary cell wall regeneration from protoplast” 5th International Conference of Plant Cell

- Wall Biology, ポスター発表, 2014 年 7 月 27 日, ケアンズ(オーストラリア)
4. 米田新、出村拓 “プロトプラストからの一次細胞壁再形成時に働く分子機構の解析” 第 78 回日本植物学会, 口頭発表, 2014 年 9 月 2 日, 明治大学(神奈川県川崎市)
 5. 家門絵理、Edouard Pesquet、久保稔、大谷美沙都、加藤晃、米田新、出村拓 “ケミカルジェネティクスを用いた木部道管形成の解明用いた木部道管分化における二次細胞壁パターン形成機構の解明” 第 78 回日本植物学会, 口頭発表, 2014 年 9 月 2 日, 明治大学(神奈川県川崎市)
 6. 米田新、出村拓 “プロトプラストを用いた一次細胞壁再生機構の解析” 第 55 回日本植物生理学会, 口頭発表, 2014 年 3 月 20 日, 富山大学(富山県富山市)
 7. 家門絵理、米田新、出村拓 “木部道管細胞形成の化学遺伝学解析” 新学術領域「植物細胞壁機能」主催第 2 回若手ワークショップ・第 7 回細胞壁ネットワーク研究会, 口頭発表, 2013 年 11 月 14 日, つくばグランドホテル(茨城県つくば市)
 8. 米田新、出村拓 “シロイヌナズナプロトプラストを用いた一次細胞壁制御機構の解析” 第 31 回日本植物細胞分子生物学会, 口頭発表, 2013 年 9 月 10 日, 北海道大学(北海道札幌市)
 9. 家門絵理、米田新、出村拓 “ケミカルジェネティクスを用いた木部道管形成の解明” 第 31 回日本植物細胞分子生物学会, 口頭発表, 2013 年 9 月 10 日, 北海道大学(北海道札幌市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 新 (Yoneda, Arata)
奈良先端科学技術大学院大学バイオサイ
エンス研究科, 助教
研究者番号: 50553715

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：