

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：82105

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880029

研究課題名（和文） ミクロフィブリル配向を制御する生体分子と細胞膜上構造体のダイナミクス

研究課題名（英文） Dynamics of microtubules and plasma membrane domain during secondary cell wall deposition.

研究代表者

高田 直樹 (TAKATA NAOKI)

独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・研究員

研究者番号：90605544

研究成果の概要（和文）：二次壁は、セルロースミクロフィブリル（MF）の配向の違いにより3層に区別される。MFの配向制御は、細胞骨格である表層微小管が密接に関与している。本研究では、二次壁のMF配向を制御する分子機構を明らかにするために、木部細胞において表層微小管の細胞内挙動を明らかにすることを目的とした。微小管を蛍光タンパク質で標識したポプラ形質転換体を作成した。形質転換体の葉、根、師部組織では、GFP蛍光により表層微小管を観察することができた。一方で、木部繊維細胞ではGFP蛍光が著しく弱く、表層微小管の観察が困難であった。今後、観察技術の高度化と遺伝子コンストラクトの改変が必要であると推察された。

研究成果の概要（英文）：Orientation of cellulose microfibril deposition is controlled by cortical microtubules. The aim of this study is to reveal dynamics of cortical microtubules during the secondary cell wall deposition. We generated transgenic aspens in which microtubules were labeled by GFP expression. Cortical microtubules were visualized by GFP fluorescence in leaf, root and phloem cells in the transgenic plants. However, GFP fluorescence was weak in xylem fiber cells due to low expression of GFP-tagged protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：樹木生理学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：セルロースミクロフィブリル、細胞壁、表層微小管、ポプラ

1. 研究開始当初の背景

樹木はその巨大な樹体を永年的に維持するために、高度に分化した細胞壁を形成する。細胞壁は、堆積過程の違いから一次壁と二次

壁に大別される。細胞壁の大部分を占める二次壁は、細胞長軸に対するセルロースミクロフィブリル（MF）の配向の違いにより3層に区別される。MFの配向制御には、細胞膜直下

に繊維状に局在する表層微小管が密接に関与している。二次壁形成過程において、表層微小管の配向は連続的に変動し、その配向変化は二次壁堆積中の MF の配向パターンと一致している。しかし、二次壁形成中に生じる表層微小管の配向変化が、どのような細胞内分子機構により制御されているのか未だ詳細な理解には至っていない。

近年、細胞膜上の構造体（細胞膜マイクロドメイン）が、セルロース合成に密接に関与することが示唆されている。既往の研究から、細胞膜マイクロドメインにはセルロース合成酵素や微小管を構成するチューブリン[α -チューブリン (TUA)、 β -チューブリン (TUB)]が集積しており、セルロース合成や表層微小管の形成・配向を調節する可能性が示唆されている。しかし、樹木の二次壁形成過程において、細胞膜マイクロドメインがどのような挙動を示し、どのような役割を果たしているのか、さらに、細胞膜マイクロドメインと表層微小管、またはセルロース合成酵素がどのような細胞内相互動態を示し、MF の合成や配向にどのような役割を有しているのか、多くの解明すべき課題が残っている。

生体内で細胞膜マイクロドメイン、表層微小管、セルロース合成酵素を可視化する技術は、ここ数年で高度に発展してきた。その背景として、蛍光染色試薬の開発と蛍光タンパク質 (GFP など) の応用が挙げられる。特に、蛍光タンパク質を利用した手法として、マーカータンパク質と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現する形質転換体を作成し、目的の細胞内構造体を可視化する技術が開発されている。しかし、この手法は草本植物で開発が進み、樹木への応用例は未だ限定的である。本研究では、蛍光タンパク質を用いた可視化技術を形質転換体の作出が簡便なポプラに適用する。

2. 研究の目的

本研究では、二次壁の MF 配向を制御する細胞内分子機構を明らかにすることを最終目標とした。研究立案の時点では、表層微小管、セルロース合成酵素、細胞膜マイクロドメインの3者間の相互動態を明らかにすることを目標としていた。しかし、研究期間及び研究基盤の整備状況から、まず表層微小管のみにターゲットを絞ることとした。本課題では、表層微小管の細胞内挙動をライブセルイメージングにより明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、表層微小管をライブセルイメージングするためのポプラ形質転換体の作

出、及びポプラ形質転換体を用いた表層微小管の蛍光観察を行った。具体的な研究方法は以下の通りである。

(1) ポプラ形質転換体の作出と形質転換体の選抜

微小管を蛍光タンパク質により標識したポプラ形質転換体の作出を行った。微小管の標識には、シロイヌナズナの α -チューブリン (AtTUA6)、 β -チューブリン (AtTUB6)、及び微小管結合タンパク質である AtEB1 を用いた。TUA や TUB を用いた場合、微小管全体が標識されるため表層微小管束の形成状態や配向状態を観察できる。EB1 を用いた場合、微小管が伸長する際の先端部 (伸長端) が標識されるため、微小管の伸長方向や極性を観察することができる。AtTUA6、AtTUB6、及び AtEB1 に蛍光タンパク質 (GFP、または mCherry) を融合したキメラ遺伝子を構築し、恒常発現用プロモーター (CaMV35S) の下流に連結した。構築した遺伝子コンストラクトは、CaMV35S::GFP-AtTUA6, CaMV35S::GFP-AtTUB6, CaMV35S::AtEB1-GFP 及び CaMV35S::AtEB1-mCherry の4種類である。これらのコンストラクトをアグロバクテリウム法により交雑ポプラ (*Populus tremula* × *Populus tremuloides*) に導入した。

ポプラ形質転換体の選抜を行うために、葉から mRNA を精製し、導入遺伝子の発現量を Real-time PCR により定量化した。

(2) ポプラ形質転換体の表現系の調査

ポプラ形質転換体において、導入遺伝子による形態形成への影響を評価した。形質転換体 (CaMV35S::GFP-AtTUA6 及び CaMV35S::GFP-AtTUB6) を土に移植した後、樹高及び土際直径を一週間おきに測定した。伸長成長量、肥大成長量、葉や茎の形態変化から、遺伝子導入によるポプラへの影響を評価した。

(3) ポプラ形質転換体を用いた表層微小管の顕微鏡観察

ポプラ形質転換体を用い、表層微小管の蛍光観察を行った。培養瓶で生育した形質転換体 (CaMV35S::GFP-AtTUA6, CaMV35S::GFP-AtTUB6 及び CaMV35S::AtEB1-mCherry) から葉や根をサンプリングし、GFP 蛍光像及び mCherry 蛍光像を共焦点レーザー顕微鏡により取得した。

(4) 師部組織、木部組織での表層微小管の顕微鏡観察

ポット苗の茎を用い、師部組織、木部組織での表層微小管の蛍光観察を行った。ポプラ形質転換体 (CaMV35S::GFP-AtTUA6 及び CaMV35S::GFP-AtTUB6) をポット苗として1~2ヶ月生育させた後、茎頂から25~30節間

目の幹をサンプリングした。表皮、師部、形成層、木部、髄を含む幹の縦断面切片をスライディングマイクロトームにより作成した。作成した切片をMS培地でマウントした後、GFP蛍光を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) ポプラ形質転換体の作出と選抜

表層微小管をライブイメージングするためのポプラ形質転換体の作出を行った。構築したコンストラクト (CaMV35S::GFP-AtTUA6, CaMV35S::GFP-AtTUB6, CaMV35S::AtEB1-GFP 及び CaMV35S::AtEB1-mCherry) を交雑ポプラ (*P. tremula* × *P. tremuloides*) に導入した。各コンストラクトにつき 40~50 植物体を個体再生した。導入遺伝子の発現量を Real-time PCR により定量化し、発現量の高い形質転換体を 3~4 ライン選定した (図 1)。Real-time PCR の結果から、GFP-AtTUA6 の発現量は GFP-AtTUB6 より高い傾向が見られた。

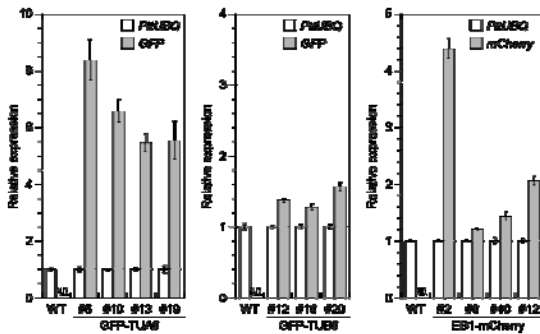


図 1. ポプラ形質転換体における導入遺伝子の発現量比較

(2) ポプラ形質転換体の表現系の調査

チューブリンタンパク質を異所的に発現すると、植物の形態形成に影響を与えるという研究報告例がある。そこで、ポプラ形質転換

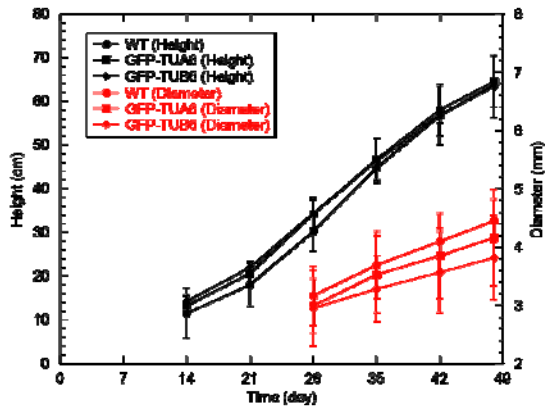


図 2. ポプラ形質転換体 (GFP-AtTUA6 及び GFP-AtTUB6) の伸長成長と肥大成長の変化

換体 (CaMV35S::GFP-AtTUA6 及び CaMV35S::GFP-AtTUB6) を土に移植し、伸長成長量と肥大成長量を測定した。その結果、形質転換体は WT と同様の伸長成長、肥大成長を示した (図 2)。また、葉や茎においても形態異常が観察されなかった。これらのことから、今回導入した AtTUA6 及び AtTUB6 はポプラの成長や形態形成にほとんど影響を与えないことが明らかになった。

(3) ポプラ形質転換体を用いた表層微小管の顕微鏡観察

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、表層微小管の蛍光観察を行った。ポプラ形質転換体 (GFP-AtTUA6 及び GFP-AtTUB6) を用いた観察から、葉の表皮細胞、孔辺細胞、葉肉細胞、根の表皮細胞において GFP 蛍光を観察することができた (図 3)。また、GFP 蛍光は繊維状の構造体として観察され、このことから表層微小管が GFP によりラベルされていることが明らかになった。GFP-AtTUA6 と GFP-AtTUB6 の蛍光強度の比較から、GFP-AtTUB6 より GFP-AtTUA6 の方が GFP の蛍光強度が強いことが明らかになった。この結果は、Real-time PCR による導入遺伝子の発現量比較の結果と一致している。CaMV35S::AtEB1-mCherry を導入した形質転換体では、mCherry の蛍光をドット状に観察することができた。

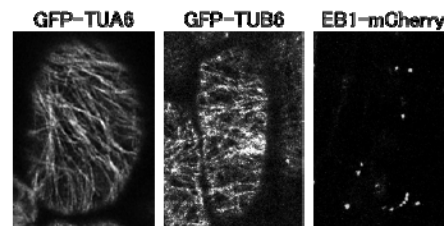


図 3. ポプラ形質転換体における表層微小管の蛍光観察像 (根の表皮細胞)

(4) 師部組織、木部組織での表層微小管の顕微鏡観察

ポット苗の 25~30 節間目の幹から表皮、師部、形成層、木部、髄を含む縦断面切片を作成し、各細胞の GFP 蛍光観察を観察した。その結果、師部細胞においては繊維状の表層微小管を観察することができた (図 4)。一方で、木部の繊維細胞や師部の繊維細胞では GFP 蛍光が著しく弱く表層微小管の観察が困難であった。また、木部放射線細胞では、GFP 蛍光が細胞質においても観察された。これらのことから、木部繊維細胞において表層微小管をライブセルで観察するためには、顕微鏡観察技術の高度化、遺伝子コンストラクトの改変、木繊維細胞の *in vitro* 誘導系などを行う必要があると考えられた。

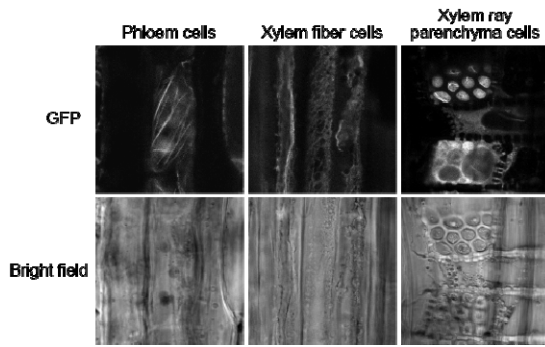


図4. ポプラ形質転換体 (GFP-AtTUA6) における表層微小管の蛍光観察像 (師部細胞、木部繊維細胞、木部放射柔細胞)

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6件)

- ① 高田直樹. ドイツで開催された国際会議 (Plant Biology Congress Freiburg 2012) の概要. 森林遺伝育種, 査読無, 2, 2013, 37-40
http://fgtb.ac.affrc.go.jp/publish/FGTB_ISSN_2187-350X/Vol.2/FGTB_Vol2_No.1/FGTB_V2N1_topic4.pdf
- ② Takata N, Eriksson ME. A simple and efficient transient transformation for hybrid aspen (*Populus tremula* × *P. tremuloides*). Plant Methods, 査読有, 8, 2012, 30
 DOI: 10.1186/1746-4811-8-30
- ③ 高田直樹. モデル樹木・ポプラの生物情報データベースの現状と活用. 林木の育種, 査読無, 241, 2011, 27-30

他3件

[学会発表] (計13件)

- ① 高田直樹, 谷口亨. 全ゲノム重複後の重複遺伝子対の発現変化 -ポプラ・セルロース合成酵素の機能分化-. 第63回日本木材学会, 2013年3月27日, 岩手大学 (盛岡)
- ② Takata N, Yokota K, Ohki S, Mori M, Taniguchi T, Kurita M. Molecular Phylogeny and Structural Divergence of the *EPF/EPFL* Gene Family. 第54回日本植物生理学会, 2013年3月23日, 岡山大学 (岡山)

- ③ Takata N, Taniguchi T. Functional divergence of secondary cell wall-associated *CELLULOSE SYNTHASES* (*CesAs*) after a polyploidy event in *Populus* species. Plant Biology Congress Freiburg 2012, 2012年7月31日, Freiburg University (Freiburg, Germany)

- ④ 高田直樹, 谷口亨. 二次細胞壁形成を担うポプラ・セルロース合成酵素の遺伝子発現制御と進化. 第53回日本植物生理学会, 2012年3月18日, 京都産業大学 (京都)

他9件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 直樹 (TAKATA NAOKI)

独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・研究員

研究者番号: 90605544