

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292107

研究課題名(和文) 樹幹形成層における細胞増殖と木部形成過程をモニターするモデル樹木の育成

研究課題名(英文) Development of model trees to monitor cell growth and wood formation process in the tree stem

研究代表者

片山 義博 (KATAYAMA, Yoshihiro)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：10214339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、樹木の資源蓄積が、樹幹形成層の細胞増殖と木部における細胞壁肥厚で進行する事に着目し、それらプロセスの進行をレポーター遺伝子(GUS遺伝子)を用いて、細胞レベルで長い樹木の生育期間モニター可能なモデル樹木を育成した。樹木の樹幹形成層の細胞増殖と木部形成の進行をモニターするため、ポプラの有糸分裂特異的制御因子(PtCYCB)、および細胞薄壁形成候補遺伝子(PtSCAML)、木部特異的キシラン合成酵素遺伝子(PtGT43A, 8D)のプロモーター配列下流にレポーター遺伝子(GUS)を融合し、それらを導入した遺伝子組換えポプラを用いて樹幹形成層の細胞増殖と木部形成の進行を観察した。

研究成果の概要(英文)：The secondary xylem of the wood trunk is composed of the daughter cells produced by vascular cambium in the stem. Proliferation of woody cell in the secondary xylem is performed by long-range cell division. Most of woody cells have thickened secondary cell wall, constituting large amount of biomass storage. Therefore, the regulation of cell division in vascular cambium and differentiation into the secondary xylem is important for biomass production.

In this study, we constructed mitosis marker, *Populus trichocarpa* CYCB promoter fused with GUS and cell plate formation marker, *P. trichocarpa* SCAMP-Like protein promoter fused with GUS. Using these vectors, we evaluated cell division activity and cell plate formation in vascular cambium of poplar tree. Furthermore, we also constructed secondary xylem formation marker, *P. trichocarpa* GT43A promoter fused with GUS and evaluated differentiation into the secondary xylem of the wood trunk.

研究分野：森林資源化学

キーワード：木質バイオマス 形成層 細胞増殖 細胞壁肥厚 木部形成 有糸分裂 細胞隔壁 二次壁

1. 研究開始当初の背景

21世紀の世界は、化石資源の代替、温室効果ガス削減などを目指した資源循環型社会の形成を目指し、バイオマス資源活用に立脚した産業体系の創出が重視されている。その実現のためには、化学的な加工性や材質などの機能性に優れた木材資源の安定な確保と、その生産拡大が不可欠である。

樹木の資源蓄積は、樹幹の形成層細胞が長期間にわたって細胞分裂を継続し、肥大成長により二次木部、いわゆる木材を内部に蓄積することにより行われている。しかし細胞分裂から木部形成への進行を細胞レベルでステージ毎に判断するには、現在なお高度な経験と技術を必要としている。本研究は、森林の多様な生育条件下で様々な環境要因が樹幹の形成層活動を介して資源蓄積に及ぼす影響を、細胞レベルで長期間継続的に観察できる方法の開発を目指して実施した。

2. 研究の目的

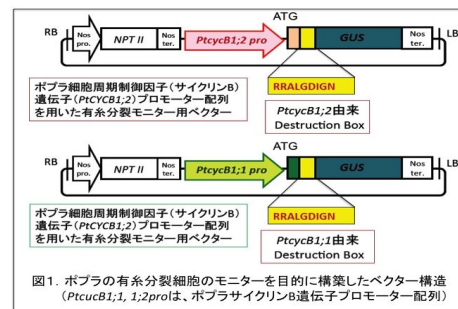
森林を構成する樹木には、地球規模での環境問題の解決や、木材資源の安定的な確保への貢献が期待されている。本研究の目的は、樹木の資源蓄積が、樹幹形成層の細胞増殖と木部における細胞壁肥厚で進行する事に着目し、樹幹におけるそれらプロセスの進行をレポーター遺伝子(GUS 遺伝子)を用いて、細胞レベルで長い樹木の生育期間、継続的にモニター可能なモデル樹木を育成する事である。さらに本研究で育成したモデル樹木を国内外の樹木研究者に広く提供することにより、シロイヌナズナなどモデル植物を用いて目覚ましい発展を見せる植物分子生物学研究の成果を、樹木の研究領域で検証し、また積極的に樹木資源研究に融合させる事を可能とし、木材資源生産に関する研究の発展に貢献する事を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 「樹木の形成層分裂組織において有糸分裂に突入した細胞の生成と分布」を観察可能な広葉樹モデル植物(ポプラ)の育成。

「樹木の形成層分裂組織において有糸分裂に突入した細胞の生成と分布」を観察可能な広葉樹モデル植物(ポプラ)の育成には、細胞の有糸分裂段階で特異的に発現するポプラ細胞周期制御遺伝子、サイクリン B 遺伝子(ポプラ *PtCycB*)のプロモーター配列の下流に GUS レポーター遺伝子を連結した T-DNA ベクターを構築し、その遺伝子を組換えたポプラを作出した。そのため本研究では、ポプラサイクリン B 遺伝子、*PtCycB1:1* (accession number NCBI データベース: XM_002308836)および *PtCycB1:2* (accession number

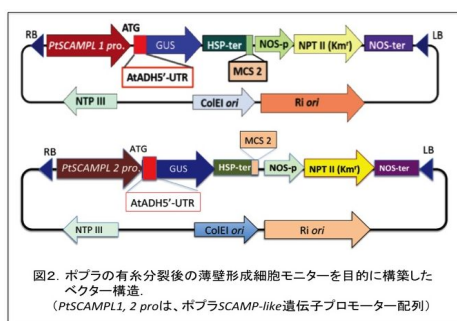
NCBI データベース: XM_002323189)を取り上げた。*Populus trichocarpa* のゲノムから PCR 法により *PtCycB1:1* および *PtCycB1:2* のプロモーター配列を取得し、その下流に GUS レポーター遺伝子を連結した。*PtCycB1:1* のプロモーター配列は、翻訳開始点から上流域 389bp と、タンパク質コード領域に存在するユビキチン依存性 destruction box 配列 (RRVLGDIGN) を含む約 1 kb の DNA 配列の下流に、レポーター遺伝子(GUS 遺伝子)を in frame に連結した(図1)。*PtCycB1:2* のプロモーター配列は、翻訳開始点から上流域 498bp と、タンパク質コード領域に存在するユビキチン依存性 destruction box 配列 (RRVLGDIGN) を含む約 1.1kb の DNA 配列の下流に、レポーター遺伝子(GUS 遺伝子)を in frame に連結した(図1)。こうして構築した T-DNA ベクターを、常法に従いアグロバクテリウム LBA4404 を介してポプラ交雑ヤマナラシ (*Populus sieboldii* x *Populus gradidentata*) Y-3B の茎切片に感染させた。ポプラの形質転換体の選抜には、Murashige Skoog 培地を基本に、シュート形成用および発根用培地を調製し使用した。遺伝子組換え体の選抜には、抗生物質 kanamycin (最終濃度 100.0 mg/l), hygromycin(最終濃度 20.0mg/l)を必要に応じて添加した。培養は、25℃、24 時間 3000 ルクス白色光照射下で行った。寒天培地で選抜された遺伝子組換え体は、大きな植物体として育成するために土壌に移植した(鉢植)。寒天培地から鉢植えに移植するため、「馴化」処理を施した。



- (2) 「樹木の形成層分裂組織において薄壁形成に突入した細胞の生成と分布」を観察可能な広葉樹モデル植物(ポプラ)の育成。

「樹木の形成層分裂組織において薄壁形成に突入した細胞の生成と分布」を観察可能な広葉樹モデル植物(ポプラ)の育成には、細胞周期の有糸分裂の終結後、2個の娘細胞形成に必要な薄壁(細胞板)構築に関与する遺伝子(*SCAMP* 遺伝子、K. Toyooka ら、The Plant Cell, 21,1212 (2009))に着目し、*Populus trichocarpa* のゲノム DNA から *SCAMP* 遺伝子ホモログ (*PtSCAMPL* 遺伝子)を単離し、そのプロモーター配列の下流に GUS レポーター遺伝子を連結した T-DNA ベクターを構築し、

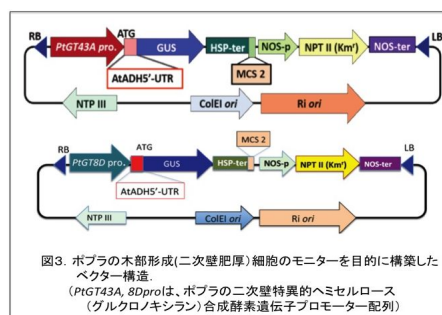
その遺伝子を組換えたポプラを作出した。ポプラ形成層で十分高いレベルで発現している *PtSCAMPL1*, *PtSCAMPL2* 遺伝子を同定した。*PtSCAMPL1* は、*Populus trichocarpa* のゲノム DNA 配列 (NCBI データベース) accession number: NC_008485.2, *PtSCAMPL2* は、*Populus trichocarpa* のゲノム DNA 配列 (NCBI データベース) accession number NC_008479.2 であった。*PtSCAMPL1* のプロモーター配列は、翻訳開始点から上流約 4.12Kb の DNA 配列を用い、その下流にレポーター遺伝子 (GUS 遺伝子) を連結した (図 2)。また *PtSCAMPL2* のプロモーター配列は、翻訳開始点から上流約 4.15Kb の DNA 配列を用い、その下流に、レポーター遺伝子 (GUS 遺伝子) を連結した (図 2)。それらを、上記の方法でポプラ交雑ヤマナラシ Y-3B に感染させ、分化再生させる事により遺伝子組換えポプラを作出した。また上記の方法で馴化個体を育成した。



(3) 「樹木の樹幹形成層から木部二次壁肥厚へ突入した細胞の生成と分布」を観察可能な広葉樹モデル植物 (ポプラ) の育成。

「樹木の樹幹形成層から木部二次壁肥厚へ突入した細胞の生成と分布」を観察可能な広葉樹モデル植物の育成には、ポプラ樹幹の木部形成過程で、二次壁特異的に蓄積するヘミセルロース (glucronoxylan) の合成酵素遺伝子群 (*PtGT43A*, *PtGT8D*, G.K.Zhou ら, *Plant Cell Physiol*, 48, 689(2007)) のプロモーター配列の下流に GUS レポーター遺伝子を連結した T-DNA ベクターを構築して、その遺伝子を組換えたポプラを作出した。*PtGT43A* 遺伝子は、*Populus trichocarpa* のゲノム DNA 配列 (NCBI データベース) accession number: NC_008472.2, *PtGT8D* は、*Populus trichocarpa* のゲノム DNA 配列 (NCBI データベース) accession number: NC_008474.2 である。*GT43A* のプロモーター配列は、翻訳開始点から上流約 4.53kb の DNA 配列の下流に、レポーター遺伝子 (GUS 遺伝子) を連結した (図 3)。また *GT8D* は、翻訳開始点から上流約 4.85kb の DNA 配列の下流に、レポーター遺伝子 (GUS 遺伝子) を連結した (図 3)。これらを、上記の方法でポプラ交雑ヤマナラシ Y-3B に感染させ、分化再生させる事によ

り遺伝子組換えポプラを作出した。また上記の方法で馴化個体を育成した。



(4) GUS 染色と切片の作成。

形質転換ポプラの観察部位を、GUS 反応液 (X-GUS; 0.5mM, $K_3Fe(CN)_6$; 0.5mM, $K_4Fe(CN)_6$, 0.5mM, 10% Triton X-100; 0.05% in 50mM Phosphate Buffer) に浸漬 GUS 染色を行った。本研究では、観察組織を 5mm 程度の長さにとりミングして、1% 寒天プレートへ垂直に差し入れ、試料の包埋部分を 10mm 角程度に切り出し、マイクローム装着用の木片に乗せ、フリーザー (-80) で凍結させる。凍結後、マイクロームに固定し、約 50 ~ 100nm の厚さで切片を作成した。切り出した切片の寒天を洗い流して顕微鏡を用いて観察を行った。

4. 研究成果

(1) 「樹木の形成層分裂組織において有糸分裂に突入した細胞の生成と分布」を観察可能な広葉樹モデル植物 (ポプラ) の育成。

「樹木の形成層分裂組織において有糸分裂に突入した細胞の生成と分布」をモニターする事を目的に、細胞周期の有糸分裂期 (M 期) に特異的に発現し、M 期の終了に伴い速やかに消失するポプラの細胞周期制御因子 (サイクリン B) をコードする遺伝子、*PtCycB1:1* および *PtCycB1:2* のプロモーター配列の下流に GUS レポーター遺伝子を連結した T-DNA ベクターを、ポプラ交雑ヤマナラシ Y-3B に導入し複数個体の形質転換体を作成した。GUS 染色の有無を確認し選別をした結果、*PtCycB1:1 pro:GUS* を導入した遺伝子組換え系統を 3 系統、*PtCycB1:2 pro:GUS* を導入した遺伝子組換え系統を 4 系統獲得した。それぞれの系統とコントロール個体を比較し、生長や形態に外見的な差異や異常は見られなかった。

葉、根組織における有糸分裂細胞の生成と分布

PtCycB1:1 pro:GUS, *PtCycB1:2 pro:GUS* を導入した組換え体から、それぞれ頂芽、中間部の葉、根を取り出し、GUS 染色を行った。

その結果、いずれも頂芽付近の葉では、その基部領域（ただし葉柄は GUS 活性を示していない）で強い GUS 活性が見られた。一方シュート下部にある十分展開した葉では GUS 活性が見られなかった（図 4）。根においてはどちらの組換え体も、根端分裂組織で強い GUS 染色を示した。根端分裂組織から離れた上部の伸長領域では GUS 染色は殆ど認められないが、側根発生部位と思われる領域に、スポット状で GUS 染色が観察された（図 4）

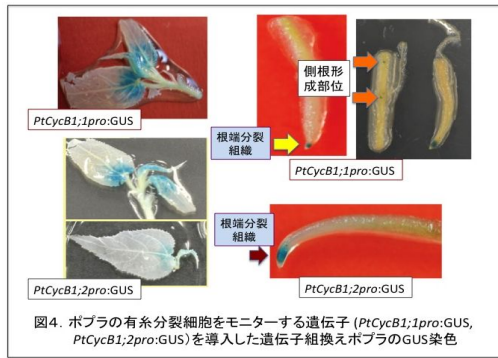


図4. ポプラの有糸分裂細胞をモニターする遺伝子 (*PtCycB1;1pro:GUS*, *PtCycB1;2pro:GUS*) を導入した遺伝子組換えポプラの GUS 染色

維管束形成層における有糸分裂細胞の生成と分布

茎の横断面における GUS 活性を調査した。その結果、木部組織に沿うように存在している形成層帯にスポット状で GUS 活性が確認できた（図 5）。この事は、木部組織の外側に囲むように円周状に配列されている形成層の細胞分裂が、同調的に円周状に一斉進行するのではなく、形成層細胞がランダムに細胞分裂を進行させている事が分かる。

茎の縦断面における GUS 活性を調査した。縦断面の上部から下部に連なる形成層に沿って確認できたが、その中でも濃淡があることを発見した。この濃淡は観察した殆どの切片で見られた。茎を縦に割り、外皮側と軸側に剥がして同様の条件で GUS 染色を行った（図 6）。その結果、茎に円筒状に存在している形成層では、有糸分裂の進行中の細胞領域と、他の細胞周期に移行した細胞領域が、比較的広範囲なゾーンを形成して維管束形成層の細胞増殖が全体として進行していると考えられる。

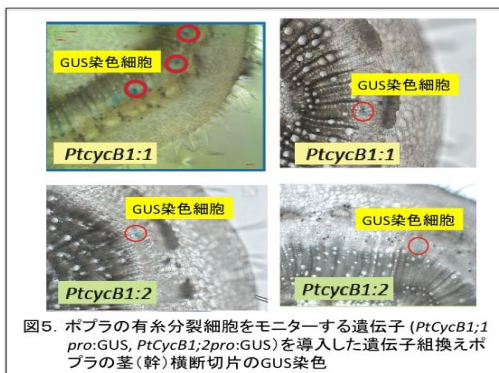


図5. ポプラの有糸分裂細胞をモニターする遺伝子 (*PtCycB1;1pro:GUS*, *PtCycB1;2pro:GUS*) を導入した遺伝子組換えポプラの茎（幹）横断切片の GUS 染色

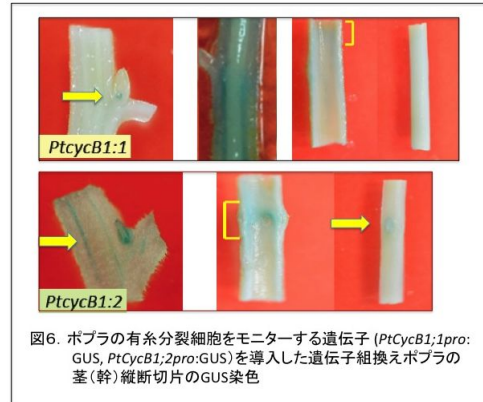


図6. ポプラの有糸分裂細胞をモニターする遺伝子 (*PtCycB1;1pro:GUS*, *PtCycB1;2pro:GUS*) を導入した遺伝子組換えポプラの茎（幹）縦断切片の GUS 染色

鉢植え個体の育成

GUS 染色が正常に観察された遺伝子組換え体、大きな植物体として育成するために土壌に移植し『馴化』処理を施し、順次大きなサイズの植物体として育成する事に成功した（図 7）。得られた馴化個体は、いずれも正常な GUS 染色が観察された。

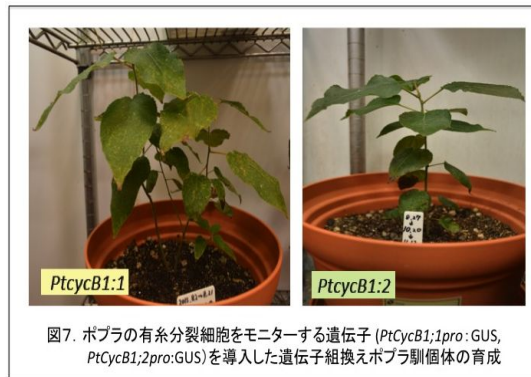


図7. ポプラの有糸分裂細胞をモニターする遺伝子 (*PtCycB1;1pro:GUS*, *PtCycB1;2pro:GUS*) を導入した遺伝子組換えポプラ馴化個体の育成

(2) 「樹木の形成層分裂組織において薄壁形成に突入した細胞の生成と分布」を観察可能な広葉樹モデル植物（ポプラ）の育成。

「樹木の形成層分裂組織において薄壁形成に突入した細胞の生成と分布」をモニターする事を目的に、細胞周期の有糸分裂の終結後、2 個の娘細胞への分裂に必要な薄壁（細胞板）構築に関与する輸送タンパク遺伝子（*SCAMP* 遺伝子、K. Toyooka ら、*The Plant Cell*, 21, 1212 (2009)）に着目し、ポプラ形成層で十分高いレベルで発現している遺伝子 *PtSCAMPL1*, *PtSCAMPL2* を選択し、図 2 の GUS モニター用 T-DNA を、各々ポプラ交雑ヤマナラシ Y-3 B に導入し、複数個体の形質転換体を作成した。*PtSCAMPL1pro:GUS* を導入した遺伝子組換え体 4 系統、*PtSCAMPL1bpro:GUS* を導入した遺伝子組換え体 6 系統、*PtSCAMPL2pro:GUS* を導入した遺伝子組換え体 4 系統獲得した。それぞれの系統とコントロール個体を比較し、生長や形態に外見的な差異や異常は見られなかった。

葉、根組織における薄壁形成細胞の生成と分布

各々の GUS モニター遺伝子を導入したポプラ組換え体から頂芽、中間部の葉、根を取り出し、GUS 染色を行った。その結果、いずれの組換え体系統でも頂芽付近の葉では、その基部領域で強い GUS 活性が見られた(ただし葉柄は GUS 活性を示していない)。一方シュート下部にある十分展開した葉では GUS 活性が見られなかった(図 8)。根においてはもすべての系統で、根端分裂組織で強い GUS 染色を示した。根端分裂組織から離れた上部の伸長領域では GUS 染色は殆ど認められないが、側根発生部位と思われる領域に、スポット状で GUS 染色が観察された(図 8)。これら GUS 染色の結果から、樹木における細胞分裂部位における M 期とその後続く薄壁形成による 2 個の娘細胞の生成までの一連の過程を検出する二つのシステムの構築に成功した。

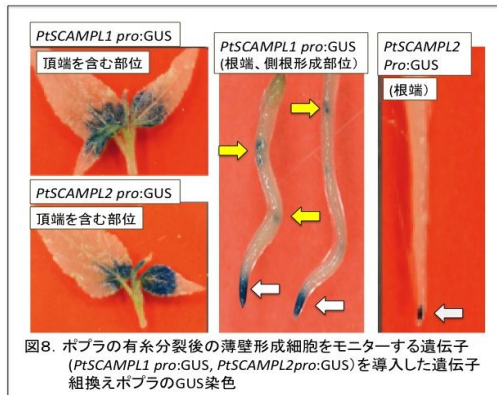


図 8. ポプラの有糸分裂後の薄壁形成細胞をモニターする遺伝子 (PtSCAMPL1 pro:GUS, PtSCAMPL2 pro:GUS) を導入した遺伝子組換えポプラの GUS 染色

維管束形成層における薄壁形成細胞の生成と分布

茎の横断面における GUS 活性を調査した。その結果、木部組織に沿うように存在している形成層帯にスポット状で GUS 活性が確認でき、木部組織の外側を囲むように円周状に配列されている形成層の細胞分裂が、同調的に円周状に一斉進行するのではなく、形成層細胞がランダムに細胞分裂を進行させている事が分かる。縦断面における形成層で観察される GUS 染色は、縦断面の上部から下部に連なる形成層に沿って濃淡を伴って観察された。さらに茎を縦に割り、外皮側と軸側に剥がして同様の条件で GUS 染色を行った。その結果、茎に円筒状に存在している形成層では、有糸分裂から薄壁形成に進行した細胞の分布領域と、他の細胞周期にある細胞の分布領域が、比較的広範囲なゾーンを形成している事が明らかとなった。GUS 染色が正常に観察された遺伝子組換え体は、大きな植物体として育成するために土壤に移植し『馴化』処理を施し、順次大きなサイズの植物体として育成する事に成功した。

(3) 「樹木の樹幹形成層から木部二次壁肥厚へ突入した細胞の生成と分布」を観察可能な広葉樹モデル植物 (ポプラ) の育成と GUS 染色。

「樹木の樹幹形成層から木部二次壁肥厚へ突入した細胞の生成と分布」をモニターする事を目的に、ポプラ樹幹の木部形成過程で、二次壁特異的に蓄積するヘミセルロース (glucuronoxylan) の合成酵素遺伝子群 (PtGT43A, PtGT8D, G.K.Zhou ら, Plant Cell Physiol, 48, 689(2007)) のプロモーター配列下流に GUS レポーター遺伝子を連結した T-DNA ベクターを構築し、ポプラ交雑ヤマナラシ Y-3B に導入し、複数個体の形質転換体を作出した。PtGT43A pro:GUS を導入した遺伝子組換え系統を 4 系統、PtGT8D pro:GUS を導入した遺伝子組換え系統を 3 系統獲得した。それぞれの系統とコントロール個体を比較し、生長や形態に外見的な差異や異常は見られなかった。

GUS 染色による葉、根組織における二次壁肥厚細胞の生成と分布

PtGT43A pro:GUS を導入した遺伝子組換え系統を 4 系統、PtGT8D pro:GUS を導入した遺伝子組換え 3 系統から、それぞれ頂芽、中間部の葉を取り出し、GUS 染色を行った。その結果、すべての系統において、頂芽にある葉も含め全ての葉の葉脈に強い GUS 活性を観察した。根においては、PtGT43A pro:GUS, PtGT8D pro:GUS 導入個体で、根の維管束を構成する二次壁肥厚した木部領域で強い GUS 活性が見られた。GT43A および GT8D は、二次壁特異的なヘミセルロースであるグルクロノキシランの主鎖合成に係る酵素遺伝子であり、本研究で育成した遺伝子組換え体は、二次壁肥厚段階にある木部細胞の生成と分布の観察が、可能である事が明らかとなった。

GUS 染色による樹幹部における二次壁肥厚細胞の生成と分布

茎の横断面における GUS 活性を調査した。PtGT43A pro:GUS 導入形質転換体においては、維管束形成層帯の内側に位置する組織で、GUS 活性が見られ木部細胞壁の形成段階の細胞が観察された。一方、形成層帯の外側では師部繊維細胞領域では弱い GUS が観察された(図 9)。PtGT8D pro:GUS 導入形質転換体においては、PtGT43A pro:GUS 導入形質転換体と同じく維管束形成層帯から内側の木部組織で強い GUS 活性が見られ、また形成層の外側を沿うように存在する、肥厚した細胞壁を持つ繊維細胞で強い GUS 活性が観察された(図 9)。PtGT8D pro:GUS 導入形質転換体では、特に放射柔組織細胞でも GUS 活性が認められ、放射柔細胞の細胞壁の二次壁肥厚の存在を

示唆している。以上の観察から、*PtGT43A pro.* は主に木部形成に關与し、*PtGT8D pro.* は木部形成だけでなく師部纖維組織や柔組織の細胞壁肥厚に關与する遺伝子である事を示唆している。GUS 染色が正常に觀察された遺伝子組換体を、大きな植物体として育成するために土壤に移植し『馴化』処理を施し、順次大きなサイズの植物体として育成する事に成功した。

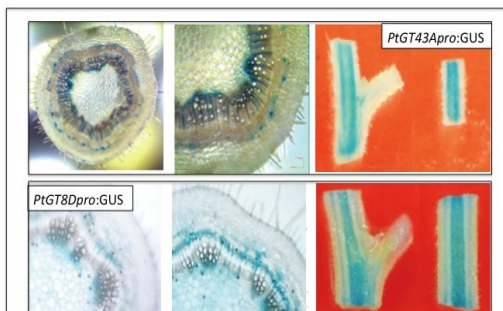


図9. ポプラの木部形成(二次壁肥厚)細胞をモニターする遺伝子 (*PtGT43Apro:GUS*, *PtGT8Dpro:GUS*) を導入した遺伝子組換えポプラの茎(幹)横および縦断切片のGUS染色

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 星野仁美、沼田宗大、片山義博、高野未織、佐藤かんな、川合伸也、出村拓
細胞周期制御遺伝子 *AtCYCD*, *OscycB* を高発現させた遺伝子組換えモデル樹木の細胞増殖と木部形成。
日本木材学会第 65 回大会、平成 27 年 3 月 17 日、東京、タワーホール船堀
- (2) 高野未織、片山義博、星野仁美、沼田宗大、佐藤かんな、川合伸也、出村拓
樹幹形成層の細胞増殖と木部形成過程をモニターするモデル樹木の育成と組換えクローンの確立。
日本木材学会第 65 回大会、平成 27 年 3 月 17 日、東京、タワーホール船堀
- (3) 星野仁美、沼田宗大、出村拓、片山義博
樹幹形成層の細胞増殖と木部形成過程をモニターするモデル樹木の育成(II)
日本木材学会第 64 回大会、平成 26 年 3 月 13 日、松山(愛媛大学)
- (4) 沼田宗大、星野仁美、住谷洋美、出村拓、片山義博
樹幹形成層の細胞増殖と木部形成過程をモニターするモデル樹木の育成(I)
日本植物学会第 77 回大会、平成 25 年 9 月 14 日、札幌(北海道大学)

〔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：
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

片山 義博(KATAYAMA, Yoshihiro)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：10214339

(2) 研究分担者

川合 伸也(KAWAI, Shinya)
東京農工大学・(連合)農学研究科
(研究院)・准教授
研究者番号：90202027
伊澤かんな(佐藤かんな)(IZAWA, Kanna)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：40456603