

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 1 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22370020

研究課題名（和文） 二次細胞壁形成の統御システムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of regulatory system for secondary cell wall formation

研究代表者

出村 拓 (DEMURA TAKU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：40272009

研究成果の概要（和文）：木質バイオマスを構成する二次細胞壁の形成メカニズムについては、不明な点が多々残されている。本研究では、二次細胞壁形成のマスタースイッチとして同定した VND7 遺伝子を利用して、高効率な二次細胞壁誘導系を確立し、これらを用いて、二次細胞壁の主要成分であるセルロースとキシランの生合成ならびに VND7 の機能制御機構の解析を行うことで、二次細胞壁形成を統御するシステムの新たな側面を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Secondary cell walls (SCWs) of plants are important because they are major components of woody biomass. However, little is known about mechanisms underlying SCW formation. In this study, we revealed several new aspects of the mechanisms through the analysis of biosynthesis of cellulose and xylan, major constituents of SCWs, and the analysis of regulatory system of VND7, the master regulatory switch of SCW formation, by using a new in vitro SCW induction experimental system that was established with the VND7 gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：木質バイオマス、二次細胞壁、VND7、セルロース合成、ヘミセルロース合成、タバコ BY-2、シロイヌナズナ、共発現解析

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、ペクチン、リグニン、構造タンパク質などを含む複雑な高分子化合物であり、植物の発生活過程と細胞の種類によってその成分は大き

く異なる。維管束木部の道管要素や繊維細胞など数多くの細胞は細胞伸長が終わったのちに、伸展性の高い一次細胞壁の内側にセルロース、ヘミセルロース、リグニンを主成分とする厚い二次細胞壁を形成する。これら二

次細胞壁の主成分の生合成のメカニズムについては近年の研究によってそれぞれの生合成に関わる酵素遺伝子が徐々に同定されているが、完全な理解にはまだ程遠いと言わざるを得ない。さらに、個々の細胞ごとに、そして、個々の細胞の分化過程において、これら生合成酵素遺伝子の発現がどのように制御されることで多様な細胞壁が形成されているのかについてもほとんどわかっていないという状況であった。

研究代表者らはこれまでに、ヒヤクニチソウ培養細胞とモデル植物であるシロイヌナズナの継代培養細胞から二次細胞壁をもつ道管要素への分化誘導系を用いたトランスクリプトーム解析により、道管要素の分化過程で特異的に発現する数多くの遺伝子群を見いだした。これらの遺伝子群にはセルロースとヘミセルロースの生合成に関与すると予想される糖転移酵素や多糖分解酵素、リグニンモノマーの生合成酵素やリグニン重合酵素などの細胞壁生合成関連酵素が多数含まれていた。さらにこれらの酵素遺伝子の発現を制御すると予想される転写制御因子も多数含まれていた。そこで研究代表者らは、上記転写因子の中から植物特有の NAC ドメイン転写因子をコードする VND1~VND7 (**V**ascular-related **N**AC **D**omain1~7) 遺伝子の解析を進め、VND6 および VND7 が道管要素の二次細胞壁生合成を制御するマスタースイッチであることを突き止めた。さらに、道管特異的に発現する機能未知遺伝子の解析から、新規の膜タンパク質である TED6 と TED7 の発現を抑制すると道管要素の二次細胞壁形成が阻害され、逆に過剰発現では二次細胞壁の形成が促進されることを示した。また、TED6 タンパク質がセルロース合成酵素活性サブユニットのひとつである AtCesA7 と結合することを免疫沈降法、プルダウンア

ッセイ、BiFC 解析で証明し、TED6 と TED7 がセルロース合成複合体の新たな構成因子である可能性を示した。

これらの研究成果を受けて、これまでの研究成果を進展させて、二次細胞壁成分のうちセルロースとヘミセルロースの生合成のしくみ、ならびに、二次細胞壁生合成酵素遺伝子のマスター転写因子である VND7 の機能制御のしくみを多面的に解析することで、二次細胞壁形成を統御するシステムに関する知見を深めることが可能であるとの着想に至った。

2. 研究の目的

主に VND7-VP16-GR 過剰発現のシロイヌナズナ形質転換体と形質転換 BY-2 タバコ培養細胞で同調的に二次細胞壁形成を誘導できることを利用した研究を行う。二次細胞壁の各成分の生合成のしくみについては、TED6 とセルロース合成酵素活性サブユニット AtCesA7 の特異的結合を基にしたプロテオーム解析により二次細胞壁のセルロース合成酵素複合体の構成タンパク質を明らかにする。さらに、二次細胞壁の主要なヘミセルロースであるキシランの生合成については、キシラン合成活性を指標に生合成酵素複合体の精製を試みる。VND7 の機能制御のしくみについては、二次細胞壁強制誘導シロイヌナズナをもとに VND7 の機能を抑制する突然変異体 (DEX 誘導での個体致死が起こらなくなる復帰突然変異体) の作出とその責任遺伝子の単離と機能解析を行い、VND7 の機能制御に関わる新規タンパク質を同定する。また、VND7 遺伝子や二次細胞壁生合成酵素遺伝子と共発現する転写因子やキナーゼなどの情報伝達関連遺伝子の機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) VP16-GR 融合型 VND7 発現形質転換シロイヌナズナ・BY-2 タバコ培養細胞の確立

二次細胞壁形成のマスタースイッチとして同定した VND7 遺伝子に転写活性化ドメイン (VP16) とグルコシルコイドレセプター (GR) を融合した遺伝子コンストラクトを用いて、シロイヌナズナと BY-2 タバコ培養細胞の形質転換を行う。多数の形質展開個体、細胞ラインから効率的に二次細胞壁形成を誘導できるものを選抜する。

(2) セルロース合成酵素複合体の精製

研究代表者らが 2009 年に発見した TED6 タンパク質がセルロース合成酵素の活性サブユニットに結合できるという性質を利用して、HA タグ等で標識した TED6 タンパク質を用いたアフィニティー精製により、セルロース合成酵素複合体の同定を目指す。

(3) キシラン合成酵素複合体の精製

(1)で選抜した高頻度に二次細胞壁形成を誘導できる形質転換 BY-2 タバコ培養細胞を材料に、キシラン主鎖の合成活性を指標にしたタンパク質画分の精製を行う。さらに、質量分析により、精製したタンパク質画分の構成因子の同定を進める。

(4) VND7 の機能制御機構の解析 (復帰突然変異体のスクリーニング)

(1)で選抜した高頻度に二次細胞壁形成を誘導できるシロイヌナズナを用いて、EMS 処理による突然変異誘発を行い、M2 世代で二次細胞壁形成が抑制された突然変異体を得る。得られた突然変異体については純化、詳細な形態観察、マッピング、遺伝子同定を順次進める。

(5) 新規制御遺伝子候補の同定

新規の細胞壁形成関連遺伝子を同定するために、VND7 遺伝子や既知の細胞壁生合成酵素遺伝子と共発現する遺伝子の探索と機

能解析を行う。機能解析としては、プロモーター解析、過剰発現体・機能抑制体の作出と観察等を行う。

4. 研究成果

(1) VP16-GR 融合型 VND7 発現形質転換シロイヌナズナ・BY-2 タバコ培養細胞の確立

高頻度に二次細胞壁形成を誘導することができる形質転換シロイヌナズナを得ることができた。中でもライン 811-2 はグルコシルコイド誘導体であるデキサメタゾン (DEX) を与えることで、3 日以内に植物体全体で二次細胞壁形成が起こり、植物自体は同時におこる細胞死によって枯死する。この形質転換体の解析により、DEX 添加によって、二次細胞壁形成に関わる遺伝子群の発現誘導と二次細胞壁特異的なヘミセルロース多糖であるキシランの蓄積が起こることが示された。また、約 90%の高頻度で二次細胞壁形成を誘導できる形質転換 BY-2 タバコ培養細胞を確立した。この培養細胞でもシロイヌナズナと同様に二次細胞壁形成関連遺伝子の発現誘導とキシランの蓄積などが起こることを確認した。

(2) セルロース合成酵素複合体の精製

標識 TED6 タンパク質を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナを作出したが、標識 TED6 タンパク質の蓄積量が十分ではなかった。TED6 タンパク質は二次細胞壁形成特異的に発現することから、(1)の VP16-GR 融合型 VND7 発現形質転換シロイヌナズナでの標識 TED6 の過剰発現を行ったところ、複合体精製に十分と思われる標識 TED6 タンパク質の蓄積が見られた。そこで、この形質転換シロイヌナズナを用いて、TED6 タンパク質と特異的に結合するタンパク質の精製を行った。さらに、精製したタンパク質画分の

質量分析を行ったところ、極めて多彩なタンパク質が見出されたが、複数回の解析で共通して同定されたタンパク質にチューブリンとアクチンが含まれていた。セルロース合成複合体が細胞骨格上を移動することが知られており、TED6 タンパク質がセルロース合成複合体と細胞骨格との結合に関与している可能性を示している。

(3) キシラン合成酵素複合体の精製

まず、蛍光標識キシロオリゴ糖を基質とした高感度のキシラン合成活性の測定法を確立した。さらに、(1)の二次細胞壁形成を誘導した形質転換 BY-2 タバコ培養細胞を材料として、細胞の破碎方法、ミクロソーム膜画分の可溶化法、反応温度、基質濃度、などの最適反応条件を見出した。また、キシラン合成酵素活性を指標にしたタンパク質画分の素抽出を行い、次いで、質量分析解析を試みたが、構成因子の同定には至らなかった。

(4) VND7 の機能制御機構の解析

(1)の強制的に二次細胞壁形成を誘導できる形質転換シロイヌナズナの種子に対して EMS 処理を行い、突然変異を誘発した。さらに、M2 世代の植物体に DEX 処理を行い、二次細胞壁形成（と細胞死）が起こらなくなった復帰突然変異体のスクリーニングを行った。約 100 ラインもの一次候補が得られたが、純化によって、最終的に 10 ライン程度に絞り込むことができた。不思議なことに、1 ラインのみが劣勢の突然変異であり、残りは優勢変異であることが分かった。劣勢のライン (2B-8) について詳細な解析を進め、植物体が矮性を示すこと、道管の二次細胞壁形成にも異常がみられること、二次細胞壁形成関連遺伝子の発現が強く抑制されること、などが明らかになった。さらに、マッピングを進めたが、F1 個体の表現型がはっきりしないなどの問題により、原因遺伝子座の特定に

は至らなかった。

(5) 新規制御遺伝子候補の同定

VND7 遺伝子や既知の細胞壁生合成酵素遺伝子と共発現する遺伝子の探索と機能解析を行ったところ、複数の AP2/ERF 遺伝子が見出された。これらの発現解析と機能解析を行ったところ、4 つの AP2/ERF 遺伝子が一次細胞壁型のセルロース合成酵素の発現を正に制御するという新規の知見が得られた。

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 17 件)

① Ohtani, M., Nakano, Y., Usami, T., Demura, T. (2012) Comparative metabolome analysis of seed kernels in phorbol ester-containing and phorbol ester-free accessions of *Jatropha curcas* L. *Plant Biotechnol.* 29: 171-174 査読有

DOI:10.5511/plantbiotechnology.12.0426a

② Nakano, Y., Ohtani, M., Polsri, W., Usami, T., Sambongi, K., Demura, T. (2012) Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) *Plant Biotechnol.* 29: 185-189 査読有

DOI:10.5511/plantbiotechnology.12.0418a

③ Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Ohtani, M., Ohme-Takagi, M., Kato, K., Demura, T. (2011) VASCULAR-RELATED NAC

DOMAIN7 directly regulates expression of a broad range of genes for xylem vessel formation. *Plant J.* 66: 579-590 査読有

DOI:10.1111/j.1365-313X.2011.04514.x

④Ohtani, M., Nishikubo, N., Xu, B., Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Goué, Shi, F., Ohme-Takagi, M., Demura, T. (2011) A NAC domain protein family contributing to the regulation of wood formation in poplar. *Plant J.* 67: 499-512 査読有
DOI:10.1111/j.1365-313X.2011.04614.x

⑤Yamaguchi, M., Goué, N., Igarashi, H., Ohtani, M., Nakano, Y., Mortimer, J.C., Nishikubo, N., Kubo, M., Katayama, Y., Kakegawa, K., Dupree, P., Demura, T. (2010) VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 effectively induce transdifferentiation into xylem vessel elements under control of an induction system. *Plant Physiol.* 153: 915-924 査読有
DOI:10.1104/pp.110.154013

⑥Yamaguchi, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Kubo, M., Ohme-Takagi, M., Fukuda, H., Demura, T. (2010) VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 22: 1249-1263 査読有
DOI:10.1105/tpc.108.064048

⑦Demura, T., Ye, Z.H. (2010) Regulation of plant biomass production. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 299-304 査読有
DOI:10.1016/j.pbi.2010.03.002

⑧Caño-Delgado, A., Lee, J.-Y., Demura, T. (2010) Regulatory Mechanisms for Specification and Patterning of Plant Vascular Tissues. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26: 605-637 査読有
DOI:10.1146/annurev-cellbio-100109-104107

⑨Nakano, Y., Nishikubo, N., Goué, N., Ohtani, M., Yamaguchi, M., Katayama, Y., Demura, T. (2010) MYB transcription factors orchestrating the developmental program of xylem vessels in Arabidopsis roots. *Plant Biotechnol.* 27: 267-272 査読有
http://www.jspcmb.jp/pbcontents/pdf/pb27_3/27_267.pdf
他 8 件

[学会発表] (計 90 件)

①Demura, T., Evolutionary conservation and divergence of genes regulating development of water conducting cells, 2013 Plant Winter Conference, 2013.1.25, 韓国・浦項市

②Demura T., CONTROL OF SECONDARY CELL WALL FORMATION BY SEVERAL DISTINCT SETS OF TRANSCRIPTION FACTORS, 23th International Conference on Arabidopsis Research, 2012.7.4, オーストリア・ウィーン

③出村拓、木部細胞の分化に必要な分子生物学的制御因子を科学する、第 5 回木質科学シンポジウム、2012.6.9、東京

④Demura T., Regulation of woody cell wall formation in model plants and trees, Umeå Renewable Energy Meeting 2012、2012.3.15、スウェーデン・ウメオ
2012 年度、他 18 件
2011 年度、他 38 件
2010 年度、他 30 件

[図書] (計 4 件)

①大谷美沙都, 山口雅利, 出村拓、エヌ・ティー・エス、「二次細胞壁形成の時空間的制御」生物の科学 遺伝、2012 年、66、40-46

②出村拓、フロンティア出版、「セルロース系バイオマス生産植物の分子育種技術」次世代バイオエタノール生産の技術革新と事業展開（鮫島正浩 監修）、2010年、114-121

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出村 拓 (DEMURA TAKU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：40272009

(2) 連携研究者

山口 雅利 (YAMAGUCHI MASATOSHI)

埼玉大学・環境科学研究センター・准教授

研究者番号：20373376