様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

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：１４３０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４５８０２４３

研究課題名（和文）二次壁多糖類の生合成、輸送、修飾とゴルジ体の空間的・時間的挙動の解明

研究課題名（英文）Temporal and spatial behavior of Golgi bodies involved in the biosynthesis, secretion and modification of non-cellulosic polysaccharides of wood fiber secondary wall

研究代表者
粟野　達也（Awano, Tatsuya）

京都大学・（連合）農学研究科（研究院）・助教

研究者番号：４０３２４６６０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,200,000円

研究成果の概要（和文）：蛍光タンパク質を用いたライブセルイメージングにより、イネプロトプラストではポプラ由来グルコマンナン合成酵素がゴルジ体マーカーと類似の局在を示すことが示された。同時発現させると単独発現する粒子と共局在する粒子が見られ、両者の発現量がゴルジ体ごとに異なることが示唆された。ポプラの葉肉細胞では静止した粒子が、葉の表皮細胞、茎の木部繊維では移動する粒子が見られ、ゴルジ体の挙動が細胞種により異なることが示唆された。
キシラナーゼは細胞壁に局在しゴルジ体には見られなかった。細胞壁タンパク質にキシラン転移活性が検出された。活性は繊維二次壁に特異的で、繊維二次壁の構造と機能に関わることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The localization of fluorescence protein-tagged glucomannan synthase was shown to be similar to that of Golgi marker protein by live-cell imaging of a rice protoplast. In a protoplast co-expressing these proteins, particles with individual fluorescence and those with merged fluorescence were found, suggesting that the level of each protein varies among different Golgi bodies. In transgenic poplar expressing fluorescence protein-tagged glucomannan synthase, moving particles were found in leaf epidermal cells and stem differentiating fiber cells, while unmoving particles were found in leaf mesophyll cells, suggesting that the behavior of Golgi body varies among cell types.
Xylanase was found in cell wall, whereas not found in Golgi body. Xylan endotransglycosylase activity was detected in proteins extracted from cell wall. In situ activity was specific to fiber cells, suggesting that the transglycosylation of xylan is essential for the structure and function of fiber secondary wall.

研究分野：樹木細胞学

キーワード：ヘミセルロース　ゴルジ体　ライブセルイメージング　グルコマンナン　キシラン　キシラン転移活性　木部繊維

１．研究開始当初の背景

ヘミセルロースおよびペクチンなどの非セルロース性多糖類は木質バイオマスの約25～30%を占めており、産業資源として重要であるばかりでなく、植物の二次細胞壁の構造、性質、生理的 機能を決定する重要な要因である。一次壁と同様に、二次壁においても非セルロース性多糖類の堆積および修飾・分解が起こり、細胞壁の機能が発揮されることがかってきている。

これらの過程には一次壁の形成と同様にゴルジ体が深 く 関わっていることが予想される。すなわち、細胞質で合成された糖ヌクレオチドがゴルジ体膜に存在するトランスポーターによりゴルジ体内腔に取り込まれ、ゴルジ体膜の内腔側に活性部位を持つ糖転移酵素により多糖類が合成される。ゴルジ小胞輸送により細胞壁へ送られた多糖類は、同じくゴルジ体を経て細胞壁に送られた糖加水分解酵素・転移酵素により分解およびつなぎ換えを受ける。多糖類の生合成と輸送、分解酵素の合成と輸送はゴルジ体 を経て行われるが、その過程は時間的、空間的に厳密に制御されているに違いない。

二次壁の非セルロース性多糖類の堆積および修 飾 と それに関わるゴルジ体の役割については以下のような疑問が残されている。

（1）二次壁形成中細胞にゴルジ体は何個存在するか?正常材とあて材では違いがあるか? (2)二次壁形成中細胞のゴルジ体は一日のうちでいつ活動(移動)するか?

（3）二次壁形成中細胞のゴルジ体の細胞内移動速度は?

（4）異なる多糖類は同じゴルジ体で生合成されるのか?

（５）多糖類を生合成するゴルジ体と糖加水分解・転移酵素を生合成するゴルジ体 は 異なるのか?

これらの疑問を解明するには従来の電子顕微鏡による観察ではなく、光学顕微鏡での観察を可能とする必要が有る。なぜならば、電子顕微鏡では高真空下に試料を置くために細胞を固定包埋する必要があり、動きを観察することができない。また、観察視野はグリッドに制限されるため、木部繊維のように長さが500μmを超える細胞の全体を観察することは困難である。さらに、切片厚さは100nm以下であるため、木部繊維の直径（10μm）方向の情報を得ることも困難である。そこで本研究では、ゴルジ体で蛍光タンパク質を発現する形質転換樹木（ポプラ）を作製し、共焦点顕微鏡によるライブセルイメージング（Live Cell Imaging）を試みた。

分化中二次木部組織では糖加水分解酵素ファミリー10（GH10）に属するキシラナーゼが発現していることは報告されているが、二次壁形成におけるこの酵素の分布や機能については不明である。

２．研究の目的

本研究では、ゴルジ体で発現するタンパク質（グルコマンナン合成酵素、ゴルジ体マーカー）と蛍光タンパク質の融合タンパク質を過剰発現する形質転換ポプラを作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行い、以下の３点について明らかにすることを目的とした。

（１）二次壁の非セルロース性多糖類であるグルコマンナンの合成酵素の局在を明らかにする。

（２）グルコマンナン合成酵素が局在するゴルジ体の挙動を明らかにする。

（３）樹木（ポプラ）の分化中木部繊維におけるグルコマンナン合成酵素が局在するゴルジ体の挙動を明らかにする。

また、分化中の二次木部組織には非ヘミセルロース性多糖類の合成酵素（キシラン合成酵素）だけでなく、糖加水分解酵素ファミリー10（GH10）に属するキシラナーゼが発現しているが、その局在と酵素活性について明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

ゴルジ体のライブセルイメージング

CaMV 35S プロモーター制御下でグルコマンナン合成酵素 PtCslA1(***Populus trichocarpa*** cellulose synthase-like A1)および黄色蛍光タンパク質YFPを発現するように設計した発現ベクターを 2 種類作製した。PtCslA の N 末端側にYFPを配置したものをYG、C末端側に配置したものをGYとする。コントロールとして黄色蛍光タンパク質YFPのみを発現するベクターも作製した(YFP とする)。CaMV 35S プロモーター制御下でゴルジ体局在マーカータンパク質である GmManI および赤色蛍光タンパク質 mCherry を発現するベクター(G-rk)を購入した。

イネ Oc 培養細胞をセルラーゼおよびマセロザイムで処理してプロトプラストを調製し、前述のベクターをPEG 法で導入し、一過的にタンパク質を発現させた。遺伝子導入してから 20～32 時間後、落射型蛍光顕微鏡により蛍光タンパク質を発現しているプロトプラストを識別した。発現が確認できたプロトプラストについて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

前述のベクターをアグロバクテリウム法によりポプラ茎断片に導入し、形質転換ポプラを得た。形質転換ポプラの葉および茎を採取し、イネプロトプラストの観察条件を参考に 共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

分化中木部におけるキシラナーゼの局在と糖転移活性

ポプラのキシラナーゼ（PtxtXyn10）のアミノ酸配列より抗原ペプチドを人工合成し、ポリクローナル抗体を作製した。免疫標識法によりポプラ分化中木部での同酵素の局在を観察した。

ポプラ分化中木部から細胞壁結合タンパク質を抽出し、カバ由来グルクロノキシラン

をドナー、スルホローダミン標識キシロオリゴ糖（XO-SR）をアクセプターとしてキシラン転移活性を測定した。ポプラおよびシロイヌナズナ茎から横断面切片を作製し、XO-SRを反応させて蛍光顕微鏡下でキシラン転移活性を検出した。

４．研究成果

ゴルジ体のライブセルイメージング

イネプロトプラストの観察では、YG 導入細胞では細胞質に散在する直径約１μｍの粒子、GY 導入細胞では核および細胞質、YFP 導入細胞では細胞質に蛍光が見られた。ゴルジ局在マーカータンパク質 GmManI を発現する G-rk 導入細胞では細胞質に散在する直径約１μｍ の粒子に蛍光が見られた。これらより、PtCslA1 の N 末端側に蛍光タンパク質を配置した場合にゴルジ装置に蛍光タンパク質が局在するものと考えられる。YG と G-rk の両者を同時に導入した場合は細胞質に散在する直径約 1μｍ の粒子に蛍光が見られたが、これらの粒子には黄色蛍光のみ、赤色蛍光のみ、 両蛍光の三種があった。PtCslA1 および GmManI の発現量がゴルジ装置ごとに異なる可能性が示唆された。タイムラプス撮影では、細胞膜近傍の粒子は比較的動きが少 な い が、細胞中心部の細胞質を動き回る粒子は速く動く様子が観察された。また、塊となって移動する様子も観察され た。

形質転換ポプラでは、 YG 導入ポプラの葉肉細胞では葉緑体周辺に強い蛍光を示す直径約 1μｍ 程度の粒子が見られたが、YFP 導入ポプラには見られなかった。これらの粒子は静止していた。YG 導入ポプラの葉の下面の表皮細胞では強い蛍光を示す直径約 1μｍ 程度の粒子が見られ、粒子が移動していた。このことから細胞種によりゴルジ装置の挙動が異なることが示唆された。

また、茎のまた、分化中木部繊維でも移動する直径約 1μｍ の蛍光粒子が確認された。

以上より、蛍光タンパク質を発現する形質転換樹木を用いたライブセルイメージング技術により分化中木部繊維でのゴルジ体の挙動を観察することに成功した。

分化中木部におけるキシラン転移活性

抗キシラナーゼ抗体による免疫標識の結果、同酵素は分化中木部組織の二次壁を有する細胞に局在した。これは基質となるキシランの局在とほぼ一致した。細胞内局在については、細胞壁に局在し、ゴルジ体では標識が観察されなかった。

細胞壁結合タンパク質のキシラン転移活性は、XO-SR の初濃度の増加に応じて高くなり、XO-SR が加水分解される割合は減少していた。したがって、ポプラ分化中木部では、アクセプターとなるグルクロノキシランの濃度の上昇に応じてキシラン転移活性が増加、キシラン加水分解活性が減少すると考えられる。したがって、実際の細胞壁中ではキシラナーゼとしてではなくキシラン転移酵素として働いていると思われる。

キシラン転移活性は、ポプラでは木部繊維と師部繊維二次壁、シロイヌナズナでは木部繊維および維管束間繊維の二次壁で見られたが、いずれも道管では見られなかった。キシランの分布を表す免疫標識は道管にも見られたので、キシラン転移活性はグルクロノキシランの堆積に必要ではなく、繊維の細胞壁形成に深く関わっていると考えられる。

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）

Derba-Maceluch M, Awano T, Takahashi J, Lucenius J, Ratkel C, Kontro I, Busse-Wicher M, Kosik O, Tanaka R, Winzell A, Kallas A, Lesniewska J, Berthold F, Immerzeel P, Teeri TT, Ezcurra I, Dupree P, Serimaa R, Mellerowicz EJ (2015) Suppression of xylan endotransglycosylase PtxtXyn10A affects cellulose microfibril angle in secondary wall in aspen wood. New Phytologist 205:666-681
doi: 10.1111/nph.13099
査読あり

〔学会発表〕（計４件）

田中涼、粟野達也、高部圭司、Ewa Mellerowicz、ポプラ分化中木部におけるキシラン加水分解・転移活性、第 63 回日本木材学会大会、2013 年 3 月 27 日、岩手大学（岩手県・盛岡市）

Tanaka R, Awano T, Takabe K, Mellerowicz EJ, Activity, localization and function of xylanases in differentiating poplar xylem,13th Cell Wall Meeting, 2013 年 7 月 8 日、Nantes（France）

田中涼、粟野達也、高部圭司、繊維特異的なキシラン転移活性 二次壁形成時におけるグルクロノキシランの構造改変、第 64 回日本木材学会大会、2014 年 3 月 14 日、愛媛大学（愛媛県・松山市）

高居知弘、粟野達也、高部圭司、 鈴木史朗、高 田 直 樹、形質転換ポプラおよびイネプロトプラストを用いたゴルジ装置のライブセルイメージング、第 65 回日本木材学会大会、2015 年 3 月 17 日、タワーホール船堀（東京都・江戸川区）

〔図書〕（計　　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　　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　　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
粟野　達也（AWANO, Tatsuya）
京都大学・大学院農学研究科・助教
　研究者番号：40324660

(2)研究分担者
（　　）

　研究者番号：

(3)連携研究者
鈴木　史朗（SUZUKI, Shiro）
京都大学・生存圏研究所・助教
　研究者番号：70437268

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・主任研究員
　研究者番号：90605544

(4)研究協力者
Ewa J. Mellerowicz（Ewa J. MELLEROWICZ）
田中　涼（TANAKA, Ryo）
高居　知弘（TAKAI, Tomohiro）