

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780167

研究課題名(和文) 遺伝子発現の定量的解析による木材細胞壁形成の日周性の機構解明

研究課題名(英文) Studies on the mechanism of diurnal periodicity in wood cell wall formation using quantitative gene expression analysis

研究代表者

細尾 佳宏 (Hosoo, Yoshihiro)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：80377184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：針葉樹(スギ)の木材細胞壁形成の日周性について遺伝子レベルで研究を行った。スギ苗木の分化中木部において、セルロースの生合成に関わるいくつかの遺伝子の発現に日変動が見られた。ヘミセルロースの生合成に関わる遺伝子の発現に明確な日変動パターンは見られなかったが、エキソサイトーシスによるヘミセルロースの分泌に関わるいくつかの遺伝子の発現に日変動が見られた。これらの結果から、木材細胞壁形成においてセルロースの生合成やヘミセルロースの分泌に日周性が存在する可能性が示唆された。木材細胞壁形成の日周性には、遺伝子発現レベルでの日周性が関わっていると予想される。

研究成果の概要(英文)：Diurnal periodicity in wood cell wall formation in a conifer, *Cryptomeria japonica*, was investigated at the gene level. In differentiating xylem of *C. japonica* saplings, diurnal changes in expression of some genes involved in cellulose biosynthesis were observed. Clear diurnal patterns of gene expression involved in hemicellulose biosynthesis were not observed, while diurnal changes in expression of some genes involved in secretion of hemicelluloses via exocytosis were observed. These results suggest a possibility that diurnal periodicity in cellulose biosynthesis and hemicellulose secretion exists during wood cell wall formation. It seems probable that diurnal changes in gene expression are associated with diurnal periodicity in wood cell wall formation.

研究分野：木質生命科学

キーワード：木質形成 日周性 細胞壁 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

樹木が肥大成長により生産する木材の本体は、木部細胞の高度に発達した細胞壁である。木材の様々な(化学的・物理的)性質は、細胞壁の微細構造や形成過程と密接な関係がある。従って、細胞壁形成の機構を解くことは、木材の生産性や材質を理解し木材を有効利用する上で重要な課題である。

代表者らはこれまで、針葉樹の木材細胞壁形成に日周性が存在することを明らかにしてきた。スギ分化中仮道管の形成中二次壁内表面(二次壁新生面)を走査電子顕微鏡で観察すると、昼はセルロースマイクロフィブリルが観察されるのに対し、夜はヘミセルロースが主成分の無定形物質が観察された(図1; Hosoo et al. *Planta* 2002; *Protoplasma* 2006)。このことから、針葉樹の木材細胞壁形成では2つの成分が日周的に供給されることを明らかにした。さらに、この日周性と光の明暗周期や細胞の膨圧変動との関連性についても明らかにしてきた(Hosoo et al. *Holzforchung* 2003; *J Wood Sci* 2005; 2006; 2011)。

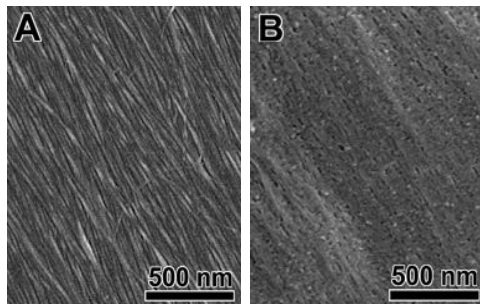


図1. スギ分化中仮道管の二次壁新生面
A: 昼(14時), B: 夜(5時)

木材細胞壁形成の日周性については、これまでの研究では未だ不明な点が残されている。壁成分(セルロース、ヘミセルロース)が日周的に供給されることは分かったが、これらの生合成段階での日周性については、正確な知見が得られなかった。そして、壁成分供給の日変動と生合成量の変動(増減)との関係も、ほとんど不明なままである。従って、セルロースとヘミセルロースの生合成の日変動特性を明らかにすることが、木材細胞壁形成の日周性(壁成分の日周的供給)の機構をより詳細に解明するために不可欠である。そのためには、新生面の観察とは別の新たな分野からの研究アプローチが必要となる。

2. 研究の目的

木材細胞壁形成については国内外で様々な研究が進められ、細胞壁成分の生合成に関わる遺伝子も同定されてきた。これらの遺伝子が発現する量によって、各成分の合成量は左右される。代表者らは、スギ分化中木部細胞からセルロースとヘミセルロースの生合成に関わる遺伝子を複数個単離した(木村・細尾ら 日本木材学会大会 2011)。さらに、エキソサイトーシスによるヘミセルロース

の形成中細胞壁への分泌に関わると推定される遺伝子を複数個見出した。これらの日周発現パターンを解析することにより、セルロース・ヘミセルロース生合成や供給の日変動特性を正確に解明できるものと期待される。本研究は、針葉樹の分化中木部細胞における細胞壁成分生合成・供給の日変動を遺伝子レベルで明らかにし、それをもとに木材細胞壁形成の日周性の機構に関する様々な局面を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 試料採取

温度 25℃、12 時間明期 / 12 時間暗期の条件に設定された 2 台の人工気象器に 3 年生スギのクローン苗を 4 本ずつ合計 8 本入れ、十分量給水しながら生育させた。生育開始から 2~3 週間後、分化中木部の試料を採取した。

二次壁新生面への成分供給の日周性は、光の明暗周期に伴って起こる(Hosoo et al. *Holzforchung* 2003; *J Wood Sci* 2005)。試料採取は、照明の点灯・消灯直後から 3 時間間隔で計 8 回行った(図 2)。1 回の採取につき 1 本苗木を伐採し、正常材部の分化中木部を採取した。

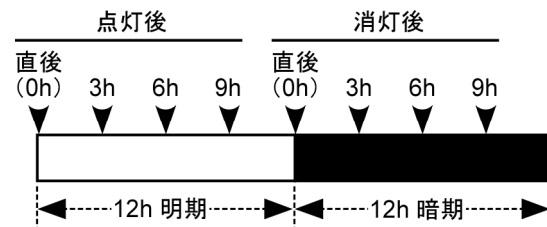


図2. 人工気象器内で生育するスギ苗木からの試料採取スケジュール
矢頭は試料採取のタイミングを示す

(2) RNA 抽出、cDNA 合成(逆転写反応)

CTAB 法を用いて、採取した分化中木部から total RNA を抽出した。そして、PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) とサーマルサイクラー (T100、バイオラッド) を用いて逆転写反応を行い、total RNA から cDNA を合成した。

(3) 細胞壁成分の生合成に関わる遺伝子の日周発現解析

代表者らがこれまでに単離したセルロース生合成関連遺伝子、ヘミセルロース生合成関連遺伝子、さらにエキソサイトーシスによるヘミセルロースの輸送に関わる遺伝子を対象(標的)遺伝子(表 1)として、分化中木部における発現量の日変動パターンをリアルタイム PCR 法により定量的に解析した。各遺伝子の特異的に検出するプライマーを設計し、設計したプライマー、各時刻に採取した分化中木部由来の cDNA、そして SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ) を用いてリアルタイム PCR 反応液を作製した。そして、リアルタイム PCR 装置 (TP800、タカラバイオ)

で反応を行い、アクチン遺伝子の発現量を内部標準として各試料採取時刻における各対象遺伝子の発現量を測定した。

表 1. 解析対象遺伝子とその機能

遺伝子がコードする酵素	酵素の機能
・セルロース合成酵素 (CjCesA1) ・Korrigan エンドグルカナーゼ (CjKOR1)	セルロースの高分子化
・スクロース合成酵素 (CjSuSy1) ・UDP-グルコースピロホスホリラーゼ (CjUGP1)	UDP-グルコース (基質) の生合成
・Cellulose synthase-like A (CjCslA1)	グルコマンナンの高分子化
・Cellulose synthase-like D (CjCslD1)	キシランの高分子化
・UDP-グルコース 4-エピメラーゼ (CjUGE1) ・UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ (CjUGD1) ・GDP-マンノースピロホスホリラーゼ (CjGMP1)	各種糖ヌクレオチド (基質) の生合成
・Exo70A ・Sec6 ・Syntaxin ・Synaptobrevin ・Rab GTPase	エキソサイトーシスに 与すると推定される

(4) 分化中木部細胞で発現するカリウムトランスポーター遺伝子の解析

生合成されたヘミセルロースがエキソサイトーシスにより形成中細胞壁へ分泌・供給される過程には、細胞内の膨圧の日変動が関与すると考えられている。本研究ではさらに、分化中木部細胞の膨圧 (浸透圧) 調節に関与するカリウムイオン (K^+) を細胞内外に膜輸送するトランスポーター (CjKUP1) 遺伝子に着目し、解析を行った。対象遺伝子を K^+ の内向き整流性 (取り込み) 輸送能が欠損した大腸菌 LB2003 変異株で発現させ、 K^+ 取り込み能の回復の有無を調べた。また、分化中木部、内樹皮などの各部位での発現量をリアルタイム PCR 法により調べた。

4. 研究成果

(1) 主な成果

UDP-グルコース (セルロース生合成の基質) の生合成やセルロースの高分子化に関わる各遺伝子について解析を行った結果、照明点灯後 3~6 時間後に発現のピークを迎え消灯中 (暗期) は発現量が低いという日変動を示すものと、発現量に大きな変動が見られないものに大別された。UDP-グルコースの生合成に関わるスクロース合成酵素遺伝子 (CjSuSy1) とセルロースの高分子化に関わるセルロース合成酵素遺伝子 (CjCesA1) に発現の日変動が見られた (図 3)。セルロースミクロフィブリルは細胞膜中のセルロース合

成酵素複合体で合成され、形成中細胞壁へ直接供給される。本研究の結果から、針葉樹の木材細胞壁形成においてセルロースの生合成は日周性を持って変動し、昼 (明期) にセルロースが活発に合成されることにより分化中仮道管の二次壁新生面にセルロースミクロフィブリルが明確に観察されるようになる可能性が考えられた。

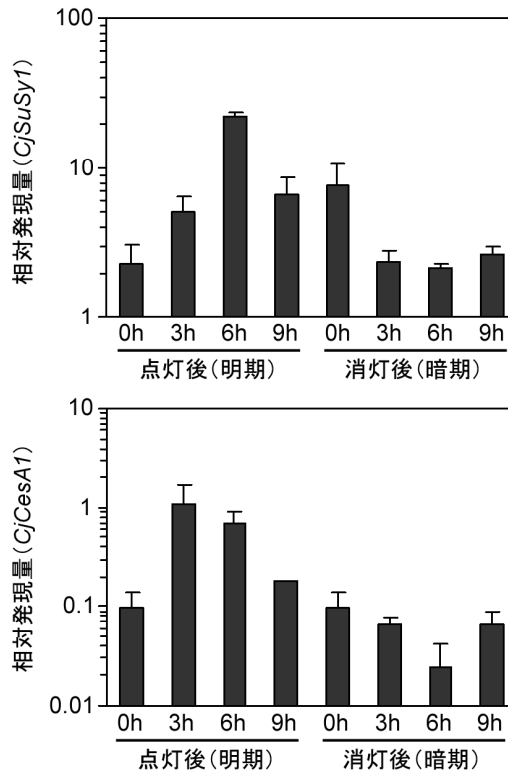


図 3. スギ分化中木部におけるセルロース生合成関連遺伝子の発現量の変動

SuSy: スクロース合成酵素遺伝子

CesA: セルロース合成酵素 (CesA) 遺伝子

エラーバーは標準偏差を示す

針葉樹材の主要ヘミセルロースであるグルコマンナンとキシランの生合成に関わる各遺伝子について発現の日変動パターンを解析した結果、グルコマンナンの高分子化に関わる cellulose synthase-like A 遺伝子 (CjCslA1)、キシランの高分子化に関わる cellulose synthase-like D 遺伝子 (CjCslD1) に明確な発現の日変動は見られなかった (図 4)。そして、2 つのヘミセルロースを合成するための基質となる各種糖ヌクレオチドの生合成に関わる遺伝子 (CjUGE1: UDP-グルコース 4-エピメラーゼ遺伝子、CjUGD1: UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子、CjGMP1: GDP-マンノースピロホスホリラーゼ遺伝子) についても、発現の日変動は見られなかった。本研究で解析した全てのヘミセルロース生合成関連遺伝子に日周発現パターンが見られなかったことから、二次壁新生面において夜 (暗期) にヘミセルロースを主成分とする無定形物質が多く観察されるのはヘミセルロース生合成段階での日変動で

はなく他の段階または因子の日変動によるものと予想された。

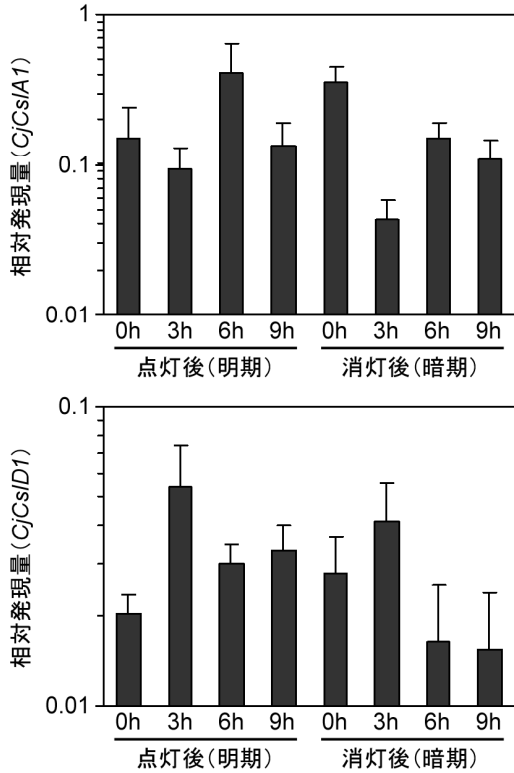


図 4. スギ分化中木部におけるヘミセルロース生合成関連遺伝子の発現量の変動
CsIA : cellulose synthase-like A 遺伝子
UGE : UDP-グルコース 4-エピメラーゼ 遺伝子
 エラーバーは標準偏差を示す

ゴルジ装置内で合成されたヘミセルロースは、エキソサイトーシスにより、細胞膜外（形成中細胞壁）へ輸送される。ヘミセルロースはまずゴルジ小胞に包まれ、細胞膜まで運ばれる。そしてゴルジ小胞膜と細胞膜が融合することにより、ヘミセルロースが放出される。この分泌過程に関わると推定される遺伝子について発現の日変動パターンを解析した結果、ゴルジ小胞の細胞膜への輸送に関わると推定される遺伝子（*Exo70A* 遺伝子、*Sec6* 遺伝子）とゴルジ小胞膜と細胞膜の融合に関わると推定される遺伝子（*Syntaxin* 遺伝子）に照明清灯後3時間後に発現量が上昇するものが見られた（図5）。このことから、ヘミセルロースの形成中細胞壁への供給が夜（暗期）に活発になり、このことが木材細胞壁形成の日周性すなわち暗期にヘミセルロースを主体とする無定形物質が二次壁新生面に多く観察されることと関連している可能性が考えられた。しかし、日周発現の発現ピークは *CjSuSy1* や *CjCesA1* と比べて顕著ではなかった。エキソサイトーシスの遺伝子レベルでの日周性については、新たな遺伝子の単離・解析を含めさらに詳細な解析が必要である。

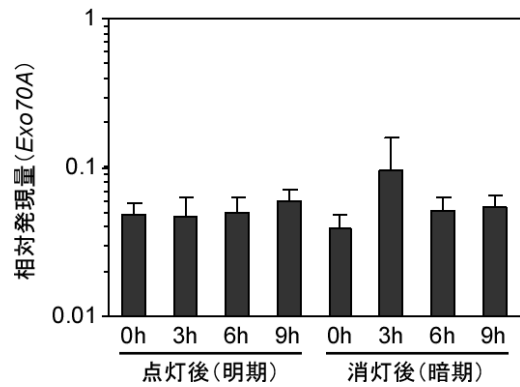


図 5. スギ分化中木部における *Exo70A* 遺伝子の発現量の変動
 エラーバーは標準偏差を示す

CjKUP1 遺伝子は、以前の研究において雄花で発現していることが分かっていたが、今回の解析により分化中木部細胞でも発現していることが新たに分かった。また、*CjKUP1* を発現させた大腸菌 LB2003 株は K^+ 取り込み能が回復した。このことから、*CjKUP1* は内向き整流性（取り込み）の K^+ 輸送機能を持つことが明らかになった。以上の結果から、この遺伝子は細胞内へのカリウム取り込みを制御することにより細胞の膨圧変動に関与している可能性が考えられた。

(2)まとめと今後の展望

これまでの研究では不明であったセルロースの生合成段階での日周性について、遺伝子レベルでの新規の知見を得た。セルロースの生合成（基質生合成、セルロース高分子化）に関わる遺伝子数個に発現の日変動が見られ、針葉樹の木材細胞壁形成におけるセルロースの生合成に日周性が存在する可能性があることが明らかになった。

これまでの研究では不明であったヘミセルロースの生合成段階での日周性について、遺伝子レベルでの新規の知見を得た。グルコマンナンやキシランの生合成（基質生合成、セルロース高分子化）に関わる遺伝子に明確な発現の日変動パターンは見られず、木材細胞壁形成の日周性にはヘミセルロースの生合成以外の段階での日変動が関連していると考えられた。

合成されたヘミセルロースの形成中細胞壁への輸送過程（エキソサイトーシス）に関わる遺伝子数個に発現の日変動が見られた。このことから、ヘミセルロースの輸送段階に日周性が存在し、このことが木材細胞壁形成の日周性に関与する可能性が示唆された。エキソサイトーシスの機構についてはモデル植物でも不明な点が多く、樹木ではほとんど研究されてこなかった。本研究の結果は、針葉樹のエキソサイトーシスに関する知見の蓄積に貢献するものである。

スギ由来の K⁺トランスポーター遺伝子について解析を行い、この遺伝子が分化中木部細胞で発現しており、細胞内へのカリウム取り込みを制御することにより膨圧変動に関与している可能性があることが明らかになった。ミセルロースの輸送・供給と関連がある分化中木部細胞の膨圧変動に関する遺伝子レベルでの新規の知見が得られた。

本研究では、針葉樹（スギ）の木材細胞壁形成の日周性において二次壁新生面の観察を主とした過去の研究では未解明であった部分に関する新規の知見が得られた。今後、この日周性の機構をより詳細に明らかにするためには、さらに細胞壁成分の生合成または分泌・供給に関わる遺伝子の単離と解析を進めていくことが必要である。また、細胞壁形成の日周性を細胞壁中で可視化できれば、これまで不明だった木部細胞が細胞壁を完成させるまでにかかる日数（細胞壁形成速度）の精密な定量法確立への展開が期待できる。それにより、樹木の肥大成長速度と材質との関係をさらに高精度で明らかにでき、木材の生産性や材質の正確な把握、それに基づいた木材の利用促進につなげることも可能となる。本研究で得られた成果は、今後の学問的・実用的木材研究につながるものと期待される。

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）

Hosoo Y, Diurnal periodicity in cell wall formation in conifer wood cells, Journal of the Faculty of Agriculture Shinshu University, 49, 1-9, 2013, 査読有
<http://hdl.handle.net/10091/17022>

〔学会発表〕（計4件）

西脇宏一, 細尾佳宏, スギ由来 KUP 系カリウムトランスポーターの輸送機能の解析, 第4回中部森林学会大会, 2014.10.25, 名古屋大学（愛知県）

岡本知沙子, 細尾佳宏, スギ分化中木部におけるエキソサイトーシスに関わる遺伝子発現の日周性, 信州大学農学部バイオサイエンス若手研究会第3回シンポジウム, 2013.12.2, 信州大学（長野県）

細尾佳宏, 樹木の木質形成メカニズムをミクロなレベルで考える, 信州大学農学部バイオサイエンス若手研究会第2回シンポジウム, 2012.12.3, 信州大学（長野県）

堤野拓馬, 細尾佳宏, 樹木の木部細胞壁形成における成分生合成・供給の日周性, 信州大学農学部バイオサイエンス若手研究会第2回シンポジウム, 2012.12.3, 信州大学（長野県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細尾 佳宏 (Hosoo, Yoshihiro)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：80377184