

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07389

研究課題名(和文)細胞壁ダイナミクスが誘起する物理的バイアスによる細胞形成の制御機構の解明

研究課題名(英文) The mechanical bias induced by cell wall dynamics plays a key role in the regulation of cell morphogenesis in plants

研究代表者

横山 隆亮 (YOKOYAMA, Ryusuke)

東北大学・生命科学研究科・講師

研究者番号：90302083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物の細胞外マトリックス構造(細胞壁)が細胞の形態形成を多面的に制御していることを実証するとともに、各機能発現のための細胞壁構造のダイナミクスと分子制御機構の解明を目指したものである。植物では、細胞壁の自律的な構造変化や外部からの加圧などによる物性変化・物理的バイアスが細胞形成のトリガーになり、さらには細胞極性、細胞の伸展方向、細胞形態を制御する重要な要素になることが示唆されている。本研究では、細胞壁の基本骨格を形成するセルロース・ネットワーク構造を多面的かつ定量的に分析できるイメージング技術の開発によって、多面的な機能を発現する細胞壁の構造ダイナミクスの捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の形態形成は、発生プログラムや環境シグナルによる統御を受け、最終的には細胞壁の強靱性と伸展性という2つの物理的性質の相互変換によって制御される細胞形成に依存している。近年、植物においても、細胞内情報伝達や遺伝子発現の制御機構の研究が飛躍的な進歩を遂げる一方で、細胞壁による細胞形成の分子機構の解明は大きく遅れている。本研究で細胞形成に寄与する細胞壁の機能的構造のダイナミクスを明らかにできたことは、植物の形態形成メカニズムの総合的な理解に繋がるものであり、この研究成果は、学術的に意義があるだけでなく、農業における品種改良などでも大きな社会貢献に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cell wall dynamics have been shown to play a key role in the regulation of cell expansion in plants. However, cell wall dynamics results not only in cell wall relaxation, but also in a highly biased pattern of cell wall mechanics. The mechanical bias due to the dynamic structure of cell wall may determine cell polarity and growth patterns, and trigger cell differentiation. In this study, we developed a quantitative confocal imaging method for general use in the study of cell wall dynamics in protoplasts derived from Arabidopsis leaf mesophyll cells. Confocal imaging of regenerating cell walls in protoplasts stained with Calcofluor White M2R allowed us to visualize the cellulose network, the basic framework that functions as the mechanical underpinning of the cell wall. Using the image analysis techniques, we successfully characterized dynamics of the cellulose network, which provides a mechanical bias for functional expression of cell wall in cell morphogenesis.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物細胞壁 プロトプラスト セルロース キシログルカン ネットワーク構造 イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)植物の細胞は、細胞表面を覆う固い細胞壁によって形状が維持される一方、細胞壁の弛緩は細胞伸長を誘起すると考えられている。今日まで、この細胞壁の強靱性と伸展性という2つの物理的性質に着目し、細胞形状の維持と細胞伸長における細胞壁の役割についての研究が進められている。

(2)しかし近年、細胞壁にかかる物理的な刺激によって、細胞の形状変化が促進され、細胞分化などが誘発されることから、細胞壁の物性変化は、細胞伸長だけではなく、細胞形成において多面的な機能を果たしている可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

(1)本研究は、植物において細胞壁が細胞形成を多面的に制御していることを実証し、個々の制御機能を発現する細胞壁の構造とダイナミクスの解明を目指したものである。特に植物の細胞表面を覆う細胞壁は、自律的な構造改変や外部からの加圧などが原因となって物性変化・物理的バイアスを生じることから、この物性変化・物理的バイアスと機能発現との関連に着目した研究を展開する。本研究では、物性変化・物理的バイアスを生じさせるための細胞壁構造とダイナミクスを解明するとともに、この物性変化・物理的バイアスが細胞形成のトリガーになり、さらには細胞極性、細胞の伸展方向、細胞形態を制御する重要な要素になることを証明する。

(2)また細胞壁の機能的構造を構築するために必要な構成多糖や、細胞壁に物性変化・物理的バイアスを誘発する因子を同定することで、細胞壁の機能発現を担う分子制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1)細胞壁構造のダイナミクスと細胞形成との関連性を明らかにするために、シロイヌナズナの葉肉細胞から作成したプロトプラストを実験材料とした細胞再生の実験系を利用した。

(2)細胞壁の機能的構造の構築プロセスとダイナミクスを定量的かつ多面的に捉えるために、細胞壁の機能的構造の基本骨格を形成するセルロース・ネットワーク構造を可視化し、イメージング技術により、このネットワーク構造を定量的かつ多面的に分析する技術を開発・利用した。さらに細胞壁成分を個別に認識できるモノクローナル抗体などを利用して、他の細胞壁構造についても同様の解析を行った。

(3)細胞壁構造のダイナミクスによる生じる物性変化・物理的バイアスが細胞形成のトリガーとなり、細胞極性、細胞の伸展方向、細胞形態を制御していることを実証するために以下の研究戦略を進めた。イメージング技術を用いて、細胞壁構造と機能発現時の構造ダイナミクスを分析する。細胞壁の構造変化による物性変化や、細胞壁成分の偏在による物理的バイアスが生じる領域を推定する。細胞極性、細胞の伸展方向、細胞形態を解析し、細胞壁による物性変化や物理的バイアスがかかった領域との相関を明らかにする。

(4)逆遺伝学的手法を用いて細胞壁の構成分子や関連タンパク質を欠損させることで、細胞壁の機能発現に必要な構成分子や酵素などを同定し、細胞壁の機能発現の分子制御機構の解明を目指す。

4. 研究成果

(1)プロトプラスト表面のセルロース微繊維をカルコフルオールなどの蛍光色素で染色した後、共焦点レーザー顕微鏡でZスタック画像を獲得し、これらの画像からセルロース・ネットワークの立体像を再構築し、これを平面に投影した2値化画像を使って、セルロース微繊維のネットワークの全体構造の総線量、平均輝度、並行度、分散などを定量的に分析する技術を開発した(図1)。また細胞壁成分を個別に認識できるモノクローナル抗体を利用して、他の細胞壁成分の細胞構造内の局在などを解析した。

(2)前述のイメージング技術を利用して、プロトプラストで再構築するセルロース・ネットワーク構造を経時的に分析することで、細胞壁の機能的構造の基本骨格を形成するセルロース・ネットワーク構造のダイナミクスを捉えることに成功した。プロトプラストにおける細胞壁の再構築過程では、急速にセルロース微繊維が合成されるとともに、幾つものセルロース微繊維がスタッキングす

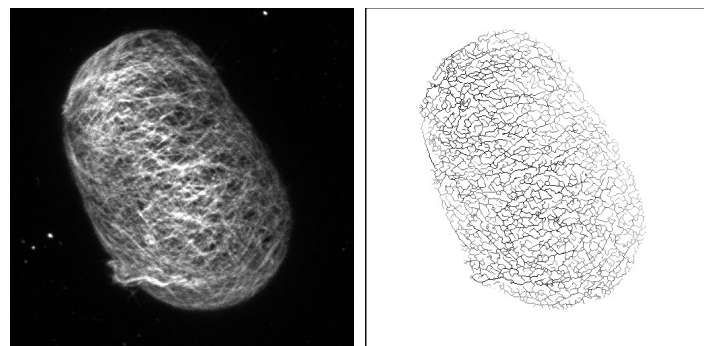


図1 イメージングによるセルロース・ネットワークの定量解析

ことで、さらに強固な太い繊維を形成していた(図2)。さらに細胞壁再構築の初期過程では、セルロース微繊維は細胞表面にランダムに蓄積するため、強固な繊維が交差した強靱なネットワーク構造を形成していた。またこの強靱なセルロース・ネットワーク構造は一樣ではなく、セルロース微繊維の密度に偏りがあることから、細胞壁に物理的バイアスを生じさせているものと推定された。さらに細胞壁構築が進行すると、セルロース微繊維が特定の一方向に対して直角方向に配向するように沈着していく過程が観察された。

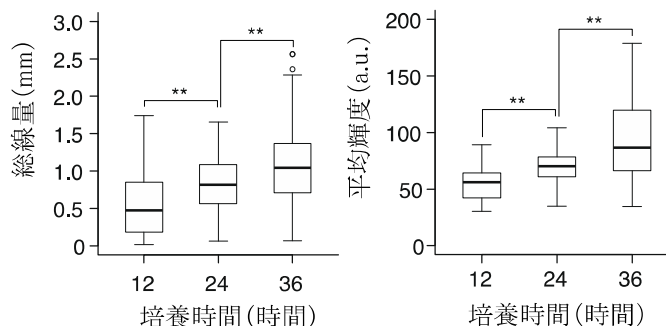


図2 セルロース微繊維の総線量と平均輝度の変化

(3) プロトプラスト表面の細胞

壁再構築の進行に伴い、細胞が球形から極性のある円筒形へと形状を変化させることが確認された。セルロース微繊維が円筒の軸となる方向に対して直角に配向していたことから、セルロース微繊維のランダムな蓄積から方向性を持った蓄積への転換が、円筒形細胞の軸を決めるとともに、細胞の側方向への膨張を抑制し、軸方向へと伸長を規定しているものと考えられた。細胞壁再構築の初期過程で観察されたセルロース微繊維の密度に偏りと細胞の極性などの相関を示す実験結果までは得られなかったが、少なくともセルロース微繊維の蓄積パターンの変化に伴うネットワーク構造と細胞形状の変化と伸長方向との関連性を示す実験結果を得ることに成功した。

(4) 細胞壁の機能発現に必要な細胞壁構造を明らかにするため、細胞壁の各構成成分を合成する酵素を欠損した突然変異体を用いた解析を行った。特に着目すべき細胞壁多糖は、セルロース微繊維間を架橋することで機能的なネットワーク構造を構築すると考えられているキシログルカンであることから、キシログルカンを完全に合成できない *xxt1/xxt2* 突然変異体を用いた研究を優先的に進めた。これまでセルロース微繊維がネットワーク構造を形成するためにはキシログルカンが必要であると考えられていたが、*xxt1/xxt2* のプロトプラストでも野生型と同様のセルロース・ネットワーク構造が形成されることが本研究を通して明らかになった。しかしキシログルカンを欠いたセルロース・ネットワークは、伸展性などの細胞壁の機能を軽減させることも示唆され、主要なヘミセルロースであるキシログルカンは、細胞伸長を促進する細胞壁の弛緩などで重要な役割を担うものと推測された。

(5) すでに当研究室では、プロトプラストの細胞壁再構築過程において細胞壁に相互作用するタンパク質を網羅的に同定していたことから、このデータベースの情報を利用した逆遺伝学的手法によって細胞壁構築に必要な因子の同定を試みた。しかし本実験を通して、セルロース以外の細胞壁多糖の欠失や細胞壁改変に関わる酵素の欠損では、初期過程のセルロース・ネットワーク構造への影響は確認できなかった。この結果は、細胞壁構築の初期段階のセルロース・ネットワーク構造はセルロース微繊維の相互作用によって自律的に形成されることを示唆するものであった。

(6) セルロース分子を繋ぎ換える新規酵素、セルロースエンド型転移酵素 (CET) の単離・同定に成功した。セルロース・ネットワークの基本構造は自律的に構築されるものと考えられたが、セルロース分子間を繋ぎ換えることができる酵素活性の発見によって、基本構造が構築された初期段階以降の細胞壁の機能発現では、CET などの転移酵素によるセルロース・ネットワークのダイナミクスが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

横山隆亮, 植物細胞壁の機能的構造とダイナミクス, アグリバイオ, 査読なし, 3, 2019, 3-47

Yamaguchi N, Jiangbo H, Tatsumi Y, Abe M, Sugano S, Kojima M, Takebayashi Y, Kiba T, Yokoyama R, Nishitani K, Sakakibara H, Ito T, Chromatin-mediated feedforward auxin biosynthesis in floral meristem determinacy, Nature Communications, 査読有, 9, 2018, 5290

doi:10.1038/s41467-018-07763-0

Kuroha T, Nagai K, Gamuyao R, Wang DR, Furuta T, Nakamori M, Kitaoka T, Adachi K, Minami A, Mori Y, Mashiguchi K, Seto Y, Yamaguchi S, Kojima M, Sakakibara H, Wu J, Ebana K, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Yanagisawa S, Yamasaki M, Yokoyama R, Nishitani

K, Mochizuki T, Tamiya G, McCouch SR, Ashikari M, An ethylene-gibberellin signaling underlies adaptation of rice to periodic flooding, *Science*, 査読有, 361, 2018, 181-186
doi:10.1126/science.aat1577

Kuki H, Higaki T, Yokoyama R, Kuroha T, Shinohara N, Hasezawa S, Nishitani K, Quantitative confocal imaging method for analyzing cellulose dynamics during cell-wall regeneration in Arabidopsis mesophyll protoplasts, *Plant Direct*, 査読有, 1, 2017, 1-10
doi:10.1002/pld3.21

Bowman J, Kouchi T,..(106名)..Yokoyama R, ..(4名), Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome, *Cell*, 査読有, 171, 2017, 287-304
doi:10.1016/j.cell.2017.09.030

Hozumi A, Bera S, Fujiwara D, Obayashi T, Yokoyama R, Nishitani K, Aoki K, Arabinogalactan proteins accumulate in the cell walls of searching hyphae of the stem parasitic plants, *Cuscuta campestris* and *Cuscuta japonica*, *Plant and Cell Physiology*, 査読有, 58, 2017, 1868-1877
doi:10.1093/pcp/pcx121

Shinohara N, Sunagawa N, Tamura S, Yokoyama R, Ueda M, Igarashi K, Nishitani K, The plant extracellular enzyme AtXTH3 catalyses covalent cross-linking between cellulose and cello-oligosaccharide, *Scientific Reports*, 査読有, 7, 2017, 46099
doi:10.1038/srep46099

Yokoyama R, Kuki H, Kuroha T, Nishitani K, Arabidopsis regenerating protoplast - a powerful model system for combining proteomics of cell wall proteins and visualization of cell wall dynamics, *Proteomes*, 査読有, 4, 2016, 34
doi:10.3390/proteomes4040034

[学会発表](計 20 件)

石田光南, 黒羽剛, 石崎公庸, 檜垣匠, 榎本悟史, 横山隆亮, 小竹敬久, 西谷和彦, ゼニゴケにおける Endoglucanase16 の機能解析, 第 60 回日本植物生理学会年会, 2019 年

横山隆亮, 加賀悠樹, 加藤萌木, 古井瑛恵, 黒羽剛, 西谷和彦, 佐藤勝也, 大野豊, 炭素イオンビームによる寄生植物ネナシカズラ属の変異体ライブラリ作製, QST 高崎サイエンスフェスタ 2018, 2018 年

加藤萌木, 横山隆亮, 黒羽剛, 大林武, 阿部光知, 西谷和彦, 寄生植物アメリカネナシカズラの花成制御における FT の機能, 日本植物学会第 82 回大会, 2018 年

加賀悠樹, 大林武, 横山隆亮, 黒羽剛, 大谷美沙都, 出村拓, 西谷和彦, 植物種間情報伝達を介したアメリカネナシカズラ吸器における維管束新生機構の探索, 日本植物学会第 82 回大会, 2018 年

Takahashi D, Sampathkumar A, Erban A, Gorka M, Kopka J, Graf A, Yokoyama R, Kuroha T, Nishitani K, Zuther E, Hincha DK, Molecular insights into changes of the extracellular matrix during cold and sub-zero acclimation, 11th International Plant Cold Hardiness Seminar (IPCHS), 2018 年

横山隆亮, 大林武, 鳴川秀樹, 加賀悠樹, 加藤萌木, 黒羽剛, 西谷和彦, アメリカネナシカズラのゲノム解読による寄生植物の適応進化メカニズムの解明, 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年

Narukawa H, Yokoyama R, Obayashi T, Kaga Y, Kato M, Kuroha T, Nishitani K, Insight into strategies for plant-plant parasitism in *Cuscuta campestris* based on genome sequencing, 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年

Yokoyama R, Kuroha T, Kuki H, Shinohara N, Mikami S, Nishitani K, Cell Wall-Related Gene Families in Land Plants, 第 65 回 NIBB コンファレンス, 2017 年

Kato M, Yokoyama R, Kuroha T, Abe M, Nishitani K, Elucidation of the molecular mechanisms controlling flowering in the stem parasitic plant *Cuscuta campestris*, Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017 年

Kaga Y, Obayashi T, Yokoyama R, Nishitani K, A Model for the Molecular Mechanism of Vascular Development in the Haustorium of the Parasitic Plant *Cuscuta Campestris*, Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017 年

Kuki H, Higaki T, Yokoyama R, Kuroha T, Hasezawa S, Nishitani K, Quantitative Imaging Approaches to Mechanisms of Cell Wall Construction Using Arabidopsis Mesophyll Protoplasts, Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017 年

Narukawa H, Kaga Y, Kuroha T, Yokoyama R, Nishitani K, Parasitic Plant-Host Interactions Control Endoreduplication-Mediated Cell Expansion During Haustorial Development of the Holoparasitic Plant, *Cuscuta Campestris*, Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017 年

九鬼寛明, 桧垣匠, 篠原直貴, 横山隆亮, 黒羽剛, 三上慎吾, 馳澤盛一郎, 西谷和彦, 細胞壁イメージングと新規の酵素機能の解析に基づく新しい細胞壁高次構造モデルの提案, 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年

鳴川秀樹, 加賀悠樹, 横山隆亮, 黒羽剛, 西谷和彦, 茎寄生植物ネナシカズラにおける宿主由来エチレンを介した吸器発生メカニズム, 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年

横山隆亮, 大林武, 鳴川秀樹, 加賀悠樹, 加藤萌木, 黒羽剛, 西谷和彦, 比較ゲノム解析から見えてきた茎寄生植物ネナシカズラの形態形成メカニズム, 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年

西谷和彦, 横山隆亮, 大林武, 鳴川秀樹, 柴田航希, 加賀悠樹, 加藤萌木, 黒羽剛, 倉田哲也, 堀江佐知子, 牧雅之, 山田和範, 青木裕一, 田高周, 成瀬孝史, 西羽美, 木下賢吾, 青木考, 阿部光知, 出村拓, 吉田聡子, 白須賢, 長谷部光泰, 星野敦, 榊原康文, 若杉達也, 山田恭司, ネナシカズラのゲノムから読み解く茎寄生の生命戦略, 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年

九鬼寛明, 桧垣匠, 横山隆亮, 馳澤盛一郎, 西谷和彦, プロトプラスト細胞壁再生系:細胞壁構築プロセスの可視化・定量化のためのツール, 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年

篠原直貴, 砂川直輝, 田村理, 横山隆亮, 上田実, 五十嵐圭日子, 西谷和彦, XTH の新規機能に基づく新しい植物細胞壁像, 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年

九鬼寛明, 桧垣匠, 横山隆亮, 馳澤盛一郎, 西谷和彦, 細胞壁再生イメージング解析法:細胞壁動態解明への新しいアプローチ, 東北植物学会第 6 回大会, 2016 年

Yokoyama R, Nishitani K, A bioinformatics approach to the identification, classification, and characterization of cell-wall-related gene families yields evolutionary insights into plant cell walls, XIV Cell Wall Meeting, 2016 年

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/nishitani_lab/

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：西谷 和彦

ローマ字氏名：(NISHITANI, kazuhiko)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院生命科学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：60164555

研究協力者氏名：黒羽 剛

ローマ字氏名：(KUROHA, takeshi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院生命科学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：50415155

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。