

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07402

研究課題名(和文) テンションウッド誘導系を用いたG層形成のマスター制御因子の探索

研究課題名(英文) Searching for the master regulator of G layer formation using the tension wood induction system

研究代表者

久保 稔 (Kubo, Minoru)

熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・特任講師

研究者番号：30342778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：テンションウッド(引張あて材)は、地面の傾斜や風雨等により倒れた樹幹を重力に逆らって起立させるための特殊な木部組織である。しかし、この形成過程の分子機構の多くは未だ明らかになっていない。そこで本研究では、プラスチックのポット内で育成したポプラ挿し木苗を利用し、効率的に短期間でテンションウッドを形成させる実験系を構築した。この実験系のテンションウッド形成過程において、継時的に網羅的遺伝子発現解析を行った結果、1880個の発現変動遺伝子を検出し、これらを階層クラスタリングすることで、テンションウッド形成過程において特異的な発現上昇を示す遺伝子を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テンションウッド(引張あて材)は広葉樹が倒れた場合、その姿勢を立て直すために作る特殊な木部組織であり、G層と呼ばれる純度の高いセルロースを作り出し、木部に蓄積する。しかし、それがどのように作られるかはほとんど明らかになっていない。純度の高いセルロースは糖化効率に優れる事から、テンションウッドの形成機構を明らかにすることで、これを効率的に産生する樹木を開発することが可能となり、バイオマスエネルギー資源の有効的な活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Tension wood (TW) is a special wood structure of hard woods that is formed in a fallen tree. However, the molecular mechanism of TW formation has been only partly clarified. Using in vitro cultured poplar, the TW formation induction system was developed, and then, transcriptome analysis were performed. As a result, 1880 differentially expressed genes were detected, of them, TW-specific genes were identified.

研究分野：植物分子・生理

キーワード：テンションウッド 細胞壁 G層 網羅的遺伝子発現解析 ポプラ 次世代シーケンシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1 研究開始当初の背景

一部の広葉樹に見られるテンションウッド(引張あて材)は、地面の傾斜や風雨等により倒れた樹幹を起立させるための支持構造となる特殊な木部組織である。ここでは重力に逆らっておこる幹の屈曲、倒れた幹の上側にある木部組織の偏心生長、さらにそこに位置する木部繊維細胞における高純度セルロース繊維からなるG層の蓄積など、一連の特徴的な現象・構造が観察される。これまでの研究で、重力/張力の感知や木部組織の偏心成長の活性化にはそれぞれオーキシン、エチレンがすることが報告されている。また木部繊維細胞の形成にはマスター制御因子としてSND1/NST3転写因子が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。さらに、いくつかの樹種において、テンションウッドを形成する木部組織とその反対側に位置する木部組織、または通常の木部組織をサンプリングし、その網羅的遺伝子発現解析が行われており、テンションウッドで顕著に発現が上昇する遺伝子が報告されている。しかし、通常の野外や圃場で育成している樹木について、テンションウッド形成の継時的な観察及び、解析を行うことは難しく、そのため、どのような分子機構がこの形成過程に参与するかは断片的な情報しか得られていなかった。

## 2 研究の目的

本研究課題ではテンションウッド形成の分子機構を明らかにするために、短期間でかつ、均一な試料を準備できるポプラ挿し木苗の無菌培養系を利用し、再現性の高いテンションウッド誘導実験系の構築を行う。この系においてはテンションウッド形成の特徴である、重力に逆らった屈曲、倒れた幹の上側の木部における偏心成長、木部繊維細胞におけるG層の蓄積を継時的に観察し、これらの特徴がどのようなタイミングでおこるかを決定する。さらに、テンションウッド形成部位のみを用いた継時的な網羅的遺伝子発現解析を次世代シーケンサーを用いて行うことで、継時的な遺伝子発現データを取得し、テンションウッド形成過程における遺伝子発現ネットワークを構築する。すでに報告されている二次木部形成の遺伝子発現ネットワークと比較し、テンションウッド形成に特異的な遺伝子群を抽出する。加えて、ポプラで誘導的に遺伝子発現ができるベクター系を利用し、上記で得られたテンションウッド形成特異的遺伝子群をポプラ培養細胞において発現させ、G層形成の有無を指標にG層形成のマスター制御因子の探索を行う。

## 3 研究の方法

以下に掲げる研究を計画した。

- 1) ポプラ挿し木苗のテンションウッド形成過程における網羅的遺伝子発現解析
- 2) 木部繊維細胞分化誘導系の構築
- 3) テンションウッドマーカー株の作成
- 4) G層形成のマスター制御因子の探索

## 4 研究成果

1) ポプラ挿し木苗のテンションウッド形成過程における網羅的遺伝子発現解析  
無菌的にポット栽培した交雑ポプラ T89 株の挿し木苗をポットごと傾斜させ、テンションウッド形成過程について幹の横断面・縦断面の観察を行った。その結果、傾斜後12時間で茎の屈曲が観察され、傾斜後4日目から屈曲部から基部にかけて幹の上面側の木部において、一様に偏心成長が観察された。さらに、傾斜後21日目以降ではテンションウッドの特徴であるG層形成が観察された。傾斜後0、4、7、14、21日目のポプラ挿し木苗のテンションウッド形成側木部(TW)と傾斜させていないポプラ木部(NW)のサンプルからRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成後、次世代シーク

エンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、1880 個の発現変動を示す遺伝子を検出した。これらを用いて階層クラスタリングを行ったところ、9 つのクラスタのうち、クラスタ 1、クラスタ 4、クラスタ 7 において、傾斜後 4-21 日目にかけてテンションウッドで特異的に発現上昇を示す遺伝子群を見いだすことができた。これらのクラスタにおいてはそれぞれ 109、258、233 遺伝子が含まれていた。特にクラスタ 7 においては、これまでにテンションウッドに顕著に発現することが報告されているファシクリン様アラビノガラクタンタンパクが有意に濃縮されていることがわかった。

## 2) 木部繊維細胞分化誘導系の構築

既存のグルココルチコイドレセプター (GR) 誘導系はカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーターを用いて目的の GR 融合タンパクを発現させるが、ポプラでは 35S プロモーターの発現誘導能が低いこと、全ての細胞・組織での発現が見られないことが報告されている。そこでゲノム情報が公開されているポプラの 1 種 *Populus trichocarpa* から、恒常的発現が報告されているユビキチン、GSK3 遺伝子についてプロモーター領域をクローニングし、これを用いて、新規の GR 誘導系ベクターを構築した。このベクターに、核移行シグナルを持つ GFP-GUS 融合タンパク (NLS-sGFP-GUS: NGG) 遺伝子または、木部繊維細胞形成のマスター制御因子 SND1/NST3 転写因子のポプラのオソログである PtVNS11 遺伝子を組み込んだプラスミドを作成し、ポプラに形質転換を行なった。まずギンドロ培養細胞に pop58:PtVNS11-GR、CE3:PtVNS11-GR を発現するコンストラクトを形質転換したが、形質転換体は得られなかった。原因としてギンドロ培養細胞では形質転換体を選別するハイグロマイシン耐性遺伝子が機能していない可能性が考えられた。次に、交雑ポプラ T89 株に木部繊維細胞誘導系のコンストラクトを形質転換した。結果として、pop58:PtVNS11-GR 形質転換ポプラ 17 個体、CE3:PtVNS11-GR 形質転換ポプラ 19 個体、pop58:NGG-GR 形質転換ポプラ 42 個体、CE3:NGG-GR 形質転換ポプラ 26 個体を得た。これら形質転換体における導入遺伝子の発現量を RT-PCR で確認したところ、pop58 プロモーターを用いた形質転換体の方が、CE3 プロモーターを用いた形質転換体よりも高い発現量を示していた。また、これら形質転換体の葉を DEX もしくは DMSO で処理し、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った結果、DEX 処理をした pop58:PtVNS11-GR 形質転換ポプラ 2 個体において、異所的な二次細胞壁の蓄積が観察された。しかし、再現性に乏しく、これらの形質転換体における二次壁蓄積の誘導には、葉の生長具合や繊維細胞誘導条件の検討が必要であると考えられる。またこれらにおいて DEX 添加時における網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、PtVNS11 の制御下にある遺伝子について、それらの一部でしかその発現上昇が見られなかった。最近、ポプラにおいて *PtVNS09,10,11,12* 遺伝子の四重変異体では、木部繊維細胞の二次細胞壁が顕著に減少することが報告されたことから、PtVNS11 を含めたこれらの遺伝子は繊維細胞のマスター制御因子として機能することが示唆された。これらの結果から、今回用いた PtVNS11 以外の PtVNS09,10,12 を用いることで木部繊維細胞誘導系を構築することができるかもしれないと考えられる。

## 3) テンションウッドマーカー株の作成

ポプラ挿し木苗のテンションウッド誘導過程での継時的な RNA-seq 解析の結果から、通常木部での発現が低く、G 層形成時に特異的な発現上昇を示す 11 個の遺伝子を選定した。これらについて、コーディング領域 (CDS) とプロモーター領域を特定し、プロモーター配列に GUS 遺伝子をつなげた G 層マーカーコンストラクトの作成を行った。そのうち、ファシクリン様アラビノガラクタンタンパクをコードする FLA12 遺伝子のプロモーター-GUS のコンストラクトを交雑ポプラ T89 株に形質転換し、複数の形質転換体を得ることができた。これらの形質転換体では、GUS 発現は観察されるものの、テンションウッド特異的な GUS 発現は観察されなかった。この結果から、コン

ストラクト作成に用いたプロモーター配列だけではテンションウッド特異的な発現には十分でないことが示唆された。

#### 4) G 層形成のマスター制御因子の探索

1) の網羅的遺伝子発現解析のデータをクラスタリングした結果、クラスタ 1、クラスタ 4、クラスタ 7 において、テンションウッドが形成される木部組織特異的に発現上昇を示すそれぞれ、10 個、12 個、11 個の転写因子を同定することができた。今後、これらについて、エストロジェン誘導系を用いたコンストラクトを作成し、交雑ポプラ T89 株における形質転換体を作成することで、ポプラ挿し木苗を用いたテンションウッド誘導系での異所的発現を行うことで、テンションウッド形成における機能を明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 青木隆之介、時田勝広、大谷美沙都、久保稔、出村拓
2. 発表標題 テンションウッド形成機構の解明に向けた木部繊維細胞誘導系の開発
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木隆之介
2. 発表標題 交雑ポプラT89における木部繊維細胞誘導系の作製
3. 学会等名 第12回細胞壁研究者ネットワーク定例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minoru Kubo
2. 発表標題 Dissecting tension wood formation of in-pot cultured poplar with RNA-seq
3. 学会等名 International Symposium on Forest Tree Molecular Biology and Biotechnology 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsuhiro Tokita, Nana Kawakubo, Ryosuke Sano, Ryunosuke Aoki, Misato Ohtani, Minoru Kubo, Taku Demura
2. 発表標題 Transcriptome analysis of tension wood formation using in-pot cultured poplar
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 時田勝広、佐野亮輔、大谷美沙都、久保稔、出村拓
2. 発表標題 ポブラ挿し木苗ポット培養系を用いたテンションウッド形成過程の網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本植物学会第80回大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	出村 拓  (Demura Taku)		