

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14954

研究課題名(和文)単一細胞直接可視化法による樹木細胞分化機構の新規イメージング解析技術の開発

研究課題名(英文)Development of new imaging methods to analyze the mechanism of cell differentiation in trees by direct visualization of single-cell

研究代表者

船田 良 (Funada, Ryo)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20192734

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究課題では、交雑ポプラなど樹木の培養細胞から複雑な細胞壁構造を有する二次木部様細胞へ直接分化する新規モデル系を開発した。管状要素への誘導率や形状を制御するため、培地の植物ホルモン条件を確立した。また、トチノキのカルスから誘導した管状要素は、細胞全体の厚い二次壁とせん孔様の構造を有しており、複雑な細胞壁形成機構を解析する優れたモデル系であるといえる。GFP遺伝子と微小管付随タンパク質をコードする遺伝子を発現させて、交雑ポプラの単一培養細胞における微小管の挙動を高精細共焦点レーザー顕微鏡法を用いて連続的に可視化した。微小管の消失や局在が、壁孔など細胞壁構造のパターン形成を制御しているといえる。

研究成果の概要(英文):In order to understand fully the mechanism of xylem differentiation in trees, new differentiation system that could induce formation of secondary xylem-like tracheary elements was developed from calli of *Populus sieboldi* × *P. grandidentata* and *Aesculus turbinata*. Induced tracheary elements formed broad regions of thick cell walls, bordered pits and perforations that showed typical features of vessel elements and tracheids. Our new in vitro system allows the detailed analysis of the process of differentiation of secondary xylem. In addition, the orientation and localization of microtubules was visualized using stable expression of genes for microtubule-associated proteins with green fluorescent protein in a single differentiating tracheary element by real-time imaging techniques. The microtubules play an important role in the determination of pattern of cell wall structure.

研究分野：木質科学

キーワード：木質バイオマス 細胞分化 生体イメージング 細胞壁 微小管 管状要素 培養細胞 セルロース・ミクロフィブリル

### 1. 研究開始当初の背景

木材など木質バイオマスは、樹木の形成層が生産する仮道管や道管要素など二次木部の集合体であることから、形成層細胞の分裂や形成層由来の細胞の分化過程は木質バイオマスの量や質を決定する。二次木部細胞の形態や組織構造に関しては、各種顕微鏡を駆使した研究により、これまでに多くのことが明らかにされている。しかしながら、二次木部細胞の分化制御機構に関する細胞生物学や分子生物学的知見は十分ではない。樹木の二次木部細胞の分化制御機構に関する知見が十分ではない理由のひとつとして、樹幹内部に存在する形成層細胞や分化中細胞を直接可視化することが困難であることがあげられる。一方、植物細胞の分化制御機構に関しては、モデル草本植物であるヒヤクニチソウやシロイズナズナなどの培養細胞を用いて精力的に研究が行われており、多くの成果が得られている。それに対し、二次木部細胞に関しては、細胞分化に関する優れた *in vitro* 実験系が確立されていないため、十分な知見が得られていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

形成層細胞由来の分化中二次木部細胞は、厚い二次壁や壁孔など構造が高度に制御された細胞壁を形成する。微小管やアクチンフィラメントなど細胞骨格は、細胞分裂やセルロース合成酵素が動く方向や局在など細胞分化を制御すると考えられており、細胞壁構造の制御機構を理解するには、細胞骨格の解析が重要である。しかしながら、細胞骨格による有縁壁孔やせん孔など複雑な細胞壁構造の制御機構については、不明な点が多い。また、細胞骨格自体の配向や局在の制御機構も十分に明らかにされていない。

そこで本研究課題では、樹木培養細胞から二次木部様細胞へ高頻度で直接分化する新規モデル系を確立する。さらに、細胞壁構造のパターン形成を制御する微小管など細胞骨格の関連遺伝子と Green Fluorescence Protein (GFP) 遺伝子を導入した培養細胞を作成し、高精細共焦点レーザー顕微鏡法を駆使して細胞骨格の動的変化をリアルタイムで解析し、単一細胞直接可視化法を確立する。樹木細胞における新規生体イメージング解析技術の開発にチャレンジすることは、細胞壁形成過程など細胞分化制御機構を明確にする上で重要であり、木質科学に新しい研究領域を提案することになるといえる。

### 3. 研究の方法

ゲノム解析が進んだポプラおよび有用樹種であるスギのシュート、葉、種子からカルスを誘導するため、各試料をMurasige and Skoog基本培地に植え付けた。また、トチノキの葉柄部分からもカルスを誘導した。培養細胞が充分増殖して細胞塊になったら、細胞分裂を停止させ分化を開始させた。分化の開始には、

何らかのシグナルが必要と考えられる。そこで、1)異なる種類のオーキシン処理、2)脱オーキシン処理、3)オーキシンとブラシノステロイドなど他の植物ホルモン処理、4)低温や乾燥処理、などを行って、培養細胞から管状要素への誘導を試みた。カルスの一部を偏光顕微鏡で観察し、管状要素面積率(管状要素誘導率)を算出した。

交雑ポプラのカルスに、GFPと微小管付随タンパク質(microtubule-associated protein; MAP)の遺伝子(GFP-MAP4遺伝子)を保有するアグロバクテリウムを散布して共存培養を行った。その後、液体培地で洗浄し、カナマイシンを含む培地で形質転換培養細胞を選抜した。選抜した細胞は、抗生物質培地に移し替え、安定増殖させた。GFP融合タンパク質を発現させた培養細胞の細胞塊深部を高精細共焦点レーザー顕微鏡法によりイメージング解析し、微小管の配向や局在の動的解析を行った。さらに、培養細胞を微小管に対する抗体を用いて蛍光抗体染色を行い観察を行った。また、細胞壁のセルロース・マイクロフィブリルの配向や局在を、共焦点レーザー顕微鏡や偏光顕微鏡で解析し、微小管の局在との一致性を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 樹木の培養細胞からの管状要素の誘導

交雑ポプラのカルスを誘導し、植物ホルモン処理などを行い、管状要素への誘導を行った。共焦点レーザー走査顕微鏡など各種顕微鏡を用いて細胞の構造を調べたところ、厚い二次壁の局所的な堆積が認められた。また、有縁壁孔など、仮道管や道管要素などに類似した細胞壁構造を有する二次木部様細胞を直接誘導することが出来た。そこで、交雑ポプラ培養細胞から管状要素への誘導への植物ホルモン条件、特にオーキシンの種類の違いによる管状要素の誘導率の違いを解析した。その結果、交雑ポプラ培養細胞の管状要素分化にはオーキシンとブラシノステロイドの存在が必須であった。また、オーキシンの極性移動が、管状要素への分化に必須であった。さらに、オーキシンの一種である2,4-Dが添加された管状要素誘導培地では、高濃度の2,4-Dが交雑ポプラ培養細胞の管状要素への分化を抑制し、管状要素誘導率は低かった。一方、同じくオーキシンの一種であるNAAの添加は高濃度であっても高い管状要素誘導率を示した。細胞への残留性や細胞間の輸送様式に違いがある2,4-DとNAAでは、管状要素への誘導率が異なることが明らかになった。さらに、NAAにジベレリンを添加すると二次木部様細胞のサイズが増大するなど、二次木部様細胞への直接誘導系の最適条件に関する新知見を得た。

トチノキの葉柄部分からカルスを誘導した。増殖性の高い交雑ポプラのカルスとの共存培養を試みた結果、カルスの増殖性が向上した。カルスをブラシノライドとNAAを組み

合わせた培地に移し、管状要素の誘導を行ったところ、カルス中に管状要素が認められた（図1）。誘導された管状要素は二次壁が網紋肥厚しており、一次木部様細胞が誘導されたといえる（図1；上図）。一方、細胞全体に広い二次壁を形成し、壁孔の構造とは明らかに異なる大きな孔が開いた、せん孔様の構造をもつ管状要素も観察された（図1；下図）。また、せん孔様の構造を単一細胞内で複数もつ管状要素も観察された。さらに、複数の管状要素間にせん孔様の構造をもつ管状要素も形成された。以上の結果より、トチノキ葉柄由来のカルスから、道管要素の特徴である厚い二次壁とせん孔を形成する二次木部様細胞を誘導することに成功したといえる。

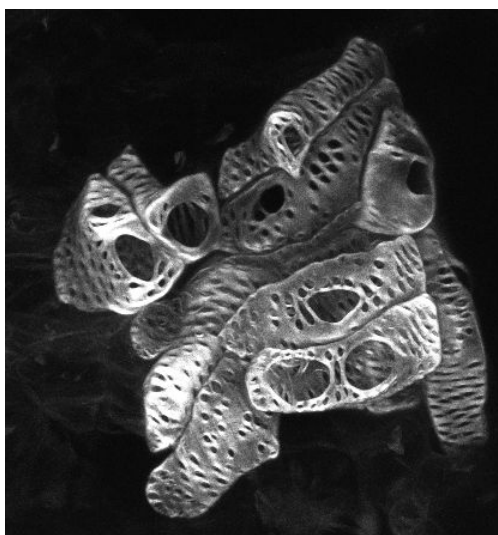
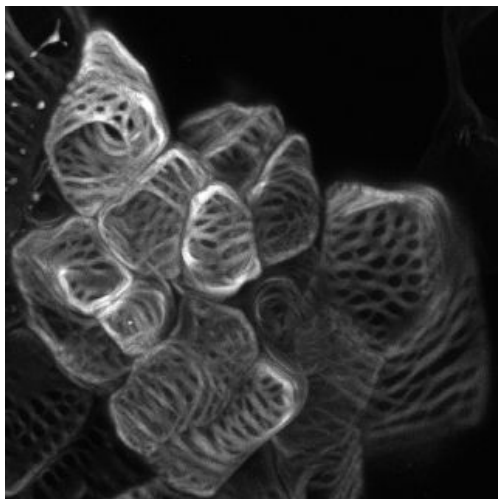


図1 トチノキ培養細胞から直接誘導された管状要素。一次木部様の管状要素（上図）とせん孔様の構造をもつ二次木部様の管状要素（下図）が形成された。

トチノキのカルスから誘導された管状要素の面積率は、NAAとサイトカイニンであるBAPを添加した増殖培地では低かったのに対し、ブラシノライドとNAAを組み合わせる添加した培地では増加した。一方、NAAやブラ

シノライドを単独添加した培地や、増殖培地に含まれる濃度のNAAとBAPにブラシノライドを組み合わせる添加した培地では、増殖培地と比較して管状要素面積率の向上が認められなかったことから、トチノキカルスの管状要素分化誘導にはNAAとブラシノライドの両者の添加が有効であることが明らかになった。

本研究課題により、トチノキの葉柄由来のカルスから誘導された管状要素は、道管要素の様に複雑な細胞壁パターンをもつ二次木部の分化制御機構を理解するための優れたモデル系であるといえる。

（2）管状要素における細胞骨格の動的解析

GFP-MAP4遺伝子を導入した交雑ポプラのカルスを共焦点レーザー走査顕微鏡下で観察すると、微小管由来の蛍光が観察された（図2）。増殖中のカルスにおいては、微小管の配向はランダムであったが、分化が開始すると微小管の配向は、一定方向への動的な変化や局在が認められた。管状要素への分化初期段階のカルスにおいて、微小管の部分的な消失が認められた。微小管が消失した部分では、セルロース・ミクロフィブリルの堆積が起こらず、その結果壁孔が形成されると考えられる。管状要素の分化がさらに進むと、微小管の配向性は高くなった。微小管を示す蛍光シグナルは、二次壁が堆積する位置に局在した。さらに、微小管の消失部分の周囲への微小管の局在によって、発達した壁孔が形成された。したがって、微小管の部分的な消失と局在が壁孔など複雑な細胞壁構造の形成を高度に制御しているといえる。

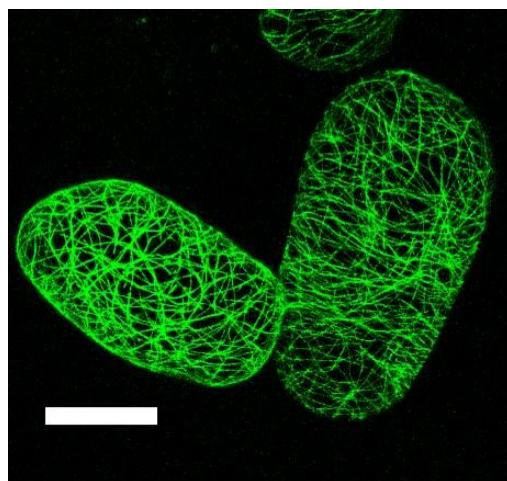


図2 交雑ポプラ培養細胞から分化した管状要素のいける微小管の配向。将来壁孔が形成される位置の微小管が局部的に消失している（右の細胞）

本研究課題では、仮道管や道管要素など二次木部細胞の分化機構を詳細に理解するため、樹木培養細胞から複雑な細胞壁構造を有

する二次木部様細胞へ直接分化する新規モデル系を開発した。さらに、細胞骨格である微小管の関連遺伝子と GFP 遺伝子を導入した培養細胞を作成し、細胞骨格の動的変化をリアルタイムで解析できる単一細胞直接可視化法の開発を行った。交雑ポプラのカルスから管状要素への誘導率や形状を制御するため、培地の植物ホルモン条件を検討し、細胞全体に厚い二次壁と有縁壁孔を形成する管状要素を誘導した。また、トチノキのカルスから、細胞全体に厚い二次壁を有する管状要素が誘導された。誘導された管状要素の二次壁の構造を詳細に解析したところ、道管要素に類似した、せん孔様の構造が観察された。トチノキからの培養細胞は、複雑な細胞壁形成機構を解析する優れた新規モデル系であるといえる。一方、GFP 遺伝子と微小管付随タンパク質をコードする遺伝子を発現させて、交雑ポプラの単一培養細胞における微小管の挙動を高精細共焦点レーザー顕微鏡法を用いて連続的にイメージング解析したところ、管状要素への分化に伴い微小管の局在が動的に変化した。微小管の局在は、壁孔など複雑な細胞壁構造のパターン形成を制御しているといえる。本研究課題で得られた知見は、国内や国際学会で多く発表し、論文や著書として広く公開した。

#### 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 5 件)

- 1) Nugroho, W.D., Nakaba, S., Yamagishi, Y., Begum, S., Rahman, M.H., Kudo, K., Marsoem, S.N., Funada, R.: Stem gravitropism and tension wood formation in *Acacia mangium* seedlings inclined at various angles. *Annals of Botany* (2018, in press; DOI 10.1093/aob/mcy056). (査読有り)
- 2) Begum, S., Kudo, K., Rahman, Md H., Nakaba, S., Yamagishi, Y., Nabeshima, E., Nugroho, D.W., Oribe, Y., Kitin, P., Jin H.O., Funada, R.: Climate change and the regulation of wood formation in trees by temperature, *Trees*, 32, 3-15 (2018). (査読有り)
- 3) Yamagishi, Y., Yoshimoto, J., Ide, S., Nakaba, S., Watanabe, U., Funada, R.: Partial desiccation enhances induction of secondary xylem-like tracheary elements from calli of hybrid poplar (*Populus sieboldii* x *P. grandidentata*), *Trees*, 31, 1083-1089 (2017). (査読有り)
- 4) Nakaba, S., Morimoto, H., Arakawa, I., Yamagishi, Y., Nakada, R. Funada, R.: Responses of ray parenchyma cells to wounding differ between earlywood and latewood in the sapwood of *Cryptomeria*

*japonica*, *Trees*, 31, 27-39 (2017). (査読有り)

- 5) Rahman, Md.H., Begum, S., Nakaba, S., Yamagishi, Y., Kudo, K., Nabeshima, E., Nugroho, W.D., Oribe, Y., Funada, R.: Relationship between the earlywood-to-latewood transition and changes in levels of stored starch around the cambium in locally heated stems of the evergreen conifer *Chamaecyparis pisifer*, *Trees*, 30, 1619-1631 (2016). (査読有り)

〔学会発表〕(計 19 件)

- 1) 山岸祐介、鎌田 裕、荒川圭太、佐野雄三、工藤佳世、半 智史、船田 良: トチノキ培養細胞を用いたせん孔をもつ管状要素の分化誘導、第68回日本木材学会大会、京都府立大学(京都)、2018年3月14日。
- 2) MD Hasnat Rahman, Widyanto Dwi Nugroho, Satoshi Nakaba, Yusuke Yamagishi, Shahanara Begum, Sri Nugroho Marsoem, Ryo Funada: Wood formation in tropical trees: understanding the changes in cambial activity in relation to the rainfall pattern in hardwood trees grown in Yogyakarta, Java Island, Indonesia, 第68回日本木材学会大会、京都府立大学(京都)、2018年3月14日。
- 3) 半 智史、船田 良: 心材形成過程の解析への自家蛍光を用いたスペクトルイメージングの応用、第68回日本木材学会大会、京都府立大学(京都)、2018年3月14日。
- 4) 宮田晴香、船田 良、半 智史、橋田 光、小林 真、吉田俊也、高橋直樹: オニグルミ樹幹におけるフェノール含有量の放射方向での変動、第68回日本木材学会大会、京都府立大学(京都)、2018年3月14日。
- 5) 北見夏海斗、Widyanto Dwi Nugroho、半 智史、船田 良: チークの引張あて材における組織学的特徴の解析、第68回日本木材学会大会、京都府立大学(京都)、2018年3月14日。
- 6) 岩見佳奈、乃万 了、伴 琢也、船田 良、半 智史、松下泰幸: カキノキにおける黒色心材様組織の誘導、第68回日本木材学会大会、京都府立大学(京都)、2018年3月14日。
- 7) 吉田裕子、山岸祐介、飛松裕基、梅澤俊明、半 智史、船田 良: 蛍光プローブによるポプラ培養細胞の管状要素誘導系におけるリグニン沈着の可視化、第68回日本木材学会大会、京都府立大学(京都)、2018年3月14日。
- 8) 生越 恵、荒川 泉、船田 良、半 智史: スギにおける周皮の分布と形成過程、第68回日本木材学会大会、京都府立大学(京都)、2018年3月14日。
- 9) 吉永恵理子、Peter Kitin、半 智史、船田 良: オーキシンの移動の制御を目的とした剥皮およびNPA塗布処理による形成層細胞の変化、第68回日本木材学会大会、京都府立大学(京都)、2018年3月14日。
- 10) 平木李奈、秋山佳貴、塚田健太郎、吉田裕子、Nuoendagula, 梶田真也、半 智史、船

田 良：ゲッケイジュのカルス培養およびオイゲノールの分析に関する研究、第68回日本木材学会大会、京都府立大学（京都）2018年3月14日。

11) 船田 良、山岸祐介、半 智史：樹木木部細胞壁の形成機構、平成 29 年度セルロース学会北海道・東北支部セミナー、北海道大学（札幌）2018年2月20日。

12) Kayo Kudo, Yuichiro Oribe, Shahanara Begum, Yusuke Yamagishi, Eri Nabeshima, Md Hasnat Rahman, Satoshi Nakaba, Katsuhiko Takata, Ryo Funada: The pattern of location of the first earlywood vessels in the current year 's xylem in a ring-porous hardwood, *Quercus serrata*, The 9th Pacific Regional Wood Anatomy Conference, Bali (Indonesia), 2017年9月26日

13) Yusuke Yamagishi, Yutaka Kamada, Kayo Kudo, Satoshi Nakaba, Yuzou Sano, Ryo Funada: Tracheary elements in calli of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata*) form perforation plates like structures, The 9th Pacific Regional Wood Anatomy Conference, Bali (Indonesia), 2017年9月26日

14) Ryo Funada, Md Hasnat Rahman, Shahanara Begum, Kayo Kudo, Yusuke Yamagishi, Eri Nabeshima, Widyanto Dwi Nugroho, Sri Nugroho Marsoem, Yuichiro Oribe, Satoshi Nakaba: Regulation of cambial activity in trees: the role of temperature and precipitation, The 9th Pacific Regional Wood Anatomy Conference, Bali (Indonesia), 2017年9月26日

15) 山岸祐介、鎌田 裕、工藤佳世、半 智史、船田 良、荒川圭太、佐野雄三：交雑ポプラ培養細胞を用いた in vitro 管状要素誘導に合成オーキシン NAA および 2,4-D が及ぼす影響、第 67 回日本木材学会大会、九州大学（福岡）2017年3月17日。

16) Md Hasnat Rahman, Shahanara Begum, Kayo Kudo, Takahiro Muraishi, Yusuke Yamagishi, Satoshi Nakaba, Ryo Funada: Effects of the application of exogenous auxin and defoliation on cambial reactivation and xylem differentiation in locally heated stems of *Abies homolepis* seedlings、第 67 回日本木材学会大会、九州大学（福岡）2017年3月17日。

17) 吉田裕子、山岸祐介、半 智史、船田 良：交雑ポプラ培養細胞の管状要素誘導系におけるリグニン沈着過程の解析、第 67 回日本木材学会大会、九州大学（福岡）2017年3月17日。

18) 山岸祐介、吉田裕子、渡辺宇外、半 智史、船田 良、荒川圭太、佐野雄三：交雑ポプラカルスにおける二次木部様管状要素の分化、第 34 回日本植物細胞分子生物学会大会、信州大学（上田）2016年9月19日。

19) Ryo Funada, Shahanara Begum, Kayo Kudo, Md Hasnat Rahman, Yusuke Yamagishi, Eri Nabeshima, Widyanto Dwi Nugroho, Yuichiro Oribe, Satoshi Nakaba: Regulation of wood formation in trees: the role of temperature in cambial activity, International Academy of Wood Science Meeting, Paris (France), 2016年6月3日

【その他】  
ホームページ等  
<http://www.tuat.ac.jp/~keisei/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

船田 良 (Funada Ryo)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：20192734