

令和 元年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18726

研究課題名(和文)新規in vitro誘導系を用いた二次木部管状要素形成における細胞骨格挙動の解析

研究課題名(英文) Analysis of cytoskeleton in formation of secondary xylem-like tracheary elements using new cell differentiation systems in vitro

研究代表者

山岸 祐介 (YAMAGISHI, Yusuke)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：80770247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：木質資源として利用される樹幹は二次木部細胞で構成されることから、二次木部細胞の形成機構の理解は木質資源の効率的な利用や生産の観点から重要である。本研究課題では、二次木部細胞の分化過程を生細胞で解析するために、複数の樹木からの培養細胞の作出と、未分化な細胞から広い面積の二次壁肥厚と有縁壁孔を形成する二次木部様管状要素を誘導する培養条件を明らかにした。さらに交雑ポプラ培養細胞に微小管関連タンパク質及びアクチンフィラメントを標識するタンパク質の導入を行うことで、これら細胞骨格の樹木細胞内における局在と連続的な挙動を蛍光顕微鏡や共焦点レーザー走査顕微鏡下で長期にわたり観察することが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木質資源の本体とも言える樹木の二次木部細胞壁の形成過程を明らかにすることは重要である。本研究課題によって確立された木本植物の管状要素誘導系を用いることで、これまで樹幹から直接採取した試料によって得られていた断片的な情報に加えて、一つの細胞が細胞壁を形成する過程の連続的な情報が獲得できるようになった。また、細胞の固定を伴う染色法によって観察されていた分化中細胞の細胞骨格の挙動についても蛍光タンパク遺伝子導入によって生細胞で連続的に解析することが可能になった。これらの結果から、木質資源の形成と生産制御、特に細胞壁の性質に基づいた育種等に応用が可能な基礎的知見が広く得られるようになったといえる。

研究成果の概要(英文)：Woody stem consists of secondary xylem cells. Therefore, to understand the mechanism of differentiation of secondary xylem cells in woody stem is important to effective utilization and production of woody resources. In this study, we induced calli of some woody plants, and established the culture condition for calli of hybrid poplar, Aesculus turbinata and Picea abies to induce the differentiation of secondary xylem like tracheary elements with highly organized thick secondary cell wall and bordered pits. Moreover, we visualized the dynamics of microtubules and actin filaments in cultured cells of hybrid poplar by expression of some fluorescent protein gene with Agrobacterium mediated gene transformation.

研究分野：樹木細胞生物学

キーワード：二次木部細胞 二次壁 細胞骨格 管状要素 オーキシシン 植物組織培養

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

### 1. 研究開始当初の背景

我々が木質資源として利用する樹幹は二次木部細胞で構成されることから、二次木部細胞の形成機構の理解は木質資源の効率的な利用や生産の観点から重要である。通水を担う細胞である道管要素や仮道管といった管状要素は、一次木部の管状要素がらせん状・網状の二次壁をもつものに対し、二次木部の管状要素は広い面積での二次壁の肥厚や有縁壁孔を形成する。このことから管状要素の二次壁の位置決定には、一次木部と二次木部とで異なる機構が存在すると考えられる。木部細胞の形成を詳細に解析する材料として、ヒャクニチソウやシロイヌナズナの細胞を管状要素へと分化させる *in vitro* 管状要素誘導系がモデル実験系として広く用いられてきたが、これらの実験系で誘導される管状要素は一次木部における構造と類似しており二次木部細胞の分化過程の解析には適していない。また細胞壁の堆積制御に関わる因子として細胞骨格である微小管などの細胞骨格があり、細胞壁の主成分であるセルロースの堆積する配向や局在の制御に関わっているとされるが、二次木部細胞の形成過程における微小管の連続した挙動の解析例はなく、動的な配向・局在の変化とその制御機構は依然十分には理解されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では木本植物である交雑ポプラ培養細胞から二次木部の特徴をもつ管状要素がより高頻度で誘導される培地条件を明らかにする。また、広葉樹とは異なる構造的特徴をもち、仮道管が樹幹の90%以上を占める針葉樹培養細胞について未分化の培養細胞から管状要素が誘導される条件を明らかにする。さらに、細胞壁形成位置決定に関わる細胞骨格である微小管やアクチンの関連タンパク質を蛍光タンパク遺伝子導入により可視化し、二次木部管状要素形成過程における経時的かつ詳細な挙動を明らかにする。以上の達成により、二次木部管状要素の分化過程における細胞の変化、特に細胞壁の肥厚位置の決定に重要とされる細胞骨格の挙動について詳細な知見を得る。

### 3. 研究の方法

#### (1) 交雑ポプラカルスを用いた管状要素誘導条件の検討

材料として東京農工大学苗圃に生育している交雑ポプラ (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*) の葉柄から2006年5月に誘導されたカルスを用いた。

##### 管状要素分化におけるオーキシンの影響

管状要素誘導は継代時期のカルスを誘導培地へ移すことで行った。誘導培地としてブラシノライド 1  $\mu\text{M}$  を添加した MS 培地を用い、またオーキシン輸送阻害剤である1-ナフチルフタラミン酸 (NPA) 及びトリヨード安息香酸 (TIBA) をそれぞれ 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$  の濃度で、それぞれブラシノライド 1  $\mu\text{M}$  と組み合わせて添加した。誘導実験から4週間後、カルスの一部を偏光顕微鏡で観察し[(複屈折を示す細胞の占める面積)/(画像内に細胞の占める面積)] × 100 (%) で示す管状要素面積率を算出した。

##### 増殖培地における合成オーキシンの種類が管状要素誘導に与える影響

カルスの獲得および増殖には植物成長調節物質としてオーキシン 2,4-D 5  $\mu\text{M}$  を添加した MS 固体培地を用い、培地上のカルスを 2,4-D 維持ラインとした。また、2,4-D 維持ラインのカルスを 2,4-D を除き NAA 10  $\mu\text{M}$  を単独添加した同組成の培地に移し換え、4-5 週間隔で5回以上継代培養したカルスを NAA 維持ラインとした。両ラインの培地上での増殖性は同程度であった。管状要素誘導は継代培養時期のカルスを誘導培地へ移すことで行い、誘導培地にはオーキシンとして NAA を 0, 10, 100  $\mu\text{M}$  または 2,4-D を 5  $\mu\text{M}$ 、ブラシノステロイドとしてブラシノライド (BL) 0 または 1  $\mu\text{M}$  を組み合わせて添加した MS 培地を用いた。

#### (2) トチノキカルスを用いた管状要素誘導条件の検討

トチノキ (*Aesculus turbinata*) の葉柄から2013年に誘導されたカルスを用いた。採取し、滅菌後培地に植え付けた。誘導・増殖培地には改変 MS 培地(窒素のみ半量)を用い、L-glutamine を 25 g/L、Casamino acid を 50 g/L になるよう添加し、植物成長調節物質としてオーキシン 2,4-D を 5  $\mu\text{M}$ 、サイトカイニンとして BAP 5  $\mu\text{M}$  を組み合わせて添加した。管状要素誘導培地には、誘導・増殖培地から植物ホルモンのみを変更し、オーキシンとしてナフチル酢酸 (NAA) 0, 5, 25  $\mu\text{M}$ 、サイトカイニンとしてベンジルアミノプリン (BAP) を 0, 5  $\mu\text{M}$ 、ブラシノステロイドとして BL を 0, 1  $\mu\text{M}$  を組み合わせて添加した培地を用いた。

#### (3) 針葉樹カルスの作出

ヨーロッパトウヒ (*Picea abies*) 成熟種子 (C622 と C814 の2系統、林木育種センター北海道育種場で2012年採取。森林研究・整備機構ジーンバンク事業による配布) を用いた。2016年7月13、15、18に滅菌水に1晩浸漬させ膨潤させた種子を、70% 2-プロパノールに1分間、3% 次亜塩素酸溶液 500 ml に対し tween 20 を数滴加えた液に5分間浸漬することで表面を殺菌した。その後クリーンベンチ内に移し滅菌水で洗浄し、メスで成熟種子胚を摘出した。カルス誘導培地として、スクロース 30 g/L とゲランガム 3 g/L を加え、pH 5.8 に調整した窒素源半量の MS 固体培地を用いた。植物成長調節物質としてオーキシン 2,4-D 0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$  とサイトカイニン BAP を 0, 5  $\mu\text{M}$  を組み合わせて添加した。

#### (4) 交雑ポブラカルスへの蛍光タンパク遺伝子導入による細胞骨格の可視化

微小管を構成するタンパクであるチューブリン TUA、TUB、または微小管結合タンパク質 MAP4 と微小管の伸長端に特異的に結合するタンパク質である EB1 またはアクチンを標識する Life-act が発現するよう構築された遺伝子を、アグロバクテリウム法を用いて交雑ポブラカルスに導入した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 交雑ポブラカルスを用いた管状要素誘導条件の検討

###### 管状要素分化におけるオーキシンの影響

誘導から 4 週後の段階でブラシノライド単独添加培地 (Control) DMSO 添加培地で培養したカルスにおいては偏光下で複屈折を示し、局所的に二次壁が肥厚した管状要素が多数観察された。一方オーキシン輸送阻害剤を添加した培地のカルスでは、NPA 添加では 25  $\mu\text{M}$  以上の濃度で、TIBA 添加では今回設定した全ての濃度で管状要素面積率が阻害剤を含まない培地のカルスに比べ有意に低い管状要素面積率を示した (図)。また、阻害剤を高濃度で添加した培地上で誘導された管状要素の面積は、阻害剤を含まない培地で誘導された管状要素と比較して有意に低い値を示した。これは一定以上の面積をもつ管状要素が阻害剤を添加した培地で培養したカルスからは誘導されなかった事に起因すると考えられる。以上の結果から、オーキシンの極性輸送が交雑ポブラカルスにおける管状要素分化の開始と、細胞の拡大に寄与している事が明らかになった。

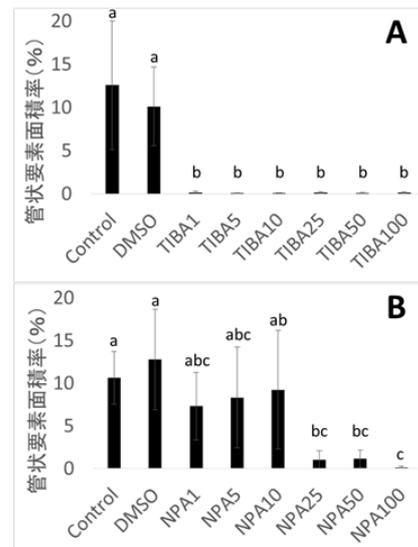


図. 異なる濃度のオーキシン輸送阻害剤添加がポブラ培養細胞の管状要素分化へ与えた影響 (A)TIBA処理 (B)NPA処理  
バーは標準偏差、アルファベットは平均値に対する多重比較の結果を示した

##### 増殖培地における合成オーキシンの種類が管状要素誘導に与える影響

2,4-D 維持ライン、NAA 維持ラインともに 2,4-D が添加された管状要素誘導培地では低い管状要素面積率を示した。高濃度の 2,4-D が交雑ポブラ培養細胞の管状要素の分化を抑制したとみられる。一方、NAA の添加は高濃度であっても 2,4-D 添加と比べて高い管状要素面積率を示した。2,4-D 維持ラインは BL 単独添加培地 (BL1) で最も高い管状要素面積率を示したのに対し、NAA 維持ラインの管状要素誘導には BL に加え NAA の組み合わせ添加が必要であった。本結果から、交雑ポブラ培養細胞の管状要素分化にはオーキシンの存在が重要な役割を担っており、2,4-D 維持ラインではカルス内に増殖培地由来の 2,4-D が低濃度で残留していたのに対し、NAA 維持ラインでは細胞内のオーキシン濃度が管状要素分化に不十分な濃度であったと考えられる。

##### (2) トチノキカルスからの管状要素誘導

誘導前のトチノキカルスにおける管状要素画像面積率は 1%以下であったのに対し、NAA と BL を組み合わせて添加した培地で 4 週間培養後では、面積率は 6%と有意に向上した。また誘導された管状要素には、広い二次壁肥厚部分に道管要素の特徴であるせん孔様の構造が観察された。トチノキ葉柄由来のカルスは安定的な増殖維持が可能であり、またせん孔様の構造を形成する管状要素が誘導されることなどから、植物の通水経路として重要な道管要素のせん孔形成機構を理解するための優れたモデルとして活用が期待できる。

##### (3) ヨーロッパトウヒカルスの作出

ヨーロッパトウヒの成熟胚を植え付けた培地のうち、植物成長調節物質として 2,4-D 20 $\mu\text{M}$  を添加した培地においてカルスの形成および増殖が最も活発であった。カルス内の管状要素面積率は約 5%でありそのうちと針葉樹仮道管の特徴である有縁壁孔を持つ二次木部様の細胞が約 5 割を占めていた。さらに誘導されたヨーロッパトウヒカルスは非常にほぐれやすく数細胞レベルでの観察が行いやすい、比較的増殖が良く安定的な維持が行いやすいなど、針葉樹の管状要素の分化過程を解析する材料として優れた性質を示した。一方で、管状要素の誘導量は既存のモデル実験系に対して低く、今後誘導培地条件の検討による誘導率の向上が求められる。

##### (4) 交雑ポブラカルスへの蛍光タンパク遺伝子導入による細胞骨格の可視化

アグロバクテリウム法により遺伝子導入を行ったところ、抗生物質培地上で複数のコロニーが選抜され、一細胞中で微小管関連タンパク質とアクチンが異なる種類の蛍光タンパク質で標識された両者の局在を観察可能な細胞株を作出することに成功した。しかしながら細胞の再選抜に時間を要した事や、管状要素分化過程全体に及ぶような長期の生体観察条件を確立できなかった事から、この形質転換株を用いた長期の管状要素分化過程の解析には至らなかった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

山岸祐介「樹木培養細胞を用いた二次木部様管状要素誘導」アグリバイオ, 11, 1083-1086, (2018)

Yusuke Yamagishi, Joto Yoshimoto, Suzuka Ide, Satoshi Nakaba, Eri Nabeshima, Ugai Watanabe, Ryo Funada.: Partial desiccation enhances induction of secondary xylem-like tracheary elements from calli of hybrid poplar (*Populus sieboldii* x *P. grandidentata*), Trees-structure and function, 31, 1083-1089, (2017) doi: 10.1007/s00468-016-1411-8

### 〔学会発表〕(計12件)

鎌田裕、佐野雄三、荒川圭太、山岸祐介「ヨーロッパトウヒの培養細胞を用いた管状要素分化誘導系の開発」第69回日本木材学会大会、2019年。

玉木健也、佐野雄三、荒川圭太、山岸祐介「組織培養を用いたカツラのクローン増殖条件の検討」第69回日本木材学会大会、2019年。

竹内信吾、佐野雄三、荒川圭太、山岸祐介「カエデ属4種の茎頂を用いたクローン増殖法の検討」第69回日本木材学会大会、2019年。

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「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、2018年。

玉木健也、佐野雄三、荒川圭太、山岸祐介「カツラ・ハルニレの組織培養を用いたクローン繁殖法の検討」第50回日本木材学会北海道支部研究発表会、2018年。

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、2017年。

鎌田裕、荒川圭太、佐野雄三、山岸祐介「交雑ポプラカルスから分化した管状要素の形態」第67回日本木材学会大会、2017年。

山岸祐介「樹木の培養細胞を用いた二次木部様管状要素の分化誘導」第67回日本木材学会大会組織と材質研究会シンポジウム、2017年。

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」9th Pacific Regional Wood Anatomy Conference, 2017.

鎌田裕、荒川圭太、佐野雄三、山岸祐介「ヨーロッパトウヒ培養細胞中に見られた仮道管様の細胞」第49回日本木材学会北海道支部研究発表会、2017年。

玉木健也、佐野雄三、荒川圭太、山岸祐介「多芽体形成を目的とした広葉樹3種の組織培養」第49回日本木材学会北海道支部研究発表会、2017年。

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、2016年

### 〔その他〕

ホームページ等

北海道大学樹木生物学研究室

<https://woodyplantbiology.wixsite.com/woodyplantbiology>

## 6. 研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：高田 直樹

ローマ字氏名：TAKATA Naoki

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。