

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19580183
研究課題名（和文） 樹木培養細胞からの二次木部直接誘導系における細胞骨格のリアルタイム解析
研究課題名（英文） Real-time analysis of cytoskeleton in secondary xylem that is directly induced from cultured cells in trees
研究代表者
船田 良（Funada Ryo）
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授
研究者番号：20192734

研究成果の概要：

木質バイオマスの有効利用のためには、樹木が生産する二次木部の分化制御機構を十分に明らかにすることが不可欠である。本研究では、樹木の未成熟種子、針葉、葉柄、形成層等由来の培養細胞（カルス）から二次木部への高頻度直接導入系を検討した。培養細胞から管状要素が直接誘導され、二次壁の肥厚面積が大きく有縁壁孔を形成するなど、二次木部様細胞の管状要素が認められた。さらに、培養細胞の微小管の配向や局在を連続的に観察し、微小管が細胞壁成分の堆積位置の決定において重要な役割を担っていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・林産科学・木質工学

キーワード：樹木形成層細胞、二次木部、管状要素分化、細胞骨格、微小管、培養細胞

1. 研究開始当初の背景

循環型社会の構築のためには、バイオマスの有効利用の促進が重要課題である。木質バイオマスは、樹木の形成層が生産する二次木部の集合体であることから、形成層活動の違いは二次木部細胞の生産量を決定する。また、木材の比重や強度など材質特性は、形成層細胞由来の二次木部細胞の形態や細胞壁構造と密接な関連性がある。二次木部

の形態や構造に関しては、各種顕微鏡を駆使した研究により、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的知見や分子生物学的知見は十分ではなく、形成層細胞の分裂から木部細胞の分化までの過程、すなわち木材がどの様にして形成されているかについての全貌は明らかになっていないのが現状である。

樹木の二次木部の形成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、樹木細胞に関する優れた実験モデル系が確立していない点があげられる。植物細胞の分裂や分化制御機構に関しては、モデル植物である *Zinnia* (ヒャクニチソウ) や *Arabidopsis* (シロイヌナズナ) など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、樹木の二次木部細胞の分化制御機構に関しては、セルロースやリグニンなど細胞壁成分の生合成過程に関与する酵素や遺伝子の解析が、ポプラを中心に多く行われているが、まだ十分な知見は得られていない。特に、形成層細胞からどのような制御下で二次木部細胞を形成するかについては、情報が不足しているのが現状である。

したがって、二次木部の形成制御機構に関する新しい知見を得るためには、厚い二次壁とともに壁孔やせん孔など複雑な修飾構造を形成する二次木部細胞を、形成層細胞ではなく培養細胞(カルス)から直接誘導するモデル系を確立することが重要である。

2. 研究の目的

本研究では、樹木の培養細胞から仮道管や道管要素など二次木部を誘導する系を確立することを主目的とする。さらに、分化中二次木部内の微小管など細胞骨格を直接観察し、細胞壁形成機構を明らかにする。

増殖中の培養細胞が、細胞分裂を停止して分化を開始するには何らかのシグナルが必要と考えられる。植物ホルモンは、細胞の分裂や分化を制御する重要なシグナルである。これまでの *Zinnia* など草本植物の培養細胞においては、オーキシンとサイトカイニンが細胞分化に必須であることが報告されている。一方、針葉樹の *Pinus radiata* においては、培地からオーキシンを除去することが、細胞分化開始のシグナルになることが報告されている。そこで、本研究においてはこれまでの報告をもとに培地中の植物ホルモン条件を網羅的に検討することにより、研究期間内に二次木部への直接導入条件の確立

を行う。また、*Zinnia* の培養細胞において分化のステージの進行に重要な役割を担っているブラシノステロイドにも注目し、分化誘導への寄与を明らかにする。これらの研究を行うことにより、1) 樹木培養細胞から二次木部へ直接誘導できる条件の確立、と2) 同調性高く高頻度で二次木部が形成される条件の確立を行う。

また本研究では、細胞の形態形成に重要な働きをもつ細胞骨格の配向や局在の動的な変化を解析できる方法の確立も目的としている。これまで、分化中木部細胞内の細胞骨格を立体的に解析するために、蛍光抗体染色-共焦点レーザー走査顕微鏡法を確立し成果をあげてきた。培養細胞を用いて細胞骨格の動的な変化をリアルタイムで追跡することは十分可能といえる。

3. 研究の方法

アカマツの未成熟種子胚、カヤの針葉、ポプラの葉柄やシュート形成層からカルスを誘導し、さらにカルスから管状要素を誘導する条件を検討した。

アカマツの未成熟胚からのカルスの誘導と維持は、植物成長調節物質の 2,4-D を 10 μ M、L-グルタミン、カザミノ酸を加えた mDCR 培地 (改変 Douglas-fir cotyledon Revised 培地) を用い、25°C の暗黒条件下で行った。培養細胞にフロログルシン塩酸反応を行い、リグニンの沈着の有無を調べた。また、サフラニン染色後、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察を行い、管状要素有無と細胞壁修飾構造を調べた。また、チューブリンに対する抗体染色を行い、微小管の3次元的な配向を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

カヤの針葉からのカルスの誘導と維持には、2,4-D を 9 μ M の濃度で含み、窒素量を一部改変した MS (Murashige and Skoog) 培地を使用した。得られたカルスをカルス誘導・維持培地と同一組成の液体培地に移し懸濁培養を行った。管状要素分化誘導は、継代培

地からオーキシンを含まず活性炭を各 0, 1, 3, 5, 10 μ M の濃度で含む培地へホルモンフリー培地で洗浄した懸濁培養細胞を移すことにより行った。二次管状要素の有無は、培養細胞の一部を偏光顕微鏡下で観察し、複屈折の有無によって評価した。また、培養細胞をサフラニン水溶液で染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡により管状要素の細胞壁構造を詳細に観察した。

交雑ポプラ (*Populus sieboldi* \times *P. grandidentata*) の葉柄およびシュートからのカルスの誘導と維持には、2,4-D を 5 μ M の濃度で含む MS (Murashige and Skoog) 培地を使用した。管状要素分化誘導は、継代培地からオーキシンを含まず、ブラシノライドを 0, 0.1, 1, 2, 5, 10 μ M の濃度で含む培地へカルスを移し替えることにより行った。さらに、暗条件と 16 時間日長 (明条件) の 2 つの培養条件も併せて検討した。14 および 21 日後にそれぞれカルスの一部を偏光顕微鏡下で観察し、複屈折の有無によって管状要素の有無を評価した。また、培養細胞をサフラニン水溶液で染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡により管状要素の細胞壁構造を詳細に観察した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞からの管状要素の誘導

①アカマツ培養細胞からの管状要素の誘導

アカマツ未成熟胚由来のカルスに、偏光顕微鏡下で複屈折を示し、二次壁が堆積した管状要素が誘導された。また、細胞壁はフロログルシンで赤紫色に染色されることから、リグニンが沈着しているといえる。

管状要素は、二次壁の肥厚面積や形状から 3 タイプに分類出来た (図 1)。第一のタイプは、らせん状の二次壁が肥厚しているが肥厚は細胞全体では起こっていないタイプで、ヒヤクニチソウの管状要素と同じく、原生木部タイプといえる。第二のタイプは、網状やかご状の二次壁が肥厚しており、第一のタイプ

より二次壁の肥厚面積が広いタイプで、第一のタイプより発達した後生木部タイプといえる。第三のタイプは、細胞全体にほぼ均一の厚さで二次壁が堆積し、さらに有縁壁孔が形成される二次木部タイプの管状要素が認められた。第三のタイプは、これまで *Zinnia* 培養細胞などからは形成が認められていないタイプであり、アカマツ培養細胞において、二次木部様の管状要素が誘導されることが明らかになった。第三のタイプは、誘導された管状要素の約 20% であり、二次木部様の管状要素が比較的高頻度で誘導されるといえる。

以上の結果から、針葉樹であるアカマツの培養細胞から、二次木部様の形態や細胞壁構造をもつ管状要素が誘導されるといえる。そこで、カヤおよび交雑ポプラを用いて、管状要素の誘導の確認と再現性の高い誘導方法の検討を行った。

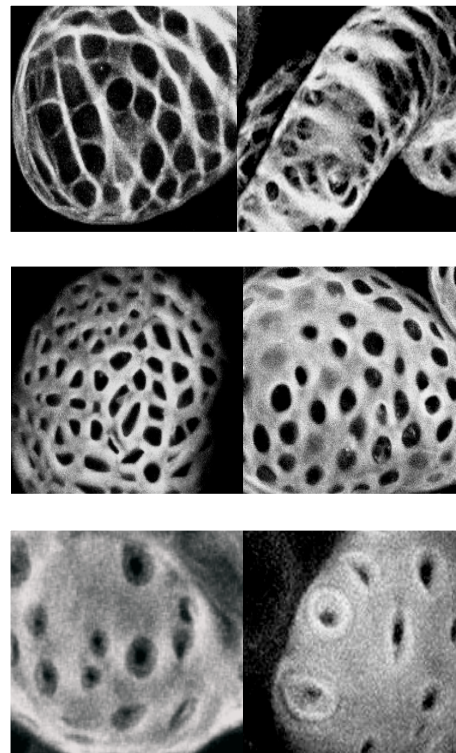


図 1 アカマツ未成熟種子から誘導された管状要素

(上図; タイプ 1 の管状要素、中央図; タイプ 2 の管状要素、下図; タイプ 3 の管状要素)

②カヤ培養細胞からの管状要素の誘導

カルス誘導開始から約3ヶ月後、一部のカルスに突起状の構造が見られるようになった。これらのカルス中には二次木部の特徴をもつ管状要素が観察された。管状要素の中には、一次木部の特徴をもつものと混在して、二次壁の肥厚面積が大きく、有縁壁孔を形成するなどの二次木部の特徴をもつものが観察された(図2)。また、カヤの特徴である仮道管のらせん肥厚に類似した二次壁肥厚も観察された。管状要素が観察されたカルスを液体培地に移し懸濁培養を行ったところ、懸濁培養細胞中にもわずかながら管状要素が観察された。

この懸濁培養細胞を継代維持条件から活性炭培地に移したところ、活性炭0~5g/lの培地で培養細胞中に含まれる管状要素の割合が増加した。特に活性炭5g/lの培地で多くの管状要素が観察された。しかしながら、懸濁培養細胞から分化した管状要素には、網状の二次壁肥厚など一次木部の特徴をもつものしか観察されなかった。

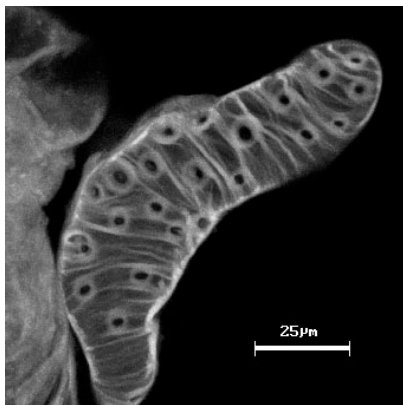


図2 カヤ針葉から誘導された管状要素
(タイプ3の管状要素)

以上の結果から、カヤのカルス中には二次木部の特徴をもつものを含め管状要素が存在していることが明らかになった。また、継代維持培地からオーキシンを除いた培地へ

培養細胞を移すことで管状要素の分化誘導が促進された。培地への活性炭の添加は、活性炭のオーキシンを吸着する作用によって細胞内のオーキシシンレベルを低下させ、カヤのカルスから管状要素への分化を促進すると考えられる。

③交雑ポプラ培養細胞からの管状要素の誘導

交雑ポプラの培養細胞誘導開始14日目では、明条件培養のBL0~2μMの条件で管状要素が観察された。21日目には、同条件の培地で14日目よりも高い割合で偏光顕微鏡下で複屈折を示す管状要素が細胞塊の内部に集合して観察された。特に、BL1μMの培地では多くの管状要素が観察された。また暗条件培養でもBL0.1μM~2μMの培地で管状要素が観察された。BLを5μM以上含む培地からは、明・暗どちらの培養条件でも管状要素がほとんど観察されなかった。ブラシノライド添加培地での培養と明条件での培養によって、それぞれ高い割合で管状要素が誘導されるといえる。特に、明条件・ブラシノライド1μMの誘導条件で最も高い割合で管状要素が誘導された。

以上の結果から、ポプラ培養細胞に対して、BLの添加は管状要素分化に促進的に働くが、一定濃度以上の添加では阻害的に働くものと考えられた。また、明条件での培養は、植物成長調節物質無添加の条件でも管状要素分化を引き起こし、暗条件での培養よりも分化の割合を向上させることが明らかになった。

誘導された管状要素には、一次木部の特徴である、環紋肥厚型、らせん紋肥厚型、階紋肥厚型、混在型の管状要素が観察された。さらに、広い二次壁や有縁壁孔の存在など、二次木部の特徴をもつ管状要素も観察され、二次木部の特徴をもつ管状要素と一次木部の特徴をもつ管状要素は混在して誘導された(図3)。

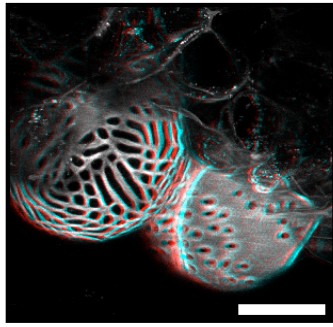


図3 ポプラ葉柄から誘導された管状要素
(タイプ2と3が混在する管状要素)

(2) 表層微小管の観察

アカマツの未成熟種子から誘導された管状要素の微小管を間接蛍光抗体で染色し、微小管の局在の変化を連続的に観察した。

微小管は、最初細胞全体で観察されたが、管状要素への分化が進むに連れて、局在と部分的な消失が認められた。微小管の部分的な消失が認められたところでは、壁孔の形成が行なわれたことから、微小管が壁孔の形成位置を制御しているといえる。さらに、管状要素への分化が進むと、太く束状になった微小管が出現した(図4)。束状の微小管と壁孔の孔口部分とは一致しており、微小管の局在が二次壁の堆積位置を決定しているといえる。微小管の局在と部分的な消失は、原形質膜状にセルロース合成が活発なドメインと不活発なドメインを作り、壁孔など修飾構造の形成を厳密に制御しているといえる。

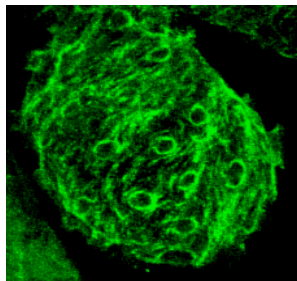


図4 アカマツ未成熟種子から誘導された管状要素における微小管の局在
(微小管が壁孔の孔口に沿って局在する)

(3) 本研究のまとめ

本研究の最大の成果は、仮道管や道管要素など本来形成層由来である二次木部を、培養細胞から直接誘導できるモデル系を示したことである。これまで、培養細胞から管状要素を同調的に誘導するモデル系は、草本植物である *Zinnia* や *Arabidopsis* など確立されている。これらの優れたモデル系は、木部細胞の形成過程に関する細胞生物学および分子生物学的研究の発展に大きく貢献している。

本研究では、細胞由来の培養細胞から、二次木部を直接誘導することができた。今後、この誘導系を用いて、二次木部を誘導するシグナルの同定、細胞壁成分の生合成経路に特異的に発現する遺伝子やタンパク質の網羅的な解析などが可能になるといえる。

本研究で成果は、国内や国際学会等で発表し、成果の一部は論文や著書で発表した。また、第57回および第58回日本木材学会大会で発表した。スギ・カルスから誘導された管状要素の形態観察結果(佐藤ら)およびポプラ・カルスからの管状要素誘導条件の検討結果(山岸ら)が優秀ポスター賞に選ばれた

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) Begum, S., Nakaba, S., Oribe, Y., Kubo, T., Funada, R.: Induction of cambial reactivation by localized heating in a deciduous hardwood hybrid poplar (*Populus sieboldii* x *P. grandidentata*), **Annals of Botany**, 100, 439-447 (2007). (査読有り)

2) Funada, R., Miura, T., Shimizu, Y., Kinase, T., Nakaba, S., Kubo, T., Sano, Y.: Gibberellin-induced formation of tension wood in angiosperm trees, **Planta** 227, 1409-1414 (2008). (査読有り)

3) Nakaba, S., Yoshimoto, J., Kubo, T., Funada, R.: Morphological changes in the cytoskeleton, nuclei and vacuoles during the cell death of short-lived ray tracheids in the conifer *Pinus densiflora*, **Journal of Wood Science**, 54, 509-514 (2008). (査読有り)

4) 船田 良: 樹木形成層活動の制御、**木材**

学会誌、54、1-10 (2008). (査読有り)

5) 船田 良 : 木質バイオマスの形成機構、**Eco-Engineering (生態工学会誌)**、20、37-43 (2008). (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

1) 吉本靖東、半 智史、佐藤武尚、渡辺宇外、久保隆文、船田 良 : アカマツカルスから誘導される二次木部様管状要素の形態、第 57 回日本木材学会大会、広島、2007 年 8 月 8 日.

2) 佐藤武尚、吉本靖東、半 智史、久保隆文、船田 良 : スギのカルスにおける管状要素文化誘導に関する研究、第 57 回日本木材学会大会、広島、2007 年 8 月 8 日.

3) 半 智史、久保隆文、船田 良 : アカマツ放射仮道管における細胞死過程のサイボウ生物学的解析、第 57 回日本木材学会大会、広島、2007 年 8 月 8 日.

4) Funada, R.: Cytoskeletal control of xylogenesis in woody plants, International Workshop of Xylogenesis in Woody Plants, Gwangju, Korea, 2007 年 10 月 18 日.

5) 半 智史、久保隆文、船田 良 : 広葉樹木部放射柔細胞における細胞死出現パターンに関する研究、第 58 回日本木材学会大会、つくば、2008 年 3 月 17 日.

6) 山岸祐介、吉本靖東、佐藤武尚、半 智史、早乙女順一、久保隆文、船田 良 : ポプラカルスからの管状要素誘導におけるブラシノステロイド添加の影響、第 58 回日本木材学会大会、つくば、2008 年 3 月 17 日.

7) Funada, R.: Microtubules and wood formation, The International Academy of Wood Science 2008 Annual Meeting, Joint with The Linnean Society and IAWA, The Linnean Society, London, UK, 2008 年 5 月 29 日.

8) Funada, R.: Wood formation of in vitro model system, International Symposium of Bio-Energy and Technology, Gwangju, Korea, 2009 年 1 月 20 日.

9) 大石 徹、山岸祐介、阿部健太郎、早乙女順一、半 智史、朴 仁善、吉本靖東、久保隆文、船田 良 : カキノキの培養細胞を用いた管状要素誘導条件の検討、第 59 回日本木材学会大会、松本、2009 年 3 月 16 日.

10) 山岸祐介、吉本靖東、佐藤武尚、朴 仁善、早乙女順一、阿部健太郎、大石 徹、半 智史、久保隆文、船田 良 : カヤ培養細胞からの管状要素分化誘導に関する研究、第 59

回日本木材学会大会、松本、2009 年 3 月 16 日.

[図書] (計 1 件)

1) Funada, R.: Microtubules and the control of wood formation. In: Nick, P. (ed.) Plant Microtubules: Development and Flexibility, Springer, Heidelberg, Germany, p.83-119 (2008).

6. 研究組織

(1)研究代表者

船田 良 (Funada Ryo)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授

研究者番号 : 20192734

(2)研究分担者

久保 隆文 (Kubo Takafumi)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授

研究者番号 : 00015091

梶田 真也 (Kajita Shinya)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号 : 40323753