

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15882

研究課題名(和文)新規in vitro針葉樹仮道管分化誘導系の開発による細胞壁形成過程の解析

研究課題名(英文)Development of a new in vitro differentiation system of conifer tracheids for analysis of cell wall formation

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): 針葉樹の樹幹の90%以上は仮道管とよばれる細胞が占め、仮道管の形態や細胞壁構造が針葉樹材の材質に大きく影響する。しかしながら、仮道管の分化機構や細胞壁形成機構は十分に明らかになっていない。そこで仮道管の細胞壁形成過程を解析するモデルとして、ヨーロッパトウヒの培養細胞を仮道管へと分化誘導する実験系の開発に取り組んだ。培養細胞が安定的に分裂・増殖する培養条件と、高い頻度で細胞壁が肥厚した細胞に分化する培養条件をそれぞれ明らかにした。細胞壁が肥厚した細胞では、仮道管にみられる有縁壁孔に非常に類似した構造が観察された。以上の結果より、培養細胞から仮道管様の細胞を誘導する実験系が確立されたといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木材などの木質バイオマスの循環型有効利用は、再生可能な資源エネルギーの供給に重要である。針葉樹材においては、仮道管の形態や細胞壁構造が針葉樹の材質に大きく影響する。仮道管の形成は樹幹の内部で起こるため、一つの生細胞の連続的な細胞壁の形成過程を解析することはできない。今回開発された培養細胞を用いたモデル誘導系は、仮道管様の細胞の形成過程の連続的な解析を可能にしており、従来の誘導系と比較して誘導率や誘導方法の単純さ等に利点がある。本成果の活用によって仮道管の形成機構に関する情報の蓄積が進むことで、将来的な針葉樹材の材質制御を目的とした森林施業や育種選抜等の応用が期待できる。

研究成果の概要(英文): More than 90% of conifer stems are composed of tracheids. Therefore, the morphology and cell wall structure of tracheids greatly affect the quality of soft wood. However, the mechanisms of differentiation and cell wall formation of tracheids have not been fully understood. Therefore, as a model for analyzing the cell wall formation process of tracheids, we developed an model differentiation system of tracheids using cultured cells of Norway Spruce. We have identified culture conditions to induce cultured cells stably divide and proliferate, and culture conditions to induce cells differentiate into cells with thickened cell walls at a high frequency. The cells with thickened cell walls showed structures very similar to the bordered pits found in tracheids. These results indicate that an experimental system for inducing tracheid-like cells from cultured cells of Norway Spruce has been established.

研究分野: 樹木細胞生物学

キーワード: 仮道管 管状要素 二次木部細胞 Picea abies オーキシン 針葉樹 植物組織培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

木材などの木質バイオマスの循環型有効利用は、資源・エネルギーの持続的供給に重要である。針葉樹の樹幹の 90%以上は仮道管とよばれる二次木部細胞が占め、仮道管の形態や細胞壁構造が針葉樹材の材質に大きく影響する。しかしながら、資源利用上の重要性にもかかわらず、仮道管の細胞壁形成機構は十分に明らかになっていない。細胞壁の形成過程を詳細に解析する材料として、培養環境下で植物細胞を道管要素へと分化誘導するモデル実験系が開発・利用されてきた。針葉樹においてはラジアータマツ(Möller et al. 2003)やカヤ(Yamagishi et al. 2011)の培養細胞から、仮道管の特徴である広い面積の二次壁肥厚と有縁壁孔をもつ細胞が誘導された。しかしながら、これらの樹種の培養細胞では、細胞壁の壁層構造が樹幹の仮道管と同一ではない、あるいは仮道管様の細胞の誘導率も低いなどの課題が残っており、仮道管の形成過程を解析するモデルとしての利用には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、増殖性が高く、安定的に維持可能な針葉樹培養細胞の獲得と、培養細胞から仮道管様の細胞を直接分化誘導する培養条件の確立による新たなモデル誘導実験系の開発によって、仮道管細胞壁の形成過程を解析することを目的とした。さらに、針葉樹培養細胞への蛍光タンパク遺伝子の導入を試み、細胞壁の堆積制御に関わるとされる細胞骨格の挙動の動的解析を目指した。

3. 研究の方法

従来の針葉樹の培養細胞を用いた誘導系では、細胞の誘導率および細胞壁構造の違いが課題となっていた。材料として増殖性が高く、仮道管様の細胞が低い割合で観察されることから選定されたヨーロッパトウヒ(*Picea abies*)の成熟種子胚由来の培養細胞を用いた。

(1)材料

森林総合研究所林木育種センター北海道育種場から配布されたヨーロッパトウヒ成熟種子(系統 C622)から誘導されたカルスを用いた。カルスの誘導および維持は、窒素量半分の MS (Murashige and Skoog) 培地に、植物成長調節物質としてオーキシシン 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 20 μM を用い、糖としてスクロース 30 g/L、添加物として L-glutamine 500 mg/L、casamino acid 1000 mg/L、固化剤としてゲランガム 3 g/L を添加した培地を用い、約 1 ヶ月間隔で植え継ぎを行った。

(2)ヨーロッパトウヒカルス増殖維持条件の検討

カルス誘導培地に添加されたオーキシシン 2,4-D 20 μM を異なる種類のオーキシシンであるナフチル酢酸 (NAA) 20, 100 μM に変更した培地を用いた。

(3)ヨーロッパトウヒ懸濁培養細胞系の確立

固体培地上で増殖したカルスを、増殖条件の固体培地から固化剤を除いた液体培地へ移し、振盪培養を行う事で懸濁培養細胞の獲得を試みた。

(4)仮道管様の細胞の分化誘導条件の検討

増殖条件で維持された細胞を、NAA または 2,4-D を 1, 10, 100 μM に変更した培地、および他樹種の仮道管様細胞の誘導に有効と報告されている活性炭を 0, 1, 10 g/L それぞれ添加した培地へ植え替えた。誘導から 6 週後にカルスの一部を偏光顕微鏡下で観察し、撮影した画像における複屈折を示す面積の割合を仮道管様の細胞の面積率として算出し、条件間の比較を行った。

(5)誘導された細胞の形態観察

仮道管様の細胞の誘導後 6 週目のカルスを氷酢酸と 30% 過酸化水素水の等液 (Franklin 1960) に 60 分、2 日間浸漬後、単離された細胞を光学顕微鏡で撮影し 2000 個の仮道管様の細胞の形態を分類した。

(6)ヨーロッパトウヒカルスへの遺伝子導入

カルスへの遺伝子導入は微小管を構成するタンパクであるチューブリン関連タンパク質、およびアクチン関連タンパク質が蛍光標識されるように構築された遺伝子コンストラクトを保有するアグロバクテリウム (GV3101 株) の懸濁液をカルスに直接散布し共存培養することで行った。共存培養後、カルスを液体培地で洗浄後、カナマイシンおよびメロペナムを添加した選抜培地上に散布し、形質転換カルスを選抜した。

4. 研究成果

(1) ヨーロッパトウヒカルス増殖維持条件の検討

カルスの誘導条件 (2,4-D 20 μM) で継代維持されたカルスには、仮道管の特徴をもつ細胞が不均一に低い割合で含まれており、後述する誘導培地の影響を評価が難しいという問題があった。また、この培地条件で繰り返し植え継ぎを行うと、増殖性の低下や部分的に褐変が見られた。

一方、添加するオーキシンを誘導条件の 2,4-D から NAA に変更した培地ではカルスが白色で柔らかくなるなど安定した増殖が観察された。NAA 添加培地では繰り返し植え継ぎを実施した場合でも 2,4-D 添加培地で見られたような部分的な褐変の発生は抑えられていた。

また、カルス誘導条件で維持されたカルスと同様、NAA 20 μM 添加培地上で増殖するカルスには仮道管の特徴をもつ細胞が観察されたが、NAA 100 μM 添加培地では観察されなかった。以上の結果から、NAA 20 μM 添加培地での培養によって、ヨーロッパトウヒカルスを管状要素に分化させることなく、安定的に増殖維持できることが明らかになった。

(2) ヨーロッパトウヒ懸濁培養細胞系の確立

NAA 20 μM 添加培地、および NAA 100 μM 添加培地で増殖するカルスは、固体培地から固化剤を除いた液体培地で懸濁培養を行うことが可能であった。懸濁培養ではいずれの培地においても仮道管の特徴をもつ細胞が観察されず、増殖性は NAA 20 μM 添加培地の方が高かった。よって懸濁培養での維持には NAA 20 μM 添加培地が望ましい。なお、繰り返し植え継ぎを行った場合、褐変の発生や増殖性の低下等の問題が生じたが、植え継ぎの際の植え継ぎ細胞量を増やす等の植え継ぎ方法の検討によって安定した懸濁培養系が確立された。

後述する様に、本研究で作出されたヨーロッパトウヒの懸濁培養細胞系は、仮道管様の細胞の分化誘導の材料としてはカルスに対して分化誘導率が低かった。しかし、安定して増殖維持が可能な懸濁培養系の報告は木本植物、中でも針葉樹においては限られており、今後針葉樹の細胞レベルでの解析を行うための材料として広い活用が期待できる。

(3) 仮道管様の細胞の分化誘導条件の検討

NAA 100 μM 添加培地で増殖したカルスを、NAA 濃度を変更した培地、2,4-D を添加した培地、活性炭添加培地へ移植したところ、NAA、2,4-D の低濃度添加培地と植物ホルモン無添加の培地において、細胞壁が厚く、偏光下で複屈折を示す細胞が誘導され、NAA 1 μM 添加培地上で最も高い割合で誘導された。一方で、高濃度の NAA または 2,4-D を添加した培地や、他樹種で有効とされた活性炭を添加した培地では管状要素の誘導が認められなかった。また、植物ホルモン無添加の培地や低濃度の NAA および 2,4-D 添加培地上では、カルスの増殖はほとんど認められなかった。

したがって、高濃度 (20-100 μM) の NAA 添加培地で増殖維持したヨーロッパトウヒ培養細胞を低濃度 (1 μM) NAA 添加培地への移植によって、高い頻度で仮道管様の細胞への分化が誘導されるということが明らかになった。

カルスから単離した細胞の細胞壁の肥厚様式の詳細な観察を行うと、複屈折を示す細胞のうち 9 割以上の細胞が壁孔様の構造を持っており、約 4 割の細胞で有縁壁孔様の構造をもつことが明らかになった。また、細胞塊の内部では、隣接する細胞間で有縁壁孔の形成位置が同調した有縁壁孔対が観察された。

以上の結果から、ヨーロッパトウヒのカルスを用いて仮道管様の細胞の新たなモデル実験系が確立できたといえる。

また、懸濁培養細胞においても、また培地条件を増殖維持条件から誘導条件へと変更し振盪培養することで、液体培地中での仮道管様細胞の直接誘導が観察された。細胞壁肥厚中の細胞の長期間観察にも成功した。しかしながら、仮道管へと誘導される細胞の割合は固体培地上での誘導と比較すると低く、仮道管の形成過程の解析に用いるためには誘導条件のさらなる検討が必要である。

これまでに報告されている針葉樹の培養細胞から仮道管様の細胞を誘導する実験系は、増殖培地または誘導培地に複数の培地成分の変更が行われるか、誘導培地への活性炭の添加が行われていた。複数の培地成分の変更は、誘導因子の解析が複雑になるという問題がある。また活性炭は、植物の二次代謝成分をはじめ、培地中の様々成分の吸着を行うが、培地に添加した植物ホルモンや阻害剤、染色液などの薬剤の吸着が発生することで解析の妨げになることがある。今回開発された誘導条件は NAA 濃度の変更のみで増殖と分化誘導を制御されているという点と、活性炭を使用していないという点で、他の針葉樹の培養系と比較しても解析が行いやすいという利点がある。今後、仮道管の分化や形成過程を解析する材料としての活用が期待できる。

(4) ヨーロッパトウヒ培養細胞への遺伝子導入

アグロバクテリウムとカルスの共存培養の期間や、共存培養後の細胞選抜における培地の抗生物質の濃度を複数検討したものの、蛍光タンパク遺伝子の導入には至らなかった。ここ迄示した様に、カルスにおける仮道管様の細胞の誘導と、細胞壁肥厚中の細胞の長期間観察には成功しているため、ヨーロッパトウヒ培養細胞への遺伝子導入の達成により仮道管様の細胞の分化過程における細胞骨格・細胞小器官の動的な解析が実施できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 山岸祐介	4. 巻 5
2. 論文標題 樹木培養細胞を用いた二次木部細胞形成過程の解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 708-712
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Yusuke, Kudo Kayo, Yoshimoto Joto, Nakaba Satoshi, Nabeshima Eri, Watanabe Ugai, Funada Ryo	4. 巻 253
2. 論文標題 Tracheary elements from calli of Japanese horse chestnut (<i>Aesculus turbinata</i>) form perforation-like structures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 99 (2021)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-021-03621-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山岸祐介, 鎌田 裕
2. 発表標題 ヨーロッパトウヒ培養細胞を用いた有縁壁孔様の構造を形成する管状要素の分化誘導系
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸祐介, 高田直樹, 渡辺宇外, 荒川圭太, 佐野雄三, 半 智史, 船田 良
2. 発表標題 交雑ポプラ培養細胞への GFP-TUA6およびLifeact-mCherryの導入による細胞骨格の可視化
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020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	高田 直樹 (Takata Naoki) (90605544)	国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所・森林バイオ研究センター・主任研究員 (82105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------