

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380107

研究課題名（和文）樹木の二次木部直接誘導系における細胞分化制御機構の解析

研究課題名（英文）Mechanism of regulation of cell differentiation in directly induced secondary xylem in trees

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

研究成果の概要（和文）：

ポプラやトガサワラなどの培養細胞を用い、培地条件などを検討することにより、有縁壁孔やらせん肥厚をもつ管状要素が観察され、培養細胞から二次木部様細胞を直接誘導することに成功した。また、スギの針葉由来の懸濁培養細胞から管状要素を *in vitro* で誘導することに成功した。さらに、培養細胞内に存在する微小管およびアクチンの配向や局在を GFP 融合タンパク質発現法で観察したところ、微小管の局在が壁孔の形成位置と良く一致していた。細胞分化の制御に細胞骨格の立体的な配向が密接に関与しているといえる。

研究成果の概要（英文）：

We induced directly secondary xylem like cells that formed developed bordered pits and spiral thickenings from cultured cells of woody plants such as hybrid poplar. In addition, we induced tracheary elements from suspended culture cells derived from needles of *Cryptomeria japonica in vitro*. Moreover, we analyzed the orientation and localization of microtubules and actin filaments using stable expression of genes for microtubule-associated proteins or second actin binding domain with green fluorescent protein. The microtubules play an important role in process of cell differentiation such as the determination of sites of pit formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：木質科学

キーワード：樹木二次木部、管状要素分化、木質バイオマス、細胞壁、細胞骨格、微小管、アクチンフィラメント、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。バイオマスの大部分は、木材など木質バイオマスで

ある。したがって、バイオマスの有効利用のためには、木材の特性に関する情報を集積するとともに、その特性を決定する木材の形成機構を十分に明らかにすることが不可欠で

ある。

木材は、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木質バイオマス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、形成層由来の二次木部の形態や細胞壁構造と密接な関連性がある。二次木部の形態などに関しては、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二次木部の細胞死までの過程、すなわち木材がどのような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、樹木細胞分化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* (ヒヤクニチソウ) 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、ゲノムデータベースがある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、樹木がどのような制御下で二次木部細胞を形成し始めるかについては、情報が不足しているのが現状である。

したがって、厚い細胞壁(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、形成層細胞由来ではなく培養細胞から直接誘導するモデル系を確立し、二次木部の形成制御機構を動的に解析し、新しい知見を得ることが重要である。

2. 研究の目的

本研究課題では、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仮道管や道管要素などに類似した二次木部細胞を樹木の培養細胞(カルス)から高頻度で

直接誘導する新規モデル系を確立し、二次木部細胞の形態形成機構や細胞死制御機構に関する新知見を得ることを主目的としている。特に、木部細胞の形態形成や細胞壁のパターン形成に重要な役割を担っている微小管やアクチンフィラメントなど細胞骨格の配向や局在をリアルタイムで動的に解析するとともに、二次木部細胞の寿命や機能を決める細胞死過程における細胞小器官の動的変化の解析を行う。

3. 研究の方法

シュートから剥ぎ取った形成層領域、葉の断片、球果から取り出した未成熟種子などからカルスを誘導し、オーキシンやサイトカニンなどの植物ホルモンを添加して、カルスを増殖させた。増殖させたカルスの培地条件や光条件などを網羅的に検討し、二次木部への直接誘導条件の確立を行った。分化を誘導する培地としては、オーキシンとサイトカニンを組み合わせた条件、脱オーキシン処理、ブラシノステロイド(BL)添加等を検討した。カルスから、管状要素への誘導が成功したかどうかを明らかにするため、培地より定期的に細胞塊を取り出し、微分干渉または位相差光学顕微鏡で細胞の形態や二次壁の有無を解析した。二次木部が誘導された場合、分化誘導開始後の日数に対する出現率を計算し、同調性や再現性を検討した。

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、共焦点レーザ走査顕微鏡で観察を行った。また、培養細胞にGFP融合タンパク質を発現させて微小管やアクチンフィラメントの動的挙動を解析した。

4. 研究成果

(1) ポプラ培養細胞からの管状要素の誘導
交雑ポプラ (*Populus sieboldi* × *P. grandidentata*) の葉柄由来のカルスを、BLを含む誘導培地において誘導開始したところ、誘導開始 10 日目に管状要素が観察された。管状要素の割合は誘導期間の延長によって増加し、誘導開始 3~4 週にかけて特に顕

著に管状要素数の増加がみられた。管状要素の誘導率は植物成長調節物質無添加の培地に対し BL 添加培地で高かったが、16 時間の明条件培養下では植物成長調節物質無添加の培地でも高い誘導率がみられた。誘導期間が7週に達すると、ほぼ全ての条件で管状要素が観察されるようになり、光条件や培地条件による違いが認められなくなった。管状要素は細胞塊中に密集して観察される傾向にあり、多いものでは 30 以上の管状要素が密集して観察された。誘導された管状要素には、一次木部の特徴をもつものと混在して、有縁壁孔の存在など二次木部の特徴をもつ管状要素が観察された (図 1)。誘導された管状要素のうち、二次木部の特徴をもつ管状要素が占める割合は、誘導条件間で明確な差は認められなかった。以上の結果から、BL 添加培地または明条件下での培養開始から 3~4 週のポプラ培養細胞を用いることで、二次木部の特徴をもつ管状要素の分化過程を観察できるといえる。

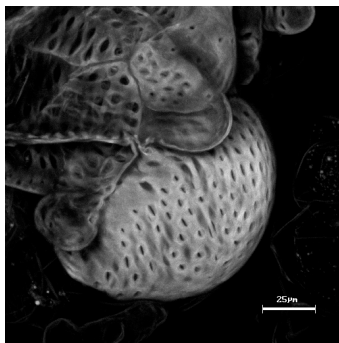


図 1 交雑ポプラ培養細胞から誘導された二次木部様管状要素 (培地に $1 \mu\text{M}$ の BL 添加)

交雑ポプラの葉柄由来のカルスに、GFP-MAP4 遺伝子 (微小管観察用) または GFP-ABD2 (アクチン観察用) を保有するアグロバクテリウムを散布し 48 時間の共存培養を行った後、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、徐々に低濃度の抗生物質培地に移し替え、安定増殖させた。

培養株を共焦点レーザー操作顕微鏡下で観察すると、アクチンの蛍光シグナルが原形質

糸に沿って観察された。また、アクチンが細胞長軸に平行に配向する細胞も観察された。

薄い二次壁が堆積する位置では、微小管を示す蛍光シグナルが局在していた。微小管は、複数が集まって束状に配向していた。時間の経過に伴い、微小管の束の幅はわずかながら太くなっていった。また、微小管束の間に架橋のように微小管が現れる様子が観察された。細胞の一部に見られた壁孔様の部分では、壁孔部分を取り囲むように円状に強い微小管のシグナルがみられていたが、時間の経過に伴い、円の中心部分に向かうように収縮していった。

以上、樹木の培養細胞内に存在する微小管およびアクチンフィラメントを GFP 融合タンパク質発現法で可視化する方法を確立し、細胞骨格を同一細胞内で経時的に観察することが可能になったといえる。細胞形態や細胞壁構造の制御に、細胞骨格の立体的な配向が密接に関与しているといえる。

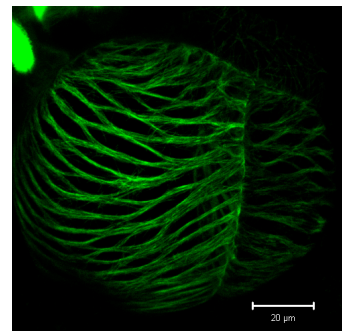


図 2 GFP-MAP4 導入交雑ポプラ培養細胞から誘導された分化中管状要素内の微小管

(2) 針葉樹およびイチョウ培養細胞からの管状要素の誘導

トガサワラ (*Pseudotsuga japonica*) およびイチョウ (*Ginkgo biloba*) の葉から誘導されたカルスを 2,4-D を $5 \mu\text{M}$ の濃度で含む MS 培地、mCD 培地、LP 培地で培養したところ、2 ヶ月後にカルスの一部に偏光顕微鏡下で複数屈折を有する管状要素が認められた。イチョウにおいては LP 培地でカルス誘導を行ったカルス中に管状要素が観察され、管状要素は

らせん紋肥厚型など一次木部の特徴をもつものが多かった。一方、トガサワラのカルスでは有縁壁孔を形成するなど二次木部の特徴をもつ管状要素が多く観察された。イチョウやトガサワラの培養細胞においては、カルス誘導を行った直後のカルス中にすでに管状要素が存在していることが強く示された。また、観察された管状要素には有縁壁孔を形成するといった二次木部の特徴をもつものも存在していた。

一方、スギ (*Cryptomeria japonica*) の懸濁培養細胞を用いて、管状要素誘導条件を検討したところ、管状要素が含まれていない状態から管状要素を誘導することに成功した。誘導 2 日後に管状要素が観察され、7 日後には二次木部の特徴をもつ管状要素も観察された。また、懸濁培養細胞を用いて、間接蛍光抗体法にて微小管を観察したところ、微小管のシグナルが得られた (図 3)。細胞が球状のものは微小管の配向がランダム配向であるのに対し、細胞が細長いものは微小管の配向が細胞の長軸方向に対して、垂直に配向しており、微小管の配向変化が、細胞の形態形成に密接に関係しているといえる。

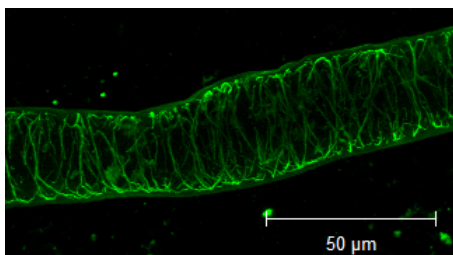


図 3 スギの懸濁培養細胞から誘導された分化中管状要素内の微小管 (間接蛍光抗体染色法)

以上の結果から、ポプラやスギなど樹木の培養細胞を用いて、管状要素が含まれていない状態から、管状要素を誘導することに成功し、二次木部の特徴をもつ管状要素を誘導す

る新規の実験系を確立したといえる。また、樹木の培養細胞内の細胞骨格を生体観察する方法を確立し、細胞の形態形成における細胞骨格の重要性に関する知見を得た。

本研究の成果は、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 60 回日本木材学会大会で発表したカキおよびホオノキにおける *in vitro* 管状要素誘導に関する研究 (吉田ら) 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 7 件)

1) Begum, S., Shibagaki, M., Furusawa, O., Nakaba, S., Yamagishi, Y., Yoshimoto, J., Jin H.O., Sano, Y., Funada, R.: Cold stability of microtubules in wood forming tissues of conifers during seasons of active and dormant cambium, **Planta**, 235, 165-179 (2012). (査読有り)

DOI: 10.1007/s00425-011-1500-2

2) Nakaba, S., Yamagishi Y., Sano, Y., Funada, R.: Temporally and spatially controlled death of parenchyma cells in involved in heartwood formation in pith regions of branches of *Robinia pseudoacacia* var. *inermis*, **Journal of Wood Science**, 58, 69-76 (2012). (査読有り)

DOI: 10.1007/s10086-011-1221-y

3) Nakaba, S., Begum, S., Yamagishi Y., Jin, H.O., Kubo, T., Funada, R.: Differences in the timing of cell death, differentiation and function among three different types of ray parenchyma cells in the hardwood *Populus sieboldii* x *P. grandidentata*, **Trees**, 26, 743-750 (2012). (査読有り)

DOI: 10.1007/s00468-011-0640-0

4) Park, I.S., Koiso, M., Morimoto, S., Kubo, T., Jin, H.O., Funada, R.: Plant regeneration by somatic embryogenesis

from mature seeds of *Magnolia obovata*, **Journal of Wood Science**, 58, 64-68 (2012). (査読有り)

DOI: 10.1007/s10086-011-1212-z

5) Nakaba, S., Kubo, T., Funada, R.: Nuclear DNA fragmentation during cell death of short-lived ray tracheids in the conifer *Pinus densiflora*, **Journal of Plant Research**, 124, 379-384 (2011). (査読有り)

DOI: 10.1007/s10265-010-0384-8

6) Nakagawa, R., Kurushima, M., Matsui, M., Nakamura, R., Kubo, T., Funada, R.: Polyamines promote the development of embryonal-suspensor masses and the formation of somatic embryos in *Picea glehnii*, **In Vitro Cellular Development Biology - Plant**, 47, 480-487 (2011). (査読有り)

DOI: 10.1007/s11627-011-9366-3

7) 船田 良, 半 智史: 樹木の二次木部細胞におけるセルロースマイクロフィブリルの配向制御, **Cellulose Communications**, 16, 95-101 (2009). (査読有り)

<http://iss.ndl.go.jp/books/R100000002-I000000101656-00>

[学会発表] (計 11 件)

1) 山岸祐介、内山大夢、吉本靖東、半 智史、渡辺宇外、船田 良: GFP-MAP4 遺伝子の導入によるポプラ培養細胞からの管状要素分化過程における表層微小管の観察、第 62 回日本木材学会大会、札幌、2012 年 3 月 16 日。

2) 内山大夢、山岸祐介、半 智史、船田 良: スギの培養細胞由来の管状要素誘導に関する研究、第 62 回日本木材学会大会、札幌、2012 年 3 月 15 日。

3) 大谷拓己、朴 仁善、辻 幸子、梶田真也、船田 良: ホオノキ培養細胞における培地条件の細胞増殖および magnolol の生成に与える影響、第 62 回日本木材学会大会、札幌、2012 年 3 月 15 日。

4) 岡加奈子、山岸祐介、小磯桃子、森本智美、朴 仁善、藤田遼二、船田 良: コブシの組織培養による植物体再生に関する研究、第 62 回日本木材学会大会、札幌、2012 年 3 月 15 日。

5) 内山大夢、山岸祐介、半 智史、船田 良: イチョウ、トガサワラおよびヌマスギの培養細胞を用いた管状要素誘導に関する研究、第 61 回日本木材学会大会、京都、2011 年 3 月 19 日。

6) 山岸祐介、内山大夢、吉本靖東、半 智史、渡辺宇外、船田 良: GFP-ABD2 遺伝子発現による交雑ポプラ培養細胞におけるアクチンの可視化、第 61 回日本木材学会大会、京都、2011 年 3 月 19 日。

7) 大谷拓己、朴 仁善、山岸祐介、小磯桃子、辻 幸子、梶田真也、船田 良: モクレン属の植物器官や植物器官由来のカルスにおける magnolol と honokiol の定量、第 61 回日本木材学会大会、京都、2011 年 3 月 19 日。

8) 小磯桃子、朴 仁善、森本智美、山岸祐介、船田 良: ホオノキの未成熟種子 PEMs 誘導における種子の最適な発達段階に関する研究、第 61 回日本木材学会大会、京都、2011 年 3 月 19 日。

9) Nakaba, S., Yoshimoto, J., Sano, Y., Kubo, T., Funada, R.: Cell biological analysis of cell death in short-lived ray tracheids in the conifer, *Pinus densiflora*, The 2010 International Workshop on Wood Biorefinery and Tree Biotechnology, Örnsköldsvik, Sweden, 2010 年 6 月 22 日。

10) 山岸祐介、吉本靖東、内山大夢、吉田菜摘、半 智史、渡辺宇外、久保隆文、船田 良: ポプラ培養細胞からの二次木部の特徴をもつ管状要素の分化誘導、第 60 回日本木材学会大会、宮崎、2010 年 3 月 18 日。

11) 吉田菜摘、山岸祐介、内山大夢、朴 仁善、半 智史、船田 良: カキおよびホオノキにおける *in vitro* 管状要素誘導に関する研究、第 60 回日本木材学会大会、宮崎、2010 年 3 月 17 日。

〔図書〕(計 1件)

1) 船田 良:木質の形成(第2版)、海青社、
p. 1-593 (2012).

〔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

(2)研究分担者

梶田 真也 (KAJITA SHINYA)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：40323753

渡辺 宇外 (WATANABE UGAI)

千葉工業大学・工学部・准教授

研究者番号：70337707