

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 6 日現在

機関番号：32503

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658065

研究課題名（和文） 力学的環境下における樹木細胞壁形成の分子機構の解析

研究課題名（英文） Molecular mechanism of cell wall formation in woody plant under mechanical environments

研究代表者

渡邊 宇外 (WATANABE UGAI)

千葉工業大学・工学部・准教授

研究者番号：70337707

研究成果の概要（和文）：

力学的環境下における樹木細胞壁の形成機構を分子レベルで明らかにすることを目的とし、力学負荷を受ける植物培養細胞における細胞壁形成関連遺伝子の発現を定量的に調べ、細胞壁における二次代謝産物の蓄積を観察した。PAL 遺伝子の発現は、培養細胞に対する比較的短時間の力学負荷で上昇し、負荷応力の明確な依存性は示さなかった。一部の二次壁形成転写因子の遺伝子については、その発現が検出できなかったが、MYB46 遺伝子および KNAT7 遺伝子の発現は、負荷時間が長くなると増加することが認められた。力学負荷を受けかつ静置培養された植物細胞では、リグニンの堆積が観察された。

研究成果の概要（英文）：

In order to clarify the mechanism of cell wall formation in woody plants under mechanical environments, the expression of genes involved in the cell wall formation was analyzed using plant cultured cells mechanically loaded. The deposition of secondary metabolic substances in their cell walls was also observed. The expression of PAL gene in the plant cultured cells was upregulated by mechanical loading for relatively short time, but didn't depend on the stress applied. Although it was impossible to determine the gene expression of some transcription factors involved in secondary cell wall formation, the expression of MYB46 and KNAT7 genes increased in the cultured cells mechanically loaded for relatively long time. Lignin was detected in the plant cultured cells subjected to a static culture after mechanical loading.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	0	1,300,000
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：森林工学、遺伝子、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

樹木の形態形成は、自重や外力などの力学的な作用による大きな影響を受ける。それにより樹幹内で発生・蓄積される応力とその分

布は、大きな個体を支える重要な因子である。いくつかの研究成果から、二次木部細胞の形成は力学的環境の影響を強く受けて誘導・制御されることが示された。また、木材の諸性

質はその細胞レベルの構造に大きく依存し、その形成には形成層細胞が置かれた力学的環境が密接に関係する。樹木の適正な形態形成には、二次木部形成において何らかの制御機構がはたらいっていると考えられるが、これについては未解明な点が多かった。樹木成長の本質的な機構の解明と木材の高度利用を目指すためには、力学的環境と樹木形成層細胞の生理応答機構の関係を明らかにする必要があると考えられた。

2. 研究の目的

経年的に肥大成長を続ける樹木にとって、個体内外の力学的環境は、二次木部の形態形成に大きな影響を与える。しかしながら、樹木が力学的環境に適応し、適正な形態を形成する機構については、十分に明らかとなっていない。木材の物理的性質や機械的性質は、二次木部の細胞・細胞壁構造に大きく依存し、その形成には、形成層細胞が受ける力学的な作用が大きく影響する。有用な木質バイオマス資源である木材を高度に利用するためには、その基礎として、力学的作用に対する樹木細胞壁形成の分子レベルでの制御機構の解明が欠かせないと考えられる。

本研究では、力学的環境下での樹木細胞壁の形成に注目し、植物培養細胞に負荷された力と細胞壁形成関連遺伝子の発現の関係を定量的に明らかにすること、ならびに力学的作用が植物細胞壁の質的な変化に与える影響について観察することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、実験試料として、*Arabidopsis thaliana* Col-0 の液体培養細胞を用いた。この細胞懸濁液に対して、回転レオメータを用いてせん断力負荷を行った。細胞密度は、 $2.5 \times 10^7 \sim 2.9 \times 10^7$ cells/ml となるよう調製し、この細胞試料を 1 ml 供した。せん断力負荷後に細胞試料を回収し、凍結乾燥後、total RNA を抽出した。負荷条件は、回転数を 100 rpm および 200 rpm、負荷時間を 1、3、6 時間とした。抽出された total RNA から cDNA を合成した。

合成された cDNA を用いて、定量 PCR 法により、細胞壁形成関連遺伝子の発現解析を行った。解析対象とした遺伝子は、*AtPAL1*、*AtCCR1*、*AtSND1*、*AtNST1*、*AtKNAT7*、*AtMYB46*、*AtMYB85* とした。*AtPAL1* は、リグニン生合成の初発反応であるフェニルアラニンの脱アミノ化とケイヒ酸の生成を触媒する酵素をコードする。*AtCCR1* は、ケイヒ酸類 CoA エステルをケイヒアルデヒドに還元する酵素をコードする。また、*AtSND1* と *AtNST1* は、二次細胞壁の肥厚を誘導する転写因子である。さらに、MYB 因子は、高等生物に広く存在する転写因子であり、植物においては、二次代

謝やストレス応答などの特有な機能の制御に関与していると考えられている。*AtKNAT7* も同様に、二次壁形成に関する転写因子とされている。

回転数 200 rpm で 1 時間および 6 時間せん断力負荷させた培養細胞に対して、細胞壁内の二次代謝産物の観察を行った。せん断力負荷直後ならびに負荷後 12 時間静置させた培養細胞を 4%ホルムアルデヒドで固定し、脱水した。この細胞試料に 0.1M アンモニア水溶液を滴下し、蛍光観察を行い、フェルラ酸の蓄積の様子を観察した。また、脱水後の細胞試料に 1%フロログルシン・アルコールおよび濃塩酸を滴下し、リグニンの蓄積の様子を観察した。

4. 研究成果

4.1. せん断力負荷を受けた植物細胞における細胞壁形成関連遺伝子の発現

シロイヌナズナ液体培養細胞全体にせん断力を負荷すると、負荷開始から 30 分程度まではせん断応力、粘性率ともに徐々に低下したが、それ以降は安定的な数値を示した。200 rpm の条件でせん断力を負荷したとき、せん断応力 τ は、約 18 Pa であった。

200 rpm・1 時間の条件でせん断力負荷を受けた培養細胞では、*AtPAL1* の発現量 (*Qty*) は、同時間静置された細胞におけるそれよりも多く、3~17 倍であった(図 1)。また、*AtPAL1* については、この条件の測定すべてにおいて、せん断力負荷を受けた細胞試料の方が発現量が多かった。一方、せん断力負荷時間が 3 時間および 6 時間になると、*AtPAL1* の発現量は、同時間静置された細胞の場合と比較して多い場合と少ない場合が認められた。また、100 rpm・1 時間の条件でせん断力負荷を受けた培養細胞では、せん断応力は約 8.6 Pa であったが、*AtPAL1* の発現量は、同時間静置された細胞におけるそれよりも多く、14~29 倍であった。これらの結果から、力学的な作用による植物細胞内の PAL 遺伝子の発現は、比較的短時間で上昇し、そののち減少の傾向を示すこと、また、負荷応力の明確な依存性は示さないことが考えられた。つまり、植物細

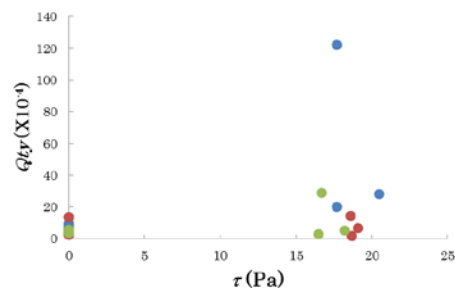


図 1. 力学負荷による *AtPAL1* の発現。
青：1 時間負荷、赤：3 時間負荷、緑：6 時間負荷。

胞に通常受ける力学的作用よりも大きな作用がかかれば、PAL 遺伝子の発現は急激に上昇するものと推測された。

AtCCR1 の発現量は、せん断力負荷と同時間静置培養された細胞においても、比較的大きい値を示した。200 rpm・1 時間の条件でせん断力負荷を受けた培養細胞では、*AtCCR1* の発現量は、同時間静置された細胞におけるそれよりも多い場合と少ない場合が認められた (図 2)。しかしながら、発現量が多い場合でも、約 1.3 倍であった。一方、せん断力負荷の時間が 6 時間の場合では、すべての測定において、*AtCCR1* の発現量は、同時間静置された細胞におけるそれよりもやや多くなった。また、100 rpm・1 時間の条件でせん断力負荷を受けた培養細胞では、*AtCCR1* の発現量は、同時間静置された細胞におけるそれよりも約 14% 減少した。これらの結果から、植物細胞内の CCR 遺伝子の発現は、力学的な作用によって大きな変動を示さないこと、力学負荷の時間が長くなるとその発現量がやや上昇することが考えられた。植物細胞は、力学負荷を受ける時間が長くなると、フェニルプロパノイド類の代謝活性を一定レベルで維持し、リグニンの生合成を行うものと推察される。

AtSND1 および *AtNST1* の発現は、いずれのせん断力負荷条件においても明確に測定できず、検出できた場合でも、*AtPAL1* や *AtCCR1* の検出値よりも 4 オーダー以上小さかった。また、定量 PCR 反応液の組成を見直し、特にプローブ量を増加させることで検出感度を上げを試みたが、測定の改善には至らなかった。これら転写因子は、少なくとも、力学的作用に対する植物細胞の二次壁肥厚の誘導には関与しない可能性が考えられるが、引き続きアイソフォームを含めてそれらの発現解析を行う必要があると考える。

その他に解析した 3 つの転写因子については、発現量は少ないものの、検出は可能であった。せん断力負荷による *AtMYB85* の発現について、その発現量は応力の大きさや負荷時

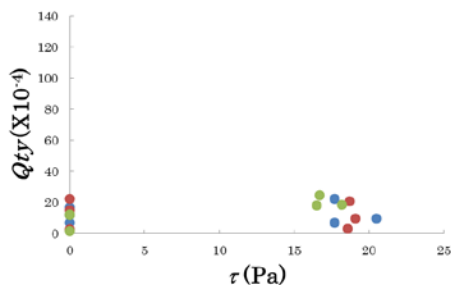


図 2. 力学負荷による *AtCCR1* の発現。青：1 時間負荷、赤：3 時間負荷：緑：6 時間負荷。

間の長さとも明確な関係を示さなかった。200 rpm・1 時間の条件でせん断力負荷を受けた培養細胞では、*AtMYB46* の発現量は、同時間静置された細胞におけるそれよりも多かった (図 3)。この傾向はせん断力負荷の時間の増加とともに顕著となり、6 時間の負荷で 12 倍以上大きくなる場合が認められた。せん断力負荷による *AtKNAT7* の発現についても同様に、せん断力負荷の時間が長くなると発現量が多くなる傾向が認められた。KNAT7 は、MYB46 の直接のターゲットで、MYB46 によってその転写が促進される。本実験における *AtMYB46* と *AtKNAT7* の発現解析の結果は、これとおおむね対応していると考えられた。また、これら二次細胞壁形成に関わる転写因子の遺伝子発現の増加にはある程度の時間が掛かったことから、植物細胞の二次壁形成には、時間的に連続した力学的作用が重要な因子であると

考えられた。

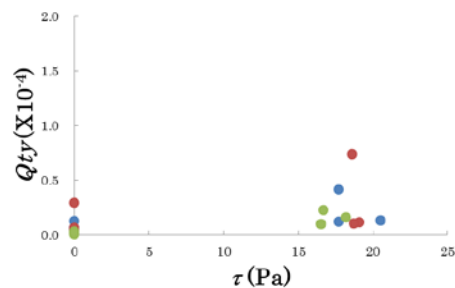


図 3. 力学負荷による *AtMYB46* の発現。青：1 時間負荷、赤：3 時間負荷：緑：6 時間負荷。

4.2. せん断力負荷を受けた植物細胞の細胞壁二次代謝産物の蓄積

細胞壁二次代謝産物であるフェルラ酸は、一次壁において主にヘミセルロースと結合している。フェルラ酸は波長 390 nm で励起すると、青色の蛍光として観察される。図 4 に、200 rpm・6 時間のせん断力負荷を受けた培養細胞におけるフェルラ酸の蓄積を示す。せん断力負荷を受けていない培養細胞と比較すると、せん断力負荷を受けた直後の培養細胞では、青色の蛍光がやや強くなっていた。これは、せん断力負荷による *AtPAL1* の発現の増加とおおむね対応していると考えられた。

さらに、植物培養細胞への力学的な作用が木質化への誘導に関与しているかを調べるため、せん断力負荷を受けた細胞におけるリグニンの蓄積を観察した。リグニンは、二次細胞壁における二次代謝産物で、木質化し細胞にフロログルシン・アルコールおよび濃塩酸を滴下すると、濃赤色または褐色に呈色す

る。図5は、この方法により観察された1時間および6時間のせん断力負荷を受けた培養細胞を示す。1時間のせん断力負荷では、濃赤色に呈色する培養細胞はわずかで、その呈色も弱く、せん断力負荷を受けていない場合とほぼ同じであった。これは、1時間のせん断力負荷を受けたのち、12時間静置培養した場合でも、同様であった。6時間のせん断力負荷を受けた直後にリグニンの蓄積を観察したが、同様に、明確な濃赤色の呈色は認められなかった。一方、6時間のせん断力負荷を受けたのち、12時間静置させた培養細胞では、明らかに濃赤色に呈色した細胞が観察された。これらの結果から、植物培養細胞への力学的な作用は細胞壁の木質化に關与する重要な因子であること、その効果が細胞壁で

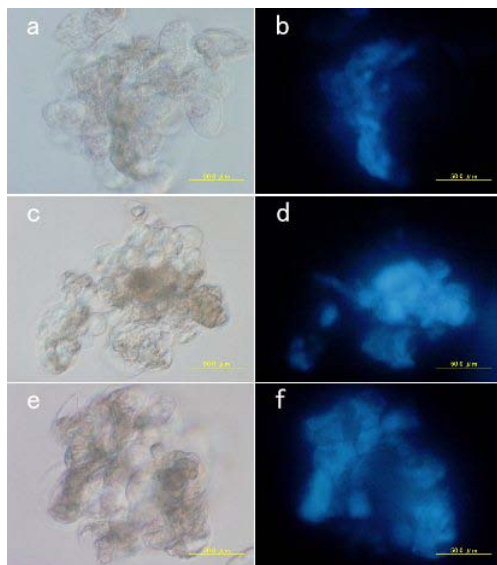


図4. せん断力負荷によるフェルラ酸の蓄積。a, b: 無負荷、c, d: 6時間負荷直後、e, f: 6時間負荷後12時間静置培養。

のリグニンの蓄積として現れるのにはある程度長い時間を要することが考えられた。ま

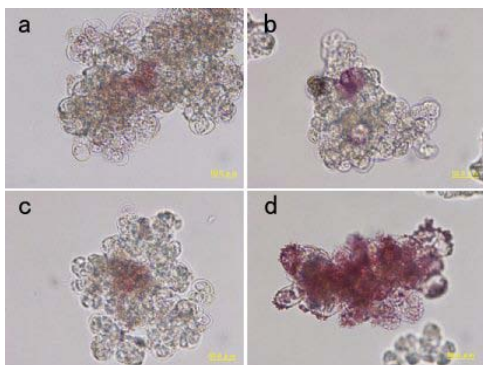


図5. せん断力負荷によるリグニンの蓄積。a: 無負荷、b: 1時間負荷直後、c: 1時間負荷後12時間静置培養、d: 6時間負荷後12時間静置培養。

た、この観察結果は、*AtMYB46*や*AtKNAT7*といった一部の二次壁形成転写因子の遺伝子発現と対応していると考えられた。

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)

[学会発表] (計4件)

- ① 辻村博子、渡邊宇外、安部久
力学刺激を受けるシロイヌナズナ培養細胞における*AtPAL1*および*AtCCR1*の発現応答
第60回日本木材学会大会、2010年3月18日、宮崎市
- ② 二橋亮介、渡邊宇外、木村聡
原子間力顕微鏡を用いた植物細胞壁再生過程の観察方法の検討
第60回日本木材学会大会、2010年3月18日、宮崎市
- ③ 若生雄飛、渡邊宇外、飯野正昭
力学負荷を受ける植物細胞内におけるPALの発現応答の観察方法
第60回日本木材学会大会、2010年3月18日、宮崎市
- ④ 辻村博子、渡邊宇外、安部久
力学刺激を受ける植物培養細胞における二次代謝関連遺伝子の発現応答
第61回日本木材学会大会、2011年3月18日、京都市

[図書] (計1件)

- ① 渡邊宇外
セル構造と木材の横方向ヤング率の多様性
木質の形成(第2版)、海青社、p. 497-501 (2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 宇外 (WATANABE UGAI)
千葉工業大学・工学部・准教授
研究者番号: 70337707