

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440124

研究課題名(和文)細胞壁多糖の細胞間輸送のための必須因子の同定

研究課題名(英文) Identification of factors essential for the extracellular trafficking of cell wall polysaccharides

研究代表者

横山 隆亮 (YOKOYAMA, Ryusuke)

東北大学・生命科学研究科・講師

研究者番号：90302083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞の形質を決定する最も重要な細胞器官の1つは、各細胞の表面に形成される細胞壁である。植物の細胞壁は多様な多糖類やタンパク質で構築される複雑かつ動的な高次構造物であるが、この細胞壁構造の構築や再編には、細胞外空間の適切なポイントへの酵素や基質の輸送が重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、今日まで細胞壁構築のための酵素や基質の細胞外での輸送の分子メカニズムについてはほとんど解明されていない。本研究では、この輸送システムに必要な制御因子の同定を試み、細胞壁構築関連分子の輸送と細胞壁構築の理解のための新たな分子モデルを確立した。

研究成果の概要(英文)：Plant cell wall plays several critical roles in determining the cell shape and functions, thereby having key roles in regulating plant growth and differentiation. The cell wall is a complex and dynamic structure that is a highly organized composite of many polysaccharides and proteins. The assembly and remodeling of the cell wall structure is involved in dynamic enzymes and substrates trafficking to the proper point in extracellular space. Various types of regulatory factors are supposed to contribute to the proper extracellular trafficking of the cell wall enzymes and substrates. To date however, the factors involved in regulation of the extracellular trafficking are almost unknown. The present study toward the characterization of trafficking regulatory factors offers an improved model for understanding the trafficking system and cell wall construction.

研究分野：生物学

キーワード：植物細胞壁 細胞壁多糖 細胞間輸送 イネ キシログルカン マイクロダイセクション

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物細胞の形質を決定する最も重要な因子の1つは、細胞表面を覆う細胞壁である。細胞壁は無数の分子で構成される複雑かつ動的な高次構造物であるが、細胞壁を細胞表面に正確に構築するためには、多様な酵素と基質が適切なタイミングで構築ポイントに供給されなければならない。酵素と基質の輸送に関しては、両者がまったく同時に同一の経路で輸送されると、構築ポイントに到達する前に両者が反応してしまう可能性がある。このような危険性を回避するために植物細胞では複数の厳密な制御機構が働いていると推測されているが、その分子メカニズムについてはほとんど解明されていなかった。

(2) 研究代表者らは、細胞壁構築関連分子の輸送制御システムの1つとして、ペクチンの架橋構造に必要なペクチンメチルエステラーゼ (PME) が不活性型の状態で輸送され、架橋構造の構築ポイントで活性型に変換されることを実証した。これは酵素の活性調節による輸送過程の制御システムとして有効に機能するものと考えられたが、細胞壁構築に関わる酵素の中には修飾等が確認できないものも多数確認され、この制御システムだけでは、細胞壁関連分子の輸送制御システムは理解できないものと考えられた。

(3) 研究代表者は、イネの維管束において、伴細胞で合成されたフコシル化キシログルカン (*f* XyG) が師管へと輸送され、細胞壁構築のために利用されていることを発見した。また師管の細胞壁に *f* XyG の転移反応を触媒すると推定されるキシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) が存在していることも明らかにした。これらの研究結果は、基質の細胞間輸送が適切な構築ポイントで酵素と基質を反応させるための制御システムとして機能していることを示唆していたが、*f* XyG の輸送経路や輸送形態、またその制御因子等の詳細については未解明のままであった。

### 2. 研究の目的

(1) 植物は細胞分化によって各細胞独自の細胞壁を構築する。本研究では、イネを研究材料として、維管束組織の師管細胞に特異的な細胞壁の構築に寄与する細胞間輸送の制御システムを解明し、植物の細胞壁構築機構の全容解明を目指す。

(2) 細胞壁多糖の1つである *f* XyG の伴細胞から師管への細胞間の輸送経路や輸送過程における分子構造、また師管の細胞壁の構成成分として組込まれるための分子メカニズムなどを解析することで、細胞壁多糖の細胞間輸送の実体を捉えるとともに、細胞壁多糖の細胞間輸送をともなう細胞壁構築過程を解明する。

(3) *f* XyG の輸送過程における分子構造や細胞間輸送の経路などが明らかになった場合、輸送経路に局在するタンパク質や、*f* XyG に相互作用するタンパク質を単離することで、細胞間輸送に関わる制御因子の同定を試みる。またこのアプローチを実行するために、植物組織の特定領域を迅速かつ多量に回収し、RNA やタンパク質を単離・同定する技術の開発を試みる。

### 3. 研究の方法

本研究計画では、以下のような研究戦略を推進することで、研究目標の達成を目指す。

- ・ *f* XyG の細胞間の輸送経路を解明する。
- ・ 細胞間の輸送経路における *f* XyG の分子構造を解明する。
- ・ イネの維管束組織内の *f* XyG の輸送経路の組織を単離・回収し、さらに回収した微量組織からの RNA やタンパク質の精製技術を開発することによって、*f* XyG の輸送に関わる制御因子を同定する。
- ・ 細胞壁多糖の細胞間輸送をともなう細胞壁の構築過程、そしてその制御機構を解明する。

(1) 研究代表者は本研究を開始するまでの細胞壁研究の中で、*f* XyG を特異的に認識するモノクローナル抗体を利用した間接蛍光抗体法によって、*f* XyG がイネの師管の細胞壁に特異的に蓄積していることを明らかにしていた。また同様の方法を用いて *f* XyG の合成酵素の1つであるフコース転移酵素が伴細胞に局在することも明らかにしていた。本研究では、さらに高解像度の免疫電子顕微鏡法を利用して、伴細胞と師管の間の *f* XyG の輸送経路を明らかにする。また同時に、さまざまなキシログルカンの構造を認識するモノクローナル抗体を利用することで、輸送過程の *f* XyG の分子構造を解析する。

(2) マイクロダイセクション法を利用して、*f* XyG の輸送経路 (数細胞とその細胞間領域) を迅速かつ多量に回収できる方法を開発し、このサンプルより RNA またはタンパク質を回収することで、*f* XyG の輸送に関わる制御因子候補を単離する。

(3) *f* XyG との相互作用等を解析することで制御因子の同定を目指す。また制御因子候補の遺伝子をノックアウトした形質転換イネを作成し、*f* XyG の細胞間の輸送への影響を調べることで、植物体における制御因子の機能を実証するとともに、細胞間輸送と細胞壁構築との関連性を解析する。

(4) さらに師管において *f* XyG を細胞壁に組込むために機能すると推定される XTH の発現量を低下させた RNAi 形質転換イネなどを作成することによって、細胞間輸送から細胞壁構築までの一連の分子機構を解析する。

#### 4. 研究成果

(1) 免疫電子顕微鏡法などによって、*f* XyG は師管の細胞壁に多量に蓄積していること、また伴細胞および伴細胞と師管の間のアポプラスト空間にも存在していることを確認した (図1)。一方、師管以外の細胞の細胞壁や、他のアポプラスト空間では *f* XyG を確認できなかったことから、*f* XyG は伴細胞からあらゆる方向に拡散した後師管の細胞壁に補足されるのではなく、伴細胞から師管の細胞壁へと方向性をもって輸送されることが明らかになった。

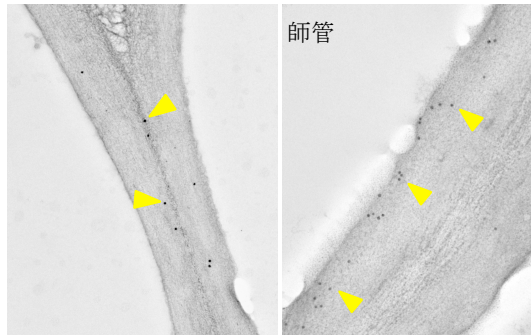


図1 *f*XyG の局在  
細胞間を輸送されていると考えられる *f*XyG (左)。  
師管の細胞壁に蓄積する *f*XyG (右)。

(2) 伴細胞と師管の間のアポプラスト空間における *f* XyG の局在を経時的に詳細に観察したところ、*f* XyG の細胞間輸送が師管分化の後期もしくは終了直後の非常に限定された期間に集中して起こることが明らかになった。またキシログルカンのフコース基を特異的に認識するモノクローナル抗体などを利用して、アポプラスト空間の *f* XyG を分析したところ、*f* XyG は側鎖構造が完成した状態で細胞間を輸送されていることが明らかになった。

(3) 師管の細胞壁で *f* XyG を組込むために機能している XTH の酵素特性を解析し、イネの XTH がキシログルカンの転移反応を触媒することを実証した。また XTH の発現量を低下させた RNAi 形質転換イネでは、背丈の低下などの表現型を示したが、師管の細胞壁での *f* XyG の蓄積への影響は確認できなかった。この結果は、師管の細胞壁における組込みの有無に関わらず、*f* XyG が師管の細胞壁へと能動的に輸送されていることを示している。

(4) *f* XyG の輸送経路と推定された特定の組織領域を多量かつ迅速にサンプリングして分析するために、マイクロダイセクションを利用したサンプリング法の改良を進めた。植物組織を固定直後に低真空で2枚のポリエチレンナフタレートフィルムに挟み込むことによって、厚さ 100  $\mu$ m までの組織から目的の部位を多量かつ迅速に回収することが

可能になった。また本技術を用いて回収したサンプルから RNA シークエンスやプロテオーム解析が可能であることも確認できたが、制御因子の同定までには至らなかった。これは技術的な要因だけではなく、本研究を通して明らかになった「*f* XyG の細胞間輸送が恒常的に行われているわけではなく、非常に限定された期間に起こる現象である」ことに起因する可能性があると考えられた。

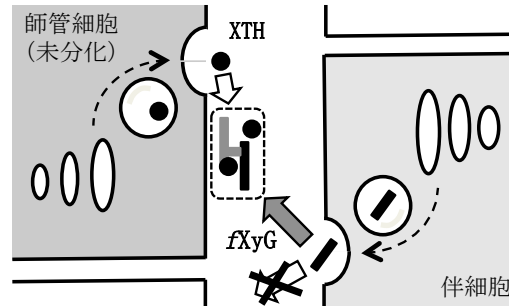


図2 イネの師管細胞壁構築における細胞間輸送の新モデル

以上の研究結果を踏まえて、イネの維管束分化における *f* XyG の細胞間輸送から師管の細胞壁構築過程までの新たな分子モデルを確立した (図2)。

#### 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 10 件)

- ① Ryusuke Yokoyama, Natsumi Kido, Tsuyoshi Yamamoto, Jun Furukawa, Hiroaki Iwai, Shinobu Satoh, Kazuhiko Nishitani (2016) Immunogold labeling analysis of cell wall polysaccharides with special reference to (1;3, 1;4)- $\beta$ -D-glucan in rice cell walls. Bio-protocol, 査読有 6: e1748. <http://www.bio-protocol.org/e1748>
- ② Yousuke Takaoka, Miyuki Shigenaga, Masaki Imai, Yuuki Nukadzuka, Yasuhiro Ishimaru, Kei Saito, Ryusuke Yokoyama, Kazuhiko Nishitani, Minoru Ueda (2016) Protein ligand-tethered synthetic calcium indicator for localization control and spatiotemporal calcium imaging in plant cells. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 査読有 26:9-14. doi:10.1016/j.bmcl.2015.11.055
- ③ Hideki Narukawa, Ryusuke Yokoyama, Kazuhiko Nishitani (2015) Possible pathways linking ploidy level to cell elongation and cuticular function in hypocotyls of dark-grown Arabidopsis seedlings. Plant Signaling & Behavior,

- 査読有 11:e1118597  
DOI:10.1080/15592324.2015.1118597.
- ④ Hideki Narukawa, Ryusuke Yokoyama, Shinichiro Komaki, Keiko Sugimoto, Kazuhiko Nishitani (2015) Stimulation of cell elongation by tetraploidy in hypocotyls of dark-grown Arabidopsis seedlings. PLOS ONE, 査読有 10:e0134547. doi:10.1371/journal.pone.0134547
- ⑤ Ryusuke Yokoyama, Natsumi Kido, Tsuyoshi Yamamoto, Jun Furukawa, Hiroaki Iwai, Shinobu Satoh, Kazuhiko Nishitani (2015) Histochemical analysis of silica body staining in rice leaf blades. Bio-protocol, 査読有 5:e1609. <http://www.bio-protocol.org/e1609>
- ⑥ Natsumi Kido, Ryusuke Yokoyama, Tsuyoshi Yamamoto, Jun Furukawa, Hiroaki Iwai, Shinobu Satoh, Kazuhiko Nishitani (2015) The matrix polysaccharide (1;3,1;4)- $\beta$ -D-glucan is involved in silicon-dependent strengthening of rice cell wall. Plant and Cell Physiology, 査読有 56: 268-276. doi:10.1093/pcp/pcu162
- ⑦ 横山隆亮, 鳴川秀樹, 工藤光子, 西谷和彦 (2015) 植物細胞壁: 高次構造の構築と再編 化学と生物 査読なし 53: 107-114
- ⑧ Weerasak Pitaksaringkarn, Masashi Asahina, Kenji Miura, Keita Matsuoka, Kimiyo Sage-Ono, Michiyuki Ono, Ryusuke Yokoyama, Kazuhiko Nishitani, Tadashi Ishii, Hiroaki Iwai, Shinobu Satoh (2014) XTH20 and XTH19 regulated by ANAC071 under auxin flow are involved in cell proliferation in incised Arabidopsis inflorescence stems. Plant Journal, 査読有 80: 604-614. DOI: 10.1111/tpj.12654
- ⑨ Ryusuke Yokoyama, Naoki Shinohara, Rin Asaoka, Hideki Narukawa, Kazuhiko Nishitani (2014) Plant Cell Wall Patterning and Cell Shape. Section 1; Factor controlling plant cell wall patterning. Chapter 1; The biosynthesis and function of polysaccharide components of the plant cell wall. 査読有 1-34. Wiley-Blackwell DOI: 10.1002/9781118647363
- ⑩ Yoshinao Hara, Ryusuke Yokoyama, Keishi Osakabe, Seiichi Toki, Kazuhiko Nishitani (2014) Xyloglucan is the principal substrate for endotransglucosylases/hydrolases in rice. Annals of Botany 査読有 114: 1309-1318. doi:10.1093/aob/mct292
- [学会発表] (計 19 件)
- ① Shinohara N, Sunagawa N, Tamura S, Yokoyama R, Igarashi K, Ueda M, Nishitani K Transglycosylation on cellulosic polysaccharides by member of the arabidopsis xyloglucan-endotransglucosylase/hydrolase family 第57回日本植物生理学会年会 岩手大学 (岩手県盛岡市) 2016年3月18日~3月20日
- ② Kuki H, Higaki H, Yokoyama R, Hasezawa S, Nishitani K Imaging analysis of cell wall regeneration in mesophyll protoplast derived from Arabidopsis thaliana 第57回日本植物生理学会年会 岩手大学 (岩手県盛岡市) 2016年3月18日~3月20日
- ③ 九鬼寛明、桧垣匠、横山隆亮、馳沢盛一郎、西谷和彦 プロトプラスト細胞壁再生系とイメージング解析を用いたセルロースネットワーク構築機構の解析 東北植物学会第5回大会 福島大学 (福島県福島市) 2015年12月19~12月20日
- ④ 竹内美和、九鬼寛明、黒羽剛、横山隆亮、西谷和彦 細胞壁構築における $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)-グルカンの機能解明 日本植物学会第79回大会 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市) 2015年9月6日~9月8日
- ⑤ 小浜大山、篠原直貴、横山隆亮、西谷和彦 膜交通過程におけるシロイヌナズナのペクチンメチルエステラーゼ PME35 の機能制御について 日本植物学会第79回大会 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市) 2015年9月6日~9月8日
- ⑥ 柴田航希、加賀悠樹、堀江佐知子、倉田哲也、牧雅之、横山隆亮、西谷和彦 アメリカネナシカズラの寄生メカニズムの解明 日本植物学会第79回大会 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市) 2015年9月6日~9月8日
- ⑦ 鳴川秀樹、横山隆亮、小牧伸一郎、杉本慶子、西谷和彦 シロイヌナズナの4倍体を用いた細胞サイズ決定メカニズムの解析 日本植物学会第79回大会 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市) 2015年9月6日~9月8日
- ⑧ Yokoyama R, Kuki H, Higaki T, Takeuchi M, Kuroha T, Hasezawa S, Nishitani K Temporal and spatial regulation of cell wall regeneration on arabidopsis mesophyll protoplasts. The 26th

- International Conference on Arabidopsis Research. Paris, France. 2015年7月5日～9日
- ⑨ Kuki H, Yokoyama R, Higaki T, Hasezawa S, Nishitani K Rethinking of construction and remodeling of the CM/XyG network in the primary cell wall “Front Lines of Plant Cell Wall Research” 奈良・東大寺 総合文化センター(奈良県奈良市) 2015年3月20日～21日
- ⑩ 横山隆亮, 九鬼寛明, 桧垣匠, 竹内美和, 馳澤盛一郎, 西谷和彦 植物プロトプラストの細胞壁再生の時間的・空間的制御機構 第56回日本植物生理学会年会 東京農業大学(東京都世田谷区) 2015年3月16日～18日
- ⑪ 藤田康平, 篠原直貴, 横山隆亮, 西谷和彦 エンド型キシログルカン転移素/加水分解酵素ファミリーの系統的基部にある PpXTH32 の酵素機能解析 東北植物学会第4回大会 山形大学(山形県山形市) 2014年12月13日～14日
- ⑫ 鳴川秀樹, 篠原直貴, 小牧伸一郎, 横山隆亮, 杉本慶子, 西谷和彦 シロイヌナズナ4倍体を用いた細胞サイズ決定メカニズムの解析 日本植物学会第78回大会 明治大学(神奈川県川崎市) 2014年9月12日～14日
- ⑬ 九鬼寛明, 桧垣匠, 小浜大山, 横山隆亮, 篠原直貴, 馳澤盛一郎, 西谷和彦 葉肉細胞プロトプラストの細胞壁再生系の開発とイメージング解析を利用した細胞壁構築過程の解析 日本植物学会第78回大会 明治大学(神奈川県川崎市) 2014年9月12日～14日
- ⑭ Yokoyama R, Nishitani K Role of (1,3;1,4)-beta-D-glucan in rice growth and development. Palm Cove, Australia The 5th International Conference on Plant Cell Wall Biology 2014年7月27日～31日
- ⑮ 金子麻里, 木戸奈都美, 横山隆亮, 山本剛史, 古川純, 岩井宏暁, 佐藤忍, 西谷和彦 The matrix polysaccharide (1;3,1;4)-beta-D-glucan is involved in silicon-dependent strengthening of rice cell wall 第55回日本植物生理学会年会 富山大学(富山県富山市) 2014年3月18日～20日
- ⑯ 小浜大山, 九鬼寛明, 浅岡凜, 篠原直貴, 横山隆亮, 西谷和彦 葉肉細胞プロトプラストを用いた細胞壁再生過程に関与するタンパク質群の解析 第55回日本植物生理学会年会 富山大学(富山県富山市) 2014年3月18日～20日
- ⑰ 横山隆亮, 柴田航希, 堀江佐知子, 牧雅之, 西谷和彦 レーザーマイクロダイセクション法によるネナシカズラ寄生根の組織特異的なオミクス解析を目指し

てワークショップ「茎寄生植物ネナシカズラ研究事始め」-これからネナシカズラの研究を始める方のために- 富山大学(富山県富山市) 2014年3月17日

- ⑱ 横山隆亮 バイオマス利用のためのイネの細胞壁研究 第65回日本生物工学会大会 広島国際会議場(広島県広島市) 2013年9月18日～20日
- ⑲ Yokoyama R, Kido N, Horie S, Nishitani K Role of cell wall matrix polysaccharides in rice growth and development. The XIII<sup>th</sup> Cell Wall Meeting Nantes, France. 2013年7月7日～12日

[図書] (計 1件)

1. Ryusuke Yokoyama, Hideki Narukawa, Kazuhiko Nishitani (2014) Atlas of Plant Cell Structure. Chapter 7; Cell Wall. Plate 7.9; Disclosing two typical cell wall polysaccharides, pectin and beta-1,3/1,4 mixed linked glucan, individually by immunological localization in two angiosperms, Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. Springer, 202 (150-151)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
[http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/nishitani\\_lab/](http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/nishitani_lab/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 隆亮 (YOKOYAMA RYUSUKE)

東北大学・大学院生命科学研究科・講師  
研究者番号: 90302083

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

西谷 和彦 (NISHITANI KAZUHIKO)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：60164555