

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850121

研究課題名(和文)心材形成誘導系を用いた樹木独自の細胞死発現機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of cell death in long-lived cells in trees by induction of artificial heartwood formation

研究代表者

半 智史(Nakaba, Satoshi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40627709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心材物質の一種であるアガサレジノールの生合成を伴ったスギ放射柔細胞の細胞死を誘導する実験系を用いて、同一試料を化学分析と顕微鏡観察に供試し、経時的に解析を行うことで、一次代謝と二次代謝を含めた代謝活性の変化および自己分解に関わる重要な出来事が起こるタイミングを明らかにした。加えて、短命の木部細胞である管状要素のプログラム細胞死において重要な役割を果たすタンパク質分解酵素であるxylem cysteine peptidaseが、長命の木部細胞である放射柔細胞の生存期間において、どのような遺伝子発現パターンを示すのかをリアルタイムPCR解析により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we used model system for analyzing the process of artificially induced cell death that accompanies with synthesis of a kind of heartwood substances, agatharesinol, in *Cryptomeria japonica*. The timing of activation of primary and secondary metabolisms and cytological changes during cell death of ray parenchyma cells in this system was revealed. In addition, intact ray parenchyma cells in *Populus* were analyzed by molecular biological methods. We isolated full-length cDNAs of xylem cysteine peptidases (XCPs), which is a kind of important autolytic enzyme in programmed cell death of short-lived tracheary element, from *P. sieboldii* × *P. grandidentata*. Patterns of gene expression of XCPs in long-lived ray parenchyma cells in *P. tremula* × *P. alba* were analyzed by real-time PCR. Our result implies that autolysis of ray parenchyma cells might not be fully explained by dramatically enhanced expression of XCP genes just before their programmed death.

研究分野：木質科学

キーワード：心材形成 放射柔細胞 細胞死 イメージング アガサレジノール 核 デンブ粒 遺伝子発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

二次木部細胞は、形成層に由来する細胞であり、再生可能な資源である木質バイオマスを構成している。二次木部細胞の分化および細胞死の過程は、二次木部細胞の性質を決定づけており、木質バイオマスの利用上重要な特性の発現を制御する。長命細胞である放射柔細胞の細胞死は、超多年生植物の樹木に特有な心材形成に深く関与する。心材とは樹幹内方に含まれ、辺縁部に位置する辺材より一般的に濃く着色し、耐久性の高い部位である。これら心材のもつ性質は、木質バイオマスの利用上重要な特性であり、心材形成機構を理解する上では、放射柔細胞の細胞死発現機構を解明する必要がある。

しかしながら、放射柔細胞の細胞死発現が、どのような機構によって制御されているのか未だ詳細な理解に至っていない。したがって本研究では、放射柔細胞の細胞死発現機構を解明することを最終目標とした。

放射柔細胞は、放射組織形成層細胞から分化し、数年から数十年の後に死を迎える。辺材外側(若い組織)と内側(古い組織)の放射柔細胞を比較した際に、内側では細胞小器官の数が減少する、あるいは液胞の肥大化が起こるなどの大まかな情報はあがるが、細胞小器官の消失の順序や細胞死に伴う遺伝子発現の変化など、細胞死機構を理解する上で重要な細胞死過程での経時的变化について詳細な情報はほとんどなかった。この原因は、申請者がこれまでに明らかにした放射柔細胞の細胞死の独自性にあると予想した。つまり、放射柔細胞の細胞死は、道管要素などの細胞死のように厳密な時間依存性をもたず、細胞ごとに死のタイミングにばらつきが存在するため、解析する上での“時間軸”を設定することが困難となっていた。

そこで申請者は、『樹幹より切り出した辺材部小片を湿度制御条件下でインキュベートする実験系』に着目した。この実験系を用いたスギに関する報告では、心材物質であるアガサレジノールの生合成に加え、放射柔細胞の細胞死が誘導された。この実験系では、辺材部小片を切り出した時点を開始点として“時間軸”を設定し、人為的に誘導した細胞死における変化を経時的に明らかに出来ると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、樹木特有の長命細胞である放射柔細胞の細胞死発現機構を解明し、心材形成機構の理解に重要な情報を与えることである。本研究期間では、1)心材形成誘導系における放射柔細胞の細胞死過程の経時的变化の解析、2)インタクトな放射柔細胞の細胞死過程の解析に焦点を絞り、以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1)心材形成誘導系を用いた放射柔細胞の細胞死過程の経時的变化の解析

本課題では、人為的に二次代謝を伴う放射柔細胞の細胞死を誘導する実験系を用いて、形態観察および二次代謝物質の生合成に関する解析を行い、放射柔細胞の細胞死に関連した形態変化および二次代謝物質の含有量の変化を経時的に明らかにすることを目的とした。これらの時系列の情報を同時に集めることで、二次代謝物質の生合成と細胞死の関連性を明らかにできる。加えて、傷害応答や心材形成における放射柔細胞の細胞死に関する情報との比較解析を行うことで、人為的に誘導した放射柔細胞の細胞死のもつ特徴を明らかにできる。

(2)インタクトな放射柔細胞の細胞死過程の解析

本課題では、インタクトな放射柔細胞について放射方向での変化を解析することで、放射柔細胞の細胞死制御に関する情報を得ることを目的とした。具体的には、人為的に誘導された放射柔細胞の細胞死において認められた特徴的な変化に着目し、インタクトな放射柔細胞での放射方向での形態変化および遺伝子発現量の変化を解析する。特に生存率の推移と核の形態変化に着目し、さらに、同じく木部細胞である管状要素の自己分解に関わるタンパク質分解酵素である Xylem cysteine peptidase(XCP)をターゲットとした。ポプラにおける XCP をコードすると予想される遺伝子(XCP1、XCP2A および XCP2B)に着目し、アミノ酸配列解析および放射方向における遺伝子発現パターンを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)心材形成誘導系を用いた放射柔細胞の細胞死過程の経時的变化の解析

独立行政法人森林総合研究所林木育種センター(茨城県日立市)に生育する針葉樹のスギ(*Cryptomeria japonica*)を供試木として用いた。二次代謝を伴う細胞死の誘導は、スギにおいて実績のある Imai and Nomura (2005)の方法に従った。供試木を伐採した後、長さ1mの丸太を研究室に持ち帰り、5cm厚の円板を切り出した。円板より、樹皮より2-4年輪目を含む辺材部小片(1x1x5cm)を複数採取し、相対湿度90%程度に調整したチャンバー内に室温にて保存するものを準備した。試料は、保存開始0、5、10、15、25日目に試料の上下2cmを切り落とし、残りの試料を二分割し、一方を化学分析用、もう一方を顕微鏡観察用とした。化学分析用試料からのメタノール抽出物中の酢酸エチル可溶部について、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)によりアガサレジノール含有量(絶乾重量%)を測定した。また、顕微鏡観察用試料の内、未固定の試料から柁目面の徒手切片を切り出し、生死判別のため fluorescein diacetate(FDA)と propidium iodide

(PI)の二重染色を行ない、蛍光顕微鏡下で観察した。さらに残りの試料は、グルタルアルデヒド溶液で固定後、スライディングマイクロトームにて40 μm厚の柎目面切片を作製し、酢酸カーミン溶液で核を、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液でデンプン粒を染色し、光学顕微鏡下で観察を行った。

#### (2) インタクトな放射柔細胞の細胞死過程の解析

XCP 遺伝子の全長配列の単離には、2007年10月および2012年6月に東京農工大学農学部実験圃場(東京都府中市)に生育する約14年生の交雑ポプラ(*Populus sieboldii* x *P. grandidentata*)より採取し、ディープフリーザ内にて保存していた試料を用いた。当年形成木部よりRNAを抽出し、GeneRacer™ kit (Life Technologies社)を用いた3'および5'RACEにより、3つのXCPを単離した。

加えて、XCPの遺伝子発現解析には、2014年8月に北海道大学札幌苗畑(北海道札幌市)に生育する約6年生の交雑ポプラ(*P. tremula* x *P. alba*)より採取した試料を用いた。採取した円板を直ちに液体窒素で凍結させ、さらに試料を年輪ごとに分割し、それぞれの年輪に含まれる放射柔細胞よりtotal RNAを抽出した。抽出したRNAから逆転写反応により1本鎖cDNAを合成し、リアルタイムPCRを行った。標準化のためのコントロールには、*ubiquitin 11 (UBQ)*遺伝子を用いた。

光学顕微鏡観察では、4%グルタルアルデヒド溶液により固定した試料を用いて、40 μm厚の柎目面切片を作製し、酢酸カーミン染色を施した後に、核の形態変化を観察した。加えて、核の有無を指標として放射柔細胞の生存率を年輪ごとに算出し、生存率の推移をグラフとして表した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 心材形成誘導系を用いた放射柔細胞の細胞死過程の経時的変化の解析

放射柔細胞の生存期間を明らかにするため、FDAとPIにより生死判別を行った(表)。その結果、保存開始15-25日目の間に、FDAの加水分解物であるフルオレセインに由来する蛍光が消失し、PIによる核の染色が認められた。したがって、保存開始15-25日目の間に細胞死を迎えたことが明らかになった。これらの結果は、放射柔細胞内におけるエステラーゼ活性の喪失と細胞膜の選択透過性の喪失が保存開始15-25日目の間に起こることを示している。

表. スギ辺材部小片における放射柔細胞のFDAとPIによる生死判別結果

: 染色あり、x: 染色無し

	0日目	5日目	10日目	15日目	25日目
FDA染色					x
PI染色	x	x	x	x	

アガサレジノールの生合成のパターンを明らかにするため、アガサレジノール含有量の経時変化をGC-MSにより測定した。その結果、保存開始後5-10日目の間にアガサレジノール含有量の急激な増加が認められた(図1)。その後、15日目にピークを迎え、15-25日目の間に急激な減少が認められた。アガサレジノールの生合成は5-10日目の間に最も盛んであると考えられる。また、15日目以降の減少は、重合などにより、アガサレジノールが別の物質に変化したことを反映していると考えられる。

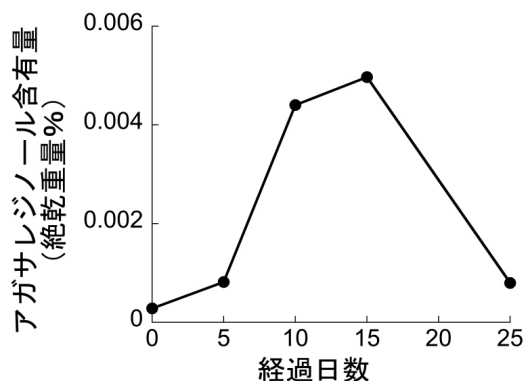


図1. スギ辺材部小片のアガサレジノール含有量(絶乾重量%)の経時変化

放射柔細胞中に含まれる貯蔵物質の変化を明らかにするため、デンプン粒の観察を行った(図2)。デンプン粒は、伐採当日では非常に多く含まれていたが、保存開始後5-10日目の間に急激に減少し、25日目には完全に消失した。細胞活動のエネルギー源であり、物質の生合成の原料でもあるデンプン粒の消費は、5-10日目の間が最も盛んであった。

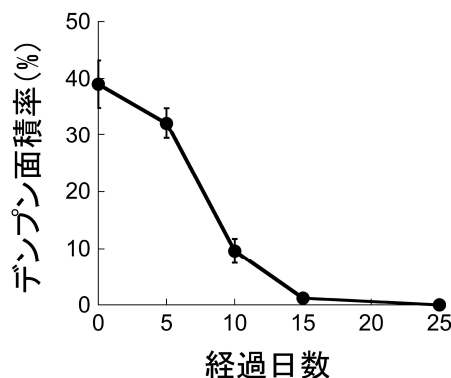


図2. スギ辺材部小片中の放射柔細胞におけるデンプン面積率の経時変化  
Barは標準偏差を表す(n=3)

以上の結果より、アガサレジノールとデンプン粒の含有量は同様のタイミングで急激に変化することが明らかになった。さらに、細胞死に関連する明確な変化は、代謝が活性化している間には顕微鏡観察では検出されなかった。本実験系において、一次代謝、二

次代謝といった化学的变化と細胞学的变化を関連付けることができたといえる。

加えて、本実験系において起こる二次代謝を伴う放射柔細胞の細胞死出現パターンと、心材形成に伴う放射柔細胞の細胞死および傷害心材形成時など傷害応答における放射柔細胞の細胞死の出現パターンとの比較を行った。特に、核の形態変化および消失のタイミングに着目した。その結果、本実験系で起こる細胞死においては、細胞死に至るまでの時間に細胞ごとに大きくばらつくことはなく、心材形成に伴う細胞死とは異なる特徴をもつといえる。細胞死出現パターンからは、本実験系において起こる細胞死は、傷害応答時に起こる細胞死に類似したものであると判断された。

### (2) インタクトな放射柔細胞の細胞死過程の解析

*P. sieboldii* x *P. grandidentata* (Psg) より全長の *XCP1*, *XCP2A* および *XCP2B* を単離した。塩基配列からアミノ酸配列を予想した結果、Psg*XCP1*, Psg*XCP2A* および Psg*XCP2B* は、At*XCP1* との相同性がそれぞれ 75%, 69% および 72% であり、At*XCP2* との相同性は 77% であった。システインプロテアーゼの活性中心を構成するアミノ酸残基 (Cys-His-Asn) は、すべての Psg*XCP* で保存されていたため、これらのタンパク質はシステインプロテアーゼとして働くことが予想された。

さらに、*P. tremula* x *P. alba* (Pta) を用いて核の形態変化について顕微鏡観察を行った。核の形態は、辺材外側から内側に向かい、紡錘形から球形に変化し、最終的に凝縮して不定形となった。このような結果は、これまでのポプラにおける観察結果と一致しており、採取した試料は細胞死過程の途中にある細胞を含んでいると判断した。また、核の有無を判断基準として、個体 1 および個体 2 の放射柔細胞の生存率の放射方向における推移を算出したところ、それぞれ樹皮より 5 年輪目および 4 年輪目においてすべての放射柔細胞が死滅することが明らかになった (図 3)。

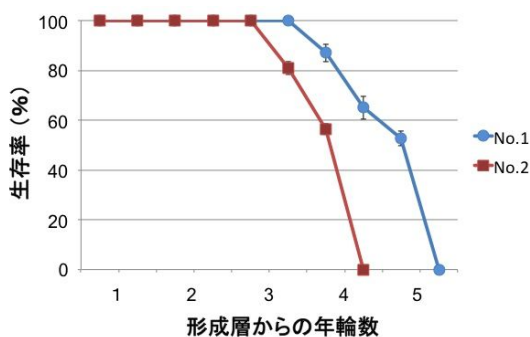


図 3. 交雑ポプラ放射柔細胞の放射方向における生存率の推移

*PtaXCP1*, *PtaXCP2A* および *PtaXCP2B* の放射方向における遺伝子発現パターンをリアルタイム PCR により解析した (図 4)。その

結果、すべての *XCP* 遺伝子が、辺材において発現し続けていることが明らかになった。この結果は、すべての *XCP* 遺伝子が、放射柔細胞が生きている 4-5 年間発現し続けていることを示している。加えて、いずれの個体においても、細胞死を迎える辺材最内年輪において *XCP* 遺伝子の発現量がピークを迎えることはなかった。短命の木部細胞のプログラム細胞死においては、細胞死直前に急激な *XCP* 遺伝子の上昇が報告されているが、放射柔細胞においては同様の遺伝子発現パターンは認められなかった。したがって、放射柔細胞の細胞死は、細胞死直前における *XCP* 遺伝子の急激な発現上昇によって説明されるものではないことが明らかになった。

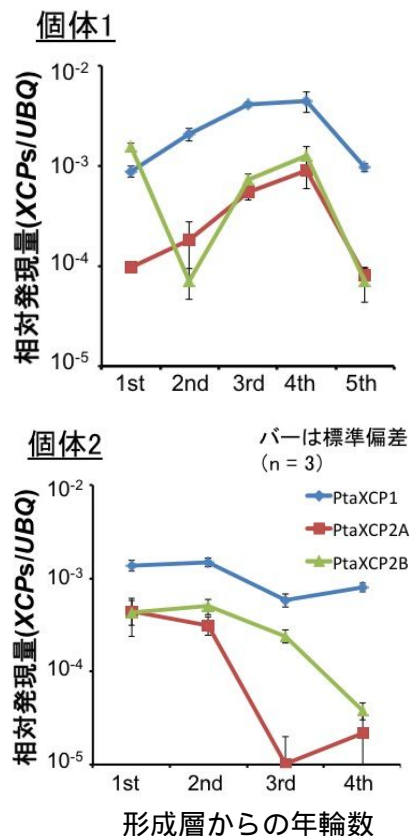


図 4. 交雑ポプラ放射柔細胞の放射方向における *XCP* 遺伝子の発現パターン

### (3) まとめ

二次代謝を伴う細胞死誘導系を用いた放射柔細胞の細胞死過程については、心材形成において起こる細胞死とは異なる特徴をもつことが明らかになった。ただし、この実験系において誘導される細胞死は、二次代謝を伴うことから、心材形成における細胞死と共通したプロセスをもつ可能性が考えられる。本実験系は、樹幹奥深くで起こる心材形成に伴う細胞死とは異なり、チャンパー内において環境を制御することが容易である。したがって、放射柔細胞の細胞死過程の解明のためのモデル実験系として期待できるといえる。

さらに、二次代謝を伴う細胞死誘導系を用

いた実験において、デンプン粒の急激な減少およびアガサレジン含有量の急激な増加のタイミングを明らかにし、一次代謝と二次代謝を含め代謝が活性化するタイミングを明らかにした。さらに、FDA と PI の二重染色により、細胞内エステラーゼ活性の喪失や細胞膜の選択透過性の喪失など自己分解において重要なタイミングを明らかにすることができた。今後、本実験系において二次代謝を伴う放射柔細胞の細胞死過程をより詳細に解析する上で、非常に有用な知見を得ることができたといえる。

加えて、モデル樹木であるポプラを用いて、管状要素のプログラム細胞死で重要な役割を果たす xylem cysteine peptidases のアミノ酸配列解析および樹木特有の長命な木部細胞である放射柔細胞に特徴的な XCP 遺伝子の発現パターンを明らかに出来た。短命の木部細胞である管状要素の細胞死においては、二次壁形成完了後速やかに細胞死を迎えるが、ポプラ放射柔細胞では、当年形成木部において明らかな二次壁肥厚が観察されるものの、速やかに細胞死を迎えることはなく、放射柔細胞が生きている 4-5 年間、XCP 遺伝子は発現し続けることが明らかになった。XCP 遺伝子の発現と自己分解のタイミングの違いは、XCP が放射柔細胞内に長期間蓄積される、あるいは放射柔細胞間を移動する可能性を示している。

以上の成果は、国際的な学術雑誌である Plant Biotechnology 誌において原著論文として発表し、8th Pacific Regional Wood Anatomy Conference (PRWAC) & Annual meeting of International Academy of Wood Science (IAWS)、The 6th International Symposium of Indonesian Wood Research Society、International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS 2015) といった国際会議における発表を行った。また、アメリカ合衆国のバージニア工科大学での招待セミナーにおいても成果を紹介し、さらに日本木材学会大会、日本植物学会大会といった国内学会においても成果発表を行った。

#### 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1件)

1. Satoshi Nakaba, Naoki Takata, Makoto Yoshida, Ryo Funada (2015) Continuous expression of genes for xylem cysteine peptidases in long-lived ray parenchyma cells in *Populus*. *Plant Biotechnology* 32: 21-29 (査読有)

[学会発表](計14件)

1. 半智史, 荒川 泉, 森本 光, 中田了五, 尾頭信昌, 今井貴規, 船田 良「スギ木部放射柔細胞を用いた二次代謝を伴う細胞死誘

導系における細胞内容物の経時変化」：第 65 回日本木材学会大会 2015 年 3 月 18 日、船堀タワーホール(東京都・江戸川区)

2. 森本 光, 荒川 泉, 山岸祐介, 船田 良, 半智史「傷害部における仮道管の脱水がスギの放射柔細胞の内容物の変化に与える影響」：第 65 回日本木材学会大会 2015 年 3 月 17 日、船堀タワーホール(東京都・江戸川区)

3. 荒川 泉, 森本 光, 山岸祐介, 船田 良, 半智史「スギおよびヒノキ放射柔細胞における液胞の生体染色条件の検討」：第 65 回日本木材学会大会 2015 年 3 月 17 日、船堀タワーホール(東京都・江戸川区)

4. 三ツ屋佑樹, 須藤紹博, 荒川 泉, 山岸祐介, 船田 良, 半智史「アカマツおよびモミ放射柔細胞の放射方向における細胞内容物の変化」：第 65 回日本木材学会大会 2015 年 3 月 17 日、船堀タワーホール(東京都・江戸川区)

5. Satoshi Nakaba, Izumi Arakawa, Hikaru Morimoto, Naoki Takata, Makoto Yoshida, Yuzou Sano, Ryo Funada: Cell biological analysis of the death of long-lived ray parenchyma cells, International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS 2015), 16 March 2015, 船堀タワーホール(東京都・江戸川区)

6. Izumi Arakawa, Hikaru Morimoto, Ryogo Nakada, Ryo Funada, Satoshi Nakaba: Morphological changes and disappearance of nuclei in ray parenchyma cells during heartwood formation in *Cryptomeria japonica*, International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS 2015), 16 March 2015, 船堀タワーホール(東京都・江戸川区)

7. Satoshi Nakaba: Cell biological studies on cell death in secondary xylem. Eco-materials research in Japan - Applications for nanocellulose, new fungal enzymes, and physiological control. 12 January 2015, Blacksburg (USA) (招待セミナー)

8. Satoshi Nakaba, Izumi Arakawa, Hikaru Morimoto, Yuzou Sano, Ryo Funada: Differences in the timing of disappearance among cellular contents during cell death of ray parenchyma in *Abies sachalinensis*. The 6th International Symposium of Indonesian Wood Research Society, 12 November 2014, Medan (Indonesia) (The Best Presentation を受賞)

9. Izumi Arakawa, Hikaru Morimoto, Ryogo Nakada, Ryo Funada, Satoshi Nakaba: Changes in cellular contents of ray parenchyma cells during heartwood formation in *Cryptomeria japonica*, The 6th International Symposium of Indonesian Wood Research Society, 13 November 2014, Medan (Indonesia)

10. 半智史, 高田直樹, 吉田 誠, 船田 良「ポプラ放射柔細胞における xylem cysteine peptidase の遺伝子発現解析」：第 78 回日本

植物学会大会 2014年9月 明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

11. 半 智史、高田直樹、吉田 誠、船田 良「ポプラ Xylem Cysteine Peptidase の細胞内局在および放射柔細胞における遺伝子発現解析」:

第64回日本木材学会大会 2014年3月14日、愛媛大学城北キャンパス(愛媛県・松山市)

12. 荒川 泉、森本 光、中田了五、船田 良、半 智史「スギの心材形成に伴う放射柔細胞の細胞死過程における細胞内容物の変化」:

第64回日本木材学会大会 2014年3月13日、愛媛県県民分化会館ひめぎんホール(愛媛県松山市)

13. 森本 光、荒川 泉、半 智史、中田了五、船田 良「スギの傷害心材形成時の脱水範囲および放射柔細胞の内容物の変化に関する研究」: 第64回日本木材学会大会 2014年3月13日、愛媛県県民分化会館ひめぎんホール(愛媛県松山市)

14. Satoshi Nakaba, Yuzou Sano, Ryo Funada: Disappearance of organelles during cell death of ray parenchyma in *Abies sachalinensis*. 8th Pacific Regional Wood Anatomy Conference (PRWAC) & Annual meeting of International Academy of Wood Science (IAWS). 20 October 2013, Nanjing (China)

#### 〔図書〕(計1件)

1. Satoshi Nakaba, Peter Kitin, Yusuke Yamagishi, Shahanara Begum, Kayo Kudo, Widyanto Dwi Nugroho, Ryo Funada (2015) Three-dimensional imaging of cambium and secondary xylem cells by confocal laser scanning microscopy. In: Yeung, E.C.T., Stasolla, C., Summer, M.J., Huang, B.Q. (eds.) Plant Microtechniques: Methods and Protocols, Springer (in press).

#### 〔その他〕

ホームページ等

[www.tuat.ac.jp/~tokusei/index.html](http://www.tuat.ac.jp/~tokusei/index.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

半 智史 (NAKABA SATOSHI)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号: 40627709