

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850124

研究課題名(和文) 樹木木部組織での表層微小管のライブセルイメージング

研究課題名(英文) Live imaging of cortical microtubule arrays in developing wood fiber cells

## 研究代表者

高田 直樹 (Takata, Naoki)

国立研究開発法人 森林総合研究所・森林バイオ研究センター・主任研究員

研究者番号：90605544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では木部細胞の二次壁形成過程で生じるセルロースマイクロフィブリルの配向変化を制御する細胞内分子機構を明らかにするために、木部細胞を用いた表層微小管のライブイメージング法の試行および表層微小管の空間配置を制御する因子の探索と機能解析を行った。前者では、微小管をGFPにより標識したポプラ形質転換体を用いて蛍光観察を行った。しかし、多くの木繊維細胞では繊維状の表層微小管を観察することは困難であった。後者では、ポプラにおいて表層微小管の平行性と密度を制御する2遺伝子を同定し、それらの遺伝子が二次木部で高発現することおよび下流の微小管関連タンパク質を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The secondary cell wall is divided into three layers based on the orientation of cellulose microfibrils (MFs). The alignment of MFs is guided by cortical microtubules (CMTs) and its spatial distribution is rearranged during the developmental process of xylem cells. The aim of this study is to reveal intracellular mechanisms that regulate spatial pattern of CMTs in xylem fibers. First, we tried to visualize CMTs in fibers using the transgenic poplars expressing GFP-tagged  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin. However, GFP fluorescence representing CMTs was not imaged in almost all cells. Second, we attempted to identify transcription factors that control spatial pattern of CMTs in xylem cells. The distribution of CMTs was more aligned in the transgenic poplar overexpressing TF26 and TF34. Since the genes were preferentially expressed in secondary xylem and regulated microtubule-associated proteins as downstream targets, they may have a key role in ordered alignments of CMTs in secondary xylem cells.

研究分野：樹木分子生物学

キーワード：表層微小管 セルロースマイクロフィブリル 木繊維細胞 ポプラ

## 1. 研究開始当初の背景

樹木は高度に分化した細胞壁を形成することで、その巨大な樹体を永年的に保持している。細胞壁は一次壁と二次壁に大別され、一次壁は細胞が伸長・拡大中に堆積する薄い細胞壁であり、二次壁は細胞が伸長・拡大停止後に堆積する厚い細胞壁である。広葉樹の木繊維や針葉樹の仮道管の場合、二次壁はS<sub>1</sub>層、S<sub>2</sub>層、S<sub>3</sub>層の3層に区別され、各壁層では細胞長軸に対するセルロースマイクロフィブリル(MF)の配向角度が異なっている(文献1)。MFの配向制御には、細胞膜の裏打ち構造である表層微小管が密接に関与している。表層微小管は二次壁の形成過程で連続的に配向変化しており、MFの配向パターンと一致している。このことは、表層微小管がMFの配向を制御することを示唆している。しかし、二次壁形成過程で生じる表層微小管の配向変化が、どのような細胞内分子機構により制御されているのか未だ詳細な理解には至っていない。

これまで、木部細胞の表層微小管の観察方法として、免疫染色法が行われてきた。二次壁形成中の木部細胞では、表層微小管は並行的かつ密に局在する(文献2)。さらに、S<sub>1</sub>層堆積中の細胞では微小管は緩傾斜のSらせん、S<sub>2</sub>層堆積中の細胞では急傾斜のZらせん、S<sub>3</sub>層堆積中の細胞では緩傾斜のSらせんを示す。また、S<sub>1</sub>層とS<sub>2</sub>層の間とS<sub>2</sub>層とS<sub>3</sub>層の間には移行層が観察される。しかし、免疫染色法では、細胞を化学固定するために生細胞での観察ができず、表層微小管の空間的・時間的な変動を解析することは困難であった。

生体内で微小管を可視化する技術は、ここ数年で高度に発展してきた。表層微小管は、 $\alpha$ -チューブリン(TUA)と $\beta$ -チューブリン(TUB)を主な構成要素とする繊維状の細胞内構造体である。近年、微小管を構成するタンパク質(TUAやTUBなど)と蛍光タンパク質(GFPなど)を融合したタンパク質を植物体で発現させることにより、微小管を直接観察する方法が確立してきた(文献3)。この手法では細胞の生理活性を維持したまま生体内を観察できることから、微小管の空間的変化を時系列で解析することに適している。そこで、本研究では、微小管の直接観察法をモデル樹木であるポプラに適用し、木繊維細胞の発達過程における表層微小管の時空間的な観察を試みる。

## 2. 研究の目的

本研究では、二次壁のMFおよび表層微小管の配向を制御する細胞内分子機構を解明することを最終目標とした。そのために、微小管を蛍光タンパク質により標識したポプラ形質転換体を用い、木部細胞において表層微小管の観察手法の確立および表層微小管の空間的・時間的な変動の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)木部細胞での表層微小管の可視化

微小管をGFPにより標識したポプラ形質転換体(CaMV35S::GFP-AtTUA6, CaMV35S::GFP-AtTUB6)を用い、表層微小管の可視化を行った。鉢植えにした形質転換体から約20節間目の幹をサンプリングし、表皮、師部、形成層、木部、髄を含む幹の徒手切片を作成した。その後、共焦点レーザー顕微鏡によりGFP蛍光を観察した。

### (2)二次壁特異的プロモーターを用いた改変型ポプラ形質転換体の作成と表層微小管の可視化

GFPにより標識したAtTUA6およびAtTUB6を木部組織において高発現させるために、遺伝子コンストラクトの改変を行った。木部組織において強発現することが明らかになっているポプラ・セルロース合成酵素PtxtCesA8BのプロモーターにGFP-AtTUA6およびGFP-AtTUB6を連結したコンストラクトを作成し、アグロバクテリウム法によりポプラに導入した(PtxtCesA8Bpro::GFP-AtTUA6, PtxtCesA8Bpro::GFP-AtTUB6)。①と同様の方法により、GFP蛍光を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

### (3)表層微小管の空間配置を制御する新規因子の探索

ポプラにおいて表層微小管の配向を制御する新規因子の探索を行った。木部組織で発現する34個の転写因子(TF)に着目し、遺伝子コンストラクト(CaMV35S::TF-TagRFP)を構築した後、ポプラ形質転換体(CaMV35S::GFP-AtTUA6)に導入した。作成したポプラ二重形質転換体について、葉の表皮細胞を用いてGFP蛍光を観察した。得られた観察像から表層微小管の空間構造を定量化するために、新たに画像解析ソフトウェアを開発し、表層微小管の平行性と密度を定量化した。

### (4)新規因子(TF<sup>26</sup>遺伝子およびTF<sup>34</sup>遺伝子)の機能解析

ポプラにおいて表層微小管の空間配置を制御する新たな因子(TF<sup>26</sup>遺伝子およびTF<sup>34</sup>遺伝子)について機能解析を行った。まず、ポプラの各組織(頂端、伸長中の茎、肥大成長中の茎の師部及び木部、葉、葉柄)を用いて、TF<sup>26</sup>遺伝子およびTF<sup>34</sup>遺伝子の発現量をreal-time PCRにより定量化した。各遺伝子を制御する上流遺伝子を探索するために、ポプラのVNS(VND-, NST/SND- and SMB-)オルソログとTF<sup>26</sup>遺伝子およびTF<sup>34</sup>遺伝子のプロモーター領域を用いて*in vivo*トランスアクチベーションアッセイを行った。各遺伝子が制御する下流の遺伝子群を同定するために、TF<sup>26</sup>遺伝子過剰発現体、TF<sup>34</sup>遺伝子過剰発現体、コントロールの葉からtotal RNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 木部細胞での表層微小管の可視化

ポプラ形質転換体 (CaMV35S::GFP-AtTUA6, CaMV35S::GFP-AtTUB6) の幹から徒手切片を作成し、高感度型の共焦点レーザー顕微鏡を用いて表層微小管の蛍光観察を行った。その結果、一部の木繊維細胞において微小管を直接観察することに成功した (図1)。これらの細胞では表層微小管が配向性よく密に局在することから、二次壁形成中の細胞であると推察された。

表層微小管を直接観察できる細胞がある一方で、多くの木部細胞では GFP 蛍光を介して微小管を観察することが困難であった。その原因として、構成発現プロモーター (CaMV35S) の活性が木繊維細胞において弱いことや今回用いたチュープリンタンパク質が木部細胞の微小管に取り込まれにくいことが考えられた。このため、ポプラ形質転換体 (CaMV35S::GFP-AtTUA6, CaMV35S::GFP-AtTUB6) を用いて本研究の目的 (木部細胞における表層微小管の空間的・時間的な変動解析) を達成することは困難であると推察された。

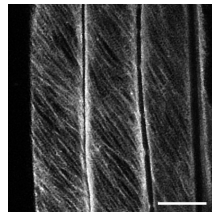


図1. 木繊維細胞における微小管の蛍光観察像. CaMV35S::GFP-AtTUA6 を発現させたポプラ形質転換体. スケールバーは 20 $\mu$ m.

##### (2) 二次壁特異的プロモーターを用いた改変型ポプラ形質転換体の作成と表層微小管の可視化

GFP-AtTUA6 および GFP-AtTUB6 を木部組織において高発現させるために、プロモーターをポプラ・セルロース合成酵素 PtxtCesA8B に改変した遺伝子コンストラクトを作成し、ポプラに導入した。得られたポプラ形質転換体 (PtxtCesA8Bpro::GFP-AtTUA6, PtxtCesA8Bpro::GFP-AtTUB6) の幹切片を用い、木繊維細胞での微小管の蛍光観察を行った。その結果、GFP 蛍光は主に細胞質から観察され、繊維状の表層微小管は観察されなかった。このことは、木繊維細胞において GFP 標識した AtTUA6 および AtTUB6 が細胞質にプールされていることを示している。

(1) および (2) の結果より、木繊維細胞において GFP 蛍光を介した表層微小管の観察が困難な原因として、微小管を標識するために用いたシロイヌナズナのチュープリンタンパク質 (AtTUA6 および AtTUB6) が木繊維細胞の表層微小管に取り込まれにくい可能性と

幹切片を作成する過程で微小管が脱重合する可能性が考えられた。

##### (3) 表層微小管の空間配置を制御する新規因子の探索

木繊維細胞を用いた表層微小管の直接観察法の開発と並行して、木部発達の過程で微小管の空間配置を制御する新規因子の探索を行った。まず、木部組織で発現する 34 個の転写因子 (TF) に着目し、遺伝子コンストラクト (CaMV35S::TF-TagRFP) を構築した後、ポプラ形質転換体 (CaMV35S::GFP-AtTUA6) に導入した。作成したポプラ二重形質転換体について、表層微小管の蛍光観察像を取得し、表層微小管の平行性および密度を画像解析ソフトウェアにより定量化した。その結果、TF<sup>26</sup> 遺伝子を過剰発現させたポプラでは表層微小管の平行性と密度が増加しており、TF<sup>34</sup> 遺伝子を過剰発現させたポプラでは平行性が増加していた (図2)。これらの結果より、TF<sup>26</sup> 遺伝子および TF<sup>34</sup> 遺伝子は木部細胞の発達過程で表層微小管の空間配置を制御する可能性が示唆された。

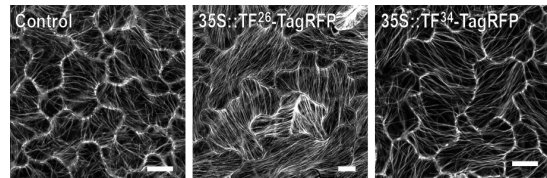


図2. TF<sup>26</sup> 遺伝子過剰発現体および TF<sup>34</sup> 遺伝子過剰発現体での表層微小管の GFP 蛍光観察像. スケールバーは 10 $\mu$ m.

##### (4) 新規因子 (TF<sup>26</sup> 遺伝子および TF<sup>34</sup> 遺伝子) の機能解析

ポプラにおいて表層微小管の空間配置を制御する TF<sup>26</sup> 遺伝子および TF<sup>34</sup> 遺伝子の機能解析を行った。まず、各組織における両遺伝子の発現パターンを解析した結果、TF<sup>26</sup> 遺伝子および TF<sup>34</sup> 遺伝子は二次木部において強く発現することを明らかにした。また、各遺伝子を発現制御する上流遺伝子を探索したところ、ポプラの NST/SND オルソログ (NST/SND; シロイヌナズナにおいて木繊維細胞の二次壁形成のマスター転写因子) が両遺伝子の発現を正に制御していた (図3)。さらに、TF<sup>26</sup> 遺伝子および TF<sup>34</sup> 遺伝子が制御する下流の遺伝子群を同定するために、TF<sup>26</sup> 遺伝子過剰発現体及び TF<sup>34</sup> 遺伝子過剰発現体を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、TF<sup>26</sup> 遺伝子過剰発現体では 498 遺伝子が発現変動しており、TF<sup>34</sup> 遺伝子過剰発現体では 238 遺伝子が発現変動していた。下流の遺伝子群には微小管関連タンパク質遺伝子 (tubulin, MAP65, kinase など) が存在することから、各転写因子が下流の遺伝子を制御することにより木部細胞の表層微小管の空間構造が決定されると推察された。

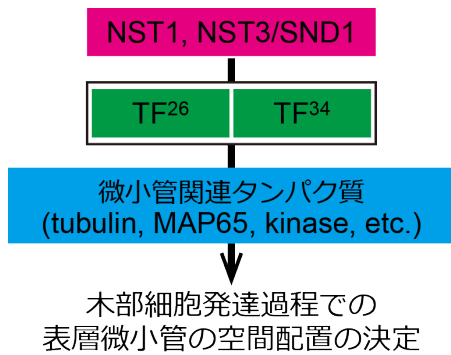


図3. 木部細胞の発達過程における表層微小管の空間配置を制御する機構のモデル。

<引用文献>

Funada R. (2008) Microtubules and the control of wood formation. In: Nick, P. (ed.) Plant Microtubules: Development and Flexibility, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 83-119.

Chaffey N, Barlow P, Sundberg B. (2002) Understanding the role of the cytoskeleton in wood formation in angiosperm trees: hybrid aspen (*Populus tremula* x *P. tremuloides*) as the model species. *Tree Physiology*, 239-249.

Ueda K, Matsuyama T, Hashimoto T. (1999) Visualization of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, 201-206.

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8件)

Takata N, Taniguchi T. (2015) Expression divergence of cellulose synthase (*CesA*) genes after a recent whole genome duplication event in *Populus*. *Planta*, 査読有, 241, 29-42. DOI: 10.1007/s00425-014-2217-9

高田直樹, 谷口亨. (2015) 木質の改変に利用可能な二次壁特異的プロモーターの同定-ポプラにおいて-. 林木育種の最前線-2011年度~2015年度の主要成果-, 査読無, 38.

URL:  
<https://www.ffpri.affrc.go.jp/ftbc/business/issue/rinboku/documents/frontiers2015.pdf>

高田直樹. (2015) 木質の構造と遺伝子(2). 林木育種情報, 査読無, 18, 7.

URL:

<https://www.ffpri.affrc.go.jp/ftbc/business/issue/documents/18-6.pdfz>

高田直樹. (2015) 木質の構造と遺伝子(1). 林木育種情報, 査読無, 17, 5.

URL:

<https://www.ffpri.affrc.go.jp/ftbc/business/issue/documents/17-5.pdf>

[学会発表](計18件)

高田直樹, 谷口亨, 朽名夏磨. ポプラにおいて表層微小管の空間構造を制御する転写因子の機能解析. 第66回日本木材学会, 2016年3月27~29日, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)

Takata N, Taniguchi T. Identification of transcription factors that regulate cortical microtubule structure in secondary xylem cells of poplar. 第57回日本植物生理学会, 2016年3月18~20日, 岩手大学(岩手県・盛岡市)

高田直樹. モデル植物の情報から樹木の木部細胞の分化メカニズムを探る. 日本木材学会・組織と材質研究会 2015秋季シンポジウム, 2015年10月23日, 九州大学(福岡県・福岡市)

高田直樹, 谷口亨. 表層微小管の空間構造を制御する新規因子の探索. 第65回日本木材学会, 2015年3月16~18日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Takata N, Taniguchi T. Transcriptional factors regulating microtubule orientation in *Populus tremula* x *Populus tremuloides*. 第56回日本植物生理学会, 2015年3月16~18日, 東京農業大学(東京都・世田谷区)

Takata N, Taniguchi T. Ectopic expression of GFP-tubulin affects morphology and growth of *Populus tremula* x *Populus tremuloides*. 第55回日本植物生理学会, 2014年3月18~20日, 富山大学(富山県・富山市)

高田直樹, 谷口亨. GFP-tubulinを導入したポプラの形態変化と微小管の可視化. 第64回日本木材学会, 2014年3月13~15日, 愛媛大学(愛媛県・松山市)

[図書](計5件)

高田直樹. 日本冷凍空調学会冷凍空調便覧改訂委員会, 第6版 冷凍空調便覧 第IV巻 食品・生物編, 植物の光応答と温度の影響. 2013年, 360-365.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高田 直樹 ( TAKATA NAOKI )

国立研究開発法人森林総合研究所・森林バ  
イオ研究センター・主任研究員

研究者番号：90605544