

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26660139

研究課題名(和文)細胞膜のゆがみはあて材形成の引き金となりうるか

研究課題名(英文) Does tension in the cellular membrane trigger compression wood formation?

研究代表者

佐藤 彩織 (Sato, Saori)

名古屋大学・生命農学研究科・特任助教

研究者番号：60641058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：木材の効率的な利用を考えた場合、問題となるのがあて材の存在である。あて材は樹幹が傾斜した状態で肥大成長したときに形成される組織で、そこでは特異な成長応力が発生しており、玉切りや製材時に割れや狂いの原因となって利用歩留まりを著しく低下させている。そこで本研究では、針葉樹あて材の形成機構を遺伝子発現の観点から明らかにすることを目的とした。特に、環境からの機械的な刺激を感知して、細胞内のカルシウムイオン濃度を変化させると考えられているメカノセンシティブチャンネルに着目して遺伝子発現量を調べた。その結果、樹幹に傾斜や曲げの刺激を与えることで、樹幹内の発現量分布が変化することが分かった。

研究成果の概要(英文)：When considering efficient use of wood, existence of reaction wood becomes a problem. Reaction wood is a special tissue that is formed during secondary growth in an inclined stem. In the reaction wood region, high growth stress is generated and it causes cracks and warp at the time of cross cutting and lumbering. This study aimed to understand a mechanism of the reaction wood formation of conifers from a viewpoint of gene expression. The gene expression of mechanosensitive channels, which respond to external mechanical stimuli and change the concentration of calcium ion within the cells, were focused on. The results showed that the gene expression patterns within the stems had changed when the stimuli of inclination and bending were applied to the stems.

研究分野：木質分子生物学

キーワード：あて材 メカノセンシティブチャンネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 樹幹が傾斜生育した場合、その樹幹には「あて材」と呼ばれる特別な組織が形成される。これまでも、その形成機構を理解する目的で、あて材部で特異的に働く遺伝子のスクリーニングがなされてきた。しかし、見つかるのは細胞壁形成や代謝に直接関わる遺伝子のほか、それらの発現を制御する転写因子が中心で、どんな刺激がどう細胞内に伝わって、シグナル伝達が起こり、あて材が形成され始めるのか、というあて材形成の引き金となる部分は不明なままである。

(2) 当研究室ではこれまでに、あて材部と正常材部における遺伝子発現を次世代シーケンサーによって比較し、細胞膜の伸びを感知するメカノセンシティブチャネルの遺伝子発現量があて材部で増加していることを明らかにした。このチャネルは細胞膜上に存在し、膜の伸びを感知すると、細胞内へのカルシウムイオンの取り込みを促すと考えられている。このカルシウムイオンがシグナルとなって、下流の遺伝子発現が制御される。これらのことから、あて材形成の引き金となるのは傾斜や曲げがもたらす細胞膜のゆがみではないかと考え、本研究を着想した。

(3) これまであて材形成を引き起こす原因は、「傾斜」や「曲げ」のように人が樹幹を観察したときの様子から想像されてきた。しかし、実際に遺伝子を発現しているのは木部細胞であるため、刺激の感知は、細胞の視点から捉えるべきである。そこで本研究では、「樹幹が傾いているかどうか」ではなく、「細胞がゆがんでいるかどうか」によって細胞内の遺伝子発現パターンが変わることを示せないかと考えた。

仮説の検証に必要な細胞を準備するために、本研究では、水の出入りによって細胞体積が昼夜で変動することを利用した。分化中木部細胞は、夜には水を吸ってぱんぱんに膨らみ、昼にはしぼむ、という細胞膜の伸び縮みを繰り返している。

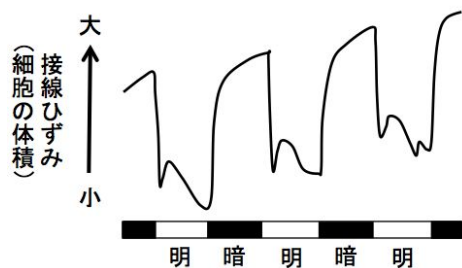


図 1. 昼夜の細胞体積変動

図 1 より、細胞膜が最も伸びるのは、夜明け前である。この時刻では、樹幹が鉛直であっても、メカノセンシティブチャネルが膜の伸びを感知すると考えられる。その結果、細

胞内にカルシウムイオンが流入し、あて材形成時の細胞内と似た状況が再現され、下流にあるあて材特異遺伝子の発現が制御されると予想した。水が細胞内に過度に流入して細胞膜が伸びるとメカノセンシティブチャネルが開くことは、バクテリアではすでに報告されている。

2. 研究の目的

(1) 昼夜の水の出入りによって細胞膜が伸び縮みした細胞内には、伸びの刺激によってカルシウムイオンが流入し、たとえ樹幹が鉛直であっても、傾斜時に見られるようなあて材特異遺伝子の発現が促されているのではないかと、という仮説を立て、それを検証することを目的とした。

(2) 着目したメカノセンシティブチャネルの遺伝子発現量が昼夜(24時間周期)で変動が見られなかった場合には、どのようなタイムスパンでなら、また、どのような刺激によってなら、メカノセンシティブチャネルの遺伝子発現量が変化するのかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 昼夜の膨圧変動と遺伝子発現量との関係
メカノセンシティブチャネル

ヒノキの苗木を鉛直に生育し、形成層活動が活発な5月末に試料採取を行った。分化中木部の採取は、細胞体積が大きくなる夜間(午前2, 3, 4, 5時)と小さくなる昼間(午後2, 3, 4, 5時)に行った。分化中木部試料から total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。次世代シーケンサーから得られたコンティグ配列をもとにメカノセンシティブチャネル遺伝子の特異プライマーを設計、外注した。合成したプライマーを用いて定量 PCR を行い、各サンプル間の遺伝子発現量を比較した。

他の圧縮あて材特異遺伝子

スギとヒノキの苗木を生育し、形成層活動が活発な5月下旬から6月上旬に試料採取を行った。細胞体積の変動と遺伝子発現量の変動との対応がとれるよう、採取は3時間ごとに計16回行い、24時間×2周期分の試料を準備した。分化中木部試料から total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。公共データベース上の塩基配列をもとにフェニルアラニンアンモニアリアーゼ、シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ、ラッカーゼ等、リグニン合成や重合に関わる遺伝子の特異プライマーを設計、外注した。合成したプライマーを用いて定量 PCR を行い、各サンプル間の遺伝子発現量を比較した。

(2) 傾斜刺激と曲げ刺激によるメカノセンシティブチャネル遺伝子の発現量変化

ヒノキの苗木を生育し、5月下旬から樹幹に傾斜刺激と曲げ刺激を与え始めた。刺激の開始から1週間ごとに1個体ずつ、4週間にわ

たり分化中木部を採取した。傾斜刺激を与えた個体では、樹幹の傾斜上側と下側に分けて分化中木部を採取した。曲げ刺激を与えた個体では、樹幹の曲げ内側と外側に分けて分化中木部を採取した。コントロールとして鉛直に生育させた個体では、樹幹の北側と南側に分けて分化中木部を採取した。分化中木部試料から total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。定量 PCR を行い、各サンプル間のメカノセンシティブチャネル遺伝子の発現量を比較した。

(3) 全長 cDNA 配列の解読と発現ストランドの確認

次世代シーケンサーから得られたメカノセンシティブチャネルのコンティグ配列は部分配列であったため、5'-RACE 法、3'-RACE 法によってメカノセンシティブチャネルの全長 cDNA 配列を決定し、配列解析を行った。また、得られたコンティグ配列がセンス鎖・アンチセンス鎖のどちらにあたるのかを確認した。

4. 研究成果

(1) 昼夜の膨圧変動と遺伝子発現量との関係 メカノセンシティブチャネル

ヒノキの苗木を鉛直に生育し、細胞体積が大きくなる夜間と小さくなる昼間の分化中木部における遺伝子発現量を比較した。定量 PCR の結果、メカノセンシティブチャネルの発現量は昼夜でほとんど差が見られず、昼夜の膨圧変動によって細胞膜が伸び縮みしても、24 時間というタイムスパンでは発現量が変わらないことが分かった。

他の圧縮あて材特異遺伝子

スギとヒノキの苗木を生育し、分化中木部において 3 時間ごとにあて材特異遺伝子の発現量を調べると、シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼやシンナモイル CoA レダクターゼ等の発現量が膨圧の低い昼間に多く発現していることが分かった。

(2) 傾斜刺激と曲げ刺激によるメカノセンシティブチャネル遺伝子の発現量変化

あて材が形成された場所

傾斜刺激を与えた苗木では、傾斜開始から 2, 3, 4 週目の樹幹において、傾斜の下側であて材の形成が確認できた。一方、曲げ刺激を与えた苗木では、曲げ開始から 3, 4 週目の樹幹において、傾斜の内側であて材の形成が確認できた。

メカノセンシティブチャネルの遺伝子発現量

定量 PCR によって、各サンプル間のメカノセンシティブチャネル遺伝子の発現量を比較した。コントロールとして鉛直状態で生育した苗木では、樹幹の方向(北, 南側)や試料採取時期(1, 2, 3, 4 週目)によらず、ほぼ一定の

発現量を示した。傾斜した状態で生育した苗木では、傾斜 2 週目以降、樹幹の傾斜下側で発現量の増加が見られた。また、その量は 3 週、4 週と週を追うごとに増加していった。曲げた状態で生育した苗木では、曲げ 3 週目以降、樹幹の曲げ外側で発現量の減少が見られた。

(3) 全長 cDNA 配列の解読と発現ストランドの確認

RACE の結果、メカノセンシティブチャネルの全長 cDNA 配列を得ることができ、公共データベースに塩基配列を登録した(CoMSL1 と命名)。コード領域の予測、アミノ酸配列への翻訳、相同性検索、膜貫通領域の予測、分子系統樹の作成を行った結果、今回配列を取得したヒノキメカノセンシティブチャネルは、細胞膜上に存在し、シロイヌナズナで確認されている MSL10 に最も近いことが明らかとなった。また、次世代シーケンサーから得られたコンティグ配列の発現ストランドを確認すると、CoMSL1 は、センス鎖・アンチセンス鎖の両方で転写が確認されたが、あて材形成時に転写量が増加しているのはセンス鎖のみであった。

(4) 得られた成果の位置づけとインパクト、今後の展望

メカノセンシティブチャネルの研究は、これまで主に細菌や動物で進められており、針葉樹における全長配列解読は、本研究が初めてである。モデル植物を含めても、細胞膜に機械的な刺激が加わったときのメカノセンシティブチャネルの発現量について週を追って調べた例はない。あて材形成メカニズムの理解という観点からも、これまで傾斜刺激と曲げ刺激とが区別されることはほとんどなかった。今回の実験結果より、最終的には同じあて材組織を形成していても、傾斜刺激を与えた場合と曲げ刺激を与えた場合とでは、メカノセンシティブチャネルの発現パターンに違いが見られることが明らかとなった。傾斜や曲げの刺激を受けた樹幹では、樹幹の上側・下側や内側・外側におけるメカノセンシティブチャネルの発現が非対称となり、それに伴って細胞内へのカルシウムイオンの取り込み量も変わるためにあて材形成が引き起こされると予想された。今後、この予想を検証していくことで、あて材形成の分子メカニズムの理解につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Saori Sato, Masato Yoshida, Hideto Hiraide, Kunio Ihara, Hiroyuki Yamamoto, Transcriptome analysis of reaction wood in gymnosperms by next-generation sequencing. American Journal of Plant Sciences, 査読有,

〔学会発表〕(計3件)

芦崎 陽介, 吉田 正人, 佐藤 彩織,
松尾 美幸, 山本 浩之, 針葉樹分化中
木部におけるリグニン合成遺伝子の日周
発現, 第 65 回日本木材学会大会, 2015
年 3 月 18 日, タワーホール船堀(東京
都・江戸川区)

佐藤 彩織, 吉田 正人, 山本 浩之,
圧縮あて材におけるアンチセンス RNA の
発現解析, 第 65 回日本木材学会大会,
2015年3月18日, タワーホール船堀(東京
都・江戸川区)

芦崎 陽介, 吉田 正人, 佐藤 彩織,
松尾 美幸, 山本 浩之, 針葉樹分化中
木部における遺伝子発現の日周期性, 日
本木材学会中部支部大会, 2014 年 10 月
16 日, 伊那市生涯学習センター いなっ
せ(長野県・伊那市)

〔その他〕

ホームページ

[http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~butsuri/
kenkyu.html](http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~butsuri/kenkyu.html)

塩基配列を公共データベースへ登録
CoMSL1: Accession number AB983480

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 彩織 (SATO, Saori)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・特任
助教
研究者番号: 6 0 6 4 1 0 5 8

(2)研究分担者

(3)連携研究者

吉田 正人 (YOSHIDA, Masato)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教
授
研究者番号: 3 0 2 4 2 8 4 5