

# 研究報告書

## 「細胞内自己組織化制御と生体ナノマシンの開発による新規木質バイオマス素材の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 小田 祥久

### 1. 研究のねらい

石油枯渇の危機や温室効果ガス排出による地球温暖化問題の解決策として、バイオマスの有効利用が求められている。限りある石油資源とは異なり、植物バイオマスは持続的な供給が可能であり、カーボンニュートラルな資源である。主要な植物バイオマス資源のひとつである木質バイオマスはリグノセルロースの富んだ木質細胞壁が蓄積した木材である。木質細胞壁は、主に木部繊維および木部道管を構成する細胞が細胞表面にセルロースを主とした二次細胞壁成分を沈着することによって形成されているが、二次細胞壁は微細な壁孔を無数に形成した特徴的なパターンで沈着する。このような壁孔を伴った二次細胞壁の沈着は木部道管において顕著であり、生きた植物では道管液の輸送に、木材では液体浸透性や通気性、強度、その表面積に寄与していると考えられている。壁孔の形態や密度を改変することができれば、化学組成を変えことなく細胞壁の分解性やセルロースの性質を改善し、新規の木質バイオマス素材を創出する技術につながると期待される。近年、木部繊維分化および木部道管分化のマスター因子が単離され、下流で働く様々な遺伝子の解析が可能となった。その中で私は、セルロース合成の足場となる表層微小管の脱重合を促進する因子として MIDD1 を同定し、MIDD1 が壁孔形成に必須であることを突き止めた (Oda et al. 2010 Curr Biol)。本研究課題では、①この MIDD1 を介して二次細胞壁の沈着パターンを制御する基本的な仕組みを明らかにすること、②その仕組みを人為的に操作することにより、二次細胞壁の沈着パターンを自在に改変する基本技術の確立を目指すこと、③改変した二次細胞壁の素材としての評価を目指した。特に、細胞が自発的に形態を作り出す自己組織化、およびエネルギーを使って細胞内の構造を制御する生体ナノマシンに着目し、細胞自体の持つ仕組みを最大限利用しつつ、人為的な操作を加えることにより任意の沈着パターンの実現を狙った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

シロイヌナズナ培養細胞の木部細胞分化誘導系を用いたマイクロアレイおよびライブイメージングにより、二次細胞壁の壁孔に局在する因子をスクリーニングし、ROPGEF4, ROPGAP3, 活性型 ROP11 および Kinesin-13A を同定した。これらの遺伝子の詳細な機能解析により、ROPGEF4とROPGAP3の働きによって局所的にROP11が活性化し、細胞膜ドメインを形成することを突き止めた。さらに、活性化したROP11がMIDD1-Kinesin-13A複合体を細胞膜ドメインにリクルートすることにより、局所的に表層微小管の脱重合を促進し、壁孔の形成をもたらすことを明らかにした。一方、表層微小管はその側面において、活性型ROP11の局在を制限していることが判明した。このように活性型ROP11と表層微小管が排他的に相互作用するこ

とにより、壁孔の形態が制御されていることが示唆された。そこで、これらの因子の一過的な過剰発現および発現抑制を試み、壁孔のサイズおよび密度、形態を一過的に改変することに成功した。壁孔の形態をより柔軟に改変するために、さらにスクリーニングを行い新規の細胞骨格付随タンパク質を同定した。この発現レベルを制御することにより、螺旋型に近い二次細胞壁パターンを実現した。このように、二次細胞壁の沈着パターンを制御する分子機構を明らかにするとともに、二次細胞壁の沈着パターンを大幅に改変することに成功し、本研究課題の目標の大部分を達成した。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「二次細胞壁微細構造の制御機構の解明」

木部道管において壁孔が形成されるメカニズムを明らかにするために、MIDD1 と共局在するタンパク質を木部道管で強く発現する遺伝子群の中から探索した。私が開発したシロイヌナズナ培養細胞の木部道管分化誘導系 (Oda et al. 2010 Curr Biol) を用い、マイクロアレイ法により木部道管分化において顕著に発現が上昇する遺伝子を同定した。その中からアノテーションを元に候補遺伝子を選び、GFP 融合タンパク質として培養細胞に発現させた。その結果、ROP GTPase の一つである ROP11, ROP GTPase の活性化因子である ROPGEF4, ROP GTPase の不活性化因子である ROPGAP3 が壁孔に局在した。ROP GTPase は GTP に結合した活性型、あるいは GDP と結合した不活性型として存在し、ROPGEF は GDP を GTP と交換することにより ROP を活性型へ、ROPGAP は GTP の GDP への分解を促進し、不活性型へと変換する。活性型 ROP11 および ROPGEF、ROPGAP3 は壁孔の細胞膜近傍に局在しており BiFC および FRET 法により MIDD1 と活性型 ROP11 が直接相互作用することが分った。さらに、壁孔において ROP11 が活性型として存在し、MIDD1 を細胞膜にリクルートする特殊な細胞膜ドメインを形成していることが明らかとなった。恒常的に活性型となる変異を持った ROP11 を過剰発現させると培養細胞および根の道管において壁孔が喪失したことから、局所的な ROP11 の活性化が壁孔の形成に必要であることが示唆された (図1)。

局所的な ROP11 の活性化における ROPGEF4 および ROPGAP3 の役割を明らかにするために、非木部細胞にこれらの遺伝子を同時に発現

させ、ROP11 の局所的な活性化が起こるかどうか検証した。その結果、ROPGEF4 および ROPGAP3 を ROP11 と同時に発現させるだけで ROPGEF4 がスポット状に局在し、局所的に ROP11 を活性化できることが明らかとなった。MIDD1 をこれらの遺伝子に加えて発現させると、ROPGEF4 のスポットの周辺で局所的に表層微小管が失われたことから、この局所的に活性化した ROP11 が MIDD1 を介して局所的に表層微小管の脱重合を引き起こすのに十分であることが分った。ROP11 を恒常的な活性型あるいは不活性型に変異させたものを導入した場合には、このような現象はまったく生じなかったことから、ROP11 が ROPGEF4 および ROPGAP3 によって活性化および不活性化され、GTP および GDP 結合状態をサイクルすることが、この自発的に ROP11 の活性化を引き起こす現象に必要なことが分った (図 2)。

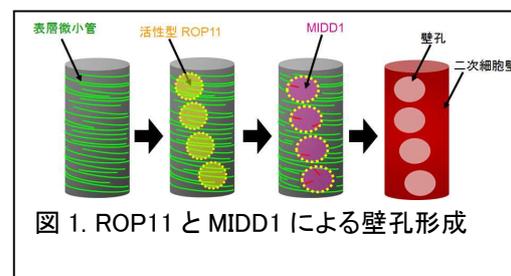


図 1. ROP11 と MIDD1 による壁孔形成

一方、木部道管へ分化している培養細胞において、微小管脱重合阻害剤 taxol を用いて表層微小管を安定化したところ、局所的に活性化した ROP11 の細胞膜ドメインが細長く変形し、通常よりも細長い壁孔が形成された。タバコの葉を用いて局所的な ROP11 の活性化を再現し、表層微小管を可視化したところ、表層微小管が活性型 ROP11 の細胞膜ドメインに沿って局在し、ROP11 の局在を制限していることが分った。以上の結果から、ROP11 と表層微小管との間に排他的な相互作用が存在し、その相互作用によって壁孔の形態が制御されていることが示唆された (Oda and Fukuda, 2012 Science, 図 2)。

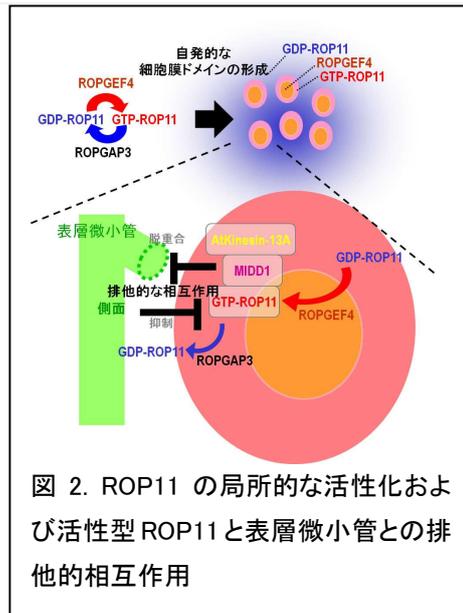


図 2. ROP11 の局所的な活性化および活性型 ROP11 と表層微小管との排他的相互作用

さらに MIDD1 と同様の局在を示す因子として

Kinesin-13A を同定した。詳細なライブイメージングを行った結果、Kinesin-13A は壁孔において脱重合している表層微小管の先端に顕著に局在することが分った。このようなダイナミクスは MIDD1 と類似しており、MIDD1 と共に機能する可能性が示唆された。そこで BiFC 法により木部道管における両者の相互作用を検証した結果、壁孔内の微小管において両者が相互作用していることが示唆された。Kinesin タンパク質は ATP をエネルギー源として微小管上を移動し、小胞等の物体を輸送する生体ナノマシンとして知られているが、中でも Kinesin-13 は微小管上を移動せず、代わりに微小管の脱重合を促進する特殊な機能を有している。シロイヌナズナの Kinesin-13A はこの Kinesin-13 ファミリーに属しているが、タンパク質としての機能や植物細胞内における役割に関してはほとんど明らかにされていなかった。GST-Kinesin-13A を精製し、*in vitro* において微小管の脱重合アッセイを行った結果、Kinesin-13A は ATP 依存的に微小管を脱重合することが分った。次に、*in vivo* において Kinesin-13A が微小管を脱重合するかどうか調べるために、非木部細胞に GFP-Kinesin-13A を過剰発現させた。しかしながら、Kinesin-13A は微小管に局在せず、微小管の脱重合も起こらなかった。そこで、MIDD1 を Kinesin-13A と共発現させると、Kinesin-13A が表層微小管に局在し、表層微小管を脱重合した。この結果は MIDD1 が Kinesin-13A を微小管にリクルートすることにより、微小管の脱重合を促進していることを示唆している (Oda and Fukuda, 2013 Plant Cell, 図 2)。

以上の解析により、二次細胞壁の壁孔の形成は ROP11-MIDD1-Kinesin-13A 経路によって制御されていること、この経路と表層微小管との排他的な相互作用が壁孔の形態を制御していることが明らかとなった。本研究課題発足時において、二次細胞壁の沈着パターンを制御する分子的なメカニズムはほとんど知られていなかった状況を考えると、本研究課題によってパターン形成から微小管の脱重合、さらには壁孔の形態制御までの一連の過程を分子的に明らかにしたことは大きな進歩であり、この研究テーマの大部分を達成したと言える。

## 研究テーマ B「二次細胞壁パターン的人為的な改変」

テーマAによって明らかになった遺伝子群を利用し、二次細胞壁の沈着パターンを改変する

ことを試みた。各遺伝子を estrogen による発現誘導により一過的に過剰発現あるいは発現抑制し、根の道管の二次細胞壁への影響を検証した。その結果、Kinesin-13A の過剰発現によって壁孔を大きく、発現抑制によって壁孔を小さくすることに成功した (Oda and Fukuda, 2013)。また、ROPGEF4 の発現抑制あるいは恒常的活性型 ROP11 の過剰発現によって壁孔の密度を低下させることに成功した (Oda and Fukuda, 2012)。上述したとおり、Kiensin-13A は ATP を消費して微小管を脱重合する生体ナノマシンであり、また ROPGEF4 および ROP11 の操作は ROP GTPase による自発的な細胞膜ドメインの形成、すなわち自己組織化作用の操作であることから、本研究課題の戦略に沿って目標を達成したといえる。一方、壁孔の形態、特に縦横比を劇的に変化させることは、これまでに同定した因子では実現することができなかった。新たに構築した計算機シミュレーションの結果、壁孔の形態には微小管の安定性が影響することが示唆された。そこで、木部道管において発現する機能未知の遺伝子の中から、壁孔の形態に影響するものを探索し、新規の微小管付随タンパク質をコードする遺伝子を同定した。このタンパク質は MIDD1 とは異なり、壁孔の外に局在する微小管に主に局在していた。このタンパク質の過剰発現によって顕著に表層微小管が増加し、微小管重合阻害剤の効果に高い耐性を示すようになったことから、このタンパク質は微小管を安定化していると考えられた。さらにこのタンパク質の過剰発現は、非木部細胞において人工的に再構築した活性型 ROP GTPase の細胞膜ドメインの面積を著しく縮小させたことから、このタンパク質は表層微小管による ROP GTPase の制限を促進することにより壁孔の形態に影響している可能性が示唆された。このように、本研究では一過的ではあるものの壁孔の密度、大きさに加えて、形態に関しても改変することに成功しており、木質バイオマスの微細構造を改変する技術を確立するという本研究課題の目的の大部分を達成した。

#### 研究テーマC「改変した二次細胞壁の評価」

二次細胞壁の沈着パターンを改変した木質バイオマスの性質を評価するために、培養系および植物体において恒常的に壁孔の形態や密度を改変した形質転換ラインの作成を行っている。すでに *XCP1*, *MIDD1*, *ATHB8*, *CESA7*, 等、木部道管に特異的に発現する遺伝子のプロモーター下に上述の遺伝子群を連結し、シロイヌナズナ植物および培養細胞に導入している。この中から二次細胞壁の沈着パターンが恒常的に変化し、かつ植物体および細胞の育成に影響の少ないものを選抜し、ラージスケールの培養・細胞を行うことにより、木質バイオマスとしての評価を行う予定である。これまでに、*XCP1* および *CESA7* のプロモーターを用いて二次細胞壁パターンの制御因子を発現させた植物において、恒常的に二次細胞壁が変化していることを確認した。今後、これらの植物体を十分量確保することにより、沈着パターンを改変した二次細胞壁の分解性とセルロースの性質の評価を行う見込みである。

### 3. 今後の展開

今後は今回確立した二次細胞壁微細構造の改変技術を樹木に応用すること、改変した樹木に由来する木質バイオマスの性質を評価することが可能になると考えられる。二次細胞壁の微細構造の改変技術を樹木に適用するために、現在行っているプロモーターの選定を慎重に行い、十分に効果的なプロモーターを選ぶ必要がある。最適なプロモーター下に置いた遺

伝子をポプラ、ユーカリなどのモデル樹木に導入し、二次細胞壁の沈着パターンが変化することを確認した後、その改変樹木を用いて木質バイオマスの評価を行うことを考えている。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

##### **研究目的の達成状況、**

本研究課題の目標である①二次細胞壁パターンの形成機構の解明、②二次細胞壁パターン的人為的な改変、③改変した二次細胞壁の素材としての評価の、うち、①、②に関しては当初の目標を達成するとともに、期待以上の成果を得ており、順次その成果を論文にまとめ投稿する予定である。③細胞壁を評価するための形質転換培養細胞および形質転換シロイヌナズナを作出することに成功しており、今後これらの材料を用いて細胞壁の評価を進める。

##### **研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)**

研究費の執行に関しては研究目標の達成に向け、年度ごとに適切な判断を行い、研究の着実な前進に貢献した。特に2年度における高速高感度の顕微鏡システムに関しては最新のパーツを吟味し、本研究課題に最も適合したシステムを導入することに成功した。実験補助員に関してはスキルの高い人材を獲得し、期待以上の成果につながった。最終年度においては研究室を新たに立ち上げたため、主に物品の購入を行い、これまでと同等の研究環境を整え、計画に沿った研究課題の遂行を実現した。

##### **研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果**

これまで、木質バイオマスの改良はリグニン等の細胞壁組成の改変が主なアプローチであった。本研究課題では植物基礎科学をベースとしたアプローチにより、木質バイオマスの微細構造を改変する技術を新たに開発し、これまでにない視点から木質バイオマスの改良を行う可能性を実現した。現在、植物科学を利用した有用植物の開発が精力的におこなわれており、この技術を高ストレス耐性や高生産をもたらす他の有用技術と組み合わせることにより、植物を用いた研究開発の有用性を社会にアピールし、社会実装への実現へ近づけることが可能になると期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

木質細胞壁の壁孔形成などを自在に行いうる技術を開発し、新規木質バイオマス素材を作成することを目的として研究が進められた。その結果、セルロース合成に係わる新たな因子を解明し、それを活用して培養細胞レベルでは、かなり自在に密度やサイズ、形態を変えた壁孔を作ることに成功している。その研究は学術的にきわめて高く評価される。現在、樹木での実験を実施中であり、モデル系だけでなく、実用植物でも、それが可能となれば、将来、目的に応じた樹木の育成に有用な技術につながる可能性を持つ研究として評価される。

現時点ではまだ基礎研究のレベルではあるが、これを一つの契機として、二次細胞壁のパターンと木質成分との関係についてさらに研究を発展させ、木質バイオマスの改変の技術開発につなげて欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表 (著者, 発表論文タイトル, 掲載誌名, 発行年, 巻号, 始頁-終頁, その他)

1. \*Oda Y, \*Fukuda H. Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. **Science** (2012) 337,1333-1336, \*Corresponding author.
- 2 \*Oda Y, Fukuda H. Rho of plant GTPase signaling regulates the behavior of Arabidopsis kinesin-13A to establish secondary cell wall patterns. **Plant Cell** (2013) 25: 4439-4450. \*Corresponding author.
3. Ohashi-Ito K, Saegusa M, Iwamoto K, Oda Y, Katayama H, Kojima M, Sakakibara H, \*Fukuda H. A bHLH Complex Activates Vascular Cell Division via Cytokinin Action in Root Apical Meristem. **Curr Biol** (2014) 24, 2053-2058.
4. \*Oda Y, Iida Y., Nagashima Y., Sugiyama Y, Fukuda H. Novel Coiled-Coil Proteins Regulate Exocyst Association with Cortical Microtubules in Xylem Cells via the Conserved Oligomeric Golgi-Complex 2 Protein. **Plant Cell Physiol** (2015) 56, 277-286. \*Corresponding author

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 学会賞

2013年3月 植物生理学会奨励賞受賞

#### 国際学会招待講演

\*Oda Y (2014) Live cell imaging of xylem differentiation: dissecting the molecular basis of secondary cell wall patterning. **International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium 2014 "Plant Live-Cell Imaging and Microdevices"** Nagoya University, Nagoya Japan, Sep 9<sup>th</sup>

\*Oda Y (2014) Self-organization of cell wall patterns through the Rho GTPase-cortical microtubule interplay. **ESF Conference (Cell polarity and membrane trafficking)**. Polonia Castle (Dom Polonii), Pultusk, Poland, May 12<sup>th</sup>

\*Oda Y, Fukuda H (2012) Secondary cell wall patterning by the microtubule-associated protein MIDD1. **International Congress on Molecular Plant Biology (IMPB)**. Jeju, Korea, , Oct 24<sup>th</sup>

#### プレスリリース

2012年9月6日 東京大学 大学院理学系研究科  
植物細胞の“形を決める”遺伝子を発見～350年来の謎を解明

### 研究者としての飛躍

2014 年4月1日に東京大学 大学院理学系研究科 助教から国立遺伝学研究所 新分野創造センター 准教授に昇級した。