

第67回 日本木材学会大会(福岡大会)

組織と材質研究会シンポジウム

「培養細胞をモデルとした細胞壁形成」

講演要旨集

Web版

2017年3月19日

九州大学

組織と材質研究会シンポジウム 2017
「培養細胞をモデルとした細胞壁形成」

趣旨説明：

木材を構成する細胞・細胞壁は形成層において形成される。木材の形成機構を解明することは、木材をより有効に利用する上で重要な課題である。しかしながら、形成層は樹皮の内側に存在するため、その活動を細胞が生きたままの状態を観察することは、現在のところほぼ不可能である。また、木材を生産する個体の樹木は、時には人間よりも巨大な構造体となり、様々な処理を施してその影響を個体として観察・分析することは困難である。このように、木材の形成機構を解明する上で、扱いやすいモデル実験系を用いることは有効な方法の1つである。中でも、培養細胞を用いる実験系は、実験のコントロール、生きたままの細胞の可視化、化学成分の抽出等において、有効であると考ええる。

本シンポジウムでは、現在培養細胞を用いて研究を進めている方々に、これまでの研究成果と現状を報告していただき、参加者の今後の研究への活用を検討する機会としたい。

日時：2017年3月19日（日）13時30分～17時

場所：九州大学農学部5号館117室（第15会場）

閉会挨拶：松村順司氏（九州大学大学院農学研究院教授）

趣旨説明：安部久（森林総合研究所）

演者：近藤哲男氏（九州大学大学院農学研究院教授）

「プロトプラストの酸性下でのカルシウムイオンストレス応答挙動からの
細胞壁形成研究へのアプローチ」

田川聡美氏（九州大学大学院農学研究院博士課程）

「シラカバ培養細胞由来プロトプラストの細胞壁形成ダイナミクス」

今井友也氏（京都大学生存圏研究所准教授）

「セルロース合成酵素の研究からみえる細胞壁形成機構の解明の難しさ」

山岸祐介氏（北海道大学大学院農学研究科助教）

「樹木の培養細胞を用いた二次木部様管状要素の分化誘導」

連絡先：松村順司（九州大学大学院農学研究院）

matumura@agr.kyushu-u.ac.jp

プロトプラストの酸性下でのカルシウムイオンストレス応答挙動からの 細胞壁形成研究へのアプローチ

九州大学大学院農学研究院

近藤 哲男

はじめに

生物が有する環境適応性の一つに、これまでに機能していた機構に代わる物質生産系の誘導がある。物質生産系を新たに確立したのか、潜在していた機構を引き出したのかは定かではないが、いずれにせよ、新たな環境の中で存続するために新しく機構を構築することができるのは生物の優れた能力である。

生物は、長い歴史の中で環境の変化に対する適応能力を獲得してきた。その一つに物質生産系の誘導がある。すなわち、生物がこれまでとは異なる環境下に置かれたとき、新しい物質を生産する系を確立して順応する。この順応は、ストレス回避あるいは軽減のための反応とも推察されるが、自己防衛のために誘導される機構の一つとみなすこともできる。

これまで演者らは、酢酸菌のセルロースナノファイバー産生および細胞壁再生過程と比較しながら、プロトプラスト（植物細胞）のストレス環境下における刺激応答挙動としてのカロースの中空繊維生産について検討してきた¹⁻¹²⁾。この研究の中で、細胞壁を形成せずにカロースの中空繊維を産生することから、細胞壁ノックダウン系としてみなすことができるという発想に到達した。そこで、通常の培養を行ったプロトプラストと本培養システムでのプロトプラストの壁形成と表層微小管動態との間の相関を調べることにより、細胞壁形成に関して新たな知見を与えられるものと考えている。このストレス応答研究の発端になったのは、細胞の拡大成長期一次壁形成時のセルロース繊維の結晶構造が主として $I\alpha$ であるが、二次壁では $I\beta$ であったことである⁶⁻⁸⁾。この違いの生じたことが、植物細胞（プロトプラスト）に環境ストレスを与えた際に、壁形成がどのように影響をうけるかの研究を駆り立てた。

樹木の細胞壁セルロース結晶繊維形成

細胞壁の主成分であるセルロースの分子鎖は、酢酸菌の場合と同様に合成酵素 Cesa から生合成される¹⁻³⁾。樹木では、TC サブユニットが円形に集合した集合体⁴⁾のロゼット型を形成して細胞膜に存在する⁵⁾。このロゼット型 TC から生合成されたセルロース分子鎖は直ちに配向し、結晶構造を形成して、最終的に約 4nm 幅のセルロースミクロフィブリルとなり、それが束になって繊維を形成し、さらに堆積して細胞壁を構築する。上記のように、セルロース繊維の結晶構造は、一次壁では主として $I\alpha$ であるが、二次壁では $I\beta$ である。その構造相違の要因として、一次壁の形成時期は細胞の拡大成長期であるため、細胞膜に延伸応力が負荷され、膜貫通タンパクであるセルロース合成酵素群の集合形態や生合成されたセルロース分子鎖の結晶化に影響を与えていると考えら

れる。すなわち、応力(あるいはストレス)がかかった状態で形成されたセルロースの結晶構造は、準安定といわれるセルロース $I\alpha$ になるのではないかと推定される。一方、細胞壁の肥厚期である二次壁形成期では、セルロースナノファイバーの形成・結晶化と堆積は、比較的応力を受けずに進行すると考えられたため、安定な構造であるセルロース $I\beta$ が形成される。このように、樹木の細胞壁形成において、ストレス環境の有無によりセルロース分子鎖の配向結晶化形態や堆積構造が異なってくる。

ストレス環境下で誘導されたプロトプラストの中空繊維分泌⁹⁻¹⁰⁾

シラカバ(*Betula Platyphylla*)植物体の葉から細胞壁を除去した原形質体であるプロトプラストを単離し、試料とした。プロトプラストは、細胞壁がないため培養条件の影響を受け易く、種々のストレスに対する細胞の応答を検討する試料として適している。そこでまず、プロトプラストの再生過程における物質生産としての細胞壁形成に着目した。植物体の成長や植物体から単離した組織の培養に広く用いられている Murashige&Skoog (MS) 培地を基本とし、細胞分裂を促進するホルモン条件を変えずに高濃度の塩化カルシウム (200mM) を添加し、さらに pH3.5 の酸性条件とすることにより、プロトプラストに対してストレスを付与した⁹⁻¹⁰⁾。イオンストレスの中で、カルシウムイオンのみが顕著に繊維の生合成を誘導した。さらに、将来の地球環境の変化を憂慮して、酸性大気下における生物の生育状況を検証するため、酸性条件に設定したところ、pH3.5 において繊維の生合成は良好であった⁹⁻¹⁰⁾。しかし、繊維が産生される一方、細胞壁形成が認められないことも見出された¹¹⁾。その後、シラカバ葉肉細胞からカルスの調製ならびにそのプロトプラストの調製に成功し、現在では、シラカバ葉肉細胞由来のカルス培養細胞のプロトプラストを試料としている¹²⁾。

免疫蛍光抗体染色法および急速凍結免疫電子顕微鏡観察により、この繊維が β -1,3-グルカン鎖のカロースからなることが同定された。ストレスを付与した培養系で分泌されたカロースは、約 30 μ m 径を有する繊維形態を成し、細胞外に向かって一箇所から約 0.3 μ m/分の速度で産生されていた(図 1)。

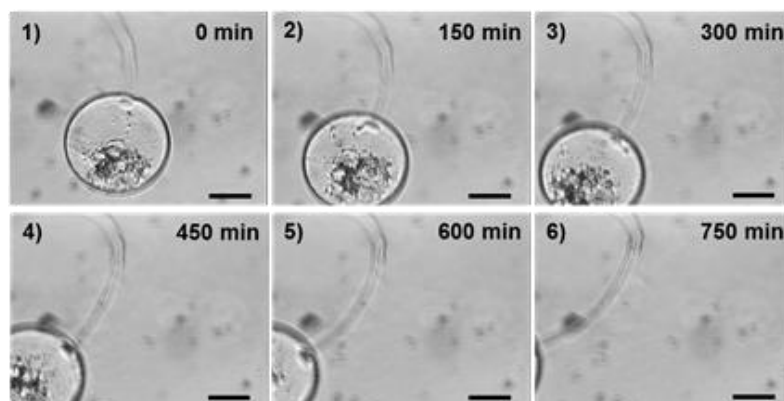


図 1 プロトプラストからの中空繊維分泌過程
(150 分間隔のタイムラプス像、bar=100 μ m)

また、繊維を産生しているプロトプラストは、葉から単離してから約 3 か月以上は、透明な状態を維持しており、蛍光試薬のフルオロセインジアセテート(FDA)を添加すると細胞内の酵素活性により、その FDA が細胞質全体を発光させて細胞活性の継続を示すことから、本生産系では生命活動が維持されながら、繊維も生合成されていることが証明されている。

透過電子顕微鏡と原子間力顕微鏡観察から、プロトプラストから産生されたカロース繊維は、 β -1,3-グルカン鎖が 600-800nm 径の中空糸を形成し、さらにそれらが束状になった階層構造を有することが判明した¹⁰⁾。植物がこのようなマイクロメートルサイズの巨大な繊維を体外へ生合成することは、非常に緻密な機構が存在することを示している。

一方、上述のように、この一連のプロセス中に細胞壁形成が認められないということで、この壁形成阻害は、繊維産生誘導因子として考えられる。セルロース合成酵素と細胞骨格は、細胞壁形成において重要な役割を果たすが、特に、表層微小管はセルロース合成酵素複合体の細胞膜上での運動を支持し、セルロース繊維の堆積方向を制御する機能をもつと考えられている^{13,14)}。このことから、本ストレス系においても細胞壁形成の有無への表層微小管の寄与が推定される。さらに、COBRA¹⁵⁻¹⁷⁾とよばれる膜タンパク質の関与、ならびに最近報告された微小管結合タンパク質である Cellulose-Microtubule Uncoupling Protein (CMU)¹⁸⁾の関与を検討する必要も生じてきた。ちなみに、CMU の機能を破壊した細胞においては、表層微小管の曲がった様子や横切る挙動が認められている。

そこで、最近の我々の研究では、次の演者である田川が詳細を発表するが、緑色蛍光タンパクと微小管結合タンパクとの融合タンパクである GFP-MAP¹⁹⁾をカルスに遺伝子導入し、微小管を可視化し、本環境ストレス中における細胞の表層微小管動態を可視化することにより、細胞壁形成阻害への寄与を検討している。その結果、上記の COBRA と CMU の細胞壁形成への関与の間接的示唆を与える実験結果を得ている。このように、本プロトプラストの細胞壁ロックダウン系は、セルロース合成の際の細胞膜と膜タンパクの直接的な接着をモニターできる系でもあると期待される。

文献

- 1) A. J. Brown: *J. Chem. Sci. (London) Transactions*, 49, 432-439 (1886).
- 2) C. Heigler, R. M. Brown, Jr.: *Science*, 210, 4472-4474 (1980).
- 3) R. M. Brown, Jr., J. H. Willison, C. L. Richardson: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 4565-4569 (1976).
- 4) M. S. Doblin, I. Kurek, D. Jacob-Wilk, D. P. Delmer: *Plant Cell Physiol.*, 43(12), 1407-1420 (2002).
- 5) S. Kimura, W. Laosinchai, T. Ito, X. Cui, C. R. Linder, R. M. Brown, Jr.: *Plant Cell*, 11, 2075-2085 (1999).
- 6) Y. Kataoka, T. Kondo: *Macromolecules*, 29, 6356-6358 (1996).
- 7) Y. Kataoka, T. Kondo: *Macromolecules*, 31, 760-764 (1998).
- 8) Y. Kataoka, T. Kondo: *Int. J. Biol. Macromol.*, 24, 37-41 (1999).
- 9) T. Kondo, J. Magoshi, H. Abe, H. Sasamoto, (2000) Method for producing of non cellulosic callose fibers from protoplasts and the callose fiber. Japan Patent No. 3936522 (Application 2000-220419)
- 10) T. Seyama, S. Kimura, H. Sasamoto, H., Abe, T. Kondo: *Planta*, 227, 1187-1197 (2008).

- 11) T. Seyama, T. Kondo: *Holzforschung* 66:407–411(2012) .
- 12) S. Matsuo, A. Takenaga, T. Seyama, T. Kondo: *Holzforschung* 68:69–73, (2014).
- 13) R. P. Paredez, et al.: *Science*, 312: 1491 (2006).
- 14) R. Gutierrez, et al.: *Nat. Cell Biol.*, 11: 797 (2009).
- 15) G. Schindelman, et al.: *Genes & Development*, 15: 1115–1127 (2001) .
- 16) F. Roudier, et al.: *Plant Cell*, 17: 1749–1763 (2005).
- 17) L. Liu, L. et al.: *Plos Genet*, 9, e1003704 (2013).
- 18) Z. Liu, et al.: *Developmental Cell*, 38: 305–315 (2016).
- 19) J. Marc et al.: *The Plant Cell*, 10: 1927–1939 (1998).

シラカバ培養細胞由来プロトプラストの細胞壁形成ダイナミクス

九州大学大学院生物資源環境科学府

田川 聡美

はじめに

植物のプロトプラストは元来、植物の品種改良に用いられてきた技術である。一方、一度細胞壁を除去する、すなわち、壁形成を一旦リセットした系としても考えることができるため、細胞壁形成の研究において有力なツールである¹⁾。通常、壁形成がリセットされたのち、プロトプラストは、壁を再形成するが、本発表で紹介する系は、環境ストレスによって誘導された細胞壁ノックダウン系である。これは、近藤ら²⁻⁵⁾によって見出された現象であり、大過剰の CaCl_2 を添加した酸性の培地条件中でシラカバ由来のプロトプラストを培養すると、細胞壁を形成せずにカロースの中空繊維を産生するという現象であった。本発表では、シラカバ(*Betula Platyphylla*)葉肉細胞由来のカルスを用いて、通常の培養を行ったプロトプラストと環境ストレスを与えたプロトプラストの壁形成と表層微小管動態の違いを調べた結果を紹介する。この違いを明確にすることにより、本細胞壁ノックダウン系を細胞壁形成研究の新たなツールとなる培養システムとして提案する。

実験方法

シラカンバカルスへの GFP-MAP4 遺伝子の導入

表層微小管の蛍光標識のために、*GFP-MAP4*⁶⁾ をアグロバクテリウム形質転換法を用いてシラカバ(*Betula Platyphylla*)葉肉細胞由来カルスに導入した。

ストレス環境下でのプロトプラストの培養および微小管阻害培養

前述の形質転換したカルスを用いて、既報⁵⁾にしたがいプロトプラストを調製した。そののち、プロトプラストを下記の各培地条件で培養した。通常培地 1 : pH 5.8 の 0.6 M マンニトールを添加した Murashige & Skoog (MS) 液体培地。通常培地 2 : 通常培地 1 に微小管の重合を阻害する Oryzalin を添加した培地。ストレス培養 1 : pH 3.5 の下、 CaCl_2 濃度を 150 mM とした MS 液体培地。ストレス培地 2 : ストレス培地 1 に Oryzalin を添加した MS 液体培地。

細胞壁、カロース中空繊維、表層微小管の観察

それぞれの培地条件における細胞組織の観察および、タイムラプス観察には、共焦点レーザー走査型顕微鏡(Confocal laser scanning microscope: CLSM, TCS SP8, Leica)を用いた。観察前に Calcofluor white (CW) を添加することにより、セルロースを蛍光染色した。GFP の励起には 489 nm、CW の励起には 405 nm のレーザーを用い、シグナルの検出には Band-Pass 499~530 nm または、430~470 nm の光学フィルタをそれぞれ用いた。

結果

プロトプラストの細胞壁形成挙動

通常培地 1 では、培養開始から 1 日後にネットワーク状の堆積物が細胞膜表層に認められた。1 週間後には、細胞全体を覆うような形で細胞壁の形成がみられた (Fig. 1a)。一方、ストレス培地 1 においては、培養開始から 1 週間経っても、細胞壁の形成は認められず、糸まり状のセルロースナノファイバーの集合体 (Coiled CNF) と考えられる産生物 (Fig. 1b 矢印) が観察された。

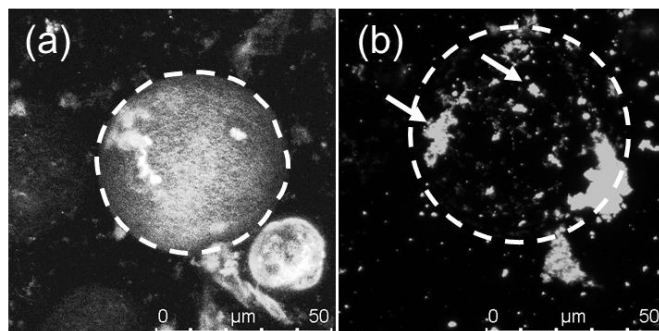


Figure 1. CLSM images of Calcofluor white in normal condition 1 (a) and stress condition 1 (b). The arrows show CNF coils. The broken line show the cell shapes.

プロトプラストの微小管動態

セルロース合成酵素と細胞骨格は、細胞壁形成において重要な役割を果たすが、特に、表層微小管はセルロース合成酵素複合体の細胞膜上での運動を支持し、セルロース繊維の堆積方向を制御する機能をもつと考えられている⁷⁾。このことから、本系においても細胞壁形成への表層微小管の寄与が推定される。そこで、GFP-MAP4 遺伝子をカルスに遺伝子導入することで表層微小管を可視化した。

培養開始から 3 週間後の細胞の CLSM 観察像を Figure 2 に示す。蛍光標識された表層微小管が通常培地 1 中においては良好に配向し (Fig. 2a)、ストレス培地 1 中においては曲線部が多く、ランダムに存在していた (Fig. 2b)。また、タイムラプス観察の結果、通常培養した場合、表層微小管が特定の位置にとどまって伸縮する様子が認められた。一方、ストレス培養においては、位置が固定されずランダムに動く様子が認められた。

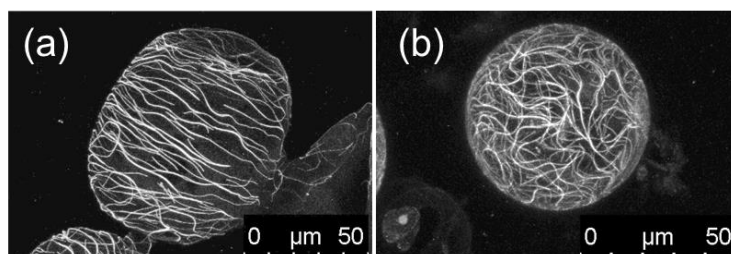


Figure 2. CLSM images of GFP-MAP4 in normal condition 1 (a) and stress condition 1 (b).

細胞壁形成と表層微小管の配置の相関

細胞壁の堆積への表層微小管の関与を検討するため、壁形成初期段階（培養開始から1-3 日後）の細胞壁(CW)と表層微小管(GFP-MAP4)の位置に相関があるのかを調べた。通常培養 1 中においては、堆積物と表層微小管とが、重なる部分が観察された。一方、ストレス培地 1 中においては、重なる部分が少なかった。

さらに、微小管の重合阻害剤を添加した培地(通常培地 2、ストレス培地 2)で培養した細胞の観察を行った。通常培地 2、ストレス培地 2 いずれの培地条件中においても、微小管が崩壊している様子が観察された。通常培地 2 では壁形成が認められたが、ストレス培地 2 では、壁形成が認められず Coiled CNF の産生がみられた。

考察

セルロースナノファイバー(CNF)の細胞膜への吸着と堆積

CNF の細胞膜への堆積を考えると、植物体では、既にある CNF のレールをテンプレートに新たに合成された CNF が堆積すると推定される。同様の現象は、近藤らによって開発されたネマチックオーダーセルロース(NOC)⁸⁾をテンプレートとした酢酸菌(*Gluconacetobacter xylinus*)の走行実験において見いだされている⁹⁾。これは、人工的にセルロース分子を配向させたテンプレート上で酢酸菌を培養すると、配向方向、すなわちセルロースのレールに沿って走行するが、分泌噴出力の反作用に起因するため、分泌方向と反対方向に酢酸菌が走行するという現象である。この際、酢酸菌から分泌された CNF は NOC の配向方向に沿って強く吸着され、それが走行方向制御の駆動力とされる。一方、プロトプラストの場合、細胞壁を除去してあるため、上記の NOC のような既存の CNF 堆積用テンプレートは存在しない。また、細胞膜中のリン酸のような帯電部位は、イオン反発効果を生じるため CNF を吸着しにくい。このことは、表面イオン化されている TEMPO 酸化セルロースナノファイバー^{10,11)}あるいはセルロースナノクリスタル¹²⁾において、イオン反発によってナノファイバー同士が自己凝集を生じない現象からも推定される。CNF の吸着が細胞膜上のリン酸部位とのイオン反発にもかかわらず生じるということは、吸着を誘発する COBRA¹³⁻¹⁵⁾とよばれる膜タンパク質の関与による可能性が高い(Fig. 3a)。したがって、細胞膜下の表層微小管を除去しても CNF は細胞膜上に吸着すると考えられる。事実、本研究において微小管の重合を阻害する培養(通常培養 2)において、微小管が崩壊しているものの、細胞壁の堆積が認められた(Fig. 3b)。

この仮説に基づくと、本ストレス系において、微小管の有無に関わらず、Coiled CNF の集合体が産生されたこと、つまり CNF の細胞膜への吸着および堆積阻害は、COBRA の機能の損失あるいは低下を示唆する(Fig. 3c)。

表層微小管と細胞膜とのリンケージ

セルロース合成酵素複合体（ターミナルコンプレックス：TCs）は protein cellulose synthase interacting (CS) 1/POM2¹⁶⁻¹⁸⁾を介することで、表層微小管に沿った運動を

すると考えられている。表層微小管が、セルロースを合成する際に生じる推進力（上記の反作用）に耐え、細胞膜直下に整然と配列するためには、膜に微小管を固定するタンパクが存在すると推定される。Cellulose-Microtubule Uncoupling Protein (CMU)¹⁹⁾ は最近報告された微小管結合タンパク質であるが、この CMU の機能を破壊した細胞においては、表層微小管の曲がった様子や横切る挙動が示されている。すなわち、CMU が微小管の膜への結合をサポートすることで、微小管はセルロース合成の際に生じる推進力に耐え、配列していられることが推定される(Fig. 3a)。この概念を本系に適応すると、本ストレス培養系では CMU の機能の損失あるいは低下により、表層微小管がランダムな配置や動きを示したものと考えられる(Fig. 3c)。また、通常培地 1 において、表層微小管と細胞壁の位置に相関がみられたことから、表層微小管の一次細胞壁の堆積方向への関与が示唆された。

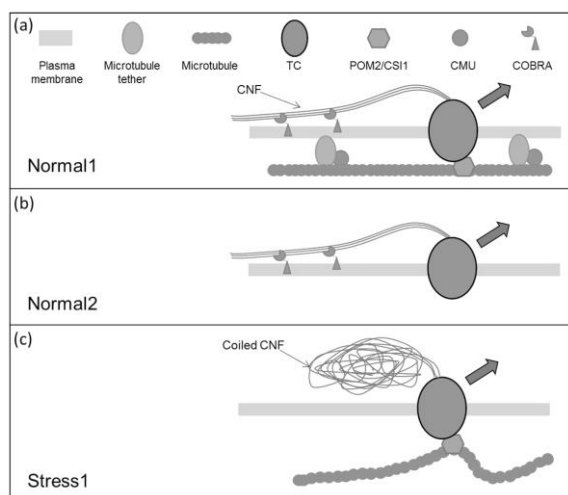


Figure 3. Linking of plasma membrane-CNF and plasma membrane-cortical microtubule in normal condition 1 (a), normal condition 2 (b) and stress condition 1 (c).

おわりに

本研究により、細胞壁と細胞膜、細胞膜と表層微小管の接着や繋がりに関する実験的知見が得られた。本研究で見出されたプロトプラストの細胞壁ノックダウン系は、細胞膜と細胞壁多糖の直接的な接着をモニターできる系であると考えられる。また、細胞壁ノックダウン培養系のみならず、本通常培養系の利用についても現在検討中である。

謝辞

本研究は、平成 25 年から現在まで私が博士課程の院生として所属する九州大学大学院生物資源科学府・近藤哲男教授の指導の下で実施してきたものです。この間、九州大学より九州大学博士後期課程奨学金をいただき、経済的な支援をしていただきました。ここに感謝の意を表します。また、研究を遂行するにあたり、千葉工業大学 木本植物細胞機能学研究室 渡邊宇外教授に GFP-MAP4 遺伝子を有するアグロバクテリウムの提供を、東京農工大学 植物資源形成学研究室 船田良教授、北海道大学 樹木生物学

研究室 山岸祐介助教に CLSM 観察のサポートおよびカルスの形質転換培養方法のご教授を賜りました。また、九州大学大学院 農学研究院研究教育支援センターの CLSM (TCS SP8, Leica) を使用させていただきました。この場をお借りし、厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Yokoyama R., Kuki H., Kuroha T. and Nishitani K. (2016) Arabidopsis Regenerating Protoplast: A Powerful Model System for Combining the Proteomics of Cell Wall Proteins and the Visualization of Cell Wall Dynamics. *Proteomes*, 4(34).
- 2) Kondo, T., Magoshi, J., Abe, H., Sasamoto, H. (2000) Method for producing of non cellulosic callose fibers from protoplasts and the callose fiber. Japan Patent No. 3936522 (Application 2000-220419).
- 3) Seyama, T., Kimura, S., Sasamoto, H., Abe, H., Kondo, T. (2008) Spinning of a gigantic bundle of hollow fibrils by a spirally moving higher plant protoplast. *Planta*, 227:1187-1197.
- 4) Seyama, T., Kondo, T. (2012) Morphological responses of Betula protoplasts in fiber spinning. *Holzforschung*, 66:407-411.
- 5) Matsuo S., Takenaga A., Seyama T. and Kondo T. (2014) Secretion of a bundle of (1→3)-β-glucan hollow fibrils from protoplasts of callus suspension under a Ca²⁺-rich and acidic stressed condition. *Holzforschung*, 68:69-73.
- 6) Marc J., Granger L. C., Brincat J., Fisher D. D., Kao T., McCubbin G. A. and Cyr J. R. (1998) A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living Eepidermal cells. *The Plant Cell*, 10: 1927-1939.
- 7) Paredes R. A., Somerville R. C. and Ehrhardt W. D. (2006) Visualization of Cellulose Synthase Demonstrates Functional Association with microtubules. *Science*, 312: 1491-1495.
- 8) Kondo T., Togawa E., and Brown, Jr. R.M. (2001) "Nematic ordered cellulose": a concept of glucan chain association. *Biomacromolecules*, 2: 1324-1330.
- 9) Kondo T., Nojiri M., Hishikawa Y., Togawa E., Romanovicz D., and Brown, Jr. R.M. (2002) Biodirected epitaxial nanodeposition of polymers on oriented macromolecular templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 14008-14013.
- 10) Saito, T., and Isogai, A. (2004) TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. The Effect of Oxidation Conditions on Chemical and Crystal Structures of the Water-Insoluble Fractions, *Biomacromolecules*, 5: 1983-1989.
- 11) Saito, T., Nishiyama, Y., Putaux, J.-L., Vignon, M., and Isogai, A. (2006) Homogeneous Suspensions of Individualized Microfibrils from TEMPO-Catalyzed Oxidation of Native Cellulose, *Biomacromolecules*, 7: 1687-1691.
- 12) Mukherjee, S. M., and Woods, H. J. (1953) X-ray and electron microscope studies of the degradation of cellulose by sulphuric acid, *Biochimica et Biophysica Acta*, 10: 499-511.
- 13) Schindelman, G., Morikami, A., Jung, J., Baskin, T., Carpita, N., Derbyshire, P., McCann, M., and Benfey, P. (2001) COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in Arabidopsis, *Genes & Development*, 15: 1115-1127.
- 14) Roudier, F., Fernandez, A., Fujita, M., Himmelsbach, R., Borner, G., Schindelman, G., Song, S., Baskin, T., Dupree, P., Wasteneys, G., and Benfey, P. (2005) COBRA, an Arabidopsis Extracellular Glycosyl-Phosphatidyl Inositol-Anchored Protein, Specifically Controls Highly Anisotropic Expansion through Its Involvement in Cellulose Microfibril Orientation, *Plant Cell*, 17: 1749-1763.
- 15) Liu, L., Shang-Guan, K., Zhang, B., Liu, X., Yan, M., Zhang, L., Shi, Y., Zhang, M., Qian, Q., Li, J., and Zhou, Y. (2013) Brittle Culm1, a COBRA-Like Protein, Functions in Cellulose Assembly through Binding Cellulose Microfibrils, *Plos Genet*, 9, e1003704.
- 16) Gu, Y., Kaplinsky, N., Bringmann, M., Cobb, A., Carroll, A., Sampathkumar, A., Baskin, T., Persson, S., and Somerville, C. (2010) Identification of a cellulose synthase-associated protein required for cellulose biosynthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 12866-12871.
- 17) Li, S., Lei, L., Somerville, C., and Gu, Y. (2012) Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) links microtubules and cellulose synthase complexes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 185-190.
- 18) Bringmann, M., Li, E., Sampathkumar, A., Kocabek, T., Hauser, M.-T., and Persson, S. (2012) POM-POM2/CELLULOSE SYNTHASE INTERACTING1 Is Essential for the Functional Association of Cellulose Synthase and Microtubules in Arabidopsis, *Plant Cell Online*, 24: 163-177.
- 19) Liu, Z., Schneider, R., Kesten, C., Zhang, Y., Somssich, M., Zhang, Y., Fernie, A., and Persson, S. (2016) Cellulose-Microtubule Uncoupling Proteins Prevent Lateral Displacement of Microtubules during Cellulose Synthesis in Arabidopsis, *Developmental Cell*, 38: 305-315.

セルロース合成酵素の研究からみえる細胞壁形成機構の解明の難しさ

京都大学生存圏研究所 今井友也¹

キーワード： セルロース合成酵素、膜タンパク質、生化学、高分子科学

1. はじめに

木質細胞壁の主要構成成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンはいずれも高分子であり、必然的に固体構造を形成する。一方で、木材は樹木という生物により作られるが、より正確には酵素タンパク質が触媒する化学反応により各成分は合成される。したがって細胞壁形成は酵素タンパク質による高分子固体構造の形成反応であり、タンパク質スケールにおける現象として大変興味深く、酵素研究の中で手垢のついてない領域の一つである。一方でその解明のためには生化学と高分子科学両方の視点が必要であり、難しい研究課題といえる。

私どものグループでは、生化学と高分子科学（特に高分子固体構造解析）の両輪を回すことで、細胞壁主成分の一つであるセルロースの生合成機構の解明を目指して研究を行っている。その成果を紹介しつつ、細胞壁形成機構研究を酵素機構レベルで解明するために必要な観点について私見を述べたい。今後の皆様の研究にとって、何らかの刺激になれば幸いである。

2. 膜タンパク質研究の重要性

セルロース合成酵素が細胞膜に存在することはよく知られている。またマンナン、キシラン、カロース、ペクチンなど、多くの細胞壁多糖の合成酵素も細胞膜あるいはゴルジ体膜に存在する。さらにヘミセルロース・リグニンの基質であるスクレオチド糖やリグニン単量体も、オルガネラ膜・細胞膜のトランスポーターによりルーメン・細胞外へ輸送供給される。

これら膜内在性のタンパク質は、脂質二重膜を貫通する疎水性ドメインで細胞膜あるいはオルガネラ膜にうち込まれており、「膜タンパク質」と呼ばれる。膜タンパク質は多くの重要な生物現象で中心的役割を果たしている（植物の光合成、ミトコンドリアの電子伝達系によるエネルギー生産（アデノシン三リン酸合成）、動物における神経伝達や感覚器官など）。細胞壁は細胞外に堆積するので、多糖合成酵素やモノリグノール輸送体が細胞膜やゴルジ膜に存在することは理にかなっており、膜タンパク質は細胞壁形成という生物現象においても中枢的役割を果たしている。

¹ E-mail: timai@rishi.kyoto-u.ac.jp 研究室見学歓迎します。

一般に膜タンパク質の研究は、可溶性タンパク質と比較して難易度は高い。その最大の理由は、疎水性部分を持つ膜タンパク質を水系溶媒中に安定に取り出すことが難しいことにある。膜タンパク質研究に取り組むためには、より簡便な実験系を選択することが有効だと博士研究員時代に実感していたので [1-3]²、セルロース合成酵素の研究を行うために、セルロース生産性の細菌である酢酸菌を実験モデルとして選択した。原核生物である細菌は真核生物である植物と比較して単純な構成の生物であり、あらゆる面で研究実施がより容易となる。また酢酸菌セルロースも木材セルロースも、ミクロフィブリル構造を持ち I 型結晶であるという点では同じであり、当面の実験モデルとして酢酸菌を使用することは十分適当であると考えた。

3. 試験管内系による研究 [4, 5]

酵素研究の第一歩はその酵素活性を抽出し、試験管内でその活性を示すことである。セルロース合成酵素のような膜タンパク質を水系溶媒中に安定に取り出すためには、界面活性剤を使って膜タンパク質の疎水性部分を水から保護する必要がある。この界面活性剤の選択が膜タンパク質研究の第一歩である。そこで我々は、今までセルロース合成酵素に使用されたことのない 10 種以上の界面活性剤について、セルロース合成活性を可溶化できるかどうか探索を行った。

比較的マイルドな界面活性剤といわれているアルキルマルトシドでセルロース合成活性を酢酸菌の細胞膜から可溶化できたため、セルロース I ミクロフィブリルの合成を期待したが、既報 [6]で見られたのと同じくセルロース II の合成が認められた。しかしその重量平均重合度は 300 程度であり、分解酵素の逆反応で得られる人工合成セルロースの多くで見られる数十程度より明らかに高く、セルロース合成酵素の重合機能は失われていないことが確認できた。現在、この部分的変性を回避するために、種々の方法を検討中である。

4. 組換え体タンパク質による研究 [7, 8]

タンパク質研究において、大量発現や変異体解析を効率的に行える組換え体タンパク質の利用は大変重要である。原理的には、タンパク質に相当する遺伝子配列が分かっているならば、その組換え体タンパク質を得ることは可能であるが、酢酸菌のセルロース合成酵素においては、1990 年にその遺伝子が同定 [9]されてから、2013 年に X 線結晶構造解析による立体構造モデルとそれに関連した酵素活性分析の報告まで [10, 11]、組換え体タンパク質を使った研究は数えるほどしかなかった。

² 前職において、電圧感受性ナトリウムチャネルの構造生物学に従事していたが、ここでもバクテリア由来のホモログを使っていた。イオンチャネル業界ではバクテリアホモログを使って本質的な研究が行われ、その成果は 2003 年ノーベル化学賞受賞に至った。

我々は酢酸菌のセルロース合成酵素の大腸菌で異種発現させることで、大腸菌にセルロースを合成させることに成功し、1年遅れで論文発表した。しかしここで合成されたセルロースも、高分子量（重量平均重合度約 700）ではあるものの SDS や 2% NaOH、酢酸硝酸混液処理といった精製処理によりセルロース II となり、セルロース I の合成活性の再構成とはならなかった。したがって、生細胞中でセルロース合成酵素を働かせてもセルロース I 合成には至らず、セルロース合成酵素の天然活性の再構成にはまだ何らかの因子が不足していると考えられる。

しかし本実験系は、通常の大腸菌培養によりセルロース合成活性を評価できるため、組換え体セルロース合成酵素の機能解析系として有用である。そこで CesA タンパク質の点変異体をいくつか作出し、その合成活性を評価してみた。予想通り、配列上よく保存されているアミノ酸残基に不活化変異を導入するとセルロース合成活性はほぼ消失したが、保存性の高くないアミノ酸に変異を入れても合成活性は明確に残存し、大腸菌合成系を使って変異体タンパク質の活性評価が可能であることが確認された。

以上の試験管内系と大腸菌系、いずれでもセルロース合成酵素の天然活性の再構成には至っていない。だが、これらの系でマイクロフィブリルの合成に成功すれば、その際の条件が天然活性に必須の最後のピースであることの証明となるため、セルロース合成酵素の本質（＝マイクロフィブリル形成能）を明確にできる実験系として有用と考えている。この最後のピースの一候補として、ターミナルコンプレックスの形成に関わる因子が挙げられる。現在はセルロース試験管内合成の *in situ* 測定や構造生物学を用いて、セルロース合成過程を明らかにしようと試みている。

5. おわりに

細胞壁形成はいわば「生物のモノづくり」である。この「モノづくり」の現場はタンパク質、特に膜タンパク質が活躍する場である。巨体で長寿の樹木という生命体がよくできているのと同様に、その細胞壁形成にかかわる膜タンパク質の機能も大変巧妙にできている。この膜タンパク質の活躍する様子をどうにか可視化したいと考えており、本稿ではセルロースについて、その合成現場の解明を目指した研究を紹介させていただいた。

ただ残念ながら現状は、比較的単純な一次構造をもつセルロースでさえ、そしてバクテリアを使ったモデル実験でさえ、セルロース合成酵素の天然活性の再構成には至っていない。一方で近年植物 CesA を使ってマイクロフィブリル構造を合成する試験管内系も報告され [12]、競争は激化している。細胞壁の形成機構というモノ作りを現場レベルで理解するためには、膜タンパク質に正面から取り組むアプローチが今後ますます重要となることを主張して本稿を結ぶ。

引用文献

- [1] Irie, K., Kitagawa, K., Nagura, H., Imai, T., Shimomura, T., Fujiyoshi, Y. 2010. Comparative study of the gating motif and C-type inactivation in prokaryotic voltage-gated sodium channels, *J.Biol.Chem.*, **285**: 3685-3694.
- [2] Nagura, H., Irie, K., Imai, T., Shimomura, T., Hige, T., Fujiyoshi, Y. 2010. Evidence for lateral mobility of voltage sensors in prokaryotic voltage-gated sodium channels, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **399**: 341-346.
- [3] Shimomura, T., Irie, K., Nagura, H., Imai, T., Fujiyoshi, Y. 2011. Arrangement and mobility of the voltage sensor domain in prokaryotic voltage-gated sodium channels, *J.Biol.Chem.*, **286**: 7409-7417.
- [4] Hashimoto, A., Shimono, K., Horikawa, Y., Ichikawa, T., Wada, M., Imai, T., Sugiyama, J. 2011. Extraction of cellulose-synthesizing activity of *Gluconacetobacter xylinus* by alkylmaltoside, *Carbohydr.Res.*, **346**: 2760-2768.
- [5] Penttilä, P. A., Sugiyama, J., Imai, T. 2016. Effects of reaction conditions on cellulose structures synthesized in vitro by bacterial cellulose synthases, *Carbohydr.Polym.*, **136**: 656-666.
- [6] Lin, F. C., Brown Jr., R. M., Cooper, J. B., Delmer, D. P. 1985. Synthesis of fibrils in vitro by a solubilized cellulose synthase from *Acetobacter xylinum*, *Science*, **230**: 822-825.
- [7] Imai, T., Sun, S. -j., Horikawa, Y., Wada, M., Sugiyama, J. 2014. Functional reconstitution of cellulose synthase in *Escherichia coli*, *Biomacromolecules*, **15**: 4206-4213.
- [8] Sun, S. -j., Horikawa, Y., Wada, M., Sugiyama, J., Imai, T. 2016. Site-directed mutagenesis of bacterial cellulose synthase highlights sulfur–arene interaction as key to catalysis, *Carbohydr.Res.*, **434**: 99-106.
- [9] Wong, H. C., Fear, A. L., Calhoon, R. D., Eichinger, G. H., Mayer, R., Amikam, D., Benziman, M., Gelfand, D. H., Meade, J. H., Emerick, A. W., Bruner, R., Ben-Bassat, A., Tal, R. 1990. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **87**: 8130-8134.
- [10] Morgan, J. L. W., Strumillo, J., Zimmer, J. 2013. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation, *Nature*, **493**: 181-186.
- [11] Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Mérida, H., Mazur, O., Bulone, V., Zimmer, J. 2013. BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **110**: 17856-17861.
- [12] Purushotham, P., Cho, S. H., Díaz-Moreno, S. M., Kumar, M., Nixon, B. T., Bulone, V., Zimmer, J. 2016. A single heterologously expressed plant cellulose synthase isoform is sufficient for cellulose microfibril formation in vitro, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **113**: 11360-11365.

樹木の培養細胞を用いた二次木部様管状要素の分化誘導

北海道大学 大学院農学研究院 山岸祐介

1. 管状要素分化誘導系とは

我々の利用する木質資源は木本植物の持つ発達した維管束形成層から分化した二次木部細胞の集合体であり、二次木部細胞の分化機構の理解は木質資源の生産や利用を進める上で重要である。木部細胞のうち、道管要素や仮道管といった管状要素は植物組織の通水を担っており、局所的に厚い二次壁を堆積させ通水機能のための疎水性と強度を獲得している。一次木部における管状要素は環紋、らせん紋、網紋の二次肥厚様式をとるのに対し、二次木部ではより広い面積で二次壁が肥厚し、部分的に有縁壁孔をするなどの発達した二次壁肥厚様式をもった管状要素が観察される。このような二次壁の肥厚を含む管状要素の分化の過程は植物体の内部でおこるため詳細に解析することは困難である。培養環境下でヒャクニチソウ (*Zinnia elegans*) 葉肉細胞を管状要素へ誘導する実験系 (Fukuda and Komamine 1980) は同調的かつ高頻度で管状要素が誘導されることから、管状要素の形成を解析するモデル実験系として広く用いられてきた。その後、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の懸濁培養細胞を特定の培地成分や植物ホルモンの添加によって管状要素へと誘導する実験系 (Oda et al. 2005, Kubo et al. 2005, Pesquet et al. 2010) が開発されたことで管状要素分化過程の分子生物学的な解析が進み、道管要素分化を制御する転写因子として、原生木部における VND7 および後生木部における VND6 が明らかになった (Yamaguchi et al. 2010)。近年ではこれらの転写因子を培養細胞に発現させることで細胞の約 8 割を管状要素へと分化する実験系も構築され、管状要素分化過程のタンパク質の発現や局在を動的に解析することが可能になっている (Oda et al. 2010)。しかしながら、これらの実験系から誘導される管状要素はらせん紋や網紋などの二次壁肥厚様式をもつことから一次木部の管状要素に類似したものであり、有縁壁孔などの二次木部の管状要素がもつ複雑な構造の形成は誘導されていない。樹幹の大部分を二次木部細胞が占める木本植物の組織形成を解析するモデルとして、二次木部の特徴をもつ管状要素を誘導する実験系の開発が求められる。

2. 針葉樹の培養細胞を用いた管状要素誘導

Möller ら (2003) はラジアータマツ (*Pinus radiata*) 培養細胞中に管状要素が観察される事を観察した。それらの管状要素には仮道管に見られるような有縁壁孔様の構造を持つものが含まれており、二次木部管状要素の特徴を持つ細胞が誘導出来ていたと言える。更に Möller ら (2006) はカルスを植物成長調節物質を含まず活性炭を添加した培地へと移し替えることや、光条件下で培養を行う事によって、カルス中に管状要素が誘導される量が増加する事を報告した。しかしながらラジアータマツのカルスから誘導された管状要素の壁層構造は針葉樹の仮道管に見られる構造とは異なっていた。

カヤ (*Torreya nucifera*) の針葉を材料としたカルス誘導を行っ

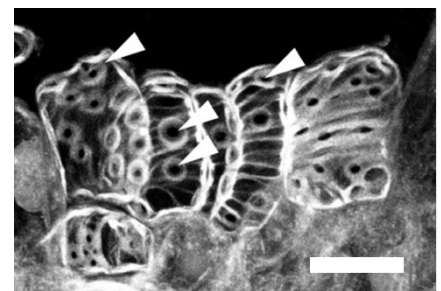


図1 カヤカルス中に観察された管状要素.有縁壁孔(矢尻)をもつ.
Bar = 25 μ m

たところ、非常に低い割合であるがカルスの内部に管状要素が観察された（図 1）。観察された管状要素の一部は広い面積での二次壁の肥厚や、有縁壁孔といった二次木部の管状要素の特徴と、カヤの仮道管の特徴であるらせん肥厚に類似した構造をもっていた。これらの結果は樹木の一部を由来とする培養細胞からその樹木の二次木部管状要素がもつ修飾構造を誘導することができることを示している。さらにこのカルスを活性炭を添加した植物成長調節物質無添加の培地へ移すことで、管状要素の誘導量は増加したが、新たに誘導された管状要素からは二次木部の管状要素のもつ複雑な形態は観察されず、網状などの比較的単純な構造が多く観察された（Yamagishi et al. 2012）。

スギ（*Cryptomeria japonica*）針葉由来の培養細胞は、比較的安定した増殖を示し、懸濁培養を行うことが可能である。また管状要素が観察されない懸濁培養細胞を固体培地上に撒くことにより低い割合ではあるが、管状要素が誘導された（Yamagishi et al. 2015）。誘導された管状要素の二次壁肥厚様式はらせん紋や網紋などの一次木部にみられる管状要素に類似したものであった（図 2）。ここまで示した様に、針葉樹の培養細胞からは有縁壁孔などの二次木部の管状要素（仮道管）の一部の特徴をもつ細胞が誘導可能である。一方で細胞の安定した増殖や分化誘導の効率に課題が残っており、さらなる培養条件や誘導方法の検討が必要である。

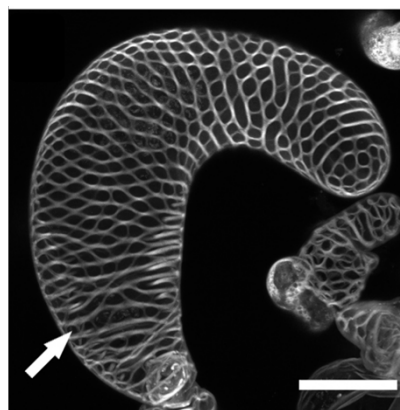


図 2 スギ懸濁培養細胞から誘導された管状要素(矢印) Bar = 50 μ m

3. 広葉樹の培養細胞を用いた管状要素誘導

交雑ポプラ（*Populus sieboldii* $\times$ *P. grandidentata*）葉柄由来のカルスは安定かつ高い増殖性を示す。カルスを増殖培地のオーキシンを除きブラシノライドを 1 μ M 単独添加した培地へ移し替える事で、管状要素を全く含まなかったカルスに管状要素が誘導された（Yamagishi et al. 2013）。さらに、誘導培地へ移し替える前にカルスに乾燥処理を行うことで管状要素の誘導される量が向上した（Yamagishi et al. 2016）。誘導された細胞には一次木部の管状要素の特徴であるらせん紋や網紋の二次壁肥厚をもつもの、二次木部の特徴である有縁壁孔をもつもの（図 3）、その両方の特徴を併せ持つものが混在していた。複合型も含めると、二次木部の管状要素の特徴をもつものは誘導された全管状要素の 7 割を占めていた。また隣接する管状要素間では有縁壁孔の形成位置が同調することで有縁壁孔対が観察されており、細胞間で二次壁の肥厚位置の決定に関する何らかの情報伝達が行われていることが示唆される。更に、交雑ポプラカルスにはアグロバクテリウム法を用いた遺伝子導入が可能であり、緑色蛍光タンパク（GFP）を用いた標識によって、管状要素形成過程の微小管の挙動を連続的に観察することにも成功した。

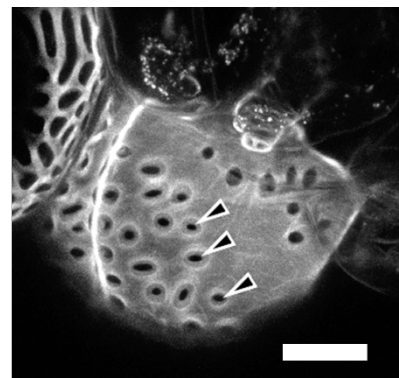


図 3 交雑ポプラカルスから誘導された管状要素. 有縁壁孔(矢尻)をもつ. Bar = 25 μ m

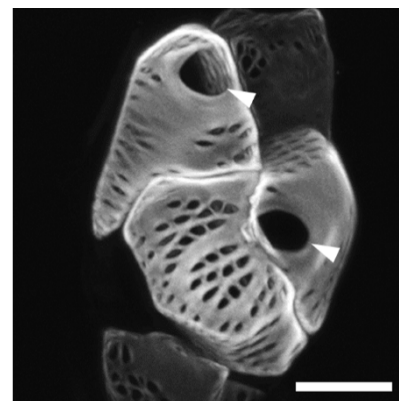


図 4 トチノキカルス中に観察された管状要素. せん孔様の構造(矢尻)をもつ. Bar = 25 μ m

このように交雑ポプラ培養細胞からは二次木部の管状要素の分化を再現性良く誘導されており細胞の分化過程の連続的な解析にも成功している。またポプラはモデル樹木であることから分子生物学的な解析に必要な基礎情報が揃っている。以上のことから二次木部管状要素の分化過程を詳細に解析するための実験系が構築できたといえる。

一方で、交雑ポプラ培養細胞から誘導される管状要素には二次壁修飾構造として有縁壁孔が形成されるが、道管要素の主要な水分通導経路であるせん孔の形成は観察されていない。またせん孔の形成は前述のヒャクニチソウ葉肉細胞を用いた実験系で報告されている（Nakashima et al. 2000）が、樹幹の道管要素がもつような大径のせん孔の形成は報告されていない。それに対し、カキノキ（*Diospyros kaki*）や、トチノキ（*Aesculus turbinata*）の葉から誘導されたカルスからはせん孔様の構造をもつ管状要素が観察された。特にトチノキカルスは細胞の増殖性も良く、観察された管状要素の約1割がせん孔様の構造を形成していた（図4）。さらに階段せん孔板や、らせん肥厚などの二次壁修飾構造の形成も観察された。これらの興味深い特徴から、トチノキカルスはせん孔板を始めとする管状要素の修飾構造の形成を解析するための新たなモデル実験系としての活用が期待できる。

4. おわりに

樹木の培養細胞を用いた管状要素誘導例について、演者らの研究内容を中心に紹介した。有縁壁孔などの二次木部の管状要素に特徴的な構造や、らせん肥厚やせん孔板といった樹種に特異的な構造も誘導されていることから、樹木の二次木部細胞がもつ多様な構造形成を明らかにするための活用が期待される。特に交雑ポプラ培養細胞については管状要素誘導率や再現性が向上しており、形成過程における細胞骨格や細胞小器官の挙動の解析を進めたい。また、実験系を広く活用していく上で、試行回数間や実験者間での結果のばらつきが課題になっている。これには管状要素の誘導条件だけでなく、その前段階にあたる培養細胞の安定的な増殖が必要であると考えられるため、その方法の確立についても取り組んでいきたい。

引用文献

- Fukuda H, Komamine A (1980) Establishment of an experimental system for the tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. Plant Physiol 65: 57–60
- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Miura T, Fukuda H, Demura T (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. Genes Dev 19: 1855–1860
- Nakashima J, Takabe K, Fujita M, Fukuda H (2000) Autolysis during In Vitro Tracheary Element Differentiation: Formation and Location of the Perforation. Plant Cell Physiol. 41: 1267–1271
- Oda Y, Fukuda H (2012) Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. Curr Opin Plant Biol. 15: 38–44
- Oda Y, Mimura T, Hasezawa S (2005) Regulation of secondary cell wall development by cortical

- microtubules during tracheary element differentiation in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiol* 137: 1027–1036
- Pesquet E, Korolev AV, Calder G, Lloyd CW (2010) The microtubule-associated protein AtMAP70-5 regulates secondary wall patterning in *Arabidopsis* wood cells. *Curr Biol* 20: 744–749
- Möller R, McDonald AG, Walter C, Harris PJ (2003) Cell differentiation, secondary cell-wall formation and transformation of callus tissue of *Pinus radiata* D. Don. *Planta* 217: 736–747
- Möller R, Ball R, Henderson A, Modzel G, Find J (2006) Effect of light and activated charcoal on tracheary element differentiation in callus cultures of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 85: 161–171
- Yamagishi Y, Sato T, Uchiyama H, Yoshimoto J, Nakagawa R, Nakaba S, Kubo T, Funada R (2012) Tracheary elements that resemble secondary xylem in calli derived from the conifers, *Torreya nucifera* and *Cryptomeria japonica*. *J Wood Sci* 58: 557–562
- Yamagishi Y, Yoshimoto J, Uchiyama H, Nabeshima E, Nakaba S, Watanabe U, Funada R (2013) In vitro induction of secondary xylem-like tracheary elements in calli of hybrid poplar (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*). *Planta* 237: 1179–1185
- Yamagishi Y, Uchiyama H, Sato T, Kitamura K, Yoshimoto J, Nakaba S, Watanabe U, Funada R (2015) In vitro induction of the formation of tracheary elements from suspension-cultured cells of the conifer *Cryptomeria japonica*. *Trees* 29: 1283–1289
- Yamagishi Y, Yoshimoto J, Ide S, Nakaba S, Nabeshima E, Watanabe U, Funada R (2016) Partial desiccation enhances induction of secondary xylem-like tracheary elements from calli of hybrid poplar (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*). *Trees* DOI: 10.1007/s00468-016-1411-8
- Yamaguchi M, Goué N, Igarashi H, Ohtani M, Nakano Y, Mortimer JC, Nishikubo N, Kubo M, Katayama Y, Kakegawa K, Dupree P, Demura T (2010) VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 effectively induce transdifferentiation into xylem vessel elements under control of an induction system. *Plant Physiol* 153: 906–914