

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02250

研究課題名(和文)加工適性の高い木材を産生し、かつ潜在的な高成長性を秘めた赤材桑の研究

研究課題名(英文) Sekizaisou, which produces red wood with high processibility and growth potential

研究代表者

梶田 真也 (KAJITA, SHINYA)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40323753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、リグニンモノマー生合成の最終段階を触媒するシナミルアルコールデヒドロゲナーゼ(CAD)をコードする遺伝子を欠損した赤材桑(セキザイソウ)について研究した。赤材桑のゲノムを解析した結果、CADの基質の一つであるシナプアルデヒドがリグニンに多量に取り込まれていることが判明した。また、代謝プロファイリングにより、シナプアルデヒドとそこから派生する生成物が強く蓄積していることが明らかになった。赤材桑のゲノムを解読し、3つの推定CAD遺伝子をアノテーションした。他の植物種でリグニン生合成に重要な役割を果たすCAD遺伝子と最も類似性の高いホモログの配列は、フレームシフト変異を起こしていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤材桑(セキザイソウ)は、これまで世界で2例しか報告がなかったリグニンの分子構造を異にする樹木の自然突然変異体の3つ目の事例である。従来、遺伝子組換え技術によりリグニンの構造が変化した樹木が多く作出されてきたが、法的な規制のためにそのほとんどは野外での栽培が行われておらず、リグニンの改変をもたらす木材の被加工性の向上が、実用的な条件下でほとんど評価されていない。赤材桑は自然突然変異体であり、野外での栽培には制約がなく、長期にわたる育成が可能である。従って、この品種を有効に活用することで、リグニン構造が変化した木材の有用性を容易に検証可能で、木材の更なる有効活用方法の開発が加速するはずである。

研究成果の概要(英文)：We report a naturally occurring mulberry, Sekizaisou, which is deficient in the gene encoding CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE (CAD) that catalyzes the last step in lignin monomer biosynthesis. Structural characterization of Sekizaisou wood revealed that substantial amounts of sinapaldehyde, one of the substrates for CAD, were integrally incorporated into its lignin. Metabolic profiling also revealed the strong accumulation of sinapaldehyde and products derived therefrom. We sequenced the genome of Sekizaisou, and annotated three putative CAD genes. The sequence of the homolog with the highest similarity to CAD genes that play a crucial role in lignin biosynthesis in other plant species exhibited a frame-shift mutation.

研究分野：木質科学

キーワード：リグニン クワ 自然突然変異体

1. 研究開始当初の背景

本研究で取り扱う赤材桑(セキザイソウ)は、京都工芸繊維大学の前身である京都高等蚕業学校の教員を務めた吉村武三吉氏により、赤色の木部を持つ珍しいクワとして大正13年に「佐久良会雑誌」の誌上で報告された野生株である。このクワは大元年頃に奥尻島の山中で発見され、その後大正後期～昭和初期頃まで同島内の青苗地区に群生したとされるが、近隣を流れる青苗川の氾濫などにより既に当地では絶滅したと考えられている。古くからその存在が知られている赤材桑であるが、本研究で取り上げられるまでその赤い木材の化学組成や赤材形質をもたらす遺伝子などについては、詳しい解析が一切行われてこなかった。本研究に先立つ我々独自の予備検討の結果から、他のクワ品種と比較して、赤材桑の木材に含まれるリグニンは分子構造が大きく異なり、また木材の酵素糖化性が高いことが示唆されていた。イネ科など単子葉植物では多くのリグニン変異体が知られているが、クワを含む双子葉植物に分類され、かつリグニン構造が大きく変化した樹木の自然突然変異体は、これまで数えるほどしか見つかっていない。リグニンは、木材の物理的な強度維持に極めて重要な化学成分である一方、種々の化学工学的な処理に際して加工の効率向上を妨げる因子でもある。従って、赤材桑の木材やそれに含まれるリグニンの詳細を明らかにすることは、木材の利用効率の向上に大きく貢献すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、赤材桑がリグニン構造を異にする自然突然変異体であるとの仮説を前提として、赤い木材が蓄積する遺伝的な原因を明らかにすると共に、木材に含まれるリグニンの分子構造の詳細とパルプ化処理等の化学工学的な処理におけるその木材の加工効率の良否について明らかにすることとした。

3. 研究の方法

研究を始めた段階では、赤材桑はもちろんのこと、同株が属する *Morus alba* のゲノム配列は明らかにされていなかった。そこで、次世代シーケンサーによるゲノム配列の解析と *Morus notabilis* のゲノム配列を用いた配列のアセンブリを行い、更に得られた配列情報の Blast 解析によりゲノム上に存在する遺伝子の探索を行うこととした。また、赤材桑の木材に含まれるリグニンの含有量や構造を各種化学的手法により解析すると共に、アルカリ蒸解によるパルプ化と酵素による糖化を行うことで、他のクワ品種の木材との比較で加工性の良否を明らかにすることとした。

4. 研究成果

(1) 赤材桑のゲノム解析とリグニン生合成関連酵素遺伝子の同定

山之内らによるフローサイトメトリーを用いた研究から、赤材桑が属する *Morus alba* のゲノムサイズは 345~359 Mbp と見積もられている。この情報を基にして、本研究では赤材桑および形態がよく似たクワ品種である鼠返の全 DNA を用いてイルミナ社製の HiSeqX Ten による配列解析を行った。ゲノムサイズの 200 倍の配列解読を目標とした解析の結果、赤材桑については 4 億 3900 万リード、約 610 億塩基、鼠返については 3 億 6100 万リード、約 490 億塩基の配列データが得られた。次に、得られた配列を使って *de novo* アセンブリーを実施し、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いてリグニン生合成に関与する酵素遺伝子の探索を行った。

従来の研究から、リグニンモノマー(モノリグノール)生合成の最終段階に関与するシンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ(CAD)の働きが抑制されると、木材の色が赤く変化することが知られていた。今回の配列解析により赤材桑ゲノム中に 4 つの CAD 類似配列を特定することができ、また、そのうちの 1 つを除いて完全なタンパク質を担うコード領域の推定にも成功した。これら 3 つの遺伝子を含め、他の植物で同定されている CAD 遺伝子の配列も用いた系統樹解析を実施したところ、3 つのうちの 1 つがリグニン生合成に関わる遺伝子であると推定された。この遺伝子の配列を詳しく調べた結果、5 つのエキソンが 4 つのイントロンで分断されている構造を取っていることが推定された。また、第 1 エキシソンの翻訳開始点と思われる部位の近傍に 1 塩基のグアニン残基の挿入が認められ、この遺伝子にフレームシフト変異が起こっていることが示唆された。RT-PCR によりこの遺伝子からの転写物を調べたところ、鼠返が持つ同じ遺伝子と同様に転写はされているものの、予想されたとおり読み枠がずれていることが強く示唆された。即ち、赤材桑において同遺伝子の機能は完全に喪失している可能性が高いと判断した。

(2) 赤材桑の木材に含まれるリグニンの含有量、および分子構造の解析

木材を使って各種の分析を行うため、同一の圃場に生育する赤材桑と他の 6 つのクワ品種(鼠返、錦桑、カタネオ、朝鮮在来種、露国野桑、根小屋高助)の個体から枝条を回収し、木片と脱脂木粉を調製した。脱脂木粉を用いたリグニン定量の結果、他の 6 品種の木材のリグニン含有量が 20~22% であるのに対して、赤材桑のそれは約 15% であった。また、チオアシドリシスによってリグニンから溶出する典型的な分解物の定量を行ったところ、リグニン単位量に対する分解

物の総収量は赤材桑で明らかに低く、またグアイアシル型分解物に対するシリギル型分解物の比率も赤材桑で有意に低い値を示した。更に、チオアシドリシス分解物を GC/MS 分析に供したところ、CAD の基質であるコニフェルアルデヒドやシナップアルデヒドがリグニンへ取り込まれた時に生じる部分構造に由来するインデン類縁体が、赤材桑の木材で顕著に検出された。

更に詳しいリグニンの構造解析を行うため、赤材桑と鼠返の木材からエンザイムリグニンを調製し、核磁気共鳴法により分析を行った。その結果、チオアシドリシスにより示唆されたとおり、赤材桑のリグニンには多量のコニフェルアルデヒドやシナップアルデヒドが取り込まれていることが明らかになった。上記の遺伝子解析の結果とも合わせて考えると、赤材桑では CAD 遺伝子の機能欠損により、リグニンの量が低下し、さらに分子構造が大きく変化していることが明らかになった。

(3) 代謝物分析

CAD 遺伝子の欠損が植物内の代謝物の蓄積にどのような影響を与えるかを調べるために、赤材桑と同じ圃場に生育する 50 品種の個体の枝条を調達し、茎の節間部に含まれるメタノール可溶性の代謝物を回収後、UPLC-MS/MS 分析に供した。その結果、赤材桑では CAD が触媒する反応に至る複数の代謝物が他のクワ品種よりも多く蓄積している一方で、CAD が触媒する代謝反応以後の代謝経路に関係する複数の代謝物の蓄積量が低かった。また、CAD の基質であるシナップアルデヒドや、その乳酸誘導体（シリギル乳酸ヘキソシド）の顕著な蓄積が認められた。CAD 遺伝子の欠損に伴う上記のような代謝変化が、赤材桑のリグニンの分子構造の変化をもたらしているものと考えられた。

(4) アルカリ蒸解、および酵素糖化による赤材桑の木材の被加工性評価

赤材桑の木材に含まれるリグニンの分子構造の変化が、木材の被加工性に与える影響を評価するため、アルカリ蒸解と酵素糖化を実施した。即ち、赤材桑と同じ *Morus alba* に属する 4 つのクワ品種（鼠返、錦桑、カタネオ、朝鮮在来種）から調製した木材チップを、一定濃度の水酸化ナトリウムを含む溶液中で熱処理し、処理後に得られる未漂白パルプの収率とパルプ中に残存するリグニン量を定量した。また、セルラーゼおよびセロビアーゼを用いて各クワ品種から調製した木粉の糖化を行い、処理後に可溶化する還元糖を定量した。なお、各クワ品種の木材に含まれる多糖を構成する中性糖（単糖）の組成を明らかにするために、アルジトールアセテート法による分析も実施した。

単糖分析の結果、乾燥木粉の単位量から検出された単糖の総量は、赤材桑に比較して錦桑、カタネオ、および朝鮮在来種では有意に高く、一方で鼠返では有意に低かった。また、水酸化ナトリウム 25% の条件下における蒸解では、他のクワ品種に比較して赤材桑の木材のパルプ化収率が有意に高く、また得られたパルプに残存するリグニン量や未蒸解画分の重量は赤材桑で有意に低かった。更に、脱脂木粉に加え、希アルカリ溶液で部分的に脱リグニンした木粉を用いた酵素糖化においては、溶出した還元糖の量が他のクワ品種に比較して赤材桑で有意に高かった。

以上のことから、赤材桑の木材は他のクワ品種のそれらに比較して高い脱リグニン能を備え、パルプ化や酵素糖化による多糖や単糖の回収効率も高いことが明らかになった。

(5) 自然環境中における変異型 CAD 遺伝子の探索

赤材桑は、今から約百年前に奥尻島で発見されており、その後、短期間ではあるが島内で人為的に栽培された記録が残されている。同遺伝子の欠損が自然環境下で個体の生存に与える影響を間接的に評価することを目的に、赤材桑が持つ変異型（欠損型）CAD 遺伝子を持つ個体を同島内で探索した。即ち、赤材桑が栽培されるとされる青苗川流域を踏査し、そこに自生する約 600 個体のクワから葉を回収した。次に、回収した葉から個別に全 DNA を調製し、PCR と増幅断片のシーケンス解析により変異型 CAD 遺伝子の有無を判定した。回収した葉の 90% 以上を使っての判定に成功したものの、赤材桑と同じ変異した CAD 遺伝子を持つ個体は発見できなかった。この結果は、変異した遺伝子を持つことが個体の生存に有利には働かないことを示唆しているのかもしれない。

(6) 雑種第二代の作出

上記のように、赤材桑に赤い木材を与える遺伝要因が CAD 遺伝子の欠損にあり、また同遺伝子の変異がリグニンの分子構造を変え、木材の被加工性を向上させることを明らかにした。一方、これまでの解析では、赤材桑の比較対象として他のクワ品種を用いてきたが、CAD 遺伝子の欠損と木材の性質の関係を真に実証するには、同じ親から生まれた兄弟姉妹系統間の相互比較が重要である。このことから、赤材桑を種子親、国桑第 21 号を花粉親とした人工交配を実施し、雑種第一代 (F1) を作出した。また、得られた F1 個体同士を人工交配し、雑種第二代 (F2) も作出した。この結果、ここで得られた F2 個体を材料に、CAD 遺伝子座の遺伝子型の違いに着目した各種の研究を遂行することが可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikeda Tsutomu, Takata Naoki, Sakamoto Shingo, Hu Shi, Nuoendagula, Hishiyama Shojiro, Mitsuda Nobutaka, Boerjan Wout, Ralph John, Kajita Shinya	4. 巻 75
2. 論文標題 Improved chemical pulping and saccharification of a natural mulberry mutant deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Holzforschung	6. 最初と最後の頁 968 ~ 977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/hf-2021-0015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 持田裕司、岸雅嵩、小堀航平、武生魁世、近藤将人、胡石、野村義宏、新保博、梶田真也	4. 巻 90
2. 論文標題 特異な材色を呈するクワの自然突然変異体「赤材桑」の飼料効率に関する検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 蚕糸・昆虫バイオテック	6. 最初と最後の頁 91 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hachisuka H, Fukuda S, Iwase M, Inagaki S, Tomiyama H, Okuizumi H, Koyama A, Kajita S	4. 巻 1
2. 論文標題 Detection protocol for a mutant allele on the CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 1 locus of the Morus species and search trial for the allele in the natural mulberry population of Okushiri island	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lignin	6. 最初と最後の頁 42 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Masanobu, Tomiyama Hirokazu, Koyama Akio, Okuizumi Hisato, Liu Sarah, Vanholme Ruben, Goeminne Geert, Hirai Yuta, Shi Hu, Takata Naoki, Ikeda Tsutomu, Uesugi Mikiko, Kim Hoon, Sakamoto Shingo, Mitsuda Nobutaka, Boerjan Wout, Ralph John, Kajita Shinya, Nuoendagula	4. 巻 182
2. 論文標題 A Century-Old Mystery Unveiled: Sekizaisou is a Natural Lignin Mutant	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1821 ~ 1828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.19.01467	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shinya Kajita
2. 発表標題 A Lignin Mutant, Sekizaisou: So Old, but Still New
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Lignin (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田努、梶田真也
2. 発表標題 赤材桑のアルカリ蒸解廃液から回収されたリグニンの化学特性
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶田真也
2. 発表標題 CAD遺伝子を欠損したクワの自然突然変異体から得られる木材と葉の潜在的な利用価値
3. 学会等名 第66回リグニン討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶田真也
2. 発表標題 特異な分子構造のリグニンを蓄積するクワの自然突然変異体・赤材桑の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶田真也
2. 発表標題 特異な分子構造のリグニンを蓄積するクワの自然突然変異体・赤材桑の解析
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田努、梶田真也
2. 発表標題 赤色木材を蓄積する自然突然変異体・赤材桑のパルプ化特性
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 SHINYA KAJITA
2. 発表標題 SEKIZAISOU: the first reported natural mutant with abnormal lignin structure in the world?
3. 学会等名 2nd International Symposium for Plant Cell Wall Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>加工性に優れた鮮やかな赤色の木材をつくる桑の秘密を解明 https://www.tuat.ac.jp/outline/disclosure/pressrelease/2019/20200219_01.html</p> <p>材が真っ赤なクワから木の新たな活用の道を探る https://webronza.asahi.com/science/articles/2021092300002.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	船田 良 (FUNADA RYO) (20192734)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	
研究分担者	横山 岳 (YOKOYAMA TAKESHI) (20210635)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授 (12605)	
研究分担者	奥泉 久人 (OKUIZUMI HISATO) (20370645)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源研究センター・主席研究員 (82111)	
研究分担者	光田 展隆 (MITSUDA NOBUTAKA) (80450667)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長 (82626)	
研究分担者	池田 努 (IKEDA TSUTOMU) (90334036)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関