

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580188

研究課題名（和文） 糖鎖分解酵素の遺伝子を導入したポプラの細胞壁微細構造

研究課題名（英文） Ultrastructural study of cell wall in transgenic poplar for several glycanases.

研究代表者

馬場 啓一 (BABA KEIICHI)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：20238223

研究成果の概要：キシログルカナーゼ組換えポプラでは、引張あて材 G 層のセルロースマイクロフィブリル間の充填構造がキシログルカンであることを明らかにした。キシラナーゼ組換えポプラでは、成長初期における二次壁形成が遅れ、リグニン沈着量が少なくなることが明らかとなった。ポリガラクトサナーゼ組換えポプラでは、細胞の径や繊維の長さが野生株と比べて小さくなり、成長が遅くなった。このことから、ポリガラクトサナーゼが細胞成長の時の細胞間の滑りに寄与していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学、林産科学・木質工学

キーワード：細胞壁、ヘミセルロース、木材、あて材

1. 研究開始当初の背景

木材の実質は植物の二次細胞壁であり、二次細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、リグニンといった高分子の複合体から成り立っている。これら高分子物質の細胞壁内における立体構造が細胞壁の性質を決定しているはずであるが、それぞれの成分と立体構造の構築や力学的性質の関係については、未だに知られていないことが多い。

キシログルカンは、これまで一次壁に特有のヘミセルロースであると考えられてきた。ところが、キシログルカン転移酵素がポプラの木部分化帯の二次壁形成初期で発現して

いることが知られ、二次壁の形成にも関与するのではないかと考えられたが、最終産物である二次壁には、キシログルカンはごく微量にしか存在せず、その機能も不明なままである。

一方、申請者はこれまでにキシログルカナーゼを導入した遺伝子組換えポプラを作出し、野性型と比べて表現型にいくつかの違いがあることを示したが、特に横倒しにして姿勢制御能を調べたところ、野性型に比べてキシログルカナーゼ組換えポプラは著しく劣ることがわかった。その幹の内部では、引張あて材形成が形成されているにもかかわらず

らず、野性型に比べて顕著に引張の応力が弱いことも明らかにした。すなわち、キシログルカナーゼに晒されつつ形成されたG層は応力の発生が弱いということである。また、キシログルカン転移酵素活性を調べたところ、G層にはキシログルカン転移酵素のアクセプター結合活性があり、またキシログルカン特有の4,6-グルコシルがメチル化分析で有意に検出されるなど、G層におけるキシログルカンとキシログルカン転移酵素の存在が明らかとなった。これらことは、キシログルカンが通常の木部形成に関与していることだけでなく、引張あて材G層中では、引張応力発生のメカニズムに直接関与していることを示唆している。キシログルカナーゼ組換え体と野性型のG層の微細構造を比較することによって、キシログルカンのG層微細構造への寄与が明らかとなる。

引張あて材を形成している幹を生きた状態で切断すると、切断面近辺の引張あて材G層は、応力が解放されることによって膨潤したような形態に変形することを光学顕微鏡レベルで明らかにした。この状態のG層と、応力解放前のG層を電子顕微鏡でその微細構造を比較できれば、応力発生に寄与する微細構造が明らかとなる。また、キシログルカナーゼ組換え体ポプラのG層も同様に比較すれば、より詳細な情報が得られるだろう。

2. 研究の目的

木材の実質は植物の二次細胞壁であり、二次細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、リグニンといった高分子の複合体から成り立っている。これら高分子物質の細胞壁内における立体構造が細胞壁の性質を決定しているはずであるが、それぞれの成分と立体構造の構築については、未だに知られていないことが多い。本研究では、細胞壁の主成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンのうち、ヘミセルロースに焦点を定め、ヘミセルロースが、木材細胞壁の立体構造構築について、どういった機能を果たしているのか、ヘミセルロースに分類される糖鎖の主鎖を加水分解する酵素の遺伝子を導入したポプラを用いて、その細胞壁の微細構造を電子顕微鏡で観察することによって解析することを目的としている。

樹木が二次肥大生長をしている幹の部分では、重力環境等に応じて屈曲するとき、あて材を形成することはよく知られていた。広葉樹では屈曲内側に引張あて材が形成され、引張の応力を発生し、縮もうとすることによって屈曲する。引張あて材ではセルロースが多くリグニンが少なく、典型例では木繊維の二次壁中にリグニンを全く含まないG層が形成される。こういった組織構造上の違いや壁成分上の違いが応力発生の要因となって

いることは想像に難くないが、そのメカニズムについては全くわかっていなかった。キシログルカナーゼを構成発現させる組換え体ポプラを用いたあて材形成の誘導で、明らかに応力の弱いあて材が形成されたことから、あて材の応力発生にキシログルカンが関与していることが初めて示された。これまで二次壁では微量にしか存在しないと思われていたキシログルカンがG層にはあると示したことも、それまでに想像されなかった発見だが、特定の糖鎖がG層の応力発生に関与していることが示唆されたのも初めてであった。G層の微細構造自体はすでに電子顕微鏡での観察例が多くあるが、特定の糖鎖に焦点を当てて応力発生との関連を直接検討するのは、本研究が唯一の試みである。応力が弱くて起きあがれない表現型の源となるキシログルカンの失われたG層と野性型ポプラのG層の微細構造を詳細に観察することによって、応力発生の構造的根拠とそこでキシログルカンの担う役割が明らかとなる。

初年度はキシログルカナーゼ組換え体を用いて引張あて材G層の微細構造を観察し、フィブリル間の接着・充填様の微細構造はキシログルカンによって形成されていることが明らかにした。今年度は、キシラナーゼ遺伝子を導入したポプラを用いて、通常の二次壁発達過程の観察をおこなう。

キシランは高等植物の二次細胞壁における主要なヘミセルロースであり、キシロースが β -1,4で直鎖状に結合した主鎖をもつ。この β -1,4-キシロシル結合を加水分解する酵素がキシラナーゼであり、キシラナーゼ遺伝子を導入したポプラでは、二次壁形成時に、その主要なヘミセルロースであるキシランを分解されながら細胞分化することが期待される。この遺伝子組換え体の細胞壁微細構造を観察することによって、キシランの二次壁微細構造構築に寄与する機能を解析する。

3. 研究の方法

キシログルカナーゼ組換え体ポプラのクローンを挿し木で増やし、植物培養室で育成する。組換え体作出に用いた元の野生型ポプラも増やす。

樹高20-30 cmに達したら、傾斜処理によって引張あて材の形成を誘導する。

誘導されたあて材試料は、

- 1) 通常の超薄切片法による電子顕微鏡観察用に、アルデヒド・オスミウム二重固定してエポキシ樹脂またはLR-white樹脂に包埋する。
- 2) 免疫電顕観察用としてパラホルムアルデヒド固定後、LR-White樹脂に包埋する。
- 3) 急速凍結・ディープエッチング法によってレプリカ膜を作製する。

といった、3種類の処置によって微細構造を観察する。

免疫電顕法では、抗キシログルカン抗体、抗キシログルカン転移酵素抗体、遺伝子導入したキシログルカナーゼ抗体を持っているので、それらの抗体を用いて、あて材G層内での局在を観察し、組換え体と野生型を比較する。

急速凍結・ディープエッチング法では、すでに一次壁でセルロースマイクロフィブリル間をキシログルカンが架橋している様子が電子顕微鏡レベルで観察されている(文献1)。単離した細胞壁をキシログルカナーゼ処理してセルロースマイクロフィブリルより細かい架橋構造が失われたことから明らかとなったが、ディープエッチング処理によってキシログルカンがどのようなサイズで見えるかがわかっているので、キシログルカンと思われるサイズの架橋構造を組換え体と野生型で比較する。

キシラナーゼ組換え体ポプラのクローンを挿し木で増やし、植物培養室で育成する。組換え体作出に用いた元の野生型ポプラも増やす。

樹高20-30 cmに達したら、伸長域から二次壁肥厚域までの各節間から試料を採取する。採取された試料は、光学顕微鏡による組織発達過程を観察する。

光学顕微鏡観察によって、組換え体と野生型とで組織発達過程に差のあった部分について、微細構造を詳細に解析するため、

1) 通常の超薄切片法による電子顕微鏡観察用に、アルデヒド・オスミウム二重固定してエポキシ樹脂またはLR-white樹脂に包埋する。

2) 急速凍結・ディープエッチング法によってレプリカ膜を作製する。

3) 脱水・ブタノール置換・凍結乾燥によってFE-SEM観察を作製する。

といった、3種類の調製法によって試料を作製し、細胞壁の微細構造を観察する。

通常の超薄切片法では、二次壁の壁層構造の構成の違いに着目して観察する。

急速凍結・ディープエッチング法では、キシランとセルロースマイクロフィブリルの関係に着目して観察を行う。

FE-SEMでは、全体的な観察ができるので、細胞壁の発達過程の違いについて詳細に観察を行う。

以上の観察結果を総合して、二次壁立体構造構築に対するキシランの役割について考察する。

4. 研究成果

木本植物の茎は、伸長成長停止後も木部にあて材を形成することで屈曲による姿勢制御をしている。双子葉植物は主に屈曲したい

側に引張あて材を形成し、その強い引張の成長応力によって茎を曲げる。引張あて材の成長応力は、主に細胞壁のG層が発生していると言われている。キシログルカンを分解する酵素であるキシログルカナーゼの遺伝子を導入した組換え体ポプラは引張あて材形成による成長応力の発生が極めて弱く、本組換え体ポプラの引張あて材細胞壁G層の微細構造を電子顕微鏡で解析することにより、引張あて材細胞壁G層におけるキシログルカンの構造的役割を明らかにすることを目的とした。当初の計画では、急速凍結・ディープエッチング法や超薄切片法など、透過型電子顕微鏡を用いることになっていたが、実際に実験を行ってみると、解析対象とする引張あて材細胞壁G層の明瞭な観察が難しく、キシログルカナーゼ組換え体と野生型ポプラの引張あて材細胞壁の違いを明確に観察することができなかった。このため、観察機器を電界放射走査型電子顕微鏡(FE-SEM)に変更し、キシログルカナーゼ組換え体と野生型ポプラの引張あて材の横断面を直接観察することとした。その結果、組換え体では、亀裂のみられるG層が多く、セルロースフィブリル同士がほぐれた様な状態が多く観察された。また、組換え体で観察された状態は、野生株引張あて材を試験管内でキシログルカナーゼ処理することによって模倣されたため、野生株にみられたフィブリル間の接着・充填様の微細構造はキシログルカンによって形成されていることが明らかとなった。

木材の実質は植物の二次細胞壁であり、二次細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、リグニンといった高分子の複合体から成り立っている。これら高分子物質の細胞壁内における立体構造が細胞壁の性質を決定しているはずであるが、それぞれの成分と立体構造の構築については、未だに知られていないことが多い。本研究では、セルロース・ヘミセルロース・ペクチンなど細胞壁構成糖鎖類がどういった機能を果たしているのか、これら糖鎖の主鎖を加水分解する酵素の遺伝子を導入したポプラを用いて、その細胞壁を解析することを目的とした。また、応用利用の観点から、これら糖鎖分解酵素遺伝子の組換え林木の木部の糖化性についても試験した。キシラナーゼ遺伝子組換えポプラでは、成長初期の茎部が野生株と比べてかなり柔軟であることが傾斜後姿勢制御実験でわかった。内部においては、二次木部の細胞壁肥厚が野生株と比べ2-4節間ほど遅く、このことが茎部に柔軟性を付与する原因であると考えられた。ペクチンの主成分であるポリガラクトuron酸を分解するポリガラクトナーゼ遺伝子を導入したポプラでも、引張あて材形成による姿勢制御が抑制された。木部の繊維細胞を調べたところ、その長さが野生株と比べ

て短くなっていることがわかった。ペクチンは細胞と細胞を接着する細胞間層に多く、細胞間でのすべり成長を阻害した結果、繊維細胞が短くなり姿勢制御能が劣ることになったと推測される。これら糖鎖分解酵素遺伝子の組換え体では、キシログルカナーゼ・キシラナーゼの組換え体で、木部の糖化性が向上した。これは、細胞壁が形成される場でセルロースとヘミセルロースの相互作用が切られながら細胞壁が堆積し、結果として糖化時の酵素のアクセシビリティが向上したことが原因であろうと推測される。

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 2件)

1. Sri H., Enny S., Park, Y. W., Kaku, T., Kaida, R., Baba, K., Hayashi T: Overexpression of poplar cellulase accelerates growth and disturbs the closing movements of leaves in sengon., *Plant Physiol.*, 査読有り, 147, 552-561, 2008

2. Taniguchi, T., Ohmiya, Y., Kurita, M., Tsubomura, M., Kondo, T., Park, Y. W., Baba, K., T. Hayashi: Biosafety assessment of transgenic poplars overexpressing xyloglucanase (AaXEG2) prior to field trials. *J. Wood. Sci.*, 査読有り, 54, 408-413, 2008

[学会発表] (計 8件)

1. 海田るみ、他：ポプラセルラーゼを構成発現するファルカタにおける糖化性の向上。第50回日本植物生理学会年会、2009年3月24日、名古屋

2. 加来友美、他：ポリガラクトツロナーゼを発現させた形質転換ポプラ。第50回日本植物生理学会年会、2009年3月24日、名古屋

3. 加来友美、他：ポリガラクトツロナーゼの過剰発現によるポプラの形態変化。第59回日本木材学会大会、2009年3月17日、松本

4. 海田るみ、他：セルラーゼ発現による糖化性の向上、2009年3月15日、松本

5. 馬場啓一、他：樹木の重力に対する応答。第1回宇宙環境・利用シンポジウム、2009年3月2日、宇治

6. K. Tomita-Yokotani et al.: CosmoBon for

studying wood formation under exotic gravitational environment for future space agriculture. 37th COSPAR Scientific Assembly, 2008年7月13-20日, Montreal, Canada.

7. 馬場啓一、他：キシログルカナーゼ構成発現による木部細胞壁G層の微細構造変化。第49回日本植物生理学会年会（札幌）。2008.3.20-22.

8. 間野絵梨子、他：キシログルカナーゼ過剰発現ポプラの引張あて材におけるG層の微細構造解析。第57回日本木材学会大会（広島）。2007.8.8-10.

[図書] (計 1件)

1. 馬場啓一、森を取り戻すために (分担執筆：第2章：二酸化炭素吸収源としての樹木・森林・木材) 林 隆久 編、総ページ数102 (うち13頁を分担)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名：馬場 啓一

所属研究機関・部局・職名：京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：20238223

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し