

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22326

研究課題名（和文）重力屈性の発現と器官屈曲状態の維持に果たすリグニンの役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of lignin in the development of gravitropism and the maintenance of organ bending state

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：植物細胞やその集合体としての植物体の形は、細胞の外側にある細胞壁が規定している。本研究では、枝条が下垂しやすいクワの自然突然変異体の赤材桑とその後代を主要な研究材料として、植物細胞壁の主要な化学成分であるリグニンが、樹木の器官の屈曲状態の維持に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

研究の結果、赤材桑ではリグニン生合成に関与するシナミルアルコールデヒドロゲナーゼの遺伝子にフレームシフト変異が見つかり、同遺伝子の機能が完全に失われていることが明らかになった。赤材桑ではリグニン構造が大きく変化していたが、下垂しやすい形態はCAD遺伝子の変異とは関係が薄いと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤材桑の木材は、単に赤いという視覚的な特徴だけでなく、それに含まれるリグニンが科学的処理により分解しやすい特徴を持つ。木材を燃料や化成品の原料として利用する際、リグニンの加工性の優劣が加工効率やコストに大きく影響を与える。赤材桑自体の生理学的、形態学的な特徴に加え、その木材の化学的な特質を深く調べることは、木材の有効利用方法の開発に大きく貢献し、脱炭素社会の構築にも資するものである。

研究成果の概要（英文）：The shape of plant cells and plant bodies are defined by the cell walls that covers outside of the cells. In this study, we aimed to clarify the role of lignin, a major chemical component of plant cell walls, in maintaining the bent state of tree organs by using SEKIZAISOU, a spontaneous mutant of mulberry with a tendency to droop branchlets, and its offspring as the main experimental materials.

As a result of the study, a frameshift mutation was found in the gene of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), which is involved in lignin biosynthesis, and it was revealed that the function of the gene was completely lost in SEKIZAISOU. Although the lignin structure of the cultivar was significantly altered, the drooping morphology was independent to the mutation of the CAD gene.

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 生合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物細胞やその集合体としての植物体の形は、細胞の外側にある細胞壁が規定している。植物細胞壁の主要な化学成分は、多糖であるセルロースとヘミセルロースに加え、芳香族高分子のリグニンである。植物の細胞壁を鉄筋コンクリートの構造物に例えると、太い鉄筋がセルロース、細い鉄筋がヘミセルロース、そしてリグニンはコンクリートに相当する。高分子であるリグニンは、ヒドロキシケイヒアルコール類を主要なモノマーとするが、このモノマー合成に關する遺伝子に異常をきたすと、リグニンの分子構造が変化する。木材中のリグニンの含有量やその分子構造の変化は、木本植物自体の形態を変化させることがある。

2. 研究の目的

本研究では、リグニンのモノマー合成酵素の一つシンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (CAD) の機能を完全に失っていると予想されるクワ(桑)の自然突然変異体(赤材桑)とその後代を主要な研究材料として用いる。赤材桑は枝条全体が下垂しやすく、また事前の予備検討の結果から特異な分子構造のリグニンを細胞壁に蓄積すると推察された。本研究の目的は、赤材桑とそれを種子親として得られた交配後代 (F1 と F2) を使い、樹木の器官の屈曲状態の維持にリグニンが果たす役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

赤材桑の枝条が示す形態的な特徴は、同品種の木材に含まれるリグニンの量や分子構造の変化に起因するとの仮説を前提に以下のような実験を行った。

- ・室内、および野外での赤材桑の樹形変化の確認
- ・赤材桑の全ゲノム解析とリグニン関連遺伝子の同定
- ・屈性発現に關すると考えられるオーキシン応答関連遺伝子の同定
- ・人工交配による F1、および F2 遺伝子の作出
- ・F1 および F2 世代の樹形とリグニン構造との関連解析

4. 研究成果

(1) 室内および野外で育てた赤材桑の形態変化の追跡

鉢植えした赤材桑を温室内で育て、その枝条形状の経時的な変化を観察することで、枝の屈曲に対する自重の影響を評価した。葉が大きく展開して活発に枝が伸長する春から夏においては、赤材桑の枝は十分に上方へ伸長できず、一部の枝は鉢を置いた床を匍匐(ほふく)した。通常、倒伏した枝はあて材の形成を経て先端部が上方へ伸びるはずであるが、赤材桑の大半の枝には、そのような成長挙動は見られなかった。一方、秋になり落葉した後、匍匐した枝の先端部はその向きを徐々に上方に変化させたことから、成長期に見られた枝の匍匐は、重力や光に対する屈性の異常に原因があるわけではなく、着葉時に自重を支えられない枝の物性に拠るものと推察された。

野外で地植えした赤材桑では、春季から夏季へ向かう成長期において個体の上端から伸びる枝条は、他の桑品種のそれと同様に上方へ伸長した。一方、中間部や下部から伸長した枝は真っすぐ上方へは伸びず、側方へ伸長するものや下方へ伸びて最終的には地面を匍匐するものが多く見られた。また、これら側方伸長や匍匐伸長する枝の先端は、同じ畑に植えた他の品種の枝の先端に比較して、上方への屈曲が弱い(上方へ曲がる角度が浅い)傾向が見られた。赤材桑で確認された屈性発現の変化が、次世代でも発現するか確認するために、多品種との人工交配により掛け合わせによって次世代、次々世代を作出することとした。



図1. 赤材桑(左)と対照品種(右)。下垂した枝の先端の上方への屈曲が、赤材桑では対照品種よりも弱いことがわかる。

(2) ドラフトゲノムシーケンスとオーキシン早期応答遺伝子群の同定

赤材桑は北海道の奥尻島の山中で約 100 年前に発見された野生株であるため、発見前の来歴が不明である。他の桑品種との系統関係は全く不明であるものの、葉の形をはじめとする個体の形態的な特徴からカラヤマガワ (*Morus alba*) と考えられる。また、特徴的な赤色を呈する木材の化学分析の結果から、リグニンの生合成に關するシンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (CAD) 遺伝子の機能欠損が伺われた。系統関係が分からないため研究開始時点では適切な対照品種の選定が難しかったが、比較的形態が似ている桑品種の鼠返を選び、二品種のドラフトゲノムの解読を試みた。

葉から抽出した全 DNA をイルミナ社の HiSeqX Ten を用いて解析し、各々のゲノムの塩基配列を決定した。得られた塩基配列をフィルタリングした結果、赤材桑では約 61Gb、4 億 3900 万のリードが得られた。一方、鼠返では約 49Gb、3 億 6100 万のリードが得られた。*M. alba* のゲノムサイズについては、Yamanouchi ら (2010) がフローサイトメトリー解析から 345-359 Mb 程度、Jiao ら (2020) がゲノムシーケンスから約 346 Mb と各々推定しており、これら既報の知見に鑑みると、今回得られた配列情報は以後の解析に十分なものと思われた。配列解析を行った時点では、*M. notabilis* のゲノム配列が唯一リファレンスゲノムとして利用できたため、これを使って各リードのマッピングを行った。その結果、両品種から得られたリードの 90% 近くがマッピングされ、両品種のゲノム配列からは *M. notabilis* のゲノムと比較で 1,000 万個以上の一塩基多型 (SNP) を検出することができた。

変異の存在が推察された CAD 遺伝子を含め、屈性発現に重要と思われる植物ホルモン関連の遺伝子を同定するために、PLATform for Assembling NUcleotide Sequences (Platanus 1.2.4, <http://platanus.bio.titech.ac.jp/>) を用いて、様々な k-mer に基づいてフィルターをかけたリードの de novo assembly を行いった。その後、Maker (v2.31.8) で予測されたタンパク質の遺伝子の予想される 47,279 個について、BLAST 解析により他の植物の遺伝子との相同性解析を行った。

上記相同性解析の結果、赤材桑の CAD 遺伝子を同定すると共に、同遺伝子上にフレームシフトを引き起こす点変異が存在することを明らかにした。また、オーキシン早期応答遺伝子群についても、最低 20 個の遺伝子が存在することを確認した。同定された CAD 遺伝子の発現を RT-PCR で確認したところ、フレームシフトによりその機能が完全に喪失しているにもかかわらず、転写されていることが確認された。

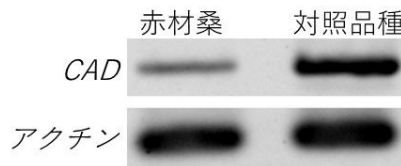


図 2. 赤材桑と多品種における CAD 遺伝子の発現確認

(3) 人工交配による赤材桑の後代の獲得と樹形の確認

赤材桑の枝条が生長時に示す特徴的な形態が遺伝するか否かを確かめるため、赤材桑を種子親、国桑第 21 号を花粉親とする人工交配を行い、後代の F1 を得た。さらに、着花促進のために複数の F1 実生苗から得た接ぎ穂を古株の台木に接ぎ、翌年に着花した 2 個体を用いて、自家受精と他家受精により各々に由来する F2 世代も獲得した。CAD 遺伝子座の遺伝子型は赤材桑が変異型ホモ型 *cad/cad* であり、国桑第 21 号は正常ホモ型 *CAD/CAD* である。従って、F1 世代は全てヘテロ型 *CAD/cad* であり、それらを掛け合わせた F2 は三つの異なる遺伝子型 (*CAD/CAD*, *CAD/cad*, *cad/cad*) の個体が混在することになる。

上記で得られた F1 および F2 の実生苗を温室内の鉢で育て形態を観察したが、数か月間の栽培期間においては、他の植物種の CAD 遺伝子欠損変異体や赤材桑と同様に枝条が下垂する形態を示す個体は確認できなかった。F2 世代については CAD 遺伝子座の遺伝子型が異なるため、材色を指標にした表現型と遺伝子型の関係を確認した。自家、および他家受精に由来する 2 系統についてこれらを確認したが、材色についてはいずれの系統も予想どおり赤色と普通色 (普通の木材色) が約 3 : 1 に分離した。また、各々の材色を示す個体の遺伝子型を調べたところ、赤い材を持つものは CAD 遺伝子が全て変異型ホモであり、普通色の材を示すものは、正常型 CAD をホモ、またはヘテロで持っていた。以上の結果から、枝条が下垂する形態と CAD 遺伝子座の遺伝子型の間に関係を見出すことはできなかった。ただし、上記は F2 世代を約 2 か月間調べた結果に基づくものであり、最終的な結論を得るには、更に栽培期間を延ばして個体の形態を確認する必要がある。



図 3. 赤材桑と国桑第21号から得られたF2個体
(左) CAD遺伝子がホモで変異した個体
(右) CAD遺伝子の片方が変異したヘテロ個体
いずれの個体の茎も下垂せず、直立している。

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 -
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 -
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 -
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 Hana Hachisuka, Sakiko Fukuda, Mizuki Iwase, Shinta Inagaki, Hirokazu Tomiyama, Hisato Okuizumi, Akio Koyama, Shinya Kajita	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
--

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	笠原 博幸 (Kasahara Hiroyuki) (00342767)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	

6. 研究組織（つづき）

	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	堀川 祥生 (Horikawa Yoshiki) (90637711)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授 (12605)	

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			
米国	University of Wisconsin, Madison			
ベルギー	University of Gent			