

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20248018

研究課題名(和文)

スギ分子育種に向けたノルリグナン生合成の生化学的・分子生物学的検討

研究課題名(英文) Biochemical and molecular biological studies on the norlignan biosynthesis for molecular breeding of Japanese cedar *Cryptomeria japonica*

研究代表者

今井 貴規 (IMAI TAKANORI)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：20252281

研究分野：樹木生理化学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：ノルリグナン、生合成、酵素、遺伝子、心材形成、アガサレジノール、セクイリン C、スギ

### 1. 研究計画の概要

植物二次代謝産物の分類の一つであるノルリグナンに関して、その生合成はほとんど知られていない。ノルリグナンは樹木の材部に存在することが多く、強固な細胞壁に囲まれまた死滅した細胞からなる樹木・木材を生化学・分子生物学実験の材料とすることは極めて不利であり、このことがノルリグナン生合成の研究を停滞させている最大の理由であろう。本研究では、ノルリグナンを主要な二次代謝物として生産する樹木(主にスギ)材部を実験試料とし、ノルリグナン生合成に関わる酵素活性の検出、酵素の精製・特徴付けなどの生化学実験とともに、分子生物学的アプローチによりノルリグナン生合成関連遺伝子の特定などにも取り組む。また、スギ材色は材中のノルリグナンに左右されるとされるため、ノルリグナン生合成の基礎的知見に基づいた、材色優良スギ生産に向けた分子育種の道筋の提案を目指す。

### 2. 研究の進捗状況

(1)スギ材を試料としてノルリグナンアガサレジノールからセクイリンCへの転換酵素(AGTH)活性を見だし、本酵素が要求する補因子等の特徴付けを達成した。本転換はノルリグナン生合成経路の一部としての初提唱である。

(2)セクイリンCはスギ材色発現と深く関連するとされている。193スギクローン、36スギ品種におけるアガサレジノールとセクイリンCの含有量・量比(ノルリグナン形質)を統計解析した。その結果、本形質にクローン間・品種間差が認められ、特にセクイリンC量・割合の遺伝率が高く、AGTHの高度な遺伝的制御が示唆された。またノルリグナン形質は他形質(樹高など)と関連しないこと、その産

地差がないこと、さらに人工交配スギ家系実験によりセクイリンCが生合成・蓄積後に著しく二次的变化をすることが見いだされた。以上の結果より、AGTH改変がスギ分子育種に向けた取組の一つとなり得ることが示唆された。

(3)ノルリグナン形質と材色との関連調査の結果、これらの間に明確な相関は認められなかった。したがって、スギ種類によりノルリグナンを着色物質へと変化させる能力に違いがあることが示唆された。

(4)スギノルリグナン着色機構としてその酵素酸化を想定した。まず、スギ材中にノルリグナンを着色させる酵素活性を見いだした。酵素反応によりセクイリンCが著しく着色し、またアガサレジノールの重合が確認される一方、セクイリンCの重合は明瞭ではなかった。したがって、スギ材色発現機構として、酵素反応によるノルリグナンの酸化重合ならびに着色構造への変化を提唱した。

(5)スギ移行材(ノルリグナン生合成部位)で発現している遺伝子のクローニング・塩基配列解読・機能解析を行った結果、乾燥等ストレスへの適応関連遺伝子、呼吸系一次代謝関連遺伝子が確認された。したがって、スギノルリグナン生合成誘導要因として、乾燥・細胞死の関わりが分子生物学的に示唆された。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している

AGTHの生化学的特徴付けは、ほぼ予定どおりの進展と言える。AGTHによるアガサレジノールからセクイリンCへの転換に関して、InTech出版予定著書"Phytochemicals"への寄稿が求められている。

林木育種専門研究機関(森林総合研究所林木育種センター)・専門家との連携が早期に構

築され、その結果遺伝的背景が明確なクローン・品種を用いた実験が可能となり、生合成調査に基づいた育種法の提案に向けて当初の予定(研究機関後半)以上に進展している。

分子生物学実験においては、ノルリグナン生合成誘導要因遺伝子のクローニングに加え、3種類のスギフェニルアラニンアンモニリアーゼ(PAL,ノルリグナン生合成上流関連酵素)遺伝子の全長塩基配列の解読を達成し、当初予定されていなかった新しい展開を迎えている。一方で、樹木材部遺伝子の抽出等に依然として困難が残り、ノルリグナン生合成遺伝子のクローニング等には長期的に取り組む必要がある。

#### 4. 今後の研究の推進方策

ノルリグナン形成とスギ育種との関わりとして、ノルリグナン生合成からさらにその後のノルリグナンの酵素酸化による二次変化までを含めて統括的に検討する必要があると考えるに至った。今後、PAL・AGTH等ノルリグナン生合成関連酵素の生化学的調査を進めると共に、ノルリグナン酵素酸化物の化学構造、酸化物と色調との関連、スギクローン・品種を用いたノルリグナン酸化酵素活性などの調査に取り組む。また、これまでに乾燥等ストレスへの適応関連遺伝子・呼吸系一次代謝関連遺伝子を特定したと同様の手順(ディファレンシャルディスプレイ法)により、ノルリグナン生合成材部位において発現している遺伝子の網羅的な解析を進める。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 9 件)

①心材成分の堆積、今井貴規、日本木材学会組織と材質研究会秋のシンポジウムー心材の形成ー要旨集、13-24 (2010) 査読無し

②Naphthalene derivatives from *Diospyros kaki*. Y. Matsushita, I.-C. Jang, T. Imai, K. Fukushima, S.-C. Lee, *Journal of Wood Science*, **56**, 418-421 (2010). 査読有り

③In vitro hydroxylation of a norlignan: from agatharesinol to sequirin C and metasequirin C with a microsomal preparation from *Cryptomeria japonica*. T. Imai, K. Asai, M. Takino, K. Fukushima, *Phytochemistry Letters*, **2**, 196-200 (2009). 査読有り

④Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaeacourbaril*, and *Astronium lecointei* and their antioxidant activities. T. Imai, S. Inoue, N. Ohdaira, R. Suzuki, Y. Matsushita, M. Sakurai, J. M. Henriques, S. K. Ozaki, Z. Finger, K. Fukushima, *Journal of Wood Science*, **54**, 471-475 (2008).

査読有り

[学会発表] (計 18 件)

①今井貴規、心材成分の堆積、日本木材学会組織と材質研究会秋のシンポジウムー、2010/9/13、名古屋大学、招待講演

②坂本和之、スギ心材ノルリグナンの心材色発現への関わり、日本木材学会大会、2011/3/18、京都大学農学部

③尾頭信昌、フルダイアレル交配家系を用いたスギ心材ノルリグナンの遺伝性の評価、日本木材学会大会、2011/3/18、京都大学農学部

④中根麻衣、スギ移行材で発現している遺伝子の調査 2、日本木材学会大会、2010/3/17、宮崎観光ホテル

⑤浅井賢介、スギ心材成分ノルリグナンアガサレジノールからセクイリン C/メタセクイリン C への酵素的酸化、日本木材学会中部支部大会、2008/11/13、大垣フォーラムホテル

[図書] (計 1 件)

今井貴規、海青社、「木質の形成」ーバイオマス科学への招待、福島ら編、印刷中

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]