

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03046

研究課題名(和文) 万能ペルオキシダーゼCWPO-Cの植物ホルモン不活性化による生長・分化制御

研究課題名(英文) An all-round peroxidase, CWPO-C, regulates plant growth through the auxin catabolism

研究代表者

堤 祐司 (Tsutsumi, Yuji)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：30236921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：万能ペルオキシダーゼCWPO-Cのシロイヌナズナ過剰発現体(OE)は成長が顕著に抑制され、重力屈性反応も遅延した。OE体の内生IAAはWTの1/10に減少した。リコンビナントCWPO-Cはin vitroにおいてIAAをホルモン活性を持たない代謝物に変換した。一方、ポプラのCWPO-C過剰発現体は成長抑制効果を示さず、内生IAA量に変化は認められなかったことから、木本と草本ではペルオキシダーゼによるIAA不活性化に対する恒常性維持機能が異なると予想された。ポプラCWPO-C抑制体はリグニン含有量が減少し、-0-4結合割合が著しく増加したことから、CWPO-Cは木化に関わることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象とするCWPO-Cは様々な基質を酸化可能という、ユニークな万能ペルオキシダーゼである。CWPO-Cは成長旺盛な部位に多く発現し、成長ホルモンであるIAAを代謝不活化することにより、植物の成長に対して負の制御を行うこと、ならびに木部細胞分化とリグニン形成に重要な役割を果たしていることが示された。植物に多数のペルオキシダーゼ遺伝子が存在しそれらの個々の機能は不明であったが、今回特定のペルオキシダーゼが成長および木化の制御を行う事は、ペルオキシダーゼの生理機能同定に関する新規な発見である。また、植物の成長をコントロールするツールとしてのペルオキシダーゼ遺伝子制御も期待される。

研究成果の概要(英文)：An all-round peroxidase, CWPO-C, has a unique oxidation ability. Compared with wild-type, transgenic Arabidopsis overexpressing CWPO-C (OE) showed shorter stems. Also, The time needed for OE plants standing up from horizontally to vertical was almost double of wild-type during the gravitropic response. Moreover, IAA content was significantly lower in the OE plants than in the wild-type. These results strongly suggest that CWPO-C has pleiotropic effects on plant growth and IAA accumulation.

Unlike Arabidopsis OE, the transgenic poplars with over-expression of CWPO-C (OE) did not show remarkable differences of plant growth, gravitropism bending time, and lignin content. On the other hand, transgenic poplars with CWPO-C suppression, showed the reduced lignin content approximately 45% and the increased -0-4 linkages. These results strongly suggest that CWPO-C plays a role in differentiation and early growth, as well as in lignin polymerization.

研究分野：木質化学

キーワード：ペルオキシダーゼ CWPO-C 成長制御 木化制御 木部細胞分化 重力応答屈性 オーキシシン 異化反応

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物バイオマス、特に木質バイオマスの有効利用はエネルギー、CO<sub>2</sub>問題を解決するための最も重要な突破口になり得ると期待されている。細胞壁の主成分の一つであるリグニンの量や質の制御は、木質資源を効率よく利用する手段の一つである。植物中のリグニンの低減は、バイオエタノールやパルプの生産性の向上、飼料の易消化性に有効である。樹木細胞壁でのリグニンの生合成過程は、「リグニンモノマーの生合成」と「ポリマーの形成」の2つに大別できる。近年の研究により、リグニンモノマーの生合成経路が解明される一方で、リグニンポリマーの形成過程(重合反応)は植物ペルオキシダーゼ(Prx)により触媒されると考えられてきたものの、数多くのPrxの中でどのPrxがリグニンポリマーの形成に関わるかはほとんど解明されていなかった。研究代表者はこれまでの研究によってリグニンの生合成に関与すると考えられる万能ペルオキシダーゼアイソザイムCWPO-Cを発見した。さらに、シロイヌナズナのPrxノックアウト変異体を解析し、全73個の植物Prxのうち、3つのCWPO-Cホモログ遺伝子(*AtPrx2*, *AtPrx25*, *AtPrx7D*)を重複ノックアウトした変異体を解析した結果、(1)植物体の矮化は観察されず、正常に生長し、(2)茎のリグニン量が約25%減少し、さらに(3)非縮合( $\beta$ -O-4結合)型リグニンがおおよそ2倍に増加した。これらの結果は、CWPO-Cとそのオーソログがこれまで未解明であった、リグニンポリマーの形成過程(重合反応)を触媒するペルオキシダーゼであること強く示唆するとともに、植物バイオマスをセルロース源として利用する際に、重合酵素の発現抑制を行うことでリグニン量の低減と分解除去しやすい結合様式を有するリグニンを含む植物資源創出にチャレンジ可能となる

### 2. 研究の目的

上記の研究結果により、万能ペルオキシダーゼCWPO-Cは植物のリグニン重合に重要な役割を有することを示唆する結果が得られたが、この仮説を直接的に証明する生理学的検証結果は得られていない。そこで本研究では、CWPO-Cの主たる生理機能を明らかにすることを目的として木本植物であるポプラとモデル植物アラビドプシスを用いて、CWPO-Cの発現解析および過剰発現体、発現抑制体の表現型解析をおこない、CWPO-Cの生理的機能を解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1)CWPO-Cの発現解析

CWPO-Cの発現局在を解析する目的で、CWPO-Cプロモーターを含むCWPO-Cの上流1,855 bpに $\beta$ -glucuronidase (GUS)を連結したコンストラクトを作成し、アラビドプシスならびにポプラに形質転換した。得られた形質転換体を所定期間生育させた後、定法に従いX-galを基質として染色を行った。また、CWPO-CはポプラPrxであるため、野生型ポプラにおけるCWPO-Cの器官別および組織別発現解析をリアルタイムPCRで行った。詳細な組織別発現解析では、レーザーマイクロダイセクションにより標的組織を採取後、リアルタイムPCRに供した。

#### (2)CWPO-C過剰発現体およびRNAi発現抑制体の作製

35SプロモーターにCWPO-C完全長cDNAを連結した過剰発現コンストラクトを作成した。また、RNAi発現抑制コンストラクトは、CWPO-C ORF内の432 bp hairpin-cassetteを作成し35Sプロモーターの下流に連結した。過剰発現コンストラクトはアラビドプシスおよびポプラに導入して過剰発現形質転換体を作製した。RNAi発現抑制形質転換体はポプラで作製した。

#### (3)形質転換体の表現型解析

a)成長および巨視的表現型観察：生育期間中経時的に、主茎長・太さ、葉の数・大きさ、根の長さ・本数等、巨視的な形態を観察した。

b)主茎の顕微組織解析：所定期間生育した植物体より主茎を採取し、基部から顕微鏡観察用切片を作製した。染色にはトルイジンブルー、フロログルシン染色、モイレ染色を用いた。

c)リグニン分析：所定期間生育させた植物体の主茎を採取し、アセチルブロマイド法を用いてリグニン含有量を算出した。また、derivatization followed by reductive cleavage(DFRC)法とGC-MSを用いてリグニン中の $\beta$ -O-4構造量を分析した。

(4)重力応答屈性時間の評価：所定期間育成した植物体を水平に設置し、ビデオを用いて植物体を録画した。録画データから茎が垂直に起き上がるまでに要した時間を測定した。

(5)内生IAAの定量：所定期間育成した植物体の茎を用いて、既存の方法に従い抽出、前処理後LC/MSによる定量を行った。

(6)リコンビナントCWPO-CによるIAAのin vitro変換と変換生成物の同定ならびにオーキシン活性評価：大腸菌を用いて異種発現したリコンビナントCWPO-CをH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下でIAAと反応させて経時的に定量を行った。また、スケールアップした反応系から、2種の主要変換生成物を、クロマトグラフィーを用いて単離し、LC/MS分析とNMR分析により構造を決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *CWPO-C* の発現解析

*CWPO-C* プロモーター-GUS を導入したポプラおよびアラビドプシスの GUS 染色される部位は大変類似しており、発現が明瞭に確認された共通の部位は(i)主茎の頂芽を含む先端部位、(ii)葉特に若い葉の先端と葉の鋸歯を含む周囲、(iii)葉脈、(iv)茎の基部と根の境目であった (図1)。ポプラの場合若い葉柄でも発現していた。ポプラ、アラビドプシスともに主茎の先端部から中間部になると青色の GUS 染色は消失していた。両植物種において、若く成長が旺盛な部位で共通に発現していることから、ポプラ頂芽における詳細な組織別の発現解析を、レーザーマイクロダイセクションとリアルタイム PCR 定量を組み合わせで解析した。その結果、図2に示すように、メリステムを含む先端組織で強く発現する一方、形成層や形成層外側の厚角組織では発現が弱いことが確認された。若く成長が旺盛な頂芽部分や葉の周囲組織、特に排水組織を含む鋸歯部分で *CWPO-C* の強い発現が確認されたことから、*CWPO-C* は植物の成長に強く関与している可能性が示唆された。この推定を確認するために、ポプラの主茎先端部を切除することにより、腋芽の発生を誘導した結果、新たに誘導された腋芽が強く染色されたこと、また、ポプラカルスから誘導された不定芽も強く染色されたことも、先の推定を支持した。

##### (2) *CWPO-C* 過剰発現体および RNAi 発現抑制体の表現型解析

ポプラでは *CWPO-C* 過剰発現体および RNAi 発現抑制体を作製し、アラビドプシスでは *CWPO-C* 過剰発現体を作製して表現型を解析した結果、両植物体の表現型に大きな違いが見られたため、植物種別に記載する。

a) アラビドプシス過剰発現体の巨視的表現型：作製した形質転換体はリアルタイム PCR ならびに *CWPO-C* 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより過剰発現体であることを確認した。過剰発現体は、発現された *CWPO-C* タンパク量に対応して成長抑制が現れ、最も発現量が多かった OE11 ラインは矮化した。OE11 ラインから得られる後代の植物体には約 60% の割合で植物体の先端が屈曲する個体が現れた。若く成長が旺盛な頂芽部分や葉の周囲組織、特に排水組織を含む鋸歯部分はオーキシンの生合成場であり、高濃度のオーキシンが存在することが知られている。すなわち、*CWPO-C* 発現部位はオーキシン局在部位と非常によく一致し、かつ過剰に発現した *CWPO-C* は成長を阻害した。以上の実験結果から、*CWPO-C* はオーキシン濃度の高い部位において、オーキシンを代謝不活化し、植物の成長に対して抑制的な制御を行っていることが推定された。この仮説を検証するために、重力屈性試験を行った。重力屈性は植物が重力方向に対して体の傾きを認識して行う姿勢制御運動であり、傾斜によって生じるオーキシン偏差分布により生じることがよく知られている。本研究では、4 週齢のアラビドプシス植物体を水平に設置してから、垂直に起き上がるまでの時間を計測した結果、過剰発現体は立ち上がるまでに野生型の約 2 倍の時間を要した (表1)。*CWPO-C* の過剰発現により屈性応答は遅延し、さらに屈性試験時に希薄濃度 (ラノリン中濃度 0.01%) の IAA を塗布すると、屈曲時間の遅延が回復した。以上の結果は先の仮説を強く支持する結果である。

b) ポプラ過剰発現体の巨視的表現型：ポプラ過剰発現体の主茎長は若干ではあるが野生型より有意に大きく、シロイヌナズナ過剰発現体とは全く異なる結果となった。次いで、重力屈性試験を行った結果、シロイヌナズナで確認された屈曲時間の遅延は生じず、むしろ短縮された。また、RNAi による発現抑制体でも野生型との特筆すべき違いは認められなかった。*CWPO-C* 発現解析ではポプラおよびシロイヌナズナにおける発現部位は、頂芽を含む若く成長旺盛な部位、葉の周囲と排水組織、木部など、非常に類似しており、かつ高濃度のオーキシン局在部位と一致していた。一方で、*CWPO-C* がポプラの生長制御機能を有する可能性を支持する巨視的表現型は得られなかった。

##### (3) リコンビナント *CWPO-C* による IAA の代謝変換と内生 IAA の定量

大腸菌で異種発現したリコンビナント *CWPO-C* による IAA の *in vitro* 変換反応を行った。IAA は *CWPO-C* によって速やかに 3-ヒドロキシメチルオキシインドール(HMO)に変換され、反応系内において HMO は 3-メチレンオキシインドール(MO)に変換された (図3)。HMO から MO への変換は *CWPO-C* は関与せず、過酸化水素によって変換されること、MO は安定な化合物で、*CWPO-C* および過酸化水素ではほとんど代謝されないことも明らかとなった。

IAA 代謝物のオーキシン活性を調べるために、シロイヌナズナ野生型および *CWPO-C* 過剰発現体に希薄濃度 (ラノリン中濃度 0.01%) の IAA あるいは代謝物を塗布して重力屈性試験を行った。試験結果の要約はいかのとおりであり、野生型において IAA 塗布は屈曲時間を明瞭に短縮させたが、代謝物 HMO および MO の塗布では時間短縮効果は現れなかった。過剰発現体では IAA 塗布による時間短縮効果は小さく、HMO および MO の塗布による短縮効果はなかった。以上の結果を受けて、シロイヌナズナ (野生型、過剰発現体) およびポプラ (野生型、過剰発現体、発現抑制体) の主茎を採取し、その内生 IAA の定量を試みた。シロイヌナズナ過剰発現体の IAA 量は野生型の約 1/10 に減少していた (図4)。ポプラの内生 IAA 量はシロイヌナズナに比べて、非常に少なかったため、繰り返し 3 回の測定において再現性のある定量値を得ることができなかったが、シロイヌナズナ過剰発現体で確認された様な過剰発現体の内生 IAA が顕著に少ない傾向は認められなかった。

#### (4)主茎の顕微鏡的解析およびリグニン分析

a)主茎の顕微鏡的解析:シロイヌナズナ過剰発現体と野生型の主茎基部より調製した切片をフロログルシン染色して観察した結果、両者を区別しうる違いはなく木部形成やリグニン形成に過剰発現の影響は現れなかった。ポプラ形質転換体(過剰発現および発現抑制)についても同様の比較を行った結果、過剰発現体に関しては特筆すべき違いは観察されなかった。一方で、RNAi発現抑制体では、フロログルシンで染色される木部組織では、i)部分的な木部形成が著しく抑制され、木部の分布が不均一となり、ii)全体的な木部形成の不均一な抑制結果として主茎横断面面積に占める木部面積の割合が約1/2に減少した(図5)。

b)ポプラ形質転換体のリグニン分析:ポプラ発現抑制においては木部組織の明瞭な変化が認められたことから、リグニン定量ならびにDFRC分析によるリグニン構造解析を行った。発現抑制体のリグニン含有量は45%減少した一方で、過剰発現体のリグニン含有量に違いは認められず、この結果は、フロログルシン染色後の主茎横断面切片観察結果と一致した。次いで、DFRC分析によりリグニン中の $\beta$ -O-4結合量を比較した結果、発現抑制体のリグニン当たり $\beta$ -O-4結合量は野生型の約1.6倍に増加した。過剰発現体では有意な差異は確認されなかった。すなわちCWPO-Cの発現抑制はポプラの木部形成を抑制し、木化細胞数の減少を引き起こした。結果として主茎のリグニン含有量は低下する一方で、リグニン当たりの $\beta$ -O-4結合量は増加した(表2)。CWPO-Cの発現抑制により、リグニンモノマーの重合速度が減少したため、リグニン重合過程におけるエンドワイス型のリグニン高分子化が起きやすくなった結果、 $\beta$ -O-4結合量が増加したと予想される。

#### (5)まとめ

草本植物シロイヌナズナおよび木本植物ポプラを用いて、CWPO-Cの生理的機解明を行った。CWPO-Cは頂芽を含む若く成長旺盛な部位、葉の周囲と排水組織、木部など、非常に類似しており、かつ高濃度のオーキシシン局在部位と一致していた。シロイヌナズナ過剰発現体は矮化し、重力屈性応答が著しく遅延したが、この遅延は主茎へのIAA塗布で回復可能であった。シロイヌナズナ過剰発現体の内生IAAは約1/10に減少した。リコンビナントCWPO-Cはin vitroにおいて、IAAをオーキシシン活性を持たない化合物に変換することから、CWPO-CはIAA濃度が高く成長旺盛な部位においてIAAの代謝不活化反応を介して負の成長制御を行っている、と結論した。ポプラにおいてCWPO-Cの発現部位はシロイヌナズナのそれと同じであったものの、過剰発現体の表現型は全く異なっていた。この原因として、以下のことが考えられる。i)CWPO-Cはポプラペルオキシダーゼ遺伝子であるため、CWPO-Cの発現異常と引く続くIAA濃度変化に対しては強い恒常性維持機能が働いたが、シロイヌナズナではポプラ由来CWPO-C導入による変化に対する修復が機能しなかったため、明瞭な表現型が現れた。ii)ポプラの内生IAA量はシロイヌナズナより非常に少ないため、両植物体でIAAに対する生理応答濃度が異なった。ポプラとシロイヌナズナともに、CWPO-Cは木部でも発現していた。両植物体の過剰発現は、木部の形成ならびにリグニンの蓄積には影響を与えなかったが、ポプラの発現抑制体では木部形成の抑制による木部細胞の減少とリグニン量の減少、ならびにリグニンの構造変化をもたらした。すなわち、本研究の成果によって、CWPO-Cは頂芽等の若く成長旺盛な高濃度のオーキシシン局在部位においてIAAの代謝不活化反応を介して負の成長制御を行い、木部では木部形成(木部細胞分化とリグニン蓄積)に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、CWPO-Cに代表される万能ペルオキシダーゼの抑制によって、リグニン量の低減と分解除去しやすい結合様式を有するリグニンを含む木本植物資源創出が可能であることが示された

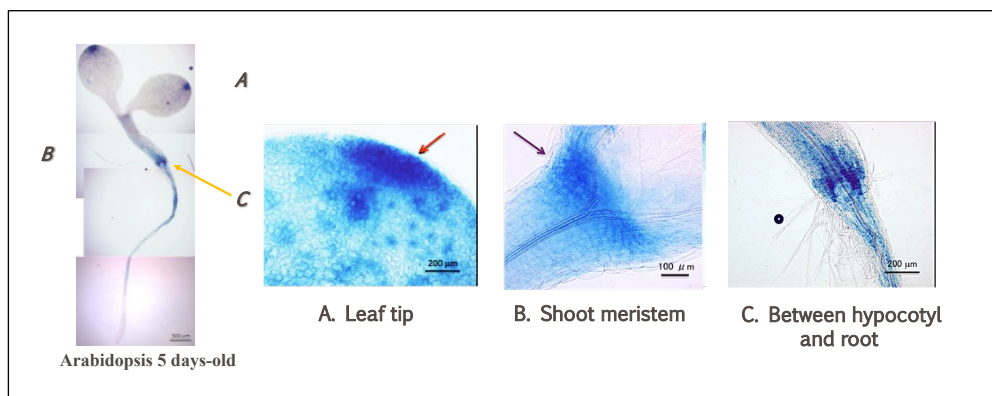


図1 シロイヌナズナにおけるCWPO-C発現解析

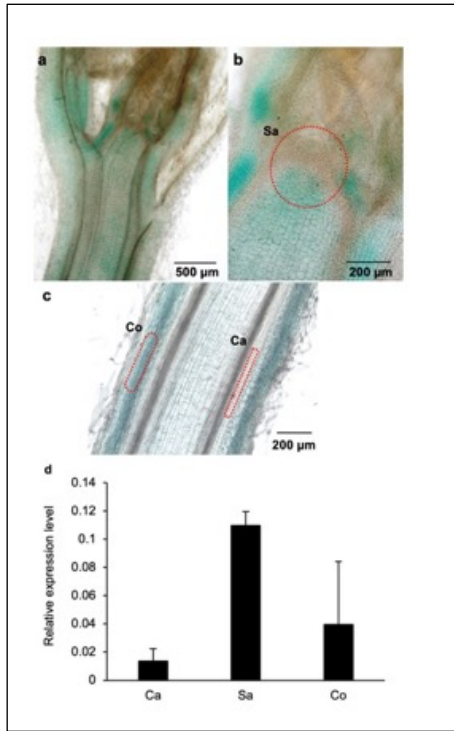


図2 (左) ポプラ頂芽における *CWPO-C* 発現解析  
 上段：ポプラメリステム周辺の発現解析  
 中斷：メリステム直下主茎の発現解析  
 赤線で囲んだ部位はレーザーマイクロダイセクションで採取した組織；Sa：メリステム、Ca：形成層、Co：厚角組織  
 下段：詳細組織における *CWPO-C* の相対発現量

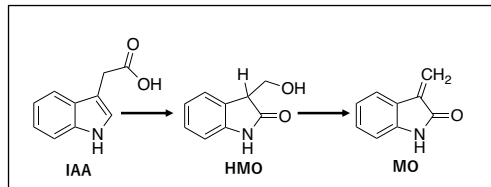


図3 *CWPO-C* による IAA 代謝物

表1 重力屈性時間

	屈性時間(分)
野生型	86 ± 4.1
過剰発現体	150 ± 3.5

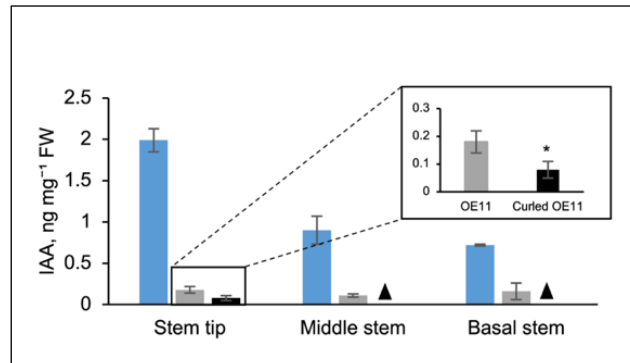


図4 シロイヌナズナの内生 IAA 量  
 青：野生型、グレー：過剰発現体 OE11、黒：過剰発現体のうち屈曲する固体

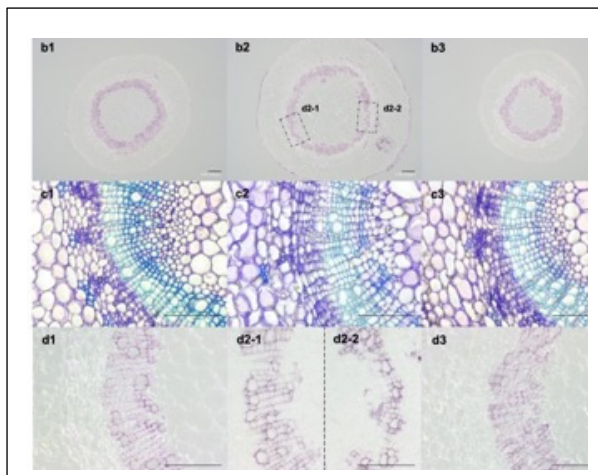


図5 (左) ポプラ主茎横断面図  
 上段、下段：横断面のフロログルシン染色  
 下段は上段の拡大図、発現抑制体は木部組織が付近一なため、2カ所を拡大した  
 中段：横断面のトルイジンブルー染色  
 左列：野生型、中列：発現抑制体、右列：過剰発現体

表2 ポプラ形質転換体のリグニン量と DFRC 分解生成物

	Lignin (%)	μmol S/g lignin	μmol G/g lignin	S/G	μmol (S+G)/g lignin
野生型	9.2 ± 0.8	61 ± 20	428 ± 40	0,14 ± 0,03	489 ± 60
発現抑制体	5.1 ± 0.6**	51 ± 14	717 ± 81**	0,07 ± 0,01*	768 ± 93**
過剰発現体	8.8 ± 0.9	45 ± 14	381 ± 74	0,12 ± 0,03	426 ± 84

(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Diego Alonso Yoshikay Benitez, Yusuke Yokoyama, Kaori Ohira, Koki Fujita, Azusa Tomiie, Yoshio Kijidani, Jun Shigeto, Yuji Tsutsumi	4. 巻 28
2. 論文標題 Populus alba cationic cell wall bound peroxidase (CWPO C) regulates the plant growth and affects auxin concentration in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physiology and Molecular Biology of Plants	6. 最初と最後の頁 1671-1680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12298-022-01259-4	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 Diego Alonso Yoshikay Benitez, Kaori Ohira, Kasturi Banerjee, Koki Fujita, Jun Shigeto, Yuji Tsutsumi	4. 巻 69
2. 論文標題 The Populus alba cationic cell wall bound peroxidase (CWPO C) regulates plant growth, lignin content and composition in poplar	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Wood Science	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s10086-023-02086-1	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田 宗史朗、坂井 志帆、松井 祐里、横山 裕亮、Diego Yoshikay、藤田 弘毅、重藤 潤、堤 祐司
2. 発表標題 CWPO-CおよびそのオーソログAtPrx71によるオーキシン不活性化を介した成長抑制機能の検討
3. 学会等名 第67回リグニン討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田 宗史朗、山本 怜奈、重藤 潤、坂井 志帆、松井 友里、藤田 弘毅、堤 祐司
2. 発表標題 CWPO-CオーソログであるAtPrx2、AtPrx25、AtPrx71をノックアウトしたシロイヌナズナ欠損体の成長とその制御作用
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Diego Yoshikay1, Kaori Ohira, Koki Fujita, Jun Shigeto, Yuji Tsutsumi
2. 発表標題 The cationic cell-wall-bound peroxidase (CWPO-C) involved in plant growth and lignification in Poplar
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松久 直文、田村 剛、川口 なつみ、藤田 弘毅、堤 祐司
2. 発表標題 rCWPO-Cを用いた人工細胞壁形成におけるシリリングル型モノリグノールの重合と凝集形態解析
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Diego Alonso Yoshikay-Benitez1, Yusuke Yokoyama, Kaori Ohira, Koki Fujita, Azusa Tomiie, Yoshio Kijidani, Yuji Tsutsumi
2. 発表標題 Indole-3-acetic acid (IAA) auxin catabolized by Class III CWPO-C peroxidase
3. 学会等名 第28回日本木材学会九州支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田 宗史朗, 藤田 弘毅, 堤 祐司, 雉子谷 佳男
2. 発表標題 CWPO-C による IAA 代謝を介した植物の成長制御
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	雉子谷 佳男  (Kijidani Yoshio)  (10295199)	宮崎大学・農学部・教授   (17601)	
研究 分担者	藤田 弘毅  (Fujita Koki)  (90264100)	九州大学・農学研究院・助教   (17102)	

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
---------	---------