

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380110

研究課題名（和文）モノリグノール類の輸送と重合を担うタンパク質

研究課題名（英文）Proteins involved in transport and polymerization of monolignols

研究代表者

高部 圭司（TAKABE KEIJI）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70183449

研究成果の概要（和文）：二次壁形成初期には、モノリグノール配糖体の一種であるコニフェリンが ATP 依存的に液胞中に活発に取り込まれ、細胞壁の木化が活発な段階になると液胞中から徐々に消失して行くことが明らかになった。モノリグノール類の輸送に関わるタンパク質の候補遺伝子に T-DNA が挿入されたシロイヌナズナを調べると、シリングルリグニンの呈色反応であるモイレ反応で弱く呈色し、化学分析によりシリングルリグニン量が少ない変異株が 1 つ見つかった。

研究成果の概要（英文）： Coniferin was actively transported into vacuole in the presence of ATP in early stage of secondary wall formation in poplar and Japanese cypress. Coniferin accumulated in vacuole gradually decreased in later stage of secondary wall formation. We collected the *Arabidopsis* seeds in which T-DNA was inserted to the candidate gene involved in monolignol transportation, and grew them for 10 to 12 weeks. Then we investigated the lignin distribution in interfascicular fibers of stalk. One of the transformants showed low syringyl lignin content in the secondary wall of interfascicular fibers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2010 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：分化中木部、細胞壁、モノリグノール、膜輸送、コニフェリン、木化、シリングルリグニン、T-DNA

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁の木化は、①細胞内でのモノリグノール類の生合成、②モノリグノール類の細胞壁への輸送、③細胞壁でのモノリグノール類の脱水素重合による高分子化、の3段階

で進行する。

①のモノリグノール生合成に関しては、主に申請者らの研究により、モノリグノール中間代謝物が細胞質ゾルと細胞小器官の膜上を行き来して合成されることが明らかにな

っている。また、③のモノリグノールの重合に関与すると思われる酸性ペルオキシダーゼは、二次壁形成中の細胞の細胞膜上に存在することも明らかになった。

一方、②のモノリグノール輸送に関する研究は皆無であった。そこで、本研究では細胞膜上にモノリグノール輸送に関与するタンパク質が存在するものと考え、細胞膜を単離して輸送活性を調べるとともに、そのタンパク質合成をコードする遺伝子を調べることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では以下の3点を研究目的とした。

(1) モノリグノール類やモノリグノール配糖体の輸送に関わるタンパク質（以下モノリグノールトランスポーターと略記）の同定と細胞内での局在を明らかにする。

(2) モノリグノールトランスポーターの遺伝子を単離し同定する。

(3) モノリグノール類の重合に関与する酵素を特定する。

3. 研究の方法

(1) 成長の盛んなポプラとヒノキの樹皮を剥ぎ、分化中木部をかき取った。軽くホモジナイズした後、細胞壁残渣をろ過して分けとり、ろ液より超遠心機を用いてミクロソーム膜画分を得た。ミクロソーム膜画分に、モノリグノールのコニフェリルアルコール、シナピルアルコール、コニフェリルアルデヒド、シナップアルデヒド、ならびにモノリグノール配糖体のコニフェリン、シリンジンを投与して、ATPの存在下、非存在下でそれらのミクロソーム膜画分への取込みを調べた。

(2) 精密ショ糖密度勾配遠心法により、ポプラやヒノキのミクロソーム膜画分より細胞小器官膜を単離した。各小器官由来の膜画分にモノリグノール類、ならびにモノリグノール配糖体を投与し、膜画分への取込みを調べた。

(3) シロイヌナズナ共発現解析データベースを用い、モノリグノール生合成関連遺伝子と共発現している膜輸送関連遺伝子群を絞り込み、モノリグノールトランスポーター候補遺伝子とした。

(4) モノリグノールトランスポーター候補遺伝子にT-DNAが挿入されたシロイヌナズナを育て、細胞壁中でのリグニン分布やリグニン量の定量を行った。

(5) モノリグノール類の重合に関与すると思われる酵素の分布を、免疫電子顕微鏡法で調べた。筆者らはすでに酸性ペルオキシダーゼの分布を調べており、今回は木部で発現が報告されているラッカーゼの分布を調べた。報告されているラッカーゼのアミノ酸配列より、抗原決定基になりうる配列を選び、ペ

プチドを合成、ペプチドにヘモシアニンを結合させ抗原とした。抗原をラビットに感作し、抗血清を得た。抗血清をアフィニティ精製し実験に用いた。

ポプラ分化中木部を液化プロパンを用いて急速凍結し、バラホルムアルデヒドを含むアセトン溶液で -80°C で凍結置換固定した。固定後、試料をLR-White樹脂に包埋した。

4. 研究成果

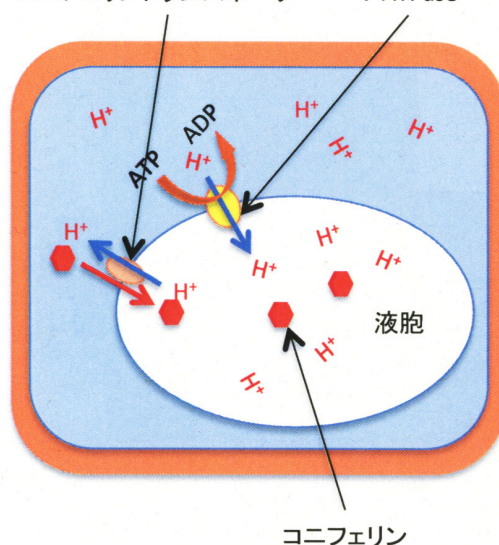
ポプラ、ヒノキの分化中木部より超遠心法によりミクロソーム膜画分を得て、モノリグノール類ならびにモノリグノール配糖体を投与したところ、コニフェリンのみがATP依存的にミクロソーム膜画分に取り込まれた。ATPの代わりにAMPを加えても、コニフェリンの取り込みは認められなかった。

ミクロソーム膜画分にABCトランスポーターの阻害剤を加えてコニフェリンの輸送を調べたところ、阻害剤の影響は全く認められなかった。一方、液胞局在性ATPaseの阻害剤を加えると、明らかにコニフェリンの取り込みは抑制された。さらに、プロトン勾配を解消する試薬を用いても、コニフェリンの輸送は阻害された。

ミクロソーム膜画分をさらに精密ショ糖密度勾配遠心法により、細胞膜に富む画分、粗面小胞体に富む画分、液胞膜に富む画分に分け、モノリグノール類やモノリグノール配糖体の取り込みを調べたところ、液胞膜に富む画分でコニフェリンがATP依存的に取り込まれることが分かった。

以上の結果より、コニフェリンを輸送するタンパク質は液胞膜上に存在し、液胞に局在するATPaseの働きによって液胞内に運搬されたプロトン液胞外に輸送する際に、液胞の外に存在していたコニフェリンを液胞内に対抗輸送するものと思われた。

コニフェリントランスポーター V-ATPase



シロイヌナズナ共発現解析データベース (CSB.DB、CoP、ACDMT) を用い、モノリグノール合成関連の遺伝子 (例えば PAL、COMT、CAD) 発現と協調発現している遺伝子群、膜輸送関連遺伝子群、膜貫通ドメインを持つ遺伝子群などを検索し、これらの中より 47 のモノリグノール輸送関連候補遺伝子に絞り込んだ。候補遺伝子に T-DNA が挿入された種子をシロイヌナズナ生物資源センターより取得して発芽させ、10~12 週間栽培した。これらの変異株より花茎を採取し、維管束や維管束間繊維のリグニン分布を調べた。その結果、シリングリグニンの呈色反応であるモイレ反応で弱く呈色する変異株が 1 つ見つかった。この変異株の花茎を化学分析に供したところ、リグニン量は野生型と同じであったが、シリングリグニン量が少なかった。

シロイヌナズナの cDNA ライブラリより候補遺伝子の cDNA を取り出して大腸菌で大量発現させ、タバコ BY-2 培養細胞で過剰発現させた。蛍光顕微鏡で候補遺伝子の発現部位を確認した所、細胞膜上での発現が明らかとなった。したがって、候補遺伝子に由来するタンパク質は、細胞膜に局在することが明らかになった。

抗ラッカーゼ抗体を用いてポプラ分化中木部を免疫標識すると、標識は分化中木部の木繊維細胞壁上に現れるとともに、放射柔細胞壁にも現れた。免疫電子顕微鏡法で観察すると、標識は主に木繊維二次壁上に認められ、放射柔細胞では protective layer 上に局在していた。

これまでの酸性ペルオキシダーゼの局在や、ラッカーゼの局在を合わせてモノリグノール類の重合について以下のように考察した。細胞膜を通過して輸送されたモノリグノール類は、酸性ペルオキシダーゼにより細胞膜近傍でラジカル化されるか、あるいはラッカーゼにより細胞壁中でラジカル化され、高分子化されるものと思われる。

放射柔細胞の protective layer に局在するラッカーゼは、傷害を受けた時に即座に反応できるように、あらかじめ protective layer に局在しているものと思われる。

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 9 件)

① Jong Sik Kim, Awano T, Yoshinaga A, Takabe K. Occurrence of xylan and mannan polysaccharides and their spatial relationship with other cell wall components in differentiating

compression wood tracheids of *Cryptomeria japonica*. *Planta*. 査読有, 233(1) 721-735 (2011)
DOI: 10.1007/s00425-010-1333-4

② Jong Sik Kim, Tatsuya Awano, Arata Yoshinaga and Keiji Takabe. Temporal and spatial diversities of the immunolabeling of mannan and xylan polysaccharides in differentiating earlywood ray cells and pits of *Cryptomeria japonica*. *Planta*, 査読有, 233, 109-122 (2011)
DOI: 10.1007/s00425-010-1283-x

③ Yamada Y, Awano T, Fujita M, Takabe K. Living wood fibers act as large-capacity "single-use" starch storage in black locust (*Robinia pseudoacacia*). *Trees-Structure and Function. Trees*. 査読有, 25(4) 607-616 (2011)
DOI: 10.1007/s00468-010-0537-3

④ Jong Sik Kim, Tatsuya Awano, Arata Yoshinaga and Keiji Takabe. Immunolocalization and structural variations of xylans in differentiating earlywood tracheid cell walls of *Cryptomeria japonica*. *Planta*, 査読有, 232, 817-824 (2010)
DOI: 10.1007/s00425-010-1225-7

⑤ Jong Sik Kim, Tatsuya Awano, Arata Yoshinaga and Keiji Takabe. Temporal and spatial immunolocalization of glucomannans in differentiating earlywood tracheid cell walls of *Cryptomeria japonica*. *Planta*, 査読有, 232, 545-554 (2010)
DOI: 10.1007/s00425-010-1189-7

⑥ Jong Sik Kim, Tatsuya Awano, Arata Yoshinaga and Keiji Takabe. Immunolocalization of β -1-4-galactan and its relationship with lignin distribution in developing compression wood of *Cryptomeria japonica*. *Planta*, 査読有, 232, 109-119 (2010)
DOI: 10.1007/s00425-010-1152-7

⑦ Yohei Morikawa, Arata Yoshinaga, Hiroshi Kamitakahara, Munehisa Wada and Keiji Takabe. Cellular distribution of coniferin in differentiating xylem of *Chamaecyparis obtusa* as revealed by Raman microscopy. *Holzforschung*, 査読有, 64, 61-67 (2010)

DOI: 10.1515/HF.2010.015

⑧ Yasuyuki Matsushita, Kazuchika Yamauchi, Keiji Takabe, Tatsuya Awano, Arata Yoshinaga, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, Takayuki Asada, Atsushi Furujo and Kazuhiko Fukushima. Enzymatic saccharification of *Eucalyptus* bark using hydrothermal pre-treatment with carbon dioxide. *Bioresource Technology*, 査読有, 101, 4936-4939 (2010) DOI: 10.1016/j.biortech.2009.09.041

⑨ Chunhua Zhang, Hisashi Abe, Yuzou Sano, Takeshi Fujiwara, Minoru Fujita and Keiji Takabe. Diffusion pathways for heartwood substances in *Acacia mangium*. *IAWA Journal*, 査読有, 30(1), 37-48 (2009)
アクセッション番号 : WOS:
000264020800004

〔学会発表〕(計 6 件)

① 津山濯、高部圭司、尾形善之、小林優、シロイヌナズナにおけるリグニン前駆物質輸送体候補 LSL1 の解析、第 62 回木材学会大会、札幌、2012 年 3 月 16 日 (口頭)

② 津山濯、高部圭司、尾形善之、シロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体を用いたリグニン前駆物質輸送体の絞り込み、第 56 回リグニン討論会、鶴岡、2011 年 9 月 15 日 (ポスター)

③ 津山濯、高部圭司、尾形善之、シロイヌナズナ共発現解析によるリグニン前駆物質輸送タンパク質の絞り込み、第 61 回本木材学会大会、京都、2011 年 3 月 19 日 (口頭)

④ Taku TSUYAMA and Keiji TAKABE, ATP dependent uptake of monolignols in microsomal membranes from several trees, 12th Cell Wall Meeting, Porto, 2010 年 7 月 (ポスター)

⑤ 津山濯、高部圭司、ヒノキ分化中木部ミクロソーム膜画分へのコニフェリルアルコールの取込み、第 60 回本木材学会大会、宮崎、2010 年 3 月 18 日 (口頭)

⑥ Taku TSUYAMA and Keiji TAKABE, ATP dependent uptake of monolignols in microsomal membranes from several trees, 7th Pacific Regional Wood Anatomy Conference, Kuala Lumpur, 2009 年 8 月 (ポスター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高部 圭司 (TAKABE KEIJI)
京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号 : 70183449

(2) 研究分担者

吉永 新 (YOSHINAGA ARATA)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号 : 60273489
栗野 達也 (AWANO TATSUYA)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号 : 40324660

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :