

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380099

研究課題名(和文)成長応力と木化の遺伝子に関する研究

研究課題名(英文)Growth stress and lignin biosynthesis gene

研究代表者

吉田 正人 (YOSHIDA, Masato)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30242845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円、(間接経費) 3,780,000円

研究成果の概要(和文)：樹木の姿勢はあて材に発生する成長応力で調整されている。しかし、木材にあて材が含まれると、割れ・反りが大きくなり、高度利用の障害となる。そこで本研究は、針葉樹のあて材がどのように形成するのかを遺伝子発現の立場から理解することを目指した。細胞壁リグニンの合成に関連する遺伝子を調べたところ、あて材が形成されるときだけに発現する遺伝子を発見し、これをCoLac1と命名した。この遺伝子はあて材の細胞壁においてリグニン増加と密接な関係にあることを明らかにした。また、次世代シーケンサであて材形成時の遺伝子発現を網羅し、あて材形成の理解を深めた。

研究成果の概要(英文)：Trees control their posture by generating the growth stress in reaction wood. Wood s containing the reaction wood increase the timber cracks and the warp disturbing a fine use of wood. This study aimed to understand the reaction wood formation from the point of view of gene expression in a conifer. In the gene involved lignin synthesis, we discover the specific gene, which is expressed only when the reaction wood is formed, and designate it CoLac1. This gene is closely related to lignin increase in cell wall of reaction wood. In addition, we reveal the global gene expression of reaction wood by using next generation sequencer.

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：あて材 成長応力 リグニン ラッカーゼ 遺伝子発現 木化

1. 研究開始当初の背景

(1) 樹木は自身の姿勢を調整するため、あて材を形成し、そこに発生する成長応力によって傾斜した幹や枝を持ち上げている。成長応力は樹木の生存に不可欠であるが、樹木を製材したときに、反りや割れ、曲がりが大きくなる障害の一因でもある。歩留まりを向上させて木材を有効に利用するためには、成長応力の発生の仕組みを理解する必要がある。

(2) あて材に発生する成長応力の大きさと、細胞壁の特徴との間には以下のような関係が、申請者らによって明らかにされてきた。広葉樹のあて材である「引張あて材」では、細胞壁二次壁中層のセルロース量が増え、引張の成長応力が増大する。針葉樹のあて材である「圧縮あて材」では、細胞壁二次壁中層のリグニン量が増え、圧縮の成長応力が増大する。つまり、発生する成長応力の大きさは、二次壁を構成するセルロース量とリグニン量によって決まっている。

(3) セルロース量やリグニン量の調整に関わっている遺伝子の中に、成長応力の大きさと相関がよいものが特定できれば、それを指標とし、成長応力が小さい個体を成長の初期に選抜することも将来は不可能ではない。成長応力の大きさを予想できる分子指標を見いだすことが求められている。

2. 研究の目的

(1) 針葉樹の圧縮あて材を対象とし、木化に関わるリグニン合成遺伝子の発現量と発生する成長応力との関係を明らかにする。

(2) 圧縮の成長応力の発生の仕組みの解明を目指しつつ、発生する成長応力が小さい個体を早期に選抜する基礎を築いていく。

ヒノキの木化に関わる遺伝子の中から、圧縮あて材を形成するときに多く発現している遺伝子を特定する。

特定した遺伝子の発現量と発生する成長応力の大きさとの関係を調べ、成長応力の大きさを説明できる遺伝子を見つけ出す。

発見した遺伝子がいつ、細胞のどの部位で発現しているのかを可視化によって明らかにする。

ツゲの木化に関わる遺伝子の中から、あて材を形成するときに多く発現している遺伝子を特定する。

特定した遺伝子の発現量と発生する成長応力の大きさとの関係を調べ、成長応力の大きさを説明できる遺伝子を見つけ出す。

発見した遺伝子がいつ、細胞のどの部位で発現しているのかを可視化によって明らかにする。

広葉樹であるツゲに圧縮の成長応力が発生する仕組みを調べる。

3. 研究の方法

(1) ヒノキの木化に関わる遺伝子発現量と成長応力の関係を明らかにする。これまでの研究から、成長応力の大きさは二次壁の木化度で決まることが分かっており、木化に関わる遺伝子と成長応力との関係を調べる。

強いあて材を形成中の木部において、木化に関わる遺伝子発現量を1つずつ検討する。発現量の定量にはリアルタイムPCRを用いて高感度検出する。

苗木の傾斜角度を5段階に設定し、5段階のあて材強度を持つ試料を生育させる。あて材の程度は組織的な特徴の数値化で定量する。

5段階のあて材に発生する成長応力を応力解放法によって測定する。

木化に関わる遺伝子発現量と成長応力の大きさとの相関分析を行い、両者の関係を調べる。

(2) 成長応力と対応のよいヒノキの木化に関わる遺伝子が、いつ、どこで発現しているかを調べる。細胞壁形成中のいつどこで遺伝子発現がみられるかを顕微鏡手法により可視化する。

解析する遺伝子発現を検出するプローブを作成する。組織や細胞観察で用いるプローブには、カスタムペプチド抗体の作成を検討する。

発見した遺伝子を失わないまま、組織切片を作成する必要がある。LR ホワイト樹脂包埋法と凍結切片法を検討する。

作成したプローブを用いて細胞内での遺伝子発現部位を可視化する。可視化には蛍光標識と金粒子標識を試みる。

(3) ツゲの木化に関わる遺伝子と成長応力の関係を明らかにする。ツゲは広葉樹であるが、針葉樹に似たあて材を形成し、針葉樹と同じ圧縮の成長応力が発生する。この特殊性を対象とすることで、木化に関わる遺伝子と圧縮の成長応力との関係を明らかにする。

ツゲの木化に関わる遺伝子を探しだし、発現量を定量する。定量にはリアルタイムPCRを用いる。

正常材から強いあて材まで5段階の試料を生育調整する。あて材の程度は組織的な特徴の数値化で行う。成長応力を応力解放法で測定する。

遺伝子発現量と成長応力とを相関解析する。

(3) ツゲの木化に関わる遺伝子の発現様式を顕微鏡手法で調べる。

プローブを作成する。
発現場所を顕微鏡観察する。
圧縮の成長応力発生の仕組みを検討する。

4. 研究成果

(1) 圧縮の成長応力は、細胞壁の木化度の上昇と非常に高い相関がある。木化に関わる遺伝子として、リグニン前駆物質の生合成に関わる酵素遺伝子およびリグニン前駆物質の酸化重合に関わる酵素遺伝子に着目し、それぞれの発現量を解析した。試料にはヒノキ苗木を準備し、人為傾斜して生育することで、弱い圧縮あて材から強い圧縮あて材までを調整できた。

圧縮あて材を形成している部位では、リグニン前駆物質の生合成に関わる遺伝子発現量は増加していた。だが、その増加は弱い圧縮あて材でも強い圧縮あて材でも、同等な増加であった。このことからリグニン前駆物質の生合成の段階では、圧縮あて材の強弱程度を調整していないことが明らかになった。

細胞壁の木化過程で、リグニン前駆物質の生合成に続いて行われる酸化重合に関わる酵素は、ペルオキシターゼとラッカーゼである。ペルオキシターゼの発現量は正常材も圧縮あて材も同等で、増加していなかった。ラッカーゼの発現量は、圧縮あて材で増加し、弱い圧縮あて材よりも強い圧縮あて材で発現量が多くなっていた。このことから、圧縮あて材の木過度の増加を最終的に調整制御しているのは、ラッカーゼであることが初めて明らかになった。

(2) ヒノキ圧縮あて材でラッカーゼに着目し、圧縮あて材で増加するラッカーゼをコードする遺伝子配列を決定した。このラッカーゼは、正常材での発現量はLife technologies社製リアルタイムPCR StepOne Plusの検出限界以下であった。したがって、この遺伝子は圧縮あて材でのみ発現し働く特異性を有していることが明らかになった。我々はこのヒノキ圧縮あて材特異遺伝子をCoLac1と命名し遺伝子データベースに登録した。

Accession number [AB762662]

(3) 弱いあて材から強いあて材までを調べたところ、CoLac1の発現量が多いほど細胞壁リグニンの量が増加していることが分かった。

圧縮あて材細胞壁の特徴のひとつは、二次壁中層外周部における過度のリグニン堆積した領域(S2L)の存在である。圧縮あて材の程度が強まるとS2L領域の半径方向幅が増加することが分かった。しかし、S2L領域の木化度は変化していないことも明らかになった。

ここにおいて、弱い圧縮あて材から強い圧縮あて材への変遷・移行において、S2Lの変化は次のようであることが示された。

最初に細胞壁のコーナー部に横断面ではブーメラン形状のS2Lが出現する。

セルコーナーのブーメラン形状のS2Lは互いに円周方向に長くなりながら、木過度を徐々に増していく。S2Lはくっつき環状のS2Lを形成する。

環状となったS2Lは木過度が頭打ちになり、その後は半径方向の幅を広げていく。

以上のS2L形成機構は、本研究が初めて示したものである。

(4) CoLac1の遺伝子配列をもとに、CoLac1ラッカーゼを認識するカスタムペプチド抗体を作成した。抗体の特異性を調べるために、圧縮あて材分化中木部から可溶性タンパク質と細胞壁結合タンパク質を抽出し、ウエスタンブロットリング法を用いた。抗体はラッカーゼ特異性を有し、CoLac1抗体が作成できた。

(5) CoLac1の発現様式を顕微鏡手法で明らかにした。作成したCoLac1抗体を使い、蛍光免疫標識法によってあて材分化中木部におけるCoLac1ラッカーゼの存在を可視化できた。形成層で細胞分裂した後、細胞体積が拡大している時期には、CoLac1は細胞同士を接着させる中間層のセルコーナー部に多く観られた。拡大を終え、細胞壁二次壁が肥厚している時期には、CoLac1は二次壁に多く観られた。

(6) あて材細胞壁におけるCoLac1の役割を検討するため、各分化段階でCoLac1の細胞内分布を調べた。二次壁の肥厚が始まる細胞では、原形質内にCoLac1の存在が多く観られるものと、細胞壁にCoLac1が多く観られるものがあった。CoLac1ラッカーゼは原形質で作られて、細胞壁へ分泌される機構が推し量ることができた。

細胞壁二次壁の肥厚が進むと、CoLac1ラッカーゼは二次壁中層の外周部に多く観られた。この領域はちょうど木過度が高いS2L領域になる場所であった。

これらから、圧縮あて材細胞壁の特徴の一つである過度に木化したS2Lの形成は、圧縮あて材特異遺伝子CoLac1が担っていること

が示された。この着想の検証が今後の課題である。

(7) 次世代シーケンサーによる遺伝子発現の網羅解析を行った。

まず、第一段階として、ヒノキ正常材、圧縮あて材の両者を含めた木部全般の遺伝子発現カタログを作成した。シーケンシングの結果、234,924,605 個のリードが得られ、40,602 個のコンティグ(平均長 529 bp)がアセンブルされた。既知タンパク質との相同性を検索したところ、54.2% (22,005 個)のコンティグがデータベース上の配列と相同性を示した。これらのコンティグのうち、19,293 個は Gene Ontology のカテゴリーによって機能分類を行うことができた。

第二段階として、正常材、圧縮あて材間の遺伝子発現を比較した。比較は、正常材、圧縮あて材の各ライブラリーに由来するリードを、アセンブルしたコンティグにマッピングすることで行った。その結果、正常材と圧縮あて材とで発現量に差の見られる遺伝子が合計 2,875 個見つかった。1,207 個は圧縮あて材で増加し、1,668 個は圧縮あて材で減少していた。この中から 30 遺伝子を選び、正常材、圧縮あて材間の転写産物量を定量 PCR によって比較すると、27 遺伝子については次世代シーケンサーで得られた結果を確認できた。次世代シーケンサーの出力結果をデータベースに登録した。

Accession number [DRA001036]

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)

Sato S, Hiraide H, Yoshida M, Yamamoto H, Changes in xylem tissue and laccase transcript abundance associated with posture recovery in *Chamaecyparis obtuse* saplings growing on an incline, *Functional Plant Biology*, 査読有, Vol.40, No.6, 2013, 637-643

DOI: 10.1071/fp12313

吉田 正人、樹木の成長と姿勢を調整する仕組み、*木材工業*、査読有、Vol.67, No.10, 2012, 426-430

<http://www.jwta.or.jp/journal.html>

[学会発表](計 8 件)

佐藤 彩織, 平出 秀人, 吉田 正人, 松尾 美幸, 山本 浩之, 井原 邦夫, 次世代シーケンサーを用いたヒノキ圧縮あて材の遺伝子発現解析, 日本木材学会大会, 2014 年 3 月 13 日, 松山, 優秀ポスター受賞

平出 秀人, 佐藤 彩織, 松尾 美幸, 吉田 正人, 山本 浩之, 圧縮あて材に

特異的なラッカーゼ CoLac1 の免疫局在性, 日本木材学会大会, 2014 年 3 月 13 日, 松山

平出 秀人, 吉田 正人, 佐藤 彩織, 山本 浩之, 細胞壁木化と遺伝子発現の季節変動, 日本木材学会大会, 2013 年 3 月 27 日, 盛岡

佐藤 彩織, 吉田 正人, 平出 秀人, 井原 邦夫, 山本 浩之, 次世代シーケンサーを用いたヒノキ圧縮あて材形成メカニズムの解明, 日本木材学会大会, 2013 年 3 月 27 日, 盛岡

吉田 正人, 生きるためのバランス戦略, 日本木材学会第 5 回木質シンポジウム(招待講演), 2012 年 6 月 9 日, 東京

平出 秀人, 吉田 正人, 大木島 敬幸, 早川 真央, 山本 浩之, 遺伝子発現から見た圧縮あて材のリグニンを増加させる仕組み, 日本木材学会大会, 2012 年 3 月 16 日, 札幌

平出 秀人, 吉田 正人, 早川 真央, 大木島 敬幸, 山本 浩之, 圧縮あて材分化特異的に働く Laccase 遺伝子:CoLac1, 日本木材学会大会, 2012 年 3 月 16 日, 札幌, 優秀ポスター受賞

早川 真央, 吉田 正人, 平出 秀人, 竹市 靖規, 山本 浩之, 広葉樹ツゲに生じる圧縮の成長応力発生機構, 日本木材学会大会, 2012 年 3 月 16 日, 札幌

[その他]

ホームページ

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~butsuri/kenkyu.html>

遺伝子データベース登録

CoLac1: Accession number [AB762662]

次世代シーケンサーからの出力データ:

Accession number [DRA001036]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 正人 (YOSHIDA, Masato)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号: 30242845

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

山本 浩之 (YAMAMOTO, Hiroyuki)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 50210555