

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850123

研究課題名(和文) リグニン形成特異的ペルオキシダーゼの反応特性と局在解析から見る細胞壁木化機構

研究課題名(英文) Elucidation of lignin polymerization mechanism from the point of view of plant peroxidase's characteristics involved in lignification

研究代表者

重藤 潤 (Shigeto, Jun)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・学術研究員

研究者番号：70570852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リグニンは植物細胞壁の主要成分の一つであり、リグニンモノマーが高度に重合した複雑な構造をもつポリマーである。リグニン生合成機構を解明するための研究が活発に行われてきた結果、リグニンモノマーの生合成過程の複雑な概観が明らかとなった。一方で、リグニンの高分子化反応は未解明であった。本研究において、高分子化反応を触媒すると考えられる酵素の活性や遺伝子発現、タンパク局在解析を試みた結果、リグニン高分子化反応を触媒するのに矛盾のない、特長のある酵素性状が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Lignin, one of the main component of vascular plant cell walls, is highly polymerized and complex aromatic heteropolymer, derived from lignin monomers. As a result of many studies on lignin biosynthesis, the basic lignin monomer biosynthesis pathway have been clarified. On the other hand, lignin polymerization mechanism was not completely explained yet. This study focused on enzymatic activity, gene expression and localization of the enzymes that are expected to catalyze the reaction of lignin polymerization. The characteristics of the enzymes we found, clearly explained the lignin polymerization mechanism.

研究分野：木質科学

キーワード：リグニン 植物ペルオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

広葉樹のリグニンには主にコニフェリルアルコール(グアイアシル型リグニン)とシナピルアルコール(シリングル型リグニン)の2つのリグニンモノマーから構成されている。リグニンモノマーの生合成機構が解明される一方、その高分子化反応は、どの酵素によってどのように進行しているのか、ほとんど明らかになっていない。

これまでに、リグニンの高分子化は植物ペルオキシダーゼ(Prx)によって酸化されたリグニンモノマーが、ラジカル重合を繰り返すことによって進行することが知られている。しかし、Prxは巨大ファミリーを形成しており、その機能、役割についての情報は非常に限られている。さらに既知の大部分のPrxがシリングル型リグニンモノマーを酸化できないという事実は、植物細胞壁におけるリグニン重合反応機構に疑問を投げかけてきた。さらにPrxがリグニンモノマーを酸化するだけでは高分子リグニンの形成は不可能であり、モノリグノールラジカルのカップリング相手となるリグニンオリゴマーやポリマーの酸化が不可欠となる。これまで、シリングル型リグニンモノマーとリグニンオリゴマーを効率よく酸化可能であることが示されたPrxは、ポプラ由来CWPO-Cのみであった。

研究代表者はシロイヌナズナノックアウト変異体の解析によって、CWPO-Cと高いアミノ酸配列類似性をもつAtPrx2、AtPrx25、AtPrx71がリグニン生合成へ関与することを発見した。これらが、CWPO-Cのような“非凡な”酸化能を持てば、Prxによるリグニンの高分子化反応の説明は可能となると考えられる。

2. 研究の目的

シロイヌナズナのリグニン生合成に関与する3つのPrx、AtPrx2、AtPrx25、AtPrx71の、グアイアシル化合物、シリングル化合物、高分子化合物に対して酸化能力をもち、リグニン高分子化酵素として矛盾のない酸化能力を持つかどうか検証を行うことによって、これまで曖昧であったリグニンの高分子化機構を明確にするとともに、CWPO-Cのような基質万能性を有するペルオキシダーゼの普遍的存在を示すことを目的とした。

さらに、遺伝子発現解析とタンパク局在解析によって、リグニン生合成における3つのペルオキシダーゼの役割の違いについて議論する。

3. 研究の方法

(1) 組換えタンパクの作製と精製

AtPrx2、AtPrx25、AtPrx71に加え、ポプラCWPO-Cと、既知の代表的なPrxの1つであるAtPrx53の計5種類の組換えタンパク(rAtPrx2、rAtPrx25、rAtPrx71、rAtPrx53、rCWPO-C)作製を試みた。大腸菌発現系によ

り作製した組換えタンパクはいずれも不活性の封入体となった。活性型へと巻き戻すため、巻き戻し溶液における変性剤の種類・濃度、CaCl₂濃度、酸化剤と還元剤の種類・濃度・比率、ヘミン濃度、pH、巻き戻し時間について検討を行った。それぞれ最適条件下で巻き戻した後、正常に巻き戻った組換えタンパクを精製した。rAtPrx2、rAtPrx53、rAtPrx71はイオン交換クロマトグラフィーを用いた。rAtPrx25は疎水性相互作用クロマトグラフィー後、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた。rCWPO-Cは疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いた。

(2) ペルオキシダーゼ活性測定

リグニンモノマーモデル化合物としてグアイアシル核をもつグアイアコールとシリングル核をもつ2,6-ジメトキシフェノール(2,6-DMP)とシリングアルダジンをを用いた(図1)。これらの化合物の酸化重合産物は分光光度計を用いた比色定量が可能である。また、高分子化合物酸化活性を評価するための基質として還元型フェロシトクロムc(分子量約14 kDa, 最大吸収波長550 nm)を用いた(図1)。

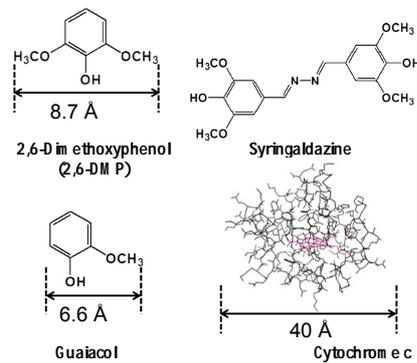


図1 基質として用いた化合物

(3) 遺伝子発現解析

6週齢シロイヌナズナの花、茎上部、茎中部、茎下部、若い葉、古い葉、根からRNAを抽出し、逆転写によってcDNAを合成した。各部位におけるAtPrx2、AtPrx25、AtPrx71の発現を半定量的PCRによって観察した。また、PCRによって単離したAtPrx2、AtPrx25、AtPrx71の上流約2000 bpを用い、GUSをレポーターとするプロモーター解析を行った。

(4) タンパク局在解析

AtPrx2、AtPrx25、AtPrx71の推定プロモーターおよび推定シグナルペプチド配列をコードする領域をPCRによって単離した。そして、各プロモーター制御下で、シグナルペプチドとEGFPとの融合タンパクを発現するベクターを構築した。アグロバクテリウム法を用いてシロイヌナズナ培養細胞(T87系統)を形質転換し、共焦点レーザー顕微鏡によって蛍光を観察した。

4. 研究成果

(1) 組換えタンパク溶液の調製

rAtPrx2, 25, 53 の巻き戻し最適条件の検討結果を図1に示した。rAtPrx71はrAtPrx2と同条件で高い効率で巻き戻ったため、最適化はしていない。精製したタンパク溶液はいずれもPrx特有の吸収スペクトルを呈し、精製度を示すRZ (Abs400/Abs280)は1.8~2.7であった。この結果から、活性型へと正常に巻き戻された各組換えタンパクを精製できた結論した。

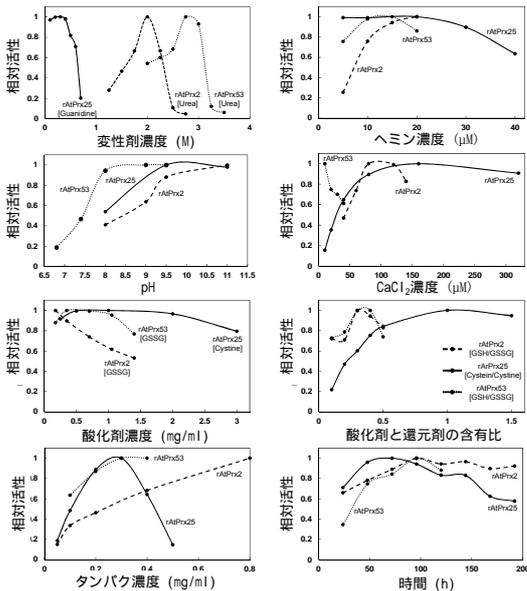


図2 各組換えタンパクの巻き戻し条件の検討結果

(2) rAtPrx2, rAtPrx25, rAtPrx71 の反応特性

精製した組換えタンパクのモデル化合物に対する酸化活性を測定し、表1に結果を示した。グアイアコールに対する酸化活性はrAtPrx53が最も高く、その活性を1.0とすると、rAtPrx2, rAtPrx25, rAtPrx71, rCWPO-Cは0.26, 0.81, 0.81, 0.36であった。一方、2,6-DMP、シリンガルダジンに対する酸化活性は、rAtPrx53が最も低いことが分かった。特にrAtPrx2とrAtPrx71は、グアイアコールに対する酸化活性よりも2,6-DMP、シリンガルダジンに対する酸化活性のほうが高く、この特性はCWPO-Cと一致する(図3)。また、rAtPrx53を除くすべての組換えタンパクはシトクロムcに対する酸化活性を有していた(図4)。CWPO-Cはタンパク表面に露出した2つのチロシン残基を基質酸化部位として利用する。このため、CWPO-Cは基質の分子サイズや立体構造は全く関係なく、リグニンモノマー、オリゴマー、そしてポリマー基質を酸化することが可能である。フェロシトクロムcを酸化できるAtPrx2, AtPrx25, AtPrx71もCWPO-C同様の基質酸化機構をもつと予想される。

シロイヌナズナノックアウト変異体の解析によりリグニン生合成に寄与することが

判明した3つすべてのPrxに比較的高いシリンガルダジン酸化活性と高分子基質酸化活性が認められた。すなわち、リグニンの高分子化に寄与するPrxは、コニフェリルアルコールだけでなく、シナピルアルコールやリグニンポリマーも酸化することができ、リグニンの高分子化を担う酵素として矛盾のない活性を有していると考えられる。

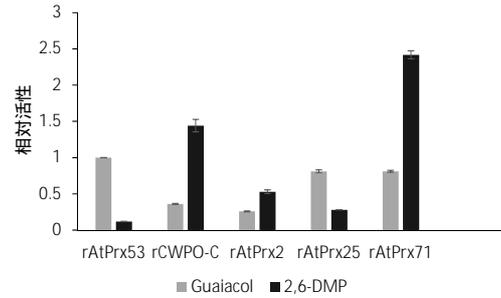


図3 各リコンビナントPrxのグアイアコール (G型基質) と2,6-ジメトキシフェノール (S型基質) に対する酸化活性

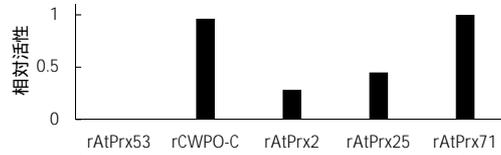


図4 各リコンビナントPrxのシトクロムcに対する相対酸化活性

(3) rAtPrx2, rAtPrx25, rAtPrx71 の遺伝子発現、タンパク局在解析

GUSをレポーターとして用いたプロモーター解析および、RT-PCRによる部位ごとの発現解析を行った。その結果、AtPrx2はどの生長段階でも根の一部に発現が確認された。茎におけるGUS活性は認められていないが、RT-PCRでは茎に発現が確認されている。解析した系統におけるGUS発現が弱い可能性があるため、新たな系統を作り、分析中である。AtPrx25は根冠を除く根全体で恒常的に発現しており、2, 3週齢では一部の葉の葉脈、4

表1. AtPrx71の発現時期と部位

| P _{AtPrx71} ::GUS-4 | 根 | 葉 | 花茎 | 花 |
|------------------------------|---|------|-------|---|
| 5day | | | | |
| 2week | | 根の先端 | | |
| 3week | | | | |
| 4week | | 葉の先端 | 花茎の先端 | 蕾 |
| 5week | | | | |
| 6week | | | | |
| RT-PCR | | | | |
| 6week | | | | |

注) =強い発現あり、 =発現あり、 =弱い発現あり、無印=発現が確認されない

週齢では地上部から約1cm間の花茎の中心柱で発現が確認された。AtPrx71は4週齢までの若い根や、全週齢を通して葉の先端及び葉脈、花茎の先端や蕾など活発に分化していると思われる組織で高い発現が確認された(表1)。AtPrx2は根の木化、AtPrx25は根や葉脈や花茎下部の木化、AtPrx71は根や葉や花茎や蕾などの組織で分化の開始後、早い

段階で木化に関わっていることが予想された。

リグニンの高分子化は細胞外で進行する。タンパク局在を調査するため、各 Prx と EGFP との融合タンパクの発現を試みた。しかし、全長配列と EGFP の融合タンパクは植物細胞において産生されなかったため、各 Prx のシグナルペプチドと EGFP の融合タンパクの発現、および局在観察に切り替えた。シロイヌナズナ培養細胞を形質転換し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて EGFP 由来の蛍光を観察した。その結果、細胞膜または細胞壁に蛍光が認められた。細胞内で産生された AtPrx2、AtPrx25、AtPrx71 はいずれもシグナルペプチドに依存して細胞膜、または細胞壁に運ばれると考えられる。リグニン沈着部位とリグニン高分子化反応を担うことが予想されている AtPrx2、AtPrx25、AtPrx71 の局在には矛盾がない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Fujita K., Bunyu Y., Kuroda K., Ashitani T., Shigeto J., Tsutsumi Y.: A novel synthetic pathway for tropolone ring formation via the olefin monoterpene intermediate terpinolene in cultured *Cupressus lusitanica* cells. *J Plant Physiol* 171, 610-614 (2014). 査読有

2. Shigeto J., Nagano M., Fujita K., Tsutsumi Y.: Catalytic profile of *Arabidopsis* peroxidases, AtPrx-2, 25 and 71, contributing to stem lignification. *PLOS ONE* 9, e105332 (2014). 査読有

3. Harada T., Fujita K., Shigeto J., Tsutsumi Y.: Stereo-selective oxidations of terpinolene by cytochrome P450 monooxygenases in the microsomal fraction of *Cupressus lusitanica* cultured cells. *J Wood Sci* 60, 446-452 (2014). 査読有

4. Shigeto J., Itoh I., Hirao S., Ohira K., Fujita K., Tsutsumi Y.: Simultaneously disrupting *AtPrx2*, *AtPrx25* and *AtPrx71* alters lignin content and structure in *Arabidopsis* stem. *J Integr Plant Biol*, 349-356 (2015). 査読有

5. 重藤 潤、堤 祐司 (2014)ミニレビュー「木化に関わるペルオキシダーゼ」木科学情報 21 巻 2 号:29-32

〔学会発表〕(計8件)

1. 重藤潤、堤祐司『第65回日本木材学会大会』リグニン生合成に関与するペルオキシダーゼによるシリリングル型モノマー脱水素重合 (2015.3) 東京。

2. Tsutsumi Y, Shigeto J., Ohira K, Takao

R, Kamada M: Expression and subcellular localization analysis of poplar cationic cell-wall-bound peroxidase and its *Arabidopsis* putative homologs involved in lignification 『Lignobiotech-III Symposium』(2014.10.) Concepción, Chile

3. 重藤潤、堤祐司『第21回日本木材学会九州支部大会』シロイヌナズナのリグニン生合成に関与するペルオキシダーゼ AtPrx2、AtPrx25、AtPrx71 の酸化特性 (2014.9.) 熊本。

4. Shigeto J., Tsutsumi Y: Characterization of plant peroxidases which involved in *Arabidopsis* stem lignification 『The XXVIIth International Conference on Polyphenols & The 8th Tannin Conference』(2014. 9.) Nagoya, Japan

5. Tsutsumi Y, Shigeto J.: Oxidation activities of plant peroxidases involved in lignification 『Oxizymes』(2014. 9.)Vienna, Austria

6. 重藤潤、堤祐司『第55回日本植物生理学会年会』リグニンの高分子化を担う植物ペルオキシダーゼの酸化能と酸化機構 (2014.3) 富山。

7. 重藤潤、堤祐司『第58回リグニン討論会』「シリグニンを高分子化する植物ペルオキシダーゼの酸化能」(2013. 10.) 香川。

8. 堤祐司、長野万里子、重藤潤『日本植物学会第77回大会』「リグニン高分子化ペルオキシダーゼの反応特性」(2013. 9.) 札幌。

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

http://ffpsc.agr.kyushu-u.ac.jp/chem/Wo odchem_%26_biochem/Wel come.html

受賞

日本木材学会九州支部黎明研究者賞(論文部門)

6. 研究組織

(1)研究代表者

重藤 潤 (JUN SHIGETO)

九州大学・農学研究院・学術研究員

研究者番号: 70570852

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし