

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H02454

研究課題名(和文)細胞壁マトリックス成分の合成・梱包・輸送と堆積のダイナミクス

研究課題名(英文)Dynamic synthesis, packing and transport of matrix substances of cell wall

研究代表者

高部 圭司(Takabe, Keiji)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70183449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,900,000円

研究成果の概要(和文)：木材細胞壁の主要マトリックス成分としてヘミセルロースがあり、グルコマンナン、キシラン、ガラクトタンが挙げられる。これらの合成と輸送に関し以下のことが判明した。1つのゴルジ装置で複数のヘミセルロースが合成され、複数のヘミセルロースは個々に異なるゴルジ小胞にパッキングされ細胞壁に輸送される。ゴルジ装置で合成されたヘミセルロースは高アセチル化されているが、細胞壁に輸送された後はアセチル基が徐々に外れていく。もう一つのマトリックス成分としてリグニンがある。ポプラやモウソウチクのリグニン前駆物質の輸送活性を調べたところ、いずれにおいてもp-グルコクマリルアルコールの輸送にV-ATPaseが関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木材細胞壁の形成過程は未解明な点が多く、その解明は知的財産を形成する上で大きな意味を持つ。本研究で明らかになったゴルジ装置でのヘミセルロースの合成と梱包の機能は細胞壁形成に関する合理的な理解を導いた。また、リグニン前駆物質の輸送メカニズムの解明は、木化する細胞壁の形成過程を深く理解するだけでなく、木材細胞壁をバイオマス材料として利用する上での貴重な基礎的情報を提供した。

研究成果の概要(英文)： One of the main components of wood cell wall is hemicellulose. Particularly, glucomannan and xylan are major hemicellulose in wood, and galactan in compression wood. Our study revealed that two or more hemicelluloses are synthesized in one Golgi apparatus, and each hemicellulose is packed into each Golgi vesicle individually and transported toward the inner surface of developing cell walls. Glucomannan in softwood and xylan in hardwood are highly acetylated during their synthesis in Golgi apparatus. The acetyl group of glucomannan and xylan is gradually removed after their deposition to the cell wall.

Other main components of wood cell wall is lignin. p-Glucocoumaryl alcohol is one of the candidates of lignin precursor. Our study clearly indicate that V-ATPase is involved in the transport of p-glucocoumaryl alcohol in the presence of ATP.

研究分野：樹木細胞学

キーワード：ヘミセルロース リグニン コニフェリン p-グルコクマリルアルコール ゴルジ装置 ミクロソーム V-ATPase 細胞壁

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

木材細胞壁の主要成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニンである。これらのうち、ヘミセルロースはゴルジ装置で合成され、その後にゴルジ小胞内に梱包され、ゴルジ小胞が細胞膜に融合することで細胞壁に輸送されるものと考えられている。しかしながら、ヘミセルロースにはグルコマンナンやキシラン、ガラクトタンがあり、それら個々のヘミセルロースがどのように制御されて合成、梱包、輸送が行われているのかは未解明であった。

一方、リグニンは細胞内でリグニン前駆物質(モノリグノール類)が合成され、細胞壁へと輸送され、細胞壁で重合が進行することにより高分子リグニンになると考えられている。これらのプロセスのうち、細胞内で合成されたモノリグノール類がどのように細胞壁へと輸送されるのかは未解明の課題であった。申請者らはポプラやヒノキのマイクロソーム画分を用いて、ATP存在下でV-ATPaseが作り出すプロトン勾配がコニフェリン輸送に重要な役割を果たしていることを見出した。しかしながら、*p*-クマリルアルコールなどのモノリグノール類がどのようなメカニズムで細胞外に輸送されるのかは未解明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3点である。

- ① ゴルジ装置において個々のヘミセルロースがどのように制御されて合成され、ゴルジ小胞内に梱包されるのかを明らかにする。
- ② ゴルジ装置内で合成されたヘミセルロースは細胞壁へと輸送、堆積することでその化学構造を変化させているのかを明らかにする。
- ③ モノリグノール類の細胞壁への輸送は、個々のモノリグノールごとにメカニズムが異なるのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

スギ圧縮あて材の分化中木部を高圧凍結装置で固定し、 $-80^{\circ}\text{C}$ に冷却した2%四酸化オスミウム・アセトン溶液で凍結置換させ、エポキシ樹脂包埋した後、超薄切片を切り出した。その切片に対し、グルコマンナン、キシラン、ガラクトタンそれぞれに特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて単独の免疫標識、あるいは抗体を組み合わせる二重標識を行ない透過電子顕微鏡観察した。また超薄切片に脱アセチル化処理を行い、同様に免疫標識した。

ポプラ分化中木部を切り出し、ホモジナイズした後に超遠心法でマイクロソーム膜画分を得た。さらにショ糖を用いた密度勾配遠心法により液胞膜、ゴルジ装置、細胞膜に富む3つの画分を得た。それら画分の一部は中性糖組成の分析に供し、残りの画分はグルタルアルデヒドで固定後、エポキシ樹脂に包埋した。包埋試料より超薄切片を切り出し、キシランの免疫標識を試みた。

ハリエンジュ分化中木部をグルタルアルデヒドで固定し、バッファー洗浄後に $50\sim 100\ \mu\text{m}$ 厚さの放射面切片を切り出した。切片には脱リグニン処理、キシラナーゼ処理、3%NaOH処理を単独、または組み合わせで行なった。*t*-ブタノールを用いた凍結乾燥後に、オスミウムコーターにより試料表面にオスミウム薄膜を形成させた。これら試料を高分解能走査電子顕微鏡(FE-SEM)観察した。

ユーカリ分化中木部を高圧凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ に冷却した2%四酸化オスミウム・アセトン溶液で凍結置換させ、エポキシ樹脂に包埋した。包埋試料より $S_2$ 層のマイクロフィブリルに対し垂直な方向と並行な方向に切片を切り出し、PATAg染色して透過電子顕微鏡で観察した。

ポプラの分化中木部を切り出し、ホモジナイズした後に超遠心法でマイクロソーム膜画分を得た。この画分に対し、*p*-ヒドロキシフェニルリグニンの前駆物質候補である*p*-クマル酸、*p*-クマリルアルコール、*p*-グルコクマリルアルコールを投与し、それらの取り込み活性を調べた。また様々な輸送阻害剤を加えて同様に取り込み活性を調べた。

### 4. 研究成果

二次壁形成中のスギ圧縮あて材を、二次壁外層( $S_1$ )形成期、二次壁中層外側部分( $oS_2$ )形成期、二次壁中層内側部分( $iS_2$ )形成期の3段階に分けた。表1には各細胞壁形成段階でのヘミセルロース抗体によるゴルジ装置の標識割合を示している。例えば $S_1$ 形成期では、観察された全てのゴルジ装置のうち82%にグルコマンナン、44%にキシラン、46%にガラクトタンの標識

表1 各二次壁形成段階でのヘミセルロース抗体によるゴルジ装置の標識割合(%)

	グルコマンナン	キシラン	ガラクトタン
$S_1$	82	44	46
$oS_2$	74	90	74
$iS_2$	60	88	20

が現れた。1つのゴルジ装置が1種類のヘミセルロースを合成しているとするなら、標識割合(%)の合計がおよそ100になるはずだが、実際には100を優に超えている。これは  $\alpha$ S<sub>2</sub>、 $\beta$ S<sub>2</sub> 形成期でも同様である。これらの結果は1つのゴルジ装置が2種類以上のヘミセルロースを合成していることを示唆している。次に、グルコマンナンとキシランの二重標識を行いゴルジ小胞の標識状態を観察すると、観察されたゴルジ小胞のうち77%の小胞がグルコマンナンのみ、20%がキシランのみの標識で、二重標識が見られたゴルジ小胞は3%であった。以上の結果を総合すると、二次壁形成中の細胞では、1つのゴルジ装置が2種類以上のヘミセルロースを合成し、各々のヘミセルロースは異なるゴルジ小胞に梱包されることを示している。また脱アセチル化処理を行うと明らかにヘミセルロースの標識密度が上がることから、合成直後のヘミセルロースは高度にアセチル化されているものと考えられる。

ポプラ分化中木部よりミクロソーム膜画分を調整し、さらに密度勾配遠心法を用いて液胞膜、ゴルジ装置、細胞膜に富む画分を得た。各画分を加水分解して糖組成を調べると、ゴルジ装置に富む画分でキシロースが検出された。また上記の3つの画分を樹脂包埋し、超薄切片を作製してキシランの免疫標識をすると、ゴルジ装置に富む画分でキシランの標識が認められた。また、同切片に脱アセチル化処理をした後にキシランの免疫標識を行うと、標識密度は上昇した。

ポプラの当年輪、前年輪、前々年輪の木部にキシランの免疫標識をすると、年数の経過と共に木部繊維細胞壁の標識密度は上昇した。各年輪に脱アセチル化処理をした後にキシランの免疫標識を行うと、形成から間もない年輪ほど標識密度は上昇した。各年輪の切片より顕微 FT-IR により赤外吸収スペクトルを測定すると、カルボニル基に由来する  $1740\text{cm}^{-1}$  の吸収が年輪形成後の年数が増加するほど減少した。また同切片に脱アセチル化処理を行うと処理前より  $1740\text{cm}^{-1}$  の吸収が減少した。これらの結果は、ゴルジ装置で合成されたキシランはアセチル基に富み、細胞壁に堆積した後は徐々に脱アセチル化が進行することを示している。

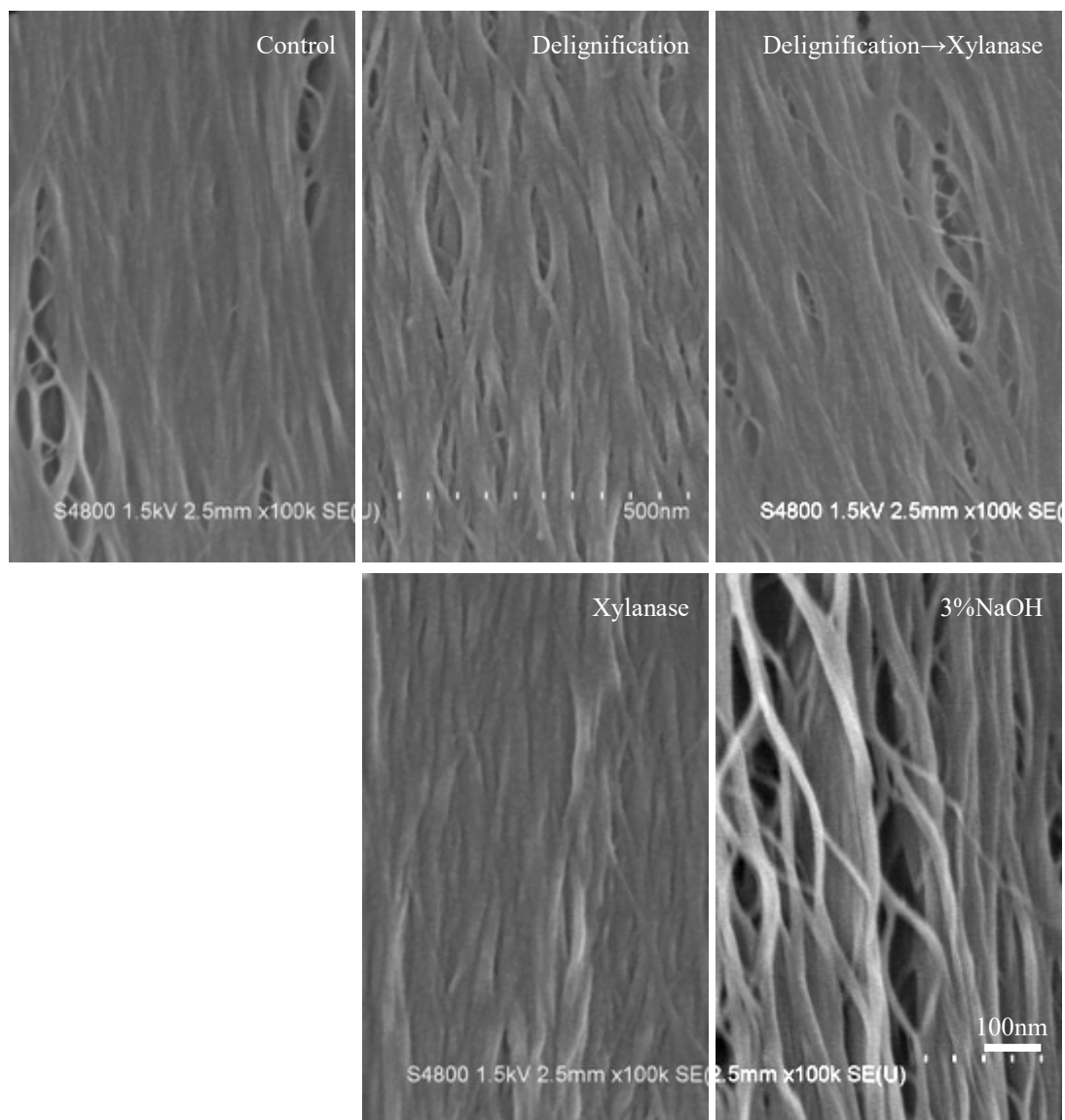


図1 FE-SEMで観察されたハリエンジュ  $S_2$  形成中の木部繊維

ハリエンジュ分化中木部の放射面切片より、細胞壁形成中の木部繊維内表面を FE-SEM で観察した (図1)。無処理の切片の S<sub>2</sub>層最内層では幅 1.5 nm ほどのフィブリルが木部繊維長軸方向に対しわずかに傾斜するように堆積し、不定形の物質がフィブリル表面をコーティングするように堆積していた。脱リグニン処理を行うとフィブリルは明瞭に観察されるようになったが、フィブリルは無処理の試料より太くなり、その表面は顆粒状の物質で覆われていた。脱リグニン処理後にキシラナーゼ処理を行うとフィブリルは細くなって集合化し、その表面は小さな顆粒状の構造物が存在した。脱リグニン処理を行わずキシラナーゼ処理を行った試料ではフィブリルは太いままだが、フィブリル間の物質が取り除かれ、1本1本のフィブリルが明瞭に観察された。また、分化中木部に希アルカリ処理を行うと、フィブリル表面を覆っていた物質は取り除かれ、フィブリルは極めて滑らかな構造を呈するとともに、フィブリル間に多数の大きな隙間を生じさせた。

これらの結果より、以下のように考えることができる。マイクロフィブリルの幅はおおよそ 3 nm と言われており、細胞壁内表面で観察されたフィブリルが 1.5 nm 程度であることから幅方向に 3~4本が集合して太いフィブリルを形成しているものと思われる。写真から見て深さ方向にどの程度のマイクロフィブリルが集合しているのかは不明である。キシラナーゼ処理によりフィブリル間の物質が除去されフィブリルが明瞭に観察されたことから、キシランはフィブリル間を埋めるように堆積しているものと思われる。脱リグニン処理を行ってもフィブリルが明瞭に観察されることから、フィブリル間にキシランと共にリグニンも充填され始めていると考えられる。脱リグニン後にキシラナーゼ処理を行うとフィブリルが細く観察されたことから、キシランはマイクロフィブリル間にも分布し、マイクロフィブリル同士を集合させて太いフィブリルを形成することに関与しているものと考えられる。希アルカリ処理ではヘミセルロースやリグニンなどのマトリックス物質が取り除かれることから、フィブリル表面が滑らかな構造を示すと考えられる。

分化中のユーカリ木部繊維を PATAg 染色して透過電子顕微鏡観察すると、セルロースマイクロフィブリルに対して垂直な方向に切られた切片と並行に切られた切片では染色性が大きく異なっていた。PATAg 法ではペクチンやヘミセルロースがよく染色される。ユーカリ木部繊維の二次壁においてはキシランがよく染色されるものと思われる。セルロースマイクロフィブリルに対して垂直な方向に切られた切片では染色部位がドット状に現れるのに対し、並行に切られた切片では筋状に現れた (図2)。後者を詳細に観察すると、あまり染色されない幅 1.2 nm 程度の筋状の部位と、よく染色される幅 1.0 nm 程度の筋状の部位が交互に現れた。あまり染色されない部位はセルロースマイクロフィブリルが 3~4本集合したフィブリルと考えられ、その間をキシランなどのヘミセルロースが堆積しているものと考えられた。また、マイクロフィブリルに対して垂直の方向に切られた切片ではドット状に、並行に切られた切片では筋状に染色されることから、

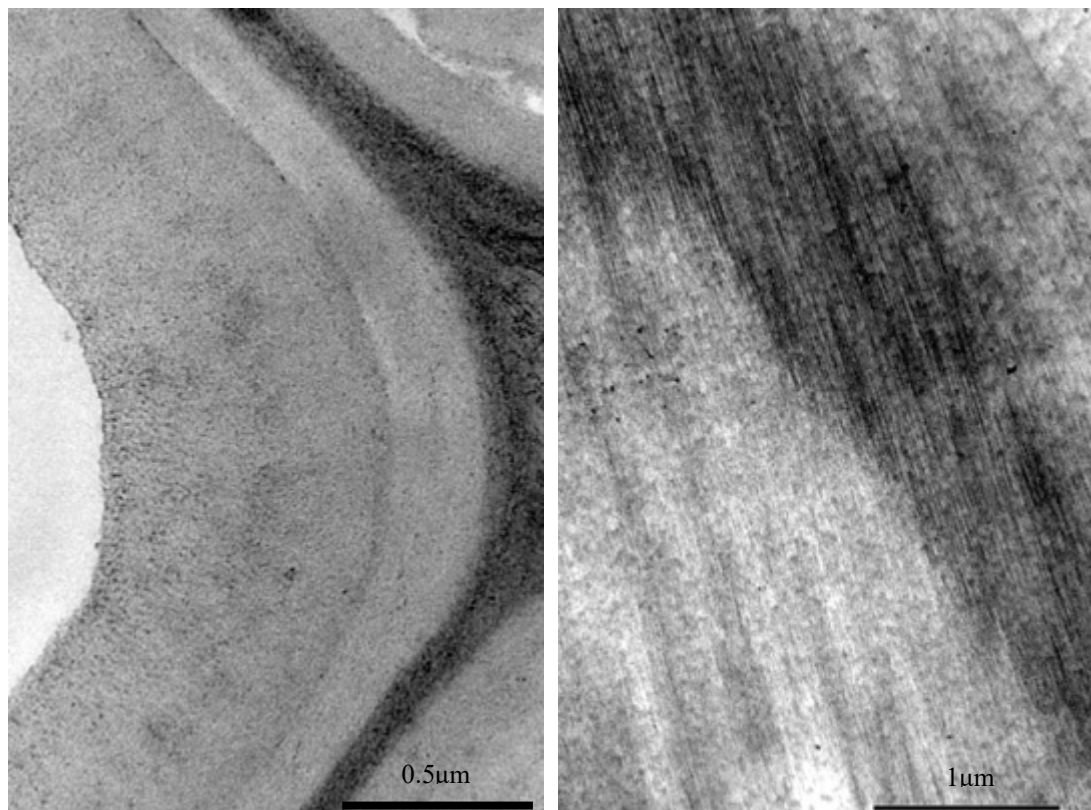


図2 PATAg 染色された S<sub>2</sub>層形成中のユーカリ木部繊維  
左はマイクロフィブリルに対しほぼ垂直に切られた切片、右は並行に切られた切片

100～200 nm 長さのキシラン分子はフィブリルに対して並行かそれに近い方向に配向して堆積しているものと考えられる。

ポプラの分化中木部より調整したミクロソーム膜画分を用いて *p*-クマル酸、*p*-クマリルアルコール、*p*-グルコクマリルアルコールの取り込み実験を行うと、ATP の存在下で *p*-グルコクマリルアルコールが活発に取り込まれた。様々な阻害剤を加えて同様の取り込み実験を行うと、V-ATPase の阻害剤であるバフィロマイシンで取り込みが著しく阻害された。従って、*p*-グルコクマリルアルコールの輸送には V-ATPase が関与していることが示された。これは申請者らがこれまで調べてきたコニフェリンの輸送メカニズムと同様のものである。

#### 5. 本研究で得られた結論

当研究を開始する際に立てた3つの研究目的に対し、以下のような結果を得た。

① ゴルジ装置において個々のヘミセルロースがどのように制御されて合成され、ゴルジ小胞内に梱包されるのかを明らかにする。

針葉樹においては、2種類以上のヘミセルロースが1つのゴルジ装置内で合成される。それぞれのヘミセルロースは、異なるゴルジ小胞中に梱包され、細胞壁へと輸送される。広葉樹においても、主要なヘミセルロースであるキシランはゴルジ装置で合成され、ゴルジ小胞に梱包されて細胞壁へと輸送される。

② ゴルジ装置内で合成されたヘミセルロースは細胞壁へと輸送、堆積することでその化学構造を変化させているのかを明らかにする。

ゴルジ装置内で合成されたヘミセルロースは高度にアセチル化され、細胞壁へと輸送される。細胞壁に堆積されたヘミセルロースは、2～3年かけて徐々にアセチル基が外される。広葉樹においては、キシランはマイクロフィブリル間に堆積してマイクロフィブリルの集合化に関与するとともに、12～15 nm 幅のフィブリル間にも堆積する。この時、キシラン分子はフィブリルの配向と同じような方向に配向して堆積するものと考えられる。

③ モノリグノール類の細胞壁への輸送は、個々のモノリグノールごとにメカニズムが異なるのかを明らかにする。

*p*-ヒドロキシフェニルリグニンの有力な前駆物質である *p*-グルコクマリルアルコールは、ATP 存在下で V-ATPase が関与して輸送される。これは申請者らがこれまで調べてきたコニフェリンの輸送メカニズムと同様のものではなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuyama, T., Matsushita, Y., Fukushima, K., Takabe, K., Yazaki, K., Kamei, I.	4. 巻 9
2. 論文標題 Proton gradient-dependent transport of p-glucocoumaryl alcohol in differentiating xylem of woody plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1038/s41598-019-45394-7	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 Zhou, Y., Kobayashi, M., Awano, T., Match, T., Takabe, K.	4. 巻 82
2. 論文標題 A new monoclonal antibody against rhamnogalactronan and its application to immunocytochemical detection of rhamnogalactronan in Arabidopsis roots	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnology. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1780-1789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2018.1485479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiyoto S., Yoshinaga, A., Fernandez-Tendero, E., Day, A., Chabert, B., Takabe, K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Distribution of lignin hemicellulose and arabinogalactan protein in hemp phloem fibers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 442-452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S1431927618012448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 高部圭司、福島和彦	4. 巻 96
2. 論文標題 リグニンの分布と構造解析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本エネルギー学会機関誌 えねるみくす	6. 最初と最後の頁 344-350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高部圭司	4. 巻 71
2. 論文標題 木材細胞壁の形成と微細構造	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 紙バ技協誌	6. 最初と最後の頁 1107-1113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 築地世玲菜、高部圭司
2. 発表標題 ハリエンジュ分化中木部繊維の二次壁内表面における細胞壁成分の堆積
3. 学会等名 日本木材学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津山濯、大塚環、矢野陽花、島田菜津美、雉子谷佳男、榊原陽一、矢崎一史、高部圭司、亀井一郎
2. 発表標題 ポブラ分化中木部におけるコニフェリン輸送体の探索
3. 学会等名 日本木材学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田菜津美、津山濯、雉子谷佳男、松下泰幸、福島和彦、矢崎一史、高部圭司、亀井一郎
2. 発表標題 タケ当年桿におけるリグニン前駆物質の輸送メカニズム
3. 学会等名 日本木材学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻井みづき、高部圭司
2. 発表標題 ヒノキの形成中仮道管内表面におけるセルロースとヘミセルロースの分子配置 — 脱アセチル化処理後のヘミセルラーゼ処理及び処理切片の糖分析 —
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田菜津美、津山濯、松下泰幸、福島和彦、矢崎一史、高部圭司、亀井一郎
2. 発表標題 モウソウチク当年桿由来マイクロソーム膜画分におけるコニフェリンの輸送活性
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津山濯、松下泰幸、福島和彦、矢崎一史、高部圭司、亀井一郎
2. 発表標題 分化中木部におけるp-グルコクマリルアルコールの輸送メカニズム
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宗方典哲、津山濯、雉子谷佳男、高部圭司、亀井一郎
2. 発表標題 モウソウチク当年桿におけるキシラン、フェルラ酸およびリグニンの堆積過程
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 麦尾祥多、高部圭司
2. 発表標題 免疫標識法および顕微FT-IRを用いたヘミセルロースの合成段階別の構造評価
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiharu Tanaka, Tatsuya Awano, Keiji Takabe
2. 発表標題 Function of Golgi apparatus in differentiating xylem of compression wood in <i>Chamaecyparis obtusa</i>
3. 学会等名 9th Pacific Regional Wood Anatomy Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chiharu Tanaka, Tatsuya Awano, Keiji Takabe
2. 発表標題 Function of Golgi apparatus in differentiating xylem of <i>Chamaecyparis obtusa</i>
3. 学会等名 255th ACS National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 麦尾祥多、高部圭司
2. 発表標題 ポプラにおけるヘミセルロースの合成段階別の構造評価
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井みづき、粟野達也、高部圭司
2. 発表標題 ヒノキ形成中仮道管壁内表面におけるセルロースとヘミセルロースの分子配置
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 築地世玲菜、高部圭司
2. 発表標題 ハリエンジュ分化中木部繊維の二次壁内表面へのセルロース、ヘミセルロースの堆積
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中千晴、粟野達也、高部圭司
2. 発表標題 ヒノキ圧縮あて材でのヘミセルロース生合成と輸送に関するゴルジ装置の機能
3. 学会等名 第67回日本木材学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中千晴、粟野達也、高部圭司
2. 発表標題 高圧凍結置換固定・免疫金標識による細胞壁形成過程の観察 - ユーカリ分化中木部でのキシラン標識 -
3. 学会等名 第66回日本木材学会大会
4. 発表年 2016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	上高原 浩 (Kamitakahara Hiroshi)  (10293911)	京都大学・農学研究科・教授  (14301)	
研究分担者	飛松 裕基 (Tobimatsu Yuki)  (20734221)	京都大学・生存圏研究所・准教授  (14301)	
研究分担者	粟野 達也 (Awano Tatsuya)  (40324660)	京都大学・農学研究科・助教  (14301)	
研究分担者	津山 濯 (Tsuyama Taku)  (40786183)	宮崎大学・農学部・助教  (17601)	
研究分担者	高野 俊幸 (Takano Toshiyuki)  (50335303)	京都大学・農学研究科・教授  (14301)	
研究分担者	吉永 新 (Yoshinaga Arata)  (60273489)	京都大学・農学研究科・准教授  (14301)	