

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14774

研究課題名(和文)ポプラペルオキシダーゼCWPO-Cは“木化と分化・形態形成”を制御する

研究課題名(英文)Poplar peroxidase, CWPO-C, controls lignification and development in plant

研究代表者

堤 祐司 (YUJI, TSUTSUMI)

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ポプラ由来ペルオキシダーゼは、他のペルオキシダーゼとは異なりリグニン前駆体を酸化可能であるためリグニン形成特異的ペルオキシダーゼとこれまで考えられてきたが、これまで直接的な証拠は得られていない。CWPO-Cの機能をより理解するため、レーザーマイクロダイセクションなどを使用した詳細な発現解析を行った。その結果、CWPO-Cは、道管で発現が観察された他、主茎における側芽や葉への分岐部、茎頂分裂組織に強い発現が観察された。また、CWPO-Cを過剰発現したシロイヌナズナでは生長の遅れ、側芽分岐の減少が観察された。これらの結果はCWPO-Cが生長、分岐に関与することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Cationic cell-wall-bound peroxidase (CWPO-C), a class III peroxidase in *Populus alba*, has been considered to play a role in the lignification process. In order to promote better understanding about CWPO-C functions, detailed expression analysis of this peroxidase using laser microdissection and expression quantification tools were performed. It was shown that cells express CWPO-C in cortex cells, instead of cambium cells. Moreover CWPO-C expression was observed in apical meristem. In addition, delay of the growth and decrease of branch number were observed in transgenic *Arabidopsis* overexpressing CWPO-C. These results imply that CWPO-C is involved in growth and cell elongation; suggesting a new aspect to the role of CWPO-C.

研究分野：木質科学

キーワード：ペルオキシダーゼ リグニン 分化 形態形成 発現解析 機能解析

1. 研究開始当初の背景

植物ペルオキシダーゼは大きな遺伝子ファミリーを形成しており、大部分が細胞壁に局在することが知られているが、それらが基質とする物質や反応機構に関する信頼できる情報は限られており、大部分の植物ペルオキシダーゼの役割は依然不明のままである。

ポプラから単離された CWPO-C は基質酸化部位がタンパク表面に露出しているため、基質とする分子のサイズや構造を問わずに酸化できる基質全能性をもつ植物ペルオキシダーゼである。そのため、既知ペルオキシダーゼが酸化できないシリングル型リグニンモノマーやリグニンオリゴマーも酸化可能であり、CWPO-C に代表される全能性ペルオキシダーゼは、リグニン形成に関与すると考えられてきた。

研究代表者は β -グルクロニダーゼ (GUS) を用いた CWPO-C のプロモーター解析を行い、リグニン沈着部位である茎での発現に加え、葉の先端部をはじめとする多くの細胞分裂や分化が活発な組織、さらに幼少葉の気孔やトライコームなど、予想外の組織で CWPO-C が強発現することを発見した。この結果から、CWPO-C にはリグニン形成以外にも、細胞分裂または細胞分化、気孔、トライコーム等の器官形成に関連する等、植物ペルオキシダーゼには知られてない役割が潜在していることが示唆された。本研究では、従来の植物ペルオキシダーゼに関する知見では説明することができない、全能性植物ペルオキシダーゼ CWPO-C の細胞分裂や分化における“新機能”の発見とメカニズムの解明を試みる。

2. 研究の目的

CWPO-C は、リグニン形成部位に加え、細胞の分裂および分化活発な組織で強く発現することから、本酵素は“多機能”であることが予想される。本研究では、CWPO-C がリグニン形成に寄与することの直接的な証拠を得るとともに、全能性ペルオキシダーゼ CWPO-C のもつ未知の役割を明らかにするため、CWPO-C がいつ、どの器官、組織、細胞で機能しているのかを明確にする。また、その形質転換体を用いた表現型解析によって CWPO-C の役割を推定する。

3. 研究の方法

(1) GUS をレポーター遺伝子として用いた CWPO-C プロモーター解析

これまで行った GUS をレポーター遺伝子として用いた CWPO-C プロモーター解析結果は、異種発現 (シロイヌナズナでの発現) のものであったため、ポプラにおける CWPO-C 発現を確認し、発現パターンを明確にする必要があった。そこで、GUS をレポーター遺伝子として用いたポプラでの CWPO-C 発現解析を行った。ポプラの形質転換、および GUS 染色は定法に従った。また、シロイヌナズナ、ポプ

ラにおいて GUS 染色された部位の横断切片を作製し、どの細胞に発現しているのかを観察した。

(2) レーザーマイクロダイセクション法を用いた細胞レベルでの発現解析

CWPO-C の主な発現部位である茎における細胞種別の CWPO-C の定量的発現解析を行うため、レーザーマイクロダイセクションによって茎先端部における頂端分裂組織および茎中間部における形成層、厚角組織を構成する細胞をそれぞれ切り出し、RNA を抽出した。逆転写後、リアルタイム PCR によって発現の定量化を行った。

(3) ポプラ CWPO-C 過剰発現体・発現抑制体の作出と解析

CWPO-C 過剰発現コンストラクト、および CWPO-C 発現抑制 (アンチセンス、RNAi) コンストラクトを作製後、アグロバクテリウム法に従い、ポプラの形質転換を行った。得られた系統については RT-PCR によって発現を確認後、表現型解析を試みた。

(4) シロイヌナズナ CWPO-C 過剰発現体系統の作出と解析

ポプラでは CWPO-C の過剰発現体が得られなかったため、シロイヌナズナ CWPO-C 過剰発現体を作製後、表現型解析を行った。CWPO-C の蓄積は抗 CWPO-C 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。

4. 研究成果

(1) CWPO-C の発現部位の可視化と定量化
挿し木 8 週間後の (CWPO-C プロモーター制御下で GUS を発現する) ポプラ形質転換体を GUS 染色に供した。その結果、茎頂部、茎における葉柄の発生部、葉柄に強い CWPO-C 発現が観察された。茎頂部では、茎頂分裂組織を除いた組織、特に developing vascular strand を含む基本分裂組織に発現が観察された。茎頂部での発現は、形成層における発現の約 10 倍であった (図 1)。

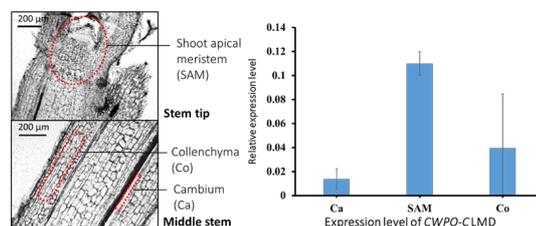


図1 CWPO-Cの組織別の定量的発現解析

第一節間の横断切片を観察したところ、木部に発現が観察された。第二節間では木部における発現は観察されなかった一方で、弱い発現が師部に観察された。葉柄では維管束を含む組織全体に発現した。茎先端部を除いて、CWPO-C の茎における発現は、葉柄の付け根周辺に限定されており、木部ではなく、葉柄方向の皮層に強い発現が観察された。また、シロイヌナズナを用いた発現解析では茎上部では道管に強い発現が認められた一方、主な

リグニン蓄積部位である繊維細胞における発現は無いまたは微弱であった。また、茎下部では皮層に発現が認められた。CWPO-Cはリグニン形成に関与するとしても、その寄与は“道管形成を含む初期のリグニン形成”と限定的であることが予想される。

シロイヌナズナでは、側芽に強い発現が観察された(図 2A)。同様に茎頂を切断し、側芽発生を誘導したポプラでも側芽に強い発現が観察された(図 2B)。CWPO-Cは芽の発生に関与することが示唆されたため、形質転換体ポプラのカルスを作製し、多芽体発生誘導時の CWPO-C 発現を観察した。その結果、多芽体に強い発現が観察された(図 2C)。CWPO-Cは芽の発生に何らかの役割を果たしていることが予想される。

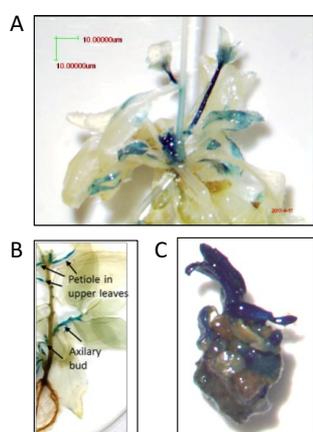


図2 芽におけるCWPO-Cの強い発現
A: シロイヌナズナ B: 茎頂を切断したポプラ C: 多芽体発生誘導したポプラカルスのGUS染色図。いずれもCWPO-Cプロモーター制御下でGUSを発現する形質転換体。

(2) 形質転換体の表現型解析

ポプラ CWPO-C 過剰発現体・発現抑制体の作出を試みたが、現在のところ 1 系統の RNAi 体 (CWPO-C の発現を約 75%抑制) が得られたのみにとどまっている。ポプラの形質転換体を獲得するには、カルスを経由し、まず多芽体を得る必要がある。上記したように CWPO-C は多芽体形成に関与することから、CWPO-C の発現をコントロールすることにより、多芽体形成が妨げられている可能性が考えられた。得られた 1 系統の RNAi 発現抑制体を生育さ

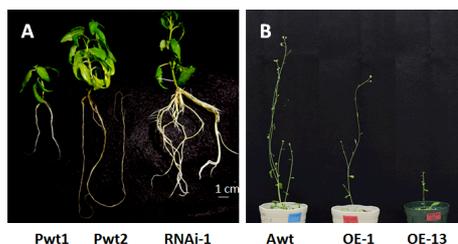


図3 CWPO-Cの発現を抑制したポプラ(A)とCWPO-Cを過剰発現させたシロイヌナズナ
Pwt: 野生型ポプラ、Pwt2: RNAi体の同主茎長の野生型ポプラ、RNAi-1: CWPO-Cの発現を抑制したポプラ、Awt:シロイヌナズナ野生型、OE-1、-13: CWPO-Cを過剰発現させたシロイヌナズナ

せ、野生型と比較したところ、生長速度が上昇していることが明らかとなった(図 3A)。今後、系統数を増やした表現型解析が不可欠

である。

ポプラの CWPO-C 過剰発現体を得るのは難しいと考え、形質転換が容易なシロイヌナズナを用い、異種発現系での CWPO-C 過剰発現体解析を行った。CWPO-Cを過剰発現したシロイヌナズナは生長速度の遅延(図 3B)、種子の減少が観察された。以上の結果は CWPO-C は芽の発生や生長におけるネガティブレギュレーターとして機能していることを示唆している。

(3) 総括

本研究は、「基質全能性をもつ植物ペルオキシダーゼ“CWPO-C”は生長、形態形成に関与している」という仮説の基に着手された。そして、本研究成果により CWPO-C が様々な器官の発生に関与し、植物体の発達を制御する因子の一つであることが示され、植物ペルオキシダーゼの新たな役割を見出すことができた。しかしながら、未だその作用機序には見解が得られておらず、CWPO-C の基質とする物質の同定が今後の課題である。

また、応用的視点から、本研究成果は植物ペルオキシダーゼの発現制御を介した生長制御についての知見を提供することで、高効率化、高品質化を標的とした作物分子育種技術開発への貢献が期待される。

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 4 件)

- (1) Shigeto J., Ueda Y., Sasaki S., Fujita K., Tsutsumi Y. Enzymatic activities for lignin monomer intermediates highlight the biosynthetic pathway of syringyl monomers in *Robinia pseudoacacia* J. Plant Res. 130, 203-210 (2017).
- (2) Shigeto J., Tsutsumi Y.: Diverse functions and reactions of class III peroxidases. New Phytol, 209, 1395-1402 (2016)
- (3) 重藤潤, 堤祐司: 細胞壁形成および修飾における植物ペルオキシダーゼの役割 Mokuzai Gakkaishi, 62, 91-100 (2016)
- (4) Fujita K, Kambe R, De Alwis R, Yagi T, Tsutsumi Y. Airborne Monoterpenes Emitted from a *Cupressus lusitanica* Cell Culture Induce a Signaling Cascade that Produces β -Thujaplicin. J Chem Ecol. 42, 814-820 (2016)

[学会発表] (計 8 件)

- (1) 和田卓, 藤田 弘毅, 堤 祐司, マイクロダイセクション: リグニン単位間 5-5 型結合の探索, 第 67 回日本木材学会大会, 2017.3.17-19, 福岡
- (2) 松永佳奈, 重藤 潤, 堤 祐司, スギの木化に関与するペルオキシダーゼの検索, 第 67 回日本木材学会大会, 2017.3.17-19,

- 福岡
- (3) 本庄裕貴, 重藤 潤, 堤 祐司, CWPO-C
リコンビナントタンパクを用いたシリ
ンギルリグニン様ポリマーの合成, 第
67 回日本木材学会大会, 2017.3.17-19,
福岡
 - (4) Diego Yoshikay, 重藤 潤, 堤 祐司,
Analysis of poplar CWPO-C gene
expression using laser micro-dissection and
RT-qPCR, 第 67 回日本木材学会大会,
2017.3.17-19, 福岡
 - (5) Diego Yoshikay, 大平香織, 重藤潤, 堤
祐司, Transcriptional analysis of Poplar
CWPO-C in different cell types and organs,
第 61 回リグニン討論会, 2016.10.27-28,
宇治
 - (6) 和田卓, 藤田 弘毅, 堤 祐司, マイクロ
ダイセクション: ポプラ 1 年輪内のリグ
ニン単位間結合変化の解析, 第 61 回リ
グニン討論会, 2016.10.27-28, 宇治
 - (7) Yuji Tsutsumi, Jun Shigeto, Hiroki Honjyo,
In vitro polymerization of lignin monomer
using the plant peroxidases involved in
lignification, Oxizymes 2016, 2016.7.3-6,
Wageningen
 - (8) 鎌田政諒, 大平香織, 重藤 潤, 堤 祐司,
シロイヌナズナペルオキシダーゼ、
AtPrx2, 25, 71 の発現解析による機能推
定, 第60回リグニン討論会, 2015.11.5-6,
つくば

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 祐司 (YUJI TSUTSUMI)

九州大学大学院・農学研究院・教授

研究者番号: 30236921

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者