

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14956

研究課題名(和文) 樹木細胞壁の木化に及ぼす非セルロース性多糖類の影響

研究課題名(英文) The effect of non-cellulosic polysaccharides on lignification of wood cell walls.

研究代表者

吉永 新 (Yoshinaga, Arata)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60273489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：カジノキ引張あて材木部繊維と師部繊維のG層にペルオキシダーゼ活性があることを確認後、キシロオリゴ糖を吸着させた。その後コニフェリルアルコールと過酸化水素を加え、これらのG層の人為的木化を試みた。その結果、引張あて材のG層と師部繊維のG層の木化が確認され、キシロオリゴ糖の添加により木化が促進されていることが示唆された。リグニンの結合様式に特異的なモノクローナル抗体で免疫蛍光標識した結果、予想に反して、人為的木化を行う前の師部繊維と引張あて材のG層において8-0-4'型構造に対する抗体の標識が見られ、G層中に特定の構造のリグニンまたはリグニン様物質が微量に存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非セルロース性多糖類が木化に及ぼす影響については、酢酸菌のシートやセルロースナノファイバーを用いた研究が存在するが、それらのセルロースマイクロフィブリルの配向はランダムであり、一次壁の木化の模倣にはなるものの、セルロースマイクロフィブリルが規則正しく配列する二次壁の状態とは異なる。本研究の独創的な点は、セルロースマイクロフィブリルが配向するG層を用いて、キシロオリゴ糖が木化に及ぼす影響を見出したことである。予想に反して、リグニンがほとんど含まれないはずのG層に特定の構造のリグニンあるいはリグニン様物質の存在が示唆されたことは、これまでの通説とは異なる点であり、学術的に新規な知見と言える。

研究成果の概要(英文)：Using peroxidase activity located in the G-layer of tension wood fibers and phloem fibers in *Broussonetia papyrifera*, these G-layers were artificially lignified by addition of coniferyl alcohol and hydrogen peroxide after treatment of xylooligosaccharide. Lignification of G-layers may be stimulated in the presence of xylooligosaccharide. As a result of immunofluorescence labeling with monoclonal antibodies against lignin substructures, unexpectedly the original G-layers without addition of coniferyl alcohol and hydrogen peroxide may contain small amount of 8-0-4' linked lignin or lignin-like materials.

研究分野：樹木細胞学

キーワード：引張あて材 G層 師部繊維 ペルオキシダーゼ 木化 キシラン ペクチン アラビノガラクトンプロテイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

広葉樹引張あて材に形成される G 層にはリグニンがほとんど存在しないとされている。近年では非セルロース性多糖類(キシログルカン、ペクチンの側鎖であるガラクトン、アラビノガラクトンタンパク質)の存在が報告され、そのあて材形成における役割が議論されている。1950年代に G 層にペルオキシダーゼ活性が存在することが報告されているが、G 層になぜリグニンが沈着しないのかについては不明のままである。申請者は数種の日本産広葉樹を用いて傾斜に伴う師部繊維の組織構造及びリグニン分布の変化を調べた(Nakagawa et al. Ann. Bot., 110, 897-904, 2012)。その結果、アカメガシワの師部繊維において、G 層と薄い木化した L 層が交互に堆積され、傾斜によって層の数が増加することを見いだした。同種の師部繊維について、キシラン分布を調べた結果、木化する S₁, S₂ 層と L 層にキシランが分布することを見だし、さらに木部の G 層にも薄い L 層が存在することを見いだした(Nakagawa et al. Tree Physiol., 34, 1018-1029, 2014)。その不均一な木化の原因を解明するため、ペルオキシダーゼ活性を調べた結果、予想に反して、師部繊維、あて材のゼラチン繊維ともに木化しないはずの G 層全体に強いペルオキシダーゼ活性があることを見いだした。そこで、これらの試料に化学構造の異なるヘミセルロース等の多糖類を添加し、その後にモノリグノールを添加することで、木化における多糖類の種類や化学構造の影響を明らかにできると着想するに至った。これまで、酢酸菌のシートやセルロースナノファイバーを用いた類似の研究は存在するが、いずれもセルロースマイクロフィブリルの配向はランダムである。それに対して、G 層はセルロースマイクロフィブリルがほぼ一方に規則的に配向しており、木材細胞壁の大部分を占める二次壁の木化を模倣することが可能であることが期待された。

2. 研究の目的

広葉樹の師部繊維及び引張あて材の G 層には、リグニンが存在しないが、リグニン重合に関与する可能性のあるペルオキシダーゼの強い活性が見られる。そこで本研究では、この G 層に存在するペルオキシダーゼ活性を利用し、様々な条件でモノリグノールを添加して G 層の人為的木化を試み、ペルオキシダーゼにリグニン重合能があるかどうかを確認する。さらにモノリグノールの添加前に側鎖構造(アセチル基やウロン酸含量等)の異なるヘミセルロースを添加することで、木化に及ぼすそれらの多糖類とその化学構造の影響を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) G 層におけるペルオキシダーゼ活性の確認

まず、G 層におけるペルオキシダーゼの活性が引張あて材木部繊維の壁層のタイプと関連性があるかどうかを確認するため、各壁層タイプを示す広葉樹 10 樹種を用いて、引張あて材 G 層にペルオキシダーゼ活性があるかどうかを確認した。引張あて材より横断面切片を作製し、リン酸緩衝液で洗浄して可溶性のペルオキシダーゼを除去した後、発色基質を加え、光学顕微鏡を用いて活性の有無を確認した。

(2) G 層へのキシロオリゴ糖の吸着の確認

(1)において G 層にペルオキシダーゼ活性が見られた樹種について、G 層を含む 50 μ m 厚さの横断面切片を作製し、様々な濃度の市販のキシロオリゴ糖水溶液で処理し、洗浄後、切片を抗キシランモノクローナル抗体で免疫蛍光標識し、G 層へのキシロオリゴ糖の吸着の有無を調べた。

(3) G 層の人為的木化

カジノキの師部、形成中の木部から 50 μ m 厚さの横断面切片を作製し、リン酸緩衝液で繰り返し洗浄して可溶性のペルオキシダーゼを除去した。キシロオリゴ糖(市販)の 70% エタノール溶液で切片を処理し、洗浄後、切片にコニフェリルアルコールと過酸化水素を加え、師部繊維の G 層と引張あて材の G 層の人為的木化を試みた。過酸化水素や、キシロオリゴ糖を含まない場合をコントロールとした。

(4) 人為的木化前後の細胞壁におけるリグニン分布の解析

反応後の切片をエタノールで繰り返し洗浄して、低分子の重合物を除去した後、一部の切片をエポキシ樹脂に包埋した。一部の切片はアクリフラビンで染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてリグニンに由来する蛍光を観察した。また、包埋試料から厚さ約 0.1 μ m の横断面超薄切片を作製し、0.1% クエン酸ナトリウムを含む 1% 過マンガン酸カリウム水溶液でリグニンを染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

(5) 免疫蛍光標識によるリグニンの部分構造の局在解析

包埋試料から厚さ 0.5 μ m の薄切片を作製し、抗キシランモノクローナル抗体、申請者が作製したリグニン中の 8-5 型、8-8 型、8-0-4 型構造に特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて免疫蛍光標識して、蛍光顕微鏡で観察した。

(6) 免疫蛍光標識による非セルロース性多糖類の局在解析

包埋試料から厚さ 0.5 μ m の薄切片を作製し、ペクチンのラムノガラクトツロナン-1 (RG-1) とアラ

ピノガラクトンプロテイン (AGP) に対するモノクローナル抗体を用いて免疫蛍光標識して、蛍光顕微鏡で観察した。

(7)表面増強ラマン散乱を用いた抗体標識強度の定量的解析のための予備調査

蛍光標識では、励起光の照射による蛍光強度の変化が見られるため、標識強度を比較することが難しい。また、従来行われてきた透過型電子顕微鏡を用いた金標識密度の測定では測定範囲を狭くせざるを得ず、たくさんの場所で標識強度を比較することが困難である。そこで、光学顕微鏡レベルで標識強度を定量的に比較する方法を確立するため、ミズメ分化中木部に抗キシラン抗体、ついで金標識二次抗体を反応後、ラマンレポーターとしてDTNBを反応させ、銀増感試薬で処理した。その後、顕微ラマン分光装置を用いて細胞壁各部位におけるラマンスペクトルを測定した。

4. 研究成果

(1)G層におけるペルオキシダーゼ活性

広葉樹10樹種を用いて、引張あて材G層にペルオキシダーゼ活性があるかどうかを確認した結果、一部の樹種では活性が見られない場合もあり、G層を持つ木部繊維の壁層構造とペルオキシダーゼ活性との間に明瞭な関連性は見られなかった。調査した樹種のうちで、カジノキでは、師部繊維にもリグニンがほとんどないG層が見られ、G層に強いペルオキシダーゼ活性が見られた。2年間傾斜させ、凍結保存したカジノキでは、師部では二次師部全体にわたって師部繊維のG層に強いペルオキシダーゼ活性が観察された。木部側では、採取した年に形成された当年輪だけでなく、前の年に形成された前年輪に存在する木部繊維のG層に強いペルオキシダーゼ活性が存在することが明らかになった。G層におけるペルオキシダーゼの存在については1950年代に報告があるのみで、樹種も限られている。本研究の成果は多くの樹種でその存在を確認したもので、新しい知見と言える。モデル樹木のポプラでもその活性は見出されたので、遺伝子情報と合わせて詳しく解析することで、引張あて材形成におけるその役割について新たな展開へとつながる可能性がある。

(2)G層へのキシロオリゴ糖の吸着

切片にキシロオリゴ糖を反応させると、師部繊維のG層にキシロオリゴ糖の吸着が観察された。一方、木部側のG層では、キシロオリゴ糖の添加により、わずかながらG層においてキシロオリゴ糖の存在を示す蛍光が観察された。キシロオリゴ糖の濃度を変えて実験したところ、濃度の増加とともにG層の蛍光が強まったが、溶液の粘度の増加とともに蛍光が弱くなる傾向が見られた。このことから、G層へのキシロオリゴ糖の吸着には適切な濃度の溶液を使用する必要があることが示唆された。師部繊維のG層と、木部側の引張あて材の木部繊維のG層を比較すると、キシロオリゴ糖の吸着の度合いは師部繊維のG層の方が高かった。このことから、師部繊維のG層と木部繊維のG層では何らかの成分組成や微細構造に違いがあることが推測された。

(3)G層の人為的木化

人為的木化を試みたカジノキでは、引張あて材のG層と、師部繊維のG層でリグニンの存在を示す蛍光が増加し、キシロオリゴ糖を加えた場合に最も強い蛍光が観察された。このことは、キシロオリゴ糖が存在することにより、G層の木化に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆している。引張あて材のG層よりも、師部繊維のG層で強い蛍光が観察された。透過型電子顕微鏡で師部繊維の細胞壁を観察すると、コニフェリルアルコールと過酸化水素を加えた場合と、キシロオリゴ糖やアセチル化キシロオリゴ糖の吸着後にこれらを加えた場合に師部繊維のG層全体の染色性が明らかに増加していた。このことは、G層へのキシロオリゴ糖吸着によって人為的木化に何らかの影響が生じたものを表しており、これまでにない新しい知見と言える。今後、生じたリグニンの化学構造を詳細に解析することができれば、木化に及ぼすキシランやそのアセチル化の影響が明らかにできると期待される。

(4)G層におけるリグニンの部分構造の免疫局在

無処理の切片において、師部および木部のG層には抗キシラン抗体の標識は見られなかった。このことから、G層へのキシラン吸着の有無を抗キシラン抗体を用いた免疫蛍光標識法で確認できることが明らかになった。一方、予期しない結果として、師部及び木部のG層に抗8-8型抗体のごく弱い標識が見られた。さらに、抗8-0-4型抗体の標識がG層全体にほぼ均一に見られた。このことから、無処理の師部繊維および木部繊維のG層においても8-8型及び8-0-4型で結合したごく微量のリグニンまたはリグニン様物質が存在する可能性が示唆された。このことは、キシロオリゴ糖の添加が形成されるリグニンの化学構造にどのような影響を及ぼすかについて明らかにするためには、もともとG層に存在するリグニンの存在を考慮する必要があることを示唆している。この結果は予期しないものであったが、これまでに特異性に問題が残るポリクローナル抗体によって得られた結果と一致しており、より特異性の高い抗体によりそれを再確認することができ、リグニンをほとんど含まないとするG層についてのこれまでの知見とは異なる新しい知見であると言える。今後さらに多くの樹種でそれが普遍的な現象なのかどうかも含め、さらに詳しく解析を進めていく予定である。

(5)G層における非セルロース性多糖類およびアラビノガラクトタンブロテインの分布
無処理の切片において、師部繊維のG層と引張あて材のG層全体にわたってRG-IおよびAGPに対する抗体の強い標識が見られた。このことから、無処理の師部繊維および木部繊維のG層においてもRG-I型のペクチンとAGPが存在する可能性が示唆された。このことは、キシロオリゴ糖の添加が形成されるリグニンの化学構造にどのような影響を及ぼすかについて明らかにするためには、もともとG層に存在するRG-IとAGPの存在を考慮する必要があることを示唆している。同じ抗体を用いてカジノキとタイプの異なる数種の広葉樹引張あて材を標識した結果、G層の標識パターンは引張あて材のタイプおよび樹種により異なることが明らかになった。この結果は一部これまでに報告されている内容と一致するが、所属する科による違いも見られており、新しい知見と言える。

(6)表面増強ラマン散乱を用いた標識強度の比較

金属表面に吸着した分子のラマン散乱は飛躍的に感度が上昇する現象(表面増強ラマン効果)が知られている。この現象を抗体を用いた免疫標識法に導入し、高感度での物質の定量に利用した例が報告されている¹⁾。この方法に金標識切片の光学顕微鏡下での可視化に用いられている銀増感と組み合わせることで、DTNBに由来する非常に強い散乱光が検出できることを見出した。この方法をさらに確立できれば、様々な抗体を用いた免疫標識による標識強度の比較をより多くの細胞で比較することが可能となり、有効な方法となることが期待される。

<引用文献>

1 Zhao Peng, Li Han-xia, Li Da-wei, Hou Ya-jun, Mao Leilei, Yang Mingfeng, Wang Ying, A SERS nano-tag-based magnetic-separation strategy for highly sensitive immunoassay in unprocessed whole blood, Talanta 198 巻、2019、527-533

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshinaga A, Awano T, Koda K, Tamai Y, Uraki Y, Takabe K
2. 発表標題 Immunolocalization of lignin substructures, non-cellulosic polysaccharides and arabinogalactan protein in G-layers of S1+G type tension wood fibers in several Japanese hardwoods.
3. 学会等名 1st International Lignin Symposium, Hokkaido, Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉永 新, 栗野達也, 幸田圭一, 玉井 裕, 浦木康光, 高部圭司
2. 発表標題 S1+G型の引張あて材木部繊維におけるリグニンと非セルロース性多糖類、AGPの分布
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会、函館
4. 発表年 2019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)	