

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07878

研究課題名(和文)心材形成メカニズム解明に向けた放射柔細胞に特異的な遺伝子発現プロファイリング

研究課題名(英文)Profiling of ray parenchymal cell-specific gene expression to elucidate heartwood formation mechanism

研究代表者

重藤 潤 (Jun, Shigeto)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70570852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年盛んな遺伝子研究によって、樹木成分(主にセルロースやリグニン)の生合成メカニズムが解明され、遺伝子改変によってその質や量を人為的にコントロールしようとする試みが始まっている。一方で心材形成を制御する分子メカニズムについてはほとんど分かっていないのが現状である。心材形成制御メカニズムの解明に取り組むにあたって、心材成分が合成される舞台である放射柔細胞の遺伝子発現および心材成分変化についての情報は必要不可欠である。そこで、そこで本研究では、心材化に関与する放射柔細胞と、それ以外の細胞を分離した放射柔細胞のみを対象とした網羅的な遺伝子発現、代謝物解析のためのサンプル調整の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心材の形成は樹木の特徴であり、特に心材の美しい色と高い耐腐朽性は木材利用にとって極めて重要な考慮すべき特性である。例えばスギでは黒色を呈する異常材が現れ、その林業上の価値は極めて低いものとなってしまう。これらを遺伝的に改良するには、その原因物質(セイクリンC、アガサレジノールなどの重合体)の動態および、生合成される分子メカニズムを知る必要がある。本研究は、“特定の放射柔細胞”を用いた“網羅的な転写解析”および“代謝物解析”に、“時間軸”を加えた動的解析を特徴としており、心材形成(様々な心材成分の生合成・細胞死・物質移動)の分子メカニズムを解明する突破口となり得る。

研究成果の概要(英文)：Recently, genetic research has elucidated the biosynthesis mechanism of tree components, mainly cellulose and lignin, and attempts have been made to artificially control the quality and quantity by genetic modification. On the other hand, little is known about the molecular mechanism that controls the formation of heartwood. Information on gene expression and changes of components in the radial parenchyma cells where heartwood components are synthesized, is essential for elucidating the mechanism of heartwood formation control. In this study, we investigated method of sample preparation for comprehensive gene expression and metabolite analysis, targeting the radial parenchyma cells involved in heartwood formation.

研究分野：植物生理学

キーワード：心材形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(研究の学術的背景)

近年盛んな遺伝子研究によって、木化(リグニン沈着)の分子メカニズムが解明され、遺伝子改変によってリグニンの質と量のコントロールする研究が始まっている一方で、心材形成を制御する分子メカニズムについてはほとんど分かっていないのが現状である。心材形成は木化とは異なり、世代時間の短い草本モデル植物に見られない樹木特有の現象であることが一因となっている。心材形成制御メカニズムの解明に取り組むにあたって、心材成分が合成される舞台である放射柔細胞の遺伝子発現および心材成分変化についての情報は必要不可欠である。これまでに、辺材から心材への移行期間に発現が上昇する遺伝子についてのいくつかの報告があるが、木部を丸ごと使用しているため、心材形成に寄与しない細胞の情報が含まれる。心材形成制御メカニズムの解明には、より正確な遺伝子発現情報の取得と蓄積が要求される。また、辺材から心材へ、逆に心材から辺材への選択的、能動的な物質輸送メカニズムが存在することが示唆されているが、どのようなタンパクが関与するかなどその実態は不明である。

申請者は、平成 23-25 年基盤研究(B)「微細組織でのリグニン蓄積と生合成遺伝子発現解析による詳細な木化過程の解明」における実験の一部に携わり、レーザーマイクロダイセクション(LMD)を用いて、細胞レベルでの遺伝子発現の定量化に成功した。また、樹木の遺伝子研究は多量に含まれる多糖類の影響から実験が困難になる場合が多いが、LMDによって不要な木化細胞を除去することによって多糖類の影響を大幅に軽減できる。したがって、特定の放射柔細胞のみの遺伝子発現を定量化しパターンすることが可能であり、得られた結果に基づき心材形成に関与する遺伝子群を同定できると考えた。

### 2. 研究の目的

色、耐腐朽性において、有利な心材の特徴を遺伝的に改良する需要が高い一方で、心材形成関連遺伝子研究の進歩は遅れている。本研究は、放射柔細胞に焦点を当て、心材化(主に細胞死、心材成分の生合成、蓄積)に関与している放射柔細胞を時空間的な視点から決定し、さらに心材化制御因子のリスト化、同定を目的とする。レーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いれば放射柔細胞のみを単離でき、しかも放射方向に段階的に単離することが可能である。特異的または網羅的な遺伝子発現解析および代謝物解析によって、心材化に関与する候補遺伝子をリスト化後、機能検証することによって心材化制御因子の同定を試みる。

### 3. 研究の方法

スギの放射柔細胞における遺伝子発現解析および代謝物解析を行う。心材形成に関与する可能性のある転写因子については機能検証実験を追加する。

[遺伝子発現解析] 放射柔細胞から LMD を用いて遺伝子発現解析に十分な量の RNA を安定して抽出する方法を確立する。その後、1 か月~3 か月ごとに放射柔細胞を採取し、RNA シーケンスによる網羅的な転写物定量解析を行う。

[代謝物解析] 心材成分生合成酵素の基質および生成物を GC-MS を用いて明らかにする。

[転写因子の機能解析] 心材形成に関わる転写因子と予想される遺伝子は、発現誘導可能なベクターを用いて培養細胞を形質転換し機能検証を行う。

### 4. 研究成果

ディスク状サンプルは、表面の霜や、サンプルの割れ等が観察された(Fig. 1)。サンプル一枚のサイズは 4 cm x 10 cm x 7 mm 程度であった。色が濃く変化している部分が心材と推定され、直径 3.5 cm 程度であった。サンプルは放射状に 8 等分に切断し (Fig 2)、放射柔細胞の観察を行うことにした。

10 μm 厚で作成できた切片を観察すると仮道管と放射柔細胞の境目および早材と晩材の境目を区別することができた (Fig. 3)。しかし、木片サンプル横断面の全エリアの切片を取ることはできない、あるいは切片を取る際にサンプルが丸まるなど、心材および辺材の区別が付かなくなるケースが生じた。そこで、より狭いエリア(特定のエリアのみが含まれているサンプル)を含むサンプルの作成を試みた (Fig. 4)。生細胞と死細胞を識別するため酢酸カーミンによる染色を行った。今後 RNA 抽出を行うことを考慮した場合、RNase を阻害するために、サンプル包埋時に用いる水として RNA later 様水溶液を用いることを検討している。



Fig. 1 2017 年 5 月中旬にサンプリングされたスギサンプル

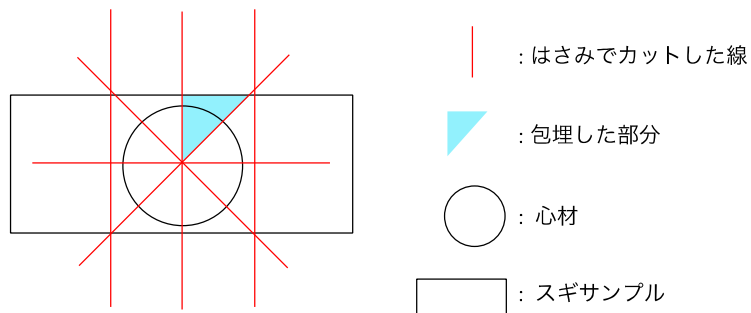


Fig. 2 サンプル模式図

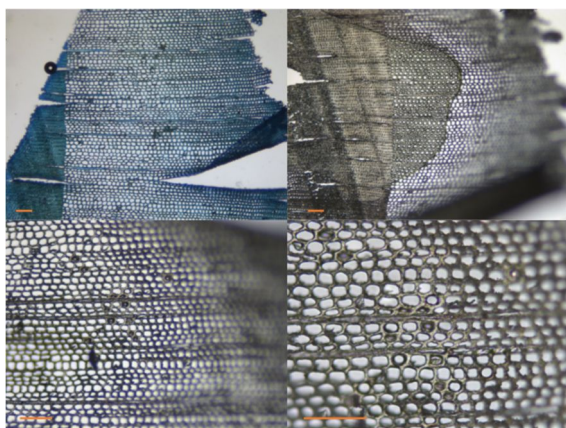


Fig. 3 10  $\mu\text{m}$  横断面切片  
 a トルイジンブルー染色  
 b- d 染色なし  
 スケールバーはすべて 100  $\mu\text{m}$

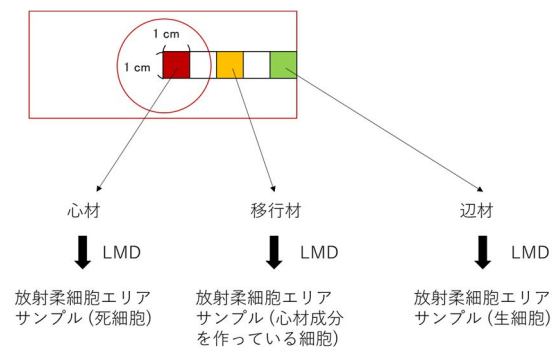


Fig. 4 RNA 分析に用いるサンプルエリア

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jun Shigeto, Hiroki Honjo, Koki Fujita, Yuji Tsutsumi	4. 巻 72
2. 論文標題 Generation of lignin polymer models via dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol and syringyl alcohol via several plant peroxidases involved in lignification and analysis of the resulting DHPs by MALDI-TOF analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Holzforschung	6. 最初と最後の頁 267-274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1515/hf-2017-0125">https://doi.org/10.1515/hf-2017-0125</a>	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 Renard J, Martinez-Almonacid I, Sonntag A, Molina I, Moya-Cuevas J, Bissoli G, Munoz-Bertomeu J, Faus I, Ninoles R, Shigeto J, Tsutsumi Y, Gadea J, Serrano R, Bueso E.	4. 巻 43
2. 論文標題 PRX2 and PRX25, Peroxidases Regulated by COG1, Are Involved in Seed Longevity in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Environ.	6. 最初と最後の頁 315-326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/pce.13656. Epub 2019 Oct 30.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tsutsumi Y, Shigeto J, Honjo
2. 発表標題 Generation of lignin polymer models via dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol and sinapyl alcohol via plant peroxidase involved in lignification and analysis of the resulting DHPs by MALDI-TOF analysis
3. 学会等名 The XXIX International Conference on Polyphenols (ICP) and the 9th Tannin Conference (TC (国際学会))
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshikay D, Shigeto J, Yokoyama Y, Tsutsumi Y
2. 発表標題 The contribution of CWPO-C to primary stage of plant growth and organogenesis
3. 学会等名 LignoBiotech 5th Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本庄裕貴, 重藤潤, 堤祐司
2. 発表標題 CWPO-Cリコンビナントタンパクを用いたシナビルアルコール類縁体の脱水素重合
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会(京都大会)
4. 発表年 2018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	中川 敏法  (Nakagawa Toshinori)  (00734261)	滋賀県立大学・環境科学部・講師    (24201)	