

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15296

研究課題名(和文)ポプラ分化中木部におけるコニフェリン輸送体の同定

研究課題名(英文)Identification of a coniferin transporter in differentiating xylem of poplar

研究代表者

津山 濯 (Tsuyama, Taku)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：40786183

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)：バイオマス活用に向けてリグニン生合成の解明が期待されているが、リグニン前駆物質の輸送は不明な点が多い。これまで樹木のコニフェリン輸送活性を明らかにしてきたが、その機能は不明である。本研究ではコニフェリン輸送活性の高いポプラミクロソーム膜画分を解析しコニフェリン輸送体候補を絞り込んだ。また、樹木分化中木部にp-グルコクマリルアルコール輸送活性を、さらにモウソウチク当年稈にコニフェリンとp-グルコクマリルアルコールの輸送活性を発見した。針葉樹、広葉樹、および単子葉類の木化組織において、コニフェリンおよびp-グルコクマリルアルコールの輸送体が保存されている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、全ての維管束植物の生存に必須なリグニン生合成において未解明なステップである、リグニン前駆物質の輸送メカニズムに関して新たな知見を与えるものであり、学術的な意義は非常に大きい。特にコニフェリン輸送体およびp-グルコクマリルアルコール輸送体が、針葉樹や広葉樹、単子葉類にまで至る幅広い植物種に存在する可能性が示唆された。本研究によりポプラにおけるコニフェリン輸送体候補が絞り込まれたが、この知見を元にした更なる研究により、バイオマスの有効活用が可能になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Elucidating lignin biosynthesis is important to utilize biomass, however, there is very little knowledge on the step of transport of lignin precursors from the cytosol to the cell wall in lignifying tissue. Coniferin transport has been found in differentiating xylem of woody plants although the role of the coniferin transport is unclear. In the present study candidates of a coniferin transporter were found in differentiating xylem of poplar by proteomic analysis. Furthermore, transport activity of p-glucocoumaryl alcohol in differentiating xylem of both poplar and Japanese cypress as well as transport activities of coniferin and p-glucocoumaryl alcohol in bamboo shoots was found in the present study. Transporters of coniferin and p-glucocoumaryl alcohol may be conserved in lignifying tissue of vascular plants.

研究分野：木質科学

キーワード：トランスポーター コニフェリン p-グルコクマリルアルコール リグニン 木化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

持続可能な社会の構築に向けてバイオマスエネルギーは重要な持続可能なエネルギー源であるが、その活用の際にリグニンが重要な因子となる。リグニンの生合成メカニズムが明らかになり、リグニンの量的、質的特性が制御可能になれば、バイオマスの有効活用が可能になると期待される。

リグニンの生合成は、前駆物質の細胞内での生合成、細胞内から細胞外への輸送、細胞外での重合の3段階に分けられる。リグニン前駆物質の生合成と重合に関しては盛んに研究がなされてきたが、リグニン前駆物質がどのように細胞内から細胞外へ輸送されるかは未だほとんど明らかになっていない。

これまでシロイヌナズナのロゼット葉から得られたミクロソーム膜画分において、ABC様の輸送体によってモノリグノールであるコニフェリルアルコール、シナピルアルコールが細胞膜を、モノリグノール配糖体であるコニフェリン、シリンジンが液胞膜を横切ることが示唆されている (Miao and Liu, Proc Natl Acad Sci USA, 2010)。だが、葉の大部分は木化しない柔細胞であり、このABC輸送体による輸送活性は木化組織の活性ではない可能性がある。

木化を制御するリグニン前駆物質輸送メカニズムの解明を目指し、以前の研究で木化を活発に行う分化中木部からミクロソーム膜を調製して輸送実験を行った。その結果、実験に用いた広葉樹、針葉樹4樹種全てにATP依存的なコニフェリンの輸送活性が存在することが明らかになった。このコニフェリン輸送にはV-ATPaseが関与し、H⁺勾配を利用した輸送であることが阻害実験から示唆された。さらにこの輸送メカニズムは広葉樹ポプラだけでなく、針葉樹ヒノキにおいても同様のものであった。コニフェリン/H⁺アンチポーターは樹木に広く保存され、重要な生理的意義を持つことが示唆される (Tsuyama *et al.*, Plant Physiol, 2013)。

リグニン前駆物質の輸送体は、シロイヌナズナにおいて*p*-クマリルアルコールの輸送体が同定された (Alejandro *et al.*, Curr Biol, 2012) のみである。だが、*p*-クマリルアルコールは植物のリグニンにおいてマイナーなH核リグニンの前駆物質であり、主要な構成要素であるG核リグニンの前駆物質であるコニフェリルアルコールや、コニフェリンの輸送体は未だ同定されていない。特に、木化を活発に行っている樹木分化中木部におけるリグニン前駆物質の輸送体については解析が進んでいない。

2. 研究の目的

分化中木部におけるコニフェリン輸送の役割を明らかにすることで、木化メカニズムの理解に大きく貢献することが期待される。そのためには、コニフェリン輸送体の膜局在と動態を明らかにすることが必要であり、コニフェリン輸送体の同定が鍵である。本研究ではポプラ分化中木部におけるコニフェリン輸送体をプロテオーム解析により絞り込むこと、また推定される機能や発現解析などから候補遺伝子をさらに絞り込むことを目的とし、最終的に候補遺伝子をタバコBY-2細胞などに過剰発現させることで機能解析を行い、コニフェリントランスポーターを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

ポプラ (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*) 分化中木部ミクロソーム膜画分を不連続ショ糖密度勾配法により分画し、コニフェリン輸送活性に差がある画分同士のプロテオーム解析を行った。同定されたタンパク質のノンラベル定量を行い、コニフェリン輸送活性がより高い画分でもより発現量が大きなタンパク質を選抜した。その中から複数回膜貫通ドメインを持つと予想されるものを輸送体候補として選抜し、さらに推定される機能からコニフェリン輸送体候補タンパク質を絞り込んだ。

ポプラ分化中木部から全RNAを抽出後、cDNAを作製した。候補遺伝子の翻訳領域をクローニングし、候補遺伝子の塩基配列を明らかにした。候補タンパク質をタバコBY-2培養細胞で過剰発現させることを目指し、バイナリベクターpGWB605に候補遺伝子配列を組み込み、アグロバクテリウムを組み換えた。組換えアグロバクテリウムを選抜し、タバコBY-2懸濁培養細胞と共培養して、BY-2細胞へのアグロバクテリウムの感染およびBY-2細胞の組換えを行った。組換えBY-2細胞を選択培地で培養し、組換え体の選抜および高発現株の取得を試みた。

ポプラおよびヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) 分化中木部からミクロソーム膜画分を調製し、H核リグニン前駆物質を基質として輸送実験を行った。不連続ショ糖密度勾配法によりミクロソーム膜画分をさらに分画し、*p*-グルコクマリルアルコールの輸送活性を明らかにした。様々な阻害剤を用いた輸送実験を行い、ポプラおよびヒノキ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を明らかにした。

さらにモウソウチク (*Phyllostachys pubescens*) の木化組織からミクロソーム膜画分を調製し、様々なリグニン前駆物質を基質として生化学的輸送実験を行った。様々な阻害剤を用いた輸送実験を行い、コニフェリンおよび*p*-グルコクマリルアルコールの輸送メカニズムを明らかにした。

4. 研究成果

(1) ポプラ分化中木部におけるコニフェリン輸送体の絞り込み

ポプラ分化中木部からマイクロソーム膜画分を不連続ショ糖密度勾配法により分画し、コニフェリン輸送活性の高い膜画分 (Fraction1) を得た。この際、輸送活性の低い膜画分 (Fraction2) も後の比較プロテオミクスに使用した (Fig. 1A)。

得られた膜画分を2次元電気泳動に供し、輸送活性の高い膜画分で発現の高いタンパク質を絞り込むことを試みた。絞り込んだタンパク質をトリプシン消化し、MALDI-TOFMSによるPeptide Mass Fingerprinting (PMF) 分析に供し、既知のポプラ (*Populus trichocarpa*) ゲノム情報から得られるデータを用いて、候補タンパク質を検索した。しかし、2次元電気泳動では膜画分間で差が見られたスポットは少なく、またPMF分析によって同定されたタンパク質は膜貫通ドメインを持たない可溶性タンパク質と推定された。これらから2次元電気泳動の過程で膜タンパク質がうまく分離できていなかった可能性が考えられる。

そこで、分画した膜タンパク質すべてを直接トリプシン消化し、nanoLC-MS/MS分析に供した (Fig. 1B)。得られたデータを用いてPMF分析を行った結果、2つの画分で合わせて2436個のタンパク質が同定され、2357のタンパク質がノンラベル定量に用いることが出来た。この中でより活性の高いFraction1で発現量が2倍以上であったものを更なる解析に用いた (Fig. 1C)。

候補タンパク質のアミノ酸配列より、膜貫通ドメインの数をSOSUIおよびTMHMMを用いて推測し、どちらのプログラムでも複数回膜貫通ドメインを持つと推測されたものを更なる候補とした (Fig. 1D)。推定される機能から物質の輸送に関与すると考えられた34個のタンパク質を、有力な候補タンパク質COPAとして絞り込むことに成功した。また、分化中木部におけるコニフェリン輸送にはABC輸送体は関与しないと示唆されている (Tsuyama *et al.*, Plant Physiol, 2013)。ABC輸送体は除くなど、予測される機能によるさらに詳細な絞り込みを行った結果、8つの最有力候補遺伝子を絞り込んだ。

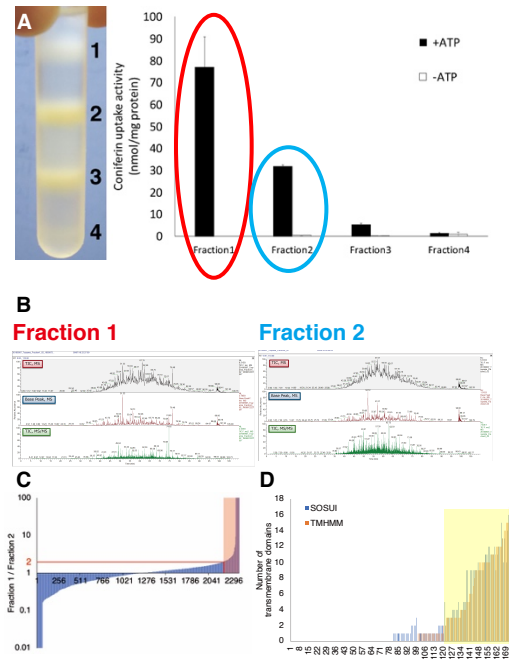


Fig. 1

- A ポプラ分化中木部マイクロソーム膜の分画
 B 分画膜の nanoLC-MS/MS 解析
 C ノンラベル定量による候補タンパク質の絞り込み
 D タンパク質構造予測による候補の絞り込み

(2) コニフェリン輸送体候補遺伝子のクローニング

ポプラ (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*) 分化中木部から全 RNA を抽出し、絞り込んだ候補遺伝子 COPA の全長翻訳領域を RT-PCR により単離した。pENTR-D/TOPO にサブクローニングし、今回、5つの候補遺伝子のクローニングに成功した。塩基配列を確認したところ、今回用いた *P. sieboldii* × *P. grandidentata* の塩基配列は参照した *P. trichocarpa* の塩基配列と約 2% 異なった。アミノ酸配列は約 96% の類似性であり、*P. trichocarpa* で予想されたものと同様の膜貫通ドメイン構造を持つと推測された (Fig. 2A)。

そこで塩基配列が確認された cDNA 配列を用いて植物発現用バイナリーベクター pGWB605 に組込んだ。大腸菌を組換えプラスミドを抽出後、目的のプラスミドが得られていることを確認した。精製プラスミドを用いてアグロバクテリウムを組換え、選抜培地でコロニーを選択した。コロニー PCR でプラスミドを保持していることを確認したアグロバクテリウムを用いて、タバコ BY-2 懸濁培養細胞と共培養し、感染させた。pGWB605 は過剰発現プロモーターと C 末端側の GFP タグを持つコンストラクトである。感染後のタバコ BY-2 細胞を BASTA により選抜し、一部 WT よりも蛍光強度が強いラインも見られた (Fig. 2B) が、再現性が得られていない。現在、過剰発現ラインの作出を進めている。

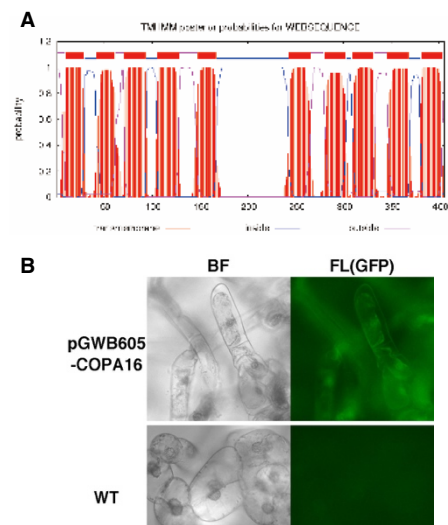


Fig. 2

- A クローニングした候補遺伝子配列から予測されるタンパク質の構造。候補タンパク質の一つ COPA16 の例。10 回膜貫通ドメインを持つことが予測される。
 B 候補遺伝子過剰発現 BY-2 細胞の作出。候補遺伝子の一つ COPA16 の例。

(3) 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活性

当初の計画には無かったものの、樹木分化中木部ミクロソーム膜画分を用いたリグニン前駆物質の生化学的輸送実験により、コニフェリン輸送体に関する新たな知見が得られた。

これまで G 核および S 核前駆物質の生化学的輸送活性については知見があるが、H 核前駆物質については知見が無い。

そこでポプラおよびヒノキ分化中木部ミクロソームを用いて H 核リグニン前駆物質の輸送活性を求めたところ、*p*-グルコクマリルアルコールの ATP 依存的な輸送活性が存在することを新たに明らかにした (Fig. 3)。

シヨ糖密度勾配法に分画した膜画分を用いて輸送実験を行ったところ、コニフェリン輸送活性と同様、密度の小さな画分で輸送活性が最も高くなった。各種阻害剤を用いた実験より、この活性には V-ATPase および H⁺勾配が関与することが示唆された。またこのメカニズムは広葉樹ポプラ、針葉樹ヒノキで共通であった。これらの特徴はコニフェリン輸送と同一のものであり、コニフェリン輸送体が *p*-グルコクマリルアルコールも認識する可能性が考えられる。

競合阻害実験の結果、*p*-グルコクマリルアルコール輸送にコニフェリンが与える影響は混合型であったことから、*p*-グルコクマリルアルコールとコニフェリンが同一の輸送体により輸送される可能性も考えられる。

以上の知見は植物における H 核リグニン前駆物質の生化学的輸送活性を示す最初の報告であり、論文として発表した (Tsuyama *et al.* Sci Rep, 2019)。

(4) モウソウチク当年程におけるリグニン前駆物質の輸送

さらに当初の計画には無かったものの、タケ木化組織から調製したミクロソーム膜画分を用いたリグニン前駆物質の生化学的輸送実験により、コニフェリン輸送体に関する新たな知見が得られた。

モウソウチク当年程の木化が活発に行われていると考えられる組織から、ミクロソーム膜画分を調製しリグニン前駆物質の輸送活性を求めたところ、コニフェリンと *p*-グルコクマリルアルコールの輸送活性が見られた (Fig. 4)。様々な阻害剤を用いた実験から、これらの輸送は、どちらも V-ATPase と H⁺勾配が関与するものであり、ABC トランスポーターは関与しないことが示唆された。これはポプラおよびヒノキ分化中木部における輸送メカニズムと同一である。これらことから、針葉樹、広葉樹、および単子葉類の木化組織において、コニフェリンおよび *p*-グルコクマリルアルコールの輸送メカニズムが保存されていることが示唆される。以上の知見は単子葉類におけるリグニン前駆物質の生化学的輸送活性を示す最初の報告であり、学会発表を行う (島田ら、第 70 回日本木材学会、2020) とともに、現在、投稿論文を執筆中である。

本研究で得られた以上の成果により、コニフェリンだけでなく *p*-グルコクマリルアルコールの輸送活性も幅広い植物種の木化組織に存在していることが明らかになり、相同性の高いコニフェリンおよび *p*-グルコクマリルアルコールの輸送体が、針葉樹、広葉樹および単子葉類にまで幅広く存在している可能性があることが示唆される。

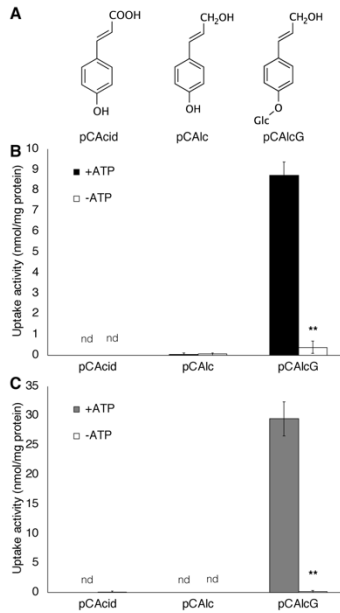


Fig. 3 分化中木部における H 核リグニン前駆物質の輸送活性
A 使用した H 核リグニン前駆物質
B, C ポプラ (B) およびヒノキ (C) 分化中木部における H 核リグニン前駆物質の輸送活性。■+ATP, □-ATP。値は 3 回の平均±標準偏差。p-グルコクマリルアルコール (pCAlcG) の ATP 依存的な輸送活性が見られた (Tsuyama *et al.* Sci Rep, 2019 より)。

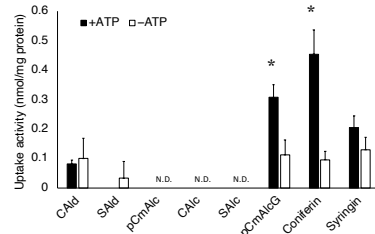


Fig. 3 モウソウチク当年程におけるリグニン前駆物質の輸送活性
■+ATP, □-ATP。値は 3 回の平均±標準偏差。p-グルコクマリルアルコール (pCAlcG) およびコニフェリンの ATP 依存的な輸送活性が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Taku, Matsushita Yasuyuki, Fukushima Kazuhiko, Takabe Keiji, Yazaki Kazufumi, Kamei Ichiro	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 8900
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://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 津山 濯	4. 巻 3
2. 論文標題 樹木分化中木部におけるリグニン前駆物質の輸送	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 63-65
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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

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 第70回日本木材学会大会
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 タケ当年稈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 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020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 モウソウチク当年稈由来マイクロソーム膜画分におけるコニフェリンおよびp-グルコクマリルアルコールの輸送
3. 学会等名 第26回日本木材学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津山 濯、榊原陽一、矢崎一史、高部圭司、亀井一郎
2. 発表標題 プロテオーム解析によるポブラ分化中木部におけるコニフェリン輸送体候補の絞り込み
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会
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 モウソウチク当年稈由来マイクロソーム膜画分におけるリグニン前駆物質の輸送
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taku Tsuyama, Yasuyuki Matsushita, Kazuhiko Fukushima, Nobukazu Shitan, Kazufumi Yazaki, Keiji Takabe, Ichiro Kamei
2. 発表標題 Transport Activities of Coniferin and p-Glucocoumaryl Alcohol in Lignifying Tissues
3. 学会等名 15th Cell Wall Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taku Tsuyama, Yasuyuki Matsushita, Kazuhiko Fukushima, Kazufumi Yazaki, Keiji Takabe, Ichiro Kamei
2. 発表標題 p-Glucocoumaryl alcohol transport activity in differentiating xylem of poplar
3. 学会等名 Gordon research Conference (Lignin) (国際学会)
4. 発表年 2018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 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 モウソウチク当年稈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 ポプラ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
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----