

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02259

研究課題名(和文)新しい細胞壁再構成系を用いたリグノセルロースの様態と細胞壁形質の連関解析

研究課題名(英文) Analysis of relationship between lignocellulose and cell wall trait using the new system to reconstruct plant cell walls

研究代表者

光田 展隆 (Mitsuda, Nobutaka)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：80450667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,380,000円

研究成果の概要(和文)：我々は繊維細胞において二次細胞壁を形成しないnst1 nst3二重変異体に、ERF転写因子を発現させることにより、一次壁成分を二次壁様に肥厚させることに成功した。さらに、追加でLXM転写因子を発現させてリグニンを追加沈着させることに成功し、強度が向上していることを確認した。しかし、Gリグニンに富んだ組成になっていることが示唆され、通常の野生株の繊維細胞に蓄積するリグニンとは異なるように思われた。そこで、リグニンのS/G比の制御にかかわる遺伝子をさらに追加で発現させたところ、Sリグニンの割合を増やせることが分かり、一次細胞壁様細胞壁にもSリグニンに富んだリグニンを形成させられることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の二次細胞壁とは木質のことであり、結晶化したセルロースとリグニンなどから成る強固なポリマー複合体である。これまで、それを別の細胞壁に置き換えるようなことは誰も考えついていなかったが、われわれは二次細胞壁を、リグニンを持たない一次細胞壁様の細胞壁に置き換えることに成功した。さらに、遺伝子操作によってそこにリグニンを足したり、リグニンの組成比まで変化させて構造を強固にすることにも成功し、人工的に、植物の細胞壁、木質をデザインしたり、置き換えたりすることが可能であることを実証した。この成果は将来的にバイオマスの利用効率を高めることで二酸化炭素排出削減などにつながると考えている。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in thickening primary wall components into a secondary wall-like structure by expressing the ERF transcription factor in the nst1 nst3 double mutant, which does not form secondary cell walls in fiber cells. In addition, we succeeded in depositing additional lignin by expressing an additional LXM transcription factor, and confirmed that the stem strength was improved. However, it was suggested that the composition was rich in G lignin, which appeared to be different from the lignin that normally accumulates in fiber cells of wild type. Therefore, we expressed additional genes involved in the regulation of the S/G ratio of lignin, and found that we could form the S-lignin-rich lignin in the primary cell wall-like thickened cell wall.

研究分野：植物バイオテクノロジー

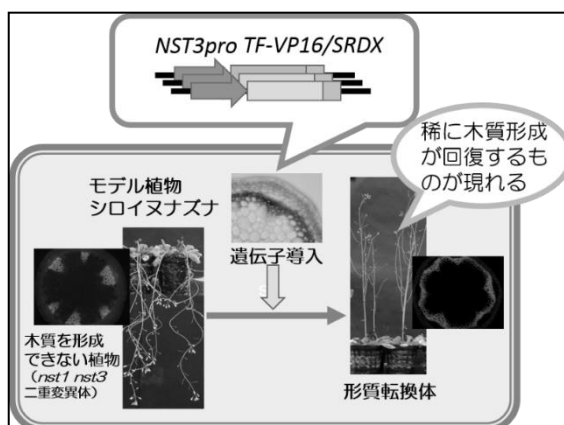
キーワード：細胞壁 木質 遺伝子 転写因子 リグニン 一次細胞壁 二次細胞壁 植物

1. 研究開始当初の背景

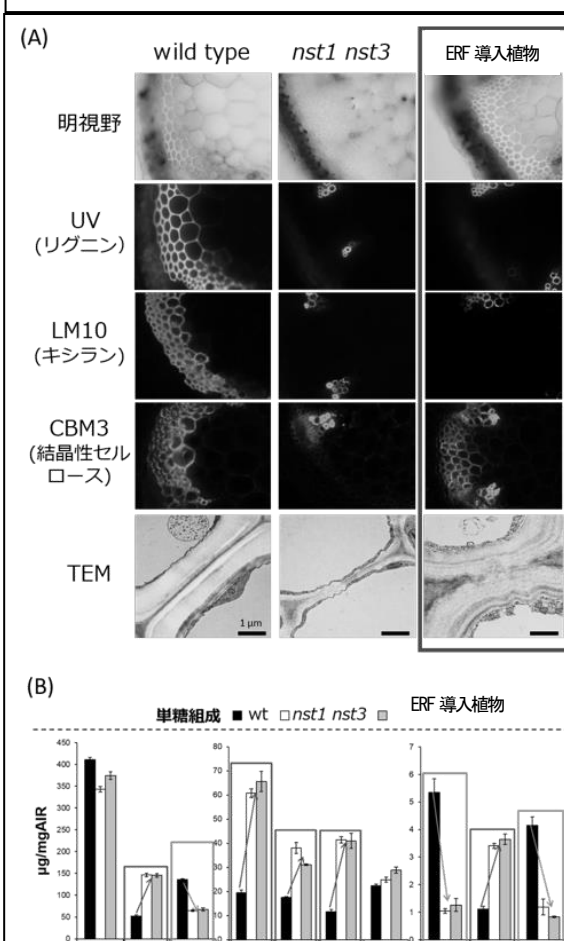
研究代表者らが世界に先駆けて発見したシロイヌナズナ *nst1 nst3* 二重変異体は繊維細胞において二次細胞壁形成が全く起きなくなっており（道管は影響を受けない）直立することができない（図1）。二次細胞壁は植物の乾燥重量の半分以上を占めることから、申請者はこの変異体を空の容器と捉え、この変異体の繊維細胞にまったく新しい木質を形成させるべく、同細胞特異的に遺伝子発現を誘導できる NST3 プロモーターを用いて約600種類もの転写因子コンストラクトを導入し、スクリーニングを行った（図1）。このスクリーニングにおいて取得した植物が本研究で使用する *nst1 nst3 NST3p:ERF035-VP16* 植物である（以下「ERF 導入植物」と呼ぶ）。この ERF 導入植物では、繊維細胞において明瞭に肥厚した細胞壁を形成するが（図2A）、その細胞壁組成は単糖組成の観点（図2B）、ペクチンを豊富に含む点、力学的性質（図3）などから考えて一次細胞壁ときわめて類似していた。また、遺伝子発現プロファイルの観点からも一次細胞壁セルロースの合成酵素遺伝子の発現が上昇するなどしており、一次細胞壁様の細胞壁が二次的に肥厚していると考えられた。しかし一方でセルロースの重合度や結晶化度は上昇しており、細胞壁の厚さや形成されるタイミング、セルロースの様態からは二次細胞壁の側面も持つことが明らかになった。申請者らはこの植物の力学的強度を向上させるため、転写因子 LXM をさらに追加導入して発現させた結果、リグニンを沈着させることに成功し、リグニンの効果により細胞壁強度が向上していることが確認できた。また、上記600種類の転写因子のスクリーニング過程において、*nst1 nst3* 二重変異体の繊維細胞に推定リグニンおよびキシランを蓄積させる新しい転写（抑制）因子 LXF も発見した（図4）。このようなことから、研究代表者らは植物の細胞壁が非常にフレキシブルであり、一次細胞壁、二次細胞壁といった分類やそれらの構成要素の様態と細胞壁の形質との関連について疑問を持つようになり、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では上記のユニークな細胞壁再構成植物を解析し、セルロースやヘミセルロース、リグニンの存在様態と力学的性質およびセルラーゼによる（セルロースの）酵素糖化性との関連性を明らかにすることで、それらの存在意義を再定義することを目的とする。リグニンやヘミセルロースの存在意義を明らかにするにはリグニンやヘミセルロースのない細胞壁にそれらを足したらどうなるかを調べるのが最も理想的である。しかし、リグニンやヘミセルロースを含まない高結晶性セルロースのみの二次細胞壁を植物に作らせることに成功した例は全くない。そこで上記背景に記



(図1) *nst1 nst3* 二重変異体とこれまで行ったスクリーニングの概要図



(図2) ERF 導入植物は一次壁様の二次壁を蓄積する

(A) ERF 導入植物では肥厚した細胞壁が見られるが、リグニンもキシランも検出できない
(B) ERF 導入植物の細胞壁の糖組成は一次細胞壁しか持たない *nst1 nst3* とほぼ同じである

そこで上記背景に記

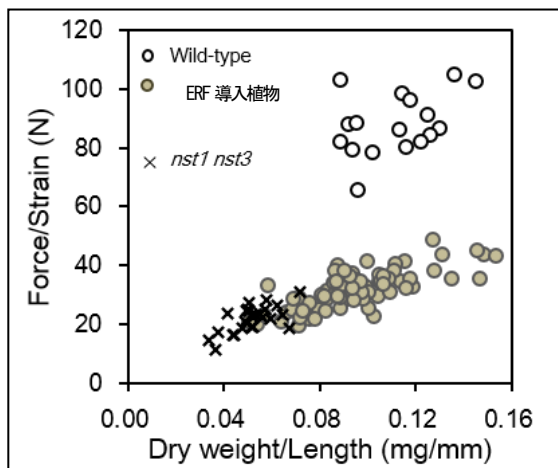
載したような植物の細胞壁を詳細に解析し、比較することによりリグニン、セルロース、ヘミセルロースの様態と細胞壁の形質との連関が明らかになり、これらの存在意義や、一次細胞壁、二次細胞壁をそうたらしめている本質的要件を再定義できると考えた。

3. 研究の方法

本研究では上述の通り、(1) 二次壁のない繊維細胞に一次細胞壁を肥厚させた植物 (ERF) (2) 二次壁のない繊維細胞に一次細胞壁を肥厚させてリグニンを沈着させた植物 (ERF+LXM) (3) 二次壁のない繊維細胞に一次細胞壁を肥厚させてリグニンとキシランを沈着させた植物 (ERF+LXF、作成する) (4) 野生株 (5) *nst1 nst3* 二重変異体、を用いる。これら全てに関して、リグニン、キシラン及びセルロースの存在様態や酵素糖化性、力学的性質を調べ、比較解析を行うことでそれらの連関を明らかにすることとした。しかし、研究過程において、NMR 解析等に供するにはこれらの植物における細胞壁肥厚が十分ではないことが明らかになり、これらの転写因子をより強力に発現させるシステムを構築することとした。追加第一弾は、繊維細胞でのみ遺伝子を発現させる NST3 遺伝子のプロモーター領域を使用していったん酵母 GAL4 転写因子を発現させ、GAL4 結合部位を繰り返し含む人工プロモーター (GAL4UAS) によってこれらの ERF や LXM 転写因子を発現させることにした。また、同じプロモーターを複数回使用するのを避けるため、ERF035 転写因子と LXM 転写因子は自己分解ペプチドなどを間に挟む形にして一続きの遺伝子として発現させることにした。さらに第二弾として、ERF035、LXM に加えてリグニンの S/G 比を制御しているとされる転写因子または酵素遺伝子を発現させるベクターを作成した。

4. 研究成果

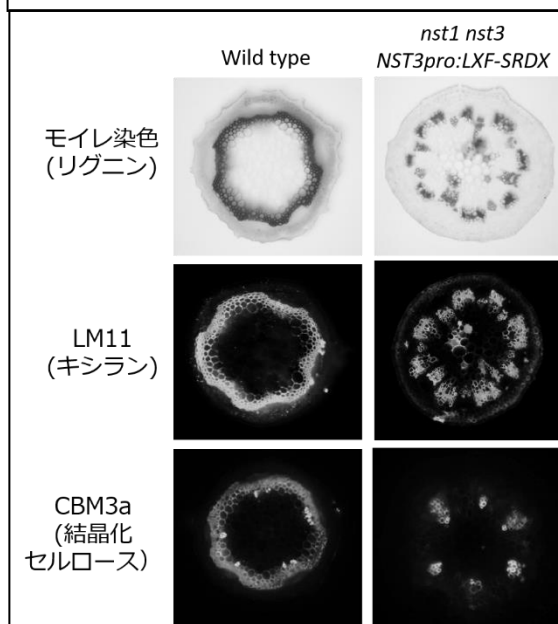
まず、「肥厚した一次壁様二次壁のみ」、「同細胞壁+リグニン」を形成させた植物において、その力学的強度を詳細に検討した結果、肥厚した一次壁様二次壁にリグニンを追加すると、力学的強度 (stiffness、ヤング率) が明らかに向上するものの通常の野生株の半分程度にしかならないことがわかった。このことはヘミセルロース成分の重要性を示唆するものである。一方で、肥厚した一次壁様二次壁にリグニンとキシランを追加したと思しきものについて、その切片観察などを慎重に実施したところ、傷害時に応答して作られるようなリグニンができていないと解釈される結果になり、我々が求めていたような植物とは異なることがわかった。このようなことからあらためてヘミセルロース成分 (キシラン) の生合成を単独で制御しうる転写因子を発見すべくインフォマティクス解析を行い、候補因子を絞り込んでそれらの働きを調べたが、最終的にわれわれが期待した性質をもつような因子は見つからなかった。そこで、*nst1 nst3* 二重変異体に、ERF および LXM 転写因子を同時発現させた植物について分析を進めることにした。国際学会にて LXM によって沈着したように見えるリグニンは実はモノリグノールやフェノリクス化合物なのではないのか、洗浄処理を行っても細胞壁から簡単に外れるようなことはないのかという指摘を受けたので、切片を洗浄処理し、顕微鏡観察を行ったところ、洗浄処理後でもリグニン由来の自家蛍光や染色が観察されることを確認できた。また、



(図 3) ERF 導入植物の引っ張り試験

横軸は (疑似) 密度 (細胞壁の厚さとはほぼ同義)、縦軸は一定の変形を引き起こすのに必要な力を表す。

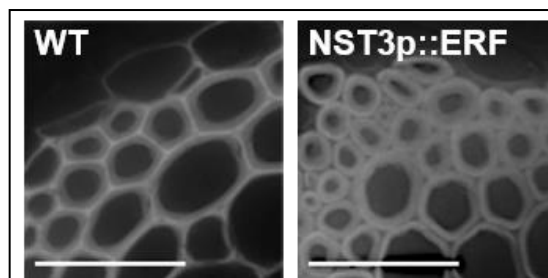
ERF 導入植物 (灰色丸) は *nst* 変異体 (×) より高強度であるが WT (白丸) よりずっと弱い。ERF 導入植物と *nst* 変異体の回帰直線はほとんど同じ傾きになる (=材質的に同等) が WT のそれは大きく異なり材質の違いを表している。



(図 4) LXF はリグニンとキシランを沈着させる

LXF 導入植物 (右側) はセルロースは沈着させないがリグニンとキシランを沈着させる。

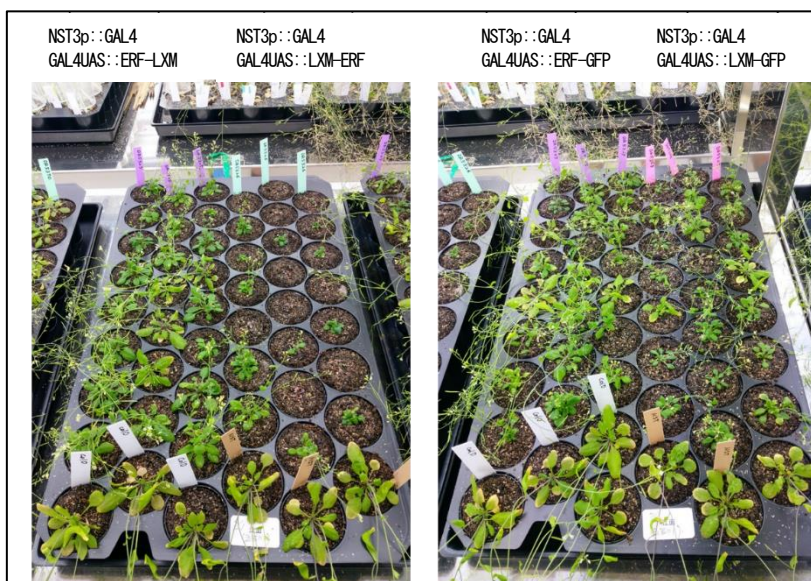
2次元 NMR 分析を実施したところ、一次細胞壁に沈着したリグニンは、野生株と異なり、G 型リグニンの偏在(S 型がみられない)がみられ、結合様式も通常とは大きく異なっているという興味深い結果を得た。しかし、多糖・リグニン間の結合を調べるには、試料の濃縮分画と再分析を行うか、より細胞壁が肥厚した試料が必要と考えられた。また、この ERF 転写因子を野生株背景で木部繊維細胞特異的に発現させると、木部繊維細胞において一次細胞壁が増えると同時に、中層・セルコーナーのリグニン沈着が起きなくなることがわかった (図 5)。



(図 5) ERF 転写因子を野生株背景で発現させると中層・セルコーナー・一次細胞壁領域のリグニン沈着が失われる

ERF035 と LXM をシンプルに NST3 プロモーターによって *nst1 nst3* 二重変異体に同時発現させた植物では細胞壁肥厚が十分ではないという問題を解決するため、酵母の転写因子をまず NST3 プロモーターで発現させて、その下流として ERF や LXM 転写因子を発現させるという二段階発現システムおよび、ERF と LXM 転写因子を連結させて発現させ、自己消化ペプチド配列を利用して発現後に分離させるシステムを利用することとした。その結果、興味深いことに、図 6 に示すように自己消化ペプチドで接続する遺伝子のうち N 末側に LXM を配置すると著しく成長阻害されることがわかった。これらの植物について T1 世代で花茎の横断切片を観察した結果 *nst1 nst3* 変異体に GUS のみを導入した植物では、*nst1 nst3* 変異体と同様に繊維細胞での二次細胞壁形成が欠損した状態であるが、ERF035 (と GFP) を導入した植物では、繊維細胞に二次細胞壁様に一次細胞壁成分が蓄積した (リグニンの自家蛍光なし)。一方で ERF035+LXM を導入した植物では二次細胞壁様に蓄積した一次細胞壁成分にリグニンが沈着している様子が自家蛍光の観察から確認された。

さらにこれらの植物の T2 世代において花茎上部、下部の横断切片を製作し、モイレ染色を行った結果、ERF035 (と GFP) のみを発現させた場合は、二次細胞壁様に一次細胞壁細胞壁の蓄積が見られたことに加え、十分成熟した茎の下部においては繊維細胞のところどころにおいてリグニンの沈着が見られた。LXM (と GFP) のみを発現させた場合は、二次細胞壁様の細胞壁肥厚が見られないものの、繊維細胞全体にリグニンの沈着が見られた。ERF035 と LXM を一続きに両方発現させた場合は肥厚した二次細胞壁様細胞壁全体に一樣なリグニン



(図 6) ERF035 と LXM など自己消化ペプチドを用いて *nst1 nst3* 変異体に同時発現させた場合の植物の成長
一番手前の行 (列によっては手前から二番目まで) はコントロール植物。

沈着が見られた。しかし、いずれにおいても沈着したリグニンは通常繊維細胞で見られるような S リグニンに富んだものではなく、G リグニンに富んだ道管様リグニンであるように見受けられた。これは先述した NMR 解析の結果とも一致する。

一次細胞壁成分には S/G 比の低いリグニンしか蓄積できないのかどうかを調べるために、これらの遺伝子に加えてリグニンの S/G 比を正に制御していると考えられている転写因子遺伝子や酵素遺伝子を共発現させる実験を行った。その結果、いずれを追加発現させてもリグニンの S/G 比が高まったと思われるようなモイレ染色像となった。このような結果から、一次細胞壁成分には G リッチリグニンしか沈着できないわけではなく、遺伝子を追加導入することで通常の二次細胞壁のような細胞壁を人工的に製作できることが実証された。このようにして製作した細胞壁がどの程度の強度を有するのか、また、リグニンがどのようにして一次細胞壁成分に沈着

しているのか、今後の研究が待たれる。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakata M.T., Sakamoto, S., Nuoendagula, Kajita, S., Mitsuda, N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Fiber Cell-Specific Expression of the VP16-Fused Ethylene Response Factor 41 Protein Increases Biomass Yield and Alters Lignin Composition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.654655	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 Sakamoto, S., Somssich, M., Nakata, M.T., Unda, F., Atsuzawa, K., Kaneko, Y., Wang, T., Bagman, A. M., Gaudinier, A., Yoshida, K., Brady, S. M., Mansfield, S. D., Persson, S., Mitsuda, N.	4. 巻 4
2. 論文標題 Complete substitution of a secondary cell wall with a primary cell wall in Arabidopsis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 777-783
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41477-018-0278-7	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 該当する
1. 著者名 Yoshida, K., Sakamoto, S., Mitsuda, N.	4. 巻 62
2. 論文標題 In Planta Cell Wall Engineering: From Mutants to Artificial Cell Walls	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1813 ~ 1827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab157	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 光田展隆	4. 巻 5
2. 論文標題 非天然木質バイオマスの創生	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 8-14
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 Yoshida, K., Sakamoto, S., Mitsuda, N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Tensile Testing Assay for the Measurement of Tissue Stiffness in Arabidopsis Inflorescence Stem	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e3327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/bioprotoc.3327	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 中田未友希、江面健太郎、坂本真吾、金子康子、吉田光毅、光田展隆
2. 発表標題 人工的な細胞壁再構築系でリグニンの意義を探索
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光田展隆
2. 発表標題 人工的な細胞壁再構築系でリグニンの効果を見る
3. 学会等名 第63回リグニン討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsuda, N.
2. 発表標題 Building up artificial synthetic cell walls in planta
3. 学会等名 Plant Cell Wall Biosynthesis 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakamoto, S., Somssich, M., Nakata, M.T., Unda, F., Atsuzawa, K., Kaneko, Y., Wang, T., Bagman, A. M., Gaudinier, A., Yoshida, K., Brady, S. M., Mansfield, S. D., Persson, S., Mitsuda, N.
2. 発表標題 Transcription factors for primary cell wall formation and their potential use in application
3. 学会等名 XV Cell Wall Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuda, N.
2. 発表標題 Wood-biomass engineering in plant --- for the development of eco-friendly wood
3. 学会等名 Korean Enzyme Engineering Conference (招待講演) (国際学会)
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	梶田 真也 (KAJITA SHINYA) (40323753)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	

	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
研究協力者	吉田 光毅 (YOSHIDA KOUKI)	大成建設株式会社	
研究協力者	坂本 真吾 (SAKAMOTO SHINGO)	産業技術総合研究所	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	江面 健太郎 (EZURA KENTARO)	産業技術総合研究所	
研究協力者	中田 未友希 (NAKATA MIYUKI)	奈良先端科学技術大学院大学	
研究協力者	西村 裕志 (NISHIMURA HIROSHI)	京都大学	
研究協力者	金子 康子 (KANEKO YASUKO)	埼玉大学	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Brookhaven National Laboratory	University of California		
カナダ	University of British Columbia			
オーストラリア	University of Melbourne			