

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H00551

研究課題名(和文) シグナル物質の作用機序とラッカーゼの構造解析による高品質漆生成技術の開発

研究課題名(英文) Development of high-quality urushi resin production technologies by the mechanism of signal transduction and structure analysis of laccase

研究代表者

田端 雅進 (Tabata, Masanobu)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・研究専門員

研究者番号：40353768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,900,000円

研究成果の概要(和文)：高品質漆の生産技術を開発するには、傷及びエチレン処理による樹体内の傷害樹脂道形成メカニズム及び硬化に関わる漆ラッカーゼの酵素タンパク質の特徴等を明らかにする必要がある。本研究において個体によるばらつきは見られたが、傷とエチレンにより傷害樹脂道形成が促進されること、各漆試料ともpI 7.35-9.30の範囲に等電点をもつ5個のアイソザイムと、pI 3.5-4.55の範囲に等電点をもつ3個のアイソザイムが検出されたこと、790-3802bpの長さを示す15遺伝子配列が漆ラッカーゼ遺伝子であると推定され、漆ラッカーゼ遺伝子はアラビドプシストで分類されたすべてのグループに存在することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漆滲出量の異なるクローン間の傷害樹脂道形成の反応性の違いの解明、及び漆ラッカーゼの構造やその多様性の解明は、それぞれ漆の生産量や漆の品質向上に影響する。これら研究の成果によって品質のよい国産漆の増産が可能になり、金閣寺や日光東照宮等重要文化財を保護し、日本の漆文化の継承・発展に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Increased production and a stable domestic supply of tree lacquer from *Toxicodendron vernicifluum* is essential for restoring national treasures and important cultural properties in Japan. Therefore, it is beneficial to clarify the mechanism of the traumatic resin canal formation in the inner bark and the characteristics of the blue copper enzyme relevant to urushiol polymerization toward the development of high-quality urushi production technology. Our study revealed that wounds and ethylene application could increase the number of the traumatic resin canals. Laccase activity staining using guaiacol showed five bands within pI 7.35-9.30 and three bands within pI 3.50-4.25. Based on the assembled sequences obtained, a search for gene sequences corresponding to laccase genes was conducted, and 15 gene sequences showing lengths of 790-3802 bp were estimated to be urushi laccase genes. Urushi laccase genes were present in all groups classified in *Arabidopsis*.

研究分野：森林保護学

キーワード：ウルシ エチレン 傷害樹脂道 漆ラッカーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウルシ(*Toxicodendron vernicifluum*)の幹に傷を付けて採取される漆は、内樹皮で生産される樹脂と木部樹液で、国宝・重要文化財の修理や漆器制作に必要な不可欠である。日本で使用される漆の約 97%を中国産が占め、国産漆は残りの 3%程度しか生産されていない。国においては平成 30 年までに国産漆のみを用いて国宝・重要文化財の修理を進める方向で取り組んでおり(文化庁 2015)、今後深刻な国産漆の供給不足が懸念されていることから、安定かつ持続的な需給体制を確立する必要性が高まっている。そのため、我々は国産漆の増産に向けたシグナル物質や DNA マーカーに関する研究を行い、エチレン等のシグナル物質の処理が漆滲出量を増加させる効果があること、ウルシクローン間で漆滲出量やウルシオール成分組成等に違いがあり、漆の硬化時間に影響を与えることを明らかにした。しかし、国産漆の生産性や品質の向上を図るには、傷及びエチレン処理による樹体内の傷害樹脂道形成メカニズム及び硬化に関わる漆ラッカーゼの酵素タンパク質の特徴等を明らかにし、高品質漆の生産技術を開発する必要がある。

2. 研究の目的

傷及びエチレン処理による樹体内の傷害樹脂道形成メカニズム及び漆ラッカーゼの酵素タンパク質の特徴等を明らかにし、高品質漆の生産技術を開発するため、以下の 4 つの項目を目的とした。

- (1) 漆滲出量の異なるクローンにおいてエチレンが傷害樹脂道の形成にどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。
- (2) 漆ラッカーゼの酵素タンパク質の特徴を明らかにする。
- (3) 漆ラッカーゼ遺伝子の長さや系統関係を明らかにする。
- (4) 漆滲出量の多いクローンを簡易に判別できる方法を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 漆滲出量の異なる 2 クローン 4 個体に対しエスレル(エチレンの発生剤)を含むラノリンを塗布してから漆掻きを行う傷エスレル処理と、対照としてエスレルを含まないラノリンを塗布してから漆掻きを行う傷ラノリン処理を行った。通常の漆掻きを行う約 4 カ月間にわたり処理を継続し、最終の漆掻きの 1 週間後に最終の掻き傷のすぐ上の部位から形成層を含む樹皮を採取し、グルタルアルデヒドで固定した。固定した試料を専用試料ホルダーに設置してから凍結し、クリオスタットで表面を平滑にした後、クライオ走査電子顕微鏡に導入した。試料表面の水分を少し昇華させるエッチング処理を行い、 -120°C 、加速電圧 3kV で二次電子像の観察を行った。通常、傷で誘導される傷害樹脂道が形成層から 200 μm の範囲で形成されるため、この範囲の樹脂道を観察し、接線方向 1 mmあたりの個数を数えた。

(2) 漆ラッカーゼの構造解析に岩手県産の初辺漆と盛辺漆、及び長野県産の初辺漆と盛辺漆を用いた。各漆試料 10ml にアセトン 30ml を加えてアセトンパウダーを得た。これに miliQ 水を 15ml 加えて溶解し、硫酸沈殿して青色の沈殿を回収した。各試料を脱塩後、限外濾過濃縮し、等電点電気泳動に用いた。各試料を等電点電気泳動により分離精製し、染色した。また、グアヤコールを用いて等電点電気泳動したゲル中のラッカーゼ活性を発色検出した。さらに、漆ラッカーゼの酵素タンパク質の特徴を明らかにするため、陽イオン交換クロマトグラフィーで分画した漆ラッカーゼ画分の 2 次元電気泳動解析を行った。

(3) ウルシクローンを供試クローンとして、初辺に相当する 6 月から末辺に相当する 9 月までの樹幹部に傷をつけた後、一週間後に傷をつけた樹幹部をそれぞれ採取した。採取した樹幹部から RNA を単離後、それぞれ次世代シーケンサーに供試し、発現する遺伝子配列を網羅的に収集した。収集配列はバイオインフォマティクス解析を行い、配列の類似性に従ってアセンブルした。得られたアセンブル配列をもとに漆ラッカーゼ遺伝子に相当する遺伝子配列を探索した。

(4) DNA 分析によって茨城県 7 カ所の分根由来のウルシ林における複数のウルシクローンの漆滲出量を測定した。さらに漆滲出長、成長特性及び葉特性と漆滲出量との関連性を調べ、漆滲出量の間接的な評価が可能な指標を探索した。

4. 研究成果

(1) 2 クローン 4 個体を調べた結果、3 個体で傷処理に対し傷エスレル処理により樹脂道数が増加した(図 1)。この結果から、個体によるばらつきは見られたが、傷とエチレンにより傷害樹脂道形成が促進されることが明らかになった。

(2) ラッカーゼ活性を発色検出した結果、各漆試料とも pI 7.35-9.30 の範囲に等電点をもつ 5 個のアイソザイムと、pI 3.5-4.55 の範囲に等電点をもつ 3 個のアイソザイムを検出することができた(図 2)。さらに、漆ラッカーゼ画分の 2 次元電気泳動解析を行った結果、中性から塩基性画分に漆ラッカーゼが 2 種類、酸性画分に 1 種類の漆ラッカーゼが存在することが明らかになった。

(3) ラッカーゼ遺伝子に相当する遺伝子配列を探索した結果、790-3802bp の長さを示す 15 遺伝子配列が漆ラッカーゼ遺伝子であると推定された。そこでモデル植物であるシロイヌナズナ(アラビドプシス)から得られていたラッカーゼ遺伝子配列(Turlapati *et al.* 2011)をもと

に NJ 法に従い系統樹を作成することで得られた漆ラッカーゼ遺伝子のグループを決定した。その結果、漆ラッカーゼ遺伝子はアラビドプシスで分類されたすべてのグループに存在することが明らかになった (図 3)。これら遺伝子配列をもとにさらにプライマーを設計し、遺伝子発現解析した結果、いくつかの遺伝子は時期及び傷害後の応答で高発現することが明らかになった。

(4) 漆滲出量は葉特性とそれぞれ高い相関係数を示した (図 4)。胸高直径と樹高、葉長と葉幅もまた、それぞれ高い相関係数を示し、成長特性と葉特性間では、胸高直径と葉特性との間でやや高い相関がみられた。これらの結果、漆滲出量の多いクローンを漆滲出長に加えて胸高直径や葉特性から簡易に判別できると考えられた。

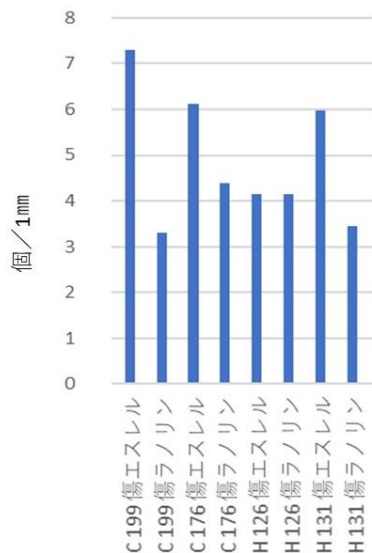


図1 樹脂道形成におけるエスレル処理の影響
形成層から200 μ mの範囲にある樹脂道の
1mmあたりの個数

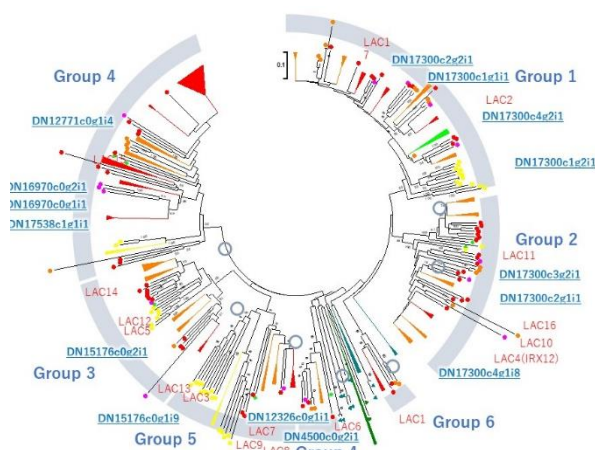


図3 ラッカーゼの系統樹 (下線: 漆に関わるラッカーゼ)

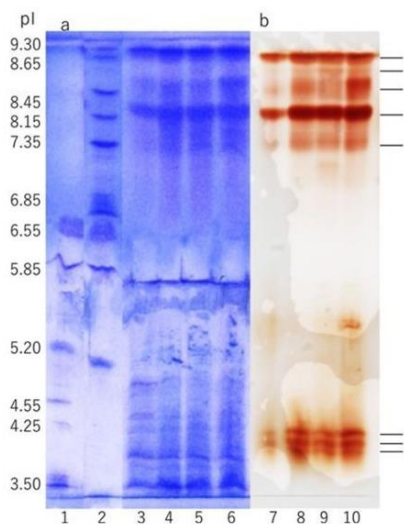


図2 等電点電気泳動

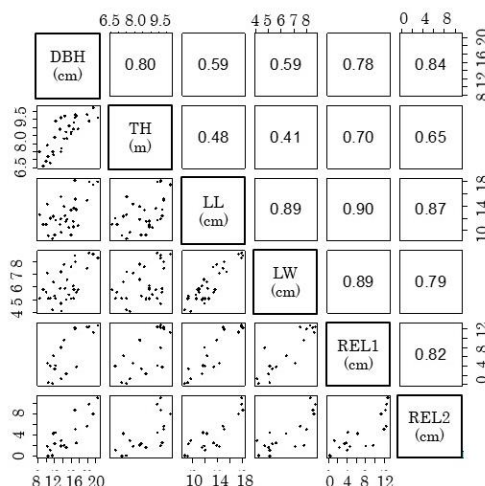


図4 調査地における胸高直径、樹高、
葉サイズ及び滲出長の関係
DBH: 胸高直径, TH: 樹高, LL: 葉長,
LW: 葉幅, REL1, 2: 漆滲出長

<引用文献>

- ①文化庁 (2015) 「国宝・重要文化財 (建造物) 保存修理における漆の使用方針について」平成 27 年 2 月 24 日付 (26 庁財第 510 号)
- ②Turlapati, Phanikanth V, Kye-Won Kim, Laurence B. Davin & Norman G. Lewis (2011) The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s) *Planta* 233: 439-470

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 TAKANO Mariko, NAKAMURA Masaya, TABATA Masanobu	4. 巻 67
2. 論文標題 Comprehensive analysis of the isozyme composition of laccase derived from Japanese lacquer tree, <i>Toxicodendron vernicifluum</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Wood Science	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s10086-021-01943-1	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 田端雅進	4. 巻 944
2. 論文標題 国産漆の増産を目指して - 日本の伝統文化を継承するために -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 森林技術	6. 最初と最後の頁 2-6
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 田端雅進	4. 巻 944
2. 論文標題 ウルシ林造成に向けた保育管理と病虫獣害防除	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 森林技術	6. 最初と最後の頁 16-19
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 田端雅進	4. 巻 48
2. 論文標題 良質な漆の生産とウルシ材の利用を目指す健全なウルシ林の造成	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 グリーン・エージ	6. 最初と最後の頁 24-28
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 田端雅進	4. 巻 101
2. 論文標題 漆文化の継承と発展を目指した国産漆の使用100%化に向けて	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本森林学会誌	6. 最初と最後の頁 295 ~ 297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4005/jjfs.101.295	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 渡辺敦史、田村美帆、泉湧一郎、山口莉未、井城泰一、田端雅進	4. 巻 101
2. 論文標題 DNAマーカーを利用した日本に現存するウルシ林の遺伝的多様性評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本森林学会誌	6. 最初と最後の頁 298 ~ 304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4005/jjfs.101.298	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 船田良、保坂路人、山岸祐介、塚田健太郎、Md Hasnat Rahman、田端雅進、半智史	4. 巻 101
2. 論文標題 漆生産量の異なるウルシにおける樹皮の組織構造の解剖学的解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本森林学会誌	6. 最初と最後の頁 305 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4005/jjfs.101.305	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 小野賢二、平井敬三、田端雅進、小谷二郎、中村人史	4. 巻 101
2. 論文標題 ウルシ植栽適地の土壌特性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本森林学会誌	6. 最初と最後の頁 311 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4005/jjfs.101.311	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 升屋勇人、田端雅進、市原優、景山幸二	4. 巻 101
2. 論文標題 国産漆の新たな脅威・Phytophthora cinnamomi	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本森林学会誌	6. 最初と最後の頁 318～321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4005/jjfs.101.318	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 田端雅進、小谷二郎、石井智朗、井城泰一、白旗学	4. 巻 101
2. 論文標題 本数密度と胴枯病がウルシ萌芽木の成長に及ぼす影響	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本森林学会誌	6. 最初と最後の頁 322～327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4005/jjfs.101.322	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 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加藤春流、田村美帆、田端雅進、渡辺敦史
2. 発表標題 漆生産の効率化に向けたウルシ遺伝情報の整備
3. 学会等名 第76回九州森林学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田端雅進、升屋勇人、安藤裕萌
2. 発表標題 ウルシ実生苗の生産を阻害するうどんこ病
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松尾晶穂、 松下範久、 田端雅進、 福田健二
2. 発表標題 ウルシ種子の複合休眠を打破する発芽促進処理の検討
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺敦史、 田村美帆、 加藤春流、 田端雅進
2. 発表標題 現存ウルシ林の遺伝的多様性
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野麻理子、 中村雅哉、 田端雅進
2. 発表標題 日本産漆ラッカーゼの多様性分析
3. 学会等名 日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田端雅進、 橋田光	4. 発行年 2020年
2. 出版社 農山漁村文化協会	5. 総ページ数 125
3. 書名 地域資源を活かす 生活工芸双書 漆2 植物特性と最新植栽技術	

〔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	渡辺 敦史 (WATANABE Atsushi) (10360471)	九州大学・農学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	福田 健二 (FUKUDA Kenji) (30208954)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授 (12601)	
研究分担者	井城 泰一 (IKI Taiichi) (40370845)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	本多 貴之 (HONDA Takayuki) (40409462)	明治大学・理工学部・専任准教授 (32682)	
研究分担者	小谷 二郎 (KOTANI Jiro) (40450811)	石川県農林総合研究センター(林業試験場)・石川県農林総合研究センター(林業試験場)・研究員(移行) (83302)	
研究分担者	中村 雅哉 (NAKAMURA Masaya) (50353793)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・研究専門員 (82105)	
研究分担者	黒田 克史 (KURODA Katsushi) (90399379)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	高野 麻理子 (TAKANO Mariko) (10353749)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	削除：2021年4月2日

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
---------	---------