

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20248018

研究課題名（和文）

スギ分子育種に向けたノルリグナン生合成の生化学的・分子生物学的検討

研究課題名（英文） Biochemical and molecular biological studies on the norlignan biosynthesis for molecular breeding of Japanese cedar *Cryptomeria japonica*

研究代表者

今井 貴規 (IMAI TAKANORI)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：20252281

研究成果の概要（和文）：

木材の利用にあたり、その諸性質は材中に含まれる化学成分に左右されることが多い。スギの場合、心材(幹等中央部の濃色部)に特徴的に含まれるノルリグナンと呼ばれる化合物群が、材色調や耐久性に関連すると考えられている。本研究では、スギがノルリグナンを作り出す(=生合成)際の酵素反応の一段階を特定すると共に、生合成後、材色発現へ向けたノルリグナンの変化の機構ならび変化物の化学構造を解明した。さらに、ノルリグナン生合成を一現象とするスギ心材形成時の生物反応(開始要因等)を遺伝子レベルで解析した。

研究成果の概要（英文）：

For wood utilization, some of the properties are often affected by the chemical compounds contained in the wood. In the case of Japanese cedar; sugi, the compounds called norlignan in the heartwood (= dark part of trunk, etc) are considered to control wood color or durability. In this research, we were able to characterize one of the enzymatic reaction in norlignan production (= biosynthesis) in sugi tree, to propose the mechanism of norlignan change toward sugi wood color expression after the biosynthesis, and to elucidate the chemical structure of the changed product. Furthermore, we analyzed the gene expression associated with biological reactions (initiation factor, etc) during sugi heartwood formation involving norlignan biosynthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	21,200,000	6,360,000	27,560,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	29,700,000	8,910,000	38,610,000

研究分野：樹木生理化学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：ノルリグナン、生合成、酵素、遺伝子、心材形成、アガサレジノール、セクイリン C、スギ

## 1. 研究開始当初の背景

植物二次代謝産物はその化学構造炭素骨格により、リグナンやネオリグナン、ノルリグナン、フラボノイド、スチルベノイド、イソプレノイド等に分類される。基礎科学としてノルリグナン生合成研究は、他の分類

の場合に比べ極めて遅れている。

ノルリグナン生合成研究が遅れている理由として、ノルリグナンは木本植物により生産されることが多く、一樹体(特に幹部分)中これを生産する細胞は僅か(≤5%)であり加えて強固な細胞壁に取り囲まれ、したがってこれらが生合成関連酵素・遺伝子を取り扱う

生化学・分子生物学実験の材料として不利であることが挙げられる。

ある種ノルリグナンを生産する *Asparagus* 属植物を代替試料とするアプローチが他研究者によりなされてはいるが、*Asparagus* には見出されない特徴的なノルリグナンを蓄積するという点、スギをその生合成研究の材料とする取り掛かりは分かり易い。

スギにおいてノルリグナンの蓄積は、心材形成時の最も激しい化学的な変化・特徴となる。心材形成とは樹木全般に見られる、老化に伴った特徴的生理現象を言う。その機構・過程等の解明は樹木基礎科学として最重要課題であるものの、真実は未解なままとなっている。

木材利用の観点から、心材の特性が材質を左右することが多い。特にスギ材利用においては、ノルリグナンは材色調や耐久性(両者は遺伝的形質である)に関連することが知られている。

以上の背景を踏まえ、ノルリグナン生合成を心材形成研究ひいてはスギ育種に向けた基盤的研究とも関連付けながら、本研究課題に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

二次代謝産物の基礎科学を充実させるため、ノルリグナンの生合成について新規な知見を得ることを最も近い目標とする。次に、ノルリグナン生合成の見地から、樹木科学基盤的課題としての心材形成科学に、化学的なアプローチを試みる。さらには、ノルリグナン生合成に関する知見に基づいた、材色優良スギ生産に向けた分子育種の道筋の提案を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) スギノルリグナン間の転換の酵素学的証明

伐採直後のスギの移行材(ノルリグナン生合成組織と考えられる)から、膜結合タンパク質画分を調製した。これを粗酵素としアガサレジノール(: 基質)、補酵素(FAD、NADH等)から成る酵素反応を行った。セクイリン C(アガサレジノール水酸化物)生成の有無をガスクロマトグラフィ質量分析法により調査した。

### (2) スギノルリグナン形質の遺伝性の統計的調査

193 スギクローン(約 250 個体)、36 スギ品種(約 100 個体)、8 スギ不完全フルダイアル交配家系およびその交配親 3 クローン(計約

250 個体)を試料とし、各試料心材メタノール抽出物量、メタノール抽出物酢酸エチル可溶部量、アガサレジノールおよびセクイリン C 含有量、両ノルリグナン組成を調査した。これら結果を統計解析することにより、各形質の遺伝性を評価した。

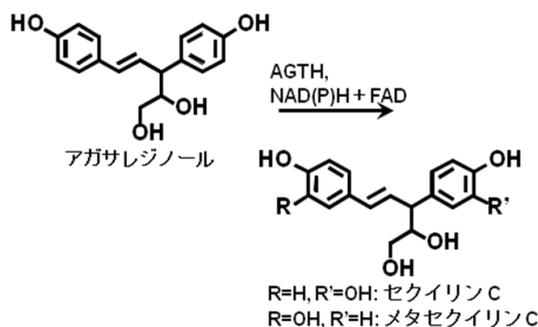
(3) スギノルリグナン生合成後二次変化の調査  
アガサレジノールおよびセクイリン C のモデル的重合物を調製し(市販フェノール酸化酵素による)、これらの化学構造についてサイズ排除高速液体クロマトグラフィー(SEC-HPLC)、炭素核磁気共鳴スペクトル法( $^{13}\text{C}$ -NMR)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MARDI-TOFMS)による解析を試みた。さらに、スギ心材から重合物画分を調製し、これについて同様の構造解析を試みた。

### (4) スギ心材形成時発現遺伝子の解析

伐採直後のスギの移行材(心材形成の場と考えられる)幹部組織から、mRNA を分離した。任意配列のプライマーの組合せを用いた蛍光ディフレンシャルディスプレイ法により移行材特異的に発現している遺伝子のクローニング・塩基配列解読・機能解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 膜タンパク質画分中にアガサレジノールからセクイリンCへの転換を触媒する酵素(アガサレジノールヒドロキシラーゼ: AGTH)活性を発見した。本酵素による水酸化反応は、補因子としてNADHならびにFADを必要とすることが確認され、酵素科学として特徴付けを行うことができた。本転換はノルリグナン生合成経路の一部としての初の提唱である。



(2) 統計解析の結果、アガサレジノールとセクイリンCの含有量・量比(ノルリグナン形質)に明確なクローン間・品種間差が認められた。特にセクイリンC量・割合の(広義の)遺伝率が高く、AGTHの高度な遺伝的制御が示唆された。他に、ノルリグナン形質は他形質(樹高、胸高

直径、心材密度・水分量)と連動しないこと、その産地間差がないこと、が確認された。

人工交配家系を用いた心材成分に関する遺伝的特性の調査の結果、抽出物量には明瞭な家系間差が確認され狭義の遺伝率は高かったが、ノルリグナン含有量・組成については家系間差が認められにくく、狭義の遺伝率は低いものであった。これは、スギ心材抽出物のうちノルリグナンはその堆積後に二次的な変質などの環境要因による影響を受けやすい形質であるためと考えられた。したがって、スギ材質とノルリグナンとの関連において、ノルリグナン生合成後の二次変化の重要性が示された。

(3) 統計解析の結果、ノルリグナン形質と材色との間に明確な相関は認められなかった。すなわち、量的・質的にノルリグナンが同等であってもスギ心材色は多様である；心材色が同等であってもノルリグナンは量的・質的に多様である、ことが示された。したがって、スギ品種・クローンによりノルリグナンを着色物質へと二次的に変化させる能力に違いがあることが示唆された。

(4) スギノルリグナン着色機構としてその酵素酸化を想定し、先ずスギ材中にノルリグナンを着色させる酵素活性を見出した。酵素反応によりセクイリン C が著しく着色し、またアガサレジノールの重合が確認される一方、セクイリン C の重合は明瞭ではなかった。したがって、スギ材色発現機構として、酵素反応によるノルリグナンの酸化重合ならびに着色構造への変化を提唱した。

次に、ノルリグナンモデル重合物を調製し、その構造解析の結果、調製物がノルリグナン基本骨格を保持した重合物であり、重合度は～10 量体程であることが確認された。分析結果の特徴として、<sup>13</sup>C-NMR では①基本骨格に相当する幅広のピークを示し②重合による新たな構造の形成により基本骨格中特定のピークが消失する、③MALDI-TOFMS では単量体相当の分子量間隔のイオン群が生成する、などが認められた。

さらに、スギ心材から分離調製された重合物画分の構造解析(モデル検証結果に基づく)の結果、本画分の化学構造は上記の①～③の特徴を示し、さらにはアガサレジノールよりセクイリン C を優勢な基本単位とすることが示唆された。したがって、初めてスギ心材中ノルリグナン重合物存在を確認すると共に、その化学構造特性を提出することができた。

(5) スギ移行材で特異的に発現している約100 遺伝子のクローニング・機能解析を達成した。

これらは一次代謝・二次代謝・転写因子・シグナル伝達・ストレス対応などに関連する遺伝子として分類され、以上の機能に基づき心材形成の開始要因や進行に伴う生物反応を推定することができた。特に、乾燥により誘導される遺伝子、呼吸関連遺伝子、二次代謝関連遺伝子の確認は、スギ心材形成誘導要因としての乾燥・細胞死、ならびに心材成分生合成を分子生物学的に支持するものである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

①心材形成の化学、今井貴規、*木材学会誌*, **1**, 11-22 (2012) 査読有り

<http://dx.doi.org/10.2488/jwrs.58.11>

②Distribution of extracts including 4,8-dihydroxy-5-methoxy-2-naphthaldehyde in *Diospyros kaki* analyzed by GC-MS and ToF-SIMS, Y. Matsushita et al. (8 人中 3 番目), *Holzforschung*, in press, 査読有り  
DOI: 10.1515/hf-2011-0214

③Clonal variation in heartwood norlignans of *Cryptomeria japonica*: evidence for independent control of agatharesinol and sequirin C biosynthesis, N. Bito, E. Fukatsu, R. Nakada, et al. (6人中6番目), *Annals of Forest Science*, **68**, 1049-1056 (2011). 査読有り  
DOI: 10.1007/s13595-011-0118-7

④Naphthalene derivatives from *Diospyros kaki*, Y. Matsushita et al. (5人中3番目), *Journal of Wood Sciences*, **56**, 418-421 (2010). 査読有り  
DOI: 10.1007/s10086-010-1115-4

⑤In vitro hydroxylation of a norlignan: from agatharesinol to sequirin C and metasequirin C with a microsomal preparation from *Cryptomeria japonica*. T. Imai et al. (4 人中 1 目), *Phytochemistry Letters*, **2**, 196-200 (2009). 査読有り, DOI:10.1016/j.phytol.2009.07.002

[学会発表] (計 39 件)

①石垣拓実ら(12 人中 12 番目)、スギ移行材部位別に発現している遺伝子の解析と心材形成に関する化学的考察、第 62 回日本木材学会大会、2012/3/15、北海道大学農学部

②尾頭信昌ら(2 人中 2 番目)、12 月採取スギ移行材から調製された粗酵素画分のアガサレジノール水酸化酵素活性、第 62 回日本木材学会大会、2012/3/15、北海道大学農学部

③坂本和之ら (3人中3番目)、スギ心材ノルリグナンの生合成後二次変化の機構および

変化物化学構造に関する研究、第62回日本木材学会大会、2012/3/17、北海道大学農学部  
④坂本和之ら(5人中5番目)、スギ心材ノルリグナンの心材色発現への関わり、第61回日本木材学会大会、2011/3/18、京都大学農学部

⑤尾頭信昌ら(8人中8番目)、フルダイアレル交配家系を用いたスギ心材ノルリグナンの遺伝性の評価、第61回日本木材学会大会、2011/3/18、京都大学農学部

⑥今井貴規、心材成分の堆積、日本木材学会組織と材質研究会秋のシンポジウム、2010/9/13、名古屋大学、招待講演

⑦中根麻衣ら(5人中5番目)、スギ移行材で発現している遺伝子の調査 2、第60回日本木材学会大会、2010/3/17、宮崎観光ホテル

⑧尾頭信昌ら(6人中6番目)、スギの心材色に及ぼすノルリグナン含有量・組成の影響の調査、第60回日本木材学会大会、2010/3/18、宮崎観光ホテル

⑨尾頭信昌ら(6人中6番目)、福島県産および高知県産スギクロン間におけるノルリグナン組成変異の探索、第59回日本木材学会大会、2010/3/17、松本大学

⑩尾頭信昌ら(4人中4番目)、スギ精英樹および在来種 35 品種のノルリグナン組成について、第59回日本木材学会大会、2010/3/16、まつもと市民芸術館

⑪浅井賢介ら(3人中3番目)、スギ心材成分ノルリグナンアガサレジノールからセクイリン C/メタセクイリン C への酵素的酸化、日本木材学会中部支部大会、2008/11/13、大垣フォーラムホテル

[図書] (計1件)

① 今井貴規、海青社、第2版木質の形成 - バイオマス科学への招待、福島ら編、pp. 229-238、250-257、425-427

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今井 貴規 (IMAI TAKANORI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：20252281

### (2) 研究分担者

福島 和彦 (FUKUSHIMA KAZUHIKO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号：80222256

(H22→H23：連携研究者)

吉田 正人 (YOSHIDA MASATO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：30242845

(H23：連携研究者)

三屋 史朗 (MITSUYA SHIRO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：70432250