

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20593

研究課題名（和文）針葉樹心材ノルリグナン生合成遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of gene involved in heartwood norlignan biosynthesis in conifers.

研究代表者

山村 正臣（YAMAMURA, Masaomi）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）・准教授

研究者番号：00948367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、スギの心材形成と連動して生産される抗菌物質ノルリグナン類の生合成に関わる遺伝子を同定するため、スギ木材の各部位（心材、移行材、辺材、葉、枝）に対し、粗酵素調製法の確立、スギ材に対するtotal RNA抽出法の確立を実施した。また、スギ材のRNA-seq解析では、一般に死んだ組織とされている心材部においても、わずかながら発現遺伝子のデータを得ることに成功した。また、スギカルスの液体培養細胞も調製することに成功しており、今後のスギカルスのRNA-seq解析に供する状況が整った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得たスギの心材、移行材、辺材部でのRNA-seqの成果は、スギ心材がどのように形成されるかという長年の謎を、分子生物学的観点から明らかにする第一歩の情報を提供するという点において学術的意義があり、本研究は将来的には心材成分のさらなる増強などにより高付加価値化されたスギ材が創出でき得るといった社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）： In this study, we established methods of crude enzyme preparation and total RNA extraction for each part of Japanese cedar (heartwood, transition wood, sapwood, leaves, and branch) in order to identify genes involved in the biosynthesis of norlignans that show antimicrobial activity and are produced at the same time as heartwood formation in cedar. In the RNA-seq analysis, we succeeded in obtaining a small amount of data on expressed genes even in the heartwood, which is generally known as dead tissue. Liquid suspension culture of Japanese cedar callus were also successfully prepared and are ready for future RNA-seq analysis of their callus.

研究分野：木質科学

キーワード：心材形成 遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

(1) ノルリグナン類は、主に針葉樹心材部に特異的に多量に蓄積している抽出成分であり、心材部における耐腐朽性の付与やスギ黒心問題原因物質として知られている。針葉樹ノルリグナン類の生合成は心材形成と連動しているため、同生合成機構の解明が心材形成機構解明の糸口になると考えられる。

(2) ノルリグナン類の中で最も単純な構造をしているヒノキレジノール (HR) は、ノルリグナン生合成経路の初発物質と考えられている。HR には (*E*)-型と (*Z*)-型の異性体があり、針葉樹などでは (*E*)-型、アスパラガスなど一部の植物からは (*Z*)-型が見出されている (図1)。これら物質は、4-クマリルアルコールと 4-クマロイル CoA のカップリングによって生じる 4-クマル酸 4-クマリルを前駆体とし、酵素反応的にそれぞれの異性体が生成されることが報告されている (文献1, 2)。

(3) ノルリグナン生合成遺伝子はこれまでほぼ同定されておらず、唯一、(*Z*)-ヒノキレジノール合成酵素 (ZHRs) 遺伝子が、アスパラガスから同定されている (文献3)。ZHRs は2種のサブユニットからなるヘテロダイマーであるが、片方のサブユニットしか存在しない場合、(*Z*)-型ではなく、スギが生産する (*E*)-型のヒノキレジノールを生成する (図1; 文献3, 4)。

(4) アスパラガスの ZHRs を構成するサブユニットは (*E*)-ヒノキレジノールの生成反応を触媒できる機能を有しているが、スギゲノム上にはアスパラガスの ZHRs 遺伝子と相同性の高い遺伝子が存在しない。それゆえ、スギではアスパラガスと全く異なる遺伝子が (*E*)-HR の生合成に関与している可能性が示唆された。

(5) スギ (*E*)-ヒノキレジノール合成酵素 (EHRs) 遺伝子を同定できれば、抗菌物質 (*E*)-HR の生物工学的生産、心材ノルリグナン類の生合成機構解明、ひいては心材形成機構解明などへの展開が可能と考えられる。

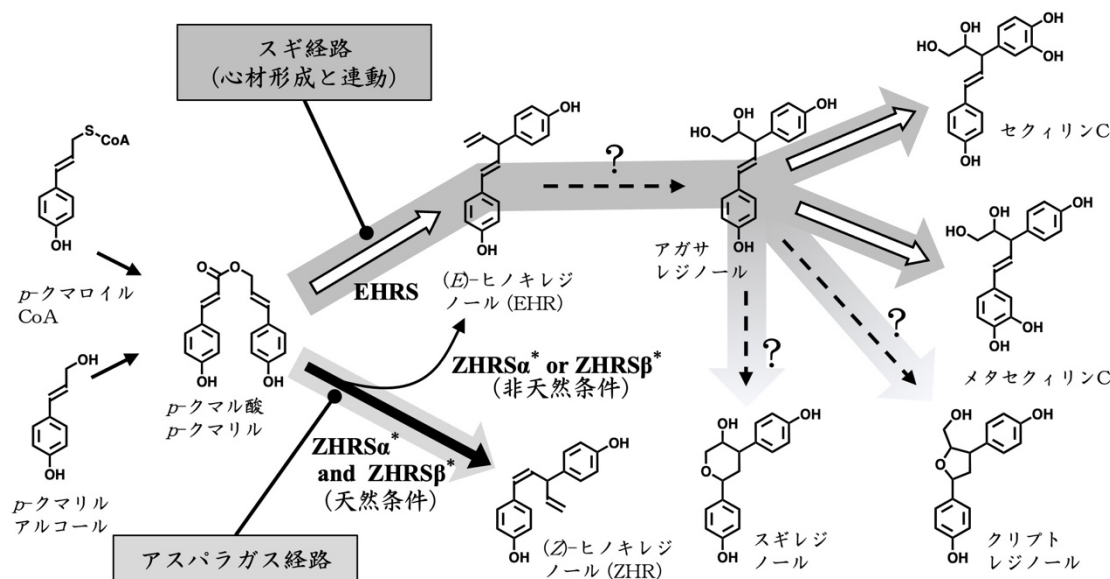


図1. ノルリグナン類の生合成

2. 研究の目的

(1) 心材形成時に発現する心材ノルリグナン類生合成遺伝子を同定するため、木材のうち、心材形成領域で発現している遺伝子の情報を得る。

(2) 発現遺伝子の網羅解析により絞り込んだ候補遺伝子を生化学的に機能解析することにより、標的とする *E*-HRS 遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) スギ木材中の心材形成部位、すなわち、辺材、移行材、心材を中心にその他数種の部位およびサンプリング時期の異なる植物試料から total RNA を抽出し、得られた mRNA を RNA-seq に供することによって部位ごとの遺伝子発現データを取得する。

(2) 液体震盪培養したスギカルスでも本研究の標的物質である(*E*)-ヒノキレジノールが生成されるため、スギ種子よりカルス誘導し、十分に増殖後、数種の培養条件(震盪の有無、エリシター処理の有無など)を検討し、遺伝子発現の異なるカルスを得る。各培養条件で得たカルスから total RNA を得た後、スギ材試料と同様に RNA-seq に供し、遺伝子発現データを得る。

(3) 近年公開されたスギゲノム配列の情報をもとに、アセンブリし、その後マッピングにより各遺伝子の発現量を算出する。

(4) 発現遺伝子群の中から、スギ心材ノルリグナン類の蓄積が急激に上昇する移行材で発現量が高い遺伝子を候補遺伝子として絞り込む。スギカルスについては、各カルスより調製した粗酵素を用いた酵素反応での比活性との相関解析により、正の相関を示す遺伝子を候補遺伝子として絞り込む。さらに、候補遺伝子の中から、既に報告されている機能既知の遺伝子、アノテーションの段階で明らかに機能が異なる酵素遺伝子、葉などノルリグナン類を生産しない部位で共発現している遺伝子、配列の長さが極端に短い遺伝子などを排除することによって、最終的な候補遺伝子を決定する。

(5) 各候補遺伝子に対し、大腸菌組換えタンパク質発現系を用いて組換えタンパク質を調製する。得た組換えタンパク質と基質である 4-クマル酸 4-クマリルと反応させ、得られた生成物を分析することにより、標的の酵素機能を有しているかを確認する。

4. 研究成果

(1) スギ材の心材、移行材、辺材(髄側、樹皮側)については夏材(9月)と冬材(1月)、さらに枝、葉を含む計 10 試料より total RNA を得ることに成功した。

(2) スギの種子を無菌条件下で発芽させ、カルス誘導することに成功した。また、無菌的に液体震盪培地において現在増殖させていることから、現段階では成果を得るに至っていないが、今後カルスを十分に増加後、様々な培養条件下でカルスを生育させ、遺伝子発現挙動が異なる試料を回収し、これについてもスギ材同様に、遺伝子発現解析を実施する。

(3) 発現遺伝子の網羅解析により、全試料では約 12 万の contig が得られ、心材では 1 万程度の contig が得られた。一般に、心材は死んだ細胞が占める組織として知られるが、本結果より心材では細胞がわずかに生き続けている、あるいは mRNA が残存している、ということが示唆された。国内外問わず、心材や移行材からの遺伝子発現データの取得および網羅解析についてはほぼ報告例がないことから、今回貴重なデータを得ることができたと言える。本研究で得た各 contig に対する発現量解析およびその他各種解析は現在実施中であるが、今後の標的とする遺伝子が同定できれば、共発現している遺伝子群を見出せると考えられ、その中には心材形成に関する遺伝子群も含まれていると予想される。

<引用文献>

1. Suzuki S., Umezawa T., Shimada M. (2001) Norlignan biosynthesis in *Asparagus officinalis* L.: the norlignan originates from two non-identical phenylpropane units. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: 3252-3257.
2. Suzuki S., Yamamura M., Shimada M., Umezawa T. (2004) A heartwood norlignan, (*E*)-hinokiresinol, is formed from 4-coumaryl 4-coumarate by a *Cryptomeria japonica* enzyme preparation. *Chem. Commun.* 2838-2839.
3. Suzuki S., Yamamura M., Hattori T., Nakatsubo T., Umezawa T. (2007) The subunit composition of hinokiresinol synthase controls geometrical selectivity in norlignan formation. *PNAS* 104: 21008-21013.
4. Yamamura M., Suzuki S., Hattori T., Umezawa T. (2010) Subunit composition of hinokiresinol synthase controls enantiomeric selectivity in hinokiresinol formation. *Org. Biomol. Chem.* 8: 1106-1110

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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