

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380102

研究課題名(和文) 微細組織でのリグニン蓄積と生合成遺伝子発現解析による詳細な木化過程の解明

研究課題名(英文) Laser microdissection-assisted analysis of lignification and related gene expression in the microstructure of woody lignifying cells

研究代表者

堤 祐司 (TSUTSUMI, YUJI)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30236921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：異なる種類の細胞や細胞壁形成過程の異なる細胞をLMDにより採取し、リグニン構造、ならびにリグニン生合成遺伝子の発現を網羅的に解析することで、「リグニン改変木質バイオマスの創成と安定供給」への基盤的知見の形成を目的とした。

LMD切り抜き細胞からの遺伝子転写解析を行った結果、CCR遺伝子はリグニン生合成の調整段階になっている可能性が示唆された。一方、LMDサンプル0.1平方mmでリグニンの定量分析可能な技術を確認した。この技術により、リグニン形成初期で既にシリングルリグニンが形成されていること、木化が完了していると思われる組織でもリグニンの蓄積や構造変化は続いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cells were collected from the different stages of lignification or different organs by a laser micro-dissection (LMD) technique and were subjected to the analyses of lignin structure and gene expression.

Transcriptions of the lignification related genes were analyzed by Real-time PCR. COMT, CCoAOMT, and CAD, were transcribed prior to lignin deposition. The transcription levels of CCR and 4CL were lower than them. CCR stands in the lignification specific pathway; therefore it is considered to be a regulatory gene in the lignin biosynthesis. The lignin structure analysis was achieved with only 0.1 square millimeter samples as a minimum requirement by the combined LMD and Py-GC/MS. The results indicated that syringyl lignin is synthesized in the beginning of lignification, and that structural changes of lignification still proceeds even in the area in which lignification seems already completed by the histochemical observations.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：リグニン 生合成 遺伝子 発現解析 微細組織 レーザーマイクロダイセクション Py-GC/MS

## 1. 研究開始当初の背景

パルプやバイオエタノールを効率的に生産するためにリグニン含有量の低い樹木や易分解性のリグニン構造を持つ樹木など、リグニン合成の制御による有用木質バイオマスの創成が試みられている。現在までに遺伝子工学的手法によるリグニン改変樹木創成への試みはあるものの、リグニン含有量の変化が小さい、あるいは低下した場合でも同時に生育不良といった予期せぬ形質を示すなど、期待される成果が得られにくいのが現状である。

これらの要因の一つは、樹木組織内でのリグニン構造や生合成機構の不完全な理解によるものであると考えられる。リグニンを構成する3種のモノリグノールの生合成経路は明らかにされつつある。一方、分光学的手法を用いた広葉樹リグニンの局在解析では、セルコーナー、複合細胞間層、二次壁の順で木化が進行し、部位によって濃度やモノリグノール構成比などが大きく異なることが知られている。即ちリグニンは不均一なものであり、リグニン合成の制御機構を理解するには、異なる細胞種ごと、あるいは細胞壁形成過程の異なる段階に分けて詳細に解析することが必要である。

## 2. 研究の目的

異なる細胞種あるいは細胞壁形成過程の異なる細胞のリグニン分析と発現しているリグニン生合成関連遺伝子の発現解析を行うことにより、各組織・細胞種でのリグニン生合成関連遺伝子とそこで生成されるリグニンを関連づける。それにより時期・場所ごとのリグニン生合成機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、レーザーメスによる $\mu\text{m}$ オーダーで目的部位の単離が可能な Laser microdissection (LMD) 法を用いて、広葉樹ポプラ (*Populus alba* L.) から標的部位を単離し、熱分解 GC-MS によるリグニン分析を行った。また、Real-time PCR により各標的部位でのリグニン生合成関連遺伝子の発現量を調査し、リグニン生合成遺伝子発現に関するプロファイリングを行った。

## 4. 研究成果

## (1) 固定化と RNA 抽出条件の検討

サンプルから LMD による標的組織をダイセクションするまでの工程で、代謝物の保存、生細胞中の RNA 分解を防ぐために、*P. alba* の主茎を固定化する必要がある。よって RNA 収率の良い固定化法の探索を行った。

ポプラ主茎を3種類の固定液 FAA (滅菌水:エタノール:ホルムアルデヒド (37%):酢酸 = 9:9:1:1)、GA (1%グルタルアルデヒド、3%パラホルムアルデヒド、50 mM

リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.5)、50 mM NaCl)、あるいは酢酸エタノール (酢酸:エタノール = 1:3) に入れ、脱気後 4°C で1晩インキュベートして固定化した。各固定化サンプルを液体窒素で凍結粉砕し、それぞれ適量はかりとった後 Concert RNA Extraction Reagent (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出し、吸光度 ( $A_{260}$ ,  $A_{230}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{320}$ ) 測定を行った。

FAA では検出可能な量の total RNA が得られず、また、GA でも 0.21  $\mu\text{g}$  というごく微量の total RNA しか得られなかったのに対し、酢酸エタノール固定での収量は 2.98  $\mu\text{g}$  と他の固定液よりも 10 倍以上の total RNA が得られ、また純度も高かった (表 1)。従って、以降の実験では固定化に酢酸エタノールを用いることとした。

表 1 3 種固定液からの RNA 抽出量と吸光度

固定液	FAA	GA	酢酸エタノール
サンプル量 (mg)	60	50	50
230 (nm)	-0.013	0.078	0.117
260 (nm)	-0.01	0.029	0.414
232 (nm)	-0.003	0.013	0.279
RNA ( $\mu\text{g}$ )		0.21	2.98

## (2) リグニン分析

## ① LMD サンプルのリグニン分析手法の確立

LMD 法はこれまで動物細胞の取得に用いられてきた手法であり、植物細胞、特に木本植物に応用した例は少ない。さらに、採取されるサンプル量の少なさから、代謝物の分析に関する報告はごく限られている。本研究では、リグニン分析において微量サンプルをハイスループットで分析が可能な熱分解 GC-MS を用いた。また、熱分解物のメチル化剤として tetramethylammonium hydroxide (TMAH) を組み合わせた熱化学的手法 (TMAH/Py-GC-MS) を用いることにより、微量な LMD サンプルでも高感度での分析を目指した。

酢酸エタノール (1:3) で固定化したサンプルから滑走式マイクロームにより 30  $\mu\text{m}$  厚の切片を作製し、LMD 用メンブレンスライドに貼り付けた。LMD により木部を放射方向に試料切片1枚の面積で 0.1  $\text{mm}^2$  (3細胞列程度)、0.2  $\text{mm}^2$  (4~5細胞列)、0.3  $\text{mm}^2$  (5~7細胞列)での切り取りを行った (図 2)。採取した LMD サンプルに 25%TMAH 水溶液 1  $\mu\text{l}$  を加え、熱分解 GC-MS 分析 [熱分解分析条件: 500°C 4 sec、分析: SIM モード ( $m/z$ : 179, 181, 194, 209, 224, 270, 300)] に供した。その結果、0.1  $\text{mm}^2$  の試料でもリグニン由来の熱分解生成物量を十分に検出できたことから (図 1)、LMD による特定の組織のリグニン分析が可能であると判断した。

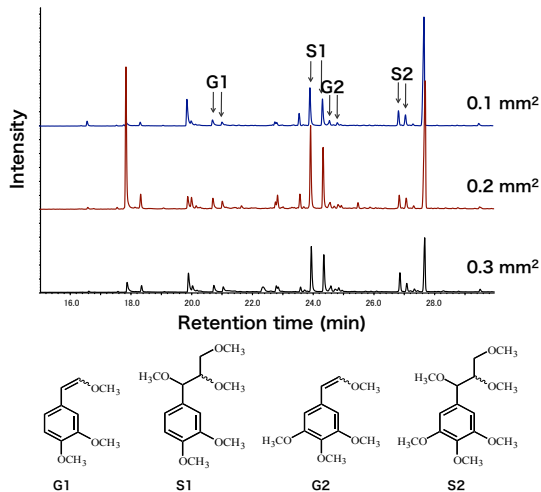


図1 各ダイセクション面積でのリグニン由来熱分解物のピークとその構造

## ② 木部組織の段階的リグニン分析

既往の組織学的研究により木化は形成層から約 50 細胞列 (図 2-D) 辺りで完了することが明らかとなっている。しかし、ポプラの木化に参与するペルオキシダーゼ“CWPO-C”の局在解析の結果、CWPO-C が死細胞 (生細胞がリグニン沈着などの分化過程を経て細胞質画分が消失した細胞) の細胞壁でも検出された。従って、細胞壁では細胞質消失後もリグニンに変化があると考え、放射方向におけるリグニン量、構造の変化を調査した。

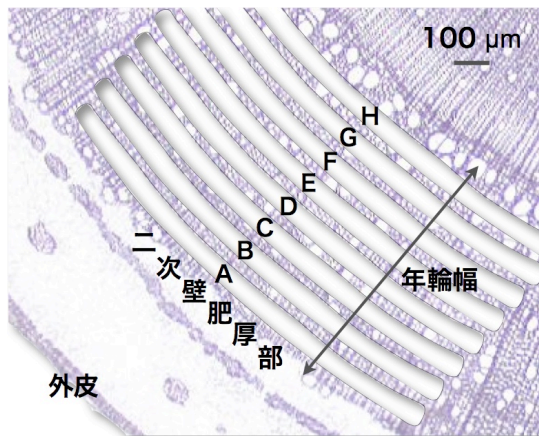


図2 LMDによる木部の段階的なサンプリングイメージ図

ポプラの1成長年輪中をLMDにより二次壁肥厚部 (分化中木部) と木部組織を8段階 (5~7 細胞列程度) で木部細胞をサンプリングし (図2)、熱分解GC-MSにより図1に示す $\beta$ -O-4 結合 (リグニン単位間結合中の約50%を占める) 由来の熱分解生成物を定量することにより、リグニン分解物およびシリングル/グアイアシル比 (S/G 比) を算出した。その結果、二次壁肥厚部ではリグニン由

来のピークがほとんど見られずリグニンの蓄積がわずかであることが確認された (data not shown)。また、ポプラ 4 個体において A~H のリグニン熱分解生成物のピーク面積、ならびに S/G 比の変化を調べた結果、木部が成熟するにつれてリグニン由来分解物量は増加する一方で、S/G 比は減少傾向が認められた (図3)。さらにこの結果から、(i) 木化が完了していると思われる 50 細胞列 (図 2-D) 以降でもリグニン含有量およびリグニン構造が変化している、あるいは、(ii) 分化開始当初は $\beta$ -O-4 結合以外の縮合型が多く形成され、木化が進行するとともに $\beta$ -O-4 結合が増加するという2つの可能性が示唆された。

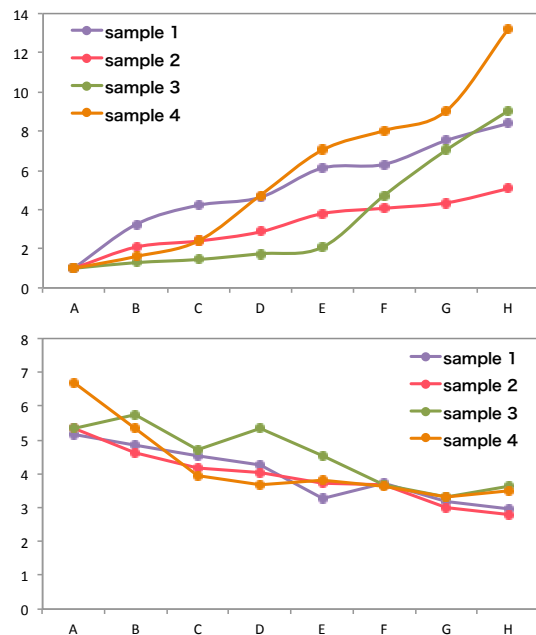


図3 各セクションのリグニン由来熱分解物のピーク面積 (上、Aを1としたときの相対値) とS/G比 (下)

## (3) リグニン生合成関連遺伝子の転写解析

リグニン分析において二次壁肥厚部ではリグニン蓄積はほとんど見られず、木化初期で $\beta$ -O-4 結合のシリングル型が多く生合成されていることが確認された。次いで、そこでのどのような酵素で遺伝子が発現しているかに関わるかを調査した。

### ① リグニン生合成遺伝子のクローニング

*P. alba* のリグニン生合成関連遺伝子の転写解析を行うにあたり、生合成に関与する7遺伝子のcDNAクローニングを行った (表2)。

### ② LMD サンプルを用いたリグニン生合成関連遺伝子転写解析プロトコルの確立

本研究では酢酸エタノール (1:3) で固定化したサンプルから切片作製後、LMD法での標的部位の切り取りを行い、RNA抽出、cDNA合成、Real-time PCRで転写解析を行うという手法を用いた。対象がLMD法による微量サンプルであるため、RNA抽出、

cDNA 合成反応ならびに Real-time PCR による発現解析の最適化を行った。

表 2 対象とするリグニン生合成関連遺伝子

フェニルプロバノイド代謝と共通な遺伝子群
フェルラ酸-5-ヒドロキシラーゼ (F5H)
ケイヒ酸-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT)
ケイヒ酸 CoA-O-メチルトランスフェラーゼ (CCoAOMT)
4-クマル酸 CoA リガーゼ (4CL)
リグニン生合成特異的な遺伝子群
ケイヒ酸 CoA エステルリダクターゼ (CGR)
ケイヒアルデヒドデヒドロゲナーゼ (CAD)
シナップアルデヒドデヒドロゲナーゼ (SAD)

Real-time PCR の定量的測定範囲を確認するために、ポプラの茎から調製した cDNA を順次希釈したものをテンプレートとして測定した結果、RNA 量依存的な Ct (Threshold Cycle) 値の変化が見られたのは、Ct 値が約 28 以下の場合であった。従って Real-time PCR による測定範囲は Ct 値 28 以下にすべきと判断した。

RNA 抽出効率および逆転写効率の高い手法確立のために、RNA 抽出試薬 Concert RNA purification reagent (Invitrogen) と TRIzol Reagent (Invitrogen) での RNA 抽出の検討、抽出後の多糖除去の検討を行った。Concert RNA purification reagent では Ct 値 28 以下の値が見られなかったのに対し、TRIzol Reagent ではほとんどの遺伝子で Ct 値 28 以下であったことから、RNA 抽出には TRIzol Reagent が適していると考えられた。さらにエタノール沈殿による多糖類の除去操作を行った結果、TRIzol Reagent による抽出を行った場合に見られていた多糖由来の 230 nm の吸収が減少し、Real-time PCR による Ct 値も 28 以下となった。このことから、より純度の高い RNA を得、Real-time PCR による精度の高い解析をするためには多糖除去操作を入れることが好ましいと判断した (表 3)。

表 3 多糖除去までの操作を行った RNA からの Real-time PCR による Ct 値

gene	試料切片枚数 (枚)	
	5	10
Actin	31.2	28.92
COMT	27.2	26.18
CAD	28.4	27.16
SAD	31.7	30.56

これまでの検討により、*P. alba* からリグニン生合成関連遺伝子の発現解析を行うにあたって、作製したプロトコルは以下の通り

である；酢酸エタノール (1:3) で固定化したサンプルから切片を作製し、TRIzol Reagent を用いて RNA 抽出する。その後、多糖除去操作を行った RNA から cDNA 合成を行い Real-time PCR を行う。

しかし、これらの条件で定量的に安定した発現量の解析をするためには 12  $\mu\text{m}$  厚の切片が約 10 枚 (約 14  $\text{mm}^2$ /1 枚) 必要であり (表 3)、この量の LMD サンプルを回収することは実質的に不可能である。そこで、定量的転写解析に向けたさらなる手法の改善策として逆転写酵素の検討、ならびに RNA 増幅の検討を行った。

これまでの逆転写には Omniscript RT (Qiagen) および Sensiscript RT (Qiagen) を用いてきた。Superscript III (Invitrogen) では反応温度が 50°C であることから熱安定性が高く、より高感度での逆転写を可能とする。よって *P. alba* からの切片を Superscript III を用いて逆転写を行い Real-time PCR を行ったところ、各遺伝子で Ct 値が約 2 減少し、より効率の良い逆転写が行われたことが確認された。一方、多糖除去操作後の RNA から RNase-Free DNase set (Qiagen) を用いて RNA 精製および濃縮と引き続く、WT-OVATION Pico RNA Amplification System (NuGEN) を用いた RNA の増幅、PCR-M (Viogene) による精製を行い RNA 増幅の検討を行った。その結果、Superscript III と比べ各遺伝子で Ct 値が 10 減少し、切片約 3 枚から増幅が、適切かつ定量的に行われたことを確認した (表 4)。

表 4 各遺伝子に対する逆転写酵素の比較

	gene		
	Actin	COMT	F5H
Sensiscript	30.61	27.29	32.42
Superscript.III	28.48	25.29	29.78
amplification	17.06	15.29	19.96

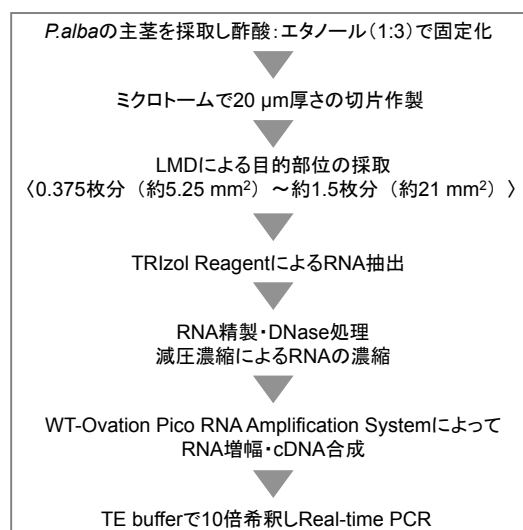


図 4 リグニン生合成関連遺伝子の転写解析までの実験スキーム

以上の Real-time PCR による発現解析の最適な条件を検討した結果、図 4 に示す実験スキームでの発現解析手法を確立した。

### ③ 二次壁肥厚部および二次木部におけるリグニン生合成遺伝子転写解析

表 4 のスキームに示す手法を用いて二次壁肥厚部と二次木部（切片 1/2 枚）のリグニン生合成関連遺伝子の発現量の比較を行った。

Actin と比較して F5H の発現量は非常に小さく、一方 COMT、CCoAOMT2、CAD については発現量が大きかった（図 5）。また、切片 1/2 枚を丸ごとホモジナイズして用いた解析、すなわち二次木部全体の平均値では CCR の発現量は大きかったのに対し、二次壁肥厚部では小さかった。

リグニン分析において二次壁肥厚部ではほとんどリグニンの蓄積が見られず、その後急速にリグニンが蓄積したことから、COMT、CCoAOMT2、CAD はリグニン蓄積に先駆けて発現していた。一方、二次壁肥厚部の CCR 発現量は二次木部全体よりも低かったことから、リグニン生合成の調節段階になっている可能性が考えられる。

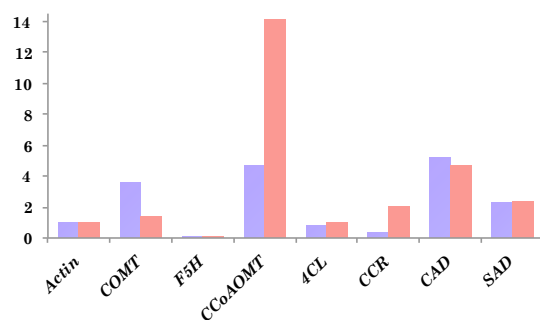


図 5 二次壁肥厚部（紫）および二次木部（赤）でのリグニン生合成遺伝子の転写解析（Actin を 1 としたときの相対値）

### (4) 総括

従来の研究では、組織や細胞種の違い、木化過程の違いによるリグニン生合成の詳細な制御プロセスを検出することは不可能であった。本研究では、LMD 法を樹木のリグニン分析、生合成関連遺伝子の転写解析に応用した手法を確立した。

LMD サンプルからの熱分解 GC-MS によるリグニン分析により、染色法や紫外線顕微鏡では木化が完了していると思われる 50 細胞列以降でも、リグニン量および構造が変化していることが示された。この結果は、放射柔細胞で合成されたモノリグノールが死細胞に輸送されることを強く示唆しており、生細胞と死細胞ではリグニン生合成プロセスが異なると考えられる。生細胞（二次壁肥厚部とリグニン沈着前の木部）では細胞内で合成されたモノリグノールが直接細胞壁

へ輸送され重合する。一方、放射柔細胞においてリグニン生合成関連遺伝子 (CCoAOMT, CAD, 4CL など) の発現が確認されていることから (Hawkins et al. Plant Physiol., 113, 321-325, 1997)、死細胞の細胞壁には柔細胞で合成されたモノリグノール類が目的の部位へ輸送され、高分子化が起こると予想される。

これらの仮説を証明するために、リグニン生合成中間体（輸送体）の解析など、LMD 法を利用したさらなる研究が求められる。またその一方で、遺伝子発現解析には熱分解 GC-MS によるリグニン分析よりも大量のサンプルが必要であるなど、転写物と代謝物を関連付けて考察するためには、まだ解決すべき課題も多く残っている。

### 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 1 件）

Jun Shigeto, Koki Fujita, Yuko Kiyonaga, Ryuichiro Kondo, Yuji Tsutsumi, Putative Cationic Cell-Wall-Bound Peroxidase Homologues in Arabidopsis, AtPrx2, AtPrx25, and AtPrx71, Are Involved in Lignification, J. Agric. Food Chem., 査読有, 61(16), 3013, 3781-3788

〔学会発表〕（計 6 件）

① 堤 祐司、マイクロダイセクション：微細組織におけるリグニン構造と生合成遺伝子の発現（招待講演）、組織と材質研究会 2012 年度秋期シンポジウム、東京農工大学府中キャンパス、2012 年 9 月 26 日

② 和田 卓、藤田 弘毅、堤 祐司、Laser microdissection を用いたリグニン不均一性制御機構の解明、第 63 回日本木材学会大会、岩手大学、2013 年 3 月 27 日

③ 大平 香織、Kasturi Banerjee、重藤 潤、堤 祐司、CWPO-C の転写およびプロモーター解析、第 64 回日本木材学会大会、愛媛大学、2014 年 3 月 14 日

④ 重藤 潤、堤 祐司、リグニンの高分子化を担う植物ペルオキシダーゼの酸化能と酸化機構、第 55 回日本植物生理学会年会、富山大学、2014 年 3 月 20 日

⑤ 重藤 潤、堤 祐司、リグニンを高分子化する植物ペルオキシダーゼの酸化能、第 58 回リグニン討論会、香川大学、2013 年 11 月 12 日

⑥ 堤 祐司、重藤 潤、長野 万里子、リグニン高分子化ペルオキシダーゼの反応特性、第 77 回日本植物学会大会、北海道大学、2013 年 9 月 13 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 祐司 (TSUTSUMI, Yuji)  
九州大学大学院・農学研究院・教授  
研究者番号：30236921

(2) 研究分担者

藤田 弘毅 (FUJITA, Koki)  
九州大学大学院・農学研究院・助教  
研究者番号：90264100

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：