

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380104

研究課題名(和文)キシログルカンが二次壁に存在する証拠

研究課題名(英文)Function of xyloglucan in the poplar xylem

研究代表者

林 隆久(Hayashi, Takahisa)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70231529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：二次壁におけるキシログルカンは、ポプラあて材G層に存在するが、キシログルカンが普遍的に二次壁S1層～S3層に存在するのか、機能を含めて不明である。木部繊維内腔表面を免疫染色し、観察した結果、野生株ではセルロースマイクロフィブリルに沿ってキシログルカンの蛍光標識が観察されたが、キシログルカナーゼ発現組換えポプラでは極く低いレベルの標識しか認められず、キシログルカンが二次壁に存在することが示された。また、組換えポプラ幹の弾性率は低くなり、キシログルカンが木部の力学的強度に関与することが明らかにされた。

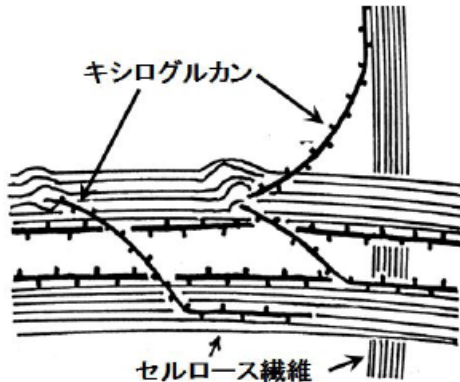
研究成果の概要(英文)：Xyloglucan is known to occur highly in the G-layers of poplar stems, where tensile stress can be generated to bend upward stems against gravitropical and mechanical stimuli. In this study, we attempted to expand the understanding of the roles of xyloglucan in xylem. We used two-year-old stems of transgenic poplars overexpressing xyloglucanase that were grown in screened housing. In the wild-type xylem, a small amount of xyloglucan was detected in the S2 and S3 layers of the secondary wall, in addition to the large amount in the primary wall due to the immunolabeling with the CCRC-M1 monoclonal antibody, but none was detected in the transgenic poplars. Static loading tests on the transgenic stems revealed a significant reduction in the Young's modulus and bending strength compared with the wild-type stems. We have concluded that the distinguishing character of xyloglucan should have structural roles in xylem.

研究分野：植物細胞壁

キーワード：キシログルカン キシログルカナーゼ ポプラ

## 1. 研究開始当初の背景

キシログルカンは、成長する植物の細胞壁(一次壁)に多く存在し、セルロースマイクロフィブリルに水素結合で結びつき、マイクロフィブリルどうしを架橋している。



### セルロース繊維を架橋するキシログルカン

成長している細胞の伸長と肥大は、キシログルカン糖鎖の分解またはつなぎ換えによって生じる。キシログルカンが植物細胞の伸長・肥大時期においてマイクロフィブリル間の「ゆるみ」を制御し、それ故に一次壁の重要なヘミセルロースであることは多くの研究者の一致するところである。

二次壁におけるキシログルカンについては、ポプラあて材 G 層にキシログルカンが少量であるが存在することが示された (Nishikubo et al.(2007) *Plant Cell Physiol*; Baba et al.(2009) *Mol Plant*)。また、プロテオミクス解析からも、キシログルカンを基質としてつなぎ換え反応を触媒する XET (キシログルカンエンドトランスグルコシラーゼ) が G 層中に存在することも示された (Kaku et al.(2009) *J Wood Sci*)。しかしながら、キシログルカンが普遍的に二次壁 S1 層~S3 層に存在するのか、すなわち二次壁形成中に生合成されているのか、あるいは、一次壁由来のキシログルカンが XET のつなぎ換え反応によって結果的に二次壁や G 層に存在するのか、キシログルカンの機能を含めて、不明である。

## 2. 研究の目的

キシログルカンが二次壁に存在すること

を明らかにする。

キシログルカンの二次壁における機能を明らかにする。

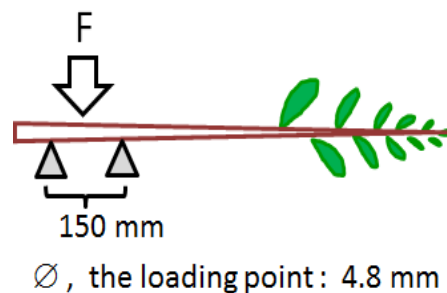
## 3. 研究の方法

### (1)木部繊維細胞内腔表面におけるキシログルカンの免疫染色

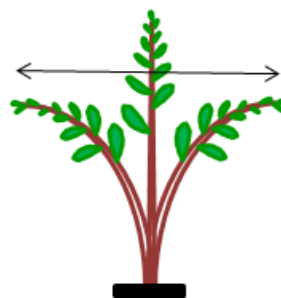
キシログルカンの存在は、キシログルカンを特異的に認識する抗体 (CCRC-M1, LM15) を用いて間接蛍光免疫染色により、木部繊維細胞内腔表面の S2, S3 層のキシログルカン標識を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### (2)ポプラ幹の力学的強度の解析

細胞壁ヤング率の測定は、曲げ試験法によって、減衰定数は、自由振動法によって行った。



曲げ試験法：一定の力 F で荷重をかけ、幹が下方にたわむ変位を測定し、ヤング率を算出する。



自由振動法：幹の先端を水平に手で引っ張り離すと幹は固有振動数で振動する。この振動をビデオで撮影し、30分の1秒、1フレームとして変位(振幅)をイメージから計測する。この振幅の減衰から減衰定数を求める。

### (3)糖鎖の解析

木部を粉碎し、木粉から4% KOH (4% KOH 溶出糖鎖画分)、続いて、24% KOH (セルロース間の水素結合が解離するアルカリ) で抽出 (24% KOH 溶出糖鎖画分) し、これらを DEAE-Sephadex A-25 陰イオン交換クロマトグラフィー、セルロースカラムに供した。

固形水酸化ナトリウム法によりメチル化分析を行い、キシログルカンに特異的な糖鎖の結合 (4, 6-glucose) の相対値からキシログルカン量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1)キシログルカンは、一次細胞壁のみならず、二次細胞壁にも普遍的に存在する。

木部繊維細胞の内腔表面を免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、野生株の繊維細胞の内腔表面には S2、S3 層のセルロースマイクロフィブリルに沿ってキシログルカンの蛍光標識が観察された。一方、キシログルカナーゼ発現組換えポプラ (キシログルカンが分解されたポプラ、以降、組換えポプラと表示する) では極く低いレベルの標識しか認められなかった。この結果から、キシログルカンは、二次壁に存在することが示された (海田るみ他、日本木材学会 2011 で発表)。

### (2)キシログルカンが木部の強度、および揺れに寄与する。

日立の林木育種センターの組換え体網室で生育させた2年生の組換えポプラの幹の力学的特性を野生株と比較した。



野外試験中の組換えポプラ

三点荷重方式により主幹基部に荷重をかけて調べたところ、組換えポプラのヤング率、及び曲げ強度が野生株に比較して減少した。すなわち、組換えポプラの幹はキシログルカンが減少したことにより、しなりやすくなることが示された。

また、幹の基部を固定し、幹の上部先端を手で引っ張ると、幹は固有振動数に従って揺れる。この振動の減衰率を調べたところ、組換えポプラの減衰定数は小さく、振動数も小さくなった。すなわち、組換えポプラは、揺れが長く続き、静止しにくくなった。キシログルカンが木部の力学的強度に関わることが明らかにされた (海田るみ他、日本木材学会 2012 で発表)。

### (3) 木部へミセルロースの糖鎖結合構造

木部マトリックス糖鎖のうちキシログルカンの含量は数パーセントと僅かである。この僅かにしか存在しない糖鎖が木部の強度に関わる理由として、キシログルカンが木部のメジャー糖鎖成分であるキシランやグルコマンナンなどと結合していることが推測される。このことを調べるために、木部から4% KOH、続いて24% KOHによりへミセルロースを抽出してそれぞれの糖鎖解析を行った。メチル化分析の結果から、4% KOH 溶出糖鎖画分にはキシログルカンがほとんど検出されなかったため、24% KOH 溶出糖鎖画分 (セルロース間の水素結合が解離するアルカリ) に焦点を当てた。

24% KOH溶出糖鎖をDEAE-Sephadex A-25 陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、リン酸バッファー、続いて塩化ナトリウムの順に溶出し、中性糖画分、及び酸性糖画分を得た。これらの画分のメチル化分析を行った結果、野生株組換えポプラ木部には、中性糖へミセルロース中にキシログルカンが0.8%、酸性糖へミセルロースには0.2% 存在することが示

された。組換えポプラにおいてはキシログルカンが検出されなかった (International Symposium on Wood Science and Technology 2015 で発表)。

前述の野生株、及び組換えポプラ木部から 24% KOH で溶出したヘミセルロースを陰イオン交換クロマトグラフィー、DEAE にかけて得られた中性糖、及び酸性糖について、次に、これをセルロースカラムにかけ、セルロースと結合するヘミセルロースを分離した。

メチル化分析を行った結果、セルロースと結合しないマトリックス多糖は、中性糖ではグルクロノキシラン、酸性糖においては、グルクロノキシランとホモガラクトン RG-I であった。一方、セルロースと結合したマトリックス多糖は、グルクロノキシラン、グルコマンナン、およびキシログルカンであった。

メチル化分析の糖鎖結合様式に関して、野生型ポプラと組換え株の間で明確な違いが認められなかったが、キシログルカンがキシラン、あるいは、グルコマンナンと結合している可能性が示唆された。以前に Fry らによってキシログルカンがウロン酸と共有結合していると報告されており、今回のカラムクロマトグラフィーによって分離された糖鎖結合の結果から、キシログルカンが結合しているウロン酸は、グルコマンナンのグルクロン酸、もしくはキシランのグルクロン酸であると推測され、キシログルカンとペクチンと共有結合することを示す結果は得られなかった。

## 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 9 件)

(1) F Funahashi, S Ohta, T Taniguchi, M Kurita, K Konagaya, T Hayashi, Architectural and physiological characteristics related to the depressed growth of poplars overexpressing

xyloglucanase in a field study. *Tree*, 査読有 28, 2014, 65-76. DOI 10.1007/s00468-013-0930-9

(2) A Alonso-Simon, A E Encina, T Seyama, T Kondo, P García-Angulo, J M Álvarez, J L Acebes, T Hayashi, Purification and characterization of a soluble  $\beta$ -1,4-glucan from bean (*Phaseolus vulgaris* L.)-cultured cells dehabituated to dichlobenil. *Planta*, 査読有 237, 2013, 1475-1482. DOI 10.1007/s00425-013-1861-9

(3) W Dwianto, D Sudarwoko Adi, I Wahyuni, Fitria, R Kaida, T Hayashi, Enzymatic Saccharification and ethanol production of xylems from Indonesian Botanical Garden trees. *Procedia Environmental Sciences*, 査読有 32, 2013, 12-24. <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-9381e7fa-0f60-3e04-a86c-863aeb2ce948/tab/jContent>

(4) Kaku T, Baba K, Taniguchi T, Kurita M, Konagaya K, Ishii K, Kondo T, Serada S, Iizuka H, Kaida R, Taji T, Sakata Y, Hayashi T, Analyses of leaves from open field-grown transgenic poplars overexpressing xyloglucanase *J Wood Sci*, 査読有 62, 2012, 1411-1424. DOI: 10.1007/s10086-011-1247-1

(5) T Taniguchi, K Konagaya, M Kurita, N Takata, K Ishii, T Kondo, F Funahashi, S Ohta, T Kaku, K Baba, R Kaida, T Hayashi, Growth and root sucker ability of field-grown transgenic poplars overexpressing xyloglucanase, *J Wood Sci*, 査読有 62, 2012, 1281-1287. DOI: 10.1007/s10086-012-1281-7

(6) Gorshkova T, Brutch N, Chabbert B, Deyholos M, Hayashi T, Lev-Yadun S, Mellerowicz EJ, Morvan C, Neutelings G, Pilate G, Plant Fiber Formation: State of the Art, Recent and Expected Progress, and Open Questions, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 査読有 31, 2012, 201-228. <http://dx.doi.org/10.1080/07352689.2011.616096>

(7) H Iizuka, T Kaku, T Taniguchi, M Kurita, K Konagaya, K Ishii, T Kondo, K Baba, R Kaida, T Taji, Y Sakata, T Hayashi, Overexpression of xyloglucanase (AaXEG2) accelerates heteroblastic development in mangium leaves, *Wood Res J*, 査読有 3, 2011, 55-59. <http://www.mapeki.org/wrj/>

(8) Hayashi T, Kaida R, Functions of xyloglucan in plant cells, *Mol Plant* 査読有 4, 2011, 17-24.

DOI: 10.1093/mp/ssq063

(9) Yamamoto R, Saito T, Isogai A, Kurita M, Kondo T, Taniguchi T, Kaida R, Baba K, Hayashi T, Enlargement of individual cellulose microfibril in transgenic poplars overexpressing xyloglucanase, J Wood Sci, 査読有 57, 2011, 71-75. DOI: 10.1007/s10086-010-1140-3

〔学会発表〕 (計 7 件)

- (1) Kaida R, Hayashi T, Effects of xyloglucan on sway of poplar stems, International Symposium on Wood Science and Technology, 2015 March 15<sup>th</sup>, Tokyo
- (2) 井上友紀、江利川遼、海田るみ、林隆久、二次壁特異的プロモーターによるキシログルカナーゼ発現、日本植物生理学会、2014年3月18日、富山大学
- (3) 井上友紀、江利川遼、海田るみ、林隆久、二次壁特異的プロモーターによるキシログルカナーゼ発現、日本木材学会、2014年3月14日、愛媛大学
- (4) 海田るみ、林隆久、ポプラ木部におけるキシログルカンの分子機構、日本木材学会、2013年3月27日、岩手大学
- (5) 海田るみ、林隆久、ポプラ木部におけるキシログルカンの機能、日本植物生理学会、2013年3月23日、岡山大学
- (6) 海田るみ、林隆久、Xyloglucan plays a important role of reinforcement of xylem. 日本植物生理学会、2012年3月16日、京都産業大学
- (7) 海田るみ、林隆久、ポプラ木部におけるキシログルカンの機能、日本木材学会、2012年3月15日、北海道大学

〔図書〕 (計 4 件)

- (1) 林隆久、講談社、植物細胞壁 セルロース合成、カロース生合成、キシログルカン合成酵素活性、セルロース合成酵素活性細胞壁測定の見解、2013年、総ページ 350 (pp. 20-23, 56-57, 318-320)
- (2) 林隆久、海田るみ、化学同人、形質転換プロトコル、ポプラ・アカシアマンギウム・ファルカタ 3つの樹種の遺伝子組換え方法プロトコル、2012、総ページ 412 (pp. 116-128)
- (3) 林隆久、海青社、早生樹産業植林と建材利用、ヘミセルロース分解酵素遺伝子組換えによる細胞壁の改変、2012、pp. 294-308
- (4) Hayashi T, Kaida R, Springer Science, Routes to Cellulosic Ethanol, Hemicelluloses as recalcitrant components for saccharification in wood, 2011, 総ページ 270 (pp.45-52)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
林 隆久 (TAKAHISA HAYASHI)  
東京農業大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：70231529

(2) 研究分担者  
太治 輝明 (TERUAKI TAJI)  
東京農業大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号：60360583

矢野浩之 (HIROYUKI YANO) 京都大学  
生存圏研究所 教授  
研究者番号：80192392

(3) 連携研究者  
磯貝 明 (AKIRA ISOGAI) 東京大学 農学生  
命科学研究科  
研究者番号：40191879