

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292097

研究課題名(和文)細胞壁へのリグニンモノマー供給を調節する輸送体・転写因子の同定 有用樹種開発へ

研究課題名(英文) Identification of monolignol transporter targeting lignin modification in plant cell walls for the biomass production

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：モノリグノール輸送体候補遺伝子を選出するため、シロイヌナズナ培養細胞の管状要素誘導時および植物体器官別サンプルを用いて、輸送体遺伝子とリファレンスとしての二次壁形成やリグニン合成関連遺伝子の発現を定量し、統計ソフトRを用いて解析した。その結果、管状要素誘導時発現解析では4輸送体遺伝子を、器官別発現解析では5輸送体遺伝子をモノリグノール輸送体候補に選出した。候補のうち4遺伝子の一遺伝子ノックアウト体のリグニン量に大きな変化はなかったが、根に特異的な発現を示した遺伝子の一遺伝子ノックアウト変異体では、候補として選抜された他の輸送体遺伝子の発現が上昇したことから、3遺伝子の機能重複が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The candidate genes for extracellular monolignol transport were screened. Tracheary element (TE) induced cells in which lignification is promoted was employed. Besides, different plant organ samples, which has different lignification were also applied. The expression analysis of the transporter genes in these samples was performed. Secondary wall formation and lignin synthesis related genes were also subjected to the analysis as references. Expression profile with TE differentiated samples showed four transporter genes highly expressed synchronously with reference genes. Besides, five transporter genes from plant organ analysis were also screened as candidates. There was no significant change in the amount of lignin in the single gene knockout mutant of the candidates. The expression levels of two other candidates were largely promoted in the single gene knockout plant, suggesting that these transporter candidates were functionally redundant.

研究分野：木質科学

キーワード：リグニンモノマー 輸送体 細胞壁形成 培養細胞 分化誘導 発現解析 リアルタイムPCR 統計解析

### 1. 研究開始当初の背景

木質から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有する樹木の創生が求められる。このような樹木の改質にはリグニン生合成機構の制御が有用となる。しかし、リグニン含有量が減少しても樹木自体の生育不良や、異なる成分の含有量への影響等期待通りの形質を付与することは難しい。

この原因の一つとして、リグニン生合成過程のうち、リグニンモノマーの細胞外輸送については未解明部分が多く残されており、リグニン生合成の全体像が明らかにされていないことが挙げられる。そこで、リグニンモノマーの細胞外輸送に関わる輸送体遺伝子を明らかにし、細胞外輸送メカニズムを解明する必要がある。

### 2. 研究の目的

シロイヌナズナ培養細胞および植物体由来のサンプルを用いて、リグニンモノマー輸送体遺伝子およびリグニン生合成や二次壁形成関連遺伝子の発現プロファイルを明らかにし、二次壁形成およびリグニン沈着と同調的に変化する輸送体を見だし、リグニンモノマーの細胞外輸送に関与する候補遺伝子を選出する。

### 3. 研究の方法

リグニン生合成に関与する遺伝子は、リグニン生合成が活発に行われている部位で活発に発現していることが予想される。そこで本研究では、培養細胞を用いて二次壁形成が促進される管状要素誘導を行い、輸送体遺伝子およびリグニン生合成や二次壁形成関連遺伝子の経時的な発現量をリアルタイムPCRで計測した後、各遺伝子発現量を統計解析処理に供し、輸送体候補遺伝子の絞り込みを行った。また、維管束植物は進化の過程でリグニン沈着を伴う厚い二次壁形成能を獲得し、維管束を発達させたと考えられることから、維管束植物のみが保有する輸送体遺伝子群を選出し、管状要素誘導系において、リグニン生合成や二次壁形成遺伝子と同調的に強発現した遺伝子群と併せて、リアルタイムPCRを用いた植物体器官別遺伝子発現解析を行った。実際の植物体においてこれらの輸送体遺伝子がいつどこで発現しているのか明らかにすることで、リグニン生合成関連輸送体を絞り込んでいく。

### 4. 研究成果

(1) 管状要素誘導系を用いた輸送体候補遺伝子の選出

① シロイヌナズナ培養細胞 T87 株の管状要素誘導

既報による 1  $\mu$ M ブラシノリド (終濃度)を用いた管状要素誘導条件を参考に、シロイヌナズナ培養細胞 T87 株の管状要素誘導条件を検討した。誘導条件のうち、ブラシノリド濃

度は 1  $\mu$ M で固定し、前培養時の培地濃度条件、誘導時のホウ酸の添加、リン酸二水素カリウムの添加の有無を検討した。木化した細胞の比率はリグニン沈着を検出するフロログルシンによって染色された細胞の存在比として定義した (図 1)。この結果、1 $\times$ MS で前培養後 1/3 $\times$ MS で誘導した場合は、同条件前培養後 1 $\times$ MS で誘導した場合と比べて、誘導後 8 日時点の木化細胞比率が 3 倍ほど高くなった。またホウ酸とリン酸二水素カリウムの添加は木化細胞比率に有意に影響を与えなかった。よって管状要素誘導条件は、前培養を 1 $\times$ MS で行い、誘導を 1/3 $\times$ MS で行うことにした。誘導後 14 日間までの木化細胞比率を測定すると、9 日目で木化細胞比率が 40%を超え、それ以降 14 日までほとんど変化しなかった (図 2)。従って、以降の遺伝子発現解析では誘導 0 日から 10 日までの 2 日ごとの細胞をサンプリングして用いることにした。

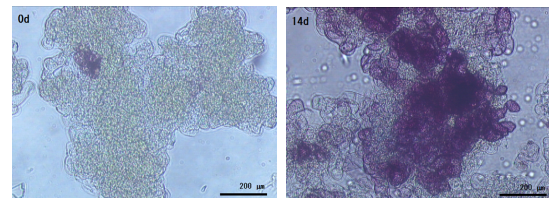


図 1 管状要素誘導シロイヌナズナ培養細胞フロログルシン染色

左: 誘導 0 日, 右: 誘導 14 日

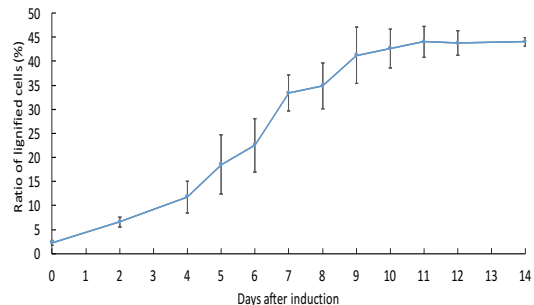


図 2 管状要素誘導後の木化細胞比率経時変化

② 管状要素誘導時の経時的遺伝子発現プロファイリング

リグニン生合成が活発に行われている時期にリグニン生合成に関与する遺伝子が強く発現し、リグニン生合成に関与する輸送体も同様に発現が活性化することが期待できる。既報よりリグニン生合成および二次壁生合成に関与する遺伝子をリファレンス遺伝子として選択した (表 1)。管状要素誘導後 0 日から 10 日まで経時的に採取した細胞から調製した cDNA と各遺伝子特異的プライマーを用いて、リアルタイム PCR で相対発現量を求めた。次いで、得られたデータを統計解析 (ソフト R)、ヒートマップを作成した (図 3)。

発現量パターンによるクラスタリングの結果、リグニン生合成転写因子である *MYB58* と、

リグニンモノマーの一つである *p*-クマリルアルコール輸送体と推定されている *ABCG29* が同じクラスターに分類された (図 3、クラスターIV)。また、最も近いクラスターにはプログラム細胞死関連遺伝子である *XCPI* や、二次壁生成転写因子である *MYB46* や、細胞壁重合酵素と予想される *AtPrx25* が含まれた (図 3、クラスターIII)。*MYB58* および *ABCG29* と同じクラスターに属する *ABCG11*、*ABCG22*、*ABCG36* もリグニン生成関連遺伝子と同時期に強い発現が認められることから、リグニン生成関連輸送体の可能性があると予想した (図 3、クラスターIV)。

表 1 リファレンス遺伝子群

遺伝子名	機能
<i>VND6</i>	
<i>VND7</i>	木化、細胞壁形成、リグニン生成関連転写因子
<i>MYB46</i>	
<i>MYB58</i>	
<i>ANAC005</i>	
<i>C4H</i>	モノリグノール生成酵素
<i>CAD5</i>	
<i>CCR1</i>	
<i>AtPrx2</i>	モノリグノール脱水素重合酵素
<i>AtPrx25</i>	
<i>AtPrx71</i>	
<i>BGLU45</i>	モノリグノール配糖体加水分解酵素
<i>CesA7</i>	セルロース生成膜酵素
<i>XCPI</i>	プログラム細胞死調節

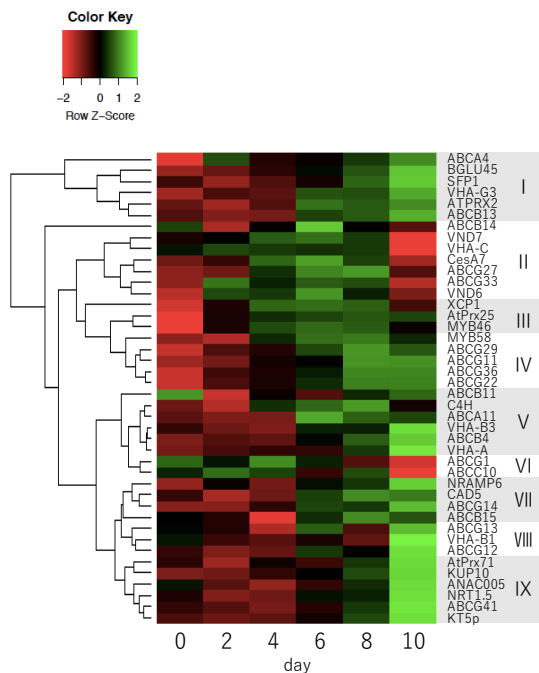


図 3 管状要素誘導後の輸送体遺伝子とリグニン生成および二次壁形成関連遺伝子の発現パターン

赤: 低発現, 緑: 高発現

(2) シロイヌナズナ植物体の植物器官別発現解析による輸送体候補遺伝子の予測

維管束植物のみが保有する 10 輸送体遺伝子と培養細胞誘導系における発現解析でリグニン生成や二次壁形成関連遺伝子と同調的に発現上昇した 4 輸送体遺伝子を対象遺伝子とし、実際の植物体内でこれらの輸送体がいづ、どこで発現しているか明らかにすることでリグニン生成に関与する輸送体を予想することにした。

4 週齢および 6 週齢のシロイヌナズナ植物体からそれぞれ 5 植物器官 (茎上部、茎下部、ロゼット葉、茎生葉、根) をサンプリングして cDNA を調製した (図 4)。これらの cDNA を鋳型にして、輸送体遺伝子とリグニン生成および二次壁生成関連遺伝子との発現量をリアルタイム PCR によって測定し、統計解析ソフト R で発現パターンをクラスタリングしてヒートマップを作成した (図 5)。

6 週齢の茎上部サンプルおよび 6 週齢の根サンプルの一つでは、木部形成転写因子である *VND6* と *VND7*、モノリグノール生成遺伝子である *CCR1* と *C4H*、プログラム細胞死関連遺伝子である *XCPI* が同調的に強く発現していることが示された。これに最も近いクラスターに二次壁生成転写因子 *MYB46* およびリグニン生成転写因子 *MYB58* が分類された。また同じクラスターに *p*-クマリルアルコール輸送体と推定されている *ABCG29* も含まれた (図 5 オレンジ線囲み)。この結果より、このクラスターに分類された *ABCG33* はリグニン生成に関与する可能性が期待される。

4 週齢および 6 週齢根のサンプルではリグニン重合酵素遺伝子である *AtPrx25* と同様に *ABCG30*、*ABCG34*、*ABCG37*、*ABCG29*、*ABCG33* が強く発現していた (図 5 水色線囲み)。*ABCG30*、*ABCG34*、*ABCG37* は根に部位特異的な発現を示していることから、根のリグニン生成関連輸送体である可能性が考えられる。

*ABCG29* を除き、管状要素誘導系でリグニン生成遺伝子や二次壁生成遺伝子と発現パターンが類似していた遺伝子は、植物体器官別発現解析において、リファレンス遺伝子と異なる発現パターンを示した。この要因として管状要素誘導によって形成される細胞が主に道管要素からなるため、繊維細胞や柔細胞を含む植物体サンプルと異なることが考えられる。

以上の結果より、5 つの輸送体遺伝子 *ABCG29*、*ABCG33*、*ABCG30*、*ABCG34*、*ABCG37* をリグニン生成関連輸送体候補遺伝子として選出した。

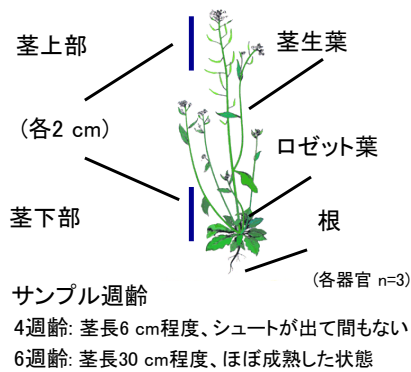


図4 植物器官別遺伝子発現解析において対象とした植物器官イメージ図

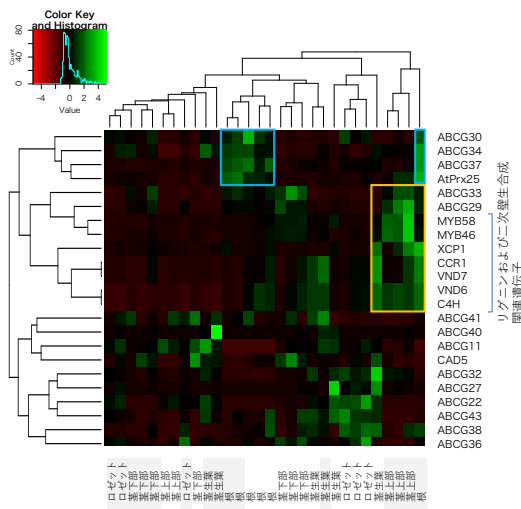


図5 異なる週齢の植物器官別発現パターン  
網掛け: 6週齢, 白地: 4週齢 n = 3

(3) 候補遺伝子の一遺伝子ノックアウト体を用いた機能推定

①一遺伝子ノックアウト変異体リグニン分析  
候補輸送体遺伝子が実際の植物体においてリグニン生合成に寄与しているか調べるため、標的遺伝子の機能欠損体を用いて、リグニン分析を行った。

輸送体候補遺伝子のうち4遺伝子の一遺伝子ノックアウト変異体のホモ接合体を選抜して、アセチルブロマイド分析法でリグニン量を算出した。

表2 一遺伝子ノックアウト体リグニン量  
野生型リグニン量を100%としたときの変異体リグニン量 (n = 3)

変異体	リグニン量 (%)
WT	100
<i>abcg30</i>	102 ± 3
<i>abcg33</i>	102 ± 4
<i>abcg34</i>	96 ± 5
<i>abcg29</i>	102 ± 3

野生型リグニン量を100%とした時の変異体リグニン量の割合を求めた結果(表2)、いずれの変異体も野生型と比較してリグニン量に変化はなかった。

②一遺伝子ノックアウト植物体での輸送体候補遺伝子発現量

発現解析において同時期に発現していた輸送体遺伝子同士は同一ファミリーに属しており、重複した機能を持つ可能性がある。そこで、一遺伝子ノックアウトが別遺伝子の発現に影響を与えるか調査した。根ですべての輸送体候補遺伝子の発現が認められたため、4週齢の根のサンプルを用いた。ホモ接合体選抜を終えた一遺伝子ノックアウト変異体における発現量を半定量的 RT-PCR によって測定した。

各一遺伝子ノックアウト変異体で、ノックアウト遺伝子の増幅は見られず、目的遺伝子の発現が RNA レベルで欠失していることを確認した(表3)。

*abcg34* では野生型と比較して *ABCG30* の発現量が4.2倍程高くなり、反対に *abcg30* における *ABCG34* の発現量は、野生型の2.6倍となった(表3)。この結果より *ABCG30* と *ABCG34* は一方の機能が失われると、他方が機能を補完する、機能重複の可能性が示唆された。さらに *ABCG37* の発現量も *abcg30* と *abcg34* では野生型の2倍程度高くなった(表3)。*ABCG30*、*ABCG34*、*ABCG37* はシロイヌナズナの器官別発現解析において根特異的にかつ同調的に発現していたことから(図5)、これらの遺伝子が機能重複している可能性が予想された。

表3 変異体における輸送体候補遺伝子相対発現量

	<i>G29</i>	<i>G30</i>	<i>G33</i>	<i>G34</i>	<i>G37</i>
<i>abcg29</i>	-	-	1.9	1.5	1.3
<i>abcg30</i>	2.0	-	2.4	2.6	2.1
<i>abcg33</i>	1.6	-	-	2.1	1.6
<i>abcg34</i>	2.1	4.2	1.8	-	1.9

G: *ABCG* の省略

野生型植物体での発現量を1とした (n = 3)

(4) 総括

培養細胞誘導系を用いた経時的発現解析および植物体の植物器官別発現解析によって、リグニンモノマー関連輸送体候補遺伝子を選出した。

培養細胞を用いた管状要素誘導系での経時的な発現解析では、*ABCG11*、*ABCG22*、*ABCG36*、*ABCG29* がリグニン生合成および二次壁生合成関連リファレンス遺伝子と同調的に発現した。一方、植物体を用いた器官別発現解析では、リグニン生合成が活発に行われていることが予想される6週齢の茎上部では *ABCG29* と *ABCG33* が、4週齢および6週齢の根で *ABCG29*、*ABCG33*、*ABCG30*、*ABCG34*、*ABCG37* がそれぞれリファレンス遺伝子と同

調的に発現しており、リグニン生合成関連輸送体の可能性が示唆された。

輸送体候補遺伝子の一遺伝子ノックアウト変異体のリグニン量は野生型と比較して顕著な差は得られなかった。一遺伝子ノックアウト変異体の他輸送体候補遺伝子の発現量を相互比較すると、根特異的に同調的に発現していた *ABCG30*、*ABCG34* は一方の遺伝子欠損時に他方の遺伝子発現が上昇した。加えて *ABCG37* の発現は *ABCG30*、*ABCG34* の機能欠損時に上昇傾向が見られた。このことから *ABCG30*、*ABCG34*、*ABCG37* の遺伝子機能重複が示唆された。

これらの輸送体が実際にリグニン生合成に関与している事を証明するために、ダブルノックアウト変異体の作出およびそれらのリグニン分析を行う必要がある。また、シロイヌナズナ培養細胞を用いた輸送体候補遺伝子の過剰発現体を作成し、ATP 依存的にリグニンモノマーの輸送がなされるか検証していく。

#### 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 5 件)

- (1) Jun Shigeto, Yukie Ueda, Shinya Sasaki, Koki Fujita, Yuji Tsutsumi, Enzymatic activities for lignin monomer intermediates highlight the biosynthetic pathway of syringyl monomers in *Robinia pseudoacacia*, *Journal of Plant Research*, 130, 203-210, (2017).
- (2) Jun Shigeto, Yuji Tsutsumi, Diverse functions and reactions of class III peroxidases, *New Phytologist*, 209, 1395-1402, (2016)
- (3) Shigeto J., Tsutsumi Y., Roles of plant peroxidases in cell wall formation and modification. *Mokuzai Gakkaishi*, 62, 91-100 (2016)
- (4) Fujita K., Kambe R., De Alwis R., Yagi T., Tsutsumi Y., Airborne Monoterpenes Emitted from a *Cupressus lusitanica* Cell Culture Induce a Signaling Cascade that Produces  $\beta$ -Thujaplicin. *J Chem Ecol.* 42, 814-820 (2016)
- (5) Jun Shigeto, Itoh Yoshitaka, Hrao Sakie, Ohhira Kaori, Koki Fujita, Yuji Tsutsumi, Simultaneously disrupting AtPrx2, AtPrx25 and AtPrx71 alters lignin content and structure in *Arabidopsis* stem, *Journal of integrative plant biology*, 57, 349-356 (2015).

[学会発表] (計 11 件)

- (1) Yuji Tsutsumi, Jun Shigeto, Hiroki Honjyo, In vitro evaluation of the lignin forming ability of plant peroxidases involved in lignification, *Lignobiotech IV*, 2016.6.19-22, Madrid

- (2) Diego Yoshikay, 大平香織, 重藤潤, 堤祐司, 武内真奈美, 毛笠貴博, 堤祐司, シロイヌナズナ植物体および培養細胞を用いたリグニンモノマー輸送体候補遺伝子の発現解析, 第 61 回リグニン討論会, 2016.10.27-28, 宇治
- (3) 大平香織, 重藤潤, 堤祐司, 形質転換ポプラ及びシロイヌナズナを用いたポプラペルオキシダーゼ CWPO-C の機能探索, 第 66 回日本木材学会大会, 2016.3.26-28, 名古屋
- (4) 毛笠貴博, 梅村早紀, 武内真奈美, 田村美帆, 渡辺敦史, 重藤潤, 堤祐司, シロイヌナズナ管状要素形成におけるリグニン前駆体輸送と木化関連遺伝子の転写解析, 第 66 回日本木材学会大会, 2016.3.26-28, 名古屋
- (5) 和田卓, 堤祐司, レーザーマイクロダイセクションを用いたポプラ木化進行過程におけるリグニン解析, 第 79 回日本植物学会大会, 2015.9.6-8, 新潟
- (6) Yuji Tsutsumi, Manami Takeuchi, Screening of monolignol transport protein in *Arabidopsis thaliana*, International Symposium on Wood Science and Technology 2015, 2015.3.15-17, Tokyo
- (7) 高尾龍之介, 重藤潤, 大平香織, 堤祐司, ポプラの組織別における CWPO-C 転写解析, 第 65 回木材学会, 2015.3.16-18, 東京
- (8) 梅村早紀, 堤祐司, シロイヌナズナ培養細胞管状要素誘導中に発現するモノリグノール輸送体の探索, 第 65 回木材学会, 2015.3.16-18, 東京
- (9) Yuji Tsutsumi, Jun Shigeto, Kaori Ohira, Ryunosuke Takao, Masaaki Kamada, Expression and subcellular localization analysis of poplar cationic cell-wall-bound peroxidase and its *Arabidopsis* putative homologs involved in lignification, *Lignobiotech III*, 2014.10.26-29, Concepcion
- (10) Jun Shigeto, Yuji Tsutsumi, Characterization of Plant Peroxidases which Involved in *Arabidopsis* Stem Lignification, XXVIIth International Conference on Polyphenols & 8th Tannin Conference, 2014.9.2-6, Nagoya
- (11) Yuji Tsutsumi, Jun Shigeto, Oxidation activities of plant peroxidases involved in lignification, *Oxizymes 2014*, 2014.7.3-6, Vienna.

[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 (YUJI TSUTSUMI)  
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 (KOKI FUJITA)  
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

重藤 潤 (JUN SHIGETO)  
九州大学大学院・農学研究院・特任助教  
研究者番号：70570852

(4) 研究協力者

( )