

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892014

研究課題名(和文)メタボリックラベル法を活用した細胞壁リグニンの新生体イメージング法の開発と応用

研究課題名(英文)Visualization of plant cell wall lignification via metabolic labelling using novel synthetic monolignol mimics.

研究代表者

飛松 裕基(Tobimatsu, Yuki)

京都大学・生存圏研究所・准教授

研究者番号：20734221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、木質バイオマスの利用拡大に向けた基盤研究として、木質形成機構の解明を目指す種々の研究に適用可能な植物細胞壁のイメージングツールの開発を目的とし、合成モノリグノールミミックと生体直交型クリック反応を利用したリグニンの蛍光生体標識法の開発を行った。ケミカルレポーターとしてアジドおよびアルキンを導入した新規な合成モノリグノールミミックの化学合成法を確立した。それら合成モノリグノールミミックとクリック反応を利用したモデル植物シロイヌナズナの実生における細胞壁リグニンの蛍光イメージングを検討し、細胞壁の木化の進行とともに合成されるリグニンを高感度に直接観察する手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Bioorthogonal click chemistry was commissioned to visualize the plant cell wall lignification process in vivo. This approach uses synthetic monolignol mimics tagged with chemical reporters (azide and alkyne groups) that can be metabolically incorporated into lignins in live plants, and subsequently derivatized via in vivo click reactions. We developed a synthetic strategy for producing -azide or -alkyne-tagged monolignol probes. Furthermore, we explored the utility of the chemical reporter-tagged monolignols to visualize cell wall lignification process in Arabidopsis. Overall, we anticipate that the developed monolignol probes and the methods using them will find broad applications in plant cell wall research.

研究分野：木質有機化学・生化学

キーワード：リグニン 植物細胞壁 バイオマス 生体イメージング 蛍光プローブ クリックケミストリー

1. 研究開始当初の背景

リグニンは、*p*-ヒドロキシケイ皮アルコール類(モノリグノール)の酵素的脱水素重合により生成する天然芳香属系高分子である。リグニンは、維管束植物を特徴付ける細胞二次壁の主要成分として、植物の生長調節に必須の役割を担っている。リグニン合成はシダ類以上の維管束植物で共通の遺伝的形質として保存されているものの、リグニンの構造特性とそれを決定付ける各生合成遺伝子の機能と発現調節は非常にフレキシブルであり、その多様性は陸上植物の進化とも密接に関連すると考えられている。¹ 一方で、木質バイオマスを家畜飼料やパルプあるいはバイオエタノールなどの原材料として利用する場合、細胞壁中のリグニンは諸々の阻害因子として寄与する。またリグニンの高付加価値利用は経済性の優れたバイオマス利用プロセス構築における重要課題でもある。その為、リグニン研究の基礎学術的重要性に加えて、バイオマス利用に適したリグニンを産生する植物の分子育種という目的からも、リグニンの生合成機構や代謝工学 について、活発な研究がなされている。^{2,3} これらの研究により、モノリグノール生合成に関わる各種遺伝子群の解析が進み、それらの発現制御によるリグニンの量的・質的改変も可能となりつつある。^{4,5} しかし、細胞壁形成過程におけるモノリグノールの細胞内外での動態や細胞壁における時空間特異的な重合の制御機構など、リグニン生合成の全容解明には未だ多くの課題が残されているのが現状である。^{1,6}

植物体内におけるリグニン生合成プロセスの解析には、遺伝子発現や代謝物の解析などに加え、組織・細胞レベルでの形態学的観察が必須である。しかし、リグニンやその前駆体であるモノリグノールは、タンパク質のように遺伝子工学的に検出タグを導入出来ないため、その生体中での局在や動態を直接観察する事は容易ではない。これまで研究代表者らは、合成モノリグノールミミック、特に蛍光モノリグノール(蛍光色素で標識したモノリグノール誘導体)を利用したリグニンのメタボリックラベルと蛍光生体標識を検討してきた。⁷⁻⁹ しかし、蛍光モノリグノールを用いたイメージング法では、疎水的で立体的に嵩高い蛍光色素がモノリグノール本来の運動性や反応性を妨げている点、使用可能な色素が限定される点など、主にモノリグノールに直接結合した色素に起因する問題点があった。

一方、ケミカルレポーターとその生体直交型反応(Bioorthogonal chemistry)を活用したメタボリックラベル法が多くの生体分子の生体イメージングに適用されている。^{10,11} この手法では、立体的に小さく、生体で不活性なケミカルレポーター(例えばアジドやアルキン)を一次タグとして標的とする生体分子に導入する。検出と可視化は、ケミカ

ルレポーターに特異的な生体直交型反応(例えばクリック反応)により蛍光色素などの二次タグを導入することで達成する。色素は、メタボリックラベル後に生体に導入されるため、分子設計に自由度が高く、標的分子を、実験目的に応じて、様々な特性を持つ蛍光色素あるいは他の検出タグで標識できるという利点がある。

2. 研究の目的

本研究では、合成モノリグノールミミックを活用したリグニンイメージング法のさらなる改良を目指し、ケミカルレポーターを導入した新たなモノリグノールミミックを合成し、それと生体直交型クリック反応を利用した新たなリグニンの蛍光生体標識法(図1)の確立を目的とした。

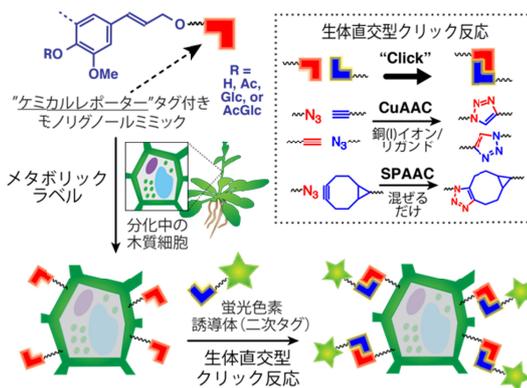


図1. ケミカルレポータータグ付きモノリグノールミミックと生体直交型クリック反応を利用した細胞壁リグニンの蛍光標識法

3. 研究の方法

まず、モノリグノールおよびモノリグノール配糖体の側鎖 位にアルキルスペーサーを介してアジドもしくはアルキンの導入したモノリグノールミミックの合成を検討した。合成したモノリグノールミミックのリグニン重合反応への適合性および高分子リグニンに導入されたアジドおよびアルキン基の反応性を検証するため、モノリグノールミミックの実験室的脱水素重合反応と生成した人工リグニン(DHP)と蛍光色素誘導体のクリック反応を検討した。

次に、合成したモノリグノールミミックを用いてモデル植物シロイヌナズナにおけるリグニンのイメージングを検討した。モノリグノールミミックを導入した組織において、種々の蛍光色素誘導体を用いた生体クリック反応を行い、リグニンの蛍光生体標識に有効なモノリグノールミミックと蛍光色素誘導体の組合せを見出すとともに、特にシロイヌナズナ実生の原生木部におけるリグニン形成過程を直接観察するイメージングプロトコルの確立を目指した。

4. 研究成果

(1) モノリグノールミミックの合成

モノリグノールの側鎖 位にアルキルスパーサーを介してアジドもしくはアルキンの導入した新規モノリグノールミミックの合成を検討した(図2)。*p*-ヒドロキシケイヒ酸類を出発物質として、THP エーテル保護、

位エステルの DIBAL-H 還元とアルキル化、さらに脱保護により、 β -カルボキシメチルモノリグノールを得た。これらとアジドおよびアルキンのアミン誘導体との縮合剤 PyBOP を用いたアミド縮合を行い(収率 40-99%)、目的とするグアイアシル(G)型、シリングル(S)型および *p*-ヒドロキシフェニル(H)型モノリグノールミミックを得た(図2)。また、アジドを導入したグアイアシル(G)型モノリグノールミミック **1G** のイミデートグリコシル化法を用いたグリコシル化(収率 40%)とイミデート糖に導入したアセチル保護基を Zemplen 条件下で脱保護し(収率 56%)、アジドを側鎖に有する G 型モノリグノール配糖体(コニフェリン)ミミック **4G** も得た(図2)。

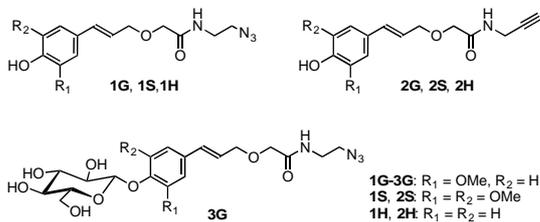


図2. ケミカルレポーターとしてアジドあるいはアルキンを導入したモノリグノールミミック

(2) G 型モノリグノールミミックの脱水素重合と人工リグニンのクリック反応

合成したモノリグノール誘導体のリグニン重合反応への適合性を調べるため、アジドおよびアルキンを導入した G 型モノリグノールミミックの実験室的脱水素重合を検討した。西洋わさび由来ペリオキシダーゼ(HRP)を触媒としたモノリグノールミミック(**1G** および **2G**; 図2)の脱水素重合反応により、人工リグニン(DHP)が高収率に得られた。2次元 NMR 法による DHP の構造解析を行ったところ、DHP の NMR スペクトルには、リグニンの主要結合様式に由来するシグナルに加えて、ケミカルレポーターとスパーサーに由来するピークが認められた。このことから、いずれのモノリグノールミミックも通常のモノリグノールと同様の重合能を有することが示唆された。

また高分子リグニンに導入されたケミカルレポーターの反応性を検証する為、上記の DHP と蛍光色素 NBD 誘導体のクリック反応を検討した。銅触媒下で行うクリック反応(CuAAC 反応)ならびに銅触媒フリーで行う

改変型クリック反応(SPAAC 反応)を検討した。反応後の DHP の 2 次元 NMR 解析および蛍光スペクトル解析により、いずれのクリック反応の場合も、DHP に導入されたケミカルレポーター残基におけるクリック反応が効率的かつ選択的に進行していることが示された。

(3) シロイヌナズナにおける細胞壁リグニンのイメージング実験

モデル植物シロイヌナズナ(Col-0 株)を用いて、G 型モノリグノールミミック(**1G** および **2G**; 図2)によるリグニンのイメージング実験をおこなった。なお、この実験の一部は、Gent 大学の Wout Boerjan 教授、京都大学の鈴木史朗博士および梅澤俊明教授らのグループとの共同研究として実施した。

まず、種々の蛍光色素誘導体(図3)を用いたクリック反応の有効性を簡易的に調べるため、アジドおよびアルキンを導入した G 型モノリグノールミミック(**1G** および **2G**; 図2) 取り込ませたシロイヌナズナの茎切片を用いた標識実験を行った。アジドおよびアルキンを導入した蛍光色素 NBD 誘導体、Fluor488 誘導体、Cy3 誘導体ならびに Cy5 誘導体を用いた CuAAC 反応を行い、洗浄した切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、リグニンが沈着する道管および繊維細胞の二次壁に選択的な蛍光標識が見られた。このことから、これら色素誘導体を用いた CuAAC 反応がリグニン選択的な蛍光標識に有効であることが示唆された。コントロールとして、ケミカルレポーターを持たないモノリグノールによる標識、重合阻害剤(KI など)を添加した系での蛍光標識を検討したが、いずれの場合も蛍光は微弱であった。

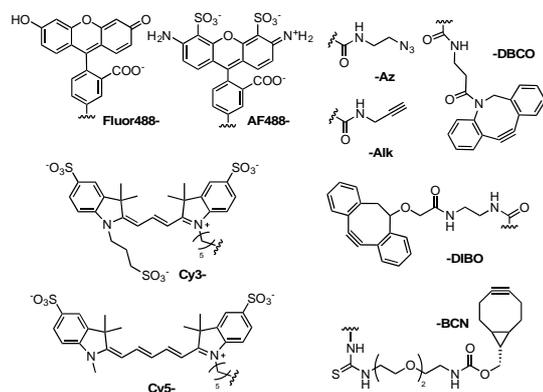


図3. クリック反応を検討した蛍光色素誘導体

また、環状オクチンを導入した各種蛍光色素による SPAAC 反応も検討したところ、色素誘導体 **AF488-DIBO** や **Cy3-DBCO** (図3)を用いた場合、木部細胞壁に比較的強い蛍光標識がみられたものの、通常はリグニンの沈着しない組織(表皮柔組織など)にもランダ

ムな蛍光が観察され、非特異的な色素の吸着が示唆された。一方、**Fluor488-BCN**(図3)によるSPAAC反応では色素による吸着は殆ど見られず、リグニン選択的な蛍光標識に有効であることが示唆された。

次に、上記の実験で有効性を確認した色素誘導体を用いてモノリグノールミミックを取り込ませたシロイヌナズナ実生における蛍光標識を検討した。実生は生体クリック反応の後に洗浄を行い、そのまま共焦点レーザー顕微鏡を用いて直接観察した。その結果、一般的にリグニンが沈着する根の分化帯の道管やカスパリー線に強い蛍光シグナルが見られ、切片の調製や透明化処理などを行わずとも、明瞭に可視化することが可能であった(図4)。コントロールとして、ケミカルレポータータグを持たないモノリグノールを取り込ませた実生を用いて蛍光色素とのクリック反応を行ったが、蛍光は微弱であった。現在、シロイヌナズナ実生におけるリグニン形成のタイムラプス観察や種々のモノリグノールミミック(図2)による蛍光標識パターンの変化などを調べている。

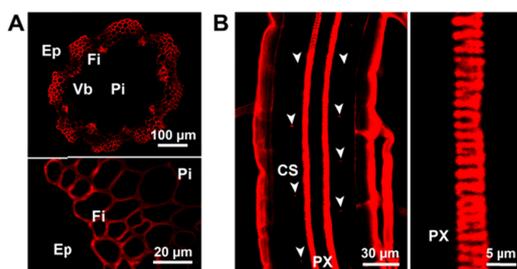


図4. モノリグノールミミック **2G** と蛍光色素 **Cy3-Az** を用いて蛍光標識したシロイヌナズナの共焦点レーザー顕微鏡画像 (A: 花茎切片; B: 根の伸長領域)

以上、本研究では、ケミカルレポーターを導入した新規なモノリグノールミミックを合成し、それらを用いたリグニンの蛍光生体標識法の有効性を示した。本手法が、高感度なリグニンの生体イメージング法として、分子生物学的あるいは細胞生物学的研究アプローチとも併用して、様々なリグニン研究に寄与することが期待される。

<引用文献>

- 1) N. Bonawitz and C. Chapple, The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype, *Annual Review of Genetics*, 2010, 44, 337-363
- 2) A. J. Ragauskas, G. T. Beckham, M. J. Bidy, R. Chandra, F. Chen, M. F. Davis, B. H. Davison, R. A. Dixon, P. Gilna, M. Keller, P. Langan, A. K.

Naskar, J. N. Saddler, T. J. Tschaplinski, G. A. Tuskan and C. E. Wyman, Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery, *Science*, 2014, 344, 1246843

- 3) Y. Zeng, S. Zhao, S. Yang and S.-Y. Ding, Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels, *Current Opinions in Biotechnology*, 2014, 27, 38-45
- 4) C. Wilkerson, S. Mansfield, F. Lu, S. Withers, J. Park, S. Karlen, E. Gonzales-Vigil, D. Padmakshan, F. Unda, J. Rencoret and J. Ralph, Monolignol ferulate transferase introduces chemically labile linkages into the lignin backbone, *Science*, 2014, 344, 90-93
- 5) N. Bonawitz, J. Kim, Y. Tobimatsu, P. Ciesielski, N. Anderson, E. Ximenes, J. Maeda, J. Ralph, B. Donohoe, M. Ladisch and C. Chapple, Disruption of Mediator rescues the stunted growth of a lignin-deficient Arabidopsis mutant, *Nature*, 2014, 509, 376-380
- 6) X. Li and C. Chapple, Understanding lignification: challenges beyond monolignol biosynthesis, *Plant Physiology*, 2010, 154, 449-452
- 7) M. Schuetz, A. Benske, R. Smith, Y. Watanabe, Y. Tobimatsu, J. Ralph, T. Demura, B. Ellis, L. Samuels, Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem, *Plant physiology*, 2014, 166, 798-807
- 8) Y. Tobimatsu, A. Wagner, L. Donaldson, P. Mitra, C. Niculaes, O. Dima, J. Kim, N. Anderson, D. Loque, W. Boerjan, C. Chapple and J. Ralph, Visualization of plant cell wall lignification using fluorescence-tagged monolignols, *The Plant Journal*, 2013, 76, 357-366
- 9) Y. Tobimatsu, C. L. Davidson, J. H. Grabber and J. Ralph, Fluorescence-tagged monolignols: Synthesis and application to studying *in vitro* lignification, *Biomacromolecules*, 2011, 12, 1752-1761

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)

Yuki Tobimatsu, Dorien Van de Wouwer, Eric Allen, Robert Kumpf, Bartel Vanholme, Boerjan Wout, John Ralph, A click chemistry strategy for visualization of plant cell wall lignification, *Chemical Communications*, 50, 2014, 12262-12265 (査読あり)
DOI: 10.1039/C4CC04692G

〔学会発表〕(計8件)

飛松裕基、リグニンの分子構造・形成メカニズムと制御、第66回日本木材学会大会部門別企画講演会、2016年3月、名古屋

有賀哲、飛松裕基、鈴木史朗、Eric Allen、John Ralph、上高原浩、梅澤俊明、高野俊幸、合成モノリグノールプロープを活用した細胞壁リグニンの蛍光生体標識、第60回リグニン討論会、2015年11月、つくば

飛松裕基、リグニン形成のフレキシビリティとそれを活用したバイオマス利用、2015年度バイオマス変換研究会/第60回リグニン討論会若手の会共同講演会、2015年11月、つくば

飛松裕基、リグニン分子構造の多様性とフレキシビリティ、新学術領域若手ワークショップ/第9回細胞壁ネットワーク定例研究会、2015年9月、大阪

飛松裕基、リグニン前駆体合成酵素遺伝子群の発現制御による植物細胞壁の構造改変、食品酵素化学研究会第15回学術講演会、2015年9月、京都

有賀哲、飛松裕基、Eric Allen、John Ralph、上高原浩、高野俊幸、リグニンの生体蛍光標識を指向したモノリグノールプロープ郡の合成、第65回日本木材学会大会、2015年3月、東京

Yuki Tobimatsu, Satoshi Aruga, Dorien Van de Wouwer, Eric Allen, Robert Kumpf, Hiroshi Kamitakahara, Toshiyuki Takano, Bartel Vanholme, Boerjan Wout, John Ralph, Visualization of cell wall lignins by metabolic labeling and bioorthogonal click chemistry, International Symposium on Wood Science and Technology 2015, 2015年3月, Tokyo, Japan

飛松裕基、Dorien Van De Wouwer、有賀哲、Eric Allen、Robert Kumpf、Bartel Vanholme、上高原浩、高野俊幸、Wout Boerjan、John Ralph、生体直交型反応を活用したリグニンのメタボリックラベルと蛍光標識、第59回リグニン討論会、2014年9月、福井

〔図書〕(計0件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
研究室ホームページ：
<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/lmsfpm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飛松 裕基 (TOBIMATSIU, Yuki)
京大大学生存圏研究所・准教授
研究者番号：20734221

(2) 研究分担者(なし)

(3) 連携研究者(なし)

(4) 研究協力者

高野 俊幸 (TAKANO, Toshiyuki)
京都大学農学研究科・教授
研究者番号：50335303

上高原 浩 (Kamitakahara, Hiroshi)
京都大学農学研究科・准教授
研究者番号：10293911

John Ralph (海外共同研究者)
University of Wisconsin, Department of Biochemistry・教授