

シロイヌナズナを用いたリグニン前駆物質輸送体の探索

武内, 真奈美

<https://hdl.handle.net/2324/1959163>

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

シロイヌナズナを用いた
リグニン前駆物質輸送体の探索

武内 真奈美

2018

目次

第1章 緒言.....	1
参考文献.....	6
第2章 モノリグノール輸送体候補遺伝子スクリーニングのためのシロイヌナズナ培養細胞管状要素誘導系における発現解析.....	9
第1節 序.....	9
第2節 T87培養細胞を用いた管状要素誘導系の確立.....	12
2.1 実験.....	12
2.1.1 T87培養細胞の取得と継体.....	12
2.1.1.1 T87培養細胞の購入.....	12
2.1.1.2 JPL培地の作製.....	12
2.1.1.3 T87培養細胞の継体.....	12
2.1.2 T87培養細胞の管状要素誘導.....	12
2.1.2.1 前培養.....	12
2.1.2.2 本培養.....	13
2.1.2.3 木化率の算出.....	13
2.2 結果と考察.....	13
第3節 管状要素誘導サンプルを用いたリアルタイムPCRによる輸送体遺伝子の発現解析.....	18
3.1 実験.....	18
3.1.1 cDNA調製.....	18
3.1.2 プライマー設計.....	18
3.1.3 リアルタイムPCR分析.....	18
3.1.4 遺伝子発現解析.....	19

3. 2	結果と考察	19
第4節	小括	33
	参考文献.....	34
第3章	モノリグノール輸送体候補遺伝子スクリーニングのためのシロイヌナズナ植物器官別発現解析	40
第1節	序.....	40
第2節	植物器官別遺伝子発現解析	41
2. 1	実験.....	41
2. 1. 1	シロイヌナズナの培養.....	41
2. 1. 2	cDNA 調製.....	41
2. 1. 3	プライマー設計.....	41
2. 1. 4	リアルタイム PCR 分析.....	41
2. 1. 5	遺伝子発現解析.....	42
2. 2	結果と考察	42
第3節	小括	47
	参考文献.....	53
第4章	候補輸送体遺伝子の T-DNA 挿入変異体を用いた機能解析	58
第1節	序.....	58
第2節	T-DNA 挿入変異体ホモ接合体の取得.....	59
2. 1	実験.....	59
2. 1. 1	T-DNA 挿入変異体購入	59
2. 1. 2	ホモ接合型 T-DNA 挿入変異体選抜	59
2. 1. 2. 1	種子の滅菌と培養	59
2. 1. 2. 2	ゲノム DNA 抽出.....	59

2. 1. 2. 3	プライマー設計.....	60
2. 1. 2. 4	ゲノム PCR.....	60
2. 1. 2. 5	ホモ系統種子の回収.....	61
2. 1. 3	ホモ接合型 T-DNA 挿入変異体の観察	61
2. 2	結果と考察.....	61
第3節	T-DNA 挿入変異体における候補遺伝子発現解析.....	66
3. 1	実験.....	66
3. 1. 1	プライマー設計.....	66
3. 1. 2	cDNA 調製.....	66
3. 1. 3	候補遺伝子の増幅 PCR と発現量解析.....	66
3. 2	結果と考察.....	67
第4節	T-DNA 挿入変異体のリグニン分析	72
4. 1	実験.....	72
4. 1. 1	アセチルブロマイド分析	72
4. 1. 2	熱分解 GC-MS 分析	73
4. 2	結果と考察.....	73
第5節	小括	78
	参考文献.....	80
第5章	総括.....	81
	参考文献.....	84
	謝辞	85

第1章 緒言

日本のエネルギー自給率は2016年時点で約8%であり、化石エネルギーや原子力エネルギーがエネルギー供給の大部分を占めている(経済産業省, 2016)。2011年に発生した東日本大震災をきっかけに、エネルギー安全保障強化の必要性が強く認識された。エネルギーの安定的、継続的な供給にはエネルギー供給源の多様性が不可欠である。近年、環境に考慮した再生可能エネルギーが注目されており、その種類は太陽光、水力、風力、地熱、バイオマスなど多岐にわたる。

バイオマス資源のうち、木質は陸上において最も豊富なバイオマスであり、日本の森林率は66.3%であることから非常に有望なエネルギー資源であるといえる(森林白書, 2017)。木質バイオマスは、以前から木質チップや木質ペレットに加工したものを燃焼させて熱を取り出したり、発電を行ったりして利用されてきた。木質バイオマスは、カーボンニュートラルな特性を有しており、オイルリファイナリーによってこれまで担われてきた燃料、化学品、マテリアルが、木質成分によって代替されるバイオリファイナリーが確立されれば、エネルギーおよび環境の両問題の解決に貢献することが期待される。

木質は主に植物細胞壁であり、その構成成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニンである。各成分の比率は植物種によって異なる(Araque et al. 2008; Shafiei et al. 2010; Tian et al. 2011)。セルロースは、D-グルコースが1,4-グルコシド結合した高分子であり、複数のセルロース分子が束になったマイクロフィブリルを形成している。ヘミセルロースはキシロース、アラビノース、マンノースなどの糖類が多様な結合をしたヘテロポリマーの総称である。ヘミセルロースはセルロースマイクロフィブリルを架橋するように存在すると考えられている。リグニンはフェニルプロパノイドモノマーが不規則に重合した3次元ヘテロポ

リマーである。リグニンはセルロース、ヘミセルロースの間隙を充填するように存在すると考えられている。

セルロースは古くからパルプとして利用されてきた。近年では、燃料として利用されるバイオエタノール生産や、様々な用途に応用できるマテリアルとしてのセルロースナノファイバー開発の研究は盛んに行われ、実用化にも至っている。また、セルロース、ヘミセルロースから得られる糖を有用な基幹化合物に変換し、多様な化学品として利用する研究も進められている。一方、リグニンはパルプ製造時に産生する黒液として回収され、燃焼によりエネルギーを生じたり、コンクリート分散剤として利用されたりしている。リグニンは芳香族化合物を骨格としており、これまで石油を原料としていた芳香族化合物の代替原料として期待されるが、その技術は確立されていない。その理由の一つとして、リグニンの構造は明らかになっておらず、他成分との分離が困難であることおよび均一な試料が得られにくいことが挙げられる。そこで、後の利用に適した、化学構造が制御された有用樹種の確立は、この問題を解決する方法の一つであると考えられる。そのためには、植物体内でのリグニン生合成メカニズムの完全な理解が必要である。つまり、リグニン生合成に関与する遺伝子およびタンパクの同定は必須である。

植物体中でのリグニン生合成は、リグニン前駆体である3種類のモノリグノール (*p*-クマリルアルコール、コニフェリルアルコール、シナピルアルコール) が細胞外で重合されることで形成される。モノリグノール生合成はフェニルアラニンの脱アミノ化に始まり、芳香環のヒドロキシル化、メチル化、側鎖の還元によって進行し、これらの反応はアンモニアリアーゼ、シトクロム P450 依存的モノオキシナーゼ、メチルトランスフェラーゼ、オキシドレダクターゼなどの酵素に触媒される。芳香環のヒドロキシル化に関わる酵素である C4H、C3H、F5H は小胞体の外表面に、その他のモノリグノール合成酵素は細胞質に

局在することが示された (Achnine et al. 2004; Chen et al. 2011)。一方、モノリグノールの重合にはペルオキシダーゼやラッカーゼが関与し (Zhao et al. 2013; Shigeto et al. 2015)、細胞外に局在することが示された (Sato et al. 2006; Schuetz et al. 2014)。したがって、リグニンの蓄積には細胞内で合成されたモノリグノールが細胞膜を介して細胞外に輸送される必要がある。

細胞外へのリグニン前駆体の輸送方法として、受動拡散、1次能動輸送、2次能動輸送、小胞輸送などが考えられる (Liu et al. 2011)。また、リグニン前駆体として、モノリグノールまたはモノリグノール配糖体が想定された。放射性同位体標識されたコニフェリン (配糖体化されたコニフェリルアルコール) のトウヒ幼木への投与実験において、リグニン中に標識が取り込まれたことから、コニフェリンがリグニン前駆体である可能性が示唆された (Freudenberg 1959)。その後の改良された実験において、コントロールタマツを用いてラベル化フェニルアラニンを投与すると、分化中木部の二次壁に加えて、ゴルジ体や液胞が標識された。タンパク合成阻害剤存在下ではゴルジ体や液胞の標識は消失したが分化中木部の標識は残っていたことから、リグニン前駆体の輸送はゴルジ体関与による輸送ではなく、何らかの膜輸送体による可能性が高いと考えられた (Kaneda et al. 2008)。また、同じくコントロールタマツの形成層および分化中木部のメタノール可溶画分の代謝物分析によってコニフェリン、コニフェリルアルコール、*p*-クマリルアルコール、ピノレジノールが検出され、コニフェリンは放射ラベル化されていなかった。これらの結果より、コニフェリンは直接的なリグニン前駆体ではないことが示唆された (Kaneda et al. 2008)。2006年の報告では、シロイヌナズナの茎とさや、茎と根においてそれぞれ *BGLU45*、*BGLU46* の転写産物が局在していることが示された (Escamilla-Treviño et al. 2006)。各タンパクを用いた基質輸送アッセイにより、*BGLU45* はシリレンジン、コニフェリンに対して高い基質特異性を示し、*BGLU46* は *p*-クマリルアルコー

ル配糖体やフェノール配糖体などに強い活性を、シリンジン、コニフェリンに対しては弱い活性を持ち、広い基質特異性を示した (Escamilla-Treviño et al. 2006)。一方、免疫染色で BGLU45、BGLU46 がそれぞれ維管束間繊維、原生木部に局在していたが、それぞれをコードする遺伝子をノックアウトしてもリグニン量に変化はなく、茎の抽出物分析ではコニフェリン量が野生型に比べて増加したが、シリンジンは変化せず、コニフェリルアルコール量も変わらなかった (Chapelle et al. 2012)。このことから、コニフェリンは蓄積時の形態である可能性が高い。シロイヌナズナの細胞膜画分および液胞膜画分において、モノリグノールおよびモノリグノール配糖体がそれぞれ ATP 依存的に輸送され、ABC 輸送体阻害剤であるバナジン酸塩によって阻害された。このことから細胞膜を介した細胞外へのモノリグノールの輸送に、ABC 輸送体が関与していることが示唆された (Miao and Liu 2010)。さらに ABC 輸送体の一つである AtABCG29 を酵母に過剰発現させ、その膜画分を用いて輸送アッセイを行うと、ATP 存在下で *p*-クマリルアルコールを特異的に輸送することが示された (Alejandro et al. 2012)。しかし、いまだに主要なリグニンモノマーであるコニフェリルアルコールおよびシナピルアルコールの輸送体は明らかにされていない。

死細胞が多くを占める樹木では細胞壁が活発に形成されることから、細胞壁関連遺伝子の発現は著しく変化していると予想される。草本植物であるシロイヌナズナにおいても維管束が発達しており、樹木のリグニン量 (25-30%)には及ばないものの、細胞壁中の約 15%をリグニンが占める。シロイヌナズナでは 2000 年に全ゲノム配列が明らかにされた (The Arabidopsis Genome Initiative 2000)。シロイヌナズナは世代期間が 2 ヶ月と短く、また DNA 改変が容易であることから、逆遺伝学的手法を用いた遺伝子の機能同定が容易である。よって候補となる遺伝子の検討をつけた後、植物体を用いた検証が可能である。シロ

イヌナズナを用いたリグニン生合成関連輸送体の探索によって、リグニン生合成メカニズムのうち未知の部分が多い輸送段階の理解につながると考えられる。

本論文は、以上の背景に基づき、シロイヌナズナを用いたモノリグノールの細胞外輸送に関わる輸送体の探索を目的として、候補となる輸送体遺伝子のスクリーニングを行い、シロイヌナズナ遺伝子ノックアウト変異体を用いた表現型解析および遺伝子発現解析を行うことで各遺伝子がリグニン生合成に関わる可能性を検討した。

まず第2章では、シロイヌナズナ管状要素誘導系を用いた輸送体遺伝子のスクリーニングを行った。

次いで第3章では、シロイヌナズナ植物体の植物器官別発現解析を行い、リグニン生合成や二次壁生合成に関与する遺伝子を同調的に発現した輸送体遺伝子を候補遺伝子として選択することができた。

さらに第4章では、第3章で選択した候補輸送体遺伝子の T-DNA 挿入変異体を用いて、一遺伝子欠損による、他候補輸送体遺伝子の発現解析を行った。2 候補遺伝子間で、一方の一遺伝子欠損が他方の遺伝子発現に影響を与える可能性が示された。また、T-DNA 挿入変異体のリグニン分析による機能推定を行った。リグニン分析では、リグニン量や構造に野生型との著しい差異は観察されなかった。一遺伝子ノックアウト変異体ではリグニン形成に変化が見られず、各候補遺伝子は、一遺伝子単独でリグニン生合成に大きく寄与しないことが示された。

参考文献

- Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon R (2004) Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16:3098–3109
- Alejandro S, Lee Y, Tohge T, Sudre D, Osorio S, Park J, Bovet L, Lee Y, Geldner N, Fernie AR, Martinoia E (2012) AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr Biol* 22:1207–1212
- Araque E, Parra C, Freer J, Contreras D, Rodríguez J, Mendonça R, Baeza J (2008) Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. *Enzyme Microb Technol* 43:214–219
- Chapelle A, Morreel K, Vanholme R, Le-Bris P, Morin H, Lapierre C, Boerjan W, Jouanin L, Demont-Caulet N (2012) Impact of the Absence of Stem-Specific β -Glucosidases on Lignin and Monolignols. *Plant Physiol* 160:1204–1217
- Chen HC, Li Q, Shuford CM, Liu J, Muddiman DC, Sederoff RR, Chiang VL (2011) Membrane protein complexes catalyze both 4- and 3-hydroxylation of cinnamic acid derivatives in monolignol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 108:21253–21258
- Escamilla-Treviño LL, Chen W, Card ML, Shih MC, Cheng CL, Poulton JE (2006) *Arabidopsis thaliana* β -Glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. *Phytochemistry* 67:1651–1660
- Freudenberg K (1959) Biosynthesis and constitution of lignin. *Nature* 183:1152–1155
- Kaneda M, Rensing KH, Wong JCT, Banno B, Mansfield SD, Samuels AL (2008) Tracking Monolignols during Wood Development in Lodgepole Pine. *Plant Physiol* 147:1750–1760
- Liu CJ, Miao YC, Zhang KW (2011) Sequestration and transport of lignin monomeric precursors. *Molecules* 16:710–727

- Miao YC, Liu CJ (2010) ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:22728–33
- Sato Y, Demura T, Yamawaki K, Inoue Y, Sato S, Sugiyama M, Fukuda H (2006) Isolation and characterization of a novel peroxidase gene ZPO-C whose expression and function are closely associated with lignification during tracheary element differentiation. *Plant Cell Physiol* 47:493–503
- Schuetz M, Benske A, Smith RA, Watanabe Y, Tobimatsu Y, Ralph J, Demura T, Ellis B, Samuels AL (2014) Laccases Direct Lignification in the Discrete Secondary Cell Wall Domains of Protoxylem. *Plant Physiol* 166:798–807
- Shafiei M, Karimi K, Taherzadeh MJ (2010) Pretreatment of spruce and oak by N-methylmorpholine-N-oxide (NMMO) for efficient conversion of their cellulose to ethanol. *Bioresour Technol* 101:4914–4918
- Shigeto J, Itoh Y, Hirao S, Ohira K, Fujita K, Tsutsumi Y (2015) Simultaneously disrupting AtPrx2, AtPrx25 and AtPrx71 alters lignin content and structure in Arabidopsis stem. *J Integr Plant Biol* 57:349–356
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408:796–815
- Tian S, Zhu W, Gleisner R, Pan XJ, Zhu JY (2011) Comparisons of SPORL and dilute acid pretreatments for sugar and ethanol productions from aspen. *Biotechnol Prog* 27:419–427
- Zhao Q, Nakashima J, Chen F, Yin Y, Fu C, Yun J, Shao H, Wang X, Wang ZY, Dixon RA (2013) LACCASE Is Necessary and Nonredundant with PEROXIDASE for Lignin Polymerization during Vascular Development in Arabidopsis. *Plant Cell* 25:3976–3987

平成 28 年度, 森林・林業白書, 森林及び林業の動向, 森林の資源と多面的機能, , 農林水産省, p.36

2017 年度, 日本のエネルギー, 経済産業省, p.3

第 2 章 モノリグノール輸送体候補遺伝子スクリーニングのためのシロイヌナズナ培養細胞管状要素誘導系における発現解析

第 1 節 序

これまでにリグニン前駆体の細胞外輸送メカニズムを明らかにするための研究が行われてきた。シロイヌナズナ主茎の異なる成長段階での、マイクロアレイ分析を用いた遺伝子発現パターン解析において、フェニルプロパノイド生合成遺伝子と同調的に発現していた複数の ABC 輸送体遺伝子が示された (Ehlting et al. 2005)。シロイヌナズナ葉の柔細胞から調製された細胞膜および液胞膜画分を用いたリグニン前駆体の輸送アッセイでは、ATP 存在下でモノリグノールおよびモノリグノール配糖体が細胞膜および液胞膜画分でそれぞれ選択的に輸送されることが示された (Miao and Liu 2010)。また、Ehlting らの調査 (2005) でフェニルプロパノイド生合成遺伝子と発現パターンが類似したいくつかの ABC 輸送体遺伝子に対して、金田らは T-DNA 挿入変異体の機能解析を行ったが、野生型と比較してリグニン沈着レベルにおいて差異は観察されなかった (Kaneda et al. 2011)。しかし、ABCB サブファミリー群に分類されるいくつかの ABC 輸送体は、オーキシンの分布に関連する輸送体であることが示唆された (Kaneda et al. 2011)。その後 Alejandro らの研究 (2012) において、マイクロアレイデータを用いた共発現解析により、いくつかのフェニルプロパノイド合成遺伝子と同調的に発現する *AtABCG29* を酵母において異種発現させると、ATP 依存的に *p*-クマリルアルコールが輸送され、コニフェリルアルコールやシナピルアルコールの輸送活性は示されなかった (Alejandro et al. 2012)。以上の結果から、リグニン前駆体の細胞外輸送に ABC 輸送体が関与している可能性が示された。しかしながら、依然としてリグニンの主要な構成要素である G 型および S 型モノマーの細胞外輸送に関わる輸送体に関する報告はされていない。

植物培養細胞に特定の植物ホルモンを添加することで、同調的な二次壁肥厚を誘導することができる。これを管状要素誘導と呼び、これまでに二次壁形成メカニズム解明に関わる研究に用いられてきた。福田、駒嶺らはオーキシシンおよびサイトカイニンを添加し、ヒヤクニチソウの単離葉肉細胞から管状要素誘導系を確立した (Fukuda and Komamine 1980)。この誘導系を用いた実験で、PAL および細胞壁結合性ペルオキシダーゼが管状要素誘導時の生化学的マーカーになり得ることが示された (Fukuda and Komamine 1982)。さらにシロイヌナズナの管状要素誘導系も開発された (Kubo et al. 2005; Oda et al. 2005)。シロイヌナズナは全ゲノム配列が明らかにされており、遺伝学的手法の応用が容易である。シロイヌナズナ培養細胞の管状要素誘導系を用いたマイクロアレイ遺伝子発現解析によって、活発な木部道管形成時に発現上昇を示した VND6 および VND7 が選出され、過剰発現体や抑制体の分析によって木部道管形成のマスタースイッチであることが示された (Kubo et al. 2005)。このようにシロイヌナズナの管状要素誘導系は、遺伝子発現変化を測定することによって細胞壁形成に関わる遺伝子を推定できるだけでなく、絞り込まれた対象遺伝子の遺伝子変異体を容易に得ることができるため機能推定も容易に行える。よって遺伝子調節ネットワーク全体を明らかにするために非常に有用なツールであるといえる。

そこで、本研究においても二次壁形成が促進される管状要素誘導培養細胞において、二次壁形成要素のひとつであるリグニン沈着の程度を経時的に調べた。リグニン沈着が進むに伴って、リグニン生合成関連遺伝子の発現量は変化すると予想された。

そこで本章では、シロイヌナズナ管状要素誘導系を用いて、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析を行った。既報を参考に、対象遺伝子は主に ABC 輸送体とした。輸送体遺伝子およびリグニン生合成遺伝子の経時的な発現パタ

ーンを明らかにし、比較することで、リグニン生合成に関わると予想される遺伝子を選抜することを目的とした。

第2節 T87 培養細胞を用いた管状要素誘導系の確立

2. 1 実験

2. 1. 1 T87 培養細胞の取得と継体

2. 1. 1. 1 T87 培養細胞の購入

T87 培養細胞 [Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. ecotype Columbia (Axelos et al. 1992)] は理化学研究所バイオリソースセンター (筑波)より購入した。取得した細胞は JPL 培地に移植して 22°C、連続明期、124 rpm で振とう培養した。

2. 1. 1. 2 JPL 培地の作製

JPL 培地 (Axelos et al. 1992)は理化学研究所バイオリソースセンターが提供するプロトコル (http://epd.brc.riken.jp/ja/wp-content/uploads/data/IPC8_T87_compr-1.pdf)に従って調製した。

2. 1. 1. 3 T87 培養細胞の継体

2 週間培養した細胞懸濁液を 1 mm メッシュに通した。濾過液を JPL 培地と 1:1 で混合した (希釈濾過液)。JPL 培地 80 ml を 300 ml 三角フラスコに分注し、希釈濾過液 4 ml を移植した。22°C、連続明期、124 rpm で 2 週間培養した。

2. 1. 2 T87 培養細胞の管状要素誘導

2. 1. 2. 1 前培養

1/3×Murashige-Skoog 培地 (3% Sucrose, 4.1 μM 2, 4-D, 以降 MS 培地) 80 ml を 300 ml 三角フラスコに分注し、継体時の希釈濾過液 8 ml を加えた。22°C、16 h 明期/8 h 暗期、124 rpm で 1 週間前培養した。

2. 1. 2. 2 本培養

前培養された細胞を 1/3×MS (1% Sucrose)で 3 回洗浄した後、同溶液 50 ml に再懸濁した。50 ml 三角フラスコに 1/3×MS [(1% Sucrose, 1 μM brassinolide (KYOWA PHARMA CHEMICAL CO.,LTD., Takaoka, Japan)]を 7 ml ずつ分注し、洗浄後前培養液を 1 ml ずつ添加した。暗所、22°C、124 rpm でインキュベートした。

2. 1. 2. 3 木化率の算出

均一に混ぜた管状要素誘導細胞懸濁液 (0, 2, 4, 6, 8, 10 日後)を約 250 μl チューブに取った。細胞のみをスライドガラス上に移し、スパーテルで軽くつぶした。1% フロログルシノール溶液に続いて 20% HCl 水溶液を数滴添加し、カバーガラスをかけた後ただちに光学顕微鏡で観察した。画像解析ソフト MMI (Molecular Machines & Industries AG, Glattbrugg, Switzerland)を用いて全細胞面積、及び組織化学染色によって赤紫色に染まった管状要素細胞の面積を求め、下記の式を用いて木化率を算出した。

$$\text{木化率} = \frac{\text{管状要素細胞エリア}}{\text{全細胞面積エリア}} \times 100$$

2. 2 結果と考察

既報のシロイヌナズナ培養細胞の管状要素誘導 (Kubo et al. 2005; Oda et al. 2005) を参考に、管状要素誘導の条件検討を行った。MS 培地濃度、添加物としてリン酸二水素カリウムまたはホウ素の有無を検討事項とし (Table 2-1)、各

条件で 8 日間誘導培養した。1×MS と 1/3×MS を利用した場合では、1/3×MS を利用した場合の方が著しく木化細胞比率が上昇した (Fig 2-1b)。また、リン酸二水素カリウムまたはホウ素の添加は木化細胞比率に大きく影響を与えなかった (Fig 2-1b)。この結果に基づいて、1/3×MS 培地に添加物を加えない条件で管状要素誘導を行うことにした。管状要素誘導後の木化レベルの変化を明らかにするため、木化誘導後細胞のうち木化細胞の割合をフロログルシノール染色によって経時的に測定した (Fig. 2-2b, c)。木化細胞の割合は、4 日目から増加率が上昇し、管状要素誘導処理の 9 日以降にプラトーに達した (Fig. 2-2a)。これは、リグニン合成が誘導処理開始後 4 日目から促進され、6 日目と 9 日目の間に特に活発に行われることを示している。また 10 日以降、木化細胞比率はわずかにしか変化していないことから、培養細胞においてリグニン合成が減少していることが示れた。したがって、本研究では管状要素誘導処理開始を 0 日として、2、4、6、8、10 日の細胞中でのリグニン生合成遺伝子および輸送体遺伝子の発現量変化を解析することで、リグニン生合成に関与する可能性のある輸送体遺伝子を絞り込む事ができると考えた。

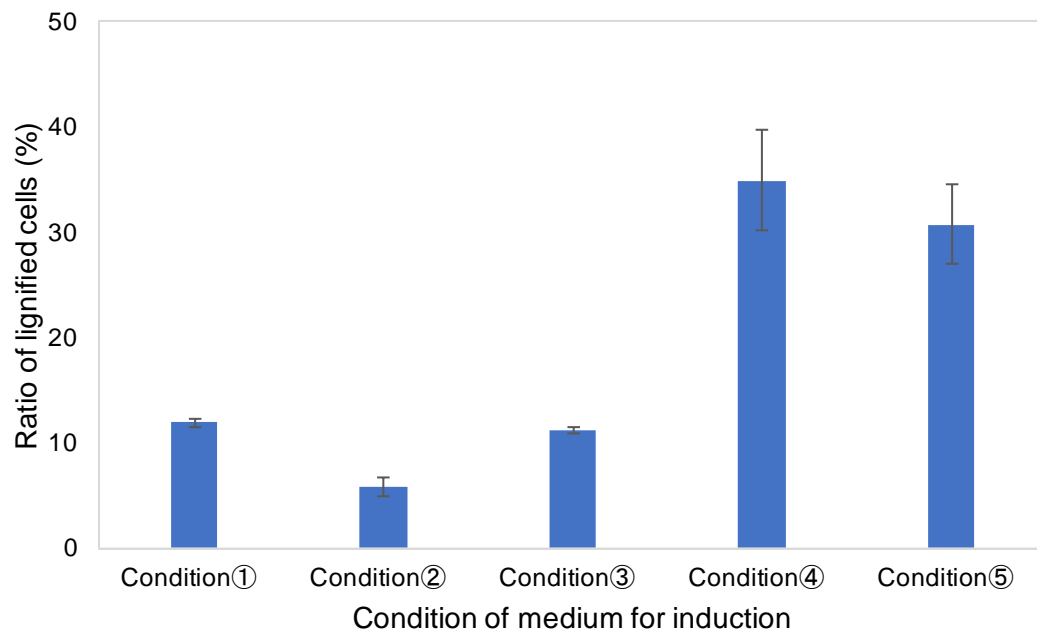


Fig 2-1 Ratio of lignified cells after eight days under different tracheary element induction conditions

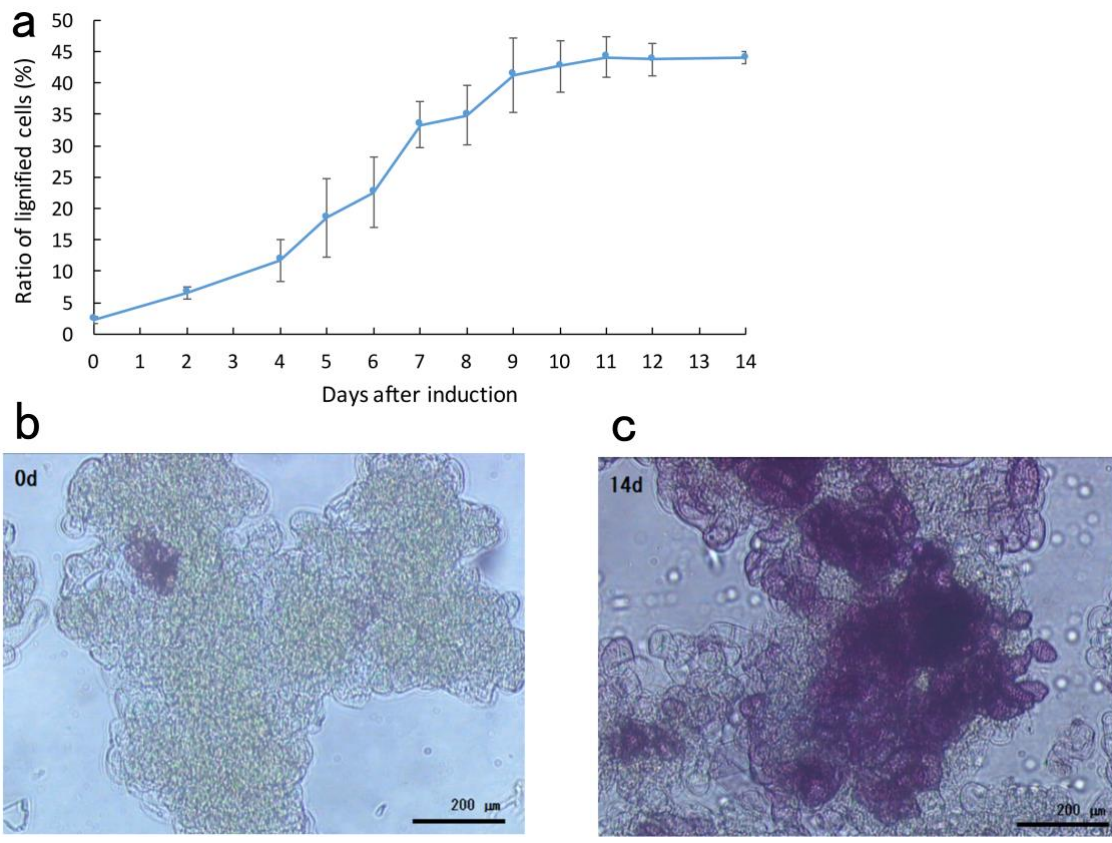


Fig. 2-2 The lignification progress in T87 cultured cells after tracheary element induction. **a** Changes of the ratio of lignified cells after TE induction treatment. **b** and **c** Phloroglucinol stained cultured cells. **b** 0 days. **c** 14 days. Scale bars 200 μm

Table 2-1 Different medium condition of tracheary element induction

Condition
① 1×MS (1%Sucrose, 1 μM brassinolide)
② 1×MS (1%Sucrose, 1 μM brassinolide, 10 mM H ₃ BO ₃)
③ 1×MS (1%Sucrose, 1 μM brassinolide, 510 mg/L KH ₂ PO ₄)
④ 1/3×MS (1%Sucrose, 1 μM brassinolide)
⑤ 1/3×MS (1%Sucrose, 1 μM brassinolide, 510 mg/L KH ₂ PO ₄)

第3節 管状要素誘導サンプルを用いたリアルタイム PCR による輸送体遺伝子の発現解析

3. 1 実験

3. 1. 1 cDNA 調製

管状要素誘導処理後細胞 (0、2、4、6、8、10 日) を生重量約 10 mg 取り、液体窒素下で破碎した。FavorPrep™ Plant Total RNA Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Ping-Tung, Taiwan) を用いて RNA を抽出し、DNase I (Toyobo Co., Osaka, Japan) で処理した。直ちに ologo dT プライマーおよびランダムプライマーを含む ReverTra Ace® (Toyobo Co.) で cDNA 合成を行った。

3. 1. 2 プライマー設計

The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>、以降 TAIR) より各対象遺伝子の CDS 配列を取得した。これらの配列をアラインメントし、共通配列を確認した。遺伝子特異的箇所をターゲットとし、200–300 bp を増幅するプライマーを設計した。これらのオリゴヌクレオチドを受託合成した (Genenet、<http://www.genenet.co.jp/>, Table 2-1, 2)。

3. 1. 3 リアルタイム PCR 分析

3. 1. 1 で調製した cDNA を 1/10 希釈して鋳型とした。各ターゲットフラグメントのコピー数は標準曲線法で算出した。検量線を作成するための各ターゲットフラグメントは KOD-Plus-Neo (Toyobo Co.) で増幅した。PCR 産物は LaboPass™ GEL (Hokkaido System Science Co., Ltd., Sapporo, Japan) を用いて精製した。精製されたフラグメントの初期コピー数は、NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MS, USA) で測定した核酸濃度を参考に概算した。

リアルタイム PCR 反応系は Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)を用いて 20 µl の系 [10 µl 2× Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix、0.8 µl 10 µM forward (F) および 10 µM reverse (R) プライマー (Table2-1, -2)、6.8 µl RNase free water、1.6 µl cDNA 溶液]で実施した。リアルタイム PCR 装置 Aria mix (Agilent Technologies, Inc.)を用いて、95°C: 3min の後 95°C: 5 sec と 60°C: 10 sec を 40 サイクルで反応させた。特異的なターゲットフラグメントの増幅を確認するため、溶解曲線を取得した。検量線の相関係数は $r^2 > 0.98$ であった。発現量の補正のために、ハウスキーピング遺伝子の一つである *UBQ5* (At3g62250) の発現量も定量した (Gutierrez et al. 2008)。

3. 1. 4 遺伝子発現解析

管状要素誘導時の経時的な発現変化を視覚的に見るため、発現パターンのクラスタリングを試みた。各ターゲット遺伝子の発現量の生データを z-score に正規化した。R 統計解析ソフト [R. ver.3.4.3, R Core Team (2017), <http://www.r-project.org>] で、gplot パッケージに含まれる関数 heatmap.2 を使ってヒートマップを作成した。

3. 2 結果と考察

本研究では ABC 輸送体がモノリグノール輸送に関与していると予想し、以下のような理由から、主に ABC 輸送体から発現解析対象遺伝子を選択した。マイクロアレイを用いた発現解析により、シロイヌナズナ培養細胞の管状要素誘導の前後で 8 倍以上発現レベルが変化した遺伝子の中から木部道管要素形成のための転写因子である *VND6* および *VND7* が同定された (Kubo et al. 2005)。

同様に、木化に関連する輸送体遺伝子が木化に伴って発現変化すると考え、上述の実験で8倍以上発現量に変化した遺伝子の中から輸送体遺伝子を対照遺伝子として選択した (Table 2-3, Groups 1 and 2)。維管束間繊維における木化レベルが異なるシロイヌナズナの茎横断面サンプルを用いて、マイクロアレイ分析による包括的転写プロファイリングが行われ、木化に関与する遺伝子と共発現する輸送体が示された (Ehlting et al. 2005)。これらの輸送体遺伝子は維管束間繊維における木化レベルの変化に基づいて選択されたため、発現解析の対象遺伝子に加えた (Table 2-3, Group 3)。ポプラ細胞膜画分のプロテオーム解析では膜結合性タンパクの局在が示された (Nilsson et al. 2010)。複数の ABC 輸送体が木部、形成層または両組織において局在していたことから対象遺伝子に追加した (Table 2-3, Group 4)。ポプラ細胞膜画分における V-ATPase によるプロトン依存的なモノリグノール配糖体の輸送が報告された (Tsuyama et al. 2013)。V-ATPase は液胞内にリグニン前駆体を蓄積する役割を担う可能性があり、これらもまた解析対象の輸送体遺伝子に含めた (Sze et al. 2002; Table 2-3, Group 5)。以上から、29 個の輸送体遺伝子をスクリーニング対象に選択した。

管状要素は複数の木部分化関連遺伝子 (木部道管転写因子、二次壁形成関連遺伝子、プログラム細胞死関連遺伝子など) が複雑に調節されて発現することで形成される (Zhong and Ye 2009; Zhao and Dixon 2011)。リグニン生合成は二次壁生合成の一部であるため、二次壁形成関連遺伝子およびその上流の木部道管転写因子などが発現するタイミングを、リグニン生合成が行われている時期の指標とすることができると考えた。そこでモノリグノール生合成遺伝子、二次壁生合成遺伝子、リグニン重合遺伝子などをリファレンス遺伝子として選択した (Table 2-4)。

管状要素誘導後の、経時的なリファレンス遺伝子および輸送体遺伝子の相対発現レベルを Fig. 2-3 および 2-4 に示した。原生木部の転写因子である *VND7*

の発現レベルは4日に最高値に達し、4から10日にかけて次第に減少した (Fig. 2-3a)。MYB46、MYB58はそれぞれ二次壁形成転写因子とリグニン生合成転写因子であり、MYB58はMYB46の下流転写因子になる。両転写因子の発現レベルは管状要素誘導後6日に最も高くなった (Fig. 2-3a)。さらにモノリグノール生合成遺伝子であるC4HやCAD5は8日に最も高い発現を示した (Fig. 2-3a)。リグニン合成に関与する上記遺伝子の発現プロファイルは、木化細胞の細胞壁形成プロセス、つまり木部細胞への分化、二次細胞壁形成誘導、リグニン沈着の進行という順序と一致するように見えた。後生木部転写因子であるVND6の発現は管状要素誘導後6日に極大を示した後急激に減少した (Fig. 2-3a)。VND7の発現レベルはVND6の発現レベルよりもかなり高かった。この結果からシロイヌナズナ培養細胞における管状要素誘導は、原生木部道管細胞の二次細胞壁の肥厚を主に促進することが示唆された。ANAC005は8日までほとんど発現していなかったが、10日目には、0日目と比較して6.2倍高い発現量を示した (Fig. 2-3a)。ANAC005は膜結合NACファミリー転写因子に属し、シロイヌナズナ植物体においてANAC005発現上昇時にリグニン含量が抑制されることが示された (Zhao et al. 2015)。本実験において、管状要素誘導10日後にANAC005の発現が高くなることは、誘導10日間で細胞中の木化レベルの上昇が停滞することと矛盾しない。従って、ANAC005は、木化のリプレッサーとして機能し得ると考えられる。

各ペルオキシダーゼは異なる発現パターンを有していた (Fig. 2-3b)。3つのシロイヌナズナにおけるペルオキシダーゼ、AtPrx25、AtPrx71およびAtPrx2は木化に関与していることが報告されている (Shigeto et al. 2013, 2015)。AtPrx25 (Fig. 2-3a) の発現パターンは、C4HおよびCAD5の発現パターン (Fig. 2-3b) と最も類似しており、管状要素誘導後8日目で発現極大を示した。AtPrx71の発現レベルは、誘導後6日目に上昇し始め、10日目まで上昇した (Fig. 2-3b)。

rAtPrx71 は、グアイアシル型およびシリリングル型化合物に加えて、高分子を酸化可能である (Shigeto et al. 2014)。AtPrx71 の発現パターンは、より高分子リグニンが形成されていると予想される管状要素誘導後半に発現量が上昇することと矛盾しない。AtPrx25 および AtPrx71 の発現パターンと既報による機能を考慮すると、これら 2 つのペルオキシダーゼは管状要素誘導中のリグニン形成に関連していることが示唆された。AtPrx2 は、誘導処理後 10 日目までほとんど発現していなかった (Fig. 2-3b)。したがって、AtPrx2 は、管状要素形成時はリグニン重合への寄与が小さいと考えられる。

モノリグノール生合成および重合に関連する遺伝子の発現は、6 日から 8 日かけて促進され、管状要素誘導の 8 日後に最も活発であった (Fig. 2-3a, b)。グループ 1 (Fig. 2-4a, Table 2-3)に含まれる遺伝子は、リファレンス遺伝子とは全く異なる発現パターンを示した (Fig. 2-3a)。グループ 2 の輸送体遺伝子の中で、ABCG27 および ABCG11 は誘導後 6 から 8 日目で高発現した (Fig. 2-3d)。グループ 3 の輸送体のうち、*p*-クマリルアルコール輸送体であることが示唆された ABCG29 (Fig. 2-3e)は、リグニン生合成遺伝子 (Fig. 2-3a)と同様に 8 日目に最も強く発現した。この結果は、ABCG29 がリグニン前駆体の輸送体であるという以前の報告を支持するものである (Alejandro et al. 2012)。同様に、ABCG22、ABCG36 は 8 日目に最も高い発現レベルを示した (Fig. 2-3e)。これらの結果から、ABCG11、ABCG22、ABCG27、ABCG29 および ABCG36 がリグニン前駆体の輸送体であり得ると予想した。グループ 4 の輸送体遺伝子は、ポプラの原形質膜のプロテオーム解析により木部、形成層またはその両方に局在することが示されていた (Nilsson et al. 2010)。ABCB4 の発現レベルは木化が活発になる直前にわずかに増加したが、ABCB13 および ABCB15 は管状要素誘導中ほとんど発現しなかった (Fig. 2-4b)。したがって、これらの遺伝子は、管状要素形成中の木化に関連しないと考えられた。グループ 5 の遺伝子は、液胞 ATP

アーゼのサブユニットをコードする遺伝子群である。*VHA-B1* および *VHA-B3* の発現は、誘導期間の後半で増加したが、他の V-ATPase 構成遺伝子はほとんど変化を示さなかった (Fig. 2-4c)。これらの遺伝子の発現プロファイルは、リファレンス遺伝子の発現プロファイルとは異なっていた (Fig. 2-3a)。したがって、V-ATPase は木化に参与している可能性は低いと考える。

セルロース生合成関連遺伝子 *CesA7* は 6 日目に発現ピークを示した (Fig. 2-3c)。プログラム細胞死関連遺伝子 *XCPI* の発現レベルは誘導後 4 日目から増加し、8 日目まで高い発現を維持したのち減少した。このことはプログラム細胞死が誘導処理後の初期段階で起こったことを示唆している。モノリグノール生合成遺伝子 *CAD5* および *C4H* が 8 日目に発現ピークを有することを考慮すると、リグニン生合成は細胞死の後も続いている可能性が示唆される (Fig. 2-3a)。プログラム細胞死が誘導されると、細胞はその内容物を放出し、細胞壁形成のための成分を新たに生合成することはできない。したがって、死細胞の木化は、他の細胞からのモノリグノール供給によって行われなければならない。既報において、管状要素誘導後の培地成分中に、モノリグノールおよびジリグノールが検出された (Hosokawa M, Suzuki S, Umezawa T 2001; Tokunaga et al. 2005; Pesquet et al. 2013)。本来木化する細胞自体においてモノリグノール生合成遺伝子の一つである *CCR1* の発現が抑制され、近隣の柔細胞では抑制されない形質転換植物体では、木部の二次細胞壁には依然としてリグニンが沈着した (Smith et al. 2013)。これは、周囲の木部柔細胞によるリグニン単量体の供給によって、木部細胞の木化が進められ得ることを示唆した。

発現パターンを客観的および視覚的に評価するために、発現データの統計処理によってヒートマップを作成した。全対象遺伝子は 9 つのクラスター (I–IX) に分類され、リファレンス遺伝子の大部分はクラスター II–IV に含まれていた (Fig. 2-5)。クラスター III にはリファレンス遺伝子 *XCPI*、*AtPrx25* および

MYB46 が含まれていた。クラスターIIIに最も近いクラスターIVには、リグニン生合成転写因子である *MYB58* と、推定 *p*-クマリルアルコール輸送体である *ABCG29* が含まれていた。クラスターIVに分類された遺伝子群の発現は、誘導後4日以降発現上昇傾向を示し、8日目にピークに達し、10日目には頭打ちになった。また、木化細胞比率は4日以降増加傾向を示し、8日まで増加し続け、10日以降はほとんど変化しない (Fig. 2-5)。このようにクラスターIVに分類された遺伝子の発現は木化の進行具合と良く一致している。したがって、クラスターIVに含まれる輸送体遺伝子 *ABCG11*、*ABCG22* および *ABCG36* は、シロイヌナズナ培養細胞の木化に関与している可能性が高い。*abcg11* ノックアウト変異体の葉は表面構造が乱れており、クチン単量体およびワックス量が劇的に減少していたことから、クチンおよびワックスモノマー分泌に関連することが報告されている (Bird et al. 2007; Panikashvili et al. 2007)。*AtABCG11* は茎の表皮および皮層、葉の表皮、根の根端、成長中側根に加えて (Bird et al. 2007)、若い葉の主脈、葉柄、成熟した根の維管束系 (Panikashvili et al. 2007)においても強く発現することが示された。*abcg22* ノックアウト変異体では水分喪失が増加したことから、*AtABCG22* は気孔開閉の調節に必要であることが示唆された (Kuromori et al. 2011)。茎および葉で *AtABCG22* の強い発現が観察された。*AtABCG11* および *AtABCG22* は、葉の主脈、根の維管束および茎などの高度に木化した植物器官で発現している。したがって、*AtABCG11* および *AtABCG22* は、既報における機能に限らず、木化にも関与している可能性がある。*AtABCG36* は、側部根冠の表皮および根冠の柔細胞において *indoie-3-butylic acid* (IBA)の排出輸送体であることが示唆されたが (Strader and Bartel 2009)、病原体耐性および重金属輸送にも関連することが報告されている (Dittgen et al. 2006; Kim et al. 2007; Underwood and Somerville 2013; Lu et al. 2015; Campe et al. 2016)。*AtABCG36* は、種々の基質の輸送に関与することが示唆されており、本

研究では、*AtABCG36* は、リファレンス遺伝子と同期して管状要素分化中に高度に発現していたことから、リグニン前駆体も輸送する可能性があると考えた。

ABCG27 および *ABCG33* は、木部分化転写因子である *VND6* と *VND7* およびセルロース生合成遺伝子 *CesA7* を含むクラスターIIに含まれていた (Fig. 2-4)。木部分化およびセルロース生合成の誘導は、リグニン生合成より早い段階で起こる事象である。クラスターIIに含まれる遺伝子の発現は、リグニン生合成関連遺伝子よりも早く増加傾向を示し、かつ早く減少した。したがって、*ABCG27* および *ABCG33* は、リグニン合成に関与せず、むしろセルロース合成に関与している可能性がある。

モノリグノール合成遺伝子 *CAD5* および *C4H* の発現は、*MYB58* および *AtPrx25* などのリグニン合成関連遺伝子の発現と同様に管状要素誘導後 8 日目に極大となった。*CAD5* および *C4H* 遺伝子の木化への関与については、多くの報告がある。*CAD5* のプロモーター活性は木部繊維および木部で高く、シロイヌナズナ植物の根および幼茎において、RNA レベルで *CAD5* が高発現していることが示された (Sibout et al. 2003)。*CAD5* および *CAD4* (*CAD5* のホモログ遺伝子) のダブルノックアウト変異体の花茎は、リグニン含量が野生型と比較して 40%減少し、モノマー含量が変化していた (Sibout et al. 2005)。*C4H* と木化との間にも強い相関が報告されている。ノーザンブロット解析によって、*C4H* はシロイヌナズナの茎および根において高い発現を示した (BellLelong et al. 1997)。シロイヌナズナ *C4H* 欠損変異体は、リグニン沈着の減少およびリグニンモノマー含量の変化を示した (Schillmiller et al. 2009)。しかしながら、管状要素誘導時の遺伝子発現解析においては、これらのモノリグノール合成遺伝子は予想外にクラスターIII または IV に含まれていなかった。

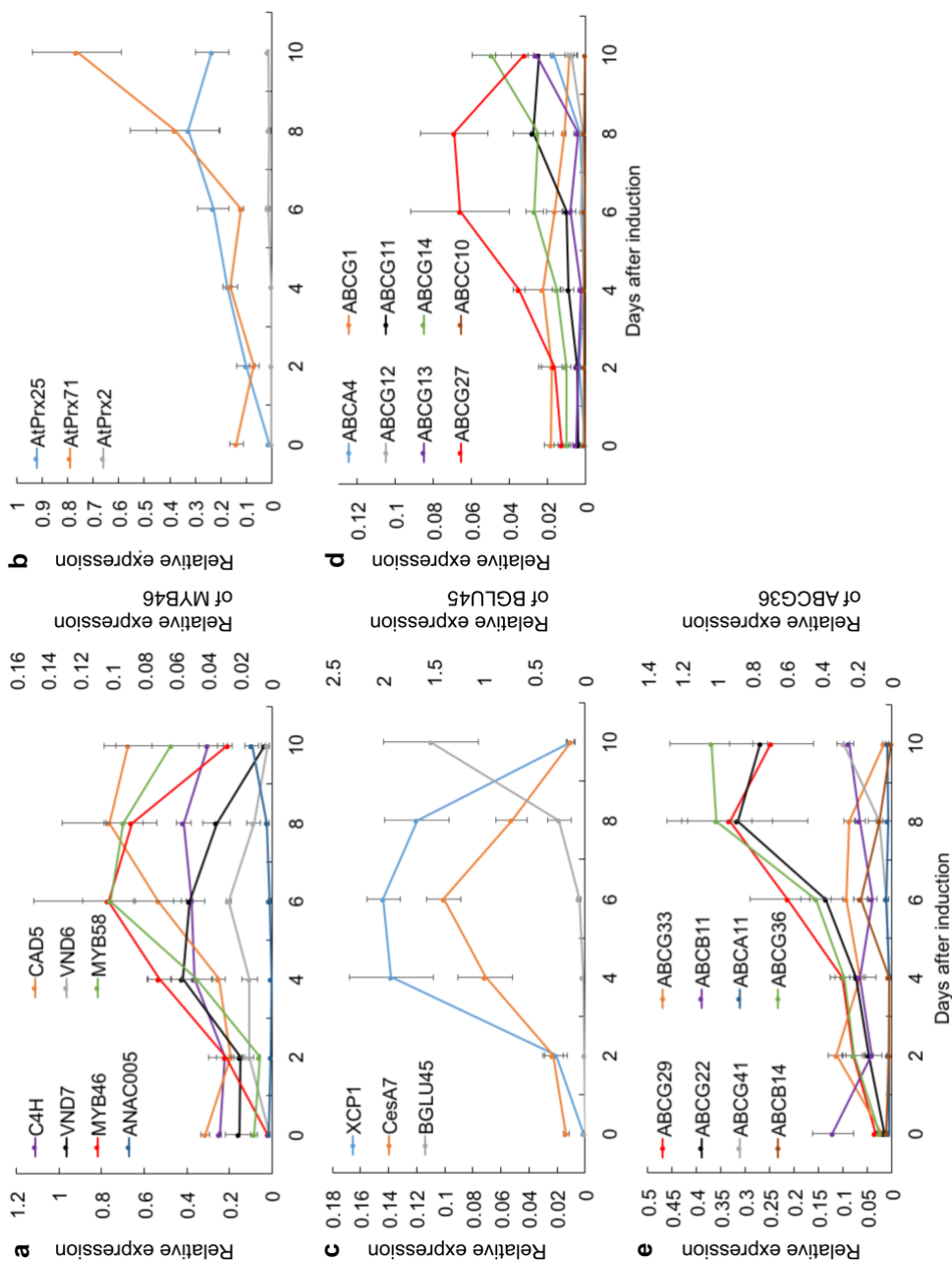


Fig. 2-3 Changes of the relative expression of reference genes and transporter genes during TE formation. **a** Monolignol synthesis genes and transcription factor genes for lignin synthesis, secondary cell wall synthesis and xylem formation. **b** Lignin synthesis related peroxidases. **c** Programmed cell death related gene, cellulose synthesis related gene and β -glucosidase gene. **d** transporter genes in group 2. **e** transporter genes in group 3

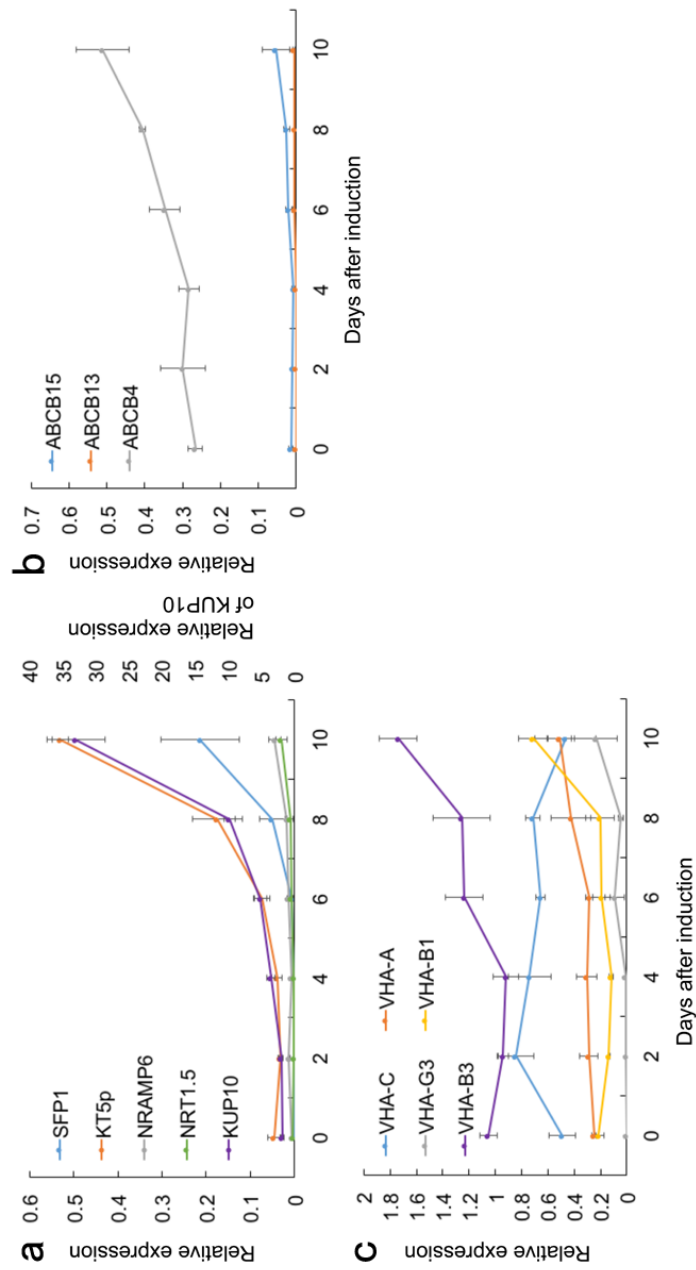


Fig. 2-4 Changes of the relative expression of transporter genes during TE formation. **a** transporter genes in Group 1. **b** transporter genes in Group 4. **c** transporter genes in Group 5

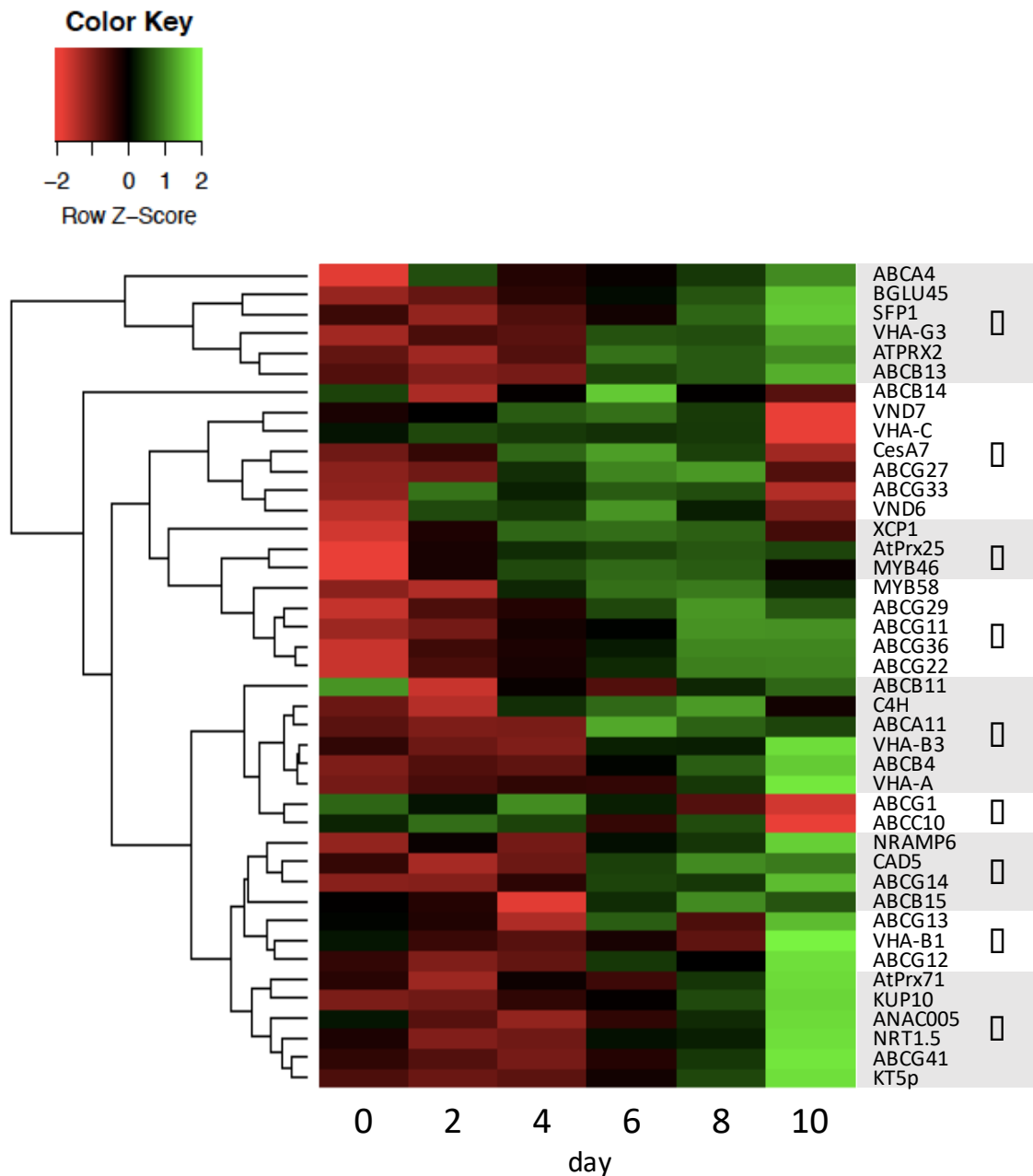


Fig. 2-5 Clustering of data from a time course of gene expression during TE induction.

The time course of gene expression after TE induction in Arabidopsis cultured cells was constructed using real-time PCR. Genes were ordered using a clustering program (see “Methods”) so that those with similar expression patterns were grouped together (I to IX). Each gene and sampling day is represented by a single row and column of colored boxes, respectively. Green: high expression, red: low expression

Table 2-2 Primers specific for the transporter genes analyzed by real-time PCR

Target gene	AGI	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>NRAMP6</i>	At1g15960	GCCCTATGCTTCTTTGTTGAGC	CGGCATAACCATGGCACC
<i>KUP10</i>	At1g31120	AACCTTCCCGTATACACCGTTC	GCCGTTTCTCAAAGTCGTCATC
<i>SFP1</i>	At5g27350	AGCACTTTTGTGCGCGTTTG	AGCTCCTAAAGTGGCGAATGAG
<i>KT5p</i>	At1g60160	GCTATGTCAGTGATGTCTGC	CAACGAGAATCACAATCG
<i>NRT1.5</i>	At1g32450	AAGTTTTGGTCGCTGCAACG	TTCGCTGTCTCCGTCATACATC
<i>ABCG1</i>	At2g39350	AGATAGCTCAAACGGCGAGGC	CGCTAGCGCCTAGAACAGC
<i>ABCG12</i>	At1g51500	AAACGGTCATGCTGAACCAG	CACGTTTCTTGCGAGTCTAC
<i>ABCC10</i>	At3g59140	CATCAGCGACGGACGGATTG	CAACGTGAGTCAGCCGAGTTG
<i>ABCA4</i>	At3g47750	GGACCGAGTTTCTTCATCCGCG	GCTCTCTCCTCAACGACATCTAG
<i>ABCG14</i>	At1g31770	TCGGTGCTCTGCTTATGAAC	ACGATGAAGGGAGGAATTTG
<i>ABCG27</i>	At3g52310	GTGGCTATTTCTGTAAGAAAGTTCC	CTTCCTTAAGCCCACTCTCTATTTCC
<i>ABCG11</i>	At1g17840	GCTCTACAAGGTCAGTACCAG	GCAAGTCGATCTGAAAGACG
<i>ABCG13</i>	At1g51460	TCGACCTTATCTGCGCGATTACAAC	ACCCCGCACTTAACACCATAATTCC
<i>ABCA11</i>	At5g61690	GGCATCTCACTAGAGATACCTGTG	GATGAGTGTCCAGAGATGCACATC
<i>ABCB4</i>	At2g47000	GTGTTATGGTAAACCGGACTACG	CTCCGTCTTTGATATTGATCAACG
<i>ABCB11</i>	At1g02520	GCATACAACAGGGTTATGACAC	CTCTGATTCCGCATCAAGAG
<i>ABCB13</i>	At1g27940	GCTTCACTTACCGAGCAAC	GTAAACTGTTCCGAGATCTG
<i>ABCB14</i>	At1g28010	CGTTCACTTACCGAGCA	GCAGCGACGGTTCCTTATATTC
<i>ABCB15</i>	At3g28345	CTTCTACACTCGTCGGGTTC	CTTTCTTGGGCCTTTTCGAGC
<i>ABCG22</i>	At5g06530	AAATAAGGAGAGAGCAGCGGATATG	GACGACAAGAAGGAAGAGAGAAGG
<i>ABCG29</i>	At3g16340	TTGCTCCAGAACTCAGCAG	CATCGATCTGCAAGTTGCCG
<i>ABCG33</i>	At2g37280	GCAGCCGCCATTGTAATGAG	GTTGTCCAAGTGGTCCGCTA
<i>ABCG36</i>	At1g59870	TGTGACTGGTGCATTTAGGC	TTTTCTTCCGGCCAAAACG
<i>ABCG41</i>	At4g15215	TCAGGTCCTAGTTGAGGTTC	CAGACATATGGTAGCCGATC
<i>VHA-C</i>	At1g12840	GATCTCAAGTTCGTGTTGC	ACTTCGGAACAACCTGCAAGG
<i>VAB3</i>	At1g20260	CAACTTCACAACAGACAG	GATCCTCGGAAGACAGAG
<i>VAB1</i>	At1g76030	CAACTTCACAACAGACAG	CTAGATAAAGCAAATCCTC
<i>VHA-G3</i>	At4g25950	CAAGGTGGGATTCAGATG	TGCAGTAGTGGTGACATAC
<i>VHA-A</i>	At1g78900	AGGAAAGCTTACGACCTTCGAG	CCATACCATCGGCAACAACAAC

Table 2-3 Primers specific for reference genes related to lignin synthesis and secondary wall formation analyzed by real-time PCR

Target gene	AGI	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>VND6</i>	At5g62380	CGCTTGACAAGTTTGTGCTTCTCAGC	GGAAGAAGCATTTCATCGAAACCATTG
<i>VND7</i>	At1g71930	ATGCATCAATATGGCAACATTGAG	TAGTGTTCTCCAATCCACACAGTT
<i>MYB46</i>	At5g12870	GAATGTGAAGAAGGTGATTGGTACA	CGAAGGAACCTCAGTGTTTCATCA
<i>MYB58</i>	At1g16490	CCAGAGAACAGAGCTCTTCAAGAG	ATGTATGAGGAGCTCGTAACTCTC
<i>ANAC005</i>	At1g02250	ATTAGCTCAAGAGGTGAG	GTTCTTGATCGTCTCTTG
<i>C4H</i>	At2g30490	CCGGGATTATATTGGCATTG	CTGAATTGTCCACCTTTCTC
<i>CAD5</i>	At4g34230	GAGAGATCTGGAACAGTATTGTCC	CTCTTAGGCCTGGTTGTTTC
<i>AtPrx2</i>	At1g05250	GCGCTGGAGAGGAAGTGTCTAATC	CATCGTTCAATTTGAGATGCGTC
<i>AtPrx25</i>	At2g41480	ATATTGCACTTGCTGCTCGTGACTC	GATGCTTCAGTTGCCAACGAGATTCT
<i>AtPrx71</i>	At5g64120	GCATTAGCCGCTCGTGACACAG	GGACGACGAGATCACGAGTATTGAGT
<i>BGLU45</i>	At1g61810	TGGTCGTCATCAAAGTTCTTC	GCTCTATCTGCATTGTTCTTG
<i>CesA7</i>	At5g17420	GGCAAACCTCAAGTGGCTTGAGCG	TAACTCCGCTCCATCTCAATTCC
<i>XCP1</i>	At4g35350	TTGACCCATGAAGAGTTCAAAGGAAGA	GAAAGCGAACTCAGATTCCTGTTG
<i>UBQ5</i>	At3g62250	GACGCTTCATCTCGTCC	CCACAGGTTGCGTTAG

Table 2-4 Transporter genes selected for expression analyses

Group	AGI	Gene name
1	At1g15960	NRAMP metal ion transporter 6 (<i>NRAMP6</i>)
	At1g31120	K ⁺ uptake permease 10 (<i>KUP10</i>)
	At5g27350	sugar-porter family protein (<i>SFP1</i>)
	At1g60160	Potassium transporter family protein (<i>KT5p</i>)
	At1g32450	nitrate transporter 1.5 (<i>NRT1.5</i>)
2	At2g39350	<i>ABCG1</i>
	At1g51500	<i>ABCG12</i>
	At3g59140	<i>ABCC10</i>
	At3g47750	<i>ABCA4</i>
	At1g31770	<i>ABCG14</i>
	At3g52310	<i>ABCG27</i>
	At1g17840	<i>ABCG11</i>
	At1g51460	<i>ABCG13</i>
3	At5g61690	<i>ABCA11</i>
	At1g02520	<i>ABCB11</i>
	At1g28010	<i>ABCB14</i>
	At5g06530	<i>ABCG22</i>
	At3g16340	<i>ABCG29</i>
	At2g37280	<i>ABCG33</i>
	At1g59870	<i>ABCG36</i>
	At4g15215	<i>ABCG41</i>
4	At2g47000	<i>ABCB4</i>
	At1g27940	<i>ABCB13</i>
	At3g28345	<i>ABCB15</i>
5	At1g12840	V-ATPase synthase subunit C (<i>VHA-C</i>)
	At1g20260	V-ATPase B subunit 3 (<i>VHA-B3</i>)
	At1g76030	V-ATPase B subunit 1 (<i>VHA-B1</i>)
	At4g25950	V-ATP synthase subunit G3 (<i>VHA-G3</i>)
	At1g78900	V-ATP synthase subunit A (<i>VHA-A</i>)

Table 2-5 Reference genes selected for expression analyses

Gene name	AGI	Presumed Function
<i>VND6</i>	At5g62380	Promotes metaxylem differentiation and directly regulates PCD
<i>VND7</i>	At1g71930	Promotes xylem vessel and protoxylem differentiation
<i>MYB46</i>	At5g12870	Regulates secondary cell wall biosynthesis
<i>MYB58</i>	At1g16490	Activates lignin biosynthetic pathway
<i>ANAC005</i>	At1g02250	Regulates vascular development
<i>C4H</i>	At2g30490	Monolignol biosynthetic enzyme
<i>CAD5</i>	At4g34230	Monolignol biosynthetic enzyme
<i>AtPrx2</i>	At1g05250	Monolignol dehydrogenative polymerization enzyme
<i>AtPrx25</i>	At2g41480	Monolignol dehydrogenative polymerization enzyme
<i>AtPrx71</i>	At5g64120	Monolignol dehydrogenative polymerization enzyme
<i>BGLU45</i>	At1g61810	Monolignol glucosides hydrolysis Glucosidase
<i>CesA7</i>	At5g17420	Cellulose biosynthetic membrane protein
<i>XCP1</i>	At4g35350	Regulates PCD

第4節 小括

本章では、二次壁肥厚環境を短期間で再現できる管状要素誘導系を用いて輸送体遺伝子および二次壁生合成関連遺伝子の発現プロファイル解析を実施し、モノリグノール輸送体候補遺伝子の選択を試みた。本実験で用いたシロイヌナズナ培養細胞の管状要素誘導条件では、誘導後4日以降に木化比率が上昇し、誘導後6日から9日の間に上昇率が最も高いことが示された。また、誘導後10日以降の木化細胞比率の変化は著しく小さかった。この結果に基づいて、管状要素誘導処理開始を0日として10日まで、2日おきに細胞を回収して輸送体遺伝子および二次壁生合成関連遺伝子の発現解析を行った。経時的な誘導後サンプルから調製したcDNAを鋳型にしてリアルタイムPCRで発現量を測定し、各遺伝子の発現パターンをクラスタリングした。

解析対象遺伝子は9つのクラスターに分類され、リファレンス遺伝子の大部分は3つのクラスターに含まれていた。クラスターIIIにはリファレンス遺伝子*XCPI*、*AtPrx25* および *MYB46* が含まれていた。クラスターIIIに最も近いクラスターIVには、リグニン生合成転写因子である *MYB58* と、推定 *p*-クマリルアルコール輸送体である *ABCG29* が含まれていた。このクラスターに分類された遺伝子の発現は、誘導後4日以降発現上昇傾向を示し、8日目にピークに達し、10日目には頭打ちになった。また、木化細胞比率は4日以降増加傾向を示し、8日まで増加し続け、10日以降はほとんど変化しない。このクラスターの遺伝子発現は木化の進行具合と一致している。したがって、クラスターIVに含まれる輸送体遺伝子 *ABCG11*、*ABCG22* および *ABCG36* は、シロイヌナズナ培養細胞の木化に関与している可能性が高いと予想した。

参考文献

- Alejandro S, Lee Y, Tohge T, Sudre D, Osorio S, Park J, Bovet L, Lee Y, Geldner N, Fernie AR, Martinoia E (2012) AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr Biol* 22:1207–1212
- Axelos M, Curie C, Mazzolini L, Bardet C, Lescure B (1992) A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *PLANT Physiol Biochem* 30:123–128
- BellLelong DA, Cusumano JC, Meyer K, Chapple C (1997) Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*---regulation in response to development and the environment. *Plant Phys* 113:729–738
- Bird D, Beisson F, Brigham A, Shin J, Greer S, Jetter R, Kunst L, Wu X, Yephremov A, Samuels L (2007) Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J* 52:485–498
- Campe R, Langenbach C, Leissing F, Popescu GV, Popescu SC, Goellner K, Beckers GJM, Conrath U (2016) ABC transporter PEN3/PDR8/ABCG36 interacts with calmodulin that, like PEN3, is required for *Arabidopsis* nonhost resistance. *New Phytol* 209:294–306
- Stein M, Dittgen J, Sánchez-Rodríguez C, Hou BH, Molina A, Schulze-Lefert P, Lipka V, Somerville S (2006) PLANT FUNGAL INFECTION PROCESS *Arabidopsis* PEN3 / PDR8 , an ATP Binding Cassette Transporter , Contributes to Nonhost Resistance to Inappropriate Pathogens That Enter by Direct Penetration. *Plant Cell* 18:731–746
- Ehltling J, Mattheus N, Aeschliman DS, Li E, Hamberger B, Cullis IF, Zhuang J, Kaneda M, Mansfield SD, Samuels L, Ritland K, Ellis BE, Bohlmann J, Douglas

- CJ (2005) Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *Plant J* 42:618–640
- Fukuda H, Komamine A (1980) Establishment of an Experimental System for the Study of Tracheary Element Differentiation from Single Cells Isolated from the Mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol* 65:57–60
- Fukuda H, Komamine A (1982) Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary-element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Planta* 155:423–430
- Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C, Van Wuytswinkel O (2008) The lack of a systematic validation of reference genes: A serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol J* 6:609–618
- Hosokawa M, Suzuki S, Umezawa T, Sato Y (2001) Progress of Lignification Mediated by Intercellular Transportation of Monolignols During Tracheary Element Differentiation of Isolated *Zinnia* Mesophyll Cells. *Plant Cell Physiol* 42:959–968
- Kaneda M, Schuetz M, Lin B, Chanis C, Hamberger B, Western T, Ehlting, J, Samuels A (2011) ABC transporters coordinately expressed during lignification of *Arabidopsis* stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. *J Exp Bot* 62:2063–2077
- Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y (2007) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* 50:207–218

- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H, Demura T (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev* 19:1855–1860
- Kuromori T, Sugimoto E, Shinozaki K (2011) Arabidopsis mutants of AtABCG22, an ABC transporter gene, increase water transpiration and drought susceptibility. *Plant J* 67:885–894
- Lu X, Dittgen J, Piślewska-Bednarek M, Molina A, Schneider B, Svatoš A, Doubský J, Schneeberger K, Weigel D, Bednarek P, Schulze-Lefert P (2015) Mutant Allele-Specific Uncoupling of PENETRATION3 Functions Reveals Engagement of the ATP-Binding Cassette Transporter in Distinct Tryptophan Metabolic Pathways. *Plant Physiol* 168:814–27
- Miao Y-C, Liu C-J (2010) ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:22728–22733
- Nilsson R, Bernfur K, Gustavsson N, Bygdell J, Wingsle G, Larsson C (2010) Proteomics of plasma membranes from poplar trees reveals tissue distribution of transporters, receptors, and proteins in cell wall formation. *Mol Cell Proteomics* 9:368–387
- Oda Y, Mimura T, Hasezawa S (2005) Regulation of secondary cell wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in Arabidopsis cell suspensions. *Plant Physiol* 137:1027–1036
- Panikashvili D, Savaldi-Goldstein S, Mandel T, Yifhar T, Franke RB, Hofer R, Schreiber L, Chory J, Aharoni A (2007) The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol* 145:1345–1360

- Pesquet E, Zhang B, Gorzsás A, Puhakainen T, Serk H, Escamez S, Barbier O, Gerber L, Courtois-Moreau C, Alatalo E, Paulin L, Kangasjärvi J, Sundberg B, Goffner D, Tuominen H (2013) Non-Cell-Autonomous Postmortem Lignification of Tracheary Elements in *Zinnia elegans*. *Plant Cell* 25:1314–1328
- Schilmiller AL, Stout J, Weng JK, Humphreys J, Ruegger MO, Chapple C (2009) Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis*. *Plant J* 60:771–782
- Shigeto J, Itoh Y, Hirao S, Ohira K, Fujita K, Tsutsumi Y (2015) Simultaneously disrupting *AtPrx2*, *AtPrx25* and *AtPrx71* alters lignin content and structure in *Arabidopsis* stem. *J Integr Plant Biol* 57:349–356
- Shigeto J, Kiyonaga Y, Fujita K, Kondo R, Tsutsumi Y (2013) Putative cationic cell-wall-bound peroxidase homologues in *Arabidopsis*, *AtPrx2*, *AtPrx25*, and *AtPrx71*, are involved in lignification. *J Agric Food Chem* 61:3781–3788
- Shigeto J, Nagano M, Fujita K, Tsutsumi Y (2014) Catalytic profile of *Arabidopsis* peroxidases, *AtPrx-2*, *25* and *71*, contributing to stem lignification. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0105332
- Sibout R, Eudes A, Mouille G, Pollet B, Lapierre C, Jouanin L, Séguin A (2005) CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:2059–2076
- Sibout R, Eudes A, Pollet B, Goujon T, Mila I, Granier F, Séguin A, Lapierre C, Jouanin L (2003) Expression Pattern of Two Paralogs Encoding Cinnamyl Alcohol Dehydrogenases in *Arabidopsis*. Isolation and Characterization of the Corresponding Mutants. *Plant Physiol* 132:848–860

- Smith R, Schuetz M, Roach M, Mansfield SD, Ellis B, Samuels L (2013) Neighboring parenchyma cells contribute to Arabidopsis xylem lignification, while lignification of interfascicular fibers is cell autonomous. *Plant Cell* 25:3988–3999
- Strader LC, Bartel B (2009) The Arabidopsis PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8/ABCG36 ATP binding cassette transporter modulates sensitivity to the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Plant Cell* 21:1992–2007
- Sze H, Schumacher K, Müller ML, Padmanaban S, Taiz L (2002) A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase. *Trends Plant Sci* 7:157–161
- Tokunaga N, Sakakibara N, Umezawa T, Ito Y, Fukuda H, Sato Y (2005) Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary element differentiation of isolated Zinnia mesophyll cells. *Plant Cell Physiol* 46:224–232
- Tsuyama T, Kawai R, Shitan N, Matoh T, Sugiyama J, Yoshinaga A, Takabe K, Fujita M, Yazaki K (2013) Proton-Dependent Coniferin Transport, a Common Major Transport Event in Differentiating Xylem Tissue of Woody Plants. *Plant Physiol* 162:918–926
- Underwood W, Somerville SC (2013) Perception of conserved pathogen elicitors at the plasma membrane leads to relocalization of the Arabidopsis PEN3 transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12492–12497
- Zhao J, Liu JS, Meng FN, Zhang ZZ, Long H, Lin WH, Luo XM, Wang ZY, Zhu SW (2015) ANAC005 is a membrane-associated transcription factor and regulates vascular development in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol* 58: 442–451
- Zhao Q, Dixon RA (2011) Transcriptional networks for lignin biosynthesis: More complex than we thought? *Trends Plant Sci* 16:227–233

Zhong R, Ye ZH (2009) Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signal Behav* 4:1028–1034

第3章 モノリグノール輸送体候補遺伝子スクリーニングのためのシロイヌナズナ植物器官別発現解析

第1節 序

陸上に進出した植物は光を求めて巨大化するにあたって、細胞壁中に疎水性芳香環ヘテロポリマーであるリグニンを取り入れ、樹体の支持とすみずみまでの水分通道を可能にした。木化した細胞壁は維管束植物の特徴であり、進化に伴って獲得されたと考えられる。現存の植物のうち、遺伝子情報が豊富かつ遺伝子操作が容易にできるモデル植物を用いて、非維管束植物と維管束植物の遺伝子を比較して維管束植物にのみ保存される遺伝子をスクリーニング対象として選択することにした。

第2節 植物器官別遺伝子発現解析

2. 1 実験

2. 1. 1 シロイヌナズナの培養

野生型シロイヌナズナ (col-0) 種子数十粒を 1.5 ml マイクロチューブに取り分け、滅菌溶液 (0.5% 次亜塩素酸ナトリウム、0.05% Tween 20) 1 ml で滅菌処理を行った。滅菌水にて洗浄後、4°C で 2 日間静置し、種子の休眠打破を行った。種子を、MS 培地 (Sucrose 3%, Gelrite 0.3%, pH 5.7) に播種し、PLANT GROWTH CHAMBER (TOMY SEIKO CO.,LTD., Tokyo, Japan)内で、温度 22°C、明期 16 h、照度光強度約 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で培養を行った。3 週齢の実生を滅菌土 (バーミキュライト : パーライト = 1:1)に植え替え、1 週間かけて順化した後所定の期間培養した。

2. 1. 2 cDNA 調製

4 週齢および 6 週齢の植物体から 5 植物器官: 茎上部 (頂端から 2 cm 長)、茎下部 (基部から 2 cm 長)、ロゼット葉、茎生葉、根を回収した。各植物器官を液体窒素下で破碎し、第 2 章、第 3 節、3. 1. 1 と同様に cDNA を調製した。

2. 1. 3 プライマー設計

第 2 章、第 3 節、3. 1. 2 と同様にプライマーを設計した (Table 3-1, -2)。

2. 1. 4 リアルタイム PCR 分析

第 2 章、第 3 節、3. 1. 3 と同様にリアルタイム PCR 分析を実施した

2. 1. 5 遺伝子発現解析

第2章、第3節、3. 1. 4と同様に遺伝子発現解析を行った。

2. 2 結果と考察

シロイヌナズナは発達した維管束を持ち、細胞壁乾燥重量の約16%をリグニンが占める。シロイヌナズナのリグニンは、主にコニフェリルアルコール(グアイアシル型)およびシナピナルアルコール(シリンギル型)に加えて、少量の

-クマリルアルコール(*p*-ヒドロキシフェニル型)で形成される(Van Acker et al. 2013)。一方、ヒメツリガネゴケでは、明確な維管束が観察されない。またリグニン様化合物が検出されるが、それらは

-ヒドロキシフェニル型モノマーのみからなる(Espiñeira et al. 2011)。ヒメツリガネゴケのゲノム解析によって全ABC輸送体が見出され、それらと相同なシロイヌナズナのABC輸送体遺伝子もまた見出された(Rensing et al. 2008)。ヒメツリガネゴケのABC輸送体と相同でない、すなわち、維管束植物であるシロイヌナズナのみが保有する遺伝子の中に維管束形成に関与する遺伝子が含まれると考え、維管束形成要素の一つであるリグニン生合成に関連する遺伝子も含まれると予想した。そこで、ヒメツリガネゴケのABC輸送体遺伝子と相同でない、シロイヌナズナABC輸送体として、10個のフルタイプABC輸送体:*ABCG30*、*ABCG32*、*ABCG33*、*ABCG34*、*ABCG37*、*ABCG38*、*ABCG40*、*ABCG41*、*ABCG42*、*ABCG43*をスクリーニングの対象遺伝子として選択した。

また、第2章で示したように、シロイヌナズナ管状要素誘導系を用いていくつかの輸送体遺伝子の発現レベルを分析した。4つのABC輸送体遺伝子(*ABCG11*、*ABCG22*、*ABCG29*、*ABCG36*)が二次壁形成およびリグニン合成に関連する参照遺伝子と同期して発現することを示した。また、*ABCG27*は、

リファレンス遺伝子と同じクラスターに含まれていないが、木化の間に高度に発現した。したがって、*ABCG11*、*ABCG22*、*ABCG27*、*ABCG29* および *ABCG36* を、モノリグノール輸送体候補スクリーニングのための標的遺伝子のリストに加えた。列挙された候補遺伝子の中で、*ABCG29* のみがモノリグノール輸送体候補として報告されている (Alejandro et al. 2012)。以上の理由から、合計 15 遺伝子をスクリーニング対象として選択した (Table 3-3)。リファレンス遺伝子の紹介 (Table 3-4)

リグニンの蓄積程度は、植物器官および成長段階によって異なる。この研究では、4 および 6 週齢のシロイヌナズナ植物体の 5 つの植物器官を対象とした。シロイヌナズナの茎は、発芽後 3 週間では観察されないが、4 週間では 2-4cm に成長する。4 週齢の茎では特に茎の通道組織において活発に木化が進行していることが予想される。既報において、6 週齢のシロイヌナズナ茎の頂端と基部では木化レベルが異なる事が示され、木化に関わる酵素をコードする遺伝子の発現は異なると考えられる (Ehltling et al. 2005; Pandey et al. 2016)。根組織は、土壌からの水および栄養分の通道のため木化が進んでいる。葉細胞の多くを占める柔細胞では木化する細胞は茎と比べて比較的少ない。このように木化レベルが異なる 4 週齢または 6 週齢の植物の 5 つの植物器官：茎上部、茎下部、茎生葉、ロゼット葉および根について、輸送体遺伝子およびリファレンス遺伝子の発現レベルを測定し、発現パターンから候補遺伝子を絞り込む事にした。

輸送体遺伝子およびリファレンス遺伝子の発現データを統計的に解析し、ヒートマップを作成した (Fig. 3-1)。対象遺伝子は 6 つのクラスターに分類された (Fig. 3-1 I-VI)。遺伝子発現パターンは、大別してクラスター I、II、III を含む第一ブロックと、クラスター IV、V、および VI を含む第二ブロックの 2 つに分けられた。9 つの参照遺伝子のうち 8 つが第一ブロックに含まれ (Fig. 3-1 I-III)、

木化に関連する輸送体が第一ブロックに含まれることが示唆された。7つの輸送体遺伝子、*VND6* および *VND7* (木部細胞分化転写因子)、*MYB46* (二次壁形成転写因子)、*MYB58* (リグニン生合成転写因子)、*C4H* および *CCR1* (モノリグノール生合成遺伝子) および *XCPI* (プログラム細胞死関連遺伝子) は6週齢の茎上部および根において高発現した (Fig. 3-1 II, III-A)。これらの結果から、6週齢シロイヌナズナ植物体の茎上部および根において細胞壁が活発に木化していることが示唆された。

ABCG29 および *ABCG33* は *MYB46* および *MYB58* と同じクラスターに分類された (Fig. 3-1 II-A)。*ABCG29* は *p*-クマリルアルコール輸送体である可能性が報告されている (Alejandro et al. 2012)。第2章の遺伝子発現パターン解析においても、*ABCG29* はシロイヌナズナ培養細胞の管状要素誘導系において、木化が活発に行われている時期に *MYB58* などのリファレンス遺伝子と協調的に発現していた。このことから *ABCG29* がモノリグノール輸送に関与する可能性が支持された。*ABCG33* の発現パターンは *ABCG29* の発現パターンと非常によく似ており、*ABCG33* もリグニン合成関連輸送体である可能性が期待された。

ABCG30、*ABCG34* および *ABCG37* は、4週齢および6週齢の植物の根においてリグニン生合成関連ペルオキシダーゼである *AtPrx25* と協調的な発現が認められたことから、リグニン生合成関連遺伝子である可能性が示された (Fig. 3-1 I-D)。*abcg30* 変異体の根では、フェノール化合物含有量の増加、糖類の減少および周囲の土壌の真菌や細菌のコミュニティプロファイルの変化が観察された。このことから *ABCG30* は根からの植物化学物質の滲出に関係していることが示唆された (Badri et al. 2009)。*ABCG34* は、葉および表皮細胞の原形質膜に極性をもって局在し、シロイヌナズナの葉において主要なフィトアレキシンであるカマレキシンの輸送に関与することが示唆された (Khare et al. 2017)。

abcg37 変異体では野生型植物体と比較して根滲出物の組成が変化し、*ABCG37*

がフェニルプロパノイド化合物の一つであるクマリンの滲出に影響することが示唆された (Ziegler et al. 2017)。以上のように、*ABCG34* は葉において、*ABCG30* および *ABCG37* は根において特定の化合物の滲出に関与していることが報告されているが、ABC 輸送体は、構造的および機能的に無関係な基質を輸送することができることも知られている (Hwang et al. 2016)。今回の発現解析において、*ABCG30*、*ABCG34* および *ABCG37* は、リグニン合成に関与する遺伝子と同調的に高発現していたことから、リグニン前駆体も基質として輸送できる可能性がある。

異なる植物器官における発現プロファイルを、公共データベースにおいても調査した。Arabidopsis eFP browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) を用いた各遺伝子の組織別発現調査において、*ABCG34* および *ABCG37* は共に、ロゼットステージの根における強い発現を示した。また、ATTED-II (<http://atted.jp>) を用いてマイクロアレイ法および RNA-Seq 法由来の両発現データで共発現解析を行った。どちらのデータを用いた場合でも *ABCG34* および *ABCG37* は互いに共発現を示した。しかし *ABCG30* は RNA-Seq 法由来の発現データでは *ABCG34* および *ABCG37* と共発現を示したが、マイクロアレイ法の発現データでは共発現を示さなかった。さらに ATTED-II を用いた共発現解析によって、*ABCG29* はマイクロアレイ法の発現データでは、フェニルプロパノイド生合成遺伝子と共発現していたが、RNA-Seq 法によるデータでは共発現を示さなかった。これらの結果より、分析手法によって解析結果が異なるため、これらの発現解析結果を参照し、本実験の結果と合わせて考察することは難しいと結論づけた。本研究では、遺伝子特異的なプライマーを用いて発現量を定量することができるリアルタイム PCR を用いた発現解析結果を行っていることから、本実験の結果を次章の機能解析に採用することにした。

最終的に、活発に木化する植物器官においていくつかのリファレンス遺伝子と同調的に発現していた、5つの遺伝子 (*ABCG29*、*ABCG30*、*ABCG33*、*ABCG34*、および *ABCG37*) をモノリグノール輸送体遺伝子候補として選択した。

第3節 小括

本章では、シロイヌナズナ植物体の異なる植物器官を用いて、リアルタイムPCRにより輸送体遺伝子および二次壁生合成関連遺伝子の発現パターン測定からモノリグノール輸送体候補遺伝子の選択を試みた。対象輸送体遺伝子として、維管束植物であるシロイヌナズナと非維管束植物であるヒメツリガネゴケのABC輸送体を比較して、シロイヌナズナのみが保存する10個のABC輸送体を選択した。また、管状要素誘導の結果、二次壁生合成遺伝子と共発現していた5個のABC輸送体も対象に含めた。

木化レベルが異なる4週齢および6週齢の5植物器官 [茎上部 (頂端から2 cm 長)、茎下部 (基部から2 cm 長)、ロゼット葉、茎生葉、根] の発現解析を行った結果、大部分のリファレンス遺伝子が互いに隣接したクラスターに分類された。*ABCG29* および *ABCG33* は6週齢の茎上部で強く発現し *MYB46* および *MYB58* と協調的な発現を示した。また、*ABCG29* は *p*-クマリルアルコール輸送体である可能性が報告されており、本実験の結果も *ABCG29* がモノリグノール輸送に関与する可能性を支持した。*ABCG33* の発現パターンは *ABCG29* の発現パターンと非常によく似ていたことから、*ABCG33* もリグニン合成関連輸送体である可能性が期待された。*ABCG30*、*ABCG34* および *ABCG37* はすでに他の基質の輸送体として報告されているが、本実験の植物器官別発現解析において *ABCG30*、*ABCG34* および *ABCG37* が4週齢および6週齢の植物の根においてリグニン生合成関連ペルオキシダーゼである *AtPrx25* と協調的な発現が認められたことに加えて、ABC輸送体は複数の機能的に無関係な基質を輸送することが知られていることから、候補輸送体遺伝子に含めた。

最終的に、活発に木化する植物器官においていくつかのリファレンス遺伝子と同調的に発現していた、5つの遺伝子 (*ABCG29*、*ABCG30*、*ABCG33*、*ABCG34*、*ABCG37*) をモノリグノール輸送体候補遺伝子として選択した。

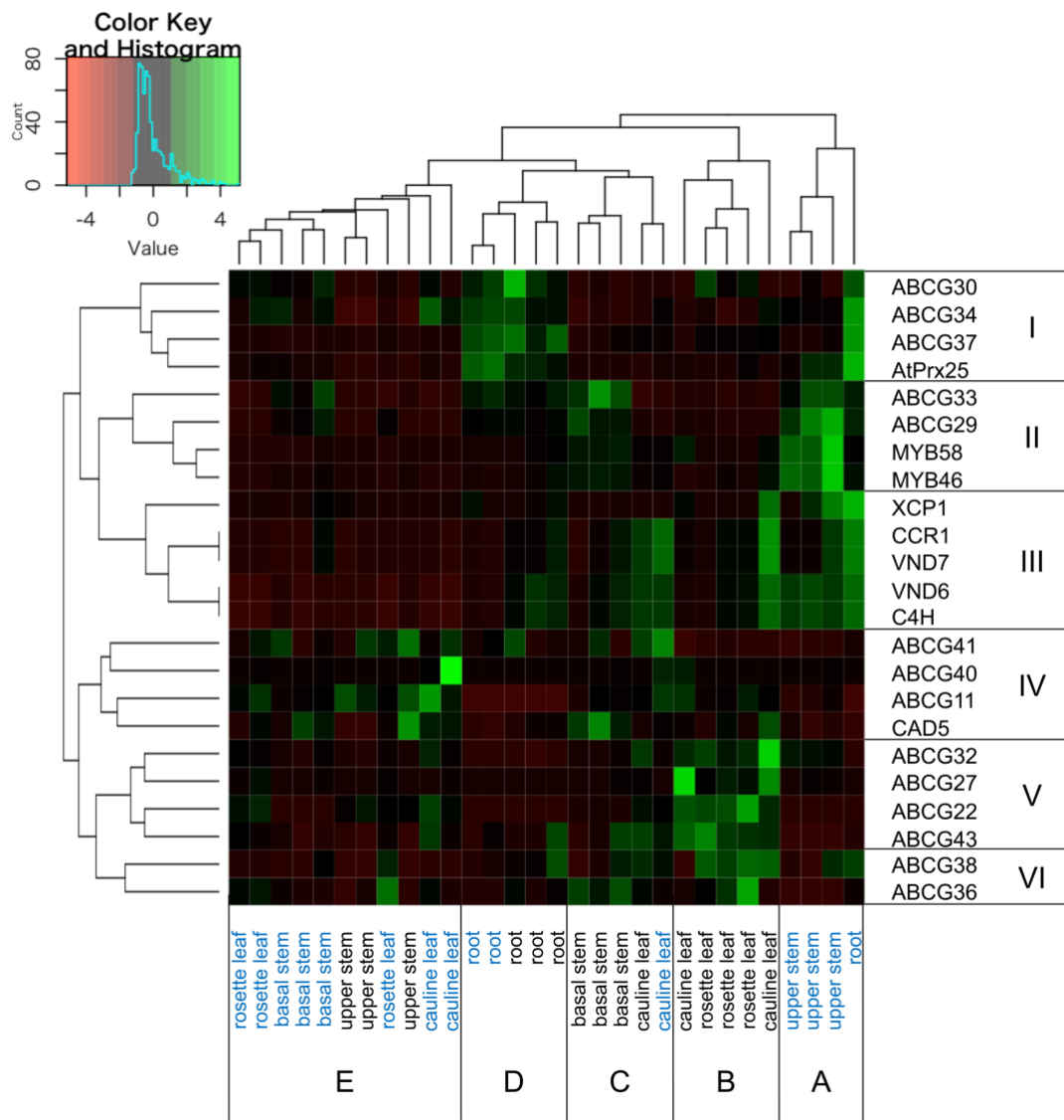


Fig. 3-1 Clustering of gene expression data for each analyzed plant organ.

Gene expression levels in different organs were analyzed by real-time PCR. Genes and plant organs were ordered using a clustering program (see Materials and Methods) that grouped those with similar expression patterns (I–VI and A–E, respectively). Each gene is represented by a single row, and each plant organ is represented by a single column. Sample labels presented in black and blue text represent 4- and 6-week-old plants, respectively. Green and red correspond to high and low expression levels, respectively.

Table 3-1 Primers specific for the ABCG transporter genes analyzed by real-time PCR

Target gene	AGI	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>ABCG11</i>	AT1G17840	GCTCTACAAGGTCAGTACCAG	GCAAGTCGATCTGAAAGACG
<i>ABCG22</i>	AT5G06530	AAATAAGGAGAGAGCAGCGGATATG	GACGACAAGAAGGAAGAGAGAAGG
<i>ABCG27</i>	AT3G52310	GTGGCTATTTTCGTGAAGAAAGTTCC	CTTCCTTAAGCCCACTCTCTATTTCC
<i>ABCG29</i>	AT3G16340	CTTATGCCCTAGCACAGGTG	CCATGATGTGTTTCGAATGG
<i>ABCG30</i>	AT4G15230	ACCAACTTTTAAAAGGGTTACTACTG	CAACTCTATAACCAACTTTGTCAATTC
<i>ABCG32</i>	AT2G26910	ACAACGTCTTCCAACCTTATTCAC	ATTTCAAATCCACAGCGTC
<i>ABCG33</i>	AT2G37280	CTTTTAAACGGCTGAGATCG	CCAACCCTCTCCATTCTTC
<i>ABCG34</i>	AT2G36380	GAGATTACCGACTTACGATCG	CACTCTGTCAGTTCTTTCTCTCA
<i>ABCG36</i>	AT1G59870	TGTGACTGGTGCATTTAGGC	TTTTCTTCCGGCCAAAACG
<i>ABCG37</i>	AT3G53480	CACAGTATTTGGAGCGATCTACG	CAATGCATAAGCAGTCGCTGA
<i>ABCG38</i>	AT3G30842	GTCCAATAGGCCACCATTCTC	TACTTGCGCAAATGTGACACC
<i>ABCG40</i>	AT4G15230	CTTTTGATCGTCTCAGGAAAG	ATCGATTCCAACCTCTATCGATAC
<i>ABCG41</i>	AT4G15215	TCAGGTCCTAGTTGAGGTTC	CAGACATATGGTAGCCGATC
<i>ABCG42</i>	AT4G15233	ATTCCGAGGTGGTGGATTTG	TCCATACTGCGATGTGAGCA
<i>ABCG43</i>	AT4G15236	TATGACTCTCTGGCTCTTGTAGCTG	CCAATGAAGAAGGCAAAAAGAGATG
<i>UBQ5</i>	AT3G62250	GACGCTTCATCTCGTCC	CCACAGGTTGCGTTAG

Table 3-2 Primers specific for reference genes related to lignin synthesis and secondary wall formation analyzed by real-time PCR

Target gene	AGI	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>VND6</i>	At5g62380	CGCTTGACAAGTTTGTGCTTCTCAGC	GGAAGAAGCATTTCATCGAAACCATTG
<i>VND7</i>	At1g71930	ATGCATCAATATGGCAACATTGAG	TAGTGTTCTCCAATCCACACAGTT
<i>MYB46</i>	At5g12870	GAATGTGAAGAAGGTGATTGGTACA	CGAAGGAACCTCAGTGTTTCATCA
<i>MYB58</i>	At1g16490	CCAGAGAACAGAGCTCTTCAAGAG	ATGTATGAGGAGCTCGTAACTCTC
<i>C4H</i>	At2g30490	CCGGGATTATATTGGCATTG	CTGAATTGTCCACCTTTCTC
<i>CAD5</i>	At4g34230	GAGAGATCTGGAACAGTATTGTCC	CTCTTAGGCCTGGTTGTTTC
<i>CCR1</i>	At1g15950	CGACGATCCGGAACAAATG	CAATGGAGGAGGTGATGAC
<i>AtPrx25</i>	At2g41480	ATATTGCACTTGCTGCTCGTGACTC	GATGCTTCAGTTGCCAACGAGATTCT
<i>XCP1</i>	At4g35350	TTGACCCATGAAGAGTTCAAAGGAAGA	GAAAGCGAACTCAGATTCCCTGTTG
<i>UBQ5</i>	At3g62250	GACGCTTCATCTCGTCC	CCACAGGTTGCGTTAG

Table 3-3 ABCG transporter genes selected for expression analyses

Gene name	Annotation
<i>ABCG11</i>	cuticular wax export (Bird et al. 2007; Panikashvili et al. 2007)
<i>ABCG22</i>	stomatal regulation (Kuromori et al. 2011)
<i>ABCG27</i>	unknown
<i>ABCG29</i>	<i>p</i> -coumaryl alcohol transport (Alejandro et al. 2012)
<i>ABCG30</i>	root exudation of phytochemicals (Badri et al. 2009)
<i>ABCG32</i>	cuticular formation (Bessire et al. 2011)
<i>ABCG33</i>	unknown
<i>ABCG34</i>	camalexin transport (Khare et al. 2017)
<i>ABCG36</i>	IBA transport (Strader and Bartel 2009), pathogen resistance (Campe et al. 2016), heavy metal transport (Kim et al. 2007)
<i>ABCG37</i>	coumarin exudation (Ziegler et al. 2017)
<i>ABCG38</i>	unknown
<i>ABCG40</i>	ABA uptake (Kang et al. 2010)
<i>ABCG41</i>	unknown
<i>ABCG42</i>	unknown
<i>ABCG43</i>	unknown

Table 3-4 Reference genes related to lignin synthesis and secondary wall formation included in the expression analyses

Gene name	Annotation
<i>VND6</i>	transcriptional switch for metaxylem differentiation (Kubo et al. 2005)
<i>VND7</i>	transcriptional switch for protoxylem differentiation (Kubo et al. 2005)
<i>MYB46</i>	transcription factor for cell wall formation (Zhong et al. 2007)
<i>MYB58</i>	transcription factor for lignin synthesis (Zhou et al. 2009)
<i>C4H</i>	monolignol biosynthetic enzyme (Schilmiller et al. 2009)
<i>CAD5</i>	monolignol biosynthetic enzyme (Sibout et al. 2005)
<i>CCR1</i>	monolignol biosynthetic enzyme (Ruel et al. 2009)
<i>AtPrx25</i>	lignin dehydrogenative polymerization enzyme (Shigeto et al. 2015)
<i>XCP1</i>	programmed cell death related gene (Funk et al. 2002)

参考文献

- Alejandro S, Lee Y, Tohge T, Sudre D, Osorio S, Park J, Bovet L, Lee Y, Geldner N, Fernie AR, Martinoia E (2012) AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr Biol* 22:1207–1212
- Badri DV, Quintana N, El Kassis EG, Kim HK, Choi YH, Sugiyama A, Verpoorte R, Martinoia E, Manter DK, Vivanco JM (2009) An ABC Transporter Mutation Alters Root Exudation of Phytochemicals That Provoke an Overhaul of Natural Soil Microbiota. *Plant Physiol* 151:2006–2017
- Bessire M, Borel S, Fabre G, Carraça L, Efremova N, Yephremov A, Cao Y, Jetter R, Jacquat AC, Métraux JP, Nawrath C (2011) A Member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE Family of ATP Binding Cassette Transporters Is Required for the Formation of a Functional Cuticle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:1958–1970
- Bird D, Beisson F, Brigham A, Shin J, Greer S, Jetter R, Kunst L, Wu X, Yephremov A, Samuels L (2007) Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J* 52:485–498
- Campe R, Langenbach C, Leissing F, Popescu GV, Popescu SC, Goellner K, Beckers GJM, Conrath U (2016) ABC transporter PEN3/PDR8/ABCG36 interacts with calmodulin that, like PEN3, is required for *Arabidopsis* nonhost resistance. *New Phytol* 209:294–306
- Ehltling J, Mattheus N, Aeschliman DS, Li E, Hamberger B, Cullis IF, Zhuang J, Kaneda M, Mansfield SD, Samuels L, Ritland K, Ellis BE, Bohlmann J, Douglas CJ (2005) Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *Plant J* 42:618–640

- Espiñeira JM, Novo Uzal E, Gómez Ros LV, Carrión JS, Merino F, Ros Barceló A, Pomar F (2011) Distribution of lignin monomers and the evolution of lignification among lower plants. *Plant Biol* 13:59–68
- Funk V, Kositsup B, Zhao C, Beers EP (2002) The *Arabidopsis* xylem peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog. *Plant Physiol* 128:84–94
- Hwang JU, Song WY, Hong D, Ko D, Yamaoka Y, Jang S, Yim S, Lee E, Khare D, Kim K, Palmgren M, Yoon HS, Martinoia E, Lee Y (2016) Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant’s Lifestyle. *Mol Plant* 9:338–355
- Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci* 107:2355–2360
- Khare D, Choi H, Huh SU, Bassin B, Kim J, Martinoia E, Sohn KH, Paek KH, Lee Y (2017) *Arabidopsis* ABCG34 contributes to defense against necrotrophic pathogens by mediating the secretion of camalexin. *Proc Natl Acad Sci* 114:E5712–E5720
- Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y (2007) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* 50:207–218
- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H, Demura T (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev* 19:1855–1860

- Kuromori T, Sugimoto E, Shinozaki K (2011) Arabidopsis mutants of AtABCG22, an ABC transporter gene, increase water transpiration and drought susceptibility. *Plant J* 67:885–894
- Pandey JL, Kiemle SN, Richard TL, Zhu Y, Cosgrove DJ, Anderson CT (2016) Investigating Biochemical and Developmental Dependencies of Lignification with a Click-Compatible Monolignol Analog in Arabidopsis thaliana Stems. *Front Plant Sci* 7:1–15
- Panikashvili D, Savaldi-Goldstein S, Mandel T, Yifhar T, Franke RB, Hofer R, Schreiber L, Chory J, Aharoni A (2007) The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol* 145:1345–1360
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin-I T, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Boore (2008) The Physcomitrella Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science* (80-) 319:64–69

- Ruel K, Berrio-Sierra J, Mir-Derikvand M, Pollet B, Thévenin J, Lapierre C, Jouanin L, Joseleau JP (2009) Impact of CCR1 silencing on the assembly of lignified secondary walls in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 184:99–113
- Schilmiller AL, Stout J, Weng JK, Humphreys J, Ruegger MO, Chapple C (2009) Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis*. *Plant J* 60:771–782
- Shigeto J, Itoh Y, Hirao S, Ohira K, Fujita K, Tsutsumi Y (2015) Simultaneously disrupting *AtPrx2*, *AtPrx25* and *AtPrx71* alters lignin content and structure in *Arabidopsis* stem. *J Integr Plant Biol* 57:349–356
- Sibout R, Eudes A, Mouille G, Pollet B, Lapierre C, Jouanin L, Séguin A (2005) CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:2059–2076
- Strader LC, Bartel B (2009) The *Arabidopsis* PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8/ABCG36 ATP binding cassette transporter modulates sensitivity to the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Plant Cell* 21:1992–2007
- Van Acker R, Vanholme R, Storme V, Mortimer JC, Dupree P, Boerjan W (2013) Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Biofuels* 6:46. doi: 10.1186/1754-6834-6-46
- Zhong R, Richardson EA, Ye Z (2007) The MYB46 Transcription Factor Is a Direct Target of SND1 and Regulates Secondary Wall Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:2776–2792

Zhou J, Lee C, Zhong R, Ye ZH (2009) MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:248–266

Ziegler J, Schmidt S, Strehmel N, Scheel D, Abel S (2017) Arabidopsis Transporter ABCG37/PDR9 contributes primarily highly oxygenated Coumarins to Root Exudation. *Sci Rep* 7:3704. doi: 10.1038/s41598-017-03250-6

第4章 候補輸送体遺伝子の T-DNA 挿入変異体を用いた機能解析

第1節 序

第3章で5つの輸送体遺伝子が候補として選択された。これらの輸送体遺伝子が、実際に植物体中でリグニン生合成に関与しているかどうか明らかにするため、逆遺伝学的な手法で遺伝子機能解析を行うことにした。

シロイヌナズナでは全ゲノム完全解読がなされており、特定の遺伝子が T-DNA 挿入によって欠損した変異体ラインが数多く作成されている (The Arabidopsis Genome Initiative 2000; Alonso et al. 2003)。T-DNA 挿入変異体はこれまでに多くの研究で用いられてきた。Wang らは T-DNA 挿入によって対象遺伝子がどの程度効果的にノックアウトできるのか、既報の文献より、転写レベルおよびタンパクレベルで調査した (Wang 2008)。その結果、エキソン挿入またはイントロン挿入によるノックアウト体では、転写レベルでそれぞれ 98.9%、99.3%に影響が見られた。また、タンパクレベルでは、エキソン挿入体またはイントロン挿入体のそれぞれ 96%、95%でタンパク発現量に影響があった。これらの結果より、タンパクコード領域中のエキソンおよびイントロンのどちらかに T-DNA が挿入されても、同様にノックアウトまたはノックダウンに効果的であるといえる。本研究ではこの結果を参考に、候補輸送体遺伝子のエキソンまたはイントロンのホモ接合体変異体ラインを用いて表現型分析を行うことにした。

第2節 T-DNA 挿入変異体ホモ接合体の取得

2. 1 実験

2. 1. 1 T-DNA 挿入変異体購入

Arabidopsis Biological Resource Center (<https://abrc.osu.edu/order-stocks>、以降 ABRC) より *ABCG29*、*ABCG30*、*ABCG33*、*ABCG34*、*ABCG37* のノックアウト変異体 (Table 4-1) を購入した。

2. 1. 2 ホモ接合型 T-DNA 挿入変異体選抜

2. 1. 2. 1 種子の滅菌と培養

購入した各変異体種子数十粒を 1.5 ml マイクロチューブに取り分け、滅菌溶液 (0.5% 次亜塩素酸ナトリウム、0.05% Tween 20) 1 ml で滅菌処理を行った。滅菌水にて洗浄後、4°C で 2 日間静置し、種子の休眠打破を行った。

2. 1. 2. 2 ゲノム DNA 抽出

3 週齢まで培養した各変異体のロゼッタ葉を 1~2 枚 2.0 ml スクリューキャップチューブに採取し、液体窒素で凍結させ、シェイクマン 3 (バイオメディカルサイエンス) 用いて粉碎した。400 μ l 抽出バッファー [200 mM Tris-HCl (pH7.5)、250 mM NaCl、25 mM EDTA (pH8.0)、0.5% SDS、1% β -メルカプトエタノール] を加え、ボルテックスした。400 μ l PCI [TE 飽和フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1)] を加え、5 分間ボルテックスした。17900 \times g で 5 分間遠心分離を行い、上清を新しい 1.5 ml チューブに移した。2 等量の 100% エタノールを加え混合し、室温で 1 分間静置した。17900 \times g で 5 分間遠心分離を行い、デカンテーションして上清を除去した。70% エタノールを 500 μ l 加え、17900 \times g で 5 分間遠心分離を行い、エタノールを完全に除去

した。50 μ l の 1/2TE (RNase 0.1 mg/ml)でペレットを溶解した。ナノドロップを用いて各サンプルの 260 nm および 280 nm における吸光度を測定し、調製した DNA の純度を確認した。

2. 1. 2. 3 プライマー設計

TAIR から取得した ABCG29, ABCG30, ABCG33, ABCG34, ABCG37 のゲノム DNA 配列を基に Left primer (LP)と Right primer (RP)を設計した。T-DNA 配列に相補的なプライマーとなる LBb1.3 は T-DNA Primer Design

(<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) において推奨されている配列

(ATTTTGCCGATTTTCGGAAC)を選択した。これらのオリゴヌクレオチドを受託合成した (株式会社ジーンネット、<http://www.genenet.co.jp/>, Table 4-1)。

2. 1. 2. 4 ゲノム PCR

2. 1. 2. 2 で調製した DNA を鋳型とした。2. 1. 2. 3 で設計した各 ABC 輸送体遺伝子特異的プライマーおよび T-DNA 特異的プライマー [(LP, RP)/野生型バンド]または (RP, LBb1.3)/(T-DNA バンド)]を用いて、各プライマー 0.5 μ M、TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase [(10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μ l、dNTP Mixture 2 μ l、TaKaRa Ex Taq 0.625 Unit), TaKaRa Bio、Otsu、Japan]で PCR を行った。PCR 反応は 98°C で 10 s 熱変性後、98°C: 10 s、58°C: 30 s、72°C: 120 s の 3 ステップを 35 サイクル行った。PCR 反応後、PCR 産物 5 μ l に 6 \times Loading buffer 1 μ l を加え、1% アガロースゲルを用い、定電圧 100 V で 40 分間電気泳動後、適当な濃度のエチジウムブロマイド中で染色し、増幅されたバンドの有無を確認した。

2. 1. 2. 5 ホモ系統種子の回収

選抜した各ノックアウト変異体ホモ接合体となっている個体を、土壌（バーミキュライト:パーライト=1:1）に植え替えて、PLANT GROWTH CHAMBER (TOMY SEIKO CO.,LTD.)内で、温度 22°C、明期 16 h、照度光強度約 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で 1 週間かけて順化を行い、引き続き培養を行った。約 8 週齢まで培養し、形成された種子を 1.5 ml チューブに回収した。回収した種子は、風乾させた後、4°C で保存した。

2. 1. 3 ホモ接合型 T-DNA 挿入変異体の観察

5 遺伝子の各一遺伝子ノックアウトおよび野生型植物体を 6 週齢まで培養し、主茎長およびその重量を測定した。

2. 2 結果と考察

ABRC より購入した 5 候補輸送体遺伝子の T-DNA 挿入変異体から抽出したゲノム DNA を用いて 2 種類の PCR (LP/RP: 野生型バンド増幅、RP/BP: T-DNA バンド増幅)を実施した。すべての変異体で、野生型バンドが増幅されず、T-DNA バンドが増幅される一遺伝子ノックアウト変異体のホモ接合体ラインを獲得した。これら変異体の 3 週齢および 6 週齢時の外観を観察したが、野生型と変異体で差は見られなかった (Fig4-1, 2)。また主茎長およびその重量についても、野生型と一遺伝子ノックアウト変異体間で変化は見られなかった (Fig. 4-3)。

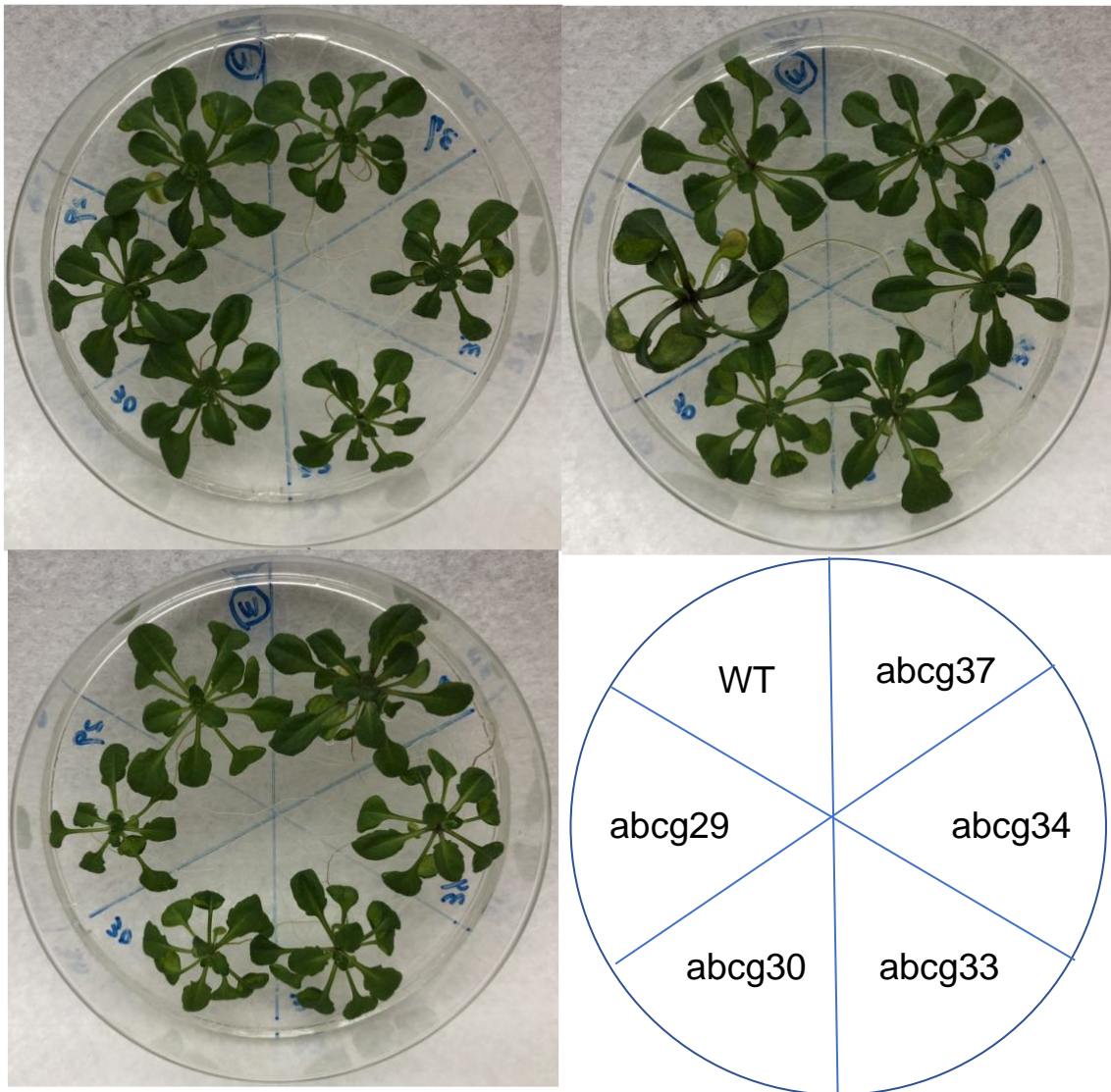


Fig. 4-1 Development of 3-week-old candidate gene mutants and wild-type *A. thaliana* plants



Fig. 4-2 Development of 6-week-old candidate gene mutants and wild-type *A. thaliana* plants

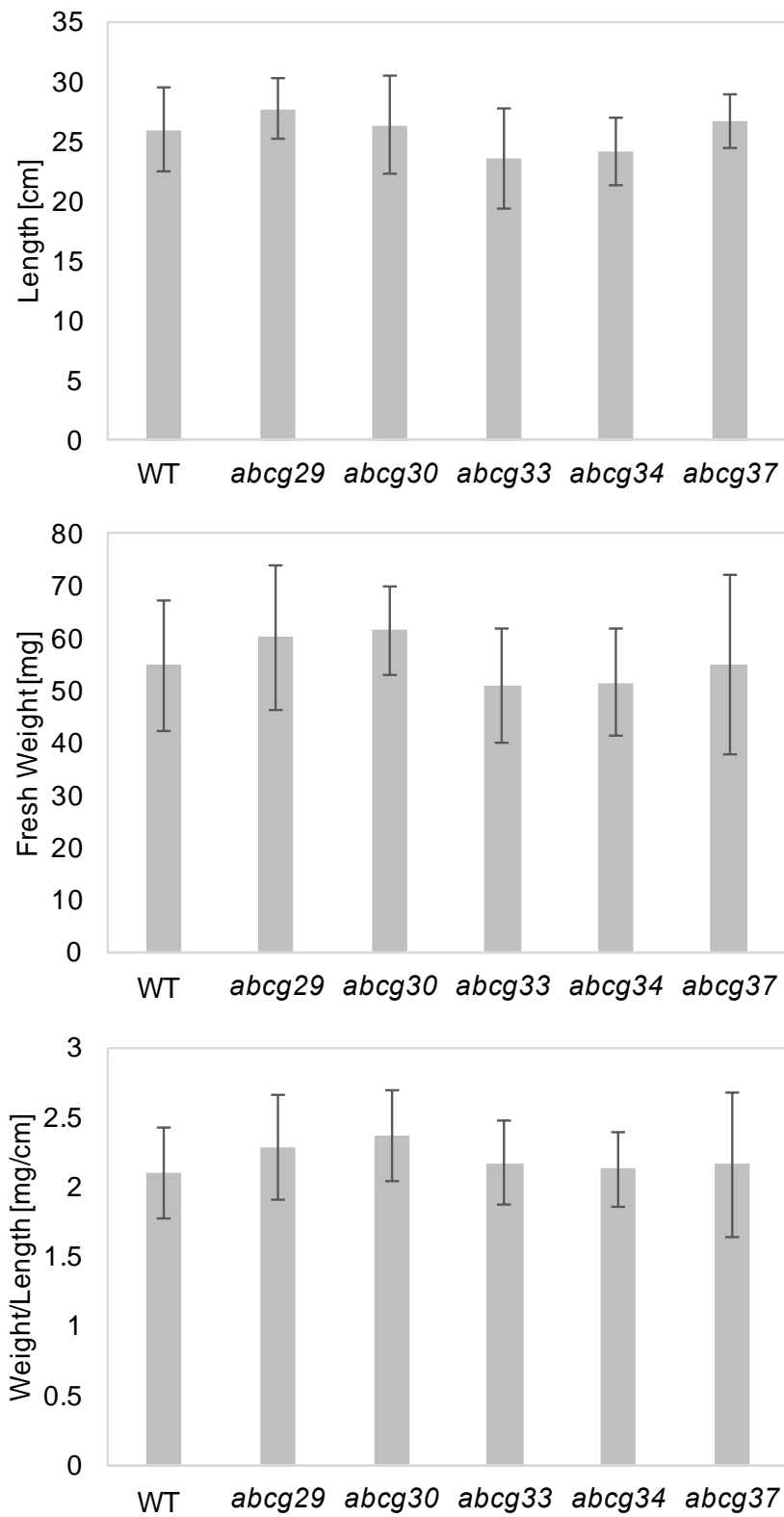


Fig. 4-3 Stem growth of 6-week-old candidate gene mutants and wild-type *A. thaliana* plants

Table 4-1 Primers specific for candidate genes used for isolating homozygous mutants

Target	Mutant line name	LP primer sequence (5'-3')	RP primer sequence (5'-3')	amplified size	Insertion
ABCG29	SALK_081047	CGAAAAGTTCGAACGTTTCAG	ACATACAATGGGCATGGATTG	998	exon
ABCG30	CS331333	AGAAGCTGTTTGGGGATCA	CCCAAAGATCCCCTGCTATC	1114	intron
ABCG33	SALK_035106	TGCATGCTCTGAATAGTTCCC	AAAGGATGGTGAATCATTCC	1040	intron
ABCG34	SALK_036087C	ATCGGATACGACTGGACTGTG	CACACGAAGCTCATTAGGGAC	1043	exon
ABCG37	SALK_078574	CAGCTTTGTGCAAAGGTTCTC	GGAAGGAAAACAAGCGGATAC	1139	exon

The gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* ABC transporter by real-time PCR for screening candidates of monolignol transporters, LP: Left primer, RP: Right primer

第3節 T-DNA 挿入変異体における候補遺伝子発現解析

T-DNA 挿入変異体の転写産物量を明らかにするため半定量的 RT-PCR を行った。T-DNA が挿入されても、CDS 配列の 5'側から部分的に転写産物の合成が行われる可能性がある。そこで T-DNA 挿入が行われている場合、転写される可能性が低い CDS 配列の 3'末端から 1 kb 程度増幅させるプライマーを設計して半定量的に転写産物量を測定することにした。

3. 1 実験

3. 1. 1 プライマー設計

候補遺伝子 *ABCG29*、*ABCG30*、*ABCG33*、*ABCG34*、*ABCG37* の CDS 配列をシロイヌナズナデータベース TAIR より取得した。配列の末端 (終止コドン) から 1-2 kb を増幅するプライマーを設計した。これらのオリゴヌクレオチドを受託合成した (Integrated DNA Technologies, Inc., <http://sg.idtdna.com/pages>, Table 4-2)。

3. 1. 2 cDNA 調製

4 週齢の変異体 (*abcg29*、*abcg30*、*abcg33*、*abcg34*、*abcg37*) と野生型植物体 (WT) の根から FavorPrep™ Plant Total RNA Mini Kit (Favorgen Biotech Corp.) を用いて RNA を抽出した。直ちに PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Bio) で cDNA 合成を行った。

3. 1. 3 候補遺伝子の増幅 PCR と発現量解析

2 倍に希釈した cDNA 溶液を鋳型として、Ex taq (TaKaRa Bio) を用いてアニーリング温度 60°C (*UBQ5*、*ABCG34*、*ABCG37*)、55°C (*ABCG29*、*ABCG30*、*ABCG33*) で 25 サイクル増幅させ、アガロースゲル (3%: *UBQ5*、1%: *ABCG29*、

ABCG30、*ABCG33*、*ABCG34*、*ABCG37*)で泳動した。リアルタイム PCR を用いて、各 cDNA サンプル中の *UBQ5* 相対量を算出し、*UBQ5* に対する相対濃度を決定した。*UBQ5* 濃度に従って PCR 産物の泳動量を調整した。*UBQ5* の PCR 産物ロード量と等量の候補遺伝子 PCR 産物を 1% アガロースゲルにロードした。適当な時間エチジウムブロマイドで染色した後、ImageJ でバンドの濃さから相対的な濃度を算出し、サンプル量を決定した。

3. 2 結果と考察

いずれの T-DNA 挿入変異体においても、T-DNA 挿入対象遺伝子の転写産物は検出されなかった (Table 4-3)。よって、各変異体においてターゲット遺伝子は正しく転写されておらず、ノックアウトされていることが示された。さらに一遺伝子の発現欠損が、他の遺伝子発現に与える影響を明らかにするため、根における候補遺伝子の発現レベルを半定量的に測定した。発現レベルは野生型植物体での発現レベルを 1 として表記した。*ABCG30* の発現は、他の遺伝子と比較して野生型植物体においても著しく低かったため、定性的に表記した (Table 4-3)。*ABCG34* の発現レベルは、*abcg30* 変異体では野生型の 2 倍となった。また、*abcg34* 変異体における *ABCG30* の発現レベルは、野生型より著しく高くなった。これらの結果より、*ABCG30* と *ABCG34* の発現は互いに影響を与えていることが示唆された。*ABCG37* の発現レベルは *abcg30* および *abcg34* において野生型と比較して有意に上昇したが、*abcg37* 変異体において *ABCG30* と *ABCG34* の発現は変化しなかった。*ABCG33* は *abcg29* および *abcg33* 変異体において野生型と比較して著しく高い発現レベルを示したが、*ABCG29* と *ABCG30* の発現レベルは *abcg33* 変異体において変化しなかった。これらの発現変化の関係を模式的に示した (Fig 4-4)。*ABCG30* と *ABCG34* の発現は互いに影

響を与え、*ABCG37* の発現は *ABCG30* および *ABCG34* の発現に影響を受ける事から、*ABCG30*、*ABCG34*、*ABCG37* の 3 遺伝子の機能が関連している可能性が示唆された。*ABCG29* および *ABCG33* については、一方向の影響のみが確認されたが、第 2 章の発現解析において両遺伝子は非常に類似した発現パターンを示したことから

Table 4-2 Primers specific for candidate genes analyzed by semi-quantitative reverse transcription PCR

Target gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>ABCG29</i>	GGTTACATCGAAGGAGACATCAG	CTATCGTTGTTGGAAGTTGAGC
<i>ABCG30</i>	TCTCCTAATATAACTGTGGAAGAGTC	CTATTTCTTTTGGAAACTGAGTTTG
<i>ABCG33</i>	CAGCTTCTCTCAGAGATCACC	TCATCGTTTTTGGAAAGTTGAGT
<i>ABCG34</i>	GTGGAACAGGAGGTTCTGTAG	TCACCTTCTTTGGAAGTTGAG
<i>ABCG37</i>	CATCGAAGGAGACATTAGAATC	TCATCTTCGTTGGAAGTTGA
<i>UBQ5</i>	ATGCAGATCTTCGTGAAAACCCTAAC	TCAAGCTTCAACTCCTTCTTTCTGG

Table 4-3 Relative expression of candidate transporter genes in single-knockout mutants

	<i>ABCG29</i>	<i>ABCG30</i>	<i>ABCG33</i>	<i>ABCG34</i>	<i>ABCG37</i>
WT	1.0±0.1	VW	1.0±0.3	1.0±0.1	1.0±0.2
<i>abcg29</i>	ND	ND	1.7±0.1 *	1.5±0.1	1.3±0.1
<i>abcg30</i>	1.6±0.0	ND	2.0±0.2 *	2.2±0.1 *	1.8±0.3 *
<i>abcg33</i>	1.3±0.4	ND	ND	1.8±0.7	1.4±0.3
<i>abcg34</i>	1.8±0.5	S	1.5±0.3	ND	1.6±0.2 *
<i>abcg37</i>	0.9±0.3	ND	1.1±0.4	0.7±0.6	ND

VW: very weak; ND: not detected; S: strong

Gene expression levels in the roots are presented relative to the wild-type expression levels, which were set at 1. Analyses were conducted with three and five biological replicates for WT, *abcg29*, *abcg30*, *abcg33*, and *abcg34* and for *abcg37*, respectively.

Asterisks indicate statistical significance vs the wild-type control in each case (P < 0.05, Student's *t* test)

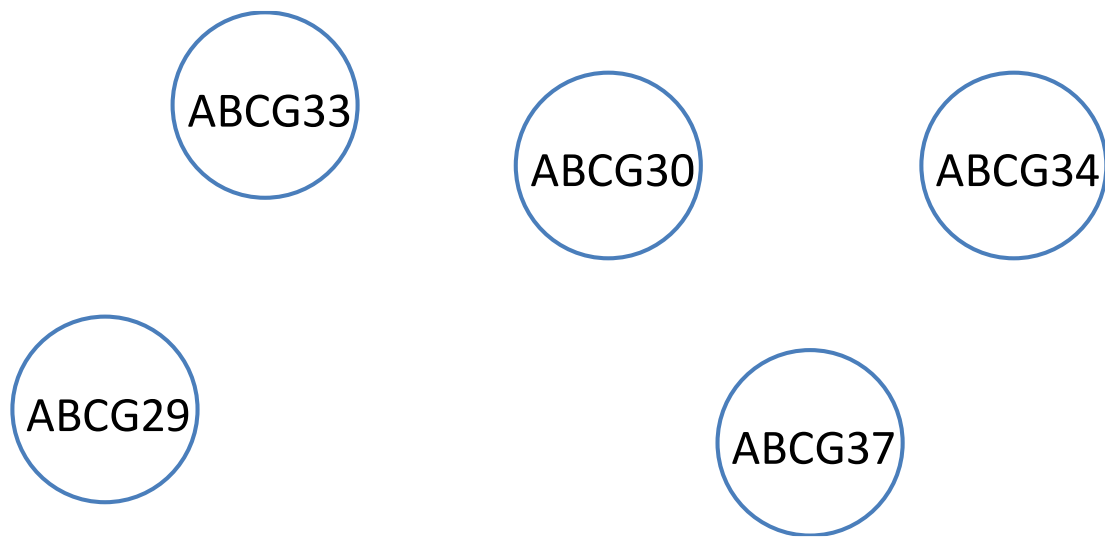


Fig. 4-4 Graphic display of expression pattern of candidate genes in single-knockout mutants

The absence of the gene expression of the root of the arrow affected gene expression ahead of the arrow

第4節 T-DNA 挿入変異体のリグニン分析

4. 1 実験

4. 1. 1 アセチルブロマイド分析

アセチルブロマイド分析は Johnson らの方法 (Johnson DB, Moore WE 1961) を参考に、以下のように実施した。6 週齢シロイヌナズナの主茎を液体窒素中で粉砕した後、メタノールを 3 回交換して脱脂し、一晚風乾させた。80°C で絶乾させたサンプル約 10 mg を量りとり、25% アセチルブロマイド酢酸溶液中で 70°C、30 分間反応させ、反応液を酢酸 20 ml、2 M NaOH 9 ml 中に移し 7.5 M 塩酸ヒドロキシルアミン 1 ml を加えて反応停止させた。酢酸で 50 ml にメスアップした。調整溶液を綿フィルターで濾過後、280 nm における吸光度を測定し、以下の式でリグニン量を算出した。

$$\text{lignin}(\%) = \frac{100(A_s - A_b) \cdot v}{a \cdot w \cdot d}$$

A_s : absorbance of sample

A_b : absorbance of blank

v : volume [l]

a : extinction coefficient [l/g·cm]

w : weight [g]

d : optical path length [cm]

4. 1. 2 熱分解 GC-MS 分析

熱分解 GC-MS 分析は黒田らの方法 (Kuroda et al. 2002)を参考に、以下のように実施した。6 週齢の植物体の茎基部から約 2 cm を採取し、メタノールで 2 回脱脂し風乾させた。パイロホイルに約 0.1 mg を量り取り、25% TMAH 2 μ l を添加して 5 分静置後分析した。Table 4-4 に記された分子を検出した。

熱分解装置 : JHP-5 型 (Japan Analytical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)

GC/MS: 7890A/5975C MSD (Agilent Technologies, Inc.)

熱分解条件: 500°C、4s

カラム: QUADREX 007-1 (25 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m)

昇温条件: 50°C (5 min) – 300°C (5°C/min) – 300°C (9 min)

INJ 温度: 250°C、ITF 温度 : 280°C、イオン化法 : EI 法、イオン化電圧 : 70 eV

4. 2 結果と考察

各ホモ接合体植物体ラインをアセチルブロマイド分析に供した。野生型シロイヌナズナの茎のリグニン量は約 16%であった。いずれの変異体ラインも野生型と同程度のリグニン量を示した (Table 4-5)。さらに熱分解 GC-MS 分析法で、各変異体リグニンの β -O-4 結合由来モノマー組成を野生型のそれと比較した。熱分解時の S および G 型由来モノマーのピークは、それぞれ 4 本ずつ黒田らによって同定されていたが、H 型モノマーについては同定されていなかったため、S および G 型モノマー由来ピークのフラグメント情報から、H 型モノマーに該当するピークを探索した。予想されるピークのフラグメントに合致するピークは 1 本しか得られなかった。よってこの 1 本のピークエリアを H 型モノマーピークエリアとして定義した。S 型および G 型のピークエリアはそれぞれ 4 本のピークエリアを合計して算出した。S/G および H/G 比は熱分解モノマー

のピークエリアを用いて算出した。野生型シロイヌナズナの茎の S/G 比は約 0.8、H/G 比は約 0.2 を示した (Table 4-5)。各ミュータントの S/G および H/G 比についても野生型と変わらなかった (Table 4-5)。*abcg37* のリグニン含量は増加傾向を示したが、今回の実験のみからはその理由は明らかではない。金田らは、T-DNA 挿入突然変異体 *abcg29* および *abcg33* の花茎の横断面切片を、トルイジンブルーまたはフロログルシノールで染色して観察したが、両変異体は野生型と比較して維管束形態またはリグニン沈着に変化はなかった (Kaneda et al. 2011)。本実験の結果は金田ら (2011) と同様であった。リグニン分析の結果から、候補とした一輸送体遺伝子の欠損はリグニン量およびリグニン組成にほとんど影響を与えず、個々の輸送体はリグニンモノマーの輸送において主要な役割を果たさないことが示唆された。しかしながら、複数の遺伝子が同時にリグニン合成に寄与する可能性がある。*ABCG30*、*ABCG34* および *ABCG37* は、野生型植物の根で協調的に発現し (Fig. 3-1)、*ABCG30* と *ABCG34* は一方をノックアウトすると他方の発現が上昇することが示された (Table 4-3)。このことから *ABCG30* と *ABCG34* は同様の機能を有している可能性が考えられる。

既報により、*ABCG29* が *p*-クマリルアルコール輸送体である可能性が示されている (Alejandro et al. 2012)。5 日齢の実生 GUS 染色によって、*ABCG29* の発現は初根および二次根において観察された。同様に GUS 染色によって、主茎が伸び始めて後 2-3 週間で茎基部およびロゼット葉の全維管束系において *ABCG29* の発現が見られた (Alejandro et al. 2012)。本研究で行った、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析では、*ABCG29* は 4 および 6 週齢の根に加えて 6 週齢の植物の茎上部において高い発現を示した。Alejandro ら (2012) は 6 週齢の植物の発現データを提供しなかったため、この成長段階で結果を比較することができなかった。また、Alejandro ら (2012) が行ったように、一遺伝子ノックアウト突然変異体のリグニン含量を分析した。彼らは根を用いたが、本研

究では茎の方が根と比較して、より木化していると予想されること、およびサンプル量が容易に確保できることを考慮して茎を用いた。Alejandro ら (2012) はチオアシドリシス法を用いて、*abcg29* 変異体の根における植物の生重量あたりのすべてのリグニンモノマー量が野生型の根と比較してより少ないことを報告した。しかし、本研究では野生型および *abcg29* 変異体植物間で、モノマー組成に著しい差は見られなかった。また、*ABCG29* を含むいずれの候補遺伝子の単一遺伝子ノックアウトによっても細胞壁乾燥重量当たりのリグニンの量および各モノマーの比は野生型と変わらなかった。よって *ABCG29* は、少なくとも茎において、*p*-クマリルアルコールの輸送に単独で関与しないと考えられる。

ABCG29 および *ABCG33* は、第 3 章の植物器官別発現解析において茎特異的な発現を示した。さらに第 4 章中第 3 節において、*ABCG29* をノックアウトすると *ABCG33* の発現が著しく上昇した。一方で、*ABCG29* および *ABCG33* のいずれの一遺伝子ノックアウト体も見た目の表現型およびリグニン合成には影響を与えなかった。よって、*ABCG29* および *ABCG33* は互いに機能を補完するため、一遺伝子ノックアウトによって表現型の変化が現れなかった可能性がある。

Table 4-4 Pyrolyzed products derived from the β -aryl ether subunits of lignin

Signal number	Product	m/z	origin
1	2-(4-methoxyphenyl)-1-methoxyethene	164, 149, 121	H
2	(Z)-2-(3, 4-dimethoxyphenyl)-1-methoxyethene	194, 179, 151, 148, 121	G
3	(E) isomer of 2	same as the MS data of 2	G
4	(Z)-2-(3, 4 5-trimethoxyphenyl)-1-methoxyethene	224, 209, 181, 178, 151	S
5	(E) isomer of 4	same as the MS data of 4	S
6	erythro-1, 2-dimethoxy-4-(1, 2, 3-trimethoxypropyl)benzene	270, 181	G
7	threo isomer of 6	same as the MS data of 6	G
8	erythro-1, 2, 3-trimethoxy-4-(1, 2, 3-trimethoxypropyl)benzene	300, 211	S
9	threo isomer of 8	same as the MS data of 8	S

Origin H: *p*-hydroxyphenyl lignin moiety (estimated by MS data), G: guaiacyl lignin moiety, S: syringyl lignin moiety

Table 4-5 Lignin contents and components in single-knockout mutants

	Lignin (%)		S/G	H/G
WT	16.1 ± 0.5	(100)	0.80±0.08	0.18±0.03
<i>abcg29</i>	16.3 ± 0.5	(101)	0.71±0.03	0.19±0.01
<i>abcg30</i>	16.4 ± 0.5	(102)	0.76±0.04	0.19±0.05
<i>abcg33</i>	16.5 ± 0.6	(102)	0.67±0.06	0.19±0.03
<i>abcg34</i>	15.5 ± 0.7	(96)	0.64±0.11	0.22±0.07
<i>abcg37</i>	19.1 ± 1.4	(114)	0.80±0.04	0.18±0.04

Lignin contents are presented as the proportion (%) of the cell wall dry weight. Data in parentheses are presented relative to the wild-type values, which were set at 100%. The pyrolyzed products used for calculating the S/G and H/G ratios are listed in Table 4-4.

Lignin contents and components were analyzed using four and three independent biological replicates, respectively.

第5節 小括

本章では第3章で選択された5つの候補輸送体遺伝子のT-DNA挿入による一遺伝子ノックアウト植物体を用いて遺伝子機能解析を行った。

各変異体のゲノムPCRにより、ホモ接合変異体ラインを取得した。ホモ接合変異体ラインにおいて、半定量的RT-PCRにより候補遺伝子は増幅されず、各候補遺伝子がノックアウトされていることを確認した。さらにノックアウト変異体を用いて、他の候補遺伝子の発現量を測定した。その結果*ABCG34*の発現レベルは、*abcg30*変異体では野生型の2倍となった。また、*ABCG30*の発現が、他の遺伝子と比較して野生型植物体においても著しく低かったため、定性的に評価したが、*abcg34*変異体における*ABCG30*の発現レベルは、野生型より著しく高くなった。これらの結果より、*ABCG30*と*ABCG34*の発現は互いに影響を与えていることが示唆された。*ABCG37*の発現レベルは*abcg30*および*abcg34*において野生型と比較して有意に上昇したが、*abcg37*変異体において*ABCG30*と*ABCG34*の発現は変化しなかった。*ABCG33*は*abcg29*および*abcg33*変異体において野生型と比較して著しく高い発現レベルを示したが、*ABCG29*と*ABCG30*の発現レベルは*abcg33*変異体において変化しなかった。*ABCG30*と*ABCG34*の発現は互いに影響を与え、*ABCG37*の発現は*ABCG30*および*ABCG34*の発現に影響を受ける事から、*ABCG30*、*ABCG34*、*ABCG37*の3遺伝子の機能が関連している可能性が示唆された。*ABCG29*および*ABCG33*については、一方向の影響のみが確認されたことから、両遺伝子間の関係性は明らかにされなかった。

各ノックアウト変異体ラインをアセチルブロマイド法によって分析すると、いずれの変異体ラインも野生型と同程度のリグニン量を示した。さらに熱分解GC-MS分析法で、各変異体リグニンの β -O-4結合由来モノマー組成を野生型のそれと比較した。ノックアウト変異体の茎のS/GおよびH/G比についても野生

型と変わらなかった。*abcg37* のリグニン含量は増加傾向を示したが、今回の実験のみからはその理由は明らかではない。

候補とした一輸送体遺伝子の欠損はリグニン量およびリグニン組成に著しい影響を与えず、個々の輸送体はリグニンモノマーの輸送において協調的に作用している可能性が示唆された。

参考文献

- Alejandro S, Lee Y, Tohge T, Sudre D, Osorio S, Park J, Bovet L, Lee Y, Geldner N, Fernie AR, Martinoia E (2012) AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr Biol* 22:1207–1212
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653–657
- Johnson DB, Moore WE ZL (1961) The spectrometric determination of lignin in small wood samples. *Tappi* 44:793–798
- Kaneda M, Schuetz M, Lin B, Chanis C, Hamberger B, Western T, Ehrling J, Samuels A (2011) ABC transporters coordinately expressed during lignification of *Arabidopsis* stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. *J Exp Bot* 62:2063–2077
- Kuroda KI, Nishimura N, Izumi A, Dimmel DR (2002) Pyrolysis of lignin in the presence of tetramethylammonium hydroxide: A convenient method for S/G ratio determination. *J Agric Food Chem* 50:1022–1027
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815
- Wang YH (2008) How effective is T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis* *J Biochem Tech* 1:11–20

第5章 総括

リグノセルロースバイオマスの有効利用のためには、リグニン生合成の理解が非常に重要である。そのうち特に、細胞内から細胞外へのリグニン前駆体の輸送については明らかにされていないことが多く残っており、これに関わるタンパクを特定することは輸送機構の理解に大きく貢献する。既報において、細胞膜画分および液胞膜画分を用いた ATP 依存的なリグニン前駆体の輸送が報告され、リグニン前駆体の細胞外輸送に関して、ABC 輸送体の関与が示唆された。本研究では ABC 輸送体に着目し、リアルタイム PCR を用いた ABC 輸送体遺伝子発現解析により候補遺伝子の選択、および候補として選出された遺伝子の一遺伝子ノックアウト変異体を用いた機能解析を行い、各輸送体タンパクのリグニン生合成への寄与を検討した。

第2章では、短期間で同調的な二次壁肥厚を誘導できるシロイヌナズナ管状要素誘導系を用いて、二次壁生合成およびそれに伴う木化のタイミングを明らかにした。これを用いて経時的な輸送体遺伝子およびリファレンスとして、二次壁生合成やリグニン生合成に関与することが知られている遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で測定し、統計解析に供した。4つの ABC 輸送体、*ABCG11*、*ABCG22*、*ABCG29*、*ABCG36* がリファレンス遺伝子と同調的に強く発現することが示され、そのうちの1つに、*p*-クマリルアルコール輸送体候補遺伝子である *ABCG29* が含まれた。また、リファレンス遺伝子とは同調的ではなかったが、*ABCG27* は木化が著しく起こっている期間に高い発現を示した。これらの結果より 5 遺伝子についてリグニン前駆体輸送体遺伝子の可能性が示唆された。

次いで第3章では、維管束植物の進化に伴って、維管束形成にとって重要な役割を果たす木化に関わる遺伝子が獲得されたと予想し、維管束植物と非維管束植物の ABC 輸送体を比較し、維管束植物にのみ保存される 10 個の ABC 輸

送体を選択した。第2章で選出された5個のABC輸送体と合わせて、合計15個のABC輸送体遺伝子を対象に植物器官別遺伝子発現解析を行った。この時、第2章と同様に二次壁生合成遺伝子やリグニン生合成遺伝子の発現パターンを参考にした。木化レベルが異なる4週齢および6週齢の5植物器官サンプル [茎上部 (頂端から2 cm 長)、茎下部 (基部から2 cm 長)、ロゼット葉、茎生葉、根] の発現量を測定し、統計解析によって各遺伝子の発現パターン別にクラスタリングを行った。全遺伝子群の発現パターンは、大きく2ブロックに分けられ、大部分のリファレンス遺伝子が一方のブロックに分類された。

ABCG29 および *ABCG33* は6週齢の茎上部で強く発現し *MYB46* および *MYB58* と協調的な発現を示した。また、*ABCG29* は *p*-クマリルアルコール輸送体である可能性が報告されており、*ABCG29* がモノリグノール輸送に関与する可能性が支持された。*ABCG33* の発現パターンは *ABCG29* の発現パターンと非常によく似ていたことから、*ABCG33* もリグニン合成関連輸送体である可能性が期待された。*ABCG30*、*ABCG34* および *ABCG37* は、4および6週齢の植物の根においてリグニン生合成関連ペルオキシダーゼである *AtPrx25* と協調的な発現が認められた。*ABCG30*、*ABCG34* および *ABCG37* はすでに他の基質の輸送体として報告されているが、ABC輸送体は複数の機能的に無関係な基質を輸送することが知られていることおよびリグニン形成関連輸送体遺伝子と共発現していたことより、候補輸送体遺伝子に含めた。最終的に、活発に木化する植物器官においていくつかのリファレンス遺伝子と同調的に発現していた、5つの遺伝子 (*ABCG29*、*ABCG30*、*ABCG33*、*ABCG34*、および *ABCG37*) をモノリグノール輸送体遺伝子候補として選択した。

さらに第4章では、第3章で選択した5つの候補遺伝子のT-DNA挿入による一遺伝子ノックアウト変異体を用いて、表現型観察およびリグニン分析による機能解析を試みた。いずれの候補遺伝子のノックアウト変異体においても野

生型と比較して見た目の変化は観察されなかった、また、リグニン分析においてもリグニン量およびモノマー比の両方に野生型との明確な変化は得られなかった。これらの結果より、いずれの候補輸送体遺伝子も 1 遺伝子単独ではリグニン生合成に寄与しないことが示唆された。

本研究では、Miao と Liu の報告 (2011)より、シロイヌナズナ葉の膜画分の基質輸送アッセイにおいて、細胞膜画分ではモノリグノール、液胞膜ではモノリグノール配糖体が ATP 依存的に輸送され、バナジン酸塩によって阻害される (Miao and Liu 2010)ことを参考に、いくつかの異なる二次代謝物の輸送体としても報告されている ABC 輸送体ファミリータンパクがモノリグノールの輸送体である可能性が高いと予想し、スクリーニングを行った。一方で、他の輸送機構によってリグニン前駆体が輸送されている可能性も考えられる。

ポプラおよびヒノキのミクロソーム画分を用いた基質輸送アッセイにより、コニフェリンが ATP 依存的に輸送された (Tsuyama et al. 2013)。これはバナジン酸塩によって阻害されず、共役阻害剤によって阻害された。よってコニフェリンはプロトン濃度勾配依存的に輸送されることが示唆された。また、このミクロソーム画分をスクロース勾配によって分画すると、V-PPase 活性がある画分にコニフェリン活性が高かったことから、液胞膜およびその他の細胞内膜においてコニフェリン輸送が行われていることが示唆された。よって、ポプラおよびヒノキではコニフェリンの輸送は、液胞膜または細胞内膜においてプロトン濃度勾配依存的に行われ、コニフェリンが液胞に貯留することが示唆された。また、細胞壁への輸送については、小胞輸送が提案された。

参考文献

- Miao YC, Liu CJ (2010) ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:22728–33
- Tsuyama T, Kawai R, Shitan N, et al (2013) Proton-Dependent Coniferin Transport, a Common Major Transport Event in Differentiating Xylem Tissue of Woody Plants. *Plant Physiol* 162:918–926

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導を賜った九州大学 大学院農学研究院 堤祐司教授に心より感謝いたします。

種々有益なご助言をいただいた九州大学 大学院農学研究院 藤田弘毅助教に深く感謝いたします。

本研究で遺伝子発現解析の統計処理を行ってくださった九州大学 大学院農学研究院 渡辺敦史准教授、田村美帆博士に心より感謝致します。