

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450480

研究課題名(和文) 稲わらでセルラーゼを安定発現するバイオ燃料用イネの開発

研究課題名(英文) Development of the rice that express heterologous cellulase in the straw for biofuel production

研究代表者

大野 良子(豊住良子)(RYOKO, OHNO)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・学術研究員

研究者番号：00398827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者らがコムギから単離した乾燥誘導性 Wdhn13プロモーター、低温誘導性タンパク質WLT10の細胞外排出シグナルを利用して糸状菌のセルラーゼを時期特異的に生産することで、生育期の形態異常を回避し、収穫後の稲わらのセルロースを容易に糖に変換できるイネの開発を目指した。Wdhn13プロモーターやWLT10の細胞外排出シグナルを用いてセルラーゼを発現させても顕著な生育異常や形態変化は認められなかったことから、セルラーゼ発現による生長や形態異常の回避に乾燥誘導性プロモーターや細胞外排出シグナルが有用であり、セルラーゼを用いた植物の糖化性の向上が期待できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated transgenic plants that express a heterologous cellulase from filamentous fungi under the control of a drought-inducible promoter and signal peptides associated with extracellular trafficking. When the endo-glucanase (EG) coding sequence was connected to the promoter region of Wdhn13 gene and signal sequence of WLT10 from common wheat, high cellulase activities were detected in the transgenic Arabidopsis plants. The EG transgenic plants showed neither morphological abnormality nor sterility. These results indicate that expression of cell wall-degrading enzymes such as cellulase by the drought-inducible promoter is one of the ways to enhance the saccharification ability of cellulosic biomass without any alteration of plant growth towards efficient production of biofuels.

研究分野：農学

キーワード：バイオマス バイオ燃料 セルラーゼ 稲わら

1. 研究開始当初の背景

再生可能な植物バイオマスのエネルギー・化学工業原料としての利用は、地球温暖化抑止に有効であるとともに持続可能な低酸素循環型社会の形成において重要である。とりわけバイオエタノールは、石油に代わる燃料エネルギーとして世界規模での需要が拡大している。しかし、現在主流となっているトウモロコシやサトウキビの澱粉質や糖質などの可食部を利用したバイオエタノールは、食料需要との競合による食料価格高騰への影響が懸念されることから、非可食部を利用したセルロース系バイオマスの活用が期待されている。しかし、稲わらなどの主成分であるセルロースは複雑で安定な分子構造のため、糖化(セルロースからグルコースを得る工程)が極めて困難である。そこで、その効率化のため、セルラーゼなどの細胞壁分解酵素をあらかじめ発現する形質転換植物の開発が進められている。しかし、外来の酵素発現量が微量である場合がほとんどで、糖化効率が悪く、セルラーゼの発現によって生育期に形態異常が生じるなどの問題が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がコムギから単離した乾燥誘導性 *Wdhn13* プロモーターを利用して糸状菌のセルラーゼを落水後の植物体(収穫直前)で時期特異的に生産することで、生育期の形態異常を回避し、収穫後の稲わらのセルロースを容易に糖に変換できるイネの開発を目指した。同時に、コムギの低温誘導性タンパク質 WLT10 の細胞外排出シグナルを利用して、セルラーゼに細胞間隙に分泌する機能を与えて、プロテアーゼの多い細胞環境から細胞間隙に移行させてセルラーゼを安定的に発現させることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Wdhn13::GUS* 形質転換植物の作製

Wdhn13 プロモーターの乾燥応答性を調べるため、*Wdhn13::GUS* を導入した形質転換植物(イネとシロイヌナズナ)を作製した。形質転換植物に乾燥処理を行い、Real time RT-PCR で *GUS* 遺伝子の発現解析を行った。また、形質転換体を *GUS* 染色して、植物体内での発現部位を明らかにした。

(2) WLT10 の細胞内局在性の解析

GFP の N 末側に WLT10 の全長(35S::*WLT10-GFP*)、20 アミノ酸からなる WLT10 のシグナル配列に 6 アミノ酸を付加したもの(35S::*WLT10signal+6aa-GFP*)、シグナル配列(35S::*WLT10signal-GFP*)を連結したコンストラクトを構築し、パーティクルガンでタマネギの表皮細胞に導入して、WLT10 の細胞内局在性を蛍光顕微鏡により観察した。

(3) *Wdhn13::WLT10signal*-セルラーゼを導入した形質転換植物の作製

セルラーゼは、糸状菌由来の 3 種類のセルラーゼ(*Trichoderma reesei* 由来のセロピオハイドロラーゼ(CBHII)、エンドグルカナナーゼ(EG)、*Aspergillus aculeatus* 由来の-グルコシダーゼ(BGL))を用いた。WLT10 の細胞外排出シグナルを N 末側に付加したセルラーゼ(CBHII、EG、BGL)をそれぞれ *Wdhn13* プロモーターに連結したコンストラクト(*Wdhn13::WLT10signal-CBHII*, *Wdhn13::WLT10signal-EG*, *Wdhn13::WLT10signal-BGL*)を作製して、アグロバクテリウムを介してイネとシロイヌナズナに導入した。細胞外排出シグナルを付加しないコンストラクト(*Wdhn13::CBHII*, *Wdhn13::EG*, *Wdhn13::BGL*)を導入した形質転換体も作製し、野生型植物と共に表現型を比較した。

(4) セルラーゼ活性の測定

各形質転換体から抽出したセルラーゼを、各基質(carboxymethyl cellulose; CMC (EG 活性)、4-Nitrophenyl β-D-lactopyranoside; pNPL (CBHII 活性)、*p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside; pNPG (BGL 活性))と反応させて、セルラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) WLT10 の細胞内局在性

コムギから単離した低温誘導性タンパク質 WLT10 の N 末に存在する 20 アミノ酸からなるシグナル配列の細胞外排出活性をタマネギ表皮細胞で検証した結果、GFP シグナルは細胞外のみならず細胞質でも観察された(図 1)。

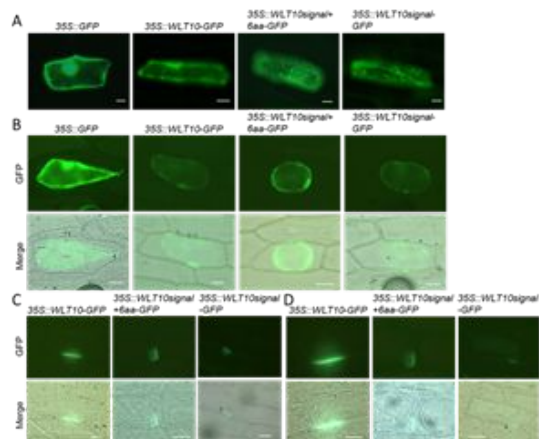


図 1. WLT10 の細胞内局在性の解析

(A) タマネギ表皮細胞における WLT10-GFP の細胞内局在シグナル、(B) 0.8 M mannitol 処理後の WLT10-GFP の細胞内局在シグナル、(C) 細胞外に局在する WLT10-GFP の蛍光シグナル、(D) 0.8 M mannitol 処理後の WLT10-GFP の蛍光シグナル

細胞質に局在した GFP シグナルは、網目状の構造体および動くドット状の構造体に局在し、小胞体マーカー-DsRed-HDEL、およびシスゴルジ体マーカー-mRFP-SYP31 と共局在した(図2)。

導入1日目には細胞質に局在する細胞が多く観察されたが、導入2日目には細胞外に局在する細胞が多く観察され、導入後1日目と2日目では細胞質と細胞外に局在する細胞の割合が変化することが分かった(図3)。以上の結果より、WLT10は小胞体、ゴルジ体を経由して細胞外に排出されることが明らかになった(Ohno and Takumi 2015)。

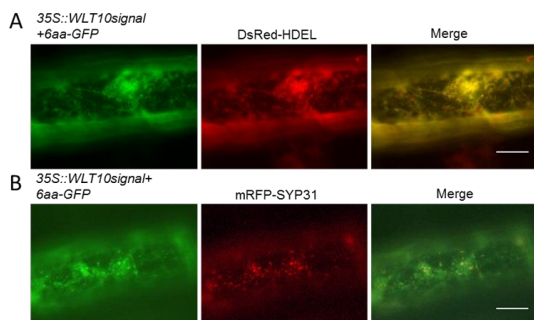


図2.WLT10のオルガネラマーカーとの共局在性の解析

(A)小胞体マーカー-DsRed-HDELと35S::WLT10 signal+6aa-GFPの共局在、(B)シスゴルジ体マーカー-mRFP-SYP31と35S::WLT10 signal+6aa-GFPの共局在

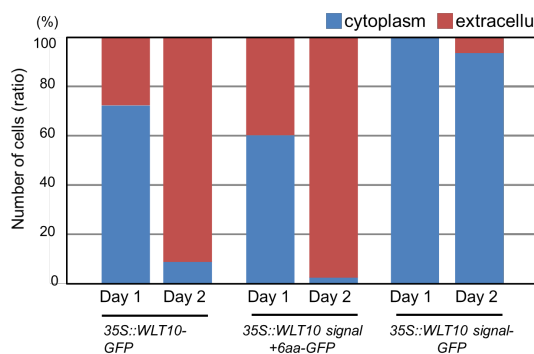


図3.GFPシグナルが細胞内と細胞外に局在する割合の変化

(2) *Wdhn13* プロモーターの乾燥応答性

Wdhn13::GUS 形質転換シロイヌナズナを用いた解析により、*Wdhn13*は、乾燥にตอบสนองして葉や根の維管束組織で特異的に発現していることが確認できた。したがって、*Wdhn13* プロモーターは、単子葉植物・双子葉植物を問わず乾燥処理によって遺伝子発現を誘導できるプロモーターとして利用可能であることが明らかになった。

(3) 導入したセルラーゼ遺伝子の発現時期

セルラーゼを導入した形質転換シロイヌナズナのうち、ホモに固定化された系統を用いて、導入したセルラーゼ遺伝子の発現時期

について調べた結果、播種後4週目から各セルラーゼ遺伝子の発現がみられ、観察を行った播種後7週目まで発現していることが確認された。

(4)セルラーゼ導入植物の表現型の解析

セルラーゼ遺伝子をCaMV35Sプロモーター等によって過剰発現させた場合、植物体の表現型に悪影響が出ることが報告されている。このような悪影響が*Wdhn13*乾燥誘導性プロモーターによってセルラーゼを発現させた場合も認められるかどうかについて検証を行った。セルラーゼを導入したシロイヌナズナについて、播種直後~収穫期までの植物体の外観を、乾燥処理等を施していない通常栽培条件下で比較したところ、今回のコンストラクト導入によって顕著な形態変化や生育異常は認められなかった。

(5) 老化誘導性プロモーターの探索と単離

セルラーゼの発現を収穫後のわら特異的にするために、老化時に特異的に発現する遺伝子のプロモーターの探索を行った。コムギの細胞死に伴って発現を上昇させるWRKY、NAC等の転写因子遺伝子を抽出して、その発現パターンや機能解析等から、老化に伴って発現が上昇するものを選抜した結果、4つのWRKY、2つのNAC、1つのMYB遺伝子が暗黒処理による老化によって発現誘導されることが分かった。したがって今後これらのコムギ遺伝子のプロモーターは、セルラーゼを発現させる時のプロモーターとして利用できる可能性がある。

(6)セルラーゼ活性の測定

セルラーゼを導入した形質転換シロイヌナズナのうち、WLT10由来のシグナル配列を付加したEGを導入した系統を用いて、セルラーゼ活性を調べた結果、高いセルラーゼ活性を持っていることが確認できた。

(7)今後の展望

本研究で得られた結果は、セルラーゼ発現による生長や形態異常の回避に乾燥誘導性プロモーターが有用であることを示し、セルラーゼを用いた植物の糖化性の向上が期待できる可能性を示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

Ohno, R., Teramura, H., Ogino, C., Kondo, A., Takumi, S., Genotypic effects on sugar and by-products of liquid hydrolysates and on saccharification of acid-insoluble residues of wheat straw, *Genes and Genetic Systems*, 査読有、2018

DOI:<http://doi.org/10.1266/ggs.17-00027>

Ohno, R., Teramura, H., Ogino, C., Kondo, A., Takumi, S., Effects of semi-dwarf and glaucousness genes on sugar contents in liquid hydrolysates and saccharificated acid-insoluble residues from wheat straw, *Wheat Information Service*, 査読無, 125, 2018

Matsuda, R., Iehisa, J.C.M., Sakaguchi, K., Ohno, R., Yoshida, K., Takumi, S., Global gene expression profiling related to temperature-sensitive growth abnormalities in interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii*, *PLOS ONE*, 査読有, 12, 2017, e0176497

DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176497>

Yoshioka, M., Iehisa, J.C.M., Ohno, R., Kimura, T., Enoki, H., Nishimura, S., Nasuda, S., Takumi, S., Three dominant awless genes in common wheat: fine mapping, interaction and contribution to diversity in awn shape and length, *PLOS ONE*, 査読有, 12, 2017, e0176148

DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176148>

Takumi, S., Okada, M., Michikawa, A., Miki, Y., Ohno, R., Yoshida, K., High-quality RNA isolation from wheat immature grains. *Wheat Information Service*, 査読無, 124, 2017

Iehisa, J.C.M., Ohno, R., Kimura, T., Enoki, H., Nishimura, S., Okamoto, Y., Nasuda, S., Takumi, S., A high-density genetic map with array-based markers facilitates structural and quantitative trait locus analyses of the common wheat genome, *DNA Research*, 査読有, 21, 2014, 555-567

DOI:10.1093/dnares/dsu020

Ohno, R., Takumi, S., Extracellular trafficking of a wheat cold-responsive protein, WLT10, *Journal of Plant Physiology*, 査読有, 174, 2015, 71-74

DOI: 10.1016/j.jplph.2014.10.004.

〔学会発表〕(計 4 件)

大野良子、久木康伸、吉田健太郎、宅見 薫雄、雑種生育不全を発症するコムギで発現量が増加する WRKY 転写因子の解析、第 59 回植物生理学会、2018.3.28、札幌コンベンションセンター(北海道)

大野良子、寺村浩、荻野千秋、近藤昭彦、宅見 薫雄、麦わらのバイオマス利用に関するパンコムギ系統間差異、第 12 回 ムギ類研究会、2017.12.16、京都大学吉田

キャンパス北部構内(京都府)

久木康伸、大野良子、吉田健太郎、宅見 薫雄、コムギ種間雑種における生育不全で発現量が増加する WRKY 転写因子の解析、第 128 回日本育種学会、2015.9.11、新潟大学(新潟県)

久木康伸、大野良子、吉田健太郎、宅見 薫雄、細胞死に関するコムギ WRKY 転写因子を発現した形質転換シロイヌナズナの解析、第 10 回 ムギ類研究会、2015.12.11、伊勢市観光文化会館(三重県)

〔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
<http://www.lab.kobe-u.ac.jp/ans-plantgenetics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 良子(OHNO, Ryoko)
神戸大学・大学院科学技術イノベーション
研究科・学術研究員
研究者番号：00398827

(2) 研究分担者

宅見 薫雄(TAKUMI, Shigeo)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：50249166

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし