

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07509

研究課題名(和文) リグニン多糖類複合体分解酵素の植物中での発現による易脱リグニン植物の育種

研究課題名(英文) Molecular breeding of easily delignified plants by producing lignin carbohydrate complex (LCC)

研究代表者

川合 伸也 (Kawai, Shinya)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90202027

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)：リグニンが構造的な多糖と結合したLignin Carbohydrate Complex (LCC)を開裂する白色腐朽菌であるCoprinopsis cinerea由来のエステラーゼCcEST1およびアラビノフラノシダーゼCcAbf62Aをイネに導入し、脱リグニンを容易にすることを目的とした。CcEST1の発現によりわずかながらリグニンの生合成が促進された可能性が示唆されたが、CcAbf62Aの発現によるリグニン含量の差はなかった。in vitroでの飼料消化率を比較するとCcEST発現イネと対象区では同程度であったが、CcAbf62A発現イネにおいて消化率の向上が見られた。

研究成果の概要(英文)：In order to increase the degradability of plant cell wall, we tried to cleave the linkages between lignin and carbohydrate in lignocarbhydrate complex (LCC) in planta. CcEST1 is an esterase of a white-rot-fungus, Coprinopsis cinerea. CcEST1 has both feruloyl-esterase activities. Thus, this enzyme can cleave bonds between the lignin and polysaccharide. And CcAbf62A is also an arabinofranosidase from C. cinerea. It can cleave the arabinofranosyl bonds in LCC. Because CcEST1 was a gene from a basidiomycete, the corresponding nucleotide sequence to a plant extracellular secretion signal was fused at the 5'-upstream site in frame to secrete effectively to the plant extracellular space. We analyzed the modified CcEST1 and CcAbf62A introduced transgenic rice plants. Transgenic rice plants produced CcEST1 contained slightly increased lignin contents, but lignin contents of transgenic rice plants produced CcEST1 were not changed. In vitro digestibility of transgenic plants rised.

研究分野：植物遺伝子工学

キーワード：リグニン イネ LCC分解 脱リグニン エステラーゼ アラビノフラノシダーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

現在、CO<sub>2</sub> 排出量削減を目的に、カーボン・ニュートラルであるバイオエタノールの効率的生産に関する研究が世界的に進められている。現在の主なバイオエタノールの原料はトウモロコシとサトウキビであり、食料や飼料と重っている。そこで、スイッチグラスなどの未利用バイオマスや作物残渣や廃材の植物細胞壁を原料としたバイオエタノール生産が注目されている。しかし、そこには大きな問題点が存在する。細胞壁中の多糖類はリグニンによって化学的、酵素的糖化処理に抵抗性があるため、低分子化されにくく発酵可能な糖の収率が低いことである。それを改善するために、リグニンの含量を減らしたり、組成を改変したりする研究が進められている。その多くの研究では、リグニン生合成に関与する生合成酵素や転写因子の発現を抑制することが行われている。しかし、リグニンは植物細胞の物理性や耐腐朽性や耐病性や害虫抵抗性や通導性に強く関与しているために、単純に含量を低下させれば良いわけではない。そこで、リグニン組成やリグニンと多糖間の結合強度やリグニンそのものの自体の構造を改変することに注目が集まっている。リグニン量を低減させるために植物でリグニン分解酵素である白色腐朽菌由来のリグニン分解酵素リグニン・ペルオキシダーゼやMnペルオキシダーゼを発現させると矮化や奇形など様々な悪影響が報告されている(S. Kawai 研究業績 1)。リグニンはヘミセルロースとフェルラ酸残基を介して強固に結合したリグニン多糖複合体(LCC)を形成している。そこで、植物中で LCC 結合を弱めることを考えた。LCC 結合が弱まれば弱い処理でリグニンと多糖を分離できるようになると考えられる。一方、リグニン含量自体は変化せず、植物体に悪影響が出にくいと考えられる。

高分子リグニンを分解できる微生物は白色腐朽菌である。白色腐朽菌のモデル生物は *Coprinopsis cinerea* である。高分子リグニンは細胞壁中の多糖類と結合して LCC となっているため、白色腐朽菌は LCC のリグニンと多糖類間の結合を切断できる酵素を持っている。そこで連携研究者の東京農工大学准教授の吉田誠は二種類の LCC のリグニンと多糖類間の結合を切断する酵素フェルロイルエステラーゼ CcEST1(Fig. 1)と多糖類部分であるヘミセルロースの内部を切断する酵素アラビノフラノシダーゼ CcAbf62A(Fig. 2)の cDNA を単離している。また、フェルロイルエステラーゼの間接的に酵素活性を測定することに本研究室で成功している。そこでそれらの酵素を植物中で発現させて、易脱リグニン含有植物の育種を目指すことにした。そして得られた形質転換植物の導入された酵素の酵素活性の測定と特性を解析することにした。

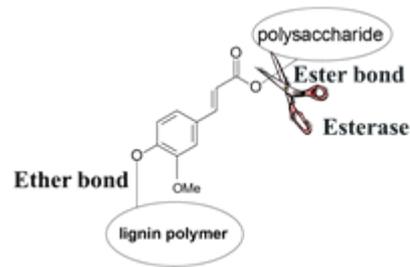


Fig. 1 フェルラ酸残基を介した LCC の結合とフェルロイルエステラーゼによる分解。

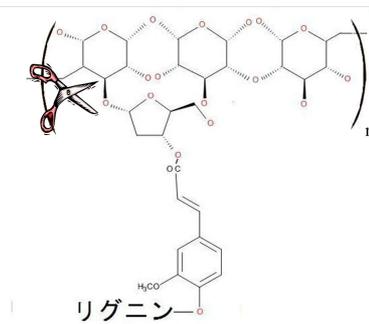


Fig. 2 アラビノフラノシダーゼによる LCC 結合の切断。

### 2. 研究の目的

近年、未利用バイオマスからバイオエタノールへの変換技術の開発が世界的に進められているが、最大の問題は細胞壁多糖類から発酵可能な単糖への分解がリグニンによって阻害されるため、低効率であることである。リグニンは細胞壁中でヘミセルロースなどと結合したリグニン多糖複合体 (lignin-carbohydrate complex, LCC) として存在している。この LCC のリグニンと多糖類間の結合を植物体中で弱められれば、易脱リグニン植物を育種できる。そこで、リグニンと多糖間の結合を解裂する酵素を植物中で発現させ易脱リグニン植物を開発することをこの研究の目的とした。そこで、白色腐朽菌である *Coprinopsis cinerea* から細胞外分泌炭水化物エステラーゼ CcEST1 とアラビノフラノシダーゼ CcAbf62A を発現する植物を開発し、その特性を解析する。

### 3. 研究の方法

・CcEST1 と CcAbf62A を高発現するベクターの改良と植物の形質転換を行った。既に少数ではあるがイネとタバコ双方の形質転換体を得られているので、技術的な問題は無い。形質転換体 T<sub>0</sub> 世代においては、形質転換操作のストレスや形質転換植物体として得られる時期による生育環境の違いによって、野生型や他の形質転換体との比較が困難になる

場合がある。それらの影響を排除するために後代を得る必要がある。そこで、形質転換体から種子を得た。

・形質転換体の PCR と RT-PCR 解析を行い、その中から、RT-PCR で発現量の多い個体を選択した。

・酵素活性測定法の確立。CcEST1 の酵素活性を直接測定することは困難であった。CcEST1 はフェルロイルエステラーゼ活性以外にもアセチルエステラーゼ活性を所持しているため、形質転換植物と野生型植物のアセチルエステラーゼ活性を *p*-ニトロフェニルアセテートを基質として反応させて吸光度変化を測定して、間接的にフェルロイルエステラーゼ活性を測定していた。そこで、フェルラ酸化合物を基質としたフェルロイルエステラーゼ活性を直接測定する方法を確立するため、非イオン性の界面活性剤の中から NP-40 を用いて系を確立した。また、アラビノキシランを基質としてアラビノフラノシダーゼ活性を、HPLC を用いて測定する系を確立した。

・CcEST1 と CcAbf62A の細胞内外での局在性の確認。両方の cDNA の 5' 末端には細胞外分泌シグナル配列に相当する塩基配列を付加した。リグニン存在場所である細胞外に分泌されているか、ゴルジ体や分泌顆粒に存在しているかどうかを GFP と mCherry を融合させて共焦点レーザー顕微鏡で確認を行った。

・野生型植物体を用いて、リグニン化学分析や染色実験を行った。その他、モイレ染色やフロログルシノール塩酸反応などをそれぞれの野生型の植物に対して行い、顕微鏡観察し、形質転換体の解析のための予備実験を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 発現させるプロモーターを CaMV35s からイネ actin プロモーターへ改変した。その結果、より RT-PCR で発現している個体を得られた。生育に関しては CcEST1 を発現しているイネにおいては形態的にも生育速度にも変化は見受けられなかった。一方、CcAbf62A を発現するイネにおいては明らかな生育不良が見受けられたが、その中で生育が良いものを選び、以降の解析に用いた。

(2) CcEST1、CcAbf62A、および空ベクターを導入したイネ pActEST、pActAbf、pActnos を作出した。アセチルプロマイド法により pActEST において pActnos よりも高いリグニン含量が検出され、CcEST1 の発現により LCC 構造が変化することでリグニンの生合成が促進された可能性が示唆された (Fig. 3)。*in vitro* での飼料消化率を比較すると pActEST と pActnos では同程度であった一方、pActAbf において消化率の向上が見られた (Fig. 4)。以上のことから、イネにおける LCC 分解系酵素の発現は、リグニン含量が同程度の個体であれば消化率を野生型よりも向上させ、リグニンの沈着が進んだ個体においては消化率

の低下を抑える働きがあると考えられた。

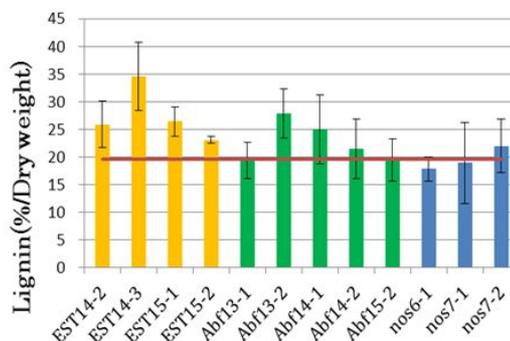


Fig. 3 AcBr 法によるリグニン含量の測定

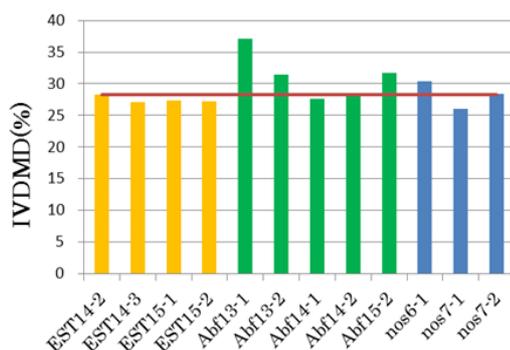


Fig. 4 *in vitro* での飼料消化率の測定

(3) 植物体の酵素活性測定。植物体からの酵素抽出液には、非形質転換体由来のものに比べエステラーゼ活性で 1.5~4.8 倍、アラビノフラノシダーゼで 1.2~2.2 倍の活性が検出された。

(4) GFP と CcEST または CcAbf62A を融合させたものと細胞質で発現する mCherry をで一過性発現させたところ、細胞外に分泌されることが確認できた。

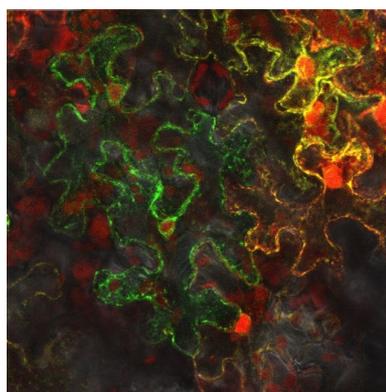


Fig. 5 CcEST-GFP と mCherry の一過的発現

(5) モイレ染色やフロログルシノール塩酸反応を行ったが、大きな変化は見られなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

黛康悦, 丸山亮, 川合伸也, リグニン・多糖  
複合体分解酵素の植物体での発現 (2) 第  
61回 リグニン討論会(2016)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川合 伸也 (KAWAI, Shinya)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：90202027

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

船田 良 (FUNADA, Ryo)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：20192734

吉田 誠 (YOSHIDA, Makoto)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：30447510

##### (4) 研究協力者

( )