

## 自己評価報告書

平成 23 年 4 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2012

課題番号：20380102

研究課題名（和文） 代謝ネットワーク制御に基づくバイオ燃料化に適した木質の分子育種

研究課題名（英文） Molecular breeding of lignocellulosics for biomass refinery

## 研究代表者

梅澤 俊明 (UMEZAWA TOSHIAKI)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：80151926

研究分野：樹木代謝機能化学

科研費の分科・細目：森林学

キーワード：転写因子、木質形成、リグニン、代謝ネットワーク、バイオ燃料

## 1. 研究計画の概要

木質からのバイオエタノールと化成品の製造の第一段階は、いずれも木質多糖成分の糖化（多糖分解によるグルコースなどの生産）であるが、リグニンが多糖を被覆していること、及び木質成分が全体として強固な集合構造を形成していることなど、木質成分の構造上の問題に起因して糖化が著しく阻害されている。すなわち、糖化以降の段階の技術革新に加え、原料改質が重要な標的となっており、長年に亘り木質科学分野で培われてきた木質細胞壁に関する知見の活用が希求されている。

そこで、本研究ではバイオエタノール製造に適する木質の作出を目的として、木質形成代謝の統御ネットワーク機構解明に基づいて、木質細胞壁成分の量、構造、及び全体の存在状態を制御することにより、高効率糖化を可能とする木質バイオマスの作出を図る。

## 2. 研究の進捗状況

本研究ではまず、シロイヌナズナを材料として用い、リグニン合成経路であるケイヒ酸モノリグノール経路上の鍵酵素の一つである CCoAOMT と共発現する転写因子の候補遺伝子 5 種を、遺伝子共発現ネットワーク解析により絞り込んだ。

次いで、それぞれの遺伝子の発現を制御した組換え（形質転換）シロイヌナズナ植物体を作成し、そのリグニンおよびリグニン合成前駆体の分析を行ったところ、特定のリグニン前駆体の生成を促進或いは減少している組換え体が得られた。以上により、リグニン生合成を含めた細胞壁構築の制御に関わる転写因子をコードすることが強く示唆される遺伝子が得られた。

次いで、これらの遺伝子の中で RING フィ

ンガータンパク質をコードする遺伝子について詳細に解析した。まず、形質転換体のリグニン芳香核構造解析のためのマイクロハイスループットリグニン分析法を確立した。次いで、この遺伝子の発現状況解析、発現の局在性、対応する組換えタンパクの生化学的解析、さらに、二次壁形成のマスター転写因子による直接的転写活性化について検討した。その結果、この RING フィンガータンパク質は、二次壁形成のマスター転写因子による直接転写活性化を受ける、二次壁形成に関与するユビキチンリガーゼであることが明らかとなった。

さらに、ポプラマイクロアレイデータの解析に基づき、二次木部で特異的に発現している転写因子遺伝子を 23 種類絞り込んだ。次に、3 種類の転写因子遺伝子を選び、これら遺伝子の過剰発現および発現抑制コンストラクトの作成を行った。さらに、アグロバクテリウムを介した形質転換により、1 種類の転写因子遺伝子の過剰発現用コンストラクトをポプラに導入し、10 系統の過剰発現個体を得た。

## 3. 現在までの達成度

## ①当初の計画以上に進展している

(理由)

研究は当初計画を上回り進展している。すなわち、二次細胞壁構築制御に関わる新規の転写因子等の遺伝子が取得されている。さらにこれらの遺伝子の発現を制御した形質転換体が多数得られており、糖化性評価の準備が整っている。また、形質転換体のリグニン分析に必須の、マイクロハイスループットリグニン分析法が確立された。

#### 4. 今後の研究の推進方策

- (1) 細胞壁構築制御関連遺伝子の機能解析  
細胞壁構築制御遺伝子の発現を制御した形質転換シロイヌナズナに就き詳細なリグニン分析を行い、当該遺伝子の機能を調べる。
- (2) 実用植物における細胞壁構築制御関連遺伝子の同定  
実用植物の細胞壁構築制御に関わる転写因子をクローニングする。次に、これらの転写因子が二次木部成分（リグニン、セルロース、ヘミセルロース）生合成を直接活性化するか否か検討する。
- (3) 形質転換実用植物におけるバイオ燃料生産性の検討  
転写因子を過剰発現および発現抑制させた形質転換実用植物に就き、細胞壁成分分析と酵素糖化効率を求め、形質転換実用植物が生産した木質バイオマスのバイオ燃料化に対する適性を評価する。

#### 5. 代表的な研究成果

（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2件）

- ① M. Yamamura, S. Wada, N. Sakakibara, T. Nakatsubo, S. Suzuki, T. Hattori, M. Takeda, N. Sakurai, H. Suzuki, D. Shibata, T. Umezawa, Occurrence of Guaiacyl/*p*-Hydroxyphenyl Lignin in *Arabidopsis thaliana* T87 Cells, Plant Biotechnology, 28, 1-8 (2011), 査読有
- ② T. Umezawa, The cinnamate/monolignol pathway, Phytochemistry Reviews, 9, 1-17 (2010), 査読有

〔学会発表〕（計11件）

- ① 山村正臣、和田将平、服部武文、鈴木史朗、竹田みぎわ、櫻井望、鈴木秀幸、柴田大輔、梅澤俊明、シロイヌナズナ T87 液体培養細胞のリグニンの性状、日本農芸化学会 2011 年度大会、平成 23 年 3 月 28 日、京都市
- ② 梅澤俊明、リグニンの量と構造の制御、第 52 回日本植物生理学会年会シンポジウム（植物バイオマス生産のための遺伝子組換え戦略）、平成 23 年 3 月 20 日、仙台市
- ③ 野田壮一郎、鈴木史朗、山口雅利、西窪伸之、服部武文、出村拓、梅澤俊明、二次壁形成に関わる RING finger タンパク質の局在と転写因子による発現制御、第 61 回日本木材学会大会、平成 23 年 3 月 19 日、京都市
- ④ 山村正臣、和田将平、榊原紀和、中坪朋文、鈴木史朗、服部武文、竹田みぎわ、櫻井望、鈴木秀幸、柴田大輔、梅澤俊明、シロイヌナズナ T87 培養細胞のリグニン分析、第 55 回リグニン討論会、平成 22 年 10 月 20 日、

京都市

- ⑤ 鈴木史朗、鶴巻勇太、服部武文、V.L. Chiang、梅澤俊明、ポプラ二次木部において高発現する MYB 転写因子の機能解析、第 28 回植物細胞分子生物学会（仙台）平成 22 年 9 月 3 日、仙台市
- ⑥ T. Umezawa, Metabolic engineering of lignin biosynthesis for biorefinery, Joint Seminar under Japan Korea Basic Scientific Cooperation, Aug24, 2010, Gyeongju, Korea
- ⑦ 鈴木史朗、樹木の細胞壁厚を制御する遺伝子の同定、第 142・143 回生存圏シンポジウム「生存圏ミッションシンポジウム」、平成 22 年 3 月 11 日、宇治市
- ⑧ 梅澤俊明、第二世代バイオ燃料開発における代謝物ネットワーク解析、第 112 回生存圏シンポジウム メタボロミクスに基づく人類の生存基盤構築、平成 21 年 3 月 18 日、宇治市
- ⑨ 鶴巻勇太、鈴木史朗、櫻井望、服部武文、鈴木秀幸、柴田大輔、梅澤俊明、木化制御遺伝子が破壊されたシロイヌナズナ変異体における代謝物網羅解析、第 59 回日本木材学会大会、平成 21 年 3 月 16 日、松本市
- ⑩ 梅澤俊明、バイオ燃料開発におけるリグニンの制御、モノづくりフェア 2008 シンポジウム 自動車産業におけるバイオ燃料の将来は？～食料と競合しない植物資源からのバイオマスエネルギー開発最前線～、平成 20 年 10 月 24 日、福岡市
- ⑪ 梅澤俊明、鈴木史朗、リグニンの代謝制御による木質バイオマスの改良、蕨田セミナー（日本農芸化学会）バイオマスデザインとリファイナリー -競合から共存へ-、平成 20 年 5 月 9 日、神戸市

〔図書〕（計2件）

- ① 梅澤俊明、CMC 出版、リグニン量と構造の制御、エコバイオリファイナリー（植田充美、田丸浩監修）、2010、pp. 65-73
- ② 梅澤俊明、CMC 出版、リグニンの代謝制御による木質バイオマスの改良（第二世代バイオ燃料の開発と応用展開、吉田和哉名誉監修、植田充美、福崎英一郎監修）、2009、pp. 103-111

〔その他〕

ホームページ

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/W/LMSFPM/>