

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 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 lignocellulose towards biorefinery

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

研究成果の概要（和文）：

非可食資源である木質からのバイオ燃料製造においては、木質成分の構造上の問題に起因して酵素糖化が著しく阻害されている。本研究ではバイオ液体燃料製造に適する木質の作出を目的として、木質形成代謝を統御する因子を明らかにし、その知見に基づき細胞壁を改変した木質バイオマスを作成した。その結果、リグニンの量と構造が酵素糖化性に及ぼす影響に関する基本的知見が得られ、今後の分子育種に対する指針が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Lignin is an essential component of plant cell walls, but it is not a storage material. The characteristics present obstacles to enzymatic hydrolysis of lignocellulosic polysaccharides for biorefinery. Herein, we identified factors that control secondary cell wall formation and manipulated expression of genes encoding the factors. Analysis of the transgenic plants thus obtained indicated that they had lower lignin contents and that the lignin structures and amounts affected largely the enzymatic saccharification efficiency. This provides useful information on future molecular breeding of lignocellulosic materials for biorefinery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学、木質科学

キーワード：リグニン、樹木バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

研究開発当初、可食資源の液体燃料化が大きな社会問題をもたらしていた。そして、非可食資源である木質からのバイオエタノール製造の各工程について、技術革新によるコスト削減を目指した研究開発が世界的に急

激に盛んになっていた。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た。

## 2. 研究の目的

上記背景のもとで、本研究ではバイオ液体燃料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目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) シロイヌナズナのリグニン合成関連転写因子等の候補遺伝子の特定

モデル植物である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と共発現する転写因子等の候補遺伝子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。

### (2) ポプラのリグニン合成関連転写因子等の候補遺伝子の特定

ポプラマイクロアレイデータの解析、形質転換コンストラクトの作成、1種類の転写因子遺伝子の過剰発現体の作出を行った。

### (3) 細胞壁形成制御に関わる候補遺伝子の機能解析

絞り込んだシロイヌナズナの細胞壁形成制御遺伝子候補の中から 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。

### (4) 実用植物における木質形成関連遺伝子の発現制御

シロイヌナズナを用いた木質形成統御遺伝子の機能解析研究を実用植物（イネとポプラ）に展開し、実用形質転換植物の生産する木質の酵素糖化効率を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) シロイヌナズナのリグニン合成関連転写因子等の候補遺伝子の特定

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。

これら5種の候補遺伝子から擬陽性を除くため、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

作成した。

得られた組換えシロイヌナズナにつき、リグニンおよびリグニン合成前駆体を常法に従って分析したところ、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等をコードすることが強く示唆される遺伝子が得られた。

### (2) ポプラのリグニン合成関連転写因子等の候補遺伝子の特定

ポプラマイクロアレイデータの解析、形質転換コンストラクトの作成、1種類の転写因子遺伝子の過剰発現体の作出を行った。まず、既に公表されているポプラの器官別のマイクロアレイデータをRMA法によって正規化し、相関係数の解析により、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、この中から3種類の転写因子遺伝子を選び、各々につき、CaMV35Sプロモーターの制御下、コード領域のC-末端の終止コドンの直前にVP16転写活性化ドメインを挿入したコンストラクトと、SRDX転写抑制化ドメインを挿入したコンストラクトを作成した。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発現制御用コンストラクトをポプラに導入し、約10系統の形質転換体を得た。

### (3) 細胞壁形成制御に関わる候補遺伝子の機能解析

(1)で選抜された細胞壁形成制御遺伝子候補の中から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、プロモーター:GUSコンストラクト導入個体においてGUS染色パターンを調べたところ、この遺伝子は、花茎の維管束間繊維や胚軸の二次木部において、二次壁形成の初期に強く発現していることを見出した。次に、過剰発現およびノックアウト変異体の花茎における遺伝子発現を調べたところ、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの各酵素遺伝子の遺伝子発現が野生型と比べ変異体において変化していた。また、この遺伝子にYFPを接続したコンストラクトをシロイヌナズナのプロトプラストで発現させ、蛍光顕微鏡で観察したところ、YFPシグナルは、細胞膜に局在した。さらに、この遺伝子のリコンビナントタンパク質を用いてユビキチン化反応を行ったところ、自己ユビキチン化反応を触媒した。また、デュアルルシフェラーゼアッセイおよびゲルシフトアッセイにより、この遺伝子は二次壁形

成のマスター転写因子である MYB46 によって直接的に転写活性化を受けることが示された。以上より、この RING フィンガータンパク質は、二次壁形成に関与するユビキチンリガーゼであることを明らかにした。

#### (4) 実用植物における木質形成関連遺伝子の発現制御

これまでのシロイヌナズナを用いた木質形成統御遺伝子の機能解析研究を実用植物（イネとポプラ）に展開し、実用形質転換植物の生産する木質の酵素糖化効率を評価する研究を行った。ポプラについては、転写因子過剰発現および発現抑制形質転換体を組換え温室で1年間栽培し、幹の木材の部分を収穫後粉末化し、木質成分と酵素糖化効率を調べるためのサンプルを調製した。今後、これらのサンプルを詳細に解析する予定である。

一方、イネについては、木質成分合成酵素遺伝子の発現パターンと相関の高い転写因子遺伝子をデータベース検索により選抜し、選抜された転写因子遺伝子の発現解析および機能解析と、発現を制御した形質転換体の栽培実験を行った。具体的には、リグニン合成酵素遺伝子である *COMT* や *ACL*、セルロース合成酵素遺伝子である *CesA*、キシラン合成酵素遺伝子である *GT43B* などの細胞壁合成酵素遺伝子の発現パターンと相関の高い転写因子遺伝子をデータベース上で調べ、MYB 転写因子遺伝子が多く含まれていることを見出した。そこで、これらの MYB 転写因子遺伝子の転写活性化能について、イネ培養細胞への一過的形質転換を用いたデュアルルシフェラーゼアッセイによって調べ、4 種類の転写因子遺伝子のうち、2 種類は転写活性化能が高く、2 種類は転写活性化能が低いことを明らかにした。また、転写活性化能の低い 2 種類の転写因子は、皮層繊維が急速に発達する出穂期の稈で特異的に発現していることを見出した。4 種類の転写因子が各々活性化する下流遺伝子を明らかにするため、*CA1dOMT*、*CesA*、*GT43B* などのプロモーターを用いてデュアルルシフェラーゼアッセイを行ったところ、4 種類のうち 3 種類の転写因子は、セルロース合成酵素遺伝子 (*CesA*) に対する転写活性を示した。この 3 種類の転写因子のうちの 1 つは、シロイヌナズナにおいてリグニン生合成を特異的に制御すると示されている MYB 転写因子のイネオーソログであると考えられるため、イネとシロイヌナズナでは、二次壁成分生合成遺伝子に対する MYB 転写因子による転写制御機構が異なっている可能性が考えられた。

また、転写因子遺伝子の発現を制御した形質転換イネの細胞壁成分分析と酵素糖化効率を求め、形質転換木質バイオマスのバイオ

燃料化に対する適性を評価した。

以上より、リグニンの量と構造が酵素糖化性に及ぼす影響に関する基本的知見が得られ、今後の分子育種に対する指針が得られた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① S. Noda, Y. Takahashi, Y. Tsurumaki, M. Yamamura, N. Nishikubo, M. Yamaguchi, N. Sakurai, T. Hattori, H. Suzuki, T. Demura, D. Shibata, S. Suzuki, T. Umezawa, *ATL54, a RING-H2 domain protein selected by a gene co-expression network analysis, is associated with secondary cell wall formation in Arabidopsis*, *Plant Biotechnology*, 査読有, 30, in press, 2013
- ② M. Yamamura, S. Noda, T. Hattori, A. Shino, J. Kikuchi, K. Takabe, S. Suzuki, D. Shibata, T. Umezawa, *Characterization of *Erianthus arundinaceus* lignocellulose in relation to enzymatic saccharification efficiency*, *Plant Biotechnology*, 査読有, 30, 2013, 25-35  
DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.1127a
- ③ M. Yamamura, T. Hattori, S. Suzuki, D. Shibata, T. Umezawa, *Microscale thioacidolysis method for the rapid analysis of  $\beta$ -0-4 substructures in lignin*, *Plant Biotechnology*, 査読有, 29, 2012, 419-423  
DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.0627a
- ④ 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*, 査読有, 28, 1-8, 2011  
DOI: 10.5511/plantbiotechnology.10.0823c
- ⑤ T. Umezawa, *The cinnamate/monolignol pathway*, *Phytochemistry Reviews*, 査読有, 9, 1-17, 2010  
DOI: 10.1007/s11101-009-9155-3

[学会発表] (計 25 件)

- ① 鈴木史朗、鶴巻勇太、池谷仁里、粟野達也、大谷美沙都、鈴木秀幸、服部武文、出村拓、梅澤俊明、キメラ MYB 転写因子の過剰発現による二次壁成分生合成の変化、第 63 回日本木材学会大会、2013/3/29、盛岡市

②梅澤俊明、リグノセルロースバイオマスの利用に向けた草本の育種、第63回日本木材学会大会、2013/3/27、盛岡市

③小柴太一、山村正臣、鈴木史朗、服部武文、坂本正弘、梅澤俊明、イネリグニン生合成の増強、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013/3/25、仙台市

④梅澤俊明、リグニン生合成の代謝工学 第223回生存圏シンポジウム ミッションシンポジウム、2013/3/13、宇治市

⑤梅澤俊明、リグノセルロースの利用に向けたリグニンの代謝工学、天野エンザイム講演会、2013/2/13、各務原市

⑥Taichi Koshiba, Norie Hirose, Mai Mukai, Masaomi Yamamura, Masahiro Sakamoto, Shiro Suzuki, Takefumi Hattori, Toshiaki Umezawa, Biosynthetic pathway for syringyl lignin in rice (*Oryza sativa*) The 4th International Conference on Pulping, Papermaking and Biotechnology 2012/11/8, Nanjing, China

⑦Shiro Suzuki, Yuta Tsurumaki, Hisato Ikegaya, Tatsuya Awano, Soichiro Noda, Takefumi Hattori, Taku Demura, Toshiaki Umezawa, Alteration of hemicellulose biosynthesis in poplar by overexpression of engineered MYB transcription factors Lignobiotech II, 2012/10/15, Fukuoka, Japan

⑧Toshiaki Umezawa, Metabolic Engineering of Grass Lignins, Lignobiotech II, 2012/10/15, Fukuoka, Japan

⑨梅澤俊明、バイオマスリファイナリー構築に向けたリグニン代謝工学の展望、日本育種学会第122回講演、2012/9/14、京都市

⑩鈴木史朗、鶴巻勇太、服部武文、Vincent 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)大会 2010/9/3、仙台市

⑪向けたリグニン代謝工学、第62回日本木材学会大会、2012/3/16、札幌市

⑫梅澤俊明、植物バイオマスの総合的利用に向けたリグニン代謝工学、第200回生存圏シンポジウム 第7回バイオ材料プロジェクト「未来の自動車は“植物”で創る」-セルロースナノファイバーを用いた高機能で Green な材料開発-、2012/3/12、京都市

⑬梅澤俊明、再生可能バイオマス資源の生産と利用、第8回京都大学生存圏研究所公開講演会、2011/10/23、宇治市

⑭野田壮一郎、鈴木史朗、山口雅利、西窪伸之、櫻井望、服部武文、鈴木秀幸、出村拓、柴田大輔、梅澤俊明、RING finger タンパク質 ATL54 の機能解析、第29回日本植物細胞分子生物学会大会、2011/9/7、福岡市

⑮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、2011/3/28、京都市

⑯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)、2011/3/20、仙台市

梅澤俊明、バイオマスリファイナリー構築に

⑰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、2011/3/18、京都市

⑱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、2010/10/20、京都市

⑲Toshiaki Umezawa, Metabolic engineering of lignin biosynthesis for biorefinery, Joint Seminar under Japan Korea Basic Scientific Cooperation, 2010/8/24, Gyeongju, Korea

⑳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」、2010/3/11、宇治市

㉑梅澤俊明、細胞壁の代謝工学 -バイオマスリファイナリーの構築に向けて-京大セルロースリサーチグループ懇話会 木質バイオマス成分の新しい魅力、2009/2/3、宇治市

㉒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、2009/3/18、宇治市

㉓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、2009/3/16、松本市

㉔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~、2008/10/24、福岡市

㉕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、菟田セミナー(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-、2008/5/9、神戸市

〔図書〕(計4件)

- ①西谷和彦、梅澤俊明(編著)、植物細胞壁、講談社、2013、359
- ②福島和彦、船田良、杉山淳司、高部圭司、

梅澤俊明、山本浩之（編）、木質の形成第2版、海青社、2011、593

③梅澤俊明、シーエムシー出版、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）、pp.65-73、2010、252

④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）、2009、250

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

鈴木 史朗 (SUZUKI SHIRO)  
京都大学・生存圏研究所・助教  
研究者番号：70437268

服部 武文 (HATTORI TAKEFUMI)  
徳島大学・大学院ソシオアーツアンドサイ  
エンス研究部・准教授  
研究者番号：60212148

### (3) 連携研究者

柴田 大輔 (SHIBATA DAISUKE)  
かずさDNA研究所・部長  
研究者番号：10370925

櫻井 望 (SAKURAI NOZOMU)  
かずさDNA研究所・研究員  
研究者番号：30392286