

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658144

研究課題名(和文)リグノセルロース超分子構造形成におけるリグニン生合成の寄与

研究課題名(英文)Role of lignin in lignocellulose suprastructure formation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：木質(リグノセルロース)の利活用が次世代バイオマスエネルギー利用技術の開発において喫緊の課題となっている。ここで、木質バイオリファイナリー・バイオ燃料生産技術基盤確立の本質的なボトルネックは、リグノセルロースを構成する各成分の存在状態(超分子構造)が未だ十分には解明されていないことに帰結される。そこで、本研究は、さまざまなリグニン含量を持つ大型のイネ科植物やリグニン生合成関連の遺伝子の発現を制御した組換えイネにつき、各種化学分析、遺伝子発現解析、組織観察を行い、このリグノセルロース超分子構造解明のための研究を進めた。

研究成果の概要(英文)：Lignocellulose is the main source of renewable biomass on Earth and is an attractive feedstock. Lignin is a major component of lignocellulosic biomass, and is an obstacle in the enzymatic saccharification of plant cell wall polysaccharides. However, little is known about suprastructures of the lignocellulosic components, which affect largely the utilization of the lignocellulose. In this context, using chemical analysis, gene expression analysis, morphological observation, enzymatic saccharification etc., we have characterized lignins and related compounds of a large grass plant, Erianthus and a number of transgenic rice plants, where expression of lignin biosynthetic genes are regulated. This study provided basic information on cell wall components for future breeding programs of large grass plants and for better utilization of the lignocellulosic biomass resource.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林圏科学・木質科学

キーワード：リグニン 酵素糖化性 超分子構造 セルロース ヘミセルロース 代謝工学 フェルラ酸 安定同位体希釈法

1. 研究開始当初の背景

木質(リグノセルロース)は、地球上に蓄積するバイオマスの9割以上を占めており、食糧と競合せず、カーボンニュートラルなバイオマスであることから、その利活用が次世代バイオマスエネルギー利用技術の開発において喫緊の課題となっている。しかし、リグニン・セルロース・ヘミセルロースの強固な複合体である木質は、維管束植物が重力と乾燥に抵抗しつつ地球上に繁栄する基盤となる構造材料であり、デンプンのような貯蔵物質とは異なりそもそも簡単に分解されるようにはできていない。つまり、木質の成分利用の難しさは木質構成成分の存在状態(超分子構造)の強固さに帰結され、この超分子構造が未だ十分には解明されていないことが、木質バイオリファイナリー・バイオ燃料生産技術基盤確立の本質的なボトルネックとなっていることが、過去10年以上にわたる当該分野の応用研究の結果、明らかにされてきた。そこで、このボトルネックの解消のために、リグノセルロース超分子構造の解明が必須となっている。

2. 研究の目的

リグニンの量と構造は、一つの木部細胞内でも部位によって異なる。すなわち、複合細胞間層(一次壁+細胞間層)、二次壁外層(S1)、中層(S2)、内層(S3)で異なっている。このことは、リグニン生合成に関与する遺伝子の発現制御が各層において異なることを示している。申請者らは、約40種のリグニン合成に関与する酵素および転写因子遺伝子の発現を制御したイネを作出している。本研究では、これらの組換えイネやエリアンサスなど器官によりリグニン含量が大きく異なる大型のイネ科植物のリグノセルロース構造を詳細に解析することにより、リグニン合成に関与する遺伝子が、リグノセルロース超分子構造形成に及ぼす影響を解析する。

3. 研究の方法

リグニン合成関連遺伝子の発現を制御した組換えイネやエリアンサスなどの茎を試料として、細胞壁成分の各種化学分析(酵素糖化性分析、糖化残渣の分析、リグニン分析、細胞壁結合型フェルラ酸分析、多糖分析)と当該遺伝子の発現状況を測定する。以上をもとに、リグノセルロース超分子構造を総合的に解析する。

4. 研究成果

木質バイオリファイナリー・バイオ燃料生産技術基盤確立の本質的なボトルネックは、リグノセルロース超分子構造が未だ十分には解明されていないことに帰結される。本研究は、既に申請者らが独自に作出した、リグニン生合成関連の遺伝子の発現を個々に制御した組換えイネやエリアンサスなどにつき、

各種化学分析、遺伝子発現解析、組織観察をもとに、各遺伝子がリグノセルロース超分子構造形成に果たす役割を解析した。

まず、10種の遺伝子についての分析を行った。すなわち、組換え体から茎(イナワラ)を分離し、一部は凍結・粉碎後、発現遺伝子解析に供した。残りの試料は乾燥後、粉碎・溶媒抽出処理を行い、リグニンおよび糖化残渣の分析などに供した。また、さまざまなリグニン量を持つ大型イネ科植物エリアンサス試料について、リグニン量と酵素糖化性の相関を解析した。

その結果、リグニン量と酵素糖化反応性には必ずしも相関がなく、リグノセルロース超分子構造構築におけるケイ皮酸類特にフェルラ酸二量体の効果が大きい可能性が示唆された。そこで、フェルラ酸二量体構造の精緻な解析に注力するため、まず一連のフェルラ酸二量体について、非標識標品の化学合成を進めた。フェルラ酸の二量体構造は、基本的にリグニン二量体構造(サブストラクチャー)と類似しているが、末端カルボキシ基の存在などにより、多くのバリエーションを有している。これらのバリエーションには、不安定で相互変換するものがあるが、本研究では不安定型を誘導体化し捕捉することに成功した。次いで、高速液体クロマトグラフ質量分析装置を用いた安定同位体希釈法による精緻な定量を行うため、各フェルラ酸二量体の重水素標識体の合成を行った。これらの重水素標識および非標識標品を用い、各種フェルラ酸二量体残基を定量したところ、いずれも微量若しくは検出限界以下であった。以上の結果に基づけば、フェルラ酸二量体残基以外にも、酵素糖化性に大きく影響を及ぼす要因の存在も否定できないことから、現在これらの要因の同定を進めている。

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 4件)

T. Koshiba, S. Murakami, T. Hattori, M. Mukai, A. Takahashi, A. Miyao, H. Hirochika, S. Suzuki, M. Sakamoto, T. Umezawa, *CAD2* deficiency causes both brown midrib and gold hull and internode phenotypes in *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare, *Plant Biotechnology*, 査読有, 30, 365-373 (2013)

DOI:

10.5511/plantbiotechnology.13.0527a

T. Koshiba, N. Hirose, M. Mukai, M. Yamamura, T. Hattori, S. Suzuki, M. Sakamoto, T. Umezawa, Characterization of 5-Hydroxyconiferaldehyde *O*-Methyltransferase in *Oryza sativa*, *Plant Biotechnology*, 査読有, 30, 157-167 (2013)

DOI:

10.5511/plantbiotechnology.13.0219a

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

M. Yamamura, T. Hattori, S. Suzuki, D. Shibata, T. Umezawa, Microscale thioacidolysis method for the rapid analysis of β -O-4 substructures in lignin, Plant Biotechnology, 査読有, 29, 2012, 419-423

DOI:

10.5511/plantbiotechnology.12.0627a

[学会発表](計 23件)

安井あゆみ、山村正臣、高部圭司、鈴木史朗、梅澤俊明、イネ科植物細胞壁成分フェルラ酸二量体の測定のための基盤構築、第64回日本木材学会大会、松山、2014/3/14
小柴太一、村上真也、向井まい、服部武文、宮尾安藝雄、廣近洋彦、鈴木史朗、坂本正弘、梅澤俊明、イネ *brown-midrib* 変異体の解析、第58回リグニン討論会、サンポートホール高松、高松、2013/11/12
梅澤俊明、植物バイオマスの高度利用に向けたリグニン代謝工学の展望、第28回植物バイオテクシンポジウム、2013/7/18
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、盛岡、2013/3/27
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、仙台、2013/3/25
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、京都、2013/3/13
梅澤俊明、矢崎一史、杉山暁史、鈴木史朗、山村正臣、柴田大輔、三位正洋、我有満、上床修弘、熱帯バイオマス植物の持続的生産と利用の応用展開、第248回生存圏シンポジウム ミッションシンポジウム、京都、2013/3/10
梅澤俊明、山村正臣、エリアンサスのリグノセルロースの構造と酵素糖化性、熱帯地域におけるイネ科バイオマス植物の持続的生産と利用に向けて、第3回熱帯人工林生存圏フラッグシップシンポジウム(第213回生存圏シンポジウム)サテライトセミナー、2013/3/4
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、天野エンザイム(株) 岐阜研究所、各務原、2013/2/13

T. Koshiba, N. Hirose, M. Mukai, M. Yamamura, M. Sakamoto, S. Suzuki, T. Hattori, T. Umezawa, Biosynthetic pathway for syringyl lignin in rice (*Oryza sativa*), The 4th International Conference on Pulping, Papermaking and Biotechnology, Nanjing, China, 2012/11/8

T. Umezawa, Metabolic Engineering of Grass Lignins, Lignobiotech II, Fukuoka, Japan, 2012/10/15

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回講演会、京都、2012/9/14

T. Koshiba, N. Hirose, M. Mukai, M. Yamamura, M. Sakamoto, S. Suzuki, T. Hattori, T. Umezawa, LIGNIN BIOSYNTHESIS IN RICE (*ORYZA SATIVA*), 51st Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America, London, Canada, 2012/8/12

山村正臣、服部武文、鈴木史朗、柴田大輔、梅澤俊明、チオアシドリシス法のハイスループットマイクロスケール化、第30回日本植物細胞分子生物学会大会、生駒、2012/8/4

山村正臣、大竹雄一郎、野田壮一郎、服部武文、高部圭司、鈴木史朗、櫻井望、鈴木秀幸、池正和、徳安健、菊地淳、柴田大輔、梅澤俊明、エリアンサスのリグニン及び関連物質の量と酵素糖化率の節間変動解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、京都、2012/3/23

小柴太一、廣瀬孝江、向井まい、山村正臣、服部武文、鈴木史朗、坂本正弘、梅澤俊明、イネのリグニン生合成経路の解明、日本農芸化学会 2012 年度大会、京都、2012/3/23
小柴太一、村上真也、向井まい、服部武文、宮尾安藝雄、廣近洋彦、鈴木史朗、坂本正弘、梅澤俊明、イネの *brown-midrib* mutant の解析、第53回日本植物生理学会年会、2012/3/17

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、第62回日本木材学会大会、札幌、2012/3/16

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、京都、2012/3/12

M. Yamamura, Y. Otake, S. Noda, T. Hattori, K. Takabe, S. Suzuki, N. Sakurai, H. Suzuki, M. Ike, K. Tokuyasu, J. Kikuchi, D. Shibata, T. Umezawa, Characterization of lignin and related compounds of *Erianthus ravennae*, 50th Anniversary Symposium Meeting of Phytochemical Society of North America,

Hilo, Hawaii, USA, 2011/12/15

21 T. Koshiba, N. Hirose, M. Mukai, M. Yamamura, M. Sakamoto, S. Suzuki, T. Hattori, T. Umezawa, Syringyl Lignin Biosynthesis in Rice (*Oryza sativa*), 3rd International Symposium of Indonesian Wood Research Society, Yogyakarta, Indonesia, 2011/11/4

22 小柴太一、廣瀬孝江、向井まい、山村正臣、坂本正弘、鈴木史朗、服部武文、梅澤俊明、イネにおけるシリングルリグニン生合成経路の解明、第56回リグニン討論会、鶴岡、2011/9/16

23 山村正臣、大竹雄一郎、野田壮一郎、服部武文、高部圭司、鈴木史朗、櫻井望、鈴木秀幸、池正和、徳安健、菊地淳、柴田大輔、梅澤俊明、*Erianthus ravennae* のリグニン及び関連物質の基本的性状と酵素糖化性、第29回日本植物細胞分子生物学会大会、福岡、2011/9/7

〔図書〕(計 9 件)

西谷和彦、梅澤俊明 (編) 植物細胞壁、講談社、2013、359 ページ

梅澤俊明、モノリグノール (植物細胞壁、西谷和彦、梅澤俊明 編) 講談社、2013、pp. 72-77

梅澤俊明、リグニン (植物細胞壁、西谷和彦、梅澤俊明 編) 講談社、2013、pp. 77-83

梅澤俊明、木化と木質化 (植物細胞壁、西谷和彦、梅澤俊明 編) 講談社、2013、p. 163

梅澤俊明、リグニンの定量 (植物細胞壁、西谷和彦、梅澤俊明 編) 講談社、2013、pp. 309-311

梅澤俊明、リグニンの化学構造解析 (植物細胞壁、西谷和彦、梅澤俊明 編) 講談社、2013、pp. 311-313

梅澤俊明、リグニン合成酵素活性測定 (植物細胞壁、西谷和彦、梅澤俊明 編) 講談社、2013、pp. 322-325

梅澤俊明、リグニンの代謝制御による木質バイオマスの改良 (リグニン利用の最新動向、坂志朗編) CMC 出版、2013、pp. 48-55

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 ページ

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：糖類の製造方法

発明者：梅澤俊明、坂本正弘、服部武文、

鈴木史朗、村上真也、小柴太一

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：特願 2012-019086 号

出願年月日：24 年 年 1 月 31 日

国内外の別：国内

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

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

鈴木 史朗 (SUZUKI SHIRO)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：70437268

坂本 正弘 (SAKAMOTO MASAHIRO)

京都大学・大学院農学研究科・講師

研究者番号：40303870

(3) 連携研究者

なし