

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月18日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18631

研究課題名(和文) イネ科植物細胞壁におけるフェルラ酸-アラビノキシランエステルの役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of feruloylated arabinoxylan in gramineous cell wall

研究代表者

伊澤 かな (佐藤かな) (IZAWA, Kanna)

東京農業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：40456603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科植物の強度と難分解性には、イネ科植物特有の細胞壁成分であるフェルラ酸-アラビノキシランエステル(FA-AX)が寄与するとされている。本研究では、ソルガム節間におけるフェルラ酸エステルの蓄積とその合成に関与する遺伝子の同定を行うことを目的とした。初めに、ソルガムでの遺伝子機能解析を可能にするための遺伝子導入条件を検討し、未熟胚の前処理により組換え体の作成が可能となることを見出した。また、フェルラ酸エステルは細胞伸長停止後の二次細胞壁形成初期に多く蓄積することが示唆され、ソルガムの11の候補遺伝子のうち少なくとも6遺伝子がソルガム節間のFA-AX蓄積時期に発現していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ソルガムは世界的な食糧としてだけでなく、高いバイオマス生産量にも注目が集まっている。本研究で検討した条件より国内ではほとんど例のなかったソルガムへの遺伝子導入が可能となった。また、今回絞り込みを行ったFA-AX合成に関与する候補遺伝子の今後の機能解明と開発した遺伝子導入技術により、バイオマスや家畜飼料の効率的な利用に向けた細胞壁の糖化効率の改善が期待できる。本研究は今後需要が高まることが見込まれるバイオマス利用に向けたソルガムの改善に大きく貢献するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Feruloylated arabinoxylan (FA-AX) has been known to contribute to the mechanical strength and indigestibility of the above-ground organs of the Gramineae. In this study, we analyzed accumulation of ferulic acid ester and tried to identify the genes which is responsible for the synthesis of FA-AX in the sorghum internodes. Firstly, in order to establish the method for genetic analysis, we examined conditions to generate transgenic sorghum plants. We revealed that several pretreatments of immature embryos of sorghum are effective to generate transgenic sorghum. Next, we analyzed accumulation of ferulic acid ester in cell walls of internodes. Our results suggest that ferulic acid ester is accumulated during early stage of secondary cell wall formation after ceasing cell elongation. Furthermore, we found at least six out of eleven candidate genes for FA-AX synthesis were expressed in the growing internodes.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ソルガム 遺伝子導入 フェルラ酸エステル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界の人口は、1年でおおよそ7千万人の割合で増加の一途をたどっており、2050年までには90億人を超えると予測されている。それに伴って食糧やエネルギーの需要も増加しているが、利用可能な耕作地や化石資源には限りがある。従って、安定した食糧供給とエネルギー源供給が今後の重要な課題の1つとなっている。

ソルガムは、食糧やエネルギー資源として注目されているイネ科資源植物である。生産面積は世界第5位の主要穀物であり、穀物としての利用だけでなく、搾汁液に含まれる糖や家畜飼料としても利用されている。ソルガムは、温帯から熱帯地域で栽培可能なこと、半乾燥地や低栄養条件でも栽培可能なことから、準耕作地を利用した生産拡大が見込まれる。また、光合成速度の高いC4植物で、短期間で多くのバイオマスを生産することから、エネルギーや物質資源としての貢献が大きく期待されている。さらに、ソルガムのゲノム配列が2008年に解読され、バイオマス資源の生産性向上やエネルギー物質への変換効率向上に向けた分子育種にも期待が寄せられている。

一般的に、植物細胞壁は植物に物理的強度を付与し、また、植物乾物生産の大部分を占めることから、植物資源の生産性や物質変換効率を改良する上で重要な標的となる。植物細胞壁は、主に多糖類であるセルロース、ヘミセルロースと芳香族化合物が重合したリグニンが複雑な立体構造を形成したものである。多糖類であるセルロースやヘミセルロースから糖資源を効率的に得るための研究がすでに進められている。細胞壁成分の糖化阻害要因であるリグニンの合成を抑制した植物がシロイヌナズナやイネなどで作成され、その解析が行われた。これらの植物では、糖化効率の向上は見られるものの、植物強度の低下を同時に引き起こすため、植物資源の生産性と糖化効率の間でどのように折り合うか課題が残されている。

### 2. 研究の目的

イネ科植物の細胞壁には、フェルラ酸とヘミセルロース成分の一つであるアラビノキシランがエステル結合した成分(FA-AX)が特徴的に含まれている。このフェルラ酸は、アラビノキシランやリグニンと結合して細胞壁ポリマー同士の架橋を行っている。この構造が植物の強度維持や家畜飼料の消化性を低下させると考えられているが、FA-AXが細胞壁の特性に具体的にどのように作用しているかは不明である。その理由として、FA-AXの含有量が1%未満と少ないこと、蓄積に関わる遺伝子の知見に乏しいことが挙げられる。細胞壁成分間の架橋を行うFA-AXの蓄積を制御することができれば、主要な細胞壁成分の含有量を変化させることなく細胞壁の性質を調節することが可能になるかもしれない。

ソルガムのバイオマス生産量はイネと比較して非常に大きいため、植物体を支持する細胞壁の強度や性質が植物資源の生産性を大きく左右する。ソルガムではFA-AXの蓄積量や分布が未解析のままであり、細胞壁の性質との関連も明らかでない。その理由の1つに、ソルガムは形質転換が難しく、遺伝子機能の検証まで至らないことが挙げられる。申請者はこれまでにソルガムの遺伝子組換え系の開発に取り組んでおり、効率や安定性は低いものの組換え体を数個体獲得することに成功した。そこで本研究では、ソルガムの遺伝子導入系の改善を行うと共に、ソルガムにおけるFA-AXの蓄積パターンを明らかにすることとした。また、FA-AXの蓄積パターンとFA-AXの合成に関わると考えられている候補遺伝子の発現パターンの比較を行い、FA-AX合成に関与していると考えられる遺伝子について、遺伝子発現を変化させた組換え体の作成および解析を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1)ソルガムへの遺伝子導入条件の検討

これまでに、感染前のソルガム未熟胚に遠心処理10分、および、熱処理15分を施すことで遺伝子組換え個体を獲得することに成功した。遺伝子導入効率を安定かつ向上させるための条件を検討するため、本研究では感染前の熱処理時間、4℃処理、界面活性剤処理などの検討を行った。遺伝子導入およびソルガムの組織培養に使用した培地はWu et al. (2014)に記載されている培地を基本とした。

#### (2)ソルガム節間におけるケイヒ酸エステルの蓄積パターンの解析

ソルガムの器官で最も植物資源を蓄積する節間について、生育段階ごとのケイヒ酸エステルの蓄積パターンの分析を行った。穂ばらみ期のソルガムの最上位節間について、基部側の節直上部から3cmずつ15cmまでカットした組織片を分析に用いた(図1)。

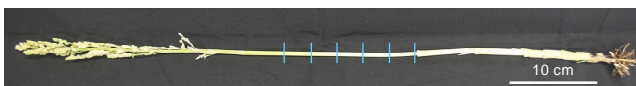


図1. 解析に用いたソルガム節間の成長段階別サンプリング

水色線はサンプリングの際に3cmずつ切断した部分。伸長中の節間では基部よりほど若い組織となる。

液体窒素で粉末にした植物をエタノール、アセトン、メタノールなどで抽出した後、アミラーゼ処理を施した残渣画分を乾燥させて細胞壁画分(AIR)とした。細胞壁画分10~20mgを1M水酸化ナトリウムでアルカリ加水分解を行い、ガスクロマトグラフィーを用いて遊離したパラ-

クマル酸(p-CA)およびフェルラ酸(FA)の定量を行った。また、蓄積部位の観察を行うために各生育段階の節間の組織切片を作成し、FA が結合したポリマーを認識する LM12 抗体 (PlantProbes 社製)を用いて免疫組織染色を行った。

### (3)FA-AX 合成に関与する候補遺伝子の発現解析

イネにおいて FA-AX 合成に関与する遺伝子として、AFT (arabinoxylanferuloyl transferases)遺伝子群が報告されている (Piston et al. 2010)。この遺伝子と相同性の高いソルガムの遺伝子群を同定し、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析を行った。

### (4)発現が認められた候補遺伝子の RNAi コンストラクト作成とソルガムへの導入

発現が認められた遺伝子について、約 300bp の領域を増幅した後 pANDA ベクターに断片を導入した RNAi 用のベクターを構築した。得られたベクターはアグロバクテリウム法により、(1)で検討した条件でソルガムへの遺伝子導入を試みた。

## 4. 研究成果

### (1)ソルガムへの遺伝子導入条件の検討

感染前の未熟胚に遠心処理、43 熱処理、4 処理、界面活性剤(SILWET L-77)処理を行い、ソルガムへの遺伝子導入効率を比較した。遠心処理に加えて 43 熱処理を 15~21 分間、および、4 処理を一晩施すことで組換え体を獲得することができた。最も効率が高かったのは 43 21 分と 4 処理を行った処理区であったが、4 処理無の 43 15 分処理区と有意な差は認められなかった。また、これらの前処理によって組換え体は得られたものの、組換え体が得られない反復も散見される。引き続き、安定して組換え体を得られる条件を検証していく予定である。

### (2)ソルガム成長段階別節間のケヒ酸エステルの蓄積

初めに組織観察による伸長中節間の生育段階を判別し、おおむね次のように分類した。

0-3cm : 細胞分裂-伸長領域

3-6cm : 伸長-二次細胞壁形成初期

6-15 cm : 二次細胞壁形成

次にアルカリ加水分解により、細胞壁にエステル結合しているケヒ酸(p-CA、FA)の含有量を分析した。p-CA については、二次細胞壁形成の間にその割合が増加するのに対して、FA は若い組織から 2 次壁形成初期にかけて増加が認められた。また、LM12 抗体を用いた免疫組織染色より、フェルラ酸結合した細胞壁ポリマーは、0-3 cm の若い組織では二次壁形成が始まっている維管束木部に蓄積が認められ、3 cm 以上の領域では生育が進むにつれて維管束組織や表層、柔組織へと蓄積が広がっていた。このことから、細胞壁フェルラ酸は分裂・伸長中の一次細胞壁よりも伸長停止後の二次細胞壁形成初期の組織で蓄積が増加することが示唆された。

### (3)FA-AX 合成に関与する候補遺伝子の発現解析

イネにおいて FA-AX 合成に関与することが報告されている AFT 遺伝子と相同性の高い遺伝子をソルガムゲノム配列から検索し、11 遺伝子を候補遺伝子とした (SbAFT1~11)。系統樹を作成したところ、これら 11 遺伝子はイネでの報告と同様に 5 つのグループに分類された。これらの遺伝子発現を節間の各生育段階別にリアルタイム PCR により解析した。11 遺伝子のうち 2 遺伝子については機能するプライマーが設計できておらず引き続き解析を行っている。その他 9 遺伝子のうち、3 遺伝子については発現がごくわずかもしくは検出できなかったため、FA-AX 合成に関与している可能性は非常に低いことが考えられた。残り 6 遺伝子については生育段階ごとの発現パターンは異なるものの、節間の各生育段階で発現が認められた。

表 1. 前処理別の形質転換効率

Hyg 耐性ライン数/感染した未熟胚数 (%)									
前処理									
反復	4°C			+			+		
	-	-	-	-	-	-	+	+	+
遠心	-	-	-	+	+	+	+	+	+
熱 (43)	0 min	15 min	21 min	0 min	15 min	21 min	0 min	15 min	21 min
1	0/38 (0.0)	0/56 (0.0)	0/20 (0.0)	0/61 (0.0)	1/32 (3.1)	0/51 (0.0)	1/72 (1.4)	0/33 (0.0)	3/68 (4.4)
2	0/50 (0.0)	0/50 (0.0)	0/34 (0.0)	0/21 (0.0)	0/64 (0.0)	0/53 (0.0)	0/37 (0.0)	3/48 (6.3)	0/48 (0.0)
3	0/65 (0.0)	0/35 (0.0)	0/62 (0.0)	0/28 (0.0)	1/56 (1.8)	1/20 (5.0)	0/48 (0.0)	0/38 (0.0)	0/44 (0.0)
4	0/45 (0.0)			0/9 (0.0)	0/87 (0.0)	0/32 (0.0)	0/41 (0.0)	0/40 (0.0)	0/50 (0.0)
5				0/49 (0.0)	1/50 (2.0)		0/40 (0.0)	0/35 (0.0)	2/40 (5.0)
6				0/107 (0.0)					
7				0/50 (0.0)					

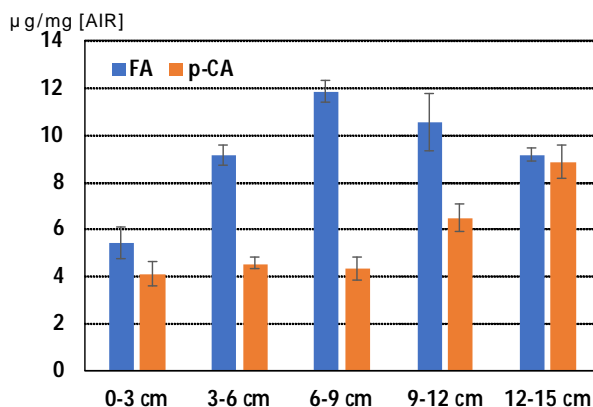


図 2. 成長段階別のケヒ酸エステル含有量

#### (4) 候補遺伝子の RNAi コンストラクト作成とソルガムへの遺伝子導入

上記(3)で発現が認められた6つの候補遺伝子は5グループのうち4グループに属していた。そこで、同じグループに属する遺伝子の中で相同性が高い領域を選び、4種類の RNAi コンストラクトを作成した。上記(1)で検討した条件でソルガムへの遺伝子導入を行ったが、形質転換効率が低く、現在までに2系統の組換え体しか得られていない。1系統については節間の生育段階別のサンプルが採取できたため、(2)と同様にケイヒ酸エステル含量の分析を行った。しかし本系統ではフェルラ酸含有量に有意な差は認められず、本遺伝子は FA-AX 合成に関与しない可能性が示唆された。引き続き各コンストラクトについて形質転換を行っており、それぞれ最低3系統の組換え体を確保してケイヒ酸エステルの含有量解析を進める予定である。

#### < 引用文献 >

Wu E, Lenderts B, Glassman K, Berezowska-Kaniewska M, Christensen H, Asmus T, Zhen S, Chu U, Cho M-J, Zhao Z-Y Optimized Agrobacterium-mediated sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic sorghum plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 50, 2014, 9-18

Piston F, Uauy C, Fu L, Langston J, Labavitch J, Dubcovsky J Down-regulation of four putative arabinoxylan feruloyl transferase genes from family PF02458 reduces ester-linked ferulate content in rice cell walls. *Planta*, 231, 2010, 677-691

#### 5 . 主な発表論文等

##### [ 雑誌論文 ] (計 1 件)

Kanna Sato-Izawa, Kyoko Tokue, Hiroshi Ezura, Development of a stable *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for *Sorghum bicolor* Tx430. *Plant Biotechnology*, 査読有, 35, 2018, 181-185

##### [ 学会発表 ] (計 2 件)

伊澤かな、徳江京子、坂本真吾、中田未友希、光田展隆、江面浩、バイオマス利用に向けたソルガム形質転換技術の開発、日本育種学会第 135 回講演会、2019

伊澤(佐藤)かな、徳江京子、有泉亨、江面浩、ソルガムにおける組換え育種基盤の構築、日本育種学会第 131 回講演会、2017

#### 6 . 研究組織

(1) 研究分担者  
なし

(2) 研究協力者  
研究協力者氏名：徳江 京子  
ローマ字氏名：(TOKUE, Kyoko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。