

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658003

研究課題名(和文) イネの高糖化性遺伝子の同定と利用

研究課題名(英文) Identification of a gene associated with high saccharification efficiency of rice straw

研究代表者

伊藤 幸博 (Ito, Yukihiro)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70280576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では稲わらの効率的なバイオ燃料生産を最終目的とし、稲わらの糖化性(分解されやすさ)を決めている遺伝子の探索を行った。まず、様々なイネ品種の稲わらの糖化性を調べたところ、品種間差があることがわかった。また、同じ品種でも器官により糖化性が異なり、茎は糖化性が高く、葉は低いことを見出した。栽培条件によっても差が見られ、窒素不足になると糖化性が低下することがわかった。さらに、糖化性を決めている遺伝子の大きな染色体上の位置を調べた。

研究成果の概要(英文)：In this study we searched a gene associated with high saccharification efficiency of rice straw to generate rice plant suitable for biofuel production. It was shown that saccharification efficiency was different among rice cultivars as well as among organs. Fertilizer condition also affected the efficiency. Rough mapping of a gene associated with high saccharification efficiency was carried out.

研究分野：植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：バイオマス 糖化性 イネ

## 1. 研究開始当初の背景

産業革命以来の人類の活動により、地球温暖化に代表される世界レベルの環境破壊が進み、今日では人類の存続さえも危惧される状況となってきている。この問題の解決策として、再生可能エネルギー、特にバイオエタノールの利用が期待されている。また、バイオエタノールの生産によりエネルギーの海外依存を低下させることができると同時に、その原料となる農産物の栽培を通じて、農業の活性化を促すことにもなる。一方、海外ではトウモロコシのデンプンやサトウキビの糖といった食糧にもなる農産物からのバイオエタノールの生産が実用化されているが、食糧価格の高騰や新たな耕地開発等の新たな問題も引き起こしている。

このような状況から、食糧や農地との競合を引き起こさないバイオエタノールの原料を供給することが急務と考えられており、廃材や農業残渣等のリグノセルロースが有力な候補と考えられている。しかし、エネルギー収支や生産コストの問題から、実用化には至っていない。また、日本農業の活性化のためには日本に適した高付加価値の原料農作物の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では環境破壊、原油枯渇問題の克服を目指し、食糧との競合のないセルロース由来のバイオエタノール生産を念頭に置き、その原料に適したイネの開発研究を行う。セルロース系バイオエタノールは、原料となる植物細胞壁を糖に分解し、その糖を発酵することにより生産する。しかし、植物細胞壁は物理的、化学的に極めて安定であるため、その糖化に多大なエネルギーとコストがかかり、セルロース系バイオエタノール生産の最大の問題となっている。本研究では、原料植物の改良という観点からこの問題の解決に取り組む。

これまでの研究から、稲わらの糖化性に品種間差異があることが考えられた。そこでその差をもたらす遺伝子、すなわち稲わらの糖化性を決めている遺伝子 (QTL) を同定し、糖化性を決定する仕組みを明らかにすると同時に、同定した高糖化性遺伝子を集積したイネを作成し、収穫後に稲わらのセルロースを容易に糖に分解できるイネの開発を目指す。農耕開始以来の食糧増産において作物の品種改良が果たした役割を考えると、農業残渣というバイオマスからのエネルギー生産においても原料作物の品種改良は大きな役割を果たすと考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) イネの栽培

イネは全てガラス室、温室あるいは人工気

象器内で栽培した。同一の実験に用いるイネは、同じガラス室、温室あるいは人工気象器で1カ所にまとめて同時期に栽培し、環境の違いによる影響を極力低減した。特にカビ等の繁殖の程度の差が糖化性の違いをもたらす可能性が懸念されるが、上記のように密接した状態で栽培し、且つ、病徴の見られないイネだけを用いることにより、そのような可能性をできるだけ排除した。

### (2) 糖化性の測定

糖化性の測定は以下のように行った。稲わら全体あるいは器官ごとに分けたサンプルを高温乾燥後、粉碎し、篩にかけた。この粉碎稲わらに市販のセルラーゼを反応させ、反応液中の還元糖濃度を測定することにより、糖化性を測定した (図1)。

1. 稲わらを高温 (105°C) 乾燥させ、粉砕機で微粉砕した。



2. 得られた稲わら粉末 (<math>\phi 77 \mu\text{m}</math>) をマイクロチューブに入れ、市販の糖化酵素を含む反応液で処理した。



3. 酵素処理48時間後の反応液中の還元糖濃度を測定した。

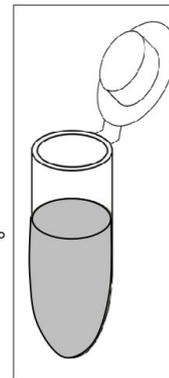


図1、稲わらの糖化性試験の方法

### (3) 高糖化性品種および高糖化性染色体断片置換系統の選抜

様々な品種の稲わらの糖化性を調べ、糖化性が高い品種から低い品種まで選び出した。これらの中から比較的糖化性に大きな差が見られ、且つ染色体断片置換系統が存在する品種の組合せを選抜した。その染色体断片置換系統の糖化性を調べ、高糖化性を示す系統を選抜した。

### (4) 高糖化性遺伝子マッピング用集団の作成

選抜した系統と親系統 (日本晴あるいはコシヒカリ) を交配し、F1を得た。さらに F1 の自家受粉により F2 を得た。この F2 を播種し、実生の段階でカサラス染色体に置換された領域の遺伝子型を決定した。この領域で組換えが起こっている株をマッピング用として保持することにした。

## 4. 研究成果

### (1) 高糖化性品種の選抜

当研究室で保持されていたイネ品種 (10 品種) の稲わらの糖化性を調べたところ、糖化性の高いものから低いものまで、様々なもの

が見られた(図2)。このことから稲わらの糖化性は遺伝的に決まっていることが考えられた。調べた品種のうち、日本晴とカサラスおよびコシヒカリとカサラスでは染色体断片置換系統が作成され、入手可能であった。染色体断片置換系統を用いれば、両品種の糖化性の差をもたらす遺伝子の染色体上の大まかな座乗位置を迅速に決定することができる。そこで、染色体断片置換系統を用いて、これらの品種間の糖化性の差をもたらしている遺伝子の同定を目指すことにした。

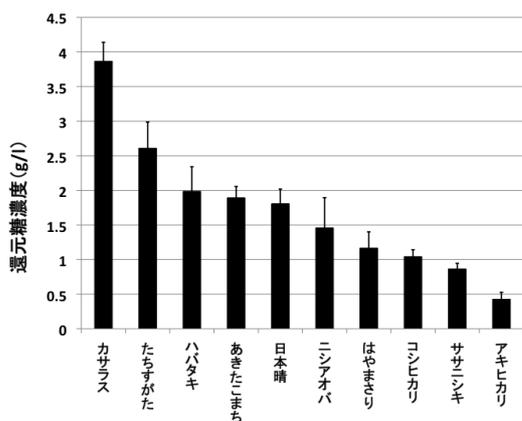


図2、稲わらの糖化性の品種間差

### (2)高糖化性染色体断片置換系統の選抜

日本晴/カサラス染色体断片置換系統(54系統)およびコシヒカリ/カサラス染色体断片置換系統(39系統)の稲わらの糖化性を調べたところ、糖化性は系統により大きく異なり、カサラスと同程度の高い糖化性を示す系統から日本晴あるいはコシヒカリよりも低い糖化性を示す系統が見られた。稲わらの糖化性が遺伝的に決まっている場合、量的遺伝子座に制御されていることが予想されるが、この結果はその予想と一致するものであった。日本晴あるいはコシヒカリよりも高い糖化性を示した系統では、その系統が持つカサラス由来の染色体領域に糖化性を決めている遺伝子が存在し、カサラス由来のアレルが相対的に糖化性を高める働きがあると考えられた。逆に、日本晴あるいはコシヒカリよりも低い糖化性を示した系統では、カサラス由来の領域に存在する遺伝子の日本晴のアレルあるいはコシヒカリのアレルが相対的に糖化性を高める働きを有すると考えられた。また、多くの系統で糖化性が日本晴あるいはコシヒカリと異なり、その度合いも大きく異なることから、稲わらの糖化性は寄与率の異なる多くの遺伝子によって制御されていると推測された。

### (3)イネの各器官の糖化性

イネの各器官の糖化性の違いを調べた。葉身、葉鞘および茎の糖化性を調べたところ、茎の糖化性が高く、葉身および葉鞘の糖化性

は低いことがわかった。還元糖の元となる細胞壁成分の組成に糖化性の差ほどの差があるとは考えにくいので、この糖化性の差は細胞壁の構造の違いやあるいは糖化酵素を阻害(あるいは活性化)する物質の差ではないかと推測された。さらに、器官により糖化性に差が見られることから、イネ品種間における糖化性の差には稲わらを構成する各器官の割合の違いが原因の1つとなっている可能性が推測された。

### (4)イネの発育ステージによる糖化性の変化

イネの発育ステージの違いによる糖化性の違いを調べた。葉身および葉鞘の生育期(発芽後30日および60日)、出穂期、収穫期(出穂40日後)の糖化性を調べたところ、カサラスでは徐々に糖化性が低下していくのに対し、日本晴では出穂期から収穫期にかけて糖化性が大きく低下することがわかった(図3、図4)。従って、稲わらの糖化性は出穂後に低下していくが、その低下の度合いに品種間差があり、それが糖化性の差をもたらしていることが考えられた。

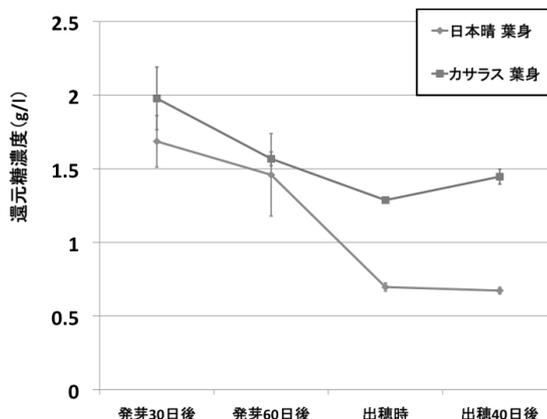


図3、葉身の各発育ステージにおける糖化性

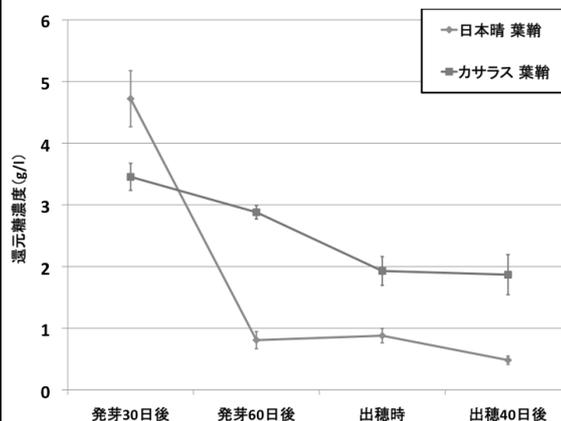


図4、葉鞘の各発育ステージにおける糖化性

また、選抜した染色体断片置換系統の出穂時と収穫期（出穂 40 日後）の稲わらの糖化性を調べたところ、出穂時には両者に差は見られなかったが、出穂後は日本晴では糖化性が低下し、カサラスでは逆にやや向上し、両者に差が見られた（図 5）。この染色体断片置換系統が持つ高糖化性遺伝子は、出穂後の稲わらの糖化性を高く維持する機能を持つと考えられた。

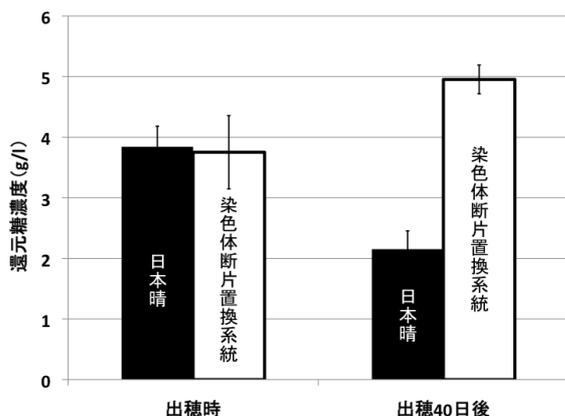


図 5、日本晴と選抜した染色体断片置換系統の稲わらの糖化性

#### (5) 施肥と稲わらの糖化性

通常、品種間の生育環境を一定にするため施肥量を揃えてイネを栽培しているが、カサラスと日本晴を比べるとカサラスの方が植物体が大きいため、同量の肥料では肥料不足が原因と思われる葉色の黄化が見られることがあった。また、日本晴とカサラスの稲わらの糖化性を比較している過程で、両者に差が見られない場合もあった。これらのことから、肥料不足になると稲わらの糖化性が低下し、そのため両品種間の糖化性の差が見られなくなる時があるのではないかと考えた。そこで、窒素、リン、カリの施肥なしで育てた場合の日本晴の葉身の糖化性を調べた。

リンあるいはカリの施肥なしで栽培した場合は糖化性の低下は見られなかった（図 6）。一方、窒素の施肥なしで栽培した場合は、植物体の矮小化や葉色の黄化に加え、糖化性の低下も見られた（図 6）。

以上の結果から、稲わらの糖化性は窒素の施肥により影響を受け、肥料不足になると糖化性が低下すると考えられた。このことは稲わらの糖化性が遺伝的要因だけでなく、環境にも大きく影響を受けることを意味しており、糖化試験用のイネに栽培には、各品種に応じた適切な施肥管理が重要であることを示している。

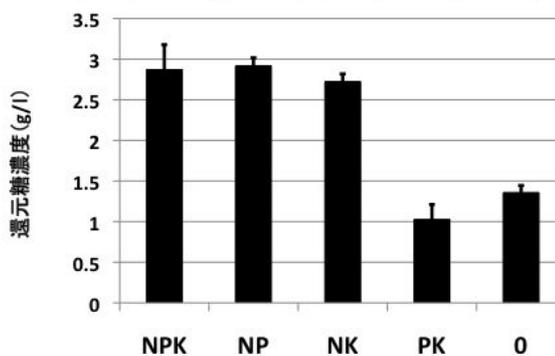
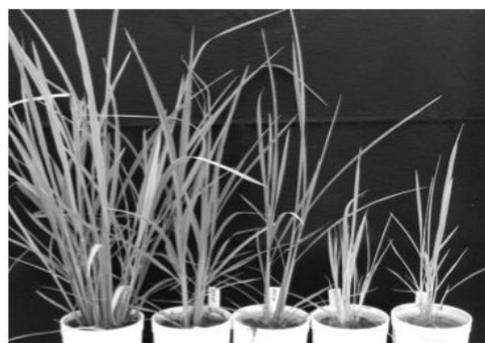


図 6、施肥と日本晴の葉身の糖化性  
上の写真は糖化試験に用いたイネで、下のグラフと同じ順番に並べてある。下のグラフは糖化性試験の結果を示す。

NPK：窒素、リン、カリを施肥

NP：窒素、リンを施肥

NK：窒素、カリを施肥

PK：リン、カリを施肥

0：無施肥

#### 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）

伊藤幸博、園木和典、イネにおけるバイオテクノロジー、日本エネルギー学会誌、査読無、2014 年、印刷中

Furukawa K, Ichikawa S, Nigorikawa M, Sonoki T, Ito Y, Enhanced production of reducing sugars from transgenic rice expressing exo-glucanase under the control of a senescence-inducible promoter, Transgenic Res、査読有、2014 年、印刷中

DOI:10.1007/s11248-014-9786-z

Furukawa T, Sawaguchi C, Watanabe A, Takahashi M, Nigorikawa M, Furukawa K, Imura Y, Kajita S, Oguchi T, Ito Y, Sonoki T, Application of fungal laccase fused with cellulose-binding domain to develop low-lignin rice plants, JBiosci Bioeng、査読有、116 巻、2013 年 616-619

DOI:10.1016/j.jbiosc.2013.05.007

Nigorikawa M, Watanabe A, Furukawa, Sonoki T, Ito Y, Enhanced saccharification of rice straw by overexpression of rice

exo-glucanase、Rice、査読有、5巻、2012年、14  
DOI:10.1186/1939-8433-5-14

東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：70280576

〔学会発表〕(計19件)

Abe T、Takahashi Y、Sonoki T、Ito Y、  
Changes of saccharification  
efficiencies during plant growth in rice、  
第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3  
日-6日、神戸市

Furukawa K、Nigorikawa M、Sonoki T、Ito Y、  
Enhanced saccharification of rice  
straw by constitutive or  
senescence-inducible expression of rice  
exo-glucanase、7th International Rice  
Genetics Symposium、2013年11月5日-8日、  
フィリピン・マニラ

阿部友美、高橋裕貴、園木和典、伊藤幸博、  
稲わらの生育段階による酵素糖化性の变化、  
第8回東北育種研究集会、2013年11月2日、  
弘前市

高橋裕貴、阿部友美、園木和典、伊藤幸博、  
稲わらの糖化性の品種間差異、日本育種学  
会第124回講演会、2013年10月12日-13日、  
鹿児島市

Ito Y、Sonoki T、Enhanced  
saccharification of rice straw by  
overexpression of rice exo-glucanase、  
15th International Biotechnology  
Symposium、2012年9月16日-21日、韓国・大  
邱

〔図書〕(計1件)

伊藤幸博、東北大学出版会、「農学生命科  
学を学ぶための入門生物学」、2011、  
119-122ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：植物に含まれるリグニン量を低減する  
方法

発明者：園木和典、飯村洋介、梶田真也、伊  
藤幸博、小口太一

権利者：国立大学法人弘前大学、独立行政法  
人産業技術総合研究所、国立大学法人東京農  
工大学

種類：特許

番号：特願 2012-045173

出願年月日：2012年3月1日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.rpip.tohoku.ac.jp/seeds/prof  
ile/50/](http://www.rpip.tohoku.ac.jp/seeds/profile/50/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 幸博 (ITO, YUKIHIRO)