

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660140

研究課題名(和文) リグニン重合酵素のマルチノックアウトによる低リグニン・易分解性変異体植物の創出

研究課題名(英文) Improvement lignin characteristics by simultaneous disruption of plant peroxidases involved in lignification

研究代表者

堤 祐司 (TSUTSUMI, YUJI)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30236921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リグニンは、バイオエタノールやパルプの生産性、飼料の消化性に強い阻害効果を有することによって、植物の産業的活用における進展の障壁となっている。研究代表者は、シロイヌナズナにおいてリグニンの生合成に寄与する植物ペルオキシダーゼの遺伝子発現の欠損が、リグニン量の減少および易分解性リグニン構造の増加を引き起こすことを見いだした。本研究は、リグニンの生合成に関与する植物ペルオキシダーゼの遺伝子発現の複数同時欠損が、リグニンの減少量と易分解性の構造を増加させ、有効なリグニン改変法である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Lignin have negative impacts on the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels, forage digestibility, and the kappa value in the pulping industry. We recently demonstrated that deficiency of plant peroxidases (Prx) involved in Arabidopsis stem lignification led to both decreased total lignin content and increased uncondensed units of lignin. In this study, we showed simultaneous disruption of these Prx genes resulted in enhancing the phenotypic traits of each single mutant, suggesting that manipulation of Prx genes is an attractive strategy to improve lignin characteristics.

研究分野：木質生化学

キーワード：ペルオキシダーゼ 学 プロモーター マルチノックアウト 低リグニン 易分解性リグニン エネルギー植物 遺伝子工

1. 研究開始当初の背景

遺伝子改変技術の中核とするバイオテクノロジーは、人間の望む形質をもった植物創出を可能にすると考えられ、資源、エネルギー、食糧問題を解決するための突破口を与えてくれるものと期待されている。細胞壁の主成分の一つであるリグニンの量や質の制御は、森林資源を効率よく利用する手段の一つである。植物中のリグニンの低減は、バイオエタノールやパルプの生産性の向上、飼料の易消化性に有効である。樹木細胞壁でのリグニンの生合成過程は、「リグニンモノマーの生合成」と「ポリマーの形成」の2つに大別できる。近年の研究により、リグニンモノマーの生合成経路が解明され、リグニンモノマーの生合成遺伝子発現を抑制したトランスジェニック植物の作出が試みられてきた。一方で、リグニンポリマーの形成過程(重合反応)は植物ペルオキシダーゼ(Prx)により触媒されると考えられてきたものの、数多くのPrx遺伝子の中でどのPrxがリグニンポリマーの形成に関わるかはほとんど解明されていなかった。

研究代表者はこれまでの研究によってリグニンの生合成に関与するPrxアイソザイムCWPO-Cを発見した。さらに、シロイヌナズナの植物Prxノックアウト変異体を解析し、全73個の植物Prxのうち、3つのCWPO-Cホモログ遺伝子(*AtPrx2*, *AtPrx25*, *AtPrx71*)の発現をそれぞれノックアウトした変異体(*atprx2*, *atprx25*, *atprx71*)を解析した結果、(1)植物体の矮化は観察されず、正常に生長し、(2)2つの変異体(*atprx2*, *atprx25*)で茎のリグニン量が約10%~14%減少し、さらに(3)3種すべての変異体で非縮合(β -O-4結合)型リグニンが14~35%増加した。これらの結果は、バイオマスをセルロース源として利用する際に、極めて有利な表現型といえる。これにより、重合段階でのリグニン生合成制御の可能性が新たに開けた。すなわち、従来のリグニン改変アプローチはリグニンモノマー生合成遺伝子発現抑制によるリグニン量の低減を目指すものであったが、重合酵素の発現抑制を行うことでリグニン量の低減と分解除去しやすい結合様式を有するリグニン改質にチャレンジ可能となった。

2. 研究の目的

リグニン重合に関与するCWPO-Cホモログ遺伝子発現を同時にノックアウト(マルチノックアウト)することにより、バイオマス利用に有利なリグニン形態を有する植物を創造可能であることを強く期待させる。そこで本研究では、シロイヌナズナを用いてマルチノックアウト変異体を作製し、生長、リグニン量、リグニン構造・組成、セルロース量、ヘミセルロース量、糖化率を測定し、野生型や単一ノックアウト変異体と比較することによって、CWPO-Cホモログ遺伝子発現のマル

チノックアウトによる、バイオマス利用に有用な植物体作製の可能性を検証する。また、同時並行的にCWPO-C遺伝子の発現をノックダウンしたトランスジェニックポプラを作製し、樹木リグニンの改変と評価を試みる。

3. 研究の方法

(1) ダブルノックアウト変異体の作製

シングルノックアウト変異体(F0世代)のうち2つを交配させ、F2世代からPCRによって同型接合型ダブルノックアウト変異体(*atprx2/atprx25*, *atprx2/atprx71*, *atprx25/atprx71*)を選抜した。F3世代を分析に用いた。

(2) ダブルノックアウト変異体の生長観察

野生型(WT)、ダブルノックアウト体の種子発芽率、3週齢、または6週齢における根全長、側芽本数、側芽最大長、主茎長、主茎乾燥重量を測定した。

(3) ダブルノックアウト変異体の組織観察

6週齢におけるWTおよびダブルノックアウト体の花茎基部をFAAで固定し、ブチルアルコールシリーズで脱水後、パラフィン包埋した。マイクロトームを用いて10 μ m厚切片を作成し、脱パラフィン後、トルイジンブルー染色、モイレ反応に供し、光学顕微鏡を用いて観察した。

(4) リグニン分析

6週齢の植物体の花茎を採取し、アセチルブロマイド法を用いてトータルリグニン含量を、derivatization followed by reductive cleavage (DFRC)法とGC-MSを用いてリグニン構造と組成を測定、分析した。

(5) 糖化効率評価

6週齢のWT、ダブルノックアウト変異体の花茎を乾燥させ、粉末化後、脱脂した。脱脂粉末20mgに50mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)30mlとセルラーゼA3(天野製薬社市販品、菌体アスペルギルス属)4mg/mlを加えた、37°Cで5日間振盪培養した。培養後サンプルをろ過し、ろ過残渣量を測定した。またバイオセンサーを用いてろ液中に含まれるグルコース量を算出した。

(6) CWPO-C抑制トランスジェニックポプラの作製

カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター制御の植物発現用ベクター(pBF2)にCWPO-C cDNAをアンチセンス方向に組み込んだアンチセンス抑制コンストラクトとCWPO-Cの一部の配列に相同な配列をセンス方向と、アンチセンス方向に組み込みこんだRNA干渉誘導コンストラクトを作製した。ポプラの形質転換、及び組織培養はEbinumaら(1997, Proc. Natl. Acad. Sci.)の方法に従った。

4. 研究成果

(1) ダブルノックアウト変異体系統の確立

交雑種子を発芽・生長後、植物体の一部からDNAを抽出し、PCRによって雑種第一代(F1)

であることの確認を行った。F1 の自家受粉によって得られた F2 の中から 1/16 の確率で生じる 2 つの T-DNA 挿入遺伝子の同型接合体を特異的プライマーを用いた PCR によって選抜

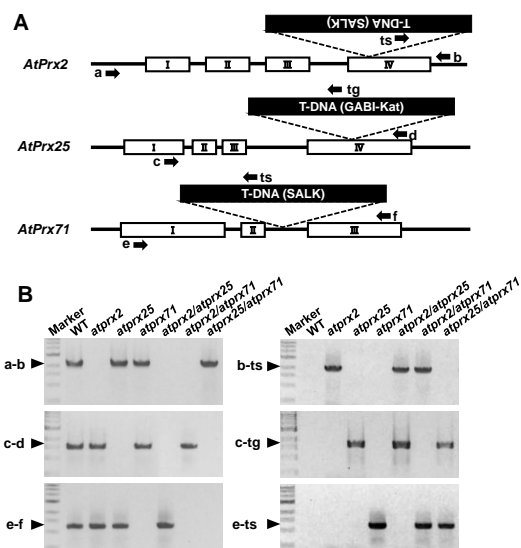


図1 ダブルノックアウト変異体系統の確立
(A) T-DNA挿入部位と選抜用プライマー (a~f) の設計部位
(B) PCRによる同型接合体の確認

した (図 1)。

(2) 細胞壁量の減少

3 週齢、および 6 週齢植物体の WT、ダブルノックアウト体 (図 2) の生長を観察したところ、6 週齢の花茎乾燥重量に有意な差が認められた。WT と比較して花茎乾燥重量は、*atprx25/atprx71* において約 17%、*atprx2/atprx71* において約 13%、*atprx2/atprx25*において約 32%減少していたことから、ダブルノックアウト体では花茎における細胞壁量が減少している可能性が考えられた。そこで花茎の横断切片をトルイジンブルーおよび、モイレ染色したところ、ダブルノックアウト体では野生型よりも木部繊維細胞における細胞壁量が減少していることが明らかとなった。なお、発芽率、根や葉の生長、側芽生長、花茎の長さには有意な差は認められなかった。

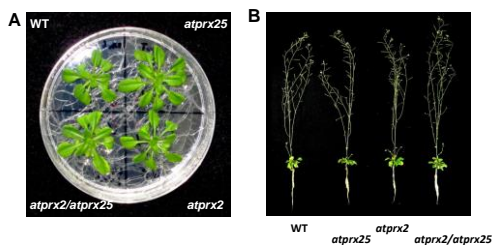


図2 3週齢 (A) と 6週齢 (B) の WT、シングルノックアウト体 (*atprx2*, *atprx25*)、ダブルノックアウト体 (*atprx2/atprx25*)

(3) リグニンの量と構造

リグニン量は *atprx71* を除く 5 つの変異体で減少しており、*atprx2/atprx25* において最

も減少 (25%減少) した (図 3)。また、すべてのダブルノックアウト変異体においてリグニン当たりの β -O-4 結合型モノマー収率が約 2 倍に増加した。これは易分解性の構造が大幅に増加したことを示している。また、ダブルノックアウト体におけるリグニン減少量および β -O-4 結合型モノマー収率ともに、シングルノックアウト体よりも大きくなった。以上の結果から、リグニン生成に関わるペルオキシダーゼを同時にノックアウトすることにより、リグニンをより減少させ、さらに易分解性リグニンの割合を増加させることができることが明らかとなった。

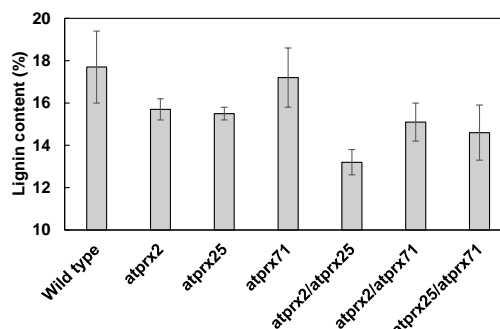


図3 6週齢のWTと変異体の花茎リグニン量

(4) 細胞壁の分解性と糖化効率の上昇

リグニン量の減少は、セルロース分解酵素 (セルラーゼ) のセルロースへのアクセシビリティを高める。そのため、リグニン量が減少したサンプルでは、セルラーゼによる糖化効率の上昇が期待できる。野生型とダブルノックアウト体の花茎乾燥脱脂粉末をセルラーゼ処理したところ、ダブルノックアウト変異体のセルラーゼによる消化効率 (重量減少率) およびグルコース放出量は、ともに 1.5 倍となった。ダブルノックアウト体では細胞壁の分解性と糖化効率が増していることが明らかとなった。

(5) ポプラ形質転換体の作成と解析

CWPO-C 抑制体ポプラ (RNAi、アンチセンス) については抑制体候補が複数固体得られているものの成長が極めて悪く、解析に至っていない。一方、シロイヌナズナを用いた CWPO-C プロモーター解析の結果、CWPO-C は分化や成長の活発な組織で高発現していた。このことから、CWPO-C はリグニン生合成だけでなく植物組織の分化や生長にも極めて重要な役割を持っていることが推測された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. **Jun Shigeto, Itoh Yoshitaka, Hrao Sakie, Ohhira Kaori, Koki Fujita, Yuji Tsutsumi**, Simultaneously disrupting *AtPrx2*, *AtPrx25* and *AtPrx71* alters lignin content and structure in *Arabidopsis* stem, 57, 4, 349-356, e105332, 2015. 04. 査読有
2. **Takako Harada, Koki Fujita, Jun Shigeto**,

Yuji Tsutsumi, Stereo-selective oxidations of terpinolene by cytochrome P450 monooxygenases in the microsomal fraction of *Cupressus lusitanica* cultured cells, *Journal of Wood Science*, 9, 8, e105332-e105332, 2014. 08. 査読有

3. **Jun Shigeto, Mariko Nagano, Koki Fujita, Yuji Tsutsumi**, Catalytic Profile of *Arabidopsis* Peroxidases, *AtPrx-2*, 25 and 71, Contributing to Stem Lignification, *PLOS ONE*, 9, 8, e105332, 2014. 08. 査読有

4. **Eri Takata, Tatsushi Tsuruoka, Ken Tsutsumi, Yuji Tsutsumi, Kenji Tabata**, Production of xylitol and tetrahydrofurfuryl alcohol from xylan in napier grass by a hydrothermal process with phosphorus oxoacids followed by aqueous phase hydrogenation, *Bioresource Technology*, 167, 74-80, 2014. 06. 査読有

5. **Koki Fujita, Yasufumi Bunyu, Ken-ichi Kuroda, Tatsuya Ashitani, Jun Shigeto, Yuji Tsutsumi**, A novel synthetic pathway for tropolone ring formation via the olefin monoterpene intermediate terpinolene in cultured *Cupressus lusitanica* cells, *Journal of Plant Physiology*, 171, 8, 610-614, 2014. 03. 査読有

6. **Eri Takata, Ken Tsutsumi, Yuji Tsutsumi, Kenji Tabata**, Production of monosaccharides from napier grass by hydrothermal process with phosphoric acid, *Bioresource Technology*, 143, 53-58, 2013. 09. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

1. **重藤 潤, 堤 祐司**, リグニン生合成に関与するペルオキシダーゼによるシリングル型モノマー脱水素重合, 第 65 回日本木材学会大会 (東京), 2015. 03. 18.

2. **Yuji Tsutsumi, Manami Takeuchi**, Screening of monolignol transport protein in *Arabidopsis thaliana*, *International Symposium on Wood Science and Technology 2015*, 2015. 03. 16.

3. **若林 昌嘉, 濱口 大空, 堤 祐司**, ニセアカシアの Cd 蓄積機構, 第 65 回木材学会 (東京), 2015. 03. 17.

4. **高尾 龍之介, 重藤 潤, 大平 香織, 堤 祐司**, ポプラの組織別における CWPO-C 転写解析, 第 65 回木材学会 (東京), 2015. 03. 17.

5. **梅村 早紀, 堤 祐司**, シロイヌナズナ培養細胞管状要素誘導中に発現するモノリグノール輸送体の探索, 第 65 回木材学会 (東京), 2015. 03. 17.

6. **Eri Takata, Tatsushi Tsuruoka, Ken Tsutsumi, Kenji Tabata, Yuji Tsutsumi**, Selective production of tetrahydrofurfuryl alcohol and xylitol

from napier grass by a hydrothermal process with phosphorus oxoacids followed by catalytic hydrogenation, *Lignobiotech III*, 2014. 10. 28.

7. **Yuji Tsutsumi, Jun Shigeto, Kaori Ohira, Ryunosuke Takao, Masaaki Kamada**, Expression and subcellular localization analysis of poplar cationic cell-wall-bound peroxidase and its *Arabidopsis* putative homologs involved in lignification, *Lignobiotech III*, 2014. 10. 27.

8. **堤 祐司, 大平 香織, 重藤 潤**, 高分子リグニン酸化能をもつポプラペルオキシダーゼ CWPO-C の発現と局在解析, 日本植物学会第 78 回大会 (川崎), 2014. 09. 12.

9. **Jun Shigeto, Yuji Tsutsumi**, Characterization of Plant Peroxidases which Involved in *Arabidopsis* Stem Lignification, XXVIIth International Conference on Polyphenols & 8th Tannin Conference (Nagoya), 2014. 09. 04.

10. **Yuji Tsutsumi, Jun Shigeto**, OXIDATION ACTIVITIES OF PLANT PEROXIDASES INVOLVED IN LIGNIFICATION, *Oxizymes*, 2014. 07. 02.

11. **重藤 潤, 堤 祐司**, リグニンの高分子化を担う植物ペルオキシダーゼの酸化能と酸化機構, 第 55 回日本植物生理学会年会 (富山), 2014. 03. 20.

12. **神戸 良, 藤田 弘毅, 堤 祐司**, テルペンシスターゼによるシグナル伝達物質の de novo 生産及び伝達メカニズム, 第 64 回日本木材学会大会 (松山), 2014. 03. 15.

13. **大平 香織, Kasturi Banerjee, 重藤 潤, 堤 祐司**, CWPO-C の転写およびプロモーター解析, 第 64 回 日本木材学会大会 (松山), 2014. 03. 14.

14. **重藤 潤, 堤 祐司**, リグニンを高分子化する植物ペルオキシダーゼの酸化能, 第 58 回リグニン討論会 (香川), 2013. 11. 12.

15. **神戸 良, 藤田 弘毅, 芦谷 竜矢, 堤 祐司**, *Cupressus lusitanica* 培養細胞が気相中に発散するモノテルペンの役割, 第 57 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (埼玉), 2013. 10. 05.

16. **高田 依里, 鶴岡 達志, 岸尾 昌典, 堤 健, 田畑 研二, 堤 祐司**, リンオキシ酸水熱反応によるネピアグラスからのキシラン分離とフラン誘導体への変換, 化学工学会第 45 回秋季大会 (岡山), 2013. 09. 18.

17. **重藤 潤, 長野 万里子, 堤 祐司**, リグニン高分子化ペルオキシダーゼの反応特性, 日本植物学会第 77 回大会 (札幌), 2013. 09. 13.

18. **高田 依里, 鶴岡 達志, 堤 健, 田畑 研二, 堤 祐司**, ~ネピアグラスの統合バイオリアファイナリー~ リンオキシ酸水熱処理による単糖生成とモノマー変換技術, 第 20 回日本木材学会九州支部大会 (福岡), 2013. 09. 02.

19. 神戸 良, 藤田 弘毅, 堤 祐司,

Cupressus lusitanica 培養細胞のシグナル伝達に関する炭化水素モノテルペンの経時的特性, 第20回日本木材学会九州支部大会(福岡), 2013. 09. 02.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ

http://ffpsc.agr.kyushu-u.ac.jp/chem/Woodchem_%26_biochem/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 祐司 (YUJI TSUTSUMI)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号: 30236921

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

重藤 潤 (JUN SHIGETO)

九州大学・農学研究院・学術研究員

研究者番号: 70570852