

LCC 分解系酵素生産イネの特性解明に関する研究

Analyses on properties of transgenic rice plants producing lignin
carbohydrate complex (LCC) degradable enzymes

2022.3

東京農工大学大学院
連合農学研究科
応用生命科学専攻
応用生物化学大講座

丸山 亮

目次

論文要旨	1
序章	4
第1章 LCC 分解系エステラーゼおよびアラビノフラノシダーゼ生産イネの作出	
1-1 緒言	12
1-2 実験材料	13
1-3 実験方法	21
1-3-1 形質転換イネ後代の選抜および生育	
1-3-2 形質転換イネの PCR 解析	
1-3-3 デイタージェント分析法による細胞壁成分の定量	
1-3-4 <i>in vitro</i> での飼料消化率(IVDMD; <i>in vitro</i> dry matter digestibility)の測定	
1-3-5 アルカリ脱リグニン効率の測定	
1-4 結果・考察	26
1-4-1 形質転換イネ後代の表現型	
1-4-2 形質転換イネの PCR 解析	
1-4-3 デイタージェント分析法による細胞壁成分の定量	
1-4-4 <i>in vitro</i> での飼料消化率(IVDMD)の測定	
1-4-5 アルカリ脱リグニン効率の測定	
1-5 まとめ	32
第2章 LCC 分解系アラビノフラノシダーゼの導入によるイネの矮化と多分げつ体化	
2-1 緒言	34
2-2 実験材料	35

2-3	実験方法	43
2-3-1	アグロバクテリウム法によるイネの形質転換	
2-3-2	形質転換イネの PCR 解析	
2-3-3	ディタージェント分析法による細胞壁成分の定量(連続法)	
2-3-4	赤外分光法(IR; Infrared spectroscopy)による細胞壁成分の定量	
2-4	結果・考察	50
2-4-1	pIG121-GUS(-)-Abf 系統の表現型	
2-4-2	形質転換イネの PCR 解析	
2-4-3	形質転換イネの農業形質の評価	
2-4-4	ディタージェント分析法による細胞壁成分の定量	
2-4-5	赤外分光法(IR)による細胞壁成分の定量	
2-5	まとめ	58
第3章	LCC 分解系アラビノフラノシダーゼ導入イネにおける矮化メカニズムの解析	
3-1	緒言	60
3-2	実験材料	60
3-3	実験方法	62
3-3-1	形質転換イネ後代の選抜および生育	
3-3-2	形質転換イネの PCR 解析	
3-3-3	形質転換イネの RT-PCR 解析	
3-3-4	フロログルシノール塩酸染色によるリグニン沈着量の観察	
3-3-5	アルカリ脱リグニン効率の測定	
3-3-6	HPLC による <i>p</i> -ヒドロキシ桂皮酸類の定量	
3-4	結果・考察	68
3-4-1	形質転換イネの表現型(T ₁ および T ₂ 世代)	
3-4-2	形質転換イネの PCR 解析	
3-4-3	形質転換イネの RT-PCR 解析	
3-4-4	フロログルシノール塩酸染色によるリグニン沈着量の観察	

3-4-5	アルカリ脱リグニン効率の測定	
3-4-6	HPLCによる <i>p</i> -ヒドロキシ桂皮酸類の定量	
3-5	まとめ	78
	終章	81
	参考文献	83
	謝辞	91

論文要旨

リグニンはセルロース、ヘミセルロースと共に植物細胞壁を構成する主要成分の一つであり、植物を鉄筋コンクリートの建物に例えるとセルロースは鉄筋、ヘミセルロースは針金、そしてリグニンはそれらの隙間を埋めるコンクリートの働きをしているといえる。リグニンは植物体の構造的な支えの他、傷害・病害や草食動物による食害に対する抵抗性に寄与している。しかし、製紙過程やバイオエタノールの生産など、我々が植物バイオマスを産業利用する際には、リグニンは阻害要因として働くため、植物バイオマスの脱リグニン処理が必要となる。脱リグニン処理にはアルカリ蒸解法やサルファイト法などの化学的・物理的な処理が広く用いられているが、これらの処理には大量の化学薬品やエネルギーが使用されており、コストと環境汚染の二つの面で問題となっている。もし植物自体に脱リグニンされやすい性質を付与することができれば、全体として脱リグニン処理にかかる化学薬品やエネルギーを大幅に削減することにつながるであろう。植物の易脱リグニン化の方法として、リグニン生合成系酵素を抑制してリグニン自体の量を減らす方法があるが、リグニンは植物にとって必要不可欠な物質であり、リグニン含量の減少は植物体の矮化や傷害・病害抵抗性の低下を引き起こしてしまう。そこで、リグニン含量を減らさずにリグニンを除去しやすくするため、本研究では新たなアプローチとしてリグニンと多糖間の結合様式である **Lignin Carbohydrate Complex (LCC)** に着目した。LCC 中の結合を減少させることで、多糖類からリグニンを切り離すことが容易になるため、リグニン自体の量を減らすことなく易脱リグニン化が行えると考えられる。多くの生物はリグニンを分解できないが、担子菌類の中にはリグニン分解能を持つ菌が存在しており、腐生担子菌 *Coprinopsis cinerea* から LCC 分解系酵素 CcEST1 および CcAbf62A の遺伝子が単離された。これらの酵素は LCC に含まれる結合の一つである、フェルラ酸を介した結合を切断する活性を持つ。CcEST1 はフェルロイルエステラーゼ活性を持ち、LCC 中のフェルラ酸-多糖間のエステル結合を切断する。また、CcAbf62A はアラビノフラノシダーゼ活性を持ち、ヘミセルロースの一種であるアラビノキシランのアラビノース側鎖とキシラン間の結合を切断する。アラビノキシランのアラビノース側鎖はフェルラ酸を介した LCC の形成に関与しているため、CcAbf62A も

LCC の分解に寄与する。本研究ではこれらの LCC 分解系酵素の遺伝子をイネに導入して、植物バイオマスの易脱リグニン化を達成することを目的とした。

本研究ではまず、rice *Act1* プロモーターで *CcEST1*、または *CcAbf62A* を発現させるコンストラクトを導入したイネ形質転換体 pActEST、pActAbf 系統について分析を行った。両系統は野生型と同様の成長を示し、想定通りリグニン含量についても減少は見られなかった。また、pActEST 系統で飼料消化率の向上、pActAbf 系統でセルロース含量の増加などの好ましい傾向が見られたが、一方で脱リグニン効率に関しては向上が見られなかった。本コンストラクトを用いた遺伝子導入ではイネの表現型の変化は起こらず、易脱リグニン化においてもそれほど大きな効果は見込めないことが示唆された。そこで、先行研究において表現型の変化が確認された、CaMV 35S プロモーターで *CcAbf62A* を発現させるコンストラクトを導入したイネ pIG121-GUS(-)-Abf 系統の作出を行った。本研究で作出された pIG121-GUS(-)-Abf 系統は 3 種類の表現型、即ち、強度の矮化と多分げつ体化が生じた dwarf 系統、伸長成長が抑制された retarded-growth 系統、および正常に生育した normal 系統を示した。イネの矮化や多分げつ体化はそれぞれ、倒伏耐性の向上や収穫量の増加につながる重要な形質である。dwarf 系統について分析を進めたところ、表皮や維管束組織へのリグニン沈着の遅れや、茎に含まれる *p*-クマル酸/フェルラ酸の低下が確認された。これらの結果から、*CcAbf62A* の生産によりアラビノキシラン結合性の *p*-クマル酸が減少し、木部組織へのリグニン沈着が阻害されて通導性が低下したために、矮化が起こった可能性が示された。また dwarf 系統ではアルカリ脱リグニン処理による質量回収率は低下した一方、脱リグニン効率には有意差が見られなかった。これは、LCC 中のエステル結合の割合が低下したためであると推測された。

本研究では、当初の目的であった植物バイオマスの易脱リグニン化と合わせて、*CcAbf62A* の導入により起こった矮化のメカニズムについても分析を行った。作出された dwarf 系統においては表現型の変化に加え、細胞壁成分の組成や生育段階による蓄積量の違いも確認され、アラビノキシランや LCC がイネの生育と強く関連していることを明らかにした。また、脱リグニン効率については明確な向上は見られなかったが、*CcAbf62A* の作用によってリグニン-多糖間の結合様式が変化したことが示唆された。LCC 分解系酵素の導入という新たなアプローチの元

に行われたこれらの研究によって、植物バイオマスの有効利用や矮化イネの作出に寄与する数多くの重要な知見が得られたと考えている。

序章

植物の易脱リグニン化の重要性

リグニンは地球上のバイオマス資源のうち、セルロースに次いで多量に存在するポリマーである。リグニンは二次代謝産物として細胞壁に蓄積され、植物体の構造的な支えの他、傷害・病害に対する抵抗性や草食動物による食害に対する抵抗性に寄与している。植物細胞壁は主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンの三要素によって構成されており、植物を鉄筋コンクリートの建物に例えると、セルロースは鉄筋、ヘミセルロースは針金、そしてリグニンはそれらの隙間を埋めるコンクリートの役割を果たしているといえる。その一方で、我々人間が植物バイオマスを産業利用する際には、リグニンは阻害要因として働いている[1]。例えば、製紙過程においてパルプから白色紙を作るためには、パルプの脱リグニン処理が必要である。また、バイオエタノールの製造においては多糖類の糖化の際に、リグニンが多糖類と結合していることが糖化効率を低下させる要因となっており、効率的にセルロースをグルコースに変換できる植物材料が求められている[2]。植物バイオマスの脱リグニン処理の方法としては、アルカリ薬剤を加えて高温・高圧下で煮るアルカリ蒸解法や、亜硫酸液を加えて蒸煮するサルファイト法が広く用いられており、近年では加熱後の減圧による水蒸気爆発前処理を利用する方法なども考案されている。しかし、これらの物理的あるいは化学的な脱リグニン処理のためには多量の化学薬品やエネルギーが使用されており、コスト的にも環境的にも問題がある。そのため、脱リグニン処理を効率的に行える方法の開発が求められているが、もし植物自体に脱リグニンされやすい特性を付与することができれば、全体として脱リグニン処理に必要な化学薬品量やエネルギー量の大幅な削減につながる。従って、植物の易脱リグニン化は植物バイオマスの利用性を向上させ、エネルギー問題や環境問題の改善に寄与する重要な研究テーマであるといえるだろう。

2つの方法：リグニン含量の減少と脱リグニン効率の向上

植物の易脱リグニン化を実現するためには、大きく分けて2つの方法が考えられる。1つ目はリグニンの生合成を抑制してリグニン含量を減少させる方法、2つ目はリグニンの組成や結合様式を改変して脱リグニンを容易にする方法である。これ

まで本研究室では両方向で研究を続けてきた[3][4]。

リグニン含量を減らすためには、リグニン生合成系(図 0-1)の炭素の流量を減らせばよい。そのために、様々なリグニン生合成系酵素の抑制が試みられてきた。例えば、4-coumarate CoA ligase (4CL)や caffeate/ferulate *O*-methyltransferase (COMT)や caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase (CCoAOMT)や cinnamoyl-CoA reductase (CCR)などである[1]。これらの酵素を抑制することでリグニン生合成系への炭素流入の単純減少や、代謝中間体が蓄積することによるフィードバック制御でリグニン生合成系への炭素流入量が減ると考えられる。リグニン含量の減少は植物の消化性を決定する重要な要素の一つであり、これまでリグニン生合成系酵素の抑制や[5][6]、転写因子の抑制による低リグニン量の形質転換植物の作出[7]が世界でも広く行われてきた。しかし、リグニンは植物にとって必要不可欠な物質であり、リグニン含量の減少は植物体の矮化や導管の形態異常[8][9][10]、障害・病害抵抗性の低下など様々な農業特性の低下を引き起こす[11][12]。そのため、リグニン含量を減少させるにも限界があるといえる。

一方で脱リグニンを容易にする方法としては、リグニンそのものが分解されやすくなるように高分子化を抑制したり(リグニンモノマーの重合に関与するペルオキシダーゼやラッカーゼの抑制)、分解されやすいモノマーの比率を高めたり(ferulate 5-hydroxylase (F5H)や coniferyl aldehyde 5-hydroxylase (Cald5H)の強化による sinapyl alcohol の割合の増加)、重合の基質にもなる分解されやすい中間体を蓄積させたり(cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)の抑制による cinnamyl aldehyde の蓄積、COMT や CCoAOMT の抑制など)する試みがなされてきた[1]。こちらの方法では植物中のリグニン含量の減少を伴わないため、植物の生育に悪影響を与えずに易脱リグニン化が行えると考えられる。本研究では後者の観点から、リグニン-多糖間の結合の分解という新たなアプローチを試みた。

Lignin carbohydrate complex (LCC)と腐生担子菌

リグニンはフェノール性化合物の 3 種類の主要モノリグノール(図 0-2)がペルオキシダーゼやラッカーゼの働きによって重合してできる強固なポリマーである。そして、リグニンはセルロースやヘミセルロースのような構造多糖類と結合して、lignin carbohydrate complex (LCC)を形成している。LCC 中に含まれる主要な結合と

して、ベンジルエーテル結合、ベンジルエステル結合、フェニルジエステル結合、そしてフェルラ酸残基を介したエステル・エーテル結合が挙げられる[13](図 0-3)。リグニン自体を変化させなくても、植物中の LCC を減少させることができれば、リグニンと多糖間の結びつきが弱まり、脱リグニンが容易になると予想される。

また、ほとんどの生物は高分子リグニンを分解できないが、例外として、白色腐朽菌などの一部の腐生担子菌はリグニン分解能を持つ。腐生担子菌を用いた脱リグニン処理は、エネルギーや有害な薬品の使用量を抑えられるものの、物理的および化学的処理に比べて処理に長い時間を必要とする欠点がある。さらに、腐生担子菌の中には多糖類も分解する菌が存在し、リグニンを選択的に分解する菌でも木材の腐朽状況によって分解の選択性は大きく異なる。これらのことを考えれば、腐生担子菌の脱リグニンへの大規模な利用には難しい面が存在する。とはいえ、腐生担子菌の優れたリグニン分解能を利用することは大変効果的だろう。

LCC 分解系酵素導入による易脱リグニン化

本研究では腐生担子菌から単離された LCC 分解系酵素の遺伝子を、形質転換法により植物に導入して酵素を生産させることで、処理時間の長さや非選択的な分解性の問題を解決し、腐生担子菌の持つリグニン分解能を植物の易脱リグニン化に有効利用することを試みた。東京農工大学農学部環境資源科学科の吉田 誠研究室において、腐生担子菌の一種である *Coprinopsis cinerea* から細胞外分泌炭水化物エステラーゼ CcEST1 の遺伝子 *CcEST1* (DNA Data Base accession number: AB540992)、およびアラビノフラノシダーゼ CcAbf62A の遺伝子 *CcAbf62A* (DNA Data Base accession number: AB557888) が単離された[14][15]。*C. cinerea* は茸を形成可能なモデル担子菌で、積みわらなどの腐敗した草本類に群生するが、樹木上では見られないという性質を持つ。そこで、本研究では CcEST1、CcAbf62A をイネに生産させ、その影響を調べることを目的とする。

CcEST1 および CcAbf62A は、LCC に含まれる結合のうち、特にフェルラ酸を介した結合を切断する活性を持つ。CcEST1 はフェルラ酸残基と多糖類を結ぶエステル結合を切断するフェルロイルエステラーゼ活性を持つだけでなく(図 0-4)、ヘミセルロースであるキシランのアセチル化されたキシロース残基上の特定部位のアセチル基のエステル結合を切断するアセチルキシランエステラーゼ活性も有する

特異な酵素である。また CcAbf62A は草本類における主要なヘミセルロースであるアラビノキシランの[16]、キシラン鎖と結合しているアラビノース側鎖を切断するアラビノフラノシダーゼ活性を持っている(図 0-5)。草本類の細胞壁において、キシラン鎖の C₃ 位に結合しているアラビノース側鎖は、5'-OH 基をフェルラ酸や *p*-クマル酸などのヒドロキシ桂皮酸類によってアシル化されている[17][18]。植物にこれらのエステラーゼ、アラビノフラノシダーゼを生産させるだけではリグニンを完全に分解することはできない。しかし、これらの酵素が植物中でフェルラ酸残基を介したリグニン-多糖間の結合や、キシランに結合したアセチル基を切断することで、脱リグニンが容易になることが期待される。実際に、先行研究において真菌類由来のフェルロイルエステラーゼをイネ科草本であるオニウシノケグサ(*Festuca arundinacea*)に発現させた系統において、細胞壁消化率の向上も確認されている[19]。また、キシランアラビノシルトランスフェラーゼをノックアウトしたイネにおいて、稲わらの糖化効率が向上したという結果も報告されている[20]。

PrxA3a シグナル配列の付加

CcEST1、CcAbf62A は真菌類由来の酵素であるため、植物細胞壁で働かせるためにはタンパク質を細胞外へと輸送するための分泌シグナル配列を付加する必要がある。植物細胞において効率的な細胞外分泌を期待する上で、真菌類由来の分泌シグナル配列よりも植物タンパク質由来の分泌シグナル配列の方が有利であると考えられる。そこで、当研究室の刑部らにより交雑ヤマナラシ・キタカミハクヨウ(*Populus × kitakamiensis: P. grandidentata × P. tremula var. sieboldii*)から単離・解析された酸性ペルオキシダーゼの遺伝子 *prxA3a* (DNA Data Base accession number: D38050)のシグナル配列部分に相当する塩基配列を利用することにした。*prxA3a* は *pI* 4.29 の等電点を持つ酸性ペルオキシダーゼ PrxA3a をコードする遺伝子であり、PrxA3a はリグニンの生合成に関与していると推測されており[21]、細胞外分泌のシグナル配列を有する。

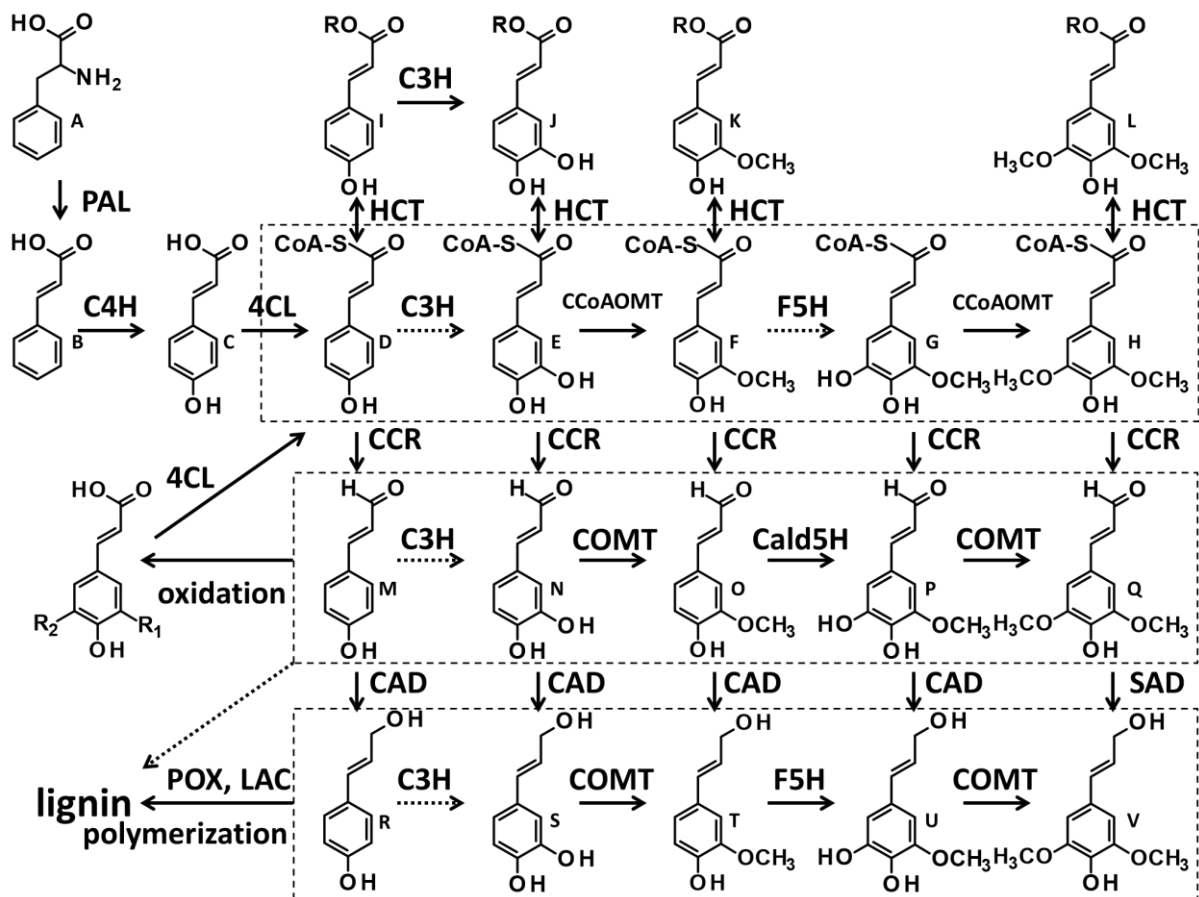


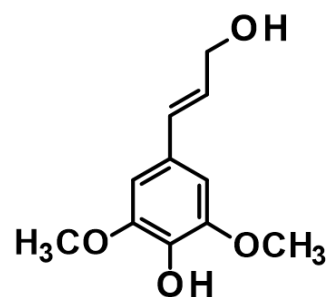
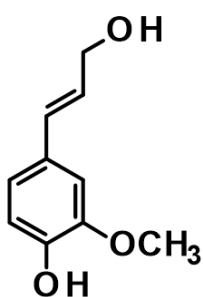
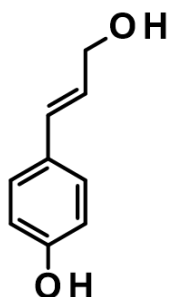
図 0-1. リグニン生合成経路の模式図

酵素の略称は以下の通りである。4CL : 4-coumarate CoA ligase、C3H : coumarate 3-hydroxylase、C4H : cinnamate 4-hydroxylase、CAD : cinnamyl alcohol dehydrogenase、Cald5H : coniferyl aldehyde 5-hydroxylase、CCoAOMT : caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase、CCR : cinnamoyl-CoA reductase、COMT : caffeate/ferulate *O*-methyltransferase、F5H : ferulate 5-hydroxylase、HCT : hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyl transferase、LAC : laccase、PAL : phenylalanine ammonia lyase、POX : peroxidase、SAD : sinapyl alcohol dehydrogenase。

A – V で示した化合物の名称は以下の通りである。A : phenylalanine、B : *trans*-cinnamic acid、C : *p*-coumaric acid、D : *p*-coumaroyl-CoA、E : caffeoyl-CoA、F : feruloyl-CoA、G : 5-hydroxyferuloyl-CoA、H : sinapoyl-CoA、I : *p*-coumaroyl shikimic acid/quinic acid、J : caffeoyl shikimic acid/quinic acid、K : feruloyl shikimic acid/quinic acid、L : sinapoyl shikimic acid/quinic acid、M : *p*-coumaryl aldehyde、N : caffeoyl aldehyde、O : coniferyl aldehyde、P : 5-

hydroxyconiferyl aldehyde、Q : sinapyl aldehyde、R : *p*-coumaryl alcohol、S : caffeyl alcohol、T : coniferyl alcohol、U : 5-hydroxyconiferyl alcohol、V : sinapyl alcohol。I-L の-OR はシキミ酸/キナ酸とのエステル結合を示している。

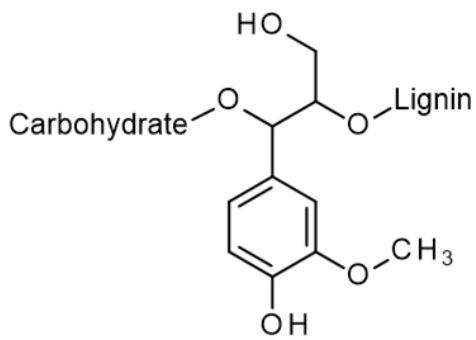
p-ヒドロキシシシナモイル CoA(D-H)は、CCR によって *p*-ヒドロキシシシナミルアルデヒド(M-Q)へと還元され、その後 CAD や SAD による *p*-ヒドロキシシシナミルアルコール(R-V)への還元を経て、リグニンへと重合される。*p*-ヒドロキシシシナミルアルデヒドは酸化されやすく、酸化を受けて *p*-ヒドロキシ桂皮酸類となるが、*p*-ヒドロキシ桂皮酸類は 4CL の働きによって *p*-ヒドロキシシシナモイル CoA に変換され、リグニン生合成系へと回収される。



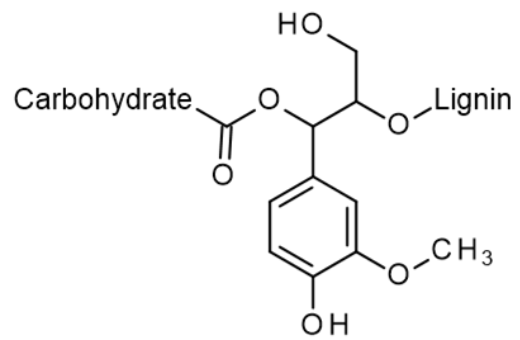
p-クマリルアルコール コニフェリルアルコール シナピルアルコール

図 0-2.3 種類のモノリグノール

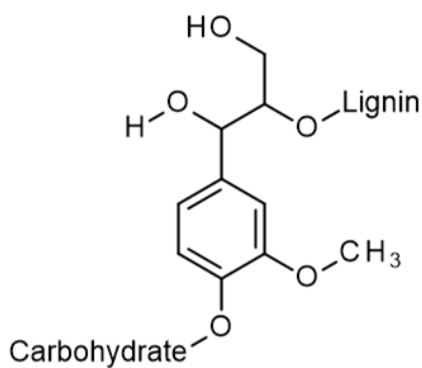
リグニンは主にこれら 3 種類のモノリグノールが重合することによって作られる。リグニンの組成は植物種により異なり、裸子植物のリグニンは主にコニフェリルアルコールに由来する G リグニンから成り、被子植物のリグニンは主に G リグニンと、シナピルアルコールに由来する S リグニンから成る。イネ科の草本類のリグニンは G リグニンと S リグニンに加えて、*p*-クマリルアルコールに由来する H リグニンを多く含んでいる。



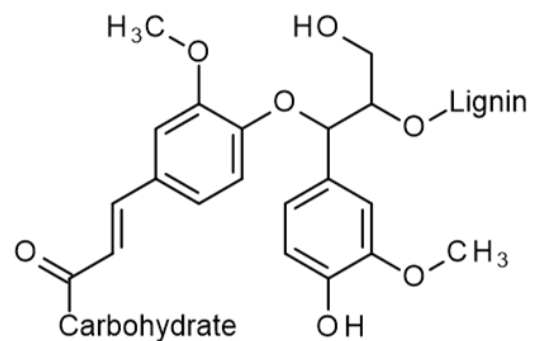
ベンジルエーテル結合



ベンジルエステル結合



フェニルグリコシド結合



フェルラ酸を介した結合

図 0-3. Lignin carbohydrate complex (LCC)に含まれる主要な結合

リグニンと多糖類は細胞壁中で主にこれらのエステル、エーテル結合によって LCC を形成している。図中では便宜的にリグニンを β -O-4 結合で重合したコニフェリルアルコールとして示した。

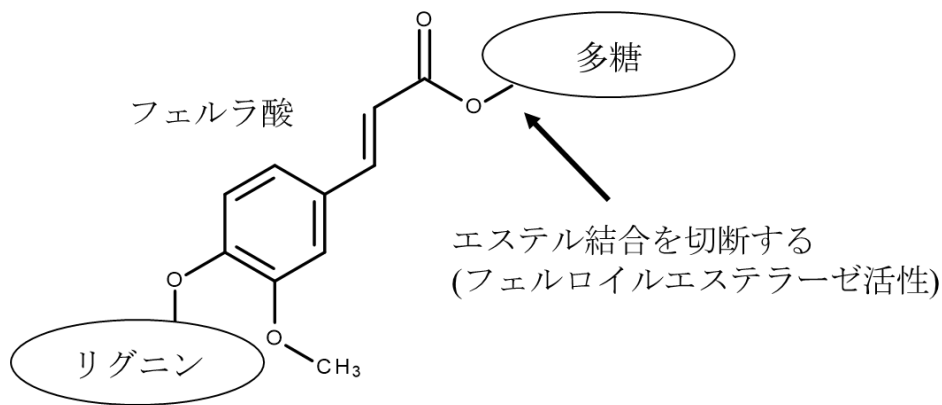


図 0-4. CcEST1 により切断されるフェルラ酸-多糖間の結合

フェルラ酸残基は多糖類とエステル結合を、リグニンとエーテル結合をすることにより、多糖類とリグニンを結び付けて LCC を形成している。CcEST1 はフェルロイルエステラーゼ活性によりフェルラ酸-多糖間のエステル結合を切断する。

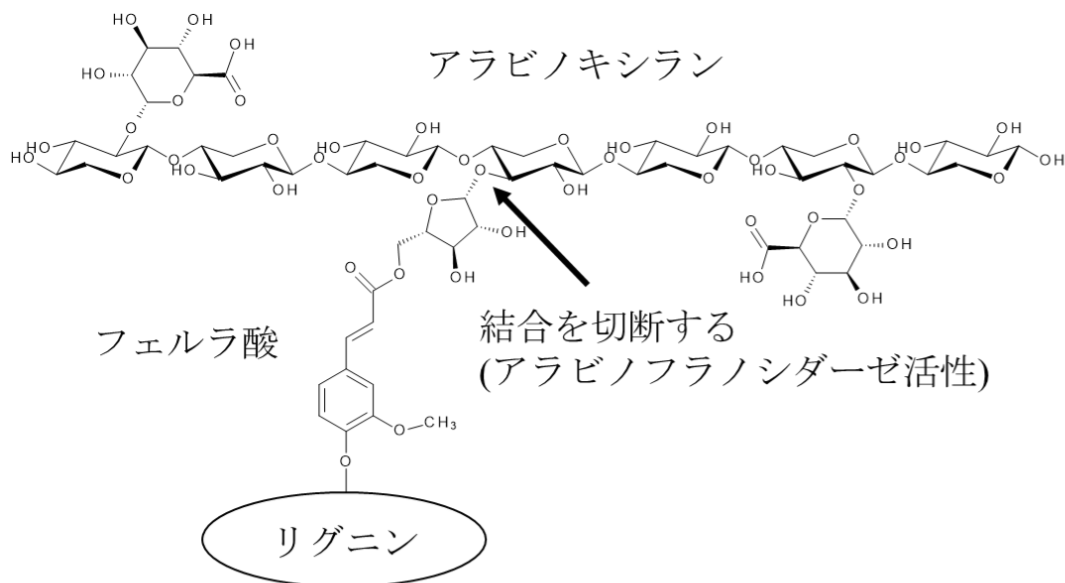


図 0-5. CcAbf62A により切断されるアラビノース-キシラン間の結合

アラビノキシラン中に存在する、キシラン鎖の C₃ 位に結合しているアラビノース側鎖は、フェルラ酸残基とエステル結合を形成する。これにより、アラビノキシランのアラビノース側鎖は LCC の形成や、多糖間の結合に寄与している。CcAbf62A はアラビノキシランのアラビノース-キシラン間の結合を切断する。

第1章 LCC 分解系エステラーゼおよびアラビノフラノシダーゼ生産イネの作出

1-1 緒言

先行研究において本研究室の浅田、松井により pIG121-GUS(-)をベクターとして CaMV 35S プロモーター下流に *CcEST1* あるいは *CcAbf62A* を挿入したコンストラクトを導入したタバコが作出され、これらのタバコではリグニン分解系酵素が発現しているにもかかわらず野生型と比べて表現型に違いが見られなかった[22][23]。その結果を受け、本研究室の品川により pIG121-GUS(-)をベクターとして *CcEST1*、*CcAbf62A* をそれぞれ導入した形質転換イネ pIG121-GUS(-)-EST、pIG121-GUS(-)-Abf 系統の作出が行われた[24]。イネにおいて易脱リグニン化が実現できれば、現在未利用資源として大量に存在している稲収穫後の稲わらの家畜飼料への利用や、バイオエタノール生産への利用などにつながると考えられる。イネに *CcEST1* を導入して得られた pIG121-GUS(-)-EST 系統はコントロールと同様に伸長成長したが、出穂前に枯死してしまい種子形成までは至らなかった。また、*CcAbf62A* を導入した pIG121-GUS(-)-Abf 系統は伸長成長が極めて遅く、芝生のように多数の短い芽が広がるように成長していき(図 1-1)、順化過程で枯死してしまった。これらの生育上の変化が *CcEST1*、*CcAbf62A* の発現を原因としたものであるかを調べるためには、より多くの形質転換体を得る必要があるだろう。

自身の先行研究において、形質転換に使用するベクターを pIG121-GUS(-)から pActnos/Hm2 に変更して、*CcEST1*、*CcAbf62A* をイネに導入した pActEST、pActAbf 系統を作出して分析を行った[25]。この変更により導入遺伝子上流のプロモーターが CaMV 35S プロモーターから rice *Act1* プロモーター[26]に代わる。rice *Act1* プロモーターはイネを含む様々な単子葉類への遺伝子導入において CaMV 35S プロモーターよりも安定して高い遺伝子発現量を持つことが確認されているプロモーターである[27][28]。作出された pActEST および pActAbf 系統では、pIG121-GUS(-)-Abf 系統で確認されたような表現型の変化は起こらず、生育への悪影響も見られなかった。そして、リグニン含量はコントロールと比較して減少しておらず、リグニンの組織への沈着パターンや組成に関しても差が見られないことが明らかとなった。本章では先行研究で作出されたこれらのイネの世代促進を行い、獲得した T₃ 世

代のイネをサンプルとして、より詳細な細胞壁成分分析や脱リグニン効率の評価を試みた。

1-2 実験材料

供試植物

形質転換用の供試植物としてイネ(日本晴れ)*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare を使用した。pActEST、pActAbf 系統はそれぞれ先行研究においてアグロバクテリウム法により *CcEST1*、*CcAbf62A* を導入されて分化・再生した形質転換イネである[25]。また、コントロールとして野生型(WT)の“日本晴れ”を用いた。

導入されたコンストラクト

形質転換用バイナリーベクターとして pActnos/Hm2 を使用した[29]。pActnos/Hm2 にそれぞれ *CcEST1*、*CcAbf62A* を導入して構築したプラスミド pActEST、pActAbf の T-DNA 領域について図 1-2 に示した。以下に各遺伝子の詳細を記載する。

PrxA3a の遺伝子 *prxA3a* (DNA database accession no. D38050)のシグナル配列部分の塩基配列は、イントロンを除去した *prxA3a* を挿入したプラスミドを鋳型として *prxA3a* Forward primer および *prxA3a* Reverse primer(表 1-1)のセットを用いて増幅したものである。Forward primer には *HindIII*および *XbaI*、Reverse primer には *EcoRI*の制限酵素部位が付与されるように設計されている(図 1-3)。

細胞外炭水化物エステラーゼ *CcEST1* (protein_id = "BAJ10857.1")の遺伝子 *CcEST1* (DNA DataBase Accession Number: AB540992)、およびアラビノフラノシダーゼ *CcAbf62A* (protein_id = "BAK14423.1")の遺伝子 *CcAbf62A* (DNA DataBase Accession Number: AB557888)は東京農工大学農学部環境資源科学科の吉田誠研究室より供与して頂いた。構築したコンストラクトより、PrxA3a シグナル配列と *CcEST1*、*CcAbf62A* タンパク質領域のそれぞれの融合タンパク質のアミノ酸配列とそれをコードしている塩基配列を図 1-4 および図 1-5 に示した。

PCR 用プライマー

目的の塩基配列の増幅、および形質転換イネの遺伝子導入の確認に用いられたプライマーの配列を表 1-1 に示した。

使用された培地および試薬

培地や試薬の調製に用いられた試薬類は主に、富士フィルム和光純薬(Wako)、Merck Sigma-Aldrich、東京化成工業(TCI)よりの購入品である。

培地および試薬の組成については表 1-2 から表 1-7 に示した。形質転換イネ種子の抗生物質耐性選抜のために MS 培地を使用した。抗生物質については使用濃度の 1,000 倍濃度のハイグロマイシン水溶液を調製してフィルター滅菌したものをストック溶液とし、オートクレーブ後に培地に添加した。

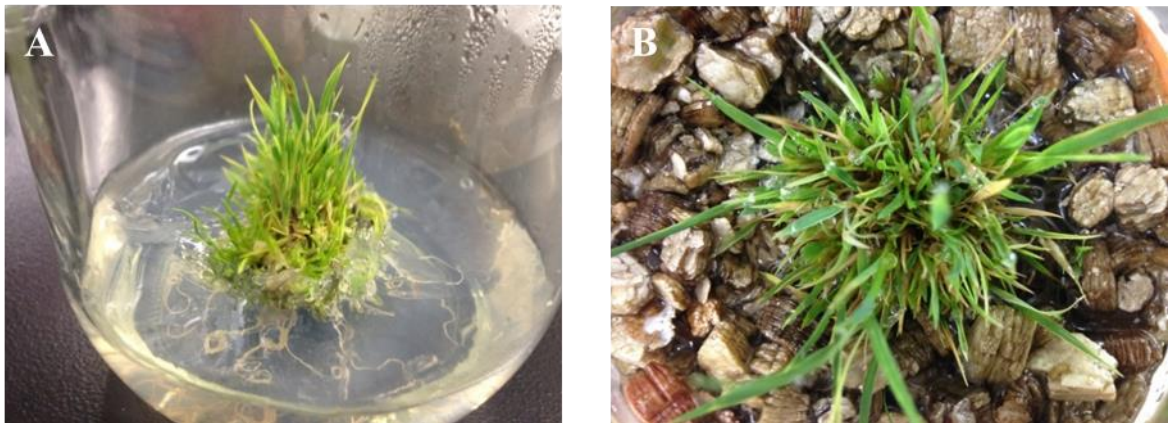


図 1-1. 先行研究で作出された形質転換イネ pIG121-GUS(-)-Abf 系統の表現型

(A) MS 培地上で生育中の pIG121-GUS(-)-Abf。 (B) バーミキュライト上で生育中の pIG121-GUS(-)-Abf を上から見た図。

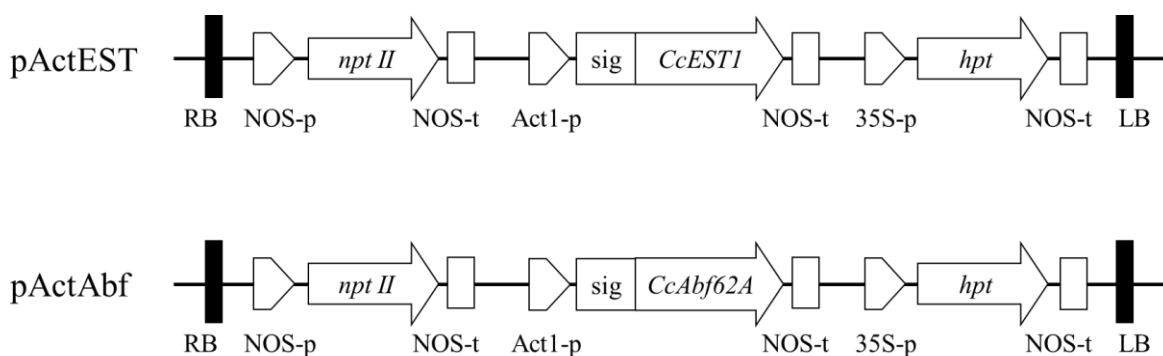


図 1-2. 使用したプラスミド pActEST および pActAbf の T-DNA 領域

RB: 右境界配列、LB: 左境界配列、NOS-p: ノパリン合成酵素遺伝子プロモーター、35S-p: CaMV 35S プロモーター、Act1-p.: rice *Act1* プロモーター、NOS-t: ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター、*npt II*: カナマイシン耐性遺伝子、*hpt*: ハイグロマイシン耐性遺伝子、sig: PrxA3a のシグナル配列部分に相当する塩基配列、*CcESTI*: イントロンを除かれた *CcESTI* の塩基配列、*CcAbf62A*: イントロンを除かれた *CcAbf62A* の塩基配列。

```

1  gaaagctttctagaATGATGGTAGATAAAGCAATGCATCCGTTAGTTGCATCTCTTTTTA 60
      M M V D K A M H P L V A S L F I
61  TTGTAATCTGGTTTGGAGGATCACTTCCCTATGCCTATGCTGAATTCT 109
      V I W F G G S L P Y A Y A E F
  
```

図1-3. *prxA3a*のシグナル配列部分の塩基配列およびアミノ酸配列

末端に制限酵素認識部位を付加したプライマーを設計して増幅した。下線部は *prxA3a* Forward primer の塩基配列および *prxA3a* Reverse primer の相補鎖に相当する塩基配列である。

HindIII Xba I
1 aagcctttctagaATGATGGTAGATAAAGCAATGCATCCGTTAGTTGCATCTCTTTTTATT 60
M M V D K A M H P L V A S L F I
61 GTAATCTGGTTTGGAGGATCACTTCCCTATGCCTATGCTGAATTCGCCTCCACCCCGGC 120
V I W F G G S L P Y A Y A E F A S T P G
121 TGTGGCAGGAGCCACCCTCGAGCGGTACCAAGAACATCGGCAACCGACAGTACATCCTC 180
C G R S P P S S G T K N I G N R Q Y I L
181 CAAGTCCCCGCAACTATGACCCAACAGGCCGTACAACTCATCTTCGGCTTCCACTGG 240
Q V P A N Y D P N R P Y K L I F G F H W
241 CTCGGTGGCAACATGAACAACGTGCCCCAGGCTACTACGGTCTCCGTGCCCTCGCAAAC 300
L G G N M N N V A P G Y Y G L R A L A N
301 GAAAGCGCCATCTTCGTGCGACCCAACGGCCTCGACGCGGTGGGCCAACACCGGAGGT 360
E S A I F V A P N G L D A G W A N T G G
361 CGCGACACCACCTTCGTCAACCAGATGCTCACCGAGCTCAAGAACAGCATGTGTGTCGAT 420
R D T T F V N Q M L T E L K N S M C V D
421 GACACTCAGATTTTTGCGACTGGCTTCAGCTACGGTGGTGGCATGTCTACTCTCTCGCT 480
D T Q I F A T G F S Y G G G M S Y S L A
481 TGCTCCAACCCTCGTGACTTCCGTGTGTCTCCGTATCGCTGGTGGCCAGCTCAGCGGT 540
C S N P R D F R A V S V I A G A Q L S G
541 TGCAGCGGTGGCGAGACCGAGTTGCTACCTCGGTATCCACGGTGTGTCGACTCCGTC 600
C S G G E T R V A Y L G I H G V V D S V
601 CTCAACGTGAGCGAGGCCCGCAGCTACGTGACCGCTACCTCCGTGCAACGGCTGCCAG 660
L N V S A G R Q L R D R Y L R V N G C Q
661 TCCAAGAACGCACCCGAGCCCTCGTGGTCCCGACAGCAACTACATGAAGACCGAGTAC 720
S K N A P E P P R G P D S N Y M K T E Y
721 TCATGCGCTGCCGTTACCCAGTCTGGTGGATCGCTCACGGTGGTACCACGTCGCTCAG 780
S C A A G Y P V W W I A H G G D H V A Q
781 CCCAGCGGACAGAACTGGATGGCCACCCAGACATGGGACTTCTGGACCCGTGCTATCTAT 840
P S G Q N W M A T Q T W D F W T R A I Y
841 GAAGGTGTGAGAACCCCAACCCTCCACCAACCCCTCCGACCCAGCCAACCTCAGCCT 900
E G V E N P N P P T N P P P T Q P T Q P
901 CCCACTCAGCCCACCAATCCCTCCTCCGGTAACGCGCGGCTCGCTATGGTCAATGCGGT 960
P T Q P T N P P P G N C A A R Y G Q C G
961 GGCCAGGGCTGGAACGGCCCCTCATGCTGCCAATCTGGTGCCAGCTGCCAGGTGTC AAC 1020
G Q G W N G P S C C Q S G A S C Q V V N
1021 CAGTGGTACCACAGTGCCTGTAAGcggccgagcctttctaga < 1064
Q W Y H Q C L *

図1-4. PrxA3aシグナル配列とCcEST1タンパク質領域の融合タンパク質をコードしている塩基配列およびアミノ酸配列

下線部はCcEST1 Reverse primerの相補鎖に相当する塩基配列である。

HindIII Xba I
1 aagc**ttt**ctagaATGATGGTAGATAAAGCAATGCATCCGTTAGTTGCATCTCTTTTATT 60
M M V D K A M H P L V A S L F I
EcoR I
61 GTAATCTGGTTTGGAGGATCACTTCCCTATGCCTATGCTGAATTC**CAA**ACCGCTGACCAC 120
V I W F G G S L P Y A Y A **E F** Q T A D H
121 TGGGCCAGTGCGGTGGGAGAGGATTCAGTGGCCCCACCACCTGTGCAAGTGGCGCCGTC 180
W A Q C G G R G F S G P T T C A S G A V
181 TGCACGTGCGTGAATGAGTGGTACTCCAATGCATTCCCGGGTCCAACGCCCTGCTCCT 240
C T V V N E W Y S Q C I P G S N A P A P
241 GCTCCTACCACCACTCAGCC TGCCCTGCTCCCGCCCCAAGCGGGAAGCTCCCATCCAGC 300
A P T T T Q P A P A P A P S G K L P S S
301 TTCAGGTGGAGCTCAGCGGACCCTTGATTGGACCCAAGTCCGACTCTAGGAGGATTCAG 360
F R W S S S G P L I G P K S D S R R I Q
361 GGGATCAAGGATCCATCCGTGGTCTACCACGATGGTCGCTGGCACGTTTTTGCAGCACG 420
G I K D P S V V Y H D G R W H V F A S T
421 GCGAAGACTGAGGGCTACAACCTCGTCTACATCAGCTTCACTGATTGGGCCAAAGCCGGT 480
A K T E G Y N L V Y I S F T D W A Q A G
481 TCCGCATCATTCTACTACCTTGACCAAGCTCCACTTGGGACCGGGTACCGCGCCGCACCC 540
S A S F Y Y L D Q A P L G T G Y R A A P
541 CAGGTGTTCTACTTCGCTCCCGAGCGCTCTGGTATCTTGTGTACAAAACGGCAATGCC 600
Q V F Y F A P Q R L W Y L V Y Q N G N A
601 GCCTACTCTACCAATCCCGACATCAACAACCCGGCCGGATGGACTGCACCCCGCACGTT 660
A Y S T N P D I N N P A G W T A P R T F
661 TACAGTGGCATGCCCGCTATTATTCGCAACAACATCGGCAATGGACTGGGTCGACATG 720
Y S G M P A I I R N N I G N G H W V D M
721 TGGGTCAATTCGCACTCTTCGTTGTGCCACTTGTCTCGTCCGACGACAACGGTCATCTG 780
W V I C D S S L C H L F S S D D N G H L
781 TATCGTCCCAAACCTCCCTCTCCAACCTCCCTAACGGCTTCAACGAGCCCGTCATCGCC 840
Y R S Q T S L S N F P N G F N E P V I A
841 ATGCAGGACTCCAATAAGAAATCGACTCTTCGAGGCCGCCAACGTATATCGCATCGACGGT 900
M Q D S N K N R L F E A A N V Y R I D G
901 AGCAATGAATACC TCCTCCTCCATGAAGCCATCGGCAGCGACGGCAGGAGGTGGTTCAGG 960
S N E Y L L L H E A I G S D G R R W F R
961 TCTTGGACTTCGACCAAGCATTGCAGGCCCTTGGCGTGCCTTGTGACCAAGAGTCAAC 1020
S W T S T S I A G P W R A L A D Q E S N
1021 CCCTTCGCGAGGGCAAACAACGTGGCGTTCACCGGTAATGCGTGGACCAGAGACATCAGC 1080
P F A R A N N V A F T G N A W T R D I S
1081 CACGGTGAGCTGATCCGCGAGTGGAAACGACCAGACCC TCCAATCAGCCATGCAATCTT 1140
H G E L I R S G N D Q T L P I S P C N L
1141 CGCTACCTCTACCAGGGTCTTGACCCCAACTC TGGCGGCGATTACAACAGCCTTCCCTGG 1200
R Y L Y Q G L D P N S G G D Y N S L P W
Not I Xba I
1201 AAGCTCGGTCTTCTTACTCAAACCAACTCTGCTTGTTAAg**cg**g**cc**g**cc**agc**tt** **t**ctaga 1259
K L G L L T Q T N S A C *

図1-5. PrxA3aシグナル配列とCcAbf62Aタンパク質領域の融合タンパク質をコードしている塩基配列およびアミノ酸配列

下線部はCcAbf62A Reverse primerの相補鎖に相当する塩基配列である。

表 1-1. *prxA3a*、*CcEST1*、*CcAbf62A* 用プライマーの配列

プライマー名	塩基配列
<i>prxA3a</i> Forward primer	5'-GAAAGCTTTCTAGAATGATGGTAGATAAAGCAATGC-3' <i>Hind</i> III <i>Xba</i> I
<i>prxA3a</i> Reverse primer	5'-AGGAATTCAGCATAGGCATAGGGAAGTGAT-3' <i>Eco</i> RI
<i>CcEST1</i> Reverse primer	5'-TTCTCAACACCTTCATAGATAGCAC-3'
<i>CcAbf62A</i> Reverse primer	5'-TTAACAAGCAGAGTTGGTTTGAGTA-3'

表 1-2. MS basal 培地

Major minerals	
NH ₄ NO ₃	1,650 mg/L
KNO ₃	1,900 mg/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440 mg/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370 mg/L
KH ₂ PO ₄	170 mg/L
Minor minerals	
MnSO ₄	22.3 mg/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6 mg/L
H ₃ BO ₃	6.2 mg/L
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 mg/L
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025 mg/L
Na ₂ MoO ₂ · 2H ₂ O	0.25 mg/L
KI	0.83 mg/L
Iron source	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8 mg/L
EDTA · 2Na · 2H ₂ O	37.8 mg/L
Organic additives	
<i>myo</i> -inositol	100 mg/L
Thiamine hydrochloride	0.1 mg/L
Pyridoxine hydrochloride	0.5 mg/L
Nicotinic acid	0.5 mg/L
Glycine	2 mg/L
Carbon source	
Sucrose	30,000 mg/L

表 1-3. イネ発根培地(MS 培地)

In MS basal 培地

Gelrite	4,000 mg/L
---------	------------

NaOH で pH5.8 に調整した。

表 1-4. 抗生物質ストック溶液 (× 1,000)

Hygromycin B	50 mg/mL : DW
--------------	---------------

フィルター滅菌後、-20°Cで保存した。

表 1-5. 中性ディタージェント溶液

Sodium dodecyl sulfate	30 g/L
EDTA · 2Na · 2H ₂ O	18.61 g/L
Sodium borate · 10H ₂ O	6.81 g/L
Disodium hydrogen phosphate	4.56 g/L
Ethylene glycol monoethyl ether	10 mL/L

表 1-6. 酸性ディタージェント溶液

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	20 g/L
1 N H ₂ SO ₄	1 L

表 1-7. 酢酸 buffer (pH4.0)

CH ₃ COOH	4.86 g/L
CH ₃ COONa · 3H ₂ O	2.58 g/L

1-3 実験方法

1-3-1 形質転換イネ後代の選抜および生育

形質転換イネの T₃ 世代種子を、ハイグロマイシン(表 1-4)を 50 mg/L になるように加えた MS 培地(表 1-3)に無菌播種して人工気象器内で 2 週間程度生育し、発芽しなかった種子や白化した個体を取り除くことで遺伝子が導入されている個体のみを選抜した。選抜した個体をイネ用に配合した土(黒土 : 赤玉土 : 鹿沼土 = 6 : 3 : 1 (v : v : v))に移植し、人工気象器内で生育させた。生育条件は明期:11 時間 28°C、暗期 : 13 時間 25°Cの短日条件とした。WT についてはハイグロマイシンによる選抜の代わりに、種子を数日間水に漬けて発芽させた後、土に移植して形質転換イネと同じ条件で生育させた。

1-3-2 形質転換イネの PCR 解析

形質転換イネから若葉を一枚取って-80°Cで凍結し、同様に-80°Cで冷凍しておいた乳棒と乳鉢で粉碎後、QIAGEN の DNeasy Plant Mini Kit を用いて DNA 抽出を行った。一連の操作はキットのプロトコルに従った。

抽出した DNA を鋳型として *Taq* DNA polymerase を用いて PCR を行い、*CcEST1* および *CcAbf62A* がイネゲノム中に導入されているかどうかを確認した。PCR の反応液組成および反応条件については以下のようにした。*CcEST1* の導入の確認に *prxA3a* Forward primer と *CcEST1* Reverse primer のセットが、*CcAbf62A* の導入の確認に *prxA3a* Forward primer と *CcAbf62A* Reverse primer のセットが用いられた(表 1-1)。

PCR 反応液組成

DDW	15.7 μ L
10 \times Thermopol buffer	2.0 μ L
10 mM dNTPs	0.4 μ L
10 μ M Forward primer	0.4 μ L
10 μ M Reverse primer	0.4 μ L
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.1 μ L
Template DNA	1.0 μ L
Total Volume	20.0 μ L

PCR 反応条件

Pre-heating	94°C	30 sec
	↓	
Denaturing	94°C	30 sec
Annealing	55°C	30 sec
Extension	68°C	90 sec
	↓	\times 35 Cycles
Post heating	68°C	5 min
Cooling down	10°C	∞

1-3-3 ディタージェント分析法による細胞壁成分の定量

細胞壁成分の定量法として、飼料作物の品質判定法であるディタージェント分析法を用いた[30][31]。登熟期の稲わらを採取し、サンプル量の確保のために系統ごとに複数の個体の稲わらをまとめて1サンプルとして扱った。稲わらから穂、葉、および根を取り除いて茎のみを75°Cで一晩乾燥させた。乾燥後の茎をミルで粉碎した後ふるいにかけて、直径0.5 mm以下の粉末を取得して粉末サンプルとして分析に供した。

中性ディタージェント溶液による処理

粉末サンプルを 0.20 g 精秤して(W1) 100 mL 容三角フラスコにとり、中性ディタージェント溶液(表 1-5) 40 mL を加えて 1 時間煮沸した。煮沸後、秤量済みの定量濾紙を用いて吸引ろ過を行い、十分に熱水で洗浄した後、アセトンで 3 回洗浄した。残渣を秤量済みのろつぼに移して 105°C で乾燥させた後、ろつぼ、濾紙ごと秤量して残渣の重量を測定した(W2)。最後にマッフル炉で 550°C、2 時間灰化して灰分の値を測定した(W3)。

酸性ディタージェント溶液および 72%硫酸による処理

粉末サンプルを 0.20 g 精秤して(W4) 100 mL 容三角フラスコにとり、酸性ディタージェント溶液(表 1-6) 40 mL を加えて 1 時間煮沸した。煮沸後、秤量済みの 1G3 ガラスろ過器を用いて吸引ろ過を行い、十分に熱水で洗浄した後、アセトンで 3 回洗浄した。残渣を 105°C で乾燥させた後、ガラスろ過器ごと秤量して残渣の重量を測定した(W5)。次にガラスろ過器を 100 mL 容ビーカーの中へと移して 72%(w/w) 硫酸 20 mL を加え、ガラス棒を用いて 30 分おきに攪拌しながら 3 時間室温で処理した。処理後、RO 水を用いてサンプルおよび硫酸を 500 mL 容ビーカーに洗い込み、硫酸を十分に希釈した後、秤量済みの定量濾紙を用いて吸引ろ過を行った。ろ液が酸性を示さなくなるまで RO 水で洗浄し、濾紙ごと秤量済みのろつぼに移した。残渣を 105°C で一晩乾燥させた後、ろつぼ、濾紙ごと秤量して残渣の重量を測定した(W6)。最後に濾紙とサンプルをマッフル炉で 550°C、2 時間灰化して灰分の値を測定した(W7)。

中性ディタージェント繊維(NDFom; Neutral detergent fiber)、酸性ディタージェント繊維(ADFom; Acid detergent fiber)、酸性ディタージェントリグニン(ADL; Acid detergent lignin)の含量は以下の式を用いて計算した。

$$\text{NDFom} = (\text{W2} - \text{W3}) / \text{W1} \times 100$$

$$\text{ADFom} = (\text{W5} - \text{W7}) / \text{W4} \times 100$$

$$\text{ADL} = (\text{W6} - \text{W7}) / \text{W4} \times 100$$

定量された NDFom、ADFom、ADL の間には以下のような関係があり、ヘミセルロース量やセルロース量を算出することができる。

NDFom (Neutral detergent fiber)			Hemicellulose
	ADFom(Acid detergent fiber)		Cellulose
		ADLom(Acid detergent lignin)	Lignin
Ash			Silica

Hemicellulose 量 (% DM) = NDFom - ADFom

Cellulose 量 (% DM) = ADFom - ADL

1-3-4 *in vitro* での飼料消化率(IVDMD; *in vitro* dry matter digestibility)の測定

細胞壁に含まれる多糖類の利用性について評価するために、*in vitro* での飼料消化率(IVDMD)の測定を行った[31]。1-3-3 で作製した粉末サンプル 0.2 g を精秤して (W1)100 mL 容メディウム瓶にとり、5% 亜硫酸ナトリウム溶液 50 mL を加えて懸濁して 30 分間煮沸した。煮沸後、サンプルを 1G3 ガラスろ過器でろ過し、RO 水、熱湯、酢酸 buffer (表 1-7) の順に洗浄した。洗浄されたサンプルを 50 mL 容コニカルチューブに移し、セルラーゼ「オノズカ」を 0.2%(w/v)となるように加えた酢酸 buffer 45 mL を加えて 40°C で 8 時間振盪して酵素処理を行った。処理後、秤量済みの濾紙を用いて吸引ろ過を行い、残渣を RO 水で洗浄した。最後に、洗浄された残渣を秤量済みのろつぼに濾紙ごと移して 105°C で一晩乾燥した後、重量を測定した(W2)。

IVDMD は以下の式を用いて算出した。

$$\text{IVDMD (\%)} = (1 - W2 / W1) \times 100$$

1-3-5 アルカリ脱リグニン効率の測定

脱リグニン処理の方法はいくつか存在するが、本研究ではアルカリ蒸解を用いた場合の脱リグニン効率について分析を行った。まず、アセチルブロマイド(AcBr)法を用いてサンプル中のリグニン含量を測定し[32]、その後、サンプルをアルカリ処理して溶出リグニン量を測定することで[33][34]、稲わらのアルカリ脱リグニン効率を評価した。

AcBr 法によるリグニン含量測定

1-3-3 で作製された粉末サンプル 1.0 g を 100 mL 容メディウム瓶にとり、80% エタノール 50 mL を加えて 1 時間煮沸した。エタノールを交換してこの操作を 3 回繰り返し、エタノール可溶性成分を除去したものを脱脂サンプルとした。ネジキャップ付き試験管に脱脂サンプル 10 mg を精秤し、25%(v / v) AcBr/酢酸溶液 0.5 mL を加えて 70°C、30 分間反応させた。反応後すぐに氷冷し、2 M NaOH 0.9 mL、5 M HONH₃Cl(塩化ヒドロキシルアンモニウム) 0.1 mL、99.7%(v/v) 酢酸 5 mL を加えて 500 × g、1 分間遠心した。上清を酢酸で適当な濃度に希釈して 280 nm 吸光度を分光光度計で測定した。リグニン標準品として TCI 製の Lignin (Alkaline)標準品を用いて検量線を作製して、算出されたサンプル中のリグニン量をIとした。

アルカリ脱リグニン処理

ネジキャップ付き試験管に脱脂サンプル 50 mg を精秤し、0.5 M NaOH 5 mL を入れて、管内をアルゴンガスで満たして密閉し、30°Cで 24 時間振盪した。500 × g、15 分間遠心し、上清を酢酸で適当な濃度に希釈して分光光度計で 280 nm の吸光度を測定した。Lignin (Alkaline)標準品を用いて検量線を作製して、算出された上清のリグニン量をIIとした。

アルカリ脱リグニン効率は以下の式で算出した。

$$\text{アルカリ脱リグニン効率 (\%)} = \text{II} / \text{I} \times 100$$

1-4 結果・考察

1-4-1 形質転換イネ後代の表現型

アグロバクテリウム法を用いて pActEST、pActAbf コンストラクトを導入して得られた形質転換イネ pActEST、pActAbf 系統の世代促進を行い、T₃ 世代の種子を獲得した。本研究における分析は T₃ 世代の種子を、ハイグロマイシン 50 mg/L を加えた MS 培地上で選抜し、登熟期まで生育させた植物体を用いて行った。

pActEST、pActAbf の両系統について表現型を WT と比較したところ(図 1-6)、生育に大きな差は見られなかった。先行研究で作出された pIG121-GUS(-)-Abf 系統では強度の矮化や多分げつ体化が確認され[24]、順化過程で枯死してしまったため種子形成まで至らなかったが、pActAbf では同様の生育阻害は T₀ 世代から T₃ 世代を通して見られなかった。この結果は、遺伝子上流のプロモーターが CaMV 35S プロモーターから rice *Act1* プロモーターに変更されたことにより遺伝子発現パターンが変化したことで、CcAbf62A によって生じていた生育阻害が起こらなくなったことを示唆している。セルロースの糖化効率が向上しても、植物体の矮化が起きてしまうのであれば、全体のバイオマス量は減少し、バイオマスの利用性向上には至らない[11][35]。そのため、pActEST および pActAbf の両系統で矮化が起こらなかったことは、LCC 分解系酵素の導入によるイネの易脱リグニン化を目指す上で望ましい結果であるといえるだろう。

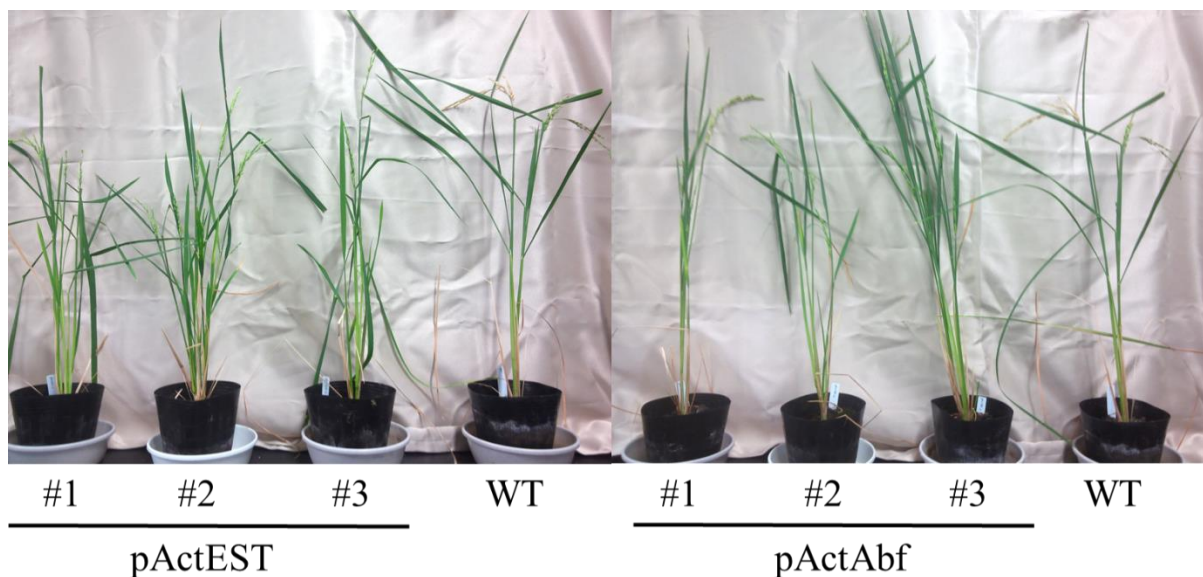


図 1-6. 形質転換イネの表現型の比較

T₃ 世代の pActEST、pActAbf 両系統と WT の表現型を登熟期において比較した。

1-4-2 形質転換イネの PCR 解析

T₃ 世代の形質転換イネからゲノム DNA を抽出し、PCR によって遺伝子導入を確認した。PrxA3a シグナル配列に対応する塩基配列と、*CcEST1*、*CcAbf62A* のコードしているタンパク質の C 末端側に近い領域の塩基配列の相補鎖をプライマーとして用いて反応を行った。アガロースゲル電気泳動を行った結果、pActEST、pActAbf からそれぞれ導入された遺伝子の配列と考えられる推定 856 bp、1,241 bp のバンドが確認された(図 1-7)。この結果から、pActEST、pActAbf 両系統に導入された遺伝子について、一過性の導入ではなく、各遺伝子がイネゲノム中に組み込まれて安定して後代に受け継がれていることが確認された。

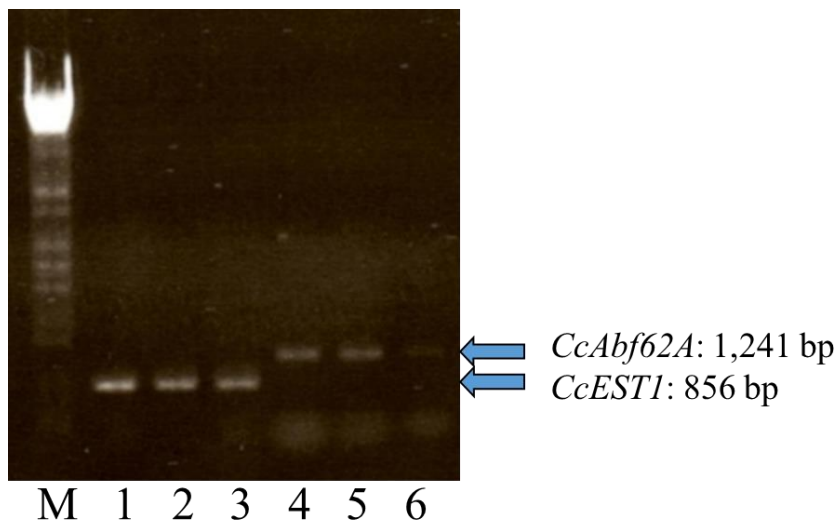


図 1-7. 形質転換イネのゲノム PCR

M. *λEcoT14I* 1. pActEST#1 2. pActEST#2 3. pActEST#3

4. pActAbf#1 5. pActAbf#2 6. pActAbf#3

1-4-3 ディタージェント分析法による細胞壁成分の定量

ディタージェント分析の結果は表 1-8 に示した。いくつかの成分について、形質転換イネと WT との間に有意差が見られた。まず、NDFom については pActEST で有意に減少していた。NDFom はヘミセルロース、セルロース、リグニンの 3 要素を全て含む植物細胞中の構造成分の総量を示しており、NDFom の減少はバイオマス量の減少を意味する。しかし、ADFom については pActEST では WT と変わらない値で、pActAbf では有意に増加していた。ADFom は NDFom からヘミセルロースを抜いた値を示しており、大部分はセルロースからなる。pActEST では NDFom は減少していたが ADFom は減少しておらず、バイオマスの産業利用における主要成分であるセルロースの蓄積量にはあまり影響は無いと考えられる。また pActAbf ではセルロースが WT よりも多く蓄積されていると考えられ、バイオマスの利用性向上という目的にとって好ましい結果が得られた。一方で、ADL については両形質転換イネについて WT との有意差は見られなかった。これは LCC 分解系酵素の発現はリグニン含量自体には影響を与えないであろうという予想と一致する結果であった。また、灰分についても pActEST で有意な増加が見られ

た。イネは地中からケイ酸類を吸収して植物体の構造強化に利用する性質を持っており、主にこのケイ酸類が灰分として検出される。pActEST で見られた NDFom の減少、すなわち構造多糖類の減少と関連して、それを補う形でケイ酸類の吸収が促進された可能性が考えられる。

表 1-8. ディタージェント法により測定した細胞壁成分(%)

	NDFom(%)	ADFom(%)	ADL(%)	灰分(%)
WT	68.5 ± 0.1	41.7 ± 1.3	4.7 ± 0.2	5.8 ± 0.4
pActEST	66.2 ± 0.5 *	42.1 ± 0.4	4.5 ± 0.4	7.1 ± 0.1 *
pActAbf	69.3 ± 1.0	45.7 ± 1.5 *	4.8 ± 0.4	6.6 ± 0.3

各数値は 3 回測定平均 ± 標準偏差で表記した。Student の *t* 検定を用いて pActEST と WT 間、および pActAbf と WT 間で検定を行い、有意水準 5% ($p < 0.05$) で有意差があった数値を*で示した。

1-4-4 *in vitro* での飼料消化率(IVDMD)の測定

IVDMD 測定の結果は図 1-8 に示した。IVDMD の値は WT、pActEST、pActAbf でそれぞれ 43.7%、49.0%、46.2%であり、pActAbf と WT の間では IVDMD に有意差は見られなかったが、pActEST では WT と比較して有意に IVDMD が向上していた。ディタージェント分析法で測定した系統間のリグニン含量の差は僅かなものであり、リグニン含量の差が IVDMD に与える影響はほぼ無いものと考えられる。その上で pActEST の IVDMD が高い傾向にあったことは、CcEST1 の発現によって構造多糖類とリグニンとの間の結合が減少し、構造多糖類とセルラーゼとの反応性が向上した可能性を示唆している。

pActEST および pActAbf は LCC 分解系酵素を生産しながらも、WT と同様に生育でき、更に pActEST では飼料消化率が向上している可能性が示された。そのため、導入するコンストラクトの改良や優良なクローンの選抜を行うことで、これらの LCC 分解系酵素導入イネを消化効率の良い飼料イネや、バイオエタノールを効率よく生成できる生物資源として利用することも期待できる。

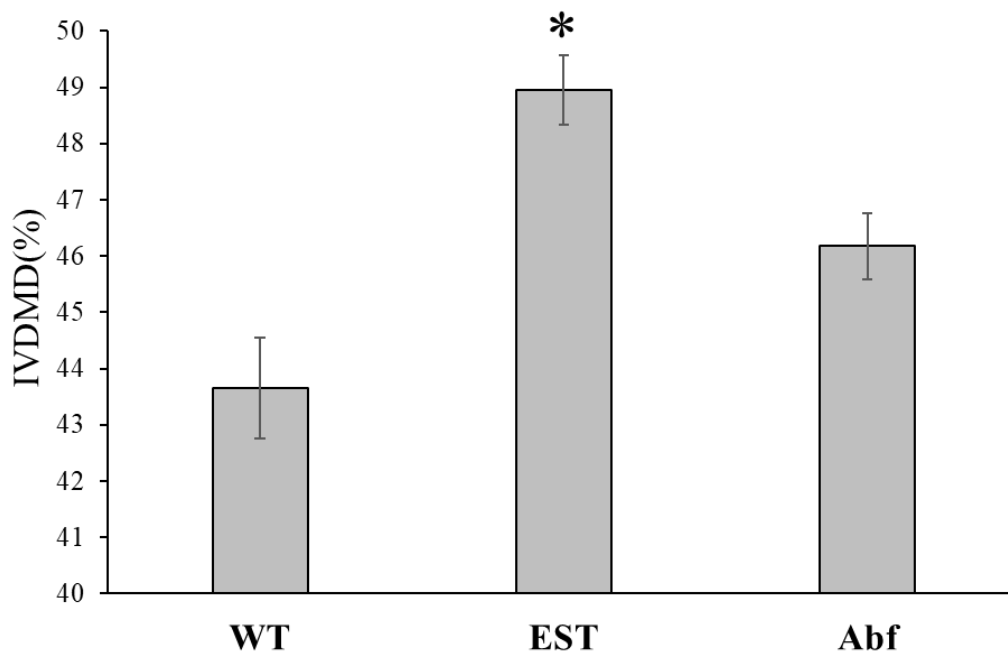


図 1-8. IVDMD の測定

各数値は 3 回測定平均 ± 標準偏差で表記した。Student の *t* 検定を用いて pActEST と WT 間、および pActAbf と WT 間で検定を行い、有意水準 5% ($p < 0.05$) で有意差があった数値を*で示した。

1-4-5 アルカリ脱リグニン効率の測定

AcBr 法およびアルカリ処理を行い、形質転換イネの脱リグニン効率を評価した。AcBr 法によるリグニン含量の測定結果は図 1-9 に、アルカリ脱リグニン効率の測定結果は図 1-10 に示した。

AcBr リグニン含量は WT、pActEST、pActAbf でそれぞれ 19.0%、18.7%、19.0% であり、有意差は見られなかった。なお、AcBr 法では酢酸に可溶性リグニン含量を測定し、ADL は 72% 硫酸に不溶性リグニン含量を測定するため、それらの値は大きく異なる。AcBr リグニン、ADL の両方で形質転換体と WT の間でリグニン含量は変化しないという結果が得られたことから、LCC 分解系酵素の導入によってリグニン含量の減少は起こらないという仮説が更に支持された。

しかしながら、アルカリ脱リグニン効率は WT、pActEST、pActAbf 系統でそれ

ぞれ 70.4%、67.4%、70.9%と有意差は見られなかった。更に pActEST 系統についてはむしろ WT よりも脱リグニン効率が低くなる傾向も見られた。この結果は LCC 分解系酵素の導入によって細胞壁中の LCC が減少することで、リグニンとアルカリ試薬との反応性が上がり、脱リグニン効率が向上するという予想に反する結果であった。このような結果が得られた理由として、本研究で使用した 0.5 M NaOH 中での 30°C、24 時間処理の条件ではリグニンの溶出率が高いため有意差が出にくかった可能性が考えられる。より弱い反応条件でアルカリ処理を行った場合に有意差が出るかどうかの検証や、他の脱リグニン処理法についての検討などを行う必要がある。

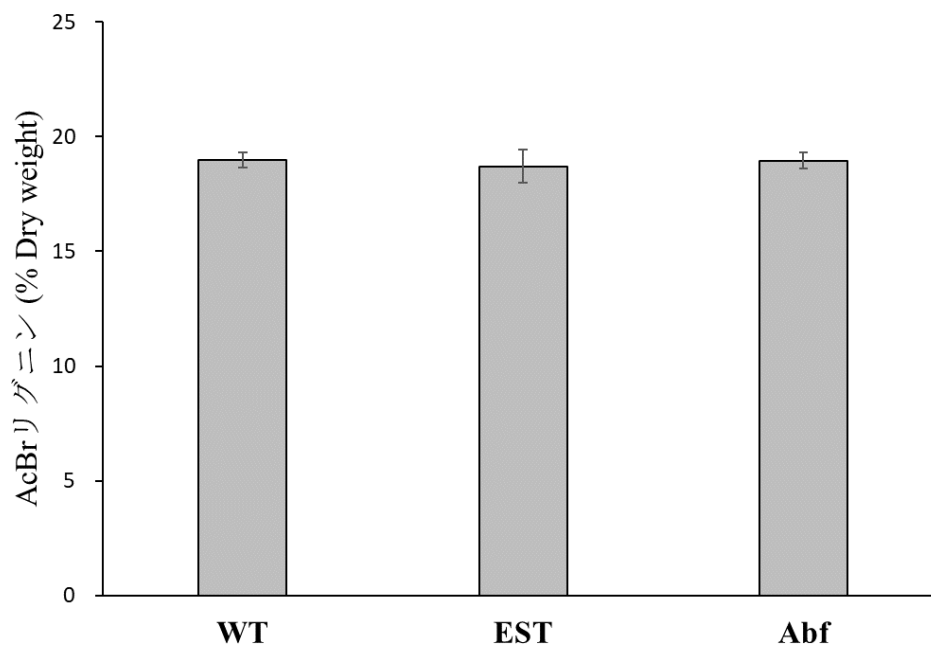


図 1-9. AcBr リグニン含量の測定

各数値は 3 回測定平均 ± 標準偏差で表記した。Student の *t* 検定を用いて pActEST 系統と WT 間、および pActAbf 系統と WT 間で検定を行ったが、有意水準 5% ($p < 0.05$) で有意差は確認されなかった。

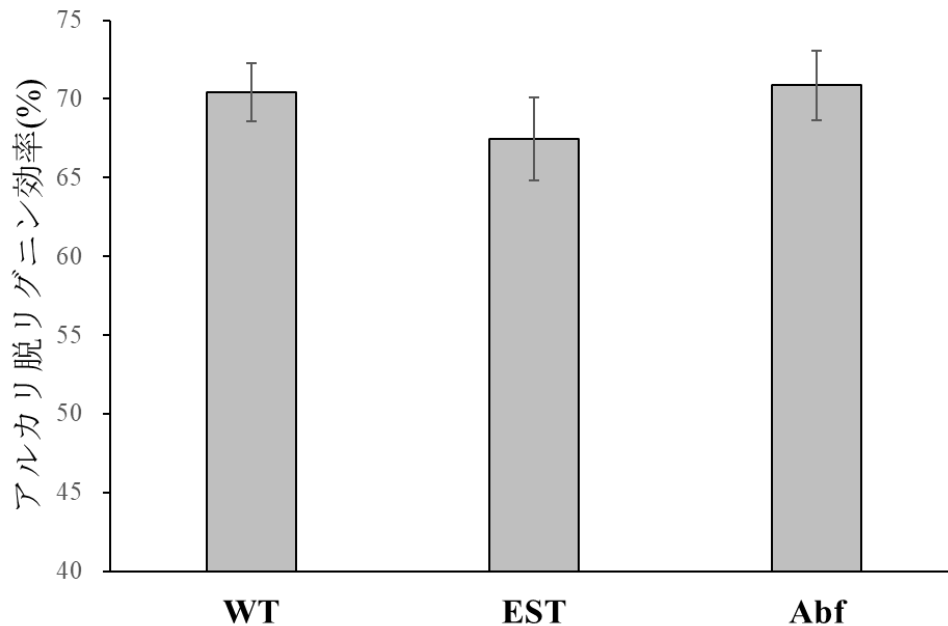


図 1-10. アルカリ脱リグニン効率測定

各数値は 3 回測定平均 ± 標準偏差で表記した。Student の *t* 検定を用いて pActEST 系統と WT 間、および pActAbf 系統と WT 間で検定を行ったが、有意水準 5% ($p < 0.05$) で有意差は確認されなかった。

1-5 まとめ

pActnos/Hm2 ベクターを用いて LCC 分解系酵素 *CcEST1* および *CcAbf62A* を導入して作出された形質転換イネ、pActEST 系統および pActAbf 系統の T₃ 世代について評価・分析を行った。pActEST および pActAbf の両系統について、伸長成長の阻害や不稔などの生育への悪影響は見られず、またリグニン含量についても ADL、AcBr リグニンの両方について測定を行ったが WT との間に有意差は見られなかった。ディタージェント分析法の結果、pActEST 系統で WT と比較して僅かに NDFom の減少、すなわちヘミセルロース含量の減少が確認されたが、ADFom については pActEST 系統では WT と同等、pActAbf 系統では WT よりも有意に高い値を示し、セルロース含量に関して減少は見られなかった。

pActEST および pActAbf 系統ではセルロース含量やリグニン含量の減少が確認されなかったことから、その上で飼料消化率や脱リグニン効率が向上していれば植物

バイオマスとしての利用性も高くなったといえると考え、これらについて分析を行った。飼料消化率の評価のために測定した IVDMD については、pActEST 系統で WT よりも有意に高い値が示された。この結果は、先行研究において真菌類由来のフェルロイルエステラーゼをオニウシノケグサに発現させた系統で高い細胞壁消化率が確認されたこと[19]とも一致しており、フェルラ酸-多糖間の結合を切断する酵素の発現は、草本類において多糖類の利用性を向上させると考えられる。しかしながら、pActEST、pActAbf 両系統で脱リグニン効率に関しては向上が確認されず、pActEST 系統では WT よりも低い傾向も見られた。

LCC 分解系酵素の生産により、pActEST 系統では飼料消化率の向上、pActAbf 系統ではセルロース含量の増加と、飼料特性の向上が見られた。しかし、その効果はそれほど大きくはなく、個体間での数値のばらつきも見られた。同じコンストラクトを導入した形質転換植物であっても、挿入位置やコピー数の違いによってその性質は変化する。そのため、多くの形質転換系統を作出して有用なクローンを選抜することで、より高い飼料消化率や脱リグニン効率を持った pActEST、pActAbf 系統が得られる可能性も考えられる。また、pActEST、pActAbf 系統では WT との表現型の変化は確認されなかったが、先行研究で作出された pIG121-GUS(-)-Abf 系統のように表現型が変化した系統では、導入した LCC 分解系酵素がより強力に作用していると推測できる。そこで、*CcEST1*、*CcAbf62A* を組み込んだ他のコンストラクトについてもイネへの導入を行い、その影響について検証を進めていくことが望まれる。

第 2 章 LCC 分解系アラビノフラノシダーゼの導入によるイネの矮化と多分げつ体化

2-1 緒言

先行研究において本研究室の浅田により、レポーター遺伝子による導入遺伝子の発現への影響を無くすために、バイナリーベクター pIG121-Hm[36] からレポーター遺伝子である β -グルクロニダーゼ(GUS)の遺伝子、*uidA* の配列を除去された pIG121-GUS(-)が作出された[22]。そして先行研究において本研究室の品川により、pIG121-GUS(-)をベクターとして *CcAbf62A* がイネに導入された系統、pIG121-GUS(-)-Abf 系統の作出が試みられ、1 系統が分化・再生した[24]。しかし、得られた pIG121-GUS(-)-Abf 系統は伸長成長が非常に遅く、芝生状に多数の芽が広がるように成長し(図 1-1)、そして順化過程において枯死してしまった。先行研究においてタバコに pIG121-GUS(-)-Abf コンストラクトを導入した系統では表現型の変化は確認されなかった[23]ことから、これらの表現型の変化は、*CcAbf62A* の基質であるアラビノキシランを多く含むイネ科草本において特異的に起こるものだと推測された。また、第 1 章で作出された pActAbf 系統では同様の表現型の変化は確認されておらず、同じく *CcAbf62A* を導入したイネでも発現ベクターの違い、すなわち導入遺伝子上流の発現用プロモーターの違いにより表現型の違いが生じることが示唆された。発現用プロモーターは pActnos/Hm2 では rice *Act1* プロモーター、pIG121-GUS(-)では CaMV 35S プロモーターである。rice *Act1* プロモーターは、CaMV 35S プロモーターよりもイネにおいて安定して高い発現量を持つとされている[26]が、*CcAbf62A* の導入においては CaMV 35S プロモーターを用いて発現させた場合にのみ表現型を変化させるほどの強い影響が確認された。

CcAbf62A の導入によるイネの矮化および多分げつ体化は非常に興味深い現象であったが、先行研究においては十分な個体数を得ることができず、順化および分析を行うことが出来なかった。イネの矮化や多分げつ体化が *CcAbf62A* の導入により引き起こされるとするならば、*CcAbf62A* をイネの倒伏耐性の向上や収穫量の増加に役立てることも可能であろう。そこで、本章では改めて多数の pIG121-GUS(-)-Abf 系統の作出・順化を行い、矮化および多分げつ体化が生じたメカニズムの解明へと

つなげることを目指した。

2-2 実験材料

供試植物

形質転換用の供試植物としてイネ(日本晴れ)*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare を使用した。コントロールとして、先行研究で空ベクター pActnos/Hm2 を導入されて作出された形質転換イネ pActnos 系統の T₃ 世代を用いた[25]。pActnos/Hm2 は pIG121-GUS(-)と同じ薬剤耐性遺伝子 *nptII* および *hpt* を持つ。

使用菌株

Escherichia coli XL10-Gold 株 および *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 株を用いた。

導入したコンストラクト

形質転換用バイナリーベクターとして当研究室の浅田が先行研究で作製した pIG121-GUS(-) (pIG121-Hm から *uidA* 配列を除去したもの)を使用した。pIG121-GUS(-)に *CcAbf62A* が挿入されて構築されたプラスミドを pIG121-GUS(-)-Abf と命名した。コンストラクトの詳細を図 2-1 に示す。遺伝子の詳細については 1-2-2 に記載した。

PCR 用プライマー

形質転換イネの遺伝子導入の確認に用いたプライマーの配列は表 1-1 に示した。

使用した培地および試薬

培地および試薬の組成については表 1-2 から表 1-6、および表 2-1 から表 2-20 に記載した。アグロバクテリウムの培養に YEP および AB 培地、イネの形質転換に N6 および MS を基本としたいくつかの培地を使用した。抗生物質に関してはカナマイシン、ハイグロマイシンを、使用濃度の 1,000 倍濃度で調製してフィルター滅菌したものをストック溶液とし、必要に応じてオートクレーブ後に培地に添加した。

植物ホルモンに関しても同様にストック溶液を調製し、必要に応じて 2,4-D はオートクレーブ前に、NAA およびカイネチンはオートクレーブ後に培地に添加した。

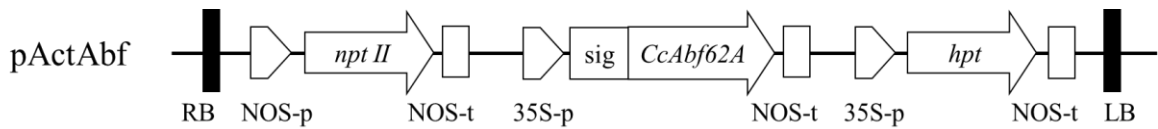


図 2-1. 使用したプラスミド pIG121-GUS(-)-Abf の T-DNA 領域

RB: 右境界配列、LB: 左境界配列、NOS-p: ノパリン合成酵素遺伝子プロモーター、35S-p: CaMV 35S プロモーター、NOS-t: ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター、*nptII*: カナマイシン耐性遺伝子、*hpt*: ハイグロマイシン耐性遺伝子、*sig*: PrxA3a シグナル配列部分に相当する塩基配列、*CcAbf62A*: イントロンが除かれた *CcAbf62A* の塩基配列。

表 2-1. LB 培地

Bacto-tryptone	1.0%
Bacto-yeast extract	0.5%
Sodium chloride	1.0%

必要に応じて agar を 1.5% になるように加えた。

表 2-2. TF Low buffer

MOPS (Morpholinopropane sulfonic acid)(pH7.0)	10 mM
RbCl	10 mM

表 2-3. TF High buffer

MOPS (Morpholinopropane sulfonic acid)(pH6.5)	0.1 M
CaCl ₂	50 mM
RbCl	10 mM

表 2-4. SOC 培地

NaCl	0.5 g/L
Bacto-tryptone	20 g/L
Bacto-yeast extract	5 g/L
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

NaOH で pH7.0 に調整した。

表 2-5. YEP 培地

Bacto-peptone	1.0%
Bacto-yeast extract	1.0%
Sodium chloride	0.5%

必要に応じて agar を 1.5%になるように加えた。

表 2-6. 10%グリセロール溶液

A	
Sucrose	93.1 g
Glycerol	100 mL
Milli-Q 水	up to 800 mL
B	
2 M MgCl ₂	500 μ L
Milli-Q 水	up to 200 mL

A 液、B 液をオートクレーブし冷えた後、無菌的に混ぜた。

表 2-7. AB basal 培地

Mineral salt	
NH ₄ Cl	1,000 mg/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	300 mg/L
KCl	150 mg/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10 mg/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2.5 mg/L
Buffer	
K ₂ HPO ₄	3,000 mg/L
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,300 mg/L

表 2-8. アグロバクテリウム前培養用培地(AB 培地)

In AB basal 培地

Glucose	5,000 mg/L
Bacto-agar	15,000 mg/L

NaOH で pH7.2 に調整した。

表 2-9. N6 basal 培地

Major minerals	
(NH ₄) ₂ SO ₄	463 mg/L
KNO ₃	2,830 mg/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	166 mg/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	185 mg/L
KH ₂ PO ₄	400 mg/L
Minor minerals	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4.4 mg/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.5 mg/L
H ₃ BO ₃	1.6 mg/L
KI	0.8 mg/L
Iron source	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8 mg/L
EDTA · 2Na · 2H ₂ O	37.3 mg/L
Organic additives	
Thiamine hydrochloride	1.0 mg/L
Pyridoxine hydrochloride	0.5 mg/L
Nicotinic acid	0.5 mg/L
Glycine	2.0 mg/L

表 2-10. N6D 培地

In N6 培地

Sucrose	30,000 mg/L
Casamino acids	300 mg/L
L-Proline	2,878 mg/L
2,4-D	2.0 mg/L
Gelrite	4,000 mg/L

NaOH で pH5.8 に調整した。

表 2-11. 2N6-AS 培地

In N6 培地

Sucrose	30,000 mg/L
Casamino acids	300 mg/L
<i>myo</i> -inositol	200 mg/L
Glucose	10,000 mg/L
2,4-D	2.0 mg/L
Acetosyringone	20 mg/L
Gelrite	4,000 mg/L

NaOH で pH5.2 に調整した。

表 2-12. AA basal 培地

Major minerals	
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	150 mg/L
KCl	2,950 mg/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	150 mg/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250 mg/L
Minor minerals	
MgSO ₄ · 4H ₂ O	10 mg/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg/L
H ₃ BO ₃	3 mg/L
KI	0.75 mg/L
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25 mg/L
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025 mg/L
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 mg/L
Iron source	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8 mg/L
EDTA · 2Na · 2H ₂ O	37.3 mg/L
Organic additives	
Thiamine hydrochloride	10 mg/L
Pyridoxine hydrochloride	1 mg/L
Nicotinic acid	1 mg/L
<i>myo</i> -inositol	100 mg/L
Amino acids	
L-Glutamine	876 mg/L
L-Aspartic acid	266 mg/L
L-Arginine	174 mg/L
Glycine	7.5 mg/L

表 2-13. AAM 溶液

In AA 培地

Sucrose	68,500 mg/L
Casamino acids	500 mg/L
Glucose	36,000 mg/L
Acetosyringone	100 mg/L

NaOH で pH5.2 に調整した。

表 2-14. イネシュート形成培地(REIII培地)

In MS basal 培地

Sorbitol	30,000 mg/L
Casamino acids	2,000 mg/L
NAA	0.02 mg/L
Kinetin	2.0 mg/L
Gelrite	4,000 mg/L

NaOH で pH5.8 に調整した。

表 2-15. 植物ホルモン・ストック溶液

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	2 mg/mL: DMSO
Acetosyringone	100 mg/mL: DMSO
Kinetin	2 mg/mL: 1 N NaOH
1-Naphthylacetic acid (NAA)	1 mg/mL: 1 N NaOH

フィルター滅菌後、4°Cで保存した。

表 2-16. 抗生物質ストック溶液 (×1,000)

Kanamycin sulfate	15 mg/mL: DW
Carbenicillin sodium salt	250 mg/mL: DW

フィルター滅菌後、-20°Cで保存した。

表 2-17. 2 × CTAB 溶液

CTAB	20.0 g/L
1 M Tris-HCL (pH 8.0)	100 mL/L
NaCl	82.0 g/L
EDTA · 2Na · 2H ₂ O	7.45 g/L

1 × CTAB 溶液は 2 × CTAB 溶液を 2 倍希釈して作製した。

表 2-18. CTAB 沈殿 buffer

CTAB	10.0 g/L
1 M Tris-HCL (pH 8.0)	50 mL/L
EDTA · 2Na · 2H ₂ O	3.75 g/L

表 2-19. TE buffer

Tris-HCl (pH8.0)	10 mM
EDTA · 2Na · 2H ₂ O	1 mM

NaCl-TE buffer は TE buffer に NaCl を 58.4 g/L 加えて作製した。

表 2-20. 10% CTAB 溶液

CTAB	100 g/L
NaCl	41 g/L

2-3 実験方法

2-3-1 アグロバクテリウム法によるイネの形質転換

アグロバクテリウム法を用いてイネに pIG121-GUS(-)-Abf コンストラクトの導入を行った[37]。用いたアグロバクテリウム(*Rhizobium radiobacter*)EHA105 株はカナマイシン耐性を持つ EHA101 株から耐性遺伝子が除かれた系統である。

大腸菌コンピテントセルの作成

大腸菌を LB 液体培地(表 2-1) 10 mL で 37°C、一晩振盪培養した(前培養)。前培養液 100 μ L を新しい LB 液体培地に移して 37°C、2.5 時間振盪培養した。培養液を 15 mL 容コニカルチューブに無菌的に移して 4,000 rpm、5 分間、0°C で遠心した後、上清を捨てて氷上に静置した。菌体に TF Low buffer(表 2-2) 5 mL を加えて懸濁し、4,000 rpm、5 分間、0°C で遠心した後、上清を捨てた。次に、TF High buffer(表 2-3) 5 mL を加えて懸濁し、氷上で 0.5–1 時間静置した後、4,000 rpm、5 分間、0°C で遠心して上清を捨てた。最後に、グリセロールを終濃度 10% になるように加えた TF High buffer 1 mL に菌体を懸濁した。懸濁液を氷冷マイクロチューブに 100 μ L ずつ分注し、-80°C で凍結保存してコンピテントセル溶液とした。

大腸菌の形質転換とプラスミド回収

氷上で溶解させたコンピテントセル溶液 100 μ L にプラスミド溶液 1–10 μ L を加え、30 分間氷冷した。42°C、90 秒間ヒートショックを与えた後、氷上で 2 分間静置した。SOC 培地(表 2-4) 1 mL を加えて 37°C、15–60 分間インキュベートした後、10,000 rpm、30 秒間延伸して上清を捨てた。菌体を残った培地に懸濁し、カナマイシンを 15 mg/L になるように加えた LB 培地に塗布して 37°C、一晩培養した。培養後、LB 培地からカナマイシン耐性を示したコロニーを拾い、カナマイシン 15 mg/L を加えた 10 mL LB 液体培地で 37°C、一晩振盪培養した。培養液から QIAGEN の QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミドの抽出を行い、プラスミド DNA 溶液とした。各操作はキットのプロトコルに準じた。

アグロバクテリウム・コンピテントセルの作成

アグロバクテリウムを 10 mL YEP 液体培地(表 2-5)で 28°C、一晩振盪培養した。培養液を 15 mL 容コニカルチューブに無菌的に移して 4,000 rpm、10 分間遠心して上清を捨てた。以下の操作は氷上で行った。ペレットに 10% グリセロール溶液(表 2-6) 10 mL を加えて懸濁して 4,000 rpm、10 分間、4°C で遠心して上清を捨てた。同様の操作をもう一度繰り返し、その後 10% グリセロール溶液 1 mL を加えて懸濁した。懸濁液を氷冷マイクロチューブに 100 μ L ずつ分注し、-80°C で凍結保存して

コンピテントセル溶液とした。

アグロバクテリウムの形質転換

コンピテントセル溶液 50 μL にプラスミド DNA 溶液 1 μL を加え、30 分間氷上でインキュベートした。同時に 2 mm 電極幅キュベットも氷冷した。溶液をキュベットに移し、エレクトロポレーション装置(BIORAD GENE PULSER II)にキュベットをセットした。エレクトロポレーション装置の条件設定は電圧 2.5 kV、キャパシタンス 25 μF 、抵抗 200 Ω として、電気パルスを与えた。その後、キュベットに YEP 液体培地 1 mL を加えて混合し、溶液をマイクロチューブに移して 28°C で 2~4 時間インキュベートした。インキュベート後、10,000 rpm、30 秒間遠心して上清を捨てた。ペレットに 100 μL 程度の YEP 液体培地を加えて懸濁し、カナマイシン 15 mg/L を加えた YEP 培地に塗布して 28°C で 3 日間培養してシングルコロニーを拾った。得られた形質転換アグロバクテリウムは、カナマイシン 15 mg/L を加えた 10 mL YEP 液体培地で 28°C 一晩振盪培養した後、アグロバクテリウム・コンピテントセルの作成と同様の操作を行い、-80°C で凍結保存してグリセロールストックとした。

種子の無菌播種とカルス誘導

イネ完熟種子から乳棒と乳鉢を用いて籾殻を外し、粒が大きく変色していない種子を選抜した。選抜された種子を 50 mL コニカルチューブに入れ、70% エタノールで 30 秒程度洗浄した。70% エタノールを捨てて滅菌水で数回洗った後、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度 5%) 20 mL、滅菌水 20 mL、Tween 20 40 μL を加えて、30 分間振盪した。次亜塩素酸ナトリウム溶液を捨てて、泡立ちが無くなるまで滅菌水ですすいだ。滅菌された種子をシャーレ中の N6D 培地(表 2-10)に胚を上向きにして埋め込んで播種し、シャーレにサージカルテープを巻いて明下、30°C で一週間程度培養した。胚盤上に誘導されたカルスから種子とシュートを取り除いて新しい N6D 培地に移し、明下、30°C で更に 10 日間程度培養した。カルスの塊からこぼれ落ちた直径 2 mm 程度のカルスを、新しい N6D 培地に移し、明下、30°C で 3 日間の前培養を行った。

アグロバクテリウムの感染と共存培養

形質転換アグロバクテリウムをグリセロールストックからカナマイシン 15 mg/L を加えた AB 培地(表 2-8)に塗布し、暗下、25°Cで3日間の前培養を行った。50 mL 容コニカルチューブに AAM 溶液(表 2-13)を 40 mL 入れ、アセトシリゴン を 40 mg/L となるように加えた。シャーレ中の 2N6-As 培地(表 2-11)の表面に滅菌濾紙を 1 枚敷き、AAM 溶液 500 μ L で湿らせた。AAM 溶液 500 μ L をマイクロチューブに取り分け、前培養されたアグロバクテリウムを滅菌済みのマイクロスパーテルで 1/4 さじ程度プレートからとって加え、よく振り混ぜた。マイクロチューブの AAM 溶液をコニカルチューブの AAM 溶液に戻し、これをアグロバクテリウム懸濁液とした。オートクレーブで滅菌済みの茶漉しをシャーレに置き、前培養されたカルスを移してアグロバクテリウム懸濁液をかけた。90 秒間アグロバクテリウム懸濁液に浸した後、茶漉しごと滅菌濾紙上にあげて余分な菌液を取り除いた。2N6-As 培地に敷いた濾紙の上にカルスを乗せ、暗下、25°Cで3日間共存培養を行った。

アグロバクテリウムの除去と選択

50 mL 容コニカルチューブに共存培養後のカルスを入れ、滅菌水で7回程度洗浄した。更に 250 mg/L のカルベニシリンを含む滅菌水で3回洗浄し、滅菌濾紙の上にカルスをあげて余分な水分を除去した。洗浄されたカルスを 250 mg/L のカルベニシリンおよび 50 mg/L のハイグロマイシンを加えた N6D 選抜培地に植えて、暗下、33°Cで10日間程度培養した。

形質転換イネの再分化

選抜後のカルスを 250 mg/L のカルベニシリンおよび 50 mg/L のハイグロマイシンを加えた REIII培地に植え替えて、明下、30°Cで2週間程度培養した。グリーンスポットが現れたカルスのみ新しい抗生物質を含む REIII培地に移し、明下、30°Cで2週間程度培養した。また、グリーンスポットの現れなかったカルスは2週間ごとに新しい抗生物質を含む REIII培地に移し替えながらグリーンスポットが現れるまで培養を続けた。カルスからシュートと根が 1 cm 以上分化した個体をホルモンおよび抗生物質を含まない MS 発根培地に植え替え、2-3週間生育した。生育中、適宜株分けを行って個体数を増やした。

形質転換イネの順化

根が十分に伸びたところでイネを MS 発根培地から取り出し、水で培地を洗い流した。その後、イネ用に配合した土(黒土 : 赤玉土 : 鹿沼土 = 6 : 3 : 1(v : v : v))に移植し、乾燥を防ぐためにラップをかけた状態で一週間程度順化を行った。上記の手順で順化できなかった系統については、土に移植する前に分けつを間引いてから順化を行った[38]。順化に成功したイネは人工気象器内で生育した。生育条件は明期 : 11 時間 28°C、暗期 : 13 時間 25°Cの短日条件とし、肥料として適当な濃度に希釈したハイポネックスを与えながら生育した。結実した種子を収穫し、乾燥剤と共に 4°Cで保存した。

2-3-2 形質転換イネの PCR 解析

イネのゲノム DNA を CTAB 法によって抽出し、抽出 DNA を鋳型として直ちに *Taq* DNA polymerase を用いて PCR を行った。

CTAB 法による DNA 抽出

イネの若葉を少量(1–10 mg)取り、-80°Cで冷凍しておいた乳棒乳鉢で粉碎し、マイクロチューブに入れた 2×CTAB 溶液(表 2-17) 150 μL に溶解した。更に 1×CTAB 溶液(表 2-17) 75 μL を加えて混合し、55°C、40 分間、時々転倒混和しながら溶解させた。クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を 250 μL 加え、室温で 20 分間穏やかに混和し、4,000 rpm、5 分間遠心された上層を別のマイクロチューブに移し、下層に 1×CTAB 溶液 150 μL を加えて室温で 10 分間、穏やかに混和し、4,000 rpm、5 分間遠心して上層を合わせた。上層に 10% CTAB 溶液(表 2-20) 35 μL を加えて 70°C、1 分間加熱した。その後クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1) 300 μL を加えて室温で 10 分間穏やかに混和し、4,000 rpm、2 分間遠心した。次に、CTAB 沈殿 buffer 350 μL を別のチューブにとり、そこに上層を加えて混和した。更に CTAB 沈殿 buffer(表 2-18) 150 μL を追加して混和し、5,000 rpm、5 分間遠心してピペットで上清を完全に除去した。沈殿に NaCl-TE buffer (表 2-19) 50 μL を加えて 55°C、5 分間溶解した。その後、イソプロパノール 50 μL を加えて混和し、15,000 rpm、10

分間遠心して上清をデカンテーションで捨てた。70%エタノール 125 μL でチューブ内を洗い、15,000 rpm、5分間遠心して上清を捨てた。次いで99.6% エタノールでも同様に洗浄した。99.6% エタノールをエバポレーターで乾燥させ、ペレットにTE buffer (表 2-19) 25 μL を加えて55°C、5分間溶解させてDNA溶液とした。

PCR 反応

抽出されたDNAを鋳型として *Taq* DNA polymerase を用いてPCRを行い、*CcAbf62A* がイネゲノム中に導入されているかどうかを確認した。PCR反応液組成および反応条件は以下のようにした。プライマーは *prxA3a* Forward primer と *CcAbf62A* Reverse primer のセットが用いられた(表 1-1)。

PCR 反応液組成

DDW	16.3 μL
10 \times Thermopol buffer	2.0 μL
10 mM dNTPs	0.4 μL
50 μM Forward primer	0.1 μL
50 μM Reverse primer	0.1 μL
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.1 μL
Template DNA	1.0 μL
Total volume	20.0 μL

PCR 反応条件

Pre-heating	94°C	30 sec
	↓	
Denaturing	94°C	30 sec
Annealing	55°C	30 sec
Extension	72°C	90 sec
	↓	\times 35 Cycles
Post heating	72°C	5 min

Cooling down	10°C	∞
--------------	------	---

2-3-3 デイタージェント分析法による細胞壁成分の定量(連続法)

デイタージェント分析法は 1-3-4 の方法を改変した方法を用いた。従来の NDFom と ADFom を別々に測定する手法では、易消化性のペクチン質が ADFom 中に残存してしまうために、ADFom が過大評価される傾向にあった[39]。そのため、中性デイタージェント溶液による処理と酸性デイタージェント溶液による処理を連続して行うことで、予め中性デイタージェント溶液による処理でペクチン質を除去し、ADFom がより正確な結晶性セルロースとリグニン量の値を示すようにした。

登熟期の稲わらを採取し、稲わらから穂、葉、および根を取り除いて茎のみを 75°C で一晩乾燥させた。乾燥後の茎をミルで粉砕した後ふるいにかけて、直径 0.5 mm 以下の粉末を取得して粉末サンプルとして分析に供した。

中性デイタージェント溶液による処理

粉末サンプルを 0.25 g 精秤して(W1) 100 mL 容メディウム瓶にとり、中性デイタージェント溶液(表 1-5) 50 mL を加えて 1 時間煮沸した。煮沸後、秤量済みの 1G3 ガラスろ過器を用いて吸引ろ過を行い、十分に熱水で洗浄した後、アセトンで 3 回洗浄した。残渣を 105°C で乾燥させた後、ガラスろ過器ごと秤量して残渣の重量を測定した(W2)。

酸性デイタージェント溶液および 72%硫酸による処理

中性デイタージェント溶液による処理後のサンプルを、酸性デイタージェント溶液(表 1-6) 40 mL で 100 mL 容メディウム瓶に洗いこみ、1 時間煮沸した。煮沸後、秤量済みのガラスろ過器を用いて吸引ろ過を行い、十分に熱水で洗浄した。残渣を 105°C で乾燥させた後、ガラスろ過器ごと秤量して残渣の重量を測定した(W3)。次にガラスろ過器を 100 mL 容ビーカーの中へと移して 72%(w / w) 硫酸 10 mL を加え、ガラス棒を用いて 30 分おきに攪拌しながら 3 時間室温で処理した。処理後、RO 水を用いてサンプルおよび硫酸を 500 mL 容ビーカーに洗い込み、硫酸を十分に希釈した後、秤量済みの定量濾紙を用いて吸引ろ過を行った。ろ液が酸性を示さ

なくなるまで RO 水で洗浄し、濾紙ごと秤量済みのるつぼに移した。残渣を 105°C で一晩乾燥させた後、るつぼ、濾紙ごと秤量して残渣の重量を測定した(W4)。最後に濾紙とサンプルをマッフル炉で 550°C、2 時間灰化して灰分の値を測定した(W5)。

中性ディタージェント繊維(NDFom; Neutral detergent fiber)、酸性ディタージェント繊維(ADFom; Acid detergent fiber)、酸性ディタージェントリグニン(ADL; Acid detergent lignin)、は以下の式を用いて計算した。

$$\text{NDFom} = (W2 - W5) / W1 \times 100$$

$$\text{ADFom} = (W3 - W5) / W1 \times 100$$

$$\text{ADL} = (W4 - W5) / W1 \times 100$$

2-3-4 赤外分光法(IR; Infrared spectroscopy)による細胞壁成分の定量

細胞壁成分の非破壊的な定量法として、赤外分光法(IR)による分析を行った[40]。各表現型の形質転換イネおよびコントロールについてそれぞれ 3 系統から葉を採取し、凍結乾燥したものをサンプルとして使用した。スペクトルの取得には PerkinElmer 社の Frontier システム(Spotlight 200i Frontier)、および全反射測定法(ATR; Attenuated Total Reflectance)分析を行うために ATR アクセサリを使用した。波数 500 – 4,000 cm^{-1} のスペクトルを取得し、セルロース由来の波数 1,040 cm^{-1} のバンドを内部標準として高さを合わせた。サンプルごとに 3 回ずつスペクトルを取得し、それらのスペクトルの平均をとった。

2-4 結果・考察

2-4-1 pIG121-GUS(-)-Abf 系統の表現型

アグロバクテリウム法によってイネに pIG121-GUS(-)-Abf の T-DNA 領域の導入を行った結果、32 系統の形質転換イネが再分化した。先行研究で作出された pIG121-GUS(-)-Abf 導入イネでは矮化と分げつ数の増加により芝生状となる表現型が確認

されたが、本研究で作出された形質転換イネは先行研究のものと同じ表現型を含む 3 種類の表現型に分離した。32 系統中 13 系統は先行研究と同じく伸長成長が遅滞し、分けつを繰り返す芝生状の表現型を示した(*dwarf* 系統)。また、7 系統は *dwarf* ほどではないが伸長成長が抑制された表現型を示し(*retarded-growth* 系統)、12 系統はコントロールと同等の伸長成長を示した(*normal* 系統)(表 2-21)。

各表現型の特徴を図 2-2 に示した。*dwarf* 系統は MS 培地上での生育過程で分けつを繰り返し、一方で伸長成長は非常に遅かった(図 2-2 A)。また、根の伸長についても遅滞が見られた(図 2-2 B)。*dwarf* 系統、*retarded-growth* 系統、および *normal* 系統との伸長速度を比較すると、MS 培地上での生育過程では *dwarf* 系統の伸長が顕著に阻害されており、*retarded-growth* 系統も *normal* 系統より伸長速度は遅かった(図 2-2 C, D)。登熟期における最終的な高さは *normal* 系統とコントロール(*pActnos*) 系統では同等であった一方で、*retarded-growth* 系統では顕著に低くなっていた(図 2-2 E)。

また、*dwarf* 系統では先行研究で作出された形質転換イネと同様に、MS 培地での培養後に土に移植すると枯死してしまう性質が見られた。そこで、枯死してしまう理由は分けつ数の増加と根の伸長阻害によって蒸散と吸水のバランスが崩れているためであると考え、分けつを間引いてから土への移植を行った[38]。その結果、大半の系統は順化できななかったが、1 つの *dwarf* 系統(*Abf-26*)が順化でき、種子の形成まで至った(図 2-2 F)。

これらの系統間における表現型の違いには、ゲノム中における遺伝子の挿入位置の違い(位置効果)やコピー数などが影響していると考えられる。32 系統中 13 系統という比較的高頻度で *dwarf* 表現型が現れたことから、*pIG121-GUS(-)-Abf* で見られた表現型の変化は、内在遺伝子の破壊や形質転換操作に伴う体細胞変異によるものではなく、導入されたコンストラクトにより引き起こされた現象だと推定した。

表 2-21. pIG121-GUS(-)-Abf 系統における各表現型の出現数

	total	normal	retarded- growth	dwarf
系統数	32	12	7	13

単一のカルスに由来して再生した植物体をそれぞれ 1 系統とした。MS 培地上での伸長成長速度の差や多分げつ体化の有無によって表現型を分類した。

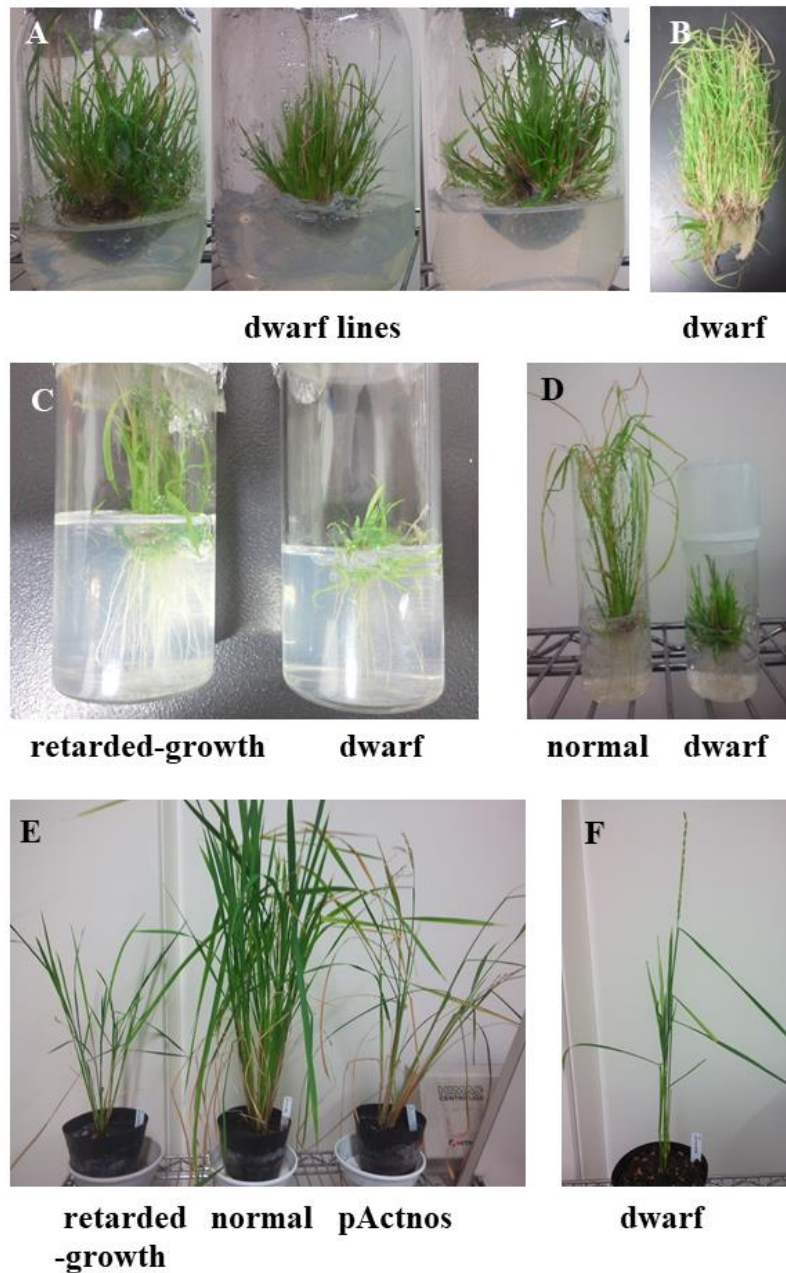


図 2-2 pIG121-GUS(-)-Abf 系統の表現型(T₀)

(A)高強度の伸長成長抑制が起きた dwarf 系統の表現型。(B)dwarf 系統における根の表現型。(C)低強度の伸長成長抑制が起きた retarded-growth 系統と dwarf 系統。(D)伸長成長抑制が起きなかった normal 系統と dwarf 系統。(E)登熟期における retarded-growth 系統と normal 系統、pActnos 系統の高さ。(F)出穂期の dwarf 系統(Abf-26)。

2-4-2 形質転換イネの PCR 解析

形質転換イネ 32 系統中 24 系統で *CcAbf62A* の導入が確認できた(図 2-3)。PCR によって目的遺伝子の導入が確認された系統のみを以降の分析に用いた。なお、遺伝子導入が確認できなかった系統の中には確認前に枯死してしまった系統を含む。dwarf、retarded-growth、normal の全ての表現型の形質転換イネにおいて遺伝子導入が確認できた。同じコンストラクトを用いて *CcAbf62A* が導入され、また T₀ 世代であるため恐らく全ての系統がヘテロ接合体で導入遺伝子を持つと推定されるが、それでも系統間で表現型に大きな差が生まれたことは、非常に興味深い現象である。

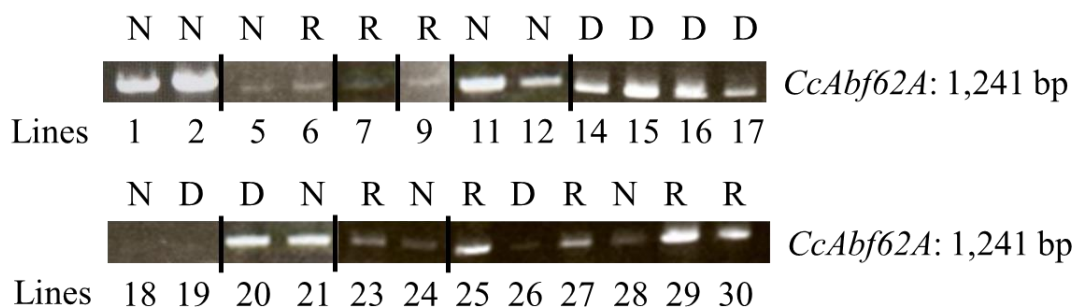


図 2-3. 形質転換イネのゲノム PCR

PCR 解析に供した図中の 24 系統全てについて、*CcAbf62A* 由来の 1,241 bp のバンドが確認された。N、R、D はそれぞれ normal、retarded-growth、dwarf 表現型を示している。

2-4-3 形質転換イネの農業形質の評価

登熟期まで生育した normal 系統から 8 系統、retarded-growth 系統から 6 系統、およびコントロール系統 2 個体を用いて農業形質の評価を行った(表 2-22)。dwarf 系統については 1 系統が種子形成まで至ったが、2-4-1 に記載したように順化の際に分げつの間引きを行っており、正当な評価は行えないと考えて表からは除いた。

normal 系統および retarded-growth 系統はコントロールと比較して分げつ数や小穂数は多かったが、結実率は非常に低かった。なお、dwarf 系統についても同様に結実率は低かった。コントロールは種子から育てた植物体であり、normal および retarded-growth 系統はカルス由来の T₀ 世代の形質転換イネであるため一概には比

較できないが、dwarf 系統で分けつ数の著しい増加が確認されたことから、分けつ数の増加は CcAbf62A の影響によるものであると考えられる。

normal 系統と retarded-growth 系統を比較したところ、retarded-growth 系統の方が穂を形成した分けつ数(= 有効分けつ数)は多く、一方で結実率は低くなる傾向があった。一般的に、伸長成長と分けつ数の増加はトレードオフの関係にあるため、retarded-growth 系統では伸長成長が抑制された分、分けつが促進されたと考えられる。また結実率の低下は、有効分けつ数が増加することによって栄養分の分散が起こり、正常な種子の成熟が妨げられたために起こったと推測できる。生育条件の検討によって低い結実率は改善すると考えられ、有効分けつ数の増加は、イネの収穫量の増加にもつながる有用な形質であるといえるだろう。

表 2-22. pIG121-GUS(-)-Abf 系統の農業形質

	表現型	種子	小穂	結実率(%)	有効分けつ数	分けつ数
pActnos #1	normal	112	147	76.2	6	11
pActnos #2	normal	125	177	70.6	3	12
Abf-1	normal	0	321	0.0	22	41
Abf-2	normal	78	512	15.2	29	36
Abf-5	normal	164	336	48.8	12	28
Abf-11	normal	77	595	12.9	22	58
Abf-12	normal	38	262	14.5	12	36
Abf-18	normal	13	81	16.0	6	11
Abf-24	normal	0	215	0.0	7	37
Abf-28	normal	0	65	0.0	4	12
Abf-6	retarded-growth	0	71	0.0	10	23
Abf-9	retarded-growth	1	22	4.5	5	15
Abf-20	retarded-growth	48	533	9.0	22	34
Abf-25	retarded-growth	0	240	0.0	17	20
Abf-29	retarded-growth	0	208	0.0	16	23
Abf-30	retarded-growth	0	641	0.0	45	72

登熟期のイネから種子を収穫し、各農業形質について計測した。小穂は種子を、分けつ数は有効分けつ数を含んだ数値となっている。結実率(%)は種子 / 小穂 × 100 で計算した。

2-4-4 デイタージェント分析法による細胞壁成分の定量

デイタージェント分析法の結果は表 2-23 に示した。まず、ADL に関しては全ての系統間について有意差は無く、リグニン含量の減少は表現型が変化した *retarded-growth* 系統においても見られなかった。このことから、NDFom の変化は主にセルロースとヘミセルロースを合わせたホロセルロース含量の変化を、ADFom の変化は主にセルロース含量の変化を示していると推測できる。

NDFom について見ると、*normal* 系統および *retarded-growth* 系統とコントロールとの間では有意差は無かった。しかし、*reterded-growth* 系統においては、その NDFom はコントロールの NDFom の 93.9 – 99.2%相当の僅かに低い値であり、これらの系統では伸長成長の遅れがホロセルロース蓄積量の減少につながったのではないかと考えられる。また、2つの *normal* 系統(Abf-1、Abf-2)は、2つの *retarded-growth* 系統(Abf-20、Abf-30)と比較すると有意に高い NDFom を持っており、伸長成長速度とホロセルロースの蓄積量に正の相関があることが示された(表 2-23)。また、NDFom の値は供試したサンプルの重量に対する重量%であるため、*retarded-growth* 系統は植物体自体の大きさも *normal* 系統より小さいことから、植物体全体としてのホロセルロース含量の減少幅は更に大きいと考えられる。

一方で、ADFom について見ると、1つの *normal* 系統(Abf-2)において有意に高く、Abf-2 は茎中にセルロースを多く蓄積していることが示された。セルロース含量の増加は茎の良好な生育に関与すると考えられ、実際に Abf-2 では有効分げつ数が他の *normal* 系統と比較して多くなっていた(表 2-22)。なお、第 1 章で行われたデイタージェント分析法の結果(表 1-8)と比較して、全体的に ADFom の値が低く検出されているが、これは連続法を用いたことにより ADFom からペクチン質が除去されたためであると考えられる[39]。

表 2-23. デイタージェント分析法による細胞壁成分の定量

	表現型	NDFom(%)	ADFom(%)	ADL(%)
pActnos	normal	64.0 ± 0.9 ^{ab}	33.9 ± 0.8 ^b	2.3 ± 0.4 ^a
Abf-1	normal	65.9 ± 1.3 ^a	33.5 ± 0.3 ^b	2.6 ± 0.5 ^a
Abf-2	normal	66.5 ± 1.5 ^a	38.9 ± 1.4 ^a	2.9 ± 0.5 ^a
Abf-5	normal	62.4 ± 1.1 ^{ab}	31.2 ± 1.2 ^b	1.9 ± 0.3 ^a
Abf-20	retarded-growth	60.8 ± 1.3 ^b	31.7 ± 1.0 ^b	2.3 ± 0.2 ^a
Abf-25	retarded-growth	63.5 ± 0.1 ^{ab}	33.2 ± 0.4 ^b	2.7 ± 0.4 ^a
Abf-30	retarded-growth	60.1 ± 0.5 ^b	32.4 ± 0.4 ^b	2.7 ± 0.0 ^a

各数値は3回測定平均±標準偏差で表記した。統計処理はTukey法を用いて行った。異なる文字は有意水準10% ($p < 0.10$)で有意差があった数値を示している。

2-4-5 赤外分光法(IR)による細胞壁成分の定量

dwarf、retarded-growth、normal 表現型、およびコントロールについてそれぞれサンプルを3系統ずつ用いてIR分析を行い、スペクトルを取得した。表現型ごとに良く似たスペクトルが得られたため、代表的なスペクトルを選んで図2-4に示した。

セルロースのC-O伸縮振動に帰属される $1,040\text{ cm}^{-1}$ のバンドを内部標準として高さを揃えて他のバンドを比較したところ、dwarf (Abf-15)、retarded-growth (Abf-25)、normal (Abf-2)の全てのAbf系統で大部分のバンドがコントロールよりも強度が増加しており、そしてその増加幅はdwarf系統、retarded-growth系統、normal系統の順に大きくなっていった。この結果は、セルロース以外の各成分が増加したとするよりは、Abf系統におけるセルロース含量の減少を示していると推測される。つまり、矮化の程度に応じてdwarf系統、retarded-growth系統、normal系統の順にセルロース含量が減少していることが予想される。

また、dwarfおよびretarded-growth系統において $1,630\text{ cm}^{-1}$ 、 $1,508\text{ cm}^{-1}$ のバンドが大きく増加していることが確認された。 $1,630\text{ cm}^{-1}$ のバンドは共役C=O伸縮振動($1,660\text{ cm}^{-1}$)と芳香環の骨格振動($1,600\text{ cm}^{-1}$)の重なったバンドと推測され、 $1,508\text{ cm}^{-1}$ のバンドは芳香環の骨格振動に帰属される[40]。これらのバンドはリグニンや他の

芳香族化合物の量に関連していると考えられる。

また、 $1,240\text{ cm}^{-1}$ と $1,508\text{ cm}^{-1}$ の間のバンドについて dwarf 系統で特に増加が見られた。 $1,462\text{ cm}^{-1}$ のバンドはリグニンに含まれる CH_2 、 CH_3 の C-H 偏角振動に帰属される。そして、 $1,422\text{ cm}^{-1}$ のバンドが dwarf 系統において顕著に増加していた。このバンドはリグニンでのみ検出されるバンドではないが、 CH_3 の C-H 偏角振動に帰属される、リグニンに特徴的なバンドの一つである。

また、 $1,730\text{ cm}^{-1}$ と $1,240\text{ cm}^{-1}$ のバンドでも増加が見られた。これらはヘミセルロースのアセチル基に帰属されるバンドだが、リグニンや芳香族に帰属されるバンドと比べると増加幅が小さかった。これは、ヘミセルロースがリグニンと比較すると減少していることを示唆している。つまり、dwarf 系統および retarded-growth 系統ではセルロースおよびヘミセルロースが減少しており、それによって相対的にリグニン含量が増加してみえていていると考えられる。

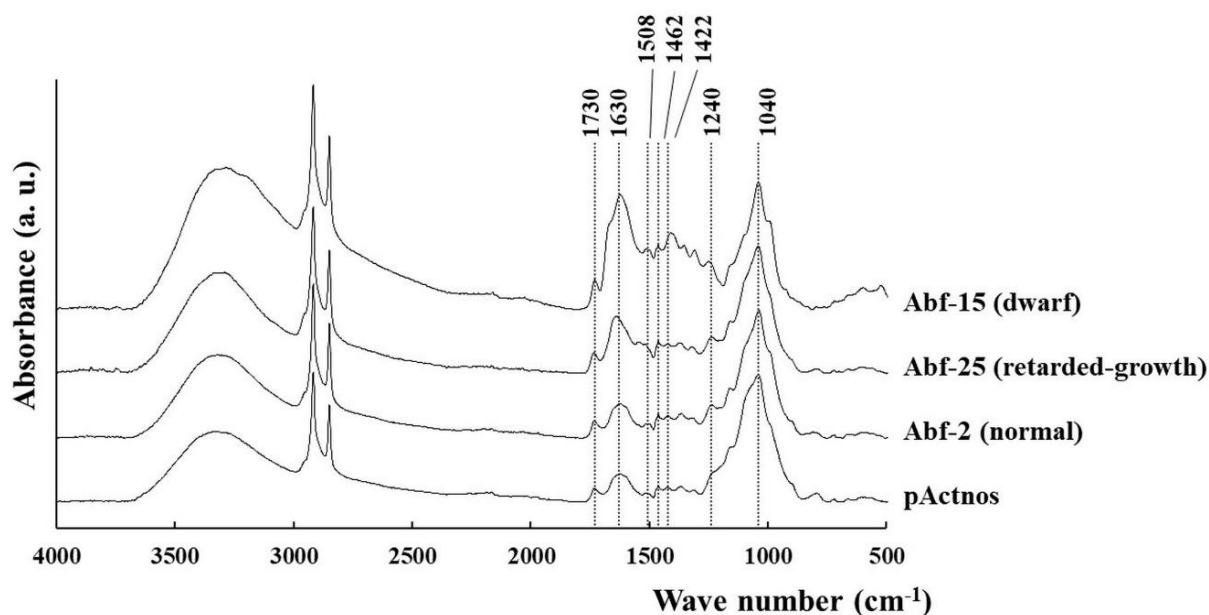


図 2-4. 葉表面の IR スペクトル

全ての吸光度はセルロースの C-O 伸縮振動に帰属される $1,040\text{ cm}^{-1}$ のバンドで高さを揃えている。各スペクトルは 3 回測定の実測値である。

2-5 まとめ

本研究で作出された pIG121-GUS(-)-Abf 導入イネは、異なる表現型を持つ 3 種類の系統、dwarf、retarded-growth、normal に分離した。dwarf 系統の表現型は先行研究で確認された表現型とよく似ており、伸長成長が遅く、分けつを繰り返して芝生状に成長し、また順化能力が低く土に移植すると枯死してしまう性質を持っていた。一方で、normal 系統のようにコントロールと変わらずに伸長成長をして、順化・種子形成まで順調に生育する系統も存在した。retarded-growth 系統については伸長成長の遅滞が見られたが、その程度は dwarf 系統よりは弱く、また順化能力も維持されているという、dwarf 系統と normal 系統との中間的な表現型を持っていた。これらの表現型の違いは遺伝子のイネゲノム中における挿入位置やコピー数等により、発現パターンが変化することで起きたと考えられる。第 1 章で作出された pActAbf 系統については矮化表現型を示した系統は 1 系統も得られなかったことから、CcAbf62A 導入イネにおける矮化は、発現用プロモーターとして rice Act1 プロモーターではなく CaMV 35S プロモーターを用いた場合に限り、一定割合で生じる現象であると予想される。

ディタージェント法、および IR 分析による細胞壁成分の分析結果は、大筋では同様の結果を示していた。dwarf 系統および retarded-growth 系統ではセルロースやヘミセルロースなどの多糖類の蓄積量が減少しており、一方でリグニン含量は維持されたため、相対的に細胞壁成分全体におけるリグニンの存在比が高く検出された。この結果はサンプルとして茎を用いたディタージェント分析法(表 2-23)と、葉を用いた赤外分光法(図 2-4)の結果で共通して見られた。また、dwarf 系統と retarded-growth 系統の間でも差はあり、dwarf 系統の方がより多糖類の蓄積量が減少していた。これらの結果は、伸長成長速度とホロセルロースの蓄積量に正の相関があることを示唆している。

本章で行った研究では、pIG121-GUS(-)-Abf 導入イネを多数作出して分析に供したが、dwarf 系統では順化不良の問題があり、順化したサンプルを十分数用意することが難しかった。そのため、IR 分析による葉表面の非破壊的な分析を行うに留まった。本章ではまた、分けつの間引きによる順化处理によって dwarf 系統からも種子の獲得に至った。この後代を用いて、T₀ 世代で起こり得る形質転換操作による影響を抑え、かつ十分なサンプル数を用いた分析を行うことが望ましい。

第3章 LCC 分解系アラビノフラノシダーゼ導入イネにおける矮化メカニズムの解析

3-1 緒言

第2章において pIG121-GUS(-)-Abf コンストラクトを導入された形質転換イネ系統を作出し、細胞壁成分の分析を行った。作出された系統は normal 系統と retarded-growth 系統、dwarf 系統の3種類の表現型に分離したが、dwarf 系統に関しては T₀ 世代においてはサンプル量が少なく、また順化できた植物体が Abf-26 系統の1個体のみであったため、十分な分析を行うことができなかった。更に、T₀ 世代では形質転換操作に伴って生じる表現型への影響も大きいとため、より正確な評価を行うためには後代の分析を行うことが望ましい。分げつを間引くことで順化させた Abf-26 系統からは後代の種子が得られたため、この後代を用いて dwarf 系統の分析を行うことを試みた。

本章では T₁ および T₂ 世代の形質転換イネを用いて、主に dwarf 系統について分析を行った。dwarf 系統の後代の分析を通して、稲わらの脱リグニン効率の評価に加えて、CcAbf62A の導入により起こったイネの矮化のメカニズムについて解析することを目的とした。イネの矮化は倒伏耐性の強化に寄与し、収穫量の増加につながる重要な形質であるため、CcAbf62A がイネの矮化を引き起こすメカニズムを明らかにできれば、飼料イネとしてだけでなく食用イネの育種への応用も期待できる。

また、CcAbf62A の基質であるアラビノキシランは、イネ科植物に特徴的なヘミセルロースで、生育の早い段階で多く蓄積されることが知られている[41]。しかし、アラビノキシランがイネ科植物の生育において担っている役割については詳しく分かっておらず、本研究では CcAbf62A を分泌生産させた形質転換イネの分析を通してアラビノキシランの存在意義についての理解を深めることも目的とした。

3-2 実験材料

供試植物

第2章で作出された形質転換イネ pIG121-GUS(-)-Abf 系統のうち、dwarf 系統で

ある Abf-26、retarded-growth 系統である Abf-20、及び normal 系統である Abf-2 からそれぞれ種子を採り、ハイグロマイシン 50 mg/L を加えた MS 培地で選抜した T₁ 世代のイネを分析に供した。またコントロールとして本研究室の品川によって作出された空ベクター pIG121-Hm[36] 導入系統である pIG121 の T₁ 世代のイネを同様に選抜して用いた。

更に、これらの T₁ 世代から種子を取り、同様に T₂ 世代のイネについても分析を行った。T₂ 世代の分析には Abf-26 系統および pIG121 系統を用いた。

導入されたコンストラクト

pIG121-GUS(-)-Abf 系統に導入されたコンストラクトについては 2-2-2 に記載したものと同様である。コントロールの pIG121 系統に導入されたコンストラクトは、pIG121-Hm をそのまま用いているため、β-グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子、*uidA* が残っている。

PCR 用プライマー

目的の塩基配列の増幅、形質転換イネの遺伝子導入の確認、および RT-PCR による遺伝子発現の確認に用いられたプライマーの配列については表 1-1 に示した。また、RT-PCR において内部標準として用いられた *Act1* の増幅に用いられたプライマーの配列を表 3-1 に示した。

使用した培地および試薬

培地及び試薬の組成については表 1-2 から表 1-4 に記載した。

表 3-1. *Act1* 用プライマーの配列

プライマー名	塩基配列
ACT F primer	5'-CGTCTGCGATAATGGAACTG-3'
ACT R primer	5'-TCTGGGTCATCTTCTCACGA-3'

3-3 実験方法

3-3-1 形質転換イネ後代の選抜および生育

T₀ 世代の normal、retarded-growth、dwarf 系統からそれぞれ Abf-2、Abf-20、Abf-26 の T₁ 種子を取り、各表現型の代表サンプルとした。種子を 50 mL 容コニカルチューブに入れて 70% エタノールで 30 秒間洗浄し、滅菌水ですすいだ後、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度 5%) 20 mL、滅菌水 20 mL、Tween 20 40 μL を加えて、30 分間振盪した。次亜塩素酸ナトリウム溶液を捨てて、泡立ちが無くなるまで滅菌水ですすいだ後、種子をハイグロマイシン 50 mg/L を加えた MS 培地(表 1-3)上に播種して 2 週間程度生育して選抜した。選抜培地において発芽し、白化しなかった個体を人工気象器内で生育させた。生育条件は、温度 25°C、明期 11 時間、暗期 13 時間とした。T₂ 世代についても同様に選抜・生育を行った。

3-3-2 形質転換イネの PCR 解析

2-3-2 と同様の方法を用いた。

3-3-3 形質転換イネの RT-PCR 解析

形質転換イネの若葉を約 50 mg とり、直ちに-80°Cで冷凍しておいた乳棒と乳鉢で粉砕し QIAGEN の RNeasy Plant Mini Kit を用いて RNA 抽出を行った。一連の操作はキットのプロトコルに従って行い、手順中、QIAGEN の RNase-Free DNase Set を用いて DNA の除去を行った。抽出した RNA を鋳型として TOYOBO の ReverTra Ace、および Taq DNA polymerase 用いて RT-PCR を行い、CcAbf62A の発現量を確認した。

CcAbf62A の確認には *prxA3a* Forward primer と CcAbf62A Reverse primer のセットを用いた(表 1-1)。また内部標準として *Act1* の mRNA を ACT F primer と ACT R primer のセットを用いて増幅した(表 3-1)。また、逆転写反応には各遺伝子の Reverse primer を使用した。RT-PCR の各ステップの反応液組成および反応条件については

以下の通りである。

RNA の熱変性

反応液組成

total RNA	1.0 μL
50 μM Reverse primer	0.1 μL
RNase Free dH_2O	11.9 μL
Total volume	13.0 μL

反応条件

Denaturing	65°C	5 min
Cooling down	4°C	∞

逆転写反応

反応液組成

熱変性反応液	13.0 μL
5 \times buffer	4.0 μL
10 mM dNTPs	2.0 μL
ReverTra Ace (100 units/ μL)	1.0 μL
Total volume	20.0 μL

反応条件

Annealing	30°C	10 min
Extension	42°C	40 min
Denaturing	99°C	5 min

PCR 反応

反応液組成

DDW	16.3 μ L
10 \times Thermopol buffer	2.0 μ L
10 mM dNTPs	0.4 μ L
50 μ M Forward primer	0.1 μ L
50 μ M Reverse primer	0.1 μ L
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.1 μ L
逆転写反応液	1.0 μ L
Total volume	20.0 μ L

反応条件

Pre-heating	94°C	30 sec
	↓	
Denaturing	94°C	30 sec
Annealing	55°C	30 sec
Extension	72°C	90 sec
	↓	\times 35 Cycles
Post heating	72°C	5 min
Cooling down	10°C	∞

3-3-4 フロログルシノール塩酸染色によるリグニン沈着量の観察

リグニンの染色法であるフロログルシノール塩酸染色を用いて、組織中のリグニン沈着の観察を行った[17]。栄養成長期、出穂期および登熟期のイネからそれぞれ茎を採取し、ホルムアルデヒド : 酢酸 : 50% エタノール(1 : 1 : 18 (v / v))溶液中で一晩浸漬した。栄養成長期の茎は地上約 2 cm 部分、出穂期の茎は第二節間部、登熟期の茎は第三節間部をそれぞれ用いて、剃刀で茎の横断切片を作製した。切片を

スライドガラス上に置き、フロログルシン/エタノール溶液(20 mg/mL) 50 μ L を添加して1分間静置した。濃塩酸 100 μ L を添加してカバーガラスをかけ、直ちに光学顕微鏡(Olympus BX50)で観察した。

3-3-5 アルカリ脱リグニン効率の測定

アセチルブロマイド(AcBr)法を用いてサンプルのリグニン全量を算出し[42]、その後サンプルをアルカリ脱リグニン処理し、溶出したリグニン量および質量回収率を測定した[34][43]。それらの結果からアルカリ脱リグニン処理の効率を評価した。

登熟期の稲わらを採取し、稲わらから穂、葉、および根を取り除いて茎のみを75°Cで一晩乾燥させた。乾燥後の茎をミルで粉砕した後ふるいにかけて、直径0.5 mm以下の粉末を取得して粉末サンプルとして分析に供した。

AcBr 法によるリグニン含量測定

粉末サンプル 1.0 g を 100 mL 容メディウム瓶にとり、80% エタノール 50 mL を加えて1時間煮沸した。80% エタノールを交換してこの操作を3回繰り返し、エタノール可溶性成分を除去したものを脱脂サンプルとした。ネジキャップ付き試験管中に脱脂サンプル 1.0 – 2.0 mg を精秤し、25%(v/v) AcBr/氷酢酸溶液を0.5 mL 加えて50°Cで2時間反応させた。反応液を氷酢酸 1.5 mL で希釈した後、上清 0.2 mL を 1.5 mL 容マイクロチューブに移して0.3 M NaOH 0.3 mL、氷酢酸 0.5 mL、そして0.5 M 塩酸ヒドロキシルアンモニウム 0.1 mL を加えてよく混ぜ、上清の280 nmの吸光度を分光光度計で測定した。リグニン標準品として TCI の Lignin (Alkaline) [L0082]を用いて検量線を作製して、算出されたサンプル中のリグニン量をIとした。

アルカリ脱リグニン処理

15 mL 容コニカルチューブに脱脂サンプル 50 – 60 mg を精秤し(W1)、脱気した1 M NaOH 6 mL を加え、30°C、75 rpm で24時間振盪した。上清を酢酸で適当な濃度に希釈して分光光度計で280 nmの吸光度を測定した。Lignin (Alkaline)を用いて検量線を作製して、算出された上清中のリグニン量をIIとした。アルカリ処理後の残渣を秤量済みの1G3 ガラスろ過器でろ過し、十分に熱水で洗浄した後、75°Cで一晩

乾燥させて重量を測定した(W2)。

アルカリ脱リグニン効率は以下の式で算出した。

$$\text{アルカリ脱リグニン効率(\%)} = \text{II} / \text{I} \times 100$$

質量回収率は以下の式で算出した。

$$\text{質量回収率(\%)} = (\text{W1} - \text{W2}) / \text{W1} \times 100$$

3-3-6 HPLC による *p*-ヒドロキシ桂皮酸類の定量

HPLC を用いてフェルラ酸(FA)および *p*-クマル酸(*p*CA)の定量を行った[44]。HPLC に用いた機器はセンシュア科学の定流量送液ポンプ SSC-3461、紫外可視分光検出器 SSC-5410 である。

細胞壁サンプルの作製

出穂期および登熟期のイネの茎を根元から 10 cm 程度採取し、細かく切った後、80°Cで冷凍しておいた乳棒・乳鉢で粉碎した。粉末状になったサンプルを 15 mL 容コニカルチューブに移した。80% エタノールで 10 mL にメスアップして、ボルテックスにより攪拌した。15 分おきにボルテックスにより攪拌しながら 65°Cの湯浴中で 1 時間加熱し、その後 10,000 × *g*、10 分間遠心して上清を捨てた。上清が透明になるまで 80% エタノールによる抽出を 4–6 回繰り返した。その後、ペレットにアセトン 10 mL を加えて懸濁し、10,000 × *g*、10 分間遠心して上清を捨てた。ペレットを 70°Cで一晩乾燥させ、細胞壁サンプルとした。

p-ヒドロキシ桂皮酸類の抽出

細胞壁サンプル 5–10 mg を 2 mL 容マイクロチューブにとり、500 μM になるように 3,4,5-トリメトキシ桂皮酸(3,4,5-TMCA)を内部標準として加えた 1 M NaOH を 600 μL 加えて 37°C、24 時間、定期的にボルテックスにより攪拌しながら反応させ

た。反応液に濃塩酸 200 μL を加えて酸性化させてからボルテックスにより攪拌し、14,000 $\times g$ 、20 分間遠心した。上清 500 μL を新しいマイクロチューブに移し、酢酸エチル 1 mL を加えてボルテックスにより攪拌し、14,000 $\times g$ 、5 分間遠心した。有機層 900 μL を新しいマイクロチューブに移し、真空乾燥機で酢酸エチルを完全に除去した。抽出物を HPLC グレードの 50% メタノール 337.5 μL に再溶解し、HPLC 分析に供した。

HPLC 分析

抽出サンプルに対して分析前に Millex - LH Syringe Driven Filter Unit を用いてフイルトレーションを行い、そのうちの 50 μL を HPLC にインジェクションにより供試した。カラムは Senshu Pak PEGASIL ODS SP100 4.6 ϕ \times 150 mm を使用した。移動相として 0.1%(v/v) ギ酸を加えた Milli Q 水および 0.1%(v/v) ギ酸を加えたアセトニトリルを用いた。流速は 0.9 mL/min、グラジエント条件に関しては図 3-1 に示した。測定波長は 330 nm を用いて、クロマトグラムを取得した。

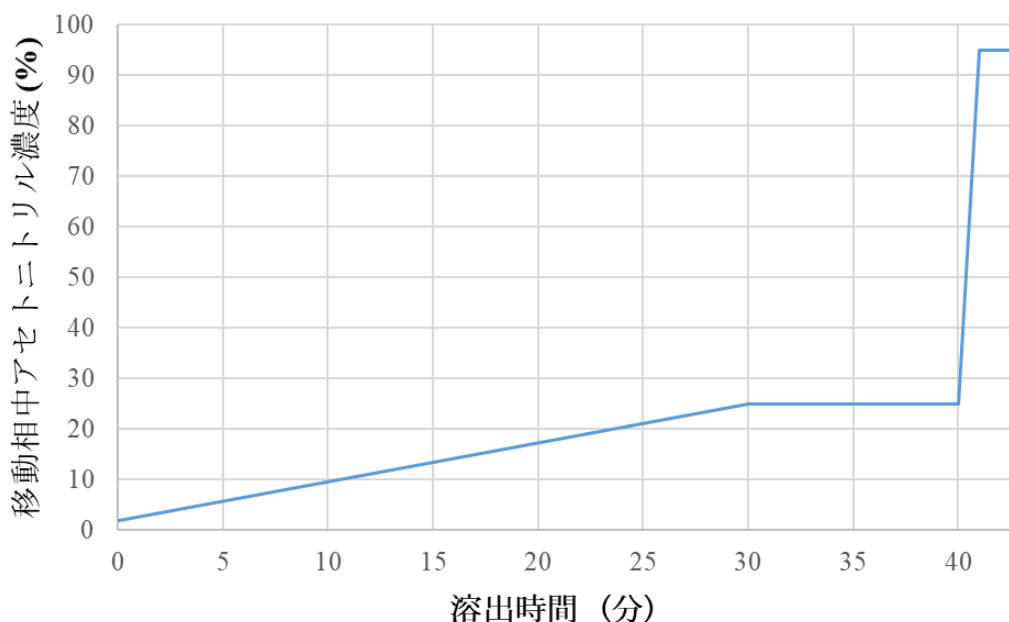


図 3-1. HPLC グラジエント条件

0 – 30 分にアセトニトリル 2 – 25%のグラジエントをかけて溶離を行い、30 – 40 分にアセトニトリル 25%で溶離を行った。41 – 43 分にアセトニトリル 95%でカラムに残留した画分を溶出した。

検量線の作成をフェルラ酸(FA)、*p*-クマル酸(*p*CA)、3,4,5-トリメトキシ桂皮酸(3,4,5-TMCA)の標準品を用いて行った。FA および *p*CA を 50, 100, 200 μ M の 3 種類の濃度、3,4,5-TMCA を 250 μ M, 500 μ M の 2 種類の濃度で 50% メタノールに溶解し、各濃度の溶液をサンプルと同様に HPLC 分析に供してクロマトグラムを取得した。また、内部標準の 3,4,5-TMCA のピークを基にサンプル量の校正を行った。

ピークの同定および分析には Chromato-PRO ソフトウェア(株式会社ランタイムインストルメンツ)を使用した。ピークの検出条件は最小検出面積 500 μ V/sec、最小検出高さ 500 μ V、最小ピーク幅 0.02 min、ピークスタートを 10 μ V/sec とした。

3-4 結果・考察

3-4-1 形質転換イネの表現型(T_1 および T_2 世代)

T_1 世代および T_2 世代の pIG121-GUS(-)-Abf 系統の表現型を図 3-2 に示した。 T_1 世代の dwarf 系統は T_0 世代と同様に伸長成長が遅く、コントロールよりも枯死しやすい特徴を示した(図 3-2 A)。更に dwarf 系統でのみ、葉に色素の薄い部分が斑に見られた(図 3-2B)。一方で、 T_0 世代で見られたような分けつ数の増加は起こらなかった。そして retarded-growth 系統はコントロールとほぼ同程度の伸長成長を示した(図 3-2 A)。登熟期のイネから有効分けつを採取し、根元から穂の付け根までの草丈を測定したところ、pIGnos 系統、retarded-growth 系統、dwarf 系統でそれぞれ平均 33.8 cm、31.3 cm、22.6 cm であり、dwarf 系統では pIGnos 系統と比較して有意に草丈が低かった(図 3-3)。 T_0 世代と T_1 世代の間でこれらの表現型の変化が起こった原因としては、形質転換操作の有無による差や、DNA のメチル化による遺伝子発現量の変化などが考えられる。しかし、 T_1 世代においても少なくとも dwarf 系統については矮化の表現型が受け継がれており、形質転換イネの表現型の変化が pIG121-GUS(-)-Abf コンストラクトの導入により起きたものであることは間違いないだろう。

T₂ 世代でも、栄養成長期(土移植後 1 ヶ月)の時点で明確に伸長成長に差が見られ(図 3-2 C)、登熟期(土移植後 3 ヶ月)には根元から穂の付け根までの茎の長さがコントロールでは 30 – 40 cm 程度であったのに対し、dwarf 系統では 20 – 30 cm 程度であった(図 3-2 D)。

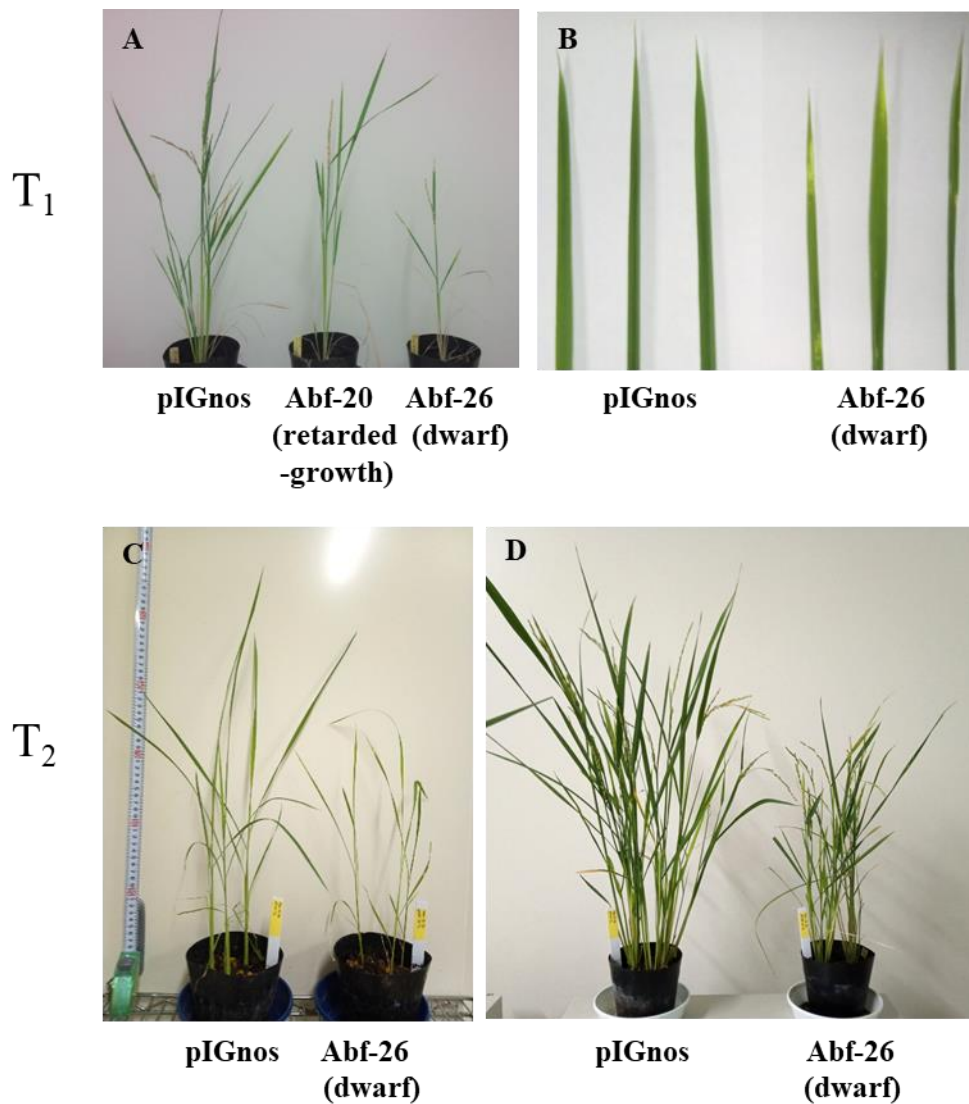


図 3-2. 形質転換イネの表現型(T₁ および T₂ 世代)

(A) T₁ 世代の登熟期における表現型。(B) T₁ 世代の dwarf 系統の葉で観察された、色素の薄い部分の斑模様。(C) T₂ 世代の栄養成長期(土移植後 1 ヶ月)における表現型。(D) T₂ 世代の登熟期(土移植後 3 ヶ月)における表現型。

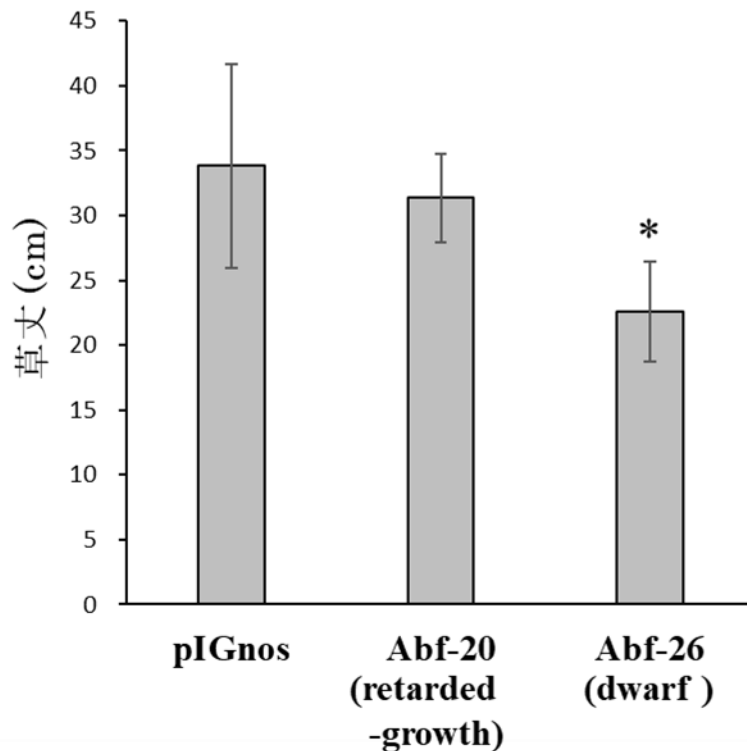


図 3-3. 登熟期における有効分けつの草丈(T₁)

pIGnos、Abf-20、Abf-26 系統からそれぞれ 13、6、5 本の有効分けつを採取し、根元から穂の付け根までの長さを測定して、平均 ± 標準偏差で表記した。統計処理は pIGnos と Abf-20、pIGnos と Abf-26 間でそれぞれ student の *t* 検定法を用いて行った。*は有意水準 5% ($p < 0.05$) で有意差があった数値を示している。

3-4-2 形質転換イネの PCR 解析

T₁ 世代の形質転換イネからゲノム DNA を抽出し、PCR によって遺伝子導入を確認した。*CcAbf62A* の増幅のため、表 1-1 記載の PrxA3a シグナル配列に相当する塩基配列(*prxA3a* Forward primer)と、*CcAbf62A* のコードしているタンパク質の C 末端側に相当する塩基配列の相補鎖(*CcAbf62A* Reverse primer)を、プライマーセットとして用いて反応を行った。アガロースゲル電気泳動を行った結果、*CcAbf62A* の配列に相当する 1,241 bp のバンドが確認された(図 3-4)。この結果から、pIG121-GUS(-)-Abf 系統に導入された遺伝子について、一過性の導入ではなく、各遺伝子がイネゲノム中に組み込まれて安定して後代に受け継がれていることが確認された。

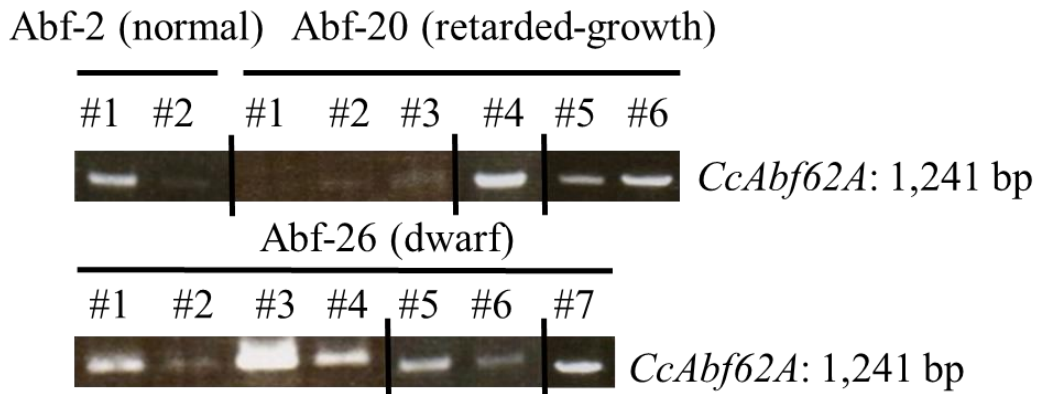


図 3-4. pIG121-GUS(-)-Abf 系統ゲノム PCR(T₁)

PCR 解析に供した形質転換イネ Abf-2、Abf-20、Abf-26 それぞれ 2、6、7 個体について、*CcAbf62A* 由来の 1,241 bp のバンドが確認された。

3-4-3 形質転換イネの RT-PCR 解析

T₁ 世代のイネを用いて、RT-PCR により遺伝子発現の確認を行った。*Act1* のバンドを内部標準として発現量を比較したところ、*dwarf* 系統において *normal* や *retarded-growth* 系統よりも濃い *CcAbf62A* のバンドが確認され、高い発現量を持つことが示唆された(図 3-5A)。1 系統につき 2 個体ずつ分析を行ったが、同系統の個体では同程度の発現量が見られた。また、ImageJ を用いて *CcAbf62A* と *Act1* のバンドの蛍光強度比を算出したところ、*dwarf* 系統で高い *CcAbf62A* 発現量が確認された一方、*retarded-growth* 系統と *normal* 系統では同程度の発現量であった(図 3-5B)。T₁ 世代において、*retarded-growth* 系統ではコントロールと同様の伸長成長が見られた(図 3-2A)ことから、T₁ 世代の *retarded-growth* 系統における *CcAbf62A* の作用はそれほど強くないと推測され、遺伝子発現量との相関性が示唆された。これらの結果から、形質転換イネで確認された表現型の違いは、主に導入された *CcAbf62A* の発現量の違いによるものと推測される。同じコンストラクトを挿入した形質転換体の中で発現量の違いが生じた原因としては、位置効果や DNA のメチル化などの理由が考えられる。より詳細な遺伝子発現解析のため、導入遺伝子のコピー数の解析や、ホモ接合体とヘテロ接合体の遺伝子発現量の比較などを行いたい。

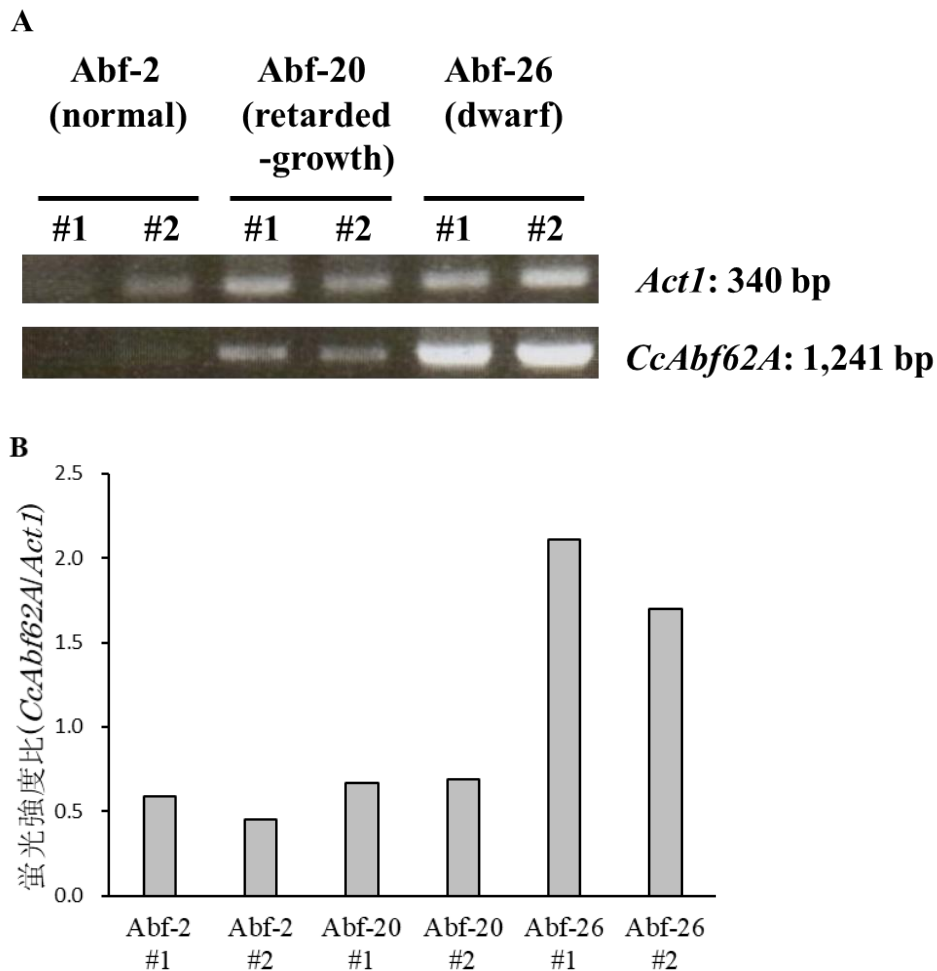


図 3-5. pIG121-GUS(-)-Abf 系統 RT-PCR(T₁)

(A) アガロースゲル電気泳動の写真。*Act1* の mRNA に由来する 340 bp のバンドと *CcAbf62A* に由来する 1,241 bp のバンドが検出された。(B) ImageJ を用いた蛍光強度の比較。*CcAbf62A* と内部標準である *Act1* のバンドの蛍光強度の比を算出した。

3-4-4 フロログルシノール塩酸染色によるリグニン沈着量の観察

T₁ 世代のイネを用いたフロログルシノール塩酸染色の結果を図 3-6 に示した。dwarf 系統とコントロールでは伸長成長速度に差があったが、播種から出穂・登熟までの期間は同程度であったため、生育段階ごとに茎サンプルを採取して分析に供した。栄養成長期において、dwarf 系統では維管束や表皮組織において、コントロールよりもリグニン沈着量が少なかった(図 3-6A, B)。そして、リグニン沈着量の減

少は出穂期まで続いていた(図 3-6C, D)。しかし、登熟期まで成長が進むと、リグニン沈着パターンは dwarf 系統とコントロールとの間にほとんど差は無かった(図 3-6E, F)。また、リグニン生合成を抑制した植物においてよく確認される、導管の形態異常は[9][10]、dwarf 系統において見られなかった。

リグニンは疎水性物質として、維管束組織を裏打ちすることによって、水分の管外への漏出を抑える役割を担っている。そのため、維管束組織へのリグニン沈着の遅れによって起こる水分損失の増加と通導性の低下は、dwarf 系統で確認された順化能力の低下の要因の一つとして考えられる[45][46]。

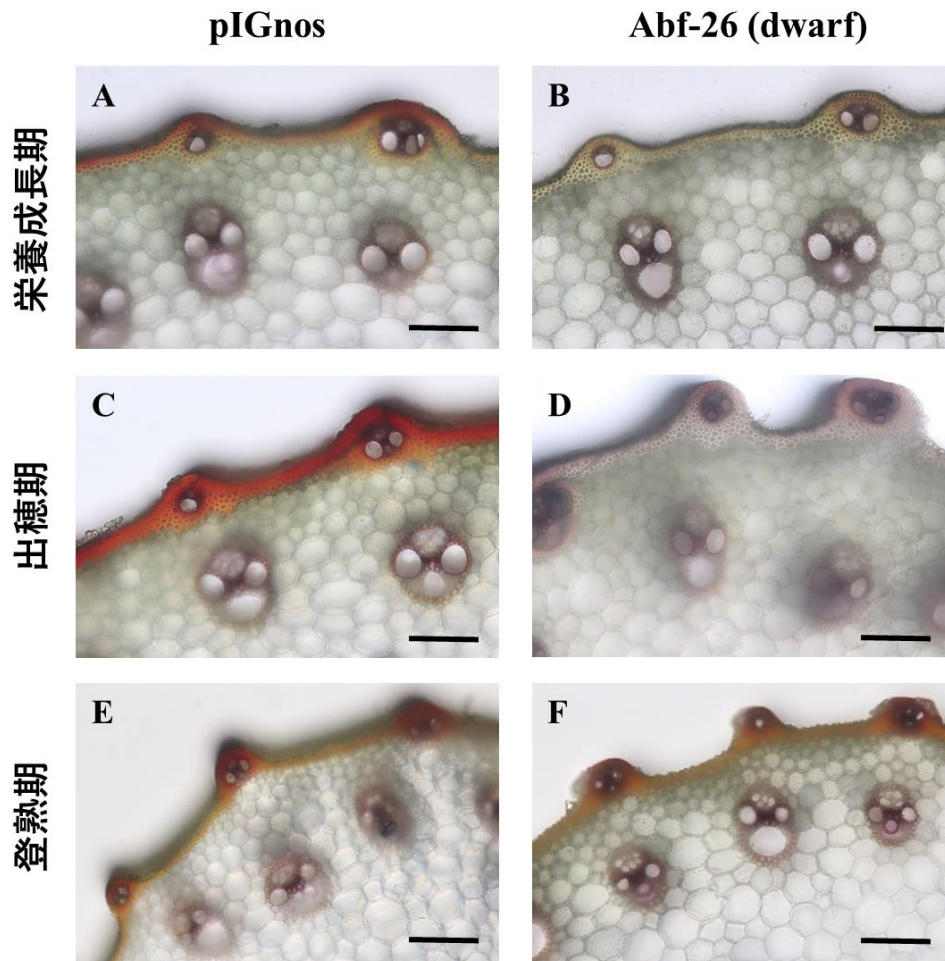


図 3-6. フロログルシノール塩酸染色による茎組織へのリグニン沈着の観察(T₁)

栄養成長期の茎は地上 2 cm 部分を、出穂期の茎は第二節間部の中腹を、登熟期の茎は第三節間部の中腹を用いて横断切片を作製した。スケールバーは 100 μ m。

3-4-5 アルカリ脱リグニン効率の測定

AcBr 法によるリグニン含量の測定結果を図 3-7 に、アルカリ脱リグニン効率および質量回収率の測定結果を図 3-8 に示した。なお T₁ 世代では normal 系統と retarded-growth 系統との間に表現型の違いが見られなかったため、retarded-growth 系統および dwarf 系統を分析に供した。AcBr リグニン含量について有意差は無かったが、コントロールと比較して dwarf 系統と retarded-growth 系統でそれぞれ 94.4%、90.5%と僅かに減少が見られた(図 3-7)。

また、アルカリ脱リグニン効率に関しても有意差は無かったが、コントロールが 76.2%であったのに対し、dwarf 系統および retarded-growth 系統ではそれぞれ 72.7%、73.5%と僅かに低下していた(図 3-8A)。対照的に、質量回収率は retarded-growth と control 系統がそれぞれ 58.2%、59.4%であったのに対して、dwarf 系統では 51.6%と有意に低下していた(図 3-8B)。一般的に、脱リグニン効率と質量回収率は負の相関性を示す。脱リグニン効率が向上しなかった一方で質量回収率だけが低下した原因としては、第一に dwarf 系統においてリグニン-多糖間の結合様式の存在比が変化している可能性が考えられる。アルカリ条件下ではフェルラ酸-リグニン間の結合(エステル結合)は切断されるが、リグニン-多糖間のベンジルエーテル結合(エーテル結合)はアルカリ抵抗性を示す[33]ために切断されにくい。CcAbf62A はアラビノキシランからアラビノース側鎖を切り離すことで、フェルラ酸-リグニン間の結合を減少させる酵素である。そのため、CcAbf62A を導入した系統ではアルカリ条件下で切断される結合が減少したことで、アルカリ脱リグニン効率が低下してしまった可能性が考えられる。また、第二に dwarf 系統においてアルカリ可溶性の画分が増加している可能性が考えられる。30°Cの 1 M NaOH 処理ではリグニンだけでなくヘミセルロースの一部も溶出する[47]ため、CcAbf62A の作用によってアラビノキシランとリグニン間の LCC が切断されたことでキシロースの溶出量が増加したり、矮化によってセルロースに対するヘミセルロースの比率が増加したりした可能性も考えられる。

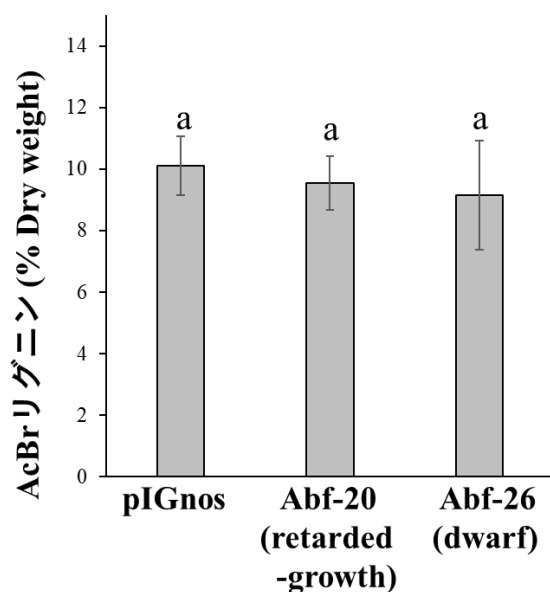


図 3-7. AcBr リグニン含量の測定(T₁)

各数値は 4 回測定平均 ± 標準偏差で表記した。統計処理は Tukey 法を用いて行ったが、有意水準 5% ($p < 0.05$) で有意差は確認されなかった。

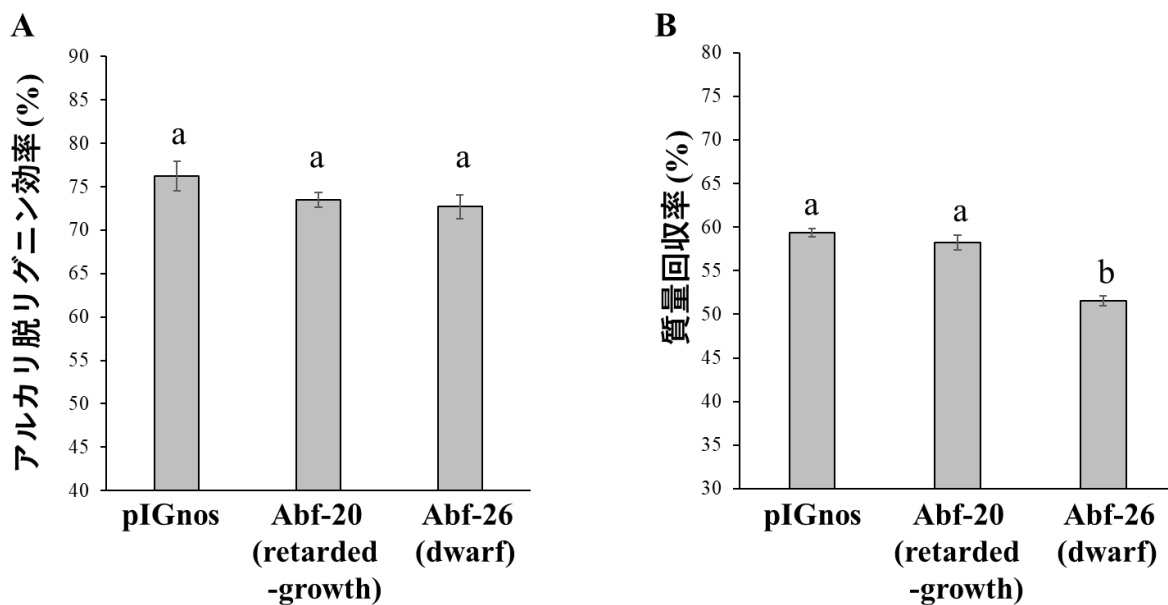


図 3-8. アルカリ脱リグニン効率および質量回収率の測定(T₁)

各数値は 3 回測定平均 ± 標準偏差で表記した。統計処理は Tukey 法を用いて行った。異なる文字は有意水準 5% ($p < 0.05$) で有意差があった数値を示している。

3-4-6 HPLC による *p*-ヒドロキシ桂皮酸類の定量

標準品を用いて測定したクロマトグラムを図 3-9 に示した。グラジエント溶離中に検出された 23.4 min 付近のピークを *p*CA、25.5 min 付近のピークを FA、アセトニトリル 25%条件下で溶離中に検出された 37.5 min 付近のピークを 3,4,5-TMCA と帰属した。このクロマトグラムを元に、サンプルのクロマトグラム中のピークを帰属し、検量線を用いて定量を行った。

HPLC による分析結果を表 3-2 に示した。dwarf 系統および pIGnos 系統の T₂ 世代のイネをサンプルとして用いた。出穂期のイネの茎を用いた分析では、*p*-ヒドロキシ桂皮酸類の含量に有意差は見られなかった。有意差が出なかった原因としては、出穂期まで生育が進むと分けつごとの成分含量の差が大きくなり、偏差が大きくなってしまったことが考えられる。また、CcAbf62A の基質であるアラビノキシランは生育の早い段階で多く見られる成分であるため、早い生育ステージの茎を用いて分析を行うことで異なる結果が得られると考えた。そこで、草丈 10–15 cm の栄養成長期のイネの茎をサンプルとして同様の分析を行った。

栄養成長期では、dwarf 系統において *p*CA の有意な減少が見られた。一方で FA は個体ごとに差は大きかったが、dwarf 系統においてやや多く、*p*CA / FA は有意に低下していた。出穂期では *p*CA、FA 共に dwarf 系統で僅かに減少していたが、栄養成長期と同じく *p*CA / FA に関しては低下していた。*p*CA と FA のバランスは細胞の成長段階によって変わり、FA は細胞の伸長段階で蓄積されるのに対して *p*CA は細胞の伸長が終了してから蓄積が始まる [17]。そのため、dwarf 系統において *p*CA / FA が低下していたことは、伸長成長の遅れとの関連性が見て取れる。CcAbf62A はアラビノキシランのアラビノース側鎖を切断し、*p*-ヒドロキシ桂皮酸の中でも特に FA を介した結合を減少させると考えられる。しかし、dwarf 系統では細胞壁結合性の FA の割合は増加傾向にあったことから、アラビノキシラン以外の多糖類と、もしくはリグニンと FA の結合が増加している可能性が考えられる。

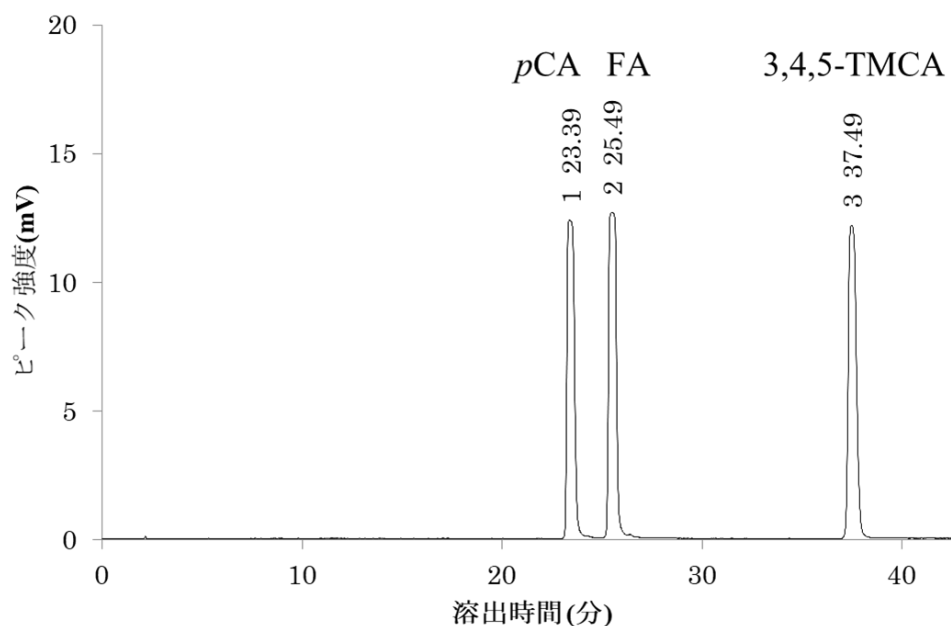


図 3-9. 標準品のクロマトグラム

*p*CA、FA、3,4,5-TMCA の標準品をそれぞれ 1000 mg/L となるように 50%メタノールに溶解してフィルトレーションした溶液 50 μ L をインジェクションして得られたクロマトグラムを示している。検量線の作成の際には各標準品を個別に調製した溶液を用いた。

表 3-2. HPLC による *p*-ヒドロキシ桂皮酸類の定量

出穂期	<i>p</i> CA(nmol/mg)	FA(nmol/mg)	<i>p</i> CA / FA
Abf-26 (dwarf)	50.02 \pm 12.19	27.85 \pm 4.47	1.78 \pm 0.16
pIGnos	60.93 \pm 11.89	29.16 \pm 3.35	2.07 \pm 0.19
栄養成長期	<i>p</i> CA(nmol/mg)	FA(nmol/mg)	<i>p</i> CA / FA
Abf-26 (dwarf)	23.15 \pm 1.10 *	76.48 \pm 15.81	0.31 \pm 0.05 *
pIGnos	26.83 \pm 1.18	53.18 \pm 10.07	0.52 \pm 0.07

各数値は3回測定平均 \pm 標準偏差で表記した。統計処理は student の *t* 検定法を用いて行った。

*は有意水準 5% ($p < 0.05$) で有意差があった数値を示している。

3-5 まとめ

pIG121-GUS(-)-Abf 系統の T₁ および T₂ 世代を用いた分析を行った。コントロールと同様の表現型を示した *retarded-growth* 系統でも、伸長成長の抑制が見られた *dwarf* 系統でも、リグニン含量はコントロールと変わらない値であった。しかし、各生育段階におけるリグニン沈着量を確認したところ、登熟期におけるリグニン沈着量は同等でも、栄養成長期から出穂期にかけては *dwarf* 系統においてコントロールよりも維管束組織や表皮組織におけるリグニン沈着量は減少していた。これにより、*dwarf* 系統では生育初期において水分ロスの増加や通導性の低下が起こると考えられ、これが *dwarf* 系統において確認された順化能力の低下に関係していると予想される。

また、脱リグニン効率については *dwarf* 系統、*retarded-growth* 系統とコントロールとの間に有意差は見られなかった。しかし、*dwarf* 系統においてはアルカリ処理後の質量回収率が大きく減少しており、アルカリ脱リグニン処理との反応性自体は向上している可能性が示唆された。質量回収率は減少したが脱リグニン効率は変わらなかった原因としては、CcAbf62A の生産によって減少すると考えられるアラビノキシラン-フェルラ酸間の結合はアルカリ処理で切断されやすいエステル結合であり、相対的にアルカリ処理で切断されにくい結合が増加したためではないかと考えられる。

T₂ 世代のイネをサンプルとして、HPLC により *p*-ヒドロキシ桂皮酸類の定量を行ったところ、栄養成長期では *dwarf* 系統においてコントロールと比較して有意に *pCA*/FA が減少していた。この結果は *dwarf* 系統において細胞の伸長成長が抑制されて *pCA* の蓄積が阻害されている可能性を示している。また、CcAbf62A の導入によりアラビノキシランのアラビノース側鎖が減少すると考えられるが、細胞壁結合性の FA はコントロールと比較して減少することは無かった。*dwarf* 系統においてアラビノース側鎖が減少しているとするれば、細胞壁と FA の別の結合様式が増加している可能性が考えられる。

多分げつ体化はストリゴラクトン生合成系酵素であるカロテノイドジオキシゲナーゼ遺伝子の変異体など、様々な形質転換イネで確認されているが、この多分げつ体化は矮化と同時に起こることが多い[38]。これは、イネの伸長成長と分げつが

トレードオフの関係にあるためと考えられる。本研究で作出された pIG121-GUS(-)-Abf 導入イネの dwarf 系統でも、第 2 章で述べたように分けつを間引くことによって伸長成長がある程度改善された。T₁ 世代では分けつ数の増加は見られず、一方で矮化は後代にも受け継がれていたことから、dwarf 系統では矮化が主要な表現型の変化で、多分けつ体化はそれに付随して起こった変化であると推測される。

CcAbf62A の導入が引き起こす矮化のメカニズムについて、本研究の結果からいくつかの仮説が立てられる。

一つ目に、*CcAbf62A* によって LCC の形成に関わるアラビノキシランのアラビノース側鎖が切断されることで、木部組織へのリグニン沈着が妨げられ、水分や養分を高い位置まで正常に輸送できなくなるために伸長成長が阻害されるという説が考えられる。dwarf 系統ではフロログルシノール塩酸染色の結果、栄養成長期から出穂期にかけて木部組織や表皮へのリグニン沈着の遅れが見られた。木部組織へのリグニン沈着の遅れは、維管束を通じた水分輸送の際の管外への漏出の増加につながると考えられる。T₁ 世代の dwarf 系統の葉で色素の薄い部分が斑模様として観察されたことも、葉への水分や養分の輸送が妨げられていることを示唆している。また、HPLC による *p*-ヒドロキシ桂皮酸類の定量的結果、dwarf 系統の栄養成長期の茎において *pCA* が減少していた。*pCA* は主にリグニンとエステル結合を形成し[48]、細胞壁のリグニン化に重要な役割を持っているため[49]、この結果も dwarf 系統において二次壁へのリグニンの沈着が遅れていることを示している。

二つ目に、*CcAbf62A* によってアラビノキシランのアラビノース側鎖が切断されることで、*pCA/FA* が低下し、それが原因で矮化が起こった可能性が考えられる。*CcAbf62A* の基質であるアラビノキシランは、主に FA と結合を形成する[48]が、FA の量は HPLC による定量的結果、dwarf 系統において減少が見られず、*pCA/FA* については栄養成長期において有意に低下していた。dwarf 系統ではアラビノキシランのアラビノース残基が切断されて FA や *pCA* の結合部位が減少していると予想されるが、細胞伸長中にも蓄積される FA が優先的にアラビノキシランと結合を形成し、細胞伸長終了後に蓄積される *pCA* の結合量が減少したため *pCA/FA* の低下につながったと考えられる。細胞壁結合性の FA は、FA を介した LCC やジフェルラ酸を介した多糖間の架橋の形成を促し、細胞壁の構造を強固にするとともに伸長成長を停止させることが知られている[50]。*pCA/FA* と草丈との相関性について調べ

るため、より詳細な分析を行うことが望まれる。

三つ目に、アラビノース側鎖が切断されたことで、セルロース-キシラン間の結合が強固になったことが矮化につながった可能性も考えられる。キシラン鎖には一定間隔でアラビノース側鎖やグルクロン酸などの置換基が付加されており、置換基の無いキシラン鎖の疎水性領域がセルロースの親水性領域と水素結合する[51]。そのため、アラビノフラノシダーゼによるアラビノース側鎖の切断は、アラビノキシランの疎水性を高めてセルロースとの結合をより強固にすると考えられる。これにより細胞壁が固くなり、細胞の伸長成長が妨げられた可能性が考えられる。矮化のメカニズムの詳細を明らかにするためには、アラビノキシランに結合しているアラビノース側鎖の量や、FA の細胞壁中での存在形態についても分析を進めていくことが望まれる。

今後は、この矮化を引き起こすのが *CcAbf62A* 特異的なものであるか、その他のアラビノフラノシダーゼの発現によっても引き起こされるものであるのかを他のアラビノフラノシダーゼの遺伝子を用いて確認する必要がある。*C. cinerea* からは本研究で使用された *CcAbf62A* (*CcGH62A*) 以外にも同じグリコシルヒドロラゼファミリー62(GH62)に属する酵素の遺伝子 *CcGH62B* および *CcGH62C* が単離されており[52]、これらの酵素についてもイネに導入して表現型を比較する必要がある。更に、*CcAbf62A* をタバコに導入した際には矮化が生じなかったことから[23]、*CcAbf62A* の生産がアラビノキシランを多く含む単子葉植物に特異的に矮化を引き起こすのかどうかについても検討を行うことが望まれる。

また、栽培イネ(*Oryza sativa* L.)はもともと多年生植物であり、その祖先と考えられている野生イネ(*O. rufipogon*)は環境が悪化しないと種子を生産する効率が悪く、分げつを繰り返して栄養繁殖を行っている[53]。栄養繁殖と種子繁殖にもこの度見つけた現象が関わっているのかについても、検討を加える必要がある。

終章

現代社会が抱える大きな課題の一つとして、人口増加や工業化に伴う世界的な化石燃料の枯渇が挙げられる。化石燃料はその名の示す通り、地中に堆積した動物や植物などの有機物が、長い年月をかけて化石となることができる燃料であるため、実質的に有限な資源である。そのため、我々人類が持続可能な発展を続けていくためには、化石燃料に代わる再生可能なエネルギーの創出が求められている。バイオエタノールは植物を原料として糖化・発酵することで作られ、燃料として利用した際に放出される二酸化炭素を再び植物が吸収して生育するため、再生可能エネルギーとして注目されている。しかし、植物細胞壁の複雑な組成や構造に由来する糖化効率の低さや、原料となる植物と食用の作物との競合などの問題点から、バイオエタノールの利用は限定的なものに留まっている。易脱リグニン植物の作出は、バイオエタノールの生産効率を向上させ、化石燃料に代わり得るだけの実用性を持たせる上で重要な研究である。更に、イネやコムギなどの作物の収穫後のわらをバイオエタノール原料として利用することができれば、食用の作物との競合という問題点も解決する。現在、日本では多くの水田を持て余しており、また稲わらの多くは未利用資源として存在している。そのため、稲わらの産業利用は農業の生産性を向上させ、農地や資源の有効活用にもつながるであろう。

1940年代から1960年代にかけて、緑の革命と呼ばれる穀物の大量増産が起こった。イネにおける緑の革命の立役者となったのが、半矮性遺伝子 *SD1* の発見である。*SD1* 変異型のイネでは矮化が起こって草丈が低く抑えられるが、穂の生育は正常に行われるという性質(半矮性)を持ち、大量の施肥を行っても倒伏が起きにくくなるため収量の増加につながった[54]。*SD1* はジベレリン生合成系酵素 GA20 オキシダーゼの遺伝子であり、この遺伝子の変異によりジベレリンの生合成量が減少し、ジベレリンによる成長促進に異常が生じるために矮化が起こる[55]。しかし、単一の遺伝子の利用だけでは矮化の程度にも限界があるため、*SD1* の発見以降、*SD1* の変異との相乗効果によって更なる矮化と収量の増加を実現するために、*SD1* とは異なるメカニズムによって矮化を引き起こす遺伝子の探索が行われてきた。

本研究はわらに着生する腐生担子菌 *C. cinerea* 由来の LCC 分解系酵素 CcEST1 および CcAbf62A をイネに生産させることで、稲わらの易脱リグニン化を達成するこ

とを目的として行われた。第 1 章では *CcEST1* および *CcAbf62A* のイネへの導入によって、野生型と同様に生育できる形質転換イネ pActEST 系統および pActAbf 系統が得られ、また、これらの系統において僅かながら飼料消化率の向上やセルロース含量の増加が確認された。第 2 章では *CcAbf62A* を CaMV 35S プロモーター下流につないだコンストラクトのイネへの導入によって、矮化および多分げつ体化が生じることが明らかにされ、*CcAbf62A* を用いたイネの耐倒伏性や多収量化といった新たな可能性が見出された。第 3 章では dwarf 表現型を示した形質転換イネの後代を用いた分析を行い、dwarf 系統においてリグニン沈着の遅れや、アルカリ処理への反応性の変化、pCA/FA の低下などの様々な違いが確認され、矮化のメカニズムやアラビノキシランの持つ役割に関して考察した。このように LCC 分解系酵素のイネへの導入は、想定されていなかった強度の表現型の変化を引き起こし、本来の目的であった稲わらの易脱リグニン化に加えて、イネの矮化メカニズムとの両視点から研究を進めた。*CcEST1* を導入されたイネでは矮化や不稔などの表現型への悪影響は見られず、僅かながらの多糖類の利用性向上が確認されたことから、飼料イネの育種への応用が期待される。*CcAbf62A* を導入されたイネではプロモーターの違いや遺伝子発現の違いによって全く異なる表現型が確認された。dwarf 系統で生じた表現型の変化について更に分析を進めていくことで、作物の新たな矮化メカニズムとしての利用や、伸長成長とアラビノキシラン、LCC の関連性の解明につながるだろう。本研究で作出されたこれらの形質転換系統で確認された細胞壁成分含量やその利用性に関する様々な変化について、詳細は明らかになっていない部分もまだ多い。しかし、腐生担子菌由来の LCC 分解系酵素を植物に導入するという新たなアプローチのもとに行われたこれらの研究によって、植物の易脱リグニン化、ひいては再生可能エネルギーの創出に寄与する数々の重要な知見が得られたと考えている。

参考文献

- [1] Kawai S (2014) Plant molecular breeding to energy crops as genetic improvements of biomass saccharification. In: Tojo S, Hirasawa T (eds). *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems*. Elsevier Publishing, Oxford, Kidlington, pp 74–88.
- [2] Simmons BA, Loque D, Ralph J (2010) Advances in modifying lignin for enhanced biofuel production. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 313–320
- [3] 志波朋美 修士論文 (2007) 「リグニン生合成系の抑制による飼料イネ消化性の向上」
- [4] 久保賢太郎 修士論文 (2004) 「リグニン生合成系の抑制による飼料イネ消化性の向上」
- [5] Halpin C (2019) Lignin engineering to improve saccharification and digestibility in grasses. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **56**, 223–229
- [6] Hisano H, Nandakumar R, Wang Z-Y (2009) Genetic modification of lignin biosynthesis for improved biofuel production. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, **45**, 306–313
- [7] Xie M, Zhang J, Tschaplinski TJ, Tuskan GA, Chen J-G, Muchero W (2018) Regulation of lignin biosynthesis and its role in growth-defense tradeoffs. *Front Plant Sci.*, **9**(1427)
- [8] Bensussan M, Lefebvre V, Ducamp A, Trouverie J, Gineau E, Fortabat M-N, Guillebaux A, Baldy A, Naquin D, Herbette S, et al. (2015) Suppression of dwarf and *irregular xylem* phenotypes generates low-acetylated biomass lines in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **168**, 452–463

- [9] Phitsuwan P, Sakka K, Ratanakhanokchai K (2013) Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass Bioenergy*, **58**, 390–405
- [10] Li X, Yang Y, Yao J, Chen G, Li X, Zhang Q, Wu C (2009) *FLEXIBLE CULM 1* encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice. *Plant Mol. Biol.*, **69**, 685–697
- [11] De Meester B, Madariaga Calderon B, de Vries L, Pollier J, Goeminne G, Van Doorselaere J, Chen M, Ralph J, Vanholme R, Boerjan W (2020) Tailoring poplar lignin without yield penalty by combining a null and haploinsufficient *CINNAMOYL-CoA REDUCTASE2* allele. *Nat. Commun.*, **11(5020)**
- [12] Pedersen JF, Vogel KP, Funnell DL (2005) Impact of reduced lignin on plant fitness. *Crop Sci.*, **45**, 812–819
- [13] Tarasov D, Leitch M, Fatehi P (2018) Lignin–carbohydrate complexes: properties, applications, analyses, and methods of extraction: a review. *Biotechnol. Biofuels*, **11(269)**
- [14] HASHIMOTO K, KANEKO S, YOSHIDA M (2010) Extracellular Carbohydrate Esterase from the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea* Released Ferulic and Acetic Acid from Xylan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74(8)**, 1722–1724.
- [15] HASHIMOTO K, KANEKO S, YOSHIDA M (2011) Isolation and Characterization of CcAbf62A, a GH62 α -L-Arabinofuranosidase, from the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75(2)**, 342–345.

- [16] Kulkarni AR, Pattathil S, Hahn MG, York WS, O'Neill MA (2012) Comparison of arabinoxylan structure in bioenergy and model grasses. *Ind. Biotechnol.* (New Rochelle NY), **8**, 222–229
- [17] Sato-Izawa K, Ito M, Nuoendagula, Kajita S, Nakamura SI, Matsumoto T, Ezura H (2020) Distinct deposition of esterlinked ferulic and *p*-coumaric acids to the cell wall of developing sorghum internodes. *Plant Biotechnol.*, **37**, 15–23
- [18] Chiniquy D, Sharma V, Schultink A, Baidoo EE, Rautengarten C, Cheng K, Carroll A, Ulvskov P, Harholt J, Keasling JD, et al. (2012) XAX1 from glycosyltransferase family 61 mediates xylosyltransfer to rice xylan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 17117–17122
- [19] Buanafina MM de O, Langdon T, Hauck B, Dalton S, Morris P (2008) Expression of a fungal ferulic acid esterase increases cell wall digestibility of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Plant Biotechnol. J.*, **6**, 264–280
- [20] Chen C, Zhao X, Wang X, Wang B, Li H, Feng J, Wu A (2021) Mutagenesis of UDP-xylose epimerase and xylan arabinosyltransferase decreases arabinose content and improves saccharification of rice straw. *Plant Biotechnol. J.*, **19**, 863–865
- [21] Osakabe K, Koyama H, Kawai S, Katayama Y, Morohoshi N (1995) Molecular cloning of two tandemly arranged peroxidase genes from *Populus kitakamiensis* and their differential regulation in the stem., *Plant Mol. Biol.*, **28**, 677–689.
- [22] 浅田真由 卒業論文 (2014) 「Lignin Carbohydrate Complex (LCC)分解系エステラーゼ生産植物の作出」
- [23] 松井博亮 卒業論文 (2014) 「LCC(lignin-carbohydrate complex)分解系アラビノフラノシダーゼ生産植物の作出」

- [24] 品川真里菜 卒業論文(2015)「Lignin Carbohydrate Complex (LCC)分解系エステラーゼ及びアラビノフラノシダーゼ生産植物の作出」
- [25] 丸山亮 修士論文(2018)「Lignin Carbohydrate Complex (LCC)分解系エステラーゼおよびアラビノフラノシダーゼ生産イネの作出」
- [26] McElroy D, Zhang W, Cao J, Wu R (1990) Isolation of an Efficient Actin Promoter for use in rice Transformation, *The Plant Cell*, **2**, 163–171.
- [27] Perez Bernal M, Abreu Remedios D, Valdivia Perez O, Delgado Rigo M, Armas Ramos R (2016) Assessment three constitutive promoters for GUS expression in rice (*Oryza sativa* L., var. J-104). *Rev. Colomb. Biotecnologia*, **18**, 81–89
- [28] Schledzewski K, Mendel RR (1994) Quantitative transient gene expression: Comparison of the promoters for maize polyubiquitin1, rice actin1, maize-derived *Emu* and CaMV 35S in cells of barley, maize and tobacco. *Transgenic Res.*, **3**, 249–255
- [29] Zhang W, McElroy D, Wu R (1991) Analysis of Rice *Act1* 5' Region Activity in Transgenic Rice Plants, *The Plant Cell*, **3**, 1155–1165.
- [30] Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, **74**, 3583–3597
- [31] 作物分析法委員会 (1975)「栄養診断のための栽培植物分析測定法」 488–499
- [32] Moreira-Vilar FC, Siqueira-Soares R de C, Finger-Teixeira A, Oliveira DM de, Ferro AP, da Rocha GJ, Ferrarese M de LL, dos Santos WD, Ferrarese-Filho O (2014) The Acetyl Bromide Method Is Faster, Simpler and Presents Best Recovery of Lignin in

- Different Herbaceous Tissues than Klason and Thioglycolic Acid Methods. *PLoS ONE*, **9(10)**, e1110000.
- [33] Grabber JH, Hatfield RD, Lu F, Ralph J (2008) Coniferyl Ferulate Incorporation into Lignin Enhances the Alkaline Delignification and Enzymatic Degradation of Cell Walls. *Biomacromolecules*, **9**, 2510–2516
- [34] 朴承榮, 幸田圭一, 松本雄二, 飯塚堯介, 飯山賢治 (1999) 「イネワラのアリカリ蒸解過程における脱シリカと脱リグニン挙動との速度論的比較」 紙パ技協紙, **52(9)**, 96–103
- [35] Van Acker R, Leple J-C, Aerts D, Storme V, Goeminne G, Ivens B, Legee F, Lapierre C, Piens K, Van Montagu MCE, et al. (2014) Improved saccharification and ethanol yield from field-grown transgenic poplar deficient in cinnamoyl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 845–850
- [36] Akama K, Shiraishi H, Ohta S, Nakamura K, Okada K, Shimura Y (1992) Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: Comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotypes and Agrobacterium strains. *Plant Cell Rep.*, **12**, 7–11
- [37] Saika H, Onodera H, Toki S (2012) Visual Selection in Rice: A Strategy for the Efficient Identification of Transgenic Calli Accumulating Transgene Products. *Transgenic Plants: Methods and Protocols, Methods Mol. Biol.*, **847**, 67–74.
- [38] Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, Zhao X, Pan X, Xie Q, Zhu L (2006) The rice *HIGH-TILLERING DWARF1* encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *The Plant J.*, **48**, 687–698

- [39] 甘利雅弘, 田島清, 大森英之 (2017) 「aNDFom, ADFom および ADL 連続分析の有用性」 *Bull. NARO, Livest. Grassl. Sci.*, **17**, 7–11
- [40] Horikawa Y, Hirano S, Mihashi A, Kobayashi Y, Zhai S, Sugiyama J (2019) Prediction of lignin contents from infrared spectroscopy: Chemical digestion and lignin/biomass ratios of *Cryptomeria japonica*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **188**, 1066–1076
- [41] Ebringerová A, Heinze T (2000) Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, 542–556
- [42] Yoshida K, Sakamoto S, Kawai T, Kobayashi Y, Sato K, Ichinose Y, Yaoi K, Akiyoshi-Endo M, Sato H, Takamizo T, et al. (2013) Engineering the *Oryza sativa* cell wall with rice NAC transcription factors regulating secondary wall formation. *Front Plant Sci.*, **4**, 383
- [43] Miyamoto T, Yamamura M, Tobimatsu Y, Suzuki S, Kojima M, Takabe K, Terajima Y, Mihashi A, Kobayashi Y, Umezawa T (2018) A comparative study of the biomass properties of *Erianthus* and sugarcane: Lignocellulose structure, alkaline delignification rate, and enzymatic saccharification efficiency. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **82**, 1143–1152
- [44] Anderson N (2016) Cell Wall-bound *p*-Coumaric and Ferulic Acid Analysis. *bio-protocol*, **6(19)**
- [45] Ke S, Luan X, Liang J, Hung Y-H, Hsieh T-F, Zhang X-Q (2019) Rice OsPEX1, an extensin-like protein, affects lignin biosynthesis and plant growth. *Plant Mol. Biol.*, **100**, 151–161

- [46] Pandey V, Shukla A (2015) Acclimation and tolerance strategies of rice under drought stress. *Rice Sci.*, **22**, 147–161
- [47] Xu F, Sun JX, Liu CF, Sun RC (2006) Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. *Carbohydr. Res.*, **341**, 253–261
- [48] Li G, Jones KC, Eudes A, Pidatala VR, Sun J, Xu F, Zhang C, Wei T, Jain R, Birdseye D, Canlas PE, Baidoo EEK, Duong PQ, Sharma MK, Singh S, Ruan D, Keasling JD, Mortimer JC, Loqué D, Bartley LE, Scheller HV, Ronald PC (2018) Overexpression of a rice BAHD acyltransferase gene in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) enhances saccharification. *BMC Biotechnol.*, **18(54)**
- [49] Martínez-Rubio R, Centeno ML, García-Angulo P, Álvarez JM, Acebes JL, Encina A (2020) The role of cell wall phenolics during the early remodelling of cellulose-deficient maize cells. *Phytochemistry*, **170**, 112219
- [50] Eugene A, Lapierre C, Ralph J (2020) Improved analysis of arabinoxylan-bound hydroxycinnamate conjugates in grass cell walls. *Biotechnol. Biofuels*, **13(202)**
- [51] Busse-Wicher M, Li A, Silveira RL, Pereira CS, Tryfona T, Gomes TCF, Skaf MS, Dupree P (2016) Evolution of Xylan Substitution Patterns in Gymnosperms and Angiosperms: Implications for Xylan Interaction with Cellulose. *Plant Physiol.*, **171**, 2418–2431
- [52] Tono-zuka T, Tanaka Y, Okuyama S, Miyazaki T, Nishikawa A, Yoshida M (2017) Structure of the Catalytic Domain of α -L-Arabinofuranosidase from *Coprinopsis cinerea*, CcAbf62A, Provides Insights into Structure–Function Relationships in Glycoside Hydrolase Family 62. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **181**, 511–525

- [53] Mohapatra, PK, Panda BB, Kariali E (2011) Plasticity of Tiller Dynamics in Wild Rice *Oryza rufipogon* Griff.: A Strategy for Resilience in Suboptimal Environments. *International Journal of Agronomy*, **2011**, 1–9
- [54] Athwal DS (1971) Semidwarf rice and wheat in global food needs. *Q. Rev. Biol.*, **46(1)**, 1–34
- [55] Spielmeier W, Ellis MH, Chandler PM (2002) Semidwarf (*sd-1*), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9043–9048

謝辞

東京農工大学 川合 伸也准教授には、長きに亘ってご指導ご鞭撻をして頂き、研究を行う上で必要な多くの知識や技術を学ばせて頂きました。また、恵まれた研究の場を提供して頂き、学会発表や論文投稿などの貴重な経験も積ませて頂きました。そして、研究に行き詰まる度に親身に相談に乗って頂き、新たな道を示して下さいたことで、本研究を形にすることができました。更に、本論文の執筆にあたって多大なるご助力を頂きました。心より感謝申し上げます。

生分解制御学研究室の吉田 誠教授には、LCC 分解系酵素 CcEST1 および CcAbf62A の遺伝子を提供して頂き、研究を進める上でも多くのご助言を頂きました。心より感謝申し上げます。

バイオマス構造機能学研究室の堀川 祥生准教授には、赤外分光分析を行うにあたって分析手法を詳しくご教授頂き、快く分析機器を提供して頂きました。心より感謝申し上げます。

本研究を先駆けて行い、研究の歴史や実験手法について分かりやすく教えて頂いた黛 康悦さん、共に実験を行い、共に試行錯誤しながら研究を前に進めて頂いた森澤 潤さん、そして同じ志を持って研究を行い、時には協力して頂いた植物工学研究室の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究に様々な形で関わって頂いた全ての方々に、多大なる感謝を申し上げます。