

学 位 論 文 要 旨

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

応用生命科学専攻 応用生物化学大講座
丸山 亮

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、CaMV35S 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。