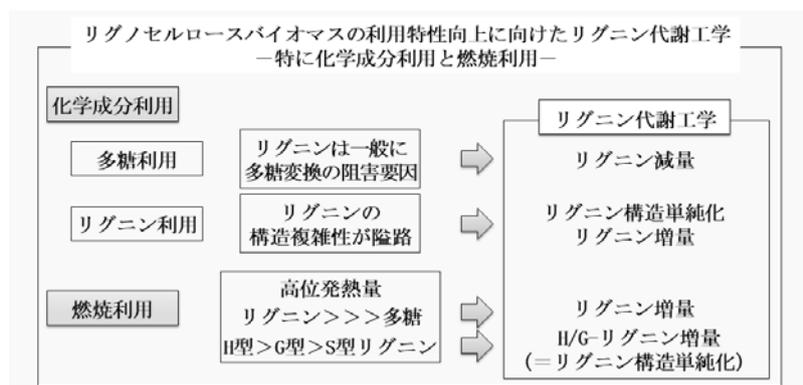


植物とくにイネ科植物でのリグニン生合成制御  
Lignin metabolic engineering of grass biomass plants

梅澤俊明  
京大生存研

バイオマス資源の内、最も蓄積量の多いリグノセルロース（木質）からの工業原料生産や石炭代替ペレット燃料生産に関する必要性和関心が近年世界的に頓に高まっている。リグノセルロース多糖成分の利用技術開発は既に相当進展しているが、リグニンの大規模利用は長きに亘り停滞してきた。この停滞は主にリグニンの構造の複雑さと単離の難しさに起因する。一方、リグニンは多糖の 1.4 倍程度の高位発熱量を有する。そこで、代謝工学によるリグニン構造の単純化やリグニン増量によるバイオマスの発熱量増加が重要な目標となる。リグノセルロースは樹木系とイネ科植物系に分けられるが、イネ科植物はバイオマス生産性及び化学成分分離特性の点で樹木系

より遥かに優れており、資源として今後一層重要になると考えられる。以上に鑑み、演者らは高バイオマス生産性の大型イネ科植物のモデルとしてイネ用い、積極的にリグニン増量を図る研究及びリグニンの構造単純化に関する研究を進めた。



### 迅速リグニン評価系確立と大型イネ科植物のリグニン特性解析

まず、リグニン代謝工学推進の準備としてリグニンの迅速定性・定量法のプロトコール確立を進めた。即ち、イネのリグノセルロースに対し、近赤外分光分析法を用いた非破壊的なリグニン含有量及び酵素糖化率の迅速評価方法を確立すると共に、リグニン構造解析法（ニトロベンゼン酸化分解法、チオアシドリシス法）につき、スループットが従来法の数十倍程度に向上した改良迅速プロトコールを確立した。さらに、大型イネ科バイオマス植物の代表例としてのエリアンサスのリグノセルロース特性を詳細に解析し、リグニン含有量と酵素糖化性の間の相関が認められない特異な組織の存在を示すなど、以後の研究推進への基礎となる知見を得た。

### リグニン含有量の増加

イネ科植物のモデルとしてイネを用い、リグニン含有量の増加を目指して、リグニンの生合成制御に関わる活性化型の転写因子遺伝子の過剰発現と抑制型の転写因

子遺伝子の機能無効化 (KO) を進めた。即ち、シロイヌナズナの活性化型転写因子遺伝子 *AtMYB61* をイネで発現させた場合、リグニン量が顕著に (53%) 増加した。これは計算上 4.7% 程度の発熱量増加に相当する。一方、イネの抑制型転写因子遺伝子 *OsMYB108*、*OsWRKY36* 及び *OsWRKY102* につきゲノム編集技術により機能無効化したところ、いずれもリグニン量が大幅に増加した (増加量: *OsMYB108* KO、18.8%; *OsWRKY36* KO、28%; *OsWRKY102* KO、32%; *OsWRKY36* と *OsWRKY102* の二重 KO、41%)。現在、この結果に基づき実用イネ科バイオマス植物 (ソルガム) について当該遺伝子の変異体候補の絞り込み選抜を進めている。また、ソルガムのインドネシア品種から高リグニン含量かつ高発熱型の G リグニン含量の大きい系統を複数見出した。これらの系統は一層の高リグニン含量化推進の母材としても利用可能である。

#### リグニン構造の単純化

リグニンはシリングル (S) 型、グアイアシル (G) 型、及び *p*-ヒドロキシフェニル (H) 型に大別されるが、イネ科植物のリグニンはこの 3 つの型の複雑な混合物である。そこで、イネを用いリグニン芳香核組成の単純化を進めた。即ち、S リグニン合成経路上の鍵酵素である *OsCA1d5H* の過剰発現 (OX) (S リグニン増加) と発現抑制 (KD) /KO (S リグニン減少、G リグニン増加)、及び G/S リグニン合成経路上の鍵酵素である *OsC3'H* の KD/KO (H リグニン増加) を行った。その結果、予想通り *OsCA1d5H* の OX では S リグニン増加 (S/G 比 12.5 倍)、*OsCA1d5H* の KD/KO では G リグニン増加 [S/G 比: 0.2 倍 (KD)、0.4 倍 (KO)]、*OsC3'H* の KD では H リグニンの大幅増加 (H/G 比 88 倍) が達成された。また、これらの芳香核組成が単純化された形質転換体につき、化学処理特性改善が認められた。

#### 新規リグニン生合成経路の発見

上記の研究で標的とした *OsCA1d5H* および *OsC3'H* の KO 変異体では、予想に反しイネ科植物リグニンに特徴的な構造である *p*-クマロイル化された S リグニン量には、大きな変動が認められなかった。また、上述の活性化型転写因子遺伝子の過剰発現形質転換体と、抑制型の転写因子遺伝子の KO 変異体では、イネ科に特徴的なリグニン構造の量が優先して変動していた。以上に基づき、少なくともイネでは、イネ科植物リグニンに特徴的な *p*-クマロイル化された S リグニンの生合成について、未知の新規経路が存在することが示された。

#### リグニン・多糖複合体形成に対するモノリグノール合成酵素の効果

上記のリグニン増量を目指した代謝工学研究に加え、リグニン量の削減とリグノセルロース多糖の酵素糖化性向上に関する研究も行った。例えば、*OsCAD* 及び *OsCA1dOMT* の発現抑制を行ったところ、リグニン量の低下と酵素糖化性の向上が見られたが、リグニン・多糖複合体の形成に及ぼす両酵素の効果には違いがあることが示された。この結果は、リグニン・多糖複合体 (リグノセルロース超分子構造) 形成機構の解明に向け、基盤となる知見を提供すると考えられる。

謝辞: 以上の成果は、多くの共同研究者、研究室の研究員、大学院学生、技術員と共に得られたものであり、ご尽力いただいた全ての方々に篤く御礼申し上げます。