

イネのカマイラス遺伝子を利用したセルロース高生産系の開発

プロジェクト代表者：小竹敬久（理工学研究科・助教）

研究背景および目的

植物が光合成により同化した炭素の大半は、多糖類として細胞壁に蓄積する。実際に、植物細胞壁の主成分であるセルロースは、地球上で最も豊富なバイオマス資源と考えられている。我々は天然資源であるセルロースを、紙、木綿、木材、燃料として利用している。最近では、セルロース系バイオエタノールの材料として、イネ藁や木材が注目されている。植物のセルロース合成能を高めることができれば、植物による炭酸ガス吸収を促進し、セルロースを効率的に生産することが可能となる。しかしながら、現在までにセルロース合成能を飛躍的に高めた植物は開発されていない。それどころか、セルロース合成の人為的な制御自体、ほとんど報告されていない。イネのカマイラス変異体、*Brittle culm 6 (Bc6)*は細胞壁中のセルロース含量が著しく減少し、茎が折れやすくなったイネの突然変異体である。これまでの研究（平成17年度総合研究機構研究プロジェクト）で、*Bc6* 変異体はセルロース合成に関わると予想される遺伝子に変異を有すること、またその変異のために葉や節間（茎）のセルロース含量が4割低下することが明らかになった。面白いことに、*Bc6* は優性の変異遺伝子で、*Bc6* を正常なイネに遺伝子導入すると、セルロース含量が低下し茎が折れやすくなる。今回、イネの *Bc6* 変異遺伝子を異種植物（シロイヌナズナ）に遺伝子導入し、そのセルロース合成への影響を調べた。

材料及び方法

まず、イネから *Bc6 cDNA* (変異 cDNA、*c* が小文字) 及び *BC6 cDNA* (正常 cDNA、*C* が大文字) を RT-PCR により単離した。cDNA を植物遺伝子導入用のプラスミドベクターに組み込み、35S プロモーターの制御下で構成的に発現するコンストラクトを作成した。遺伝子コンストラクトはアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナに導入した。組換えシロイヌナズナは、寒天培地で抗生物質により選抜後、ロックウール上で45日間育成した。折れやすさの検定及びセルロース含量の測定には、花茎を用いた。

結果及び考察

シロイヌナズナへの遺伝子導入を2回行ったところ、変異 cDNA 発現植物を5系統、正常 cDNA 発現植物を4系統得ることができた。*BC6* はイネでは二次細胞壁のセルロース合成で主要な働きをする。*Bc6* 変異遺伝子は *BC6* 正常遺伝子より優性であり、*Bc6* 変異タンパク質は *BC6* 正常タンパク質の機能を攪乱するドミナントネガティブフォームと考えられる。*Bc6* 変異タンパク質は、シロイヌナズナでも二次細胞壁におけるセルロース合成を攪乱し、セルロース合成の異常を引き起こすと予想された。実際に、シロイヌナズナで *Bc6* 変異遺伝子を構成的に発現すると、花茎でセルロース含量が低下した（図1）。しかしながら、変異タンパク質の発現により引き起こされたセルロース含量の低下は、1系統（系統2、この系統については、副次的な要因や環境要因の影響も含めて、現在追試を行っている）を除いて1割程度であり、*Bc6* 変異体（セルロースが4割低下）や *Bc6* 変異を導入したイネ（2割低下）のような劇的な変化ではなかった。花茎を折り曲げても、イネのカマイラス変異体の様な折れやすい形質は確認できなかった。また、*BC6* 正常遺伝子を構成的に発現する4系統では、セルロース含量は増加せず、むしろごくわずかに減少する傾向が見られた。

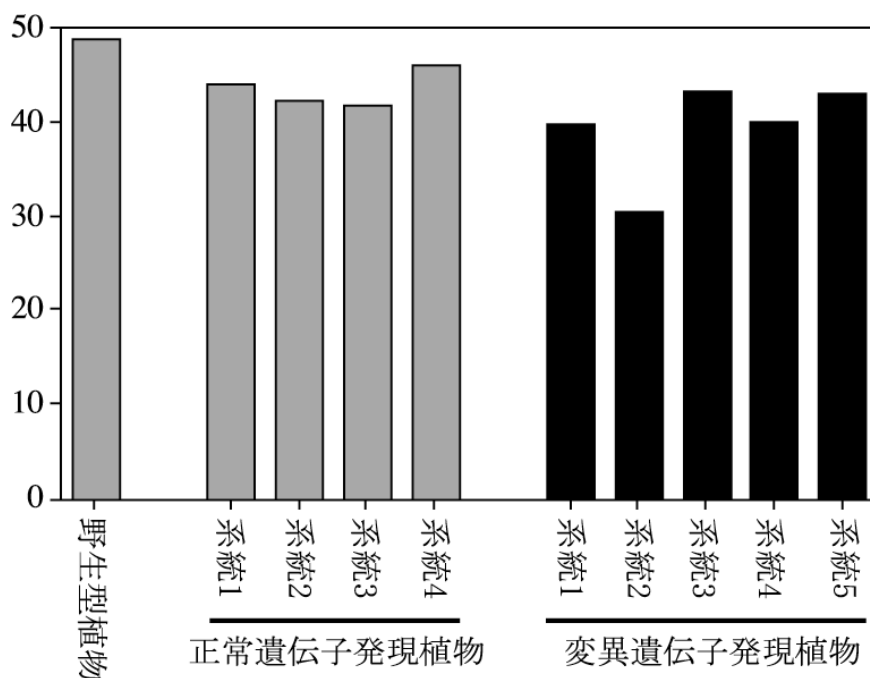


図1 組換え植物のセルロース含量 BC6 正常遺伝子、Bc6 変異遺伝子を構成的に発現するシロイヌナズナの花茎より細胞壁を調製し、セルロース含量を測定した。Bc6 変異遺伝子を発現した植物では、セルロース含量が減少する傾向が見られた。

課題と今後の展望

茎や葉といった非可食部分のバイオマス資源の有効利用を考えた場合、目的用途に適した細胞壁多糖類を蓄積するようにイネを育種することが重要である。BC6 などのカマイラズ遺伝子はセルロース蓄積のための重要形質遺伝子であり、優良なバイオマス資源を蓄積する（組換え植物でない）品種の育種・選抜にも利用できる。イネに6種類のカマイラズ遺伝子が存在することが示すように、植物のセルロース合成には多数の因子が関与すると予想される。また、これらの因子が適切な時期・部位で機能することも重要と考えられる。植物細胞壁の構築プロセスを時空間的に理解することが、優良なバイオマス資源を蓄積するイネの作出につながると考えている。

研究成果（原著論文のみ、関連研究を含む）

- 1) **Kotake T.**, Hojo S., Yamaguchi D., Aohara T., Konishi T. and Tsumuraya Y. Properties and physiological functions of UDP-sugar pyrophosphorylase in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **71**, 761-771 (2007).
- 2) Konishi T., **Kotake T.** and Tsumuraya Y. Chain elongation of pectic β -(1,4)-galactan by a partially purified galactosyltransferase from soybean (*Glycine max* Merr.) hypocotyls. *Planta* **226**, 571-579 (2007).
- 3) **Kotake T.**, Hojo S., Tajima N., Matsuoka K., Koyama T. and Tsumuraya Y. A bifunctional enzyme with L-fucokinase and GDP-L-fucose pyrophosphorylase activities salvages free L-fucose in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **283**, 8125-8135 (2008).
- 4) Ichinose H., **Kotake T.**, Tsumuraya Y. and Kaneko S. Characterization of an endo- β -1,6-galactanase from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2379-2383 (2008).