

**「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」**  
**研究領域 領域活動・評価報告書**  
 ー平成27年度終了研究課題ー

研究総括 磯貝 彰

1. 研究領域の概要

本研究領域では、植物の光合成能力の増強を図るとともに、光合成産物としての各種のバイオマスを活用することによって、二酸化炭素を資源として利活用するための基盤技術の創出を目的とします。

具体的には、植物の物質生産能力の基本である光合成の制御機構を光合成産物の代謝や転流、及び窒素同化などとの相互作用も含めて統合的に理解し、それに基づいて光合成能力を向上させる基盤技術についての研究を推進します。また、植物の多様な環境への適応機構の解明に基づいた光合成能力向上や炭素貯留能向上、及び有用バイオマス産生のための基盤技術の創出を目指します。さらには、植物の物質生産能力を最大限に活用するためのバイオマス生成・分解機構の理解とその活用技術の研究を推進します。これらの研究を推進するにあたり、二酸化炭素を資源化する革新的技術の開発までを見据えた、植物科学研究とバイオマス利活用研究の連携や融合にも取り組みます。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 9件(内、大挑戦型0件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1) 選考は、「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」領域に設けた選考委員 20 名の協力を得て、研究総括が行う。

選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html>)の他、以下の点を重視した。

- ①光合成・環境適応・バイオマス活用といった切り口から、二酸化炭素排出抑制等の社会的課題を植物の力で解決しようとする意欲的な研究提案
- ②二酸化炭素の資源化とその有用資源としての活用という本研究領域の目的を実現するために、どのようなブレークスルーが必要で、そのブレークスルーをどのように実現するかについて、理論的な説明がなされた提案

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者5名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採択数		
			10件	内訳	3年型
対象数	116件	21件			10件

( )内は大挑戦型としての採択数。

※本領域においては、5年型、大挑戦型を公募しなかった。

備考:

1)平成24年度採択課題のうち、1件は研究を中止したため今年度事後評価対象としない。



## 5. 研究実施期間

平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月(3年型)

## 6. 領域の活動状況

領域会議:7回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:研究開始時に、研究総括と技術参事、事務参事が研究現場9カ所を訪問し、研究状況の把握と研究環境、設備等の確認、並びに研究者の上司への協力依頼を行うとともに、研究者と今後の進め方について議論を行った。

## 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成27年11月	評価会開催
平成28年 3月	研究総括による事後評価
平成28年 3月	被評価者への結果通知

## 8. 事後評価項目

- (1)研究課題等の研究目的の達成状況
- (2)研究実施体制及び研究費執行状況
- (3)研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

※該当する成果がある場合には「世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)」を加味して評価を行った。

## 9. 評価結果

本年度はさがけ研究 9 課題が終了した。本領域は、光合成という二酸化炭素資源化の根本である分野から、バイオマスの増産、バイオマスの利活用に至る広範な領域をカバーしている。本年度終了課題には光合成に直接かかわる課題はないものの、上記の広範な領域をカバーする研究課題が含まれている、さらに、これらの領域を横串でつなげるような光合成機能からポリマー生産というような課題や、光合成やバイオマス生産をデータ科学の観点から解析する研究など特徴的な研究も含まれている。これらの研究課題は、いずれも、この課題に研究者が一定の実績があり、それを基盤にさらにそれを発展させ、二酸化炭素の資源化に貢献する基盤技術への道を切り開く、挑戦的な個人研究というさがけ研究にふさわしいものとして採択された。それらの中で、大部分の課題は、さがけ研究の目的を達成する研究成果をあげた、また、十分な成果が得られなかった課題についても、それぞれの研究者が目標の達成のため、最大限の努力をし、今後の発展が期待される新たな知見を数多く得ている。また、さがけ研究の目的がこの分野の将来の人材の養成でもあることを考えると、それぞれが、研究者ネットワークを作り上げるなど、領域の活性化に貢献し、また、本研究期間中に研究者として成長してきたと考えている。

こうした中で、本年度終了課題のうち、最も光る研究課題としては永野惇氏の「フィールドオミクスによる野外環境応答の解明」があげられる。本研究で永野氏は、データ科学と植物科学を融合することで、実験室と野外とのギャップを理解し、解消するための多くの新しい技術基盤を確立し、各種オミクスデータの野外での予測モデルを示すことに成功した。また、秋山拓也氏の「化学反応性に則したリグニン高分子構造の解析」も、本年度終了課題のうちの特筆すべき研究である。リグニンの構造は、タンパク質やセルロースなどのような規則性がなく、きわめて複雑である。秋山氏の成果は、リグニンの部分構造の長年の問題に決着をつける成果であり、リグニン科学の研究成果として、きわめて重要な成果である。これにより、この部分構造をターゲットにしたリグニンの化学分解が可能となり、その応用の開発もこの研究の上に立って、期待できる。本領域では、リグニンの分解と利活用が一つの大きな研究対象となっているが、秋山氏の研究は、そうした研究への波及効果が大きく、領域全体の活性化にもつながるものである。さらに、研究成果がまだ萌芽的であるが、有村慎一氏のミトコンドリアゲノムの改変技術の開発も、本年度のさがけ研究の中で、特筆すべき研究成果である。今後、植物育種で重要な技術として広範囲に使われて行くであろうと思われ、波及効果の大きな基盤技術となっていくであろう。その意味で、今後の展開を注目していきたい極めて優れた研究成果である。これらの詳細については、以下個別課題の評価の項目で述べる。

1. 秋山 拓也 研究者「化学反応性に則したリグニン高分子構造の解析」

木材成分のうち、リグニンの活用・利用の技術がまだ十分に開発されていない一因に、その構造の複雑さがある。本研究は、NMR の手法を駆使して、リグニンの部分構造の詳細を明らかにし、リグニン分子の化学反応性との関係を明らかにしようとするものである。本研究では秋山氏は、特に化学反応性が高いと考えるスピロエノン構造の有無について、化学合成と酵素合成を組み合わせることで三量体モデル化合物を合成し、NMR の解析から、その構造がリグニン分子に確かに存在し、また、それが酸で容易に開裂することを示した。秋山氏の着実な研究手法は高く評価される。こうした基礎的な研究成果を木材などのリグニン成分の利活用の基盤技術の開発につなげるには、この分野の研究者の連携が重要であろう。バイオマスの利用の中で、リグニンの利活用が最も遅れている現状で、秋山氏はこの分野の貴重な人材であり、今後、幅広く、木質バイオマスやリグニン化学・生化学の分野の研究者と交流し、その中核的な研究者として発展していくことを期待したい。

2. 有村 慎一 研究者「植物ミトコンドリアゲノム人為改変技術と雄性不稔植物の作出」

本研究で有村氏は、これまでに未開発であったミトコンドリアの遺伝子編集技術を確認し、その一つの実証として、細胞質雄性不稔植物を作出することを目的とした。有村氏はこの研究の過程でのいろいろな試行錯誤を経て、最終的に、TALEN の手法でミトコンドリアのゲノム編集に成功した。本研究をきっかけとして、ミトコンドリアのゲノム編集による遺伝子改変植物が次々と生み出されてくることが期待される。有村氏の想定した雄性不稔植物もそうした過程で生み出されてくるであろう。これが作物などで実現すれば、高生産性のハイブリッド作物の作出などにも応用することが可能となるであろう。この大きな成果をさらに発展させるために、いろいろな形質についても検討を進めることが必要である。

3. 千葉 由佳子 研究者「ショ糖過剰ストレス耐性に関わる転写と mRNA 分解の協調制御」

千葉氏は、本研究でポリ A 分解酵素の機能を明らかにし、本酵素の利用によって、二酸化炭素資源化につながる方策を考案することを目指した。その結果、標的遺伝子を明らかにするなど、一定の成果が出ている。しかし、当初目的である、ショ糖過剰耐性やバイオマスの相加に関連する標的遺伝子は未発見であるのは残念である。そのなかで、AtCCR4 が概日時計と関わりがあることはきわめて興味深いと思われる。時計遺伝子の広範な作用に、本研究の成果がどのようにかかわってくるか、注目してみたい。そのためには、その方面の研究者との共同研究なども積極的に進め、本研究成果を発展させる研究に挑戦してほしい。その延長上に、二酸化炭素資源化に貢献できる研究成果を期待したい。

4. 塚越 啓央 研究者「バイオマス生産性を支配している細胞機能転換転写制御ネットワークの人工構築」

塚越氏は、バイオマス増産への一つの道筋として、根の発育を増進するシステムの解明のため、根の細胞における転写ネットワークの人工構築をめざした。その結果、基礎となった転写因子について、いくつかの標的因子を解明することに成功した。また、根の成長・発達について、遺伝子ネットワークをリアルタイムで解析できる細胞のイメージング技術実験系を確立した。しかし、ネットワーク解析については、まだまだ全貌が見えてきたとはいえ、今後、このさきがけ研究の経験を生かして、自ら設定した研究テーマに果敢に挑戦してほしい。

5. 中島 清隆 研究者「固体ルイス酸による高効率バイオマス変換:植物由来の炭化水素類の必須化学資源化」

中島氏は、本研究において、固体ルイス酸を用いて、バイオマス成分の化学変換法の確立を目指した。その結果、本研究において、グルコース、キシロースなどの糖類を原料として、HMF やフルフラールへの変換、また、グリセロールからの乳酸への変換を行う水溶液中で機能する多様な固体触媒の開発に成功している。また、これらの触媒の反応機構なども明らかにしている。これらの成果は、高く評価されるもので、さらに反応収率を高めるなど、精密化することによって、実用化されることが期待される。中島氏は、来年度からの ALCA のプロジェクトに採択されているとのことで、本研究をさらに発展させ、本研究での成果を生かしてほしい。なお、化学という手法は、精製化合物を材料として設計されることが多いが、バイオマス自体が複雑な混合物系であることを考えるとき、そうした原料にも対応できるような工程や触媒が将来できていくことも期待したい。

6. 永野 惇 研究者「フィールドオミクスによる野外環境応答の解明」



永野氏は、実験室と野外での実験環境の違いによる植物生育の状況のギャップを科学的に理解するために、フィールドオミクスという手法を導入し、野外環境下での気象条件などの環境要因と、トランスクリプトームなどのオミクス解析のデータを関連付け、ある環境下での発現パターンなどを予測できるモデルの構築を目指した。その結果永野氏は、膨大な試料についてRNA-Seqにあらたな方法を導入し、統計モデリングの高度化に成功した。また、野外環境での遺伝子発現を再現しうる植物培養装置の開発などにも成功した。こうした成果は高く評価される。さらに永野氏は、本領域内の研究者ネットワークの形成や、多くの共同研究などを通じて、本領域に大きく貢献してきた。永野氏には、植物科学に新しい領域を開いていく研究者として、今後のいっそうの進展を期待したい。永野氏は、あらたな CREST の新規プロジェクトに採択されていることは、その中で、本さきがけの研究成果をさらに大きな研究として、発展させて行く機会が与えられたものであり、期待したい。

#### 7. 平野 展孝 研究者「セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の集積・近接化による協働作用の創出」

平野氏は、本研究で、セルロソーム複合体を再構成し、セルロース、ヘミセルロース、リグニンを分解する効率の良い系を確立することを目的とした。研究の過程で、多くの酵素の無細胞系での発現、セルロソームへの再構成など、セルロソーム活用のための基礎的な知見を得て、それが従来の微生物セルロソームより効率的にバイオマスを分解することを示した。またリグニン分解にはラッカーゼの存在が重要であり、糖化酵素とラッカーゼを同一セルロソーム骨格上に集積・近接化させることで稲わらのみならず、リグニンを含有するスギ粉末の分解活性を上昇させることに成功した。こうした生化学的な研究を着実にやってきたことは評価される。将来こうした技術を実用化するためには、長期的な展望に立って、研究を進めてほしい。実バイオマスをそのまま構成成分に分解できる酵素化学的な技術が開発されれば、バイオマスの利活用はいっそう進展することになる。

#### 8. 藤本 龍 研究者「雑種強勢の分子機構の解明とその高バイオマス作物への活用」

藤本氏は、アブラナ科植物を用いて、育種学上の大きな課題である雑種強勢の分子機構の解明に取り組んだ。その結果、シロイヌナズナの雑種強勢において DNA メチル化に係わる遺伝子 DDM1 の関与や、特定領域のヘテロ接合性が雑種強勢に重要であることを明らかにした等の成果は評価できる。しかし、当初の計画のハクサイの QTL 解析に関しては収量に関わる領域の特定にとどまっており、雑種強勢との関係に関しては課題が残った。藤本氏の解析の手法が、従来行われていた研究手法の枠をあまり超えなかったのは、やや残念である。このテーマは、一研究者のライフワークにもなるような研究課題であり、この研究を一つの契機として、継続発展させ、雑種強勢の仕組みの解明に迫ってほしい。

#### 9. 松本 謙一郎 研究者「光合成と連動するバイオポリマー合成系の構築」

松本氏は、植物などの光合成生物の細胞内で、グリコール酸を直接ポリマーとして変換する経路を確立することを本研究の課題とした。その結果、組換え大腸菌を用いて、キシロースを炭素源として、グリコール酸経路でポリマーを生産する系の確立に成功した。この成果は、植物によるポリマー生産への道筋を付けたという点で評価できる。また、領域内からの多くの助言などを取り入れて研究を進めるなど、研究の進め方が着実であったことは評価したい。しかしながら、これまでの所では、二酸化炭素を材料とした光合成がこの工程の出発点となっていないのは残念である。なお、松本氏は、来年度から、ALCA での研究を実施することになっているが、本研究の成果を生かして、さらに研究を発展させてほしい。

#### 10. 評価者

研究総括 磯貝 彰 奈良先端科学技術大学院大学 名誉教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 28 年 3 月末現在)

坂 志朗 京都大学 大学院エネルギー科学研究科 教授

佐々木 卓治 東京農業大学 総合研究所 教授

佐藤 文彦 京都大学 大学院生命科学研究科 教授

篠崎 一雄 (独)理化学研究所 環境資源科学研究センター センター長

田中 良和 サントリーグローバルイノベーションセンター(株) 研究部 部長

土肥 義治 (公財)高輝度光科学研究センター 理事長

西澤 直子 石川県立大学 生物資源工学研究所 教授



長谷 俊治\*1 大阪大学 蛋白質研究所 教授  
 東山 哲也 名古屋大学 WPI トランスフォーマティブ生命分子研究所 教授  
 福田 裕穂 東京大学 大学院理学系研究科 教授  
 山谷 知行 東北大学 研究推進本部 特任教授  
 横田 明穂\*2 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 教授

\*1 平成 24 年 6 月より参画

\*2 平成 24 年 4 月まで参画

(参考)

件数はいずれも、平成27年10月末現在。

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	35	35
口頭	101	41	142
その他	16	4	20
合計	117	80	197

(2)特許出願件数

国内	国際	計
1	0	1

(3)受賞等

- ・有村 慎一  
日本植物生理学会 奨励賞 (H25.3)
- ・千葉由佳子  
北海道大学総長賞・研究奨励賞 (H28.2)
- ・中島 清隆  
石油学会 奨励賞 (H25.2)  
東京工業大学 挑戦的研究賞 (H26.11)  
日本化学会 若い世代の特別講演会・講演賞 (H27.3)  
触媒学会 奨励賞 (H27.3)
- ・永野 惇  
文部科学大臣表彰 若手科学者賞 (H26.4)  
第 38 回内藤コンフェレンス ポスター発表賞 (H26.10)

(4)招待講演

国際 11 件  
 国内 48 件

別紙

「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」領域  
事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成28年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
秋山 拓也 (兼任)	化学反応性に則したリグニン高分子構造の解析 (東京大学大学院農学生命科学研究科)	東京大学大学院農学生命科学研究科 助教 (東京大学大学院農学生命科学研究科 助教)	28
有村 慎一 (兼任)	植物ミトコンドリアゲノム人為改変技術と雄性不稔植物の作出 (東京大学大学院農学生命科学研究科)	東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授 (東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授)	43
千葉由佳子 (兼任)	シヨ糖過剰ストレス耐性に関わる転写と mRNA 分解の協調制御 (北海道大学大学院理学研究院)	北海道大学大学院理学研究院 准教授 (北海道大学創成研究機構 特任助教)	41
塚越 啓央 (兼任)	バイオマス生産性を支配している細胞機能転換転写制御ネットワークの人工構築 (名古屋大学 遺伝子実験施設)	名古屋大学 遺伝子実験施設 特任講師 (名古屋大学大学院生命農学研究科 特任助教)	40
中島 清隆 (兼任)	固体ルイス酸による高効率バイオマス変換:植物由来の炭化水素類の必須化学資源化 (北海道大学触媒化学研究センター)	北海道大学触媒化学研究センター 准教授 (東京工業大学応用セラミックス研究所 助教)	40
永野 惇 (専任/兼任)	フィールドオミクスによる野外環境応答の解明 (龍谷大学農学部)	龍谷大学農学部 講師 (京都大学 日本学術振興会特別研究員)	50
平野 展孝 (兼任)	セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の集積・近接化による協働作用の創出 (日本大学工学部)	日本大学工学部 准教授 (日本大学工学部 准教授)	35
藤本 龍 (兼任)	雑種強勢の分子機構の解明とその高バイオマス作物への活用 (神戸大学大学院農学研究科)	神戸大学大学院農学研究科 准教授 (新潟大学大学院自然科学研究科 助教)	41
松本謙一郎 (兼任)	光合成と連動するバイオポリマー合成系の構築 (北海道大学大学院工学研究院)	北海道大学大学院工学研究院 准教授 (北海道大学大学院工学研究院 准教授)	32

# 研究報告書

## 「化学反応性に則したリグニン高分子構造の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 秋山 拓也

### 1. 研究のねらい

リグニンは、植物体が巨大化するための力学的強度や耐候性を細胞壁に付与する中心的な役割を果たしている一方で、その難分解な性質は、植物細胞壁をバイオマスとして利用する際に障害となる。従来、細胞壁のバイオマス利用の主たる対象はセルロース等の多糖類であり、細胞壁の4分の1を占めるリグニンを如何に効率よく取り除くか、に主眼を置いて分離技術が開発されてきた。その分離工程でリグニンは著しい構造変化を受けるが、製紙産業においてはパルプ蒸解後の変性リグニンは燃焼エネルギーとして効率よく利用されるため、変性リグニンに生じる構造変化を考慮する必要はない。しかし、リグニンの高付加価値利用が期待される現在、分離後の利用法を考慮しながらリグニン高分子にどのような構造変化を与えながら低分子化していくかが今後、重要な課題になると予想される。そのために、リグニンの詳細な化学構造とその反応性を把握することが欠かせない。本研究では、リグニン高分子を切断する際に成分分離や低分子化の要になり得る  $\beta$ -O-4 型構造以外の部分構造に着目した。リグニンは難分解性の高分子と呼ばれるが、その性質は高分子内で一様ではなく、反応性に富み細胞壁成分の分離や低分子化に寄与するジエノン型の部分構造が含まれると期待されており、また、ビフェニル型およびジアリールエーテル型の部分構造は高分子の形状や物性に密接に関わっていると考えられている。本研究では、これらの部分構造の詳細と頻度、および反応性を明らかにし、また、自然界におけるリグニン構造の多様性と上記の部分構造との規則性を見いだすことによって、植物細胞壁の高選択的反応の設計や利用目的に適した植物種の選抜指標など、木質系バイオマスの化学変換利用の基盤技術の確立に貢献することを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、リグニン高分子を切断する際に成分分離や低分子化の要になると想定される部分構造として、ジエノン型構造および、高分子の分岐点の候補構造の解析を行った(テーマ A、B)。これに加え、リグニン構造の樹種間における多様性とその規則性について調べ(テーマ C)、以下の研究結果を得た(図 1)。スピロジエノン構造は、0.1M 塩酸、室温の温和な酸処理条件下で低分子化し、ジアリールプロパン構造へ変換されることが、モデル化合物を用いた実験で明らかとなった。これにより、スピロジエノン型構造が高分子内部にある場合、高分子を切断し低分子化に寄与する反応が、比較的温和な塩酸処理によって進行することが示唆された。高分子分岐点の候補であるビフェニル構造の含有量について、ニトロベンゼン酸化法を精査して分析手法を確立し、針葉樹スギリグニンでは、少なくとも芳香核の 6.7%(下限値)がビフェニル型構造として含まれることが示された。もう一つの分岐点候補であるジアリ-

ルエーテル構造については、NMR 法による検出が可能となり、同結合が少量ながらもリグニンに含まれることが明確となった。針葉樹と広葉樹を含む 21 樹種について上記の化学分解法を適用した結果、ビフェニル含有量は芳香核構造の構成比と密接な関係にあることが示された。さらにリグニン構造の多様性の一環として裸子植物グネツムグネモンあて材を分析した結果、概ね広葉樹あて材(被子植物)に似た特徴を持つ一方、針葉樹あて材の化学的特徴を併せ持つことが明らかとなった。

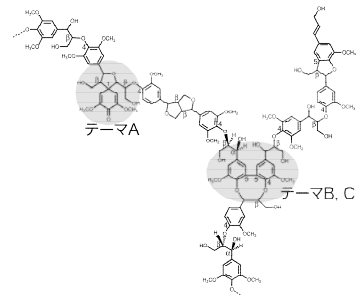


図1. リグニン構造の模式図

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「ジエノン型構造の構造解析」

リグニン生成時、カップリング反応によって生成したキノンメチド等の中間体の多くは、芳香核の再生によって安定化される。一方で、芳香核の再生を伴わないまま、ジエノン型、エノン型構造として高分子に含まれるものがある、と古くから想定されてきた(図 2)。現在のところ、その一つとして  $\beta$ -1 結合型スピロジエノン構造が含まれる、と NMR 法による詳細な解析結果から推定されている。しかし、そのモデル化合物とその NMR データが無いので、同定にまでは至っておらず、その反応性は不明のままであった。

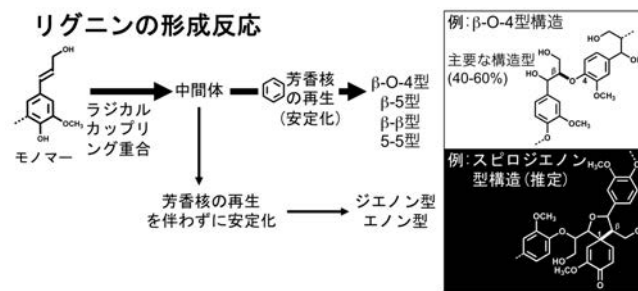


図 2. リグニン生成時に想定されるジエノン型構造の形成

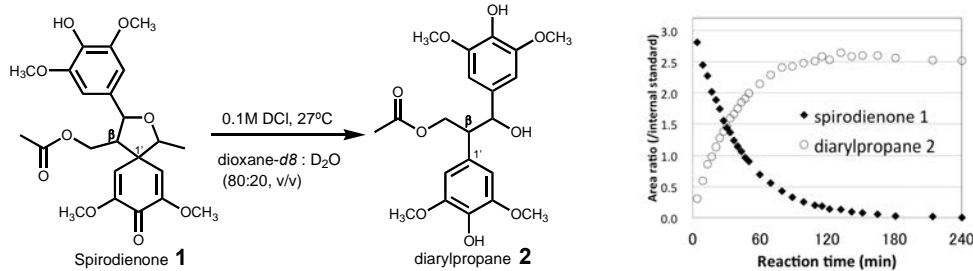


図 3. 酸処理によるスピロジエノン型モデル化合物の分解と、ジアリールプロパン型化合物の生成挙動

これまでに、 $\beta$ -1 結合型スピロジエノン構造の簡易型モデル化合物 1(図 3)の調製に成功しているが、本研究テーマにおいて、調製法の検討により、これまで問題であった収率と再現性の低さを改善し、反応性を調べるために十分な量の簡易型モデル化合物 1 を得た。同モデル化合物 1 に対して、温和な酸処理を行い、反応の進行を  $^1\text{H-NMR}$  測定で追跡した。その結果、



化合物 1 は 0.1M 塩酸、27°C、3 時間の酸処理条件下でほぼ消失した。その際、化合物 1 はジアリールプロパン型化合物 2 へと高い割合で変換された(収率 80 %以上)。ここで生じた開裂反応は、図 1 の様にスピロジエノン型構造が高分子内部にある場合、高分子を切断し低分子化に寄与する反応に相当する、ことが明らかとなった(学会発表1および3)。

### 研究テーマ B「リグニンの分岐構造の解析」

リグニンには、直鎖型ではなく、分岐型の高分子であると考えられている。これは、分岐点候補となるビフェニル構造(5-5 結合)およびジアリールエーテル構造(5-O-4 結合)の存在が広く認識されているためである(図 4)。しかしながら、ビフェニル構造の含有量については不明瞭で、異なる分析方法で様々な値が報告されている。また、ジアリールエーテル構造については、化学分解法で検出されるのに対して、NMR 法ではその存在が確認できていなかった。

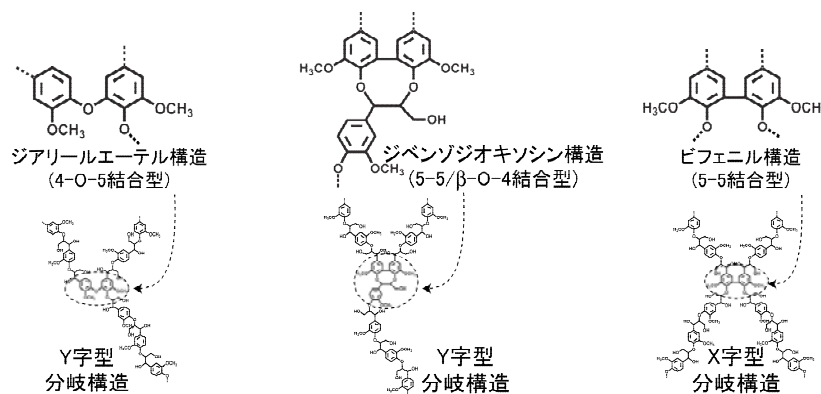


図 4. リグニン高分子の枝分かれ構造の分岐点候補

本テーマ B では、ビフェニル構造について、再現性が高い、定量的な分析手法を得ること目的に、非縮合型構造の解析に従来から広く用いられているニトロベンゼン酸化法を精査し分析手法を確立した。まず、ビフェニルモデル化合物および想定される同酸化生成物を合成し、モデル実験を行った。ビフェニルモデル化合物を同化学分解法に供した結果、ビフェニル型分解生成物の収率は約 7 割であり(反応条件:170°C, 2h)、β-O-4 モデル化合物からの非縮合型生成物の収率(約 8 割)と比べて遜色のない値を示した。また、これに加えて同分解反応中に β-O-4 構造からビフェニル構造が二次的に生成する可能性が否定されたことで、リグニンのビフェニル型構造量を過大評価することなく分析できることが示された。この手法を木粉試料に適用し、反応条件を最適化した結果、針葉樹リグニン(スギ)には、芳香核 100 単位あたり 6.7 単位(下限値)がビフェニル型構造として含まれることが明確となった(論文発表 1)。

また、高分子分岐点のもう一つの候補であるジアリールエーテル構造について NMR 法による検出を試みた。その結果、モデル化合物との比較により、リグニンの NMR ピークを同構造に帰属することが可能となった。リグニン構造を反映した詳細なモデル化合物(4 量体モデル化合物)を合成し、測定溶媒条件の違いによる NMR ピークの化学シフト値への影響を利用することにより、初めて帰属することが可能となった。これにより、ジアリールエーテル構造が少量ながらもリグニンに含まれていることが明確となった(学会発表 2 および7)。

### 研究テーマ C「リグニン化学構造の規則性」

リグニン構造の多様性を調べることを目的に、針葉樹(裸子植物)と広葉樹(被子植物)を含む 21 樹種のビフェニル型構造について、研究テーマ B で確立した分析手法を用いて分析を行った。その結果、樹種間でビフェニル含有量は大きく変動し、樹種間でのビフェニル含有量の多様性が示されると共に、その含有量は芳香核構造の構成比(シリングル/グアイアシル核比)と密接な関係があることが明らかとなった(図 5)。

この関係は、リグニン生成反応を考慮すると容易に想定される結果であるものの、樹種の違いを超えて極めて高い相関( $R^2 = 0.95$ )と共に示された(学会発表 4 および 8、投稿予定)。さらに、リグニン構造の多様性の一環として裸子植物グネツム門に属する木本植物(Gnetum gnemon)を分析した結果、多糖類・リグニン共に、広葉樹(被子植物)に似た化学構造的特徴を有することが示された。また、そのあて材の化学分析結果についても、概ね広葉樹あて材に似た特徴を持つ一方で、針葉樹(裸子植物)あて材に似た特徴として、リグニンの  $p$ -ヒドロキシ核(H 核)の含量が幹下側のあて部で高くなる傾向を示した(学会発表 6、論文投稿中)。

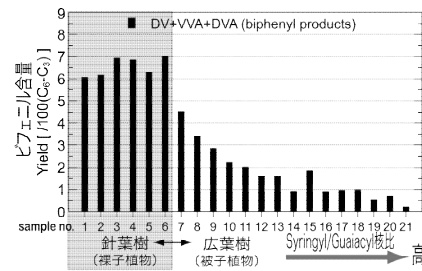


図 5. 樹種間におけるビフェニル含量の違い

### 3. 今後の展開

スピロジエノン構造のリグニンモデル化合物の調製法を確立したことでリグニンのジエノン部分構造の反応性や反応機構の詳細を調べることが可能である。本研究では、一例として塩酸処理によってスピロジエノン化合物が容易に開裂することを示すことができたが、今後、様々な酸や塩基に対する反応性や反応機構等の基礎的知見を蓄積・分類することによって、現在、バイオマス利用研究で多様な反応条件が用いられる中、どのような処理条件を用いればリグニンの低分子化に寄与する反応が進行し、また、どのような条件下で脱リグニンを阻害するような高分子化を伴う副反応が生じるのかを予測できるようになると期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

脱リグニン過程で低分子化の要となり得る部分構造を探索することを目的に本研究課題に取り組んだ結果、当初の研究計画からの若干の遅れはあったものの、新たな知見として 1. スピロジエノン型構造が当初の予想を超えて容易に酸処理で解裂可能なこと、2. 脱リグニンに負の影響を与えると予想されるビフェニル型構造の含有量は樹種間で大きく変動しシリングル/グアイアシル比に依存すること、を明確に示すことができた。一方で、分岐点の候補構造について高分子内における位置情報を得ようと試みたが、研究期間内に目的を達成するには至らなかった。この課題については、リグニン高分子の反応制御に有用な情報が得られると考えられることから、今後も研究を継続したい。また、これらの研究結果を得る過程で、簡易型スピロジエノン型化合物の調製手段、および、ビフェニル型構造の分析手段を確立したことで、木質バイオマスの研究・評価手段の幅を広げることができたと考えている。以上の研究成果は、植物細胞壁成分の効率的な分離法や選択的反応の設計、および植物種の選抜法を開発す

る上での基盤的な研究であり、今後、リグニンを含め、木質バイオマスを有用物質へと化学転換する基盤技術の創出に大きく寄与すると期待できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

木材成分のうち、リグニンの活用・利用の技術がまだ十分に開発されていない一因に、その構造の複雑さがある。本研究は、NMR の手法を駆使して、リグニンの部分構造の詳細を明らかにし、リグニン分子の化学反応性との関係を明らかにしようとするものである。本研究では秋山氏は、特に化学反応性が高いと考えるスピロジエノン構造の有無について、化学合成と酵素合成を組み合わせて三量体モデル化合物を合成し、NMR の解析から、その構造がリグニン分子に確かに存在し、また、それが酸で容易に開裂することを示した。秋山氏の着実な研究手法は高く評価される。こうした基礎的な研究成果を木材などのリグニン成分の利活用の基盤技術の開発につなげるには、この分野の研究者の連携が重要であろう。バイオマスの利用の中で、リグニンの利活用が最も遅れている現状で、秋山氏はこの分野の貴重な人材であり、今後、幅広く、木質バイオマスやリグニン化学・生化学の分野の研究者と交流し、その中核的な研究者として発展していくことを期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Akari Tamai, Haruka Goto, Takuya Akiyama, and Yuji Matsumoto.  
Revisiting alkaline nitrobenzene oxidation: quantitative evaluation of biphenyl structures in cedar wood lignin (*Cryptomeria japonica*) by a modified nitrobenzene oxidation method.  
*Holzforschung*.(2015) 69(8):951-958. DOI: 10.1515/hf-2014-0153

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

#### 1. 秋山拓也、松本雄二

スピロジエノン構造に関する研究: 同モデル化合物の酸処理によるジアリールプロパン構造の形成

第 58 回リグニン討論会、要旨集 22-25 頁、香川、2013 年 11 月

#### 2. Yanding Li, 秋山拓也、松本雄二

Nitrobenzene oxidation of a 4-O-5 lignin model compound

第 64 回木材学会大会、要旨集 179 頁(L13-P-03)、松山、2014 年 3 月

#### 3. Takuya Akiyama and Yuji Matsumoto.

Formation of diarylpropane structure from spirodienone model compound by acid treatment.

247th ACS National meeting, Dallas, USA, April 2014. #CELL123

4. 後藤晴加、玉井あかり、秋山拓也、松本雄二  
樹種間におけるビフェニル型構造量の多様性  
第 59 回リグニン討論会、要旨集 18-21 頁、福井、2014 年 9 月
5. 阿部雄一郎、秋山拓也、松本雄二  
リグニンのビフェニル型分岐構造の探索: モデル実験と NMR(HMBC)測定条件の検討  
第 59 回リグニン討論会、要旨集 104-105 頁、福井、2014 年 9 月
6. Deded S. Nawawi, Wasrin Syafii, Takuya Akiyama, Tomoya Yokoyama, Yuji Matsumoto.  
Syringyl-guaiacyl lignin in reaction wood of the vesseled-gymnosperm, Gnetum gnemon.  
International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS), Tokyo, Japan,  
March 2015. 3WC-P23
7. Yanding Li, Takuya Akiyama and Yuji Matsumoto.  
Nitrobenzene oxidation of 5-O-4 lignin model compounds and the characteristics of NMR  
chemical shifts of the models.  
International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS), Tokyo, Japan,  
March 2015. 3WC-P13
8. Haruka Goto, Akari Tamai, Takuya Akiyama, and Yuji Matsumoto.  
Variety of the content of biphenyl structures in softwood and hardwood lignins.  
International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS), Tokyo, Japan,  
March 2015. 3WC-O01

#### 招待講演

1. 秋山拓也  
リグニン化学構造の多様性  
高分子学会エコマテリアル研究会、東京、2015 年 7 月

#### 著作物

1. 秋山拓也  
リグニンの高分子構造(第 2 章第 7 項 6)、植物細胞壁(西谷和彦、梅澤俊明 編著)、講談社、2013 年、pp. 130-134 (ISBN: 978-4-06-153818-4)

# 研究報告書

## 「植物ミトコンドリアゲノム人為改変技術と雄性不稔植物の作出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 有村 慎一

### 1. 研究のねらい

植物ミトコンドリアゲノムは未だ安定な形質転換技術が確立していない。本研究では、人工制限酵素をミトコンドリアへ導入することで、高等植物ミトコンドリアゲノムの遺伝子破壊に挑戦した。人工制限酵素は、狙った数十 bp の塩基配列を認識して切断することができる合成酵素であり、近年技術進歩が著しい。これまで菌類、ほ乳類、植物などさまざまな生物で人工制限酵素を利用した“核ゲノムの標的遺伝子の切断破壊(ジーンターゲットング)”が試みられ、その有効性が実証されてきた。本研究ではこの人工制限酵素の一つ、TALEN にミトコンドリア局在シグナルを融合させ植物細胞内で発現させることで、ミトコンドリアゲノムのジーンターゲットングに挑戦する。これまでのミトコンドリアゲノム自然変異などの知見を参考にして複数のターゲット遺伝子の破壊を行い、それらの分子生物学的解析を行う。その過程で致死性・生育遅延・発生変異と共に新規細胞質雄性不稔などの表現型を示す遺伝子破壊システムの出現が期待され、それらの知見と技術は農学育種分野において下記のような応用利用が考えられる。

遠縁の植物を交配してできたその F1 世代は両親を大幅に凌ぐ生長を示すことがある。この雑種強勢現象の利用は作物や植物バイオマス増産、CO<sub>2</sub> 吸収向上に有効な技術である。大量に品質の安定した F1 種子を採取する技術の一つとして、細胞質雄性不稔植物体が利用されてきた。興味深いことに、これまで調べられたほとんどすべてにおいて、ミトコンドリアゲノム上の遺伝子発現の不具合が雄性不稔の直接の原因であることが報告されている。しかし、このようなミトコンドリアゲノム変異が、なぜ発生や生育に対しては悪影響をおこさず、雄性器官には特異的に不具合をひき起こすのかなど、基礎的な疑問も未だに解明されていない。本研究によってミトコンドリアゲノムを改変して細胞質雄性不稔を引き起こす技術を確立することができれば、現存する多くの優良作物、優良品種について極短期間で細胞質雄性不稔システムの作出が可能となり、F1 品種育種の現場の大幅な効率化につながる。植物ミトコンドリアゲノムの改変技術の確立は、植物ミトコンドリア機能の基礎理解とその機能強化のための基盤技術であり、これは二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化に大きく貢献すると考えている。

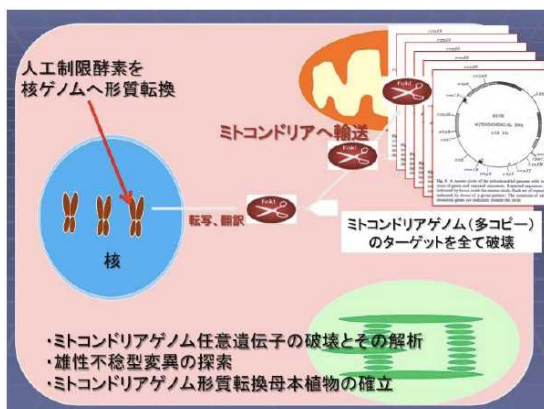
### 2. 研究成果

#### (1) 概要

人工制限酵素 TALEN をもちいた高等植物ミトコンドリアゲノムの任意遺伝子破壊に挑戦した。TALEN は狙った塩基配列を認識する二つ一組のタンパク質であり、これらについて①ミトコンドリア局在配列をもち②植物内で安定して高発現するベクターを、③ターゲットの数だけそれぞれ作る必要がある為、Multisite Gateway System を流用した高効率ベクター構築システ

ムを作製した。TALEN は 105 塩基毎の繰り返しが 15-20 回あり、また二つの TALEN 遺伝子をタンデムにつなげるなど、ベクター構築は極めて難しく、またプラスミドの不安定性、植物内での遺伝子発現の不安定性等の困難があったが、最終的に、高効率で簡便・確実な植物ミトコンドリア TALEN 遺伝子破壊発現ベクター作りに成功した。このベクターシステムをもちいて、イネ・シロイヌナズナを材料に、3 種類のターゲット遺伝子の破壊ベクターを作製し植物に導入したところ、現在、一遺伝子の二カ所の破壊に成功し、独立の遺伝子破壊植物体 20 系統を得た。現時点ではこの植物ミトコンドリアのジーンターゲットングは世界初の成功例である。植物ミトコンドリアゲノムは多種類の DNA 分子で構成されており、それぞれの中にリピート配列をもち、組換えが絶えず起こるとされているが、これまでゲノム改変ができないため、詳細理解が進んでいなかった。今回の遺伝子破壊とその後の解析によって、その正常ゲノムの維持様式や修復過程、真の物理的構造についての手がかりを得ることができた。また、ミトコンドリアゲノムは一細胞内に数百コピーが存在するため、一部のコピーに遺伝子破壊が起こっても、正常遺伝子との混在（ヘテロプラスミー）が問題になると考えていたが、意外なことに、前述 20 系統のほとんどが遺伝子破壊型へほぼ純化（ホモプラスミー化）していることが確認された。この結果は、この技術の有効性を示すとともに、新たな謎であり、また今後の多様な遺伝子破壊への展開に際する注意点を示唆している。まだ成功例が少ないため、遺伝子毎、領域毎、形質転換手法や植物種の違いなど検討すべき事項が多数考えられ、今後多数のターゲットに対して破壊と解析を行っていきたいと考えているが、当初設定した最大の目的である遺伝子ターゲットングに成功することができた。

## (2) 詳細



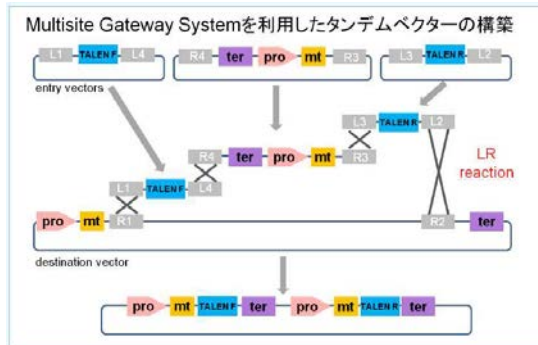
左図はプロジェクトの概要であり、植物細胞の中に、核(左,青)・ミトコンドリア(右上,オレンジ)・葉緑体(右下,緑)が書かれている。人工制限酵素遺伝子発現ベクターを一端核ゲノムへ導入し、そのタンパク質を発現させると、これに融合させたミトコンドリア局在シグナルによって、人工制限酵素がミトコンドリアへ局在する。人工制限酵素は対象配列が多コピーであっても切り続ける為、いずれ変異が蓄積するというストラ

ラテジーである。

### 1. 「ミトコンドリア TALEN 遺伝子破壊ベクター構築システムの開発」

第一段階として、このミトコンドリア局在配列付きの二つの TALEN を同時に高発現するための、植物核ゲノムへの形質転換発現ベクター作りが必要であった。TALEN は、二つ一組で働く DNase のため、設計した酵素それぞれに、ミトコンドリア局在シグナルと薬剤誘導性プロモ-

タ配列を付加する必要がある。複雑なベクター構築が複数必要となるが、Multisite Gateway System を応用し、簡便・迅速に設計するシステムを作製した。このシステムによって、TALEN-ORFを設計作製時に、それぞれを multisite エントリーベクター(図2 上部)に構築することで、TALEN-ORF 完成後すぐに(2~3 日)で二つ一組を一つの植物形質転換用 Ti-plasmid タンデム誘導ベクター上に移行することが出来る。コントロール実験として、GFP と RFP を TALEN-ORF に見立てて multisite エントリーベクターを作成、タンデムベクターを構築し、この GFP と RFP が一過的に発現し、またミトコンドリア内に局在することを確認した。初期には、タンデムの後者遺伝子(RFP)の発現が比較的弱いことが明らかになったが、さきがけ領域内



のアドバイスに従い、ターミネーターの種類を変えたところ、両遺伝子が高発現、安定するようになった。このシステムをもちいて、これまで合計 20 種類以上の TALEN タンデムベクター構築を行った。

当初 TALEN-ORF の部分は Invitrogen や Wako 社に外注していたが、1TALEN ペア毎に 50 万円を超える金額が必要であった。

そこで、広島大学の山本卓研究室で開発された Platinum Gate 法をベースとして、TALEN-ORF 部分を含んだエントリーベクター作製の自作システムも立ち上げた。これにより、ミトコンドリアゲノムの任意の配列を破壊するための TALEN 発現ベクターを効率よく一から自作できるシステムが完成し、実験の低価格化と迅速化を達成した。

## 2. 「ミトコンドリアゲノム遺伝子破壊」

これまで、イネとシロイヌナズナを対象に、合計三つの遺伝子をターゲットとして選択して、上記ベクターを複数種類作製した。これらの遺伝子は、いずれも変異による破壊がおこっても致死とならないことが先行研究により予想されている遺伝子である。当初、切断対象領域を PCRして、CEL1 assayを中心とした微量欠失や点変異検出を行っていたが、500 系統を超える独立の遺伝子導入系統でも変異が検出されなかった。しかしながら、ある遺伝子の切断を行った 20 系統の植物体において、対象遺伝子の PCR 増幅が全く起こらないという奇妙な現象が見られた。詳しく調べたところ、遺伝子切断を行った領域の前後数百 bp~数 Kbp に渡って、ゲノムが大きく消失していることが明らかになった。この消失領域の中にはそのほかの必須遺伝子は存在していなかった。消失領域の末端について調べたところ、ミトコンドリアゲノム内

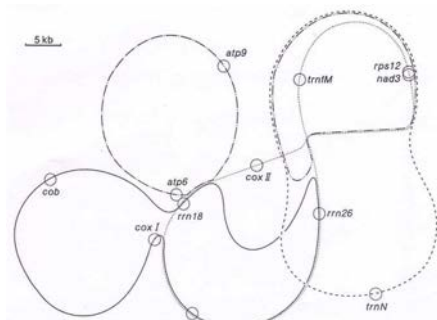


Fig. 4. A genetic map of the rice mitochondrial genome. Each type of line indicates a set of basic circles. Overlapping regions are regions repeated among circles. Iwahashi M et al. (1992) Theor Appl Genet 84:275-279

に多数存在するリピート配列を介して、ゲノム上の別の領域と組換えを起こし、新たなゲノム構造変化を引き起こしていることが明らかとなった。もともと、植物ミトコンドリアゲノムは、多数の分子種の混在であり、その中に相同配列をもっており、頻繁な組換えが起こることが報告されている。左図は、イネのミトコンドリアゲノムのマップ概略図で、それぞれのマルチパータイトDNAの中で相同な配列は重なるように

書かれている。今後解明しなければならない謎はまだ多いが、この TALEN によるミトコンドリア遺伝子破壊の成果は、(真核生物初では無くなってしまったが、)植物初のミトコンドリアゲノム編集の成功である。また、遺伝子切断後のゲノム修復過程について、核ゲノムの場合では NHEJ(Non-Homologous End Joining)と呼ばれる緊急修復が主であるのに対して、植物ミトコンドリアゲノムでは、NHEJがほぼ起こらず、homologous recombinationによる修復維持に向かうことを初めて見いだした。さらに、一つの細胞の中に数百コピー存在するといわれる植物ミトコンドリアゲノムについて、当初ヘテロプラスミーと呼ばれる、正常配列と異常配列の混在状態を保つと予想したにもかかわらず、組換え変化した変異型ゲノム構造で安定した状態(ホモプラスミー)に変化できることを見いだした。技術的な成功と知に、意外な基礎的知見を見いだすことができた。

### 3. 「選択的アプローチ: CRISPR/Cas9 とパーティクルガン法」

TALEN によるミトコンドリア遺伝子破壊の挑戦とともに、選択的な手段として、CRISPR/Cas9 をもちいた遺伝子破壊、ならびにパーティクルガン法をもちいた一過的な遺伝子導入にも挑戦した。CRISPR/Cas9 は、一タンパク質— RNA の二因子をもちいた人工制限酵素であり、ターゲット遺伝子あたりのベクター設計がごく簡単で、切断活性～破壊効率も高いため核遺伝子の改変に多用されている。Cas9 タンパク質にミトコンドリア局在シグナルをつけたベクターを構築したが、現在の所、まだ変異の検出に至っていない。植物ミトコンドリアが巨大化したミトコンドリア分裂突然変異体をもちいてパーティクルガン法による遺伝子導入を行った。GFP 等をマーカー遺伝子として、大きく分けて四種類の発現ベクターを構築しトライしたが、これまで GFP 等の発現を検出するに至っていない。

### 3. 今後の展開

植物ミトコンドリアゲノムは、巨大で複雑な構造を持っており、維持伝達機構や発現機構についてもよくわかっていない。植物生育上必須の遺伝子や、未解明の遺伝子を含んでいるにも関わらず、形質転換技術がないことがネックとなって研究が行き詰まっている。本研究の成果「人工制限酵素によるミトコンドリアゲノム遺伝子破壊」によって、遺伝子やその発現調節領域、構造領域、複製領域、組換え領域など様々な部位の解析に道をひらくと思われる。今回一端をつかんだ修復機構とゲノムの維持機構、ヘテロプラスミーの解析など、植物ミトコンドリアゲノムの基本理解において、これまで行き詰まっていた解析・研究が一気に進展する可能性がある。また、産業上最も利用され注目を浴びている細胞質雄性不稔の原因遺伝子について、これを用いた解析は必須であると思われる。これまで 10 を越える作物でその原因遺伝子候補が報告されているが、それぞれについて、最終的な同定を行う上で強力なツールとして利用されると思われる。また、この遺伝子の破壊によって、細胞質雄性不稔性の打破ができれば、この TALEN 遺伝子を人工稔性回復遺伝子として使用する応用も考えられ、一部の一代雑種育種への応用が考えられる。

また、もともと細胞質雄性不稔遺伝子は、進化上、自然に低頻度で起こるミトコンドリアゲノムの組換えで偶然出来たキメラ遺伝子だと考えられており、これが発現し悪さをすることで雄性不稔性が起こったとされている。今後、TALEN を用いたミトコンドリアゲノム上の様々な領域



を切断することによって、新たな組換えを起こすことで、新たな細胞質雄性不稔遺伝子を人為的に構築することも可能かもしれない。現在作物に利用されている雄性不稔細胞質は、種類が少なく、病害や環境変異に極めて脆弱である可能性があり、この方法で雄性不稔遺伝子を作ることができれば、優良品種を短期間で雌化して一代雑種 F1 種子生産に使うことが出来る可能性がある。また、TALEN ベクターは核ゲノムに導入されるが、その結果引き起こされる改変型ミトコンドリアゲノムは母性遺伝するため、null segregant を簡単に得ることができ、遺伝子組換え生物拡散の問題を回避できる。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

この申請研究プロジェクトの目的は、これまで不可能であった「ミトコンドリアゲノム人為改変技術」にトライするという極めてハイリスクな研究テーマであったが、これを達成することができた。タイトル後半の「雄性不稔植物の作出」までは残念ながらトライすることが出来なかったが、前者が最大のネックであるため、達成度としては高いと考えている。研究の進め方としては、「遺伝子発現ベクターを作製し、形質転換植物を作製し、変異と表現型を解析する」だけのシンプルな検討手法であるため、検証自体は当初順調に推移すると考えていたが、第一段階のベクター作りが予想外に困難で、改良に時間がかかった(約二年間経過)。また、500 系統以上を探索して変異がなかったことから、この方法に見切りをつけ、別の手段を考えはじめていたが、磯貝領域長から、「新しい方法に挑戦するのもいいけど、当初方法がなぜ悪かったかわかるまでやったほうがいいですよ」とのアドバイスをいただき、解析を工夫しつつ続けたところ幸運にも変異(ではなく予想外の大規模な欠失・消失)を検出することができたが、この検出は偶然的な要素が多分にあった。また、検出方法の変更において DNA 自動泳動装置の緊急導入、ならびに予想外のゲノム大規模改変を検出するための次世代シーケンス外注費用などの、追加支援を申請したところ受諾していただき、スムーズに緊急対応することができた。当初想定では、核ゲノムと同様の変異が起こるとばかり考えていたが、植物ミトコンドリアゲノムに特異的な相同組換えと大規模ゲノム再編が起こることを見いだすことができた。最終的にゲノム編集成功個体が現れたのが、最終年度の 8 月中旬であり、(また秘匿事項の関係で、)これまで外部発表・公開はこれからとなる。植物ミトコンドリアゲノム研究において、強力な独自の手法、それも最初の段階と検出にも工夫が必要であり外部からの新規参入ハードルが高いと思われるので、まずは国内の細胞質雄性不稔研究者を中心に新旧の共同研究者と共に、出来ることを一斉に行い、世界初の最新成果をしばらく出し続けられるように努力したい。今後の植物基礎研究、農学育種の解析・開発ツールの一つとして有効なものが出来たことは大きな成果だと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

##### (研究総括)

本研究で有村氏は、これまでに未開発であったミトコンドリアの遺伝子編集技術を確立し、その一つの実証として、細胞質雄性不稔植物を作出することを目的とした。有村氏はこの研究の

過程でのいろいろな試行錯誤を経て、最終的に、TALEN の手法でミトコンドリアのゲノム編集に成功した。本研究をきっかけとして、ミトコンドリアのゲノム編集による遺伝子改変植物が次々と生み出されてくることが期待される。有村氏の想定した雄性不稔植物もそうした過程で生み出されてくるであろう。これが作物などで実現すれば、高生産性のハイブリッド作物の作出などにも応用することが可能となるであろう。この大きな成果をさらに発展させるために、いろいろな形質についても検討を進めることが必要である。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

\*2016/2/10 現在ほか一報投稿中。ゲノム編集の成功そのものの論文は執筆中。

1. Yamashita A, Fujimoto M, Katayama K, Yamaoka S, Tsutsumi N and Arimura S (2016) Formation of Mitochondrial Outer Membrane Derived Protrusions and Vesicles in Arabidopsis thaliana. PLoS ONE 11(1): e0146717. doi:10.1371/journal.pone.0146717.
2. Huang J, Fujimoto M, Fujiwara M, Fukao Y, Arimura S, Tsutsumi N., Arabidopsis dynamin-related proteins, DRP2A and DRP2B, function coordinately in post-Golgi trafficking. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Jan 2;456(1):238-44. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.065. Epub 2014 Nov 22.
3. Matsuo Y, Arimura S, Tsutsumi N., Distribution of cellulosic wall in the anthers of Arabidopsis during microsporogenesis. Plant Cell Rep. 2013 Nov;32(11):1743-50. doi: 10.1007/s00299-013-1487-1. Epub 2013 Jul 28.
4. Shoji K, Kiuchi T, Hara K, Kawamoto M, Kawaoka S, Arimura S, Tsutsumi N, Sugano S, Suzuki Y, Shimada T, Katsuma S., Characterization of a novel chromodomain-containing gene from the silkworm, Bombyx mori. Gene. 2013 Sep 25;527(2):649-54. doi: 10.1016/j.gene.2013.06.071. Epub 2013 Jul 11.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主な招待講演

1. Mitochondrial Dynamics in Plants, Shin-ichi Arimura, The 4th International symposium on Dynamics of Mitochondria (Dynamito 2013) Okinawa, Japan 10/28-11/1 2013
2. 「植物ミトコンドリアダイナミクスを支える遺伝子群」、有村慎一、国立遺伝学研究所研究集会「オルガネラゲノムに支配される生命現象」2014年11月7日

3. Acyl remodeling affecting the mitochondrial morphology in *Arabidopsis thaliana*. 有村慎二、植物生理学会年会シンポジウム 2015 年 3 月 16 日
4. Dynamic Aspects of plant mitochondria and their genome 有村慎一 植物生理学会シンポジウム 2016 年 3 月 18 日

#### 受賞

2013 年 3 月、日本植物生理学会奨励賞受賞

#### 著作物

Mitochondria and peroxisome division Shin-ichi Arimura and Nobuhiro Tsutsumi, A Chapter in the book entitled “*Molecular cell biology of the growth and differentiation of plant*” in press. (2016)

Shin-ichi Arimura, Mitochondrial fission and fusion in an onion epidermal cell (2014) Atlas of Plant Cell Structure, 2014 Springer: pp38-39

本研究で開発されたミトコンドリアゲノム編集技術を中心にして、本年度は科研費申請を行う。今後様々な共同研究をおこないつつ、来年度以降その他の公募研究事業へ応募していく予定である。

# 研究報告書

## 「シヨ糖過剰ストレス耐性に関わる転写と mRNA 分解の協調制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 千葉 由佳子

### 1. 研究のねらい

シヨ糖は光合成で合成された糖が転流する際の主要な形態であり、植物の生育およびバイオマスに影響を与える重要なファクターである。シヨ糖には植物にとって代謝産物としてばかりではなく、シグナル伝達物質としての役割もある。そのため植物体内でのシヨ糖の量は厳密に調節されており、そこには様々な遺伝子発現制御が関わっていると考えられる。従来の遺伝子発現に関する研究は、mRNA 合成の段階である転写制御に集中して行われ、多くの知見が蓄積されてきた。しかしながら、ここ数年の RNA 研究のめざましい進展により、ノンコーディング RNA や小分子 RNA が発見され、転写後調節の重要性が見直されてきている。mRNA のポリ A 鎖長は、転写後調節の主要な段階である「mRNA の分解」および「翻訳」の両方に影響を与え得る重要な要素である。私はこれまでの研究から、シロイヌナズナのポリ A 鎖分解酵素である AtCCR4 の変異株が、シヨ糖過剰耐性、バイオマスの増加および老化の促進を示すことを見出した。これらの表現型は、ポリ A 鎖長の制御を介した転写後調節が、シヨ糖代謝および成長制御に関わっている可能性を示唆する。本研究では *atccr4* 変異株が示すシヨ糖過剰耐性に焦点を絞り、ポリ A 鎖長の制御を介した転写後調節がシヨ糖代謝にどのような役割を持つのかを明らかにすることを目指す。また、変異株が示すバイオマス増加という形質は、二酸化炭素資源化の観点から興味深いものであり、その要因も明らかにしたい。本研究の最終目的は、mRNA 分解の最初の段階を担うポリ A 鎖分解酵素 AtCCR4 に着目して、その植物生理学上の役割を理解することである。これによって植物のシヨ糖代謝および成長制御に AtCCR4 によるポリ A 鎖長制御を介した転写後調節がどのように関わっているのかを明らかにすることができる。将来的には、これまで蓄積されてきた転写制御の知見と合わせて、シヨ糖代謝および成長制御に関わる遺伝子発現制御を包括的に理解することが、二酸化炭素の資源化に適した植物を作成するための重要な基盤となることを期待する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

シロイヌナズナの AtCCR4 は、酵母における主要なポリ A 分解酵素のオルソログとして単離された。AtCCR4 は 7 つの遺伝子ファミリーを形成しており、中でも酵母の CCR4 に最も似たアミノ酸配列をもつ AtCCR4a と AtCCR4b に着目して研究を進めた。これらのタンパク質は、ポリ A 分解酵素に必須なアミノ酸残基をすべて保存していたが、その機能と植物生理学上の役割は何もわかっていない。本研究では、まず AtCCR4 が本当にポリ A 分解酵素として働きうるのかという点を、細胞内局在性を詳細に調べることにより明らかにすることを目指す。複数のアプローチにより、AtCCR4 が他の多くの mRNA 分解酵素と同様に、細胞質内の Processing

body とよばれる特殊な顆粒状の凝集体に含まれることを明らかにした。一方で植物生理学上の役割を理解するために、*atccr4* 二重変異株を用いた逆遺伝学的解析を進めた。この二重変異株は(1)ショ糖過剰耐性、(2)バイオマスの増加および(3)老化の促進など様々な表現型を示す。ショ糖過剰耐性に着目して研究を進めた結果、二重変異株ではショ糖の含有量が有意に減っており、一方でデンプンの構成要素のひとつであるアミロースが増えていることが明らかとなった。AtCCR4 はポリ A 分解酵素であり、何らかの標的遺伝子を持つと考えられる。解析の結果、アミロースの増加に関連した AtCCR4 の標的遺伝子は、アミロース合成酵素である *Granule Bound Starch Synthase 1* であることを明らかにした。これらの結果は、植物のショ糖およびデンプン代謝にポリ A 鎖長制御を介した転写後調節が関わっていることを示唆する最初の報告となる。

## (2) 詳細

真核生物に広く保存されたポリ A 分解酵素である CCR4 は、シロイヌナズナにおいて 2 つの遺伝子 AtCCR4a および AtCCR4b にコードされている。*atccr4* 二重変異株の解析を進めたところ、ショ糖過剰耐性、バイオマスの増加および老化の促進などの多様な表現型を示すことが明らかとなった。このことから、AtCCR4 は植物の生育にとって重要な役割をもつポリ A 分解酵素であると考えられる。

## 研究テーマ 1 「ポリ A 分解酵素 AtCCR4 の機能解析」

### ■ AtCCR4 の細胞内局在性

mRNA 分解に関わる多くの酵素は細胞質内の Processing body (P-body) と呼ばれる顆粒状の凝集体を形成することから、P-body は mRNA の分解場であると考えられている。そこでシロイヌナズナの一過的発現系を用いて、AtCCR4 の細胞内局在性を調べた。mRNA 分解において 5' 側のキャップ構造の除去に関わる酵素である AtDCP1 と AtDCP2 は既に P-body へ局在することが示されている (Iwasaki *et al.*, 2007, *FEBS Lett.*, 29, 2455-2459)。そこで AtDCP1-CFP および AtDCP2-mCherry 融合タンパク質をコントロールとして用い、AtCCR4a-GFP および AtCCR4b-GFP 融合タンパク質と共発現させることにより、AtCCR4a および AtCCR4b が P-body へ局在す

ることを明らかにした(図 1)。P-body への局在性はタバコ葉を用いた Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法によっても確認されている。この方法はふたつのタンパク質の相互作用とその場所を検出する方法である。N 末端と C 末端側に分断された GFP (NGFP と CGFP) をそれぞれのタンパク質に融合させ、それらを共発現させると、ふたつのタンパク質が相互作用するときのみ GFP の蛍光が観察できる。AtCCR4a-NGFP を AtDCP1-CGFP あるいは AtDCP2-CGFP と共発現させたときに、細胞質内に

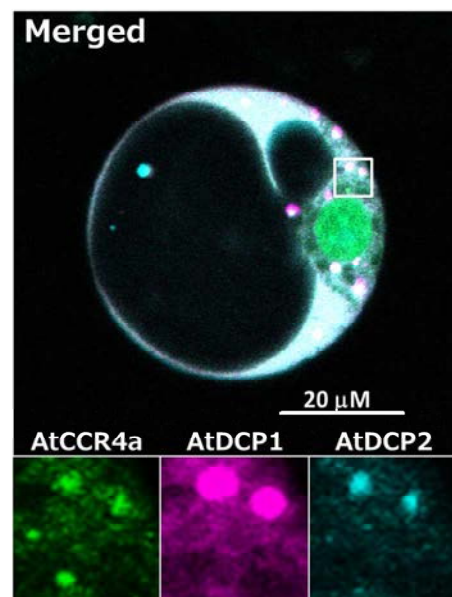


図 1. AtCCR4a の細胞内局在性  
(AtCCR4b も同様の結果が得られた)

Processing bodyと思われる顆粒状の凝集体が観察された。同様の結果はAtCCR4bでも観測され、AtCCR4a および AtCCR4b が Processing body に局在するだけでなく、AtDCP1 と AtDCP2 と相互作用していることが示された。また、P-body はストレス時に生じる Stress granule と似た形態を示すことから、Stress granule のマーカーである AteIF3b-mCherry との共発現させることによって、AtCCR4a および AtCCR4b が局在する場合は Stress granule ではないことを示した。これらの結果は、AtCCR4a と AtCCR4b が P-body において mRNA 分解に関与することを強く支持している。

## 研究テーマ2 「*atccr4* 変異株に見られるショ糖過剰耐性に関する研究」

*atccr4* 二重変異株はショ糖過剰培地において引き起こされる生育阻害に耐性を示す(図2)。その要因を知るべく植物体内の糖の含有量を *atccr4* 二重変異株とコントロール株で比較したところ、二重変異株ではショ糖が有意に減少しており、これがショ糖過剰耐性の要因である可能性が示された。興味深いことに、ブドウ糖の含有量には差が見られなかった。ショ糖が特異的に減少している一方で、葉におけるデンプン量が増加している傾向がヨウ素デンプン反応によって検出された。さらに詳細に調べると、二重変異株ではデンプンの構成要素のひとつであるアミロースの蓄積がコントロール株より有意に増加していることが明らかとなった。アミロースの合成には Granule Bound Starch Synthase 1 (GBSS1) という酵素が主要な役割を担うことから、この酵素遺伝子の発現をショ糖過剰ストレス有無の条件で生育させたコントロール株と *atccr4* 二重変異株で比較したところ、培地のショ糖条件に関わらず *atccr4* 二重変異株で増加していた。さらに、GBSS1 mRNA のポリ A 鎖の長さを LM-PAT assay という手法により *atccr4* 二重変異株とコントロール株で比較した。その結果、培地のショ糖条件に関わらず *atccr4* 二重変異株で GBSS1 mRNA のポリ A 鎖が長くなっていることが明らかとなった(図3)。これらの結果から、GBSS1 遺伝子が AtCCR4 の標的遺伝子のひとつであることが示された。この一連の研究により、AtCCR4 がシロイヌナズナにおいてポリ A 分解酵素として働いていること、さらには AtCCR4 によるポリ A 鎖長の制御がショ糖およびデンプンの代謝制御に関わっていることを明らかにし、Plant and Cell Physiology 誌に発表した (Suzuki *et al.*, 2015, *Plant Cell. Physiol.*, 56: 863-874)。

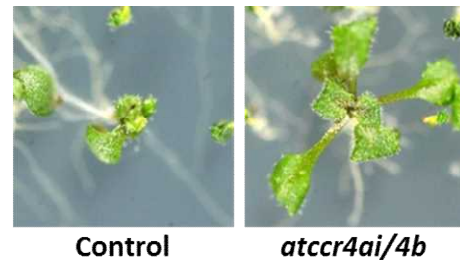


図2. *atCCR4* 二重変異株のショ糖過剰耐性  
二重変異株 *atccr4ai/4b* は 250mM のショ糖を含む培地上でも子葉を展開できる。

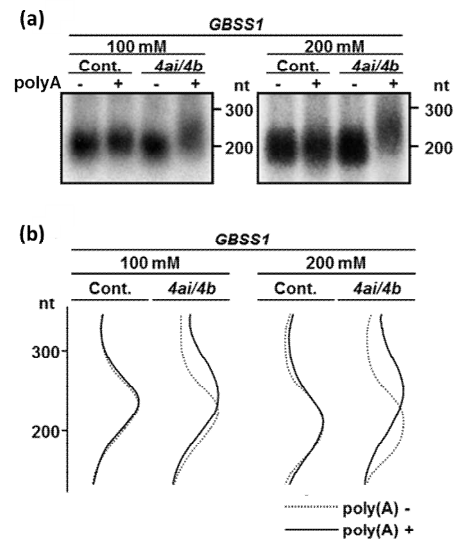


図3. GBSS1 は二重変異株で長いポリ A 鎖をもつ

(a) polyA プラスとマイナスのレーンのバンドサイズの差がポリ A 鎖長を示す。(b) (a) のバンドパターンをスキャンしたものを示す。

### 3. 今後の展開

#### ■ 包括的な網羅的解析による AtCCR4 の標的遺伝子の単離と解析

*atccr4* 二重変異株の解析から AtCCR4 が植物の成長制御において多様な役割をもつことが示唆されている。AtCCR4 の役割を理解するためには、その標的遺伝子の単離が不可欠であるが、シヨ糖過剰耐性やバイオマスの増加に関連する標的遺伝子はまだ見つかっていない。これまでの研究経過をふりかえると、表現型をもとにした個別の遺伝子解析で標的遺伝子に到達することは容易ではないと思

われる。そこで、今後はより直接的なアプローチとしてポリ A 鎖長を網羅的に測定する方法(ポリ A プロファイリング)を確立し、*atccr4* 二重変異株とコントロール株におけるポリ A 鎖長の違いを明らかにすることで標的遺伝子の単離を目指す。また、ポリ A 鎖長の調節が mRNA の分解ばかりではなく翻訳にも影響を与え得ることを考慮して、RNA-seq およびリボソームプロファイリングというふたつの網羅的解析を同時に進めることによって、mRNA レベルおよび翻訳効率が *atccr4* 変異株でどのように変化するか調べる。この包括的な解析によって、*atccr4* 変異株が示す様々な表現型の標的遺伝子が単離され、その制御の生理学的な意味が理解できることが期待される(図 4)。

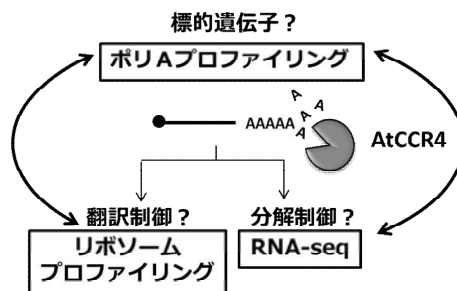


図 4. 包括的網羅解析の概念図

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

#### ■ 研究目的の達成状況

シロイヌナズナのポリ A 分解酵素 AtCCR4 の解析を通して、植物の成長制御に関連した遺伝子発現制御にポリ A 鎖長制御を介した転写後調節がどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした研究を進めてきた。そのような中、デンプン代謝に関連した AtCCR4 の標的遺伝子を同定できたことは評価できる。ただし、*atccr4* 二重変異株が示す形質の中で、二酸化炭素の資源化にとって有用と思われる「シヨ糖過剰耐性」および「バイオマスの増加」に関しては、その生理学的な要因がそれぞれシヨ糖含有量の低下とエンドサイクルの亢進にあることを明らかにできるとどまった。今後はこれらの形質に関わる標的遺伝子の探索が重要になってくる。全般を通して、ポリ A 鎖長を介した転写後調節に関する最初の論文を発表できたこと、および予期しなかった *atccr4* 二重変異株の新しい形質を見出すことができたことなど、今後の研究の足場となる知見を数多く得られたことは評価に値すると考える。

#### ■ 研究の進め方

独立した研究室を立ち上げて 5 年目というところで、さきがけ研究を開始することになり、RNA 研究に必須の機器の導入や研究補助員の雇用などにより、研究室をより効率的に運営することができた。

■ 研究成果の科学技術および社会・経済への波及効果

本研究は二酸化炭素の資源化に有用と思われる形質をもつ *atccr4* 二重変異株を分子レベルで理解するという基礎研究を通して、植物に有用な形質をもたらす新しいアプローチを構築するための基盤となる知見を得ることを目指している。研究はまだ半ばであるが、ポリA鎖長制御を介した転写後調節が植物の成長制御のいろいろな側面で働いていることが示唆されたことは、今後、この研究を続けることで転写制御を中心とした遺伝子発現制御の研究分野に新たなコンセプトをもたらすと考える。また、転写制御の知見と合わせて総合的に遺伝子発現制御を理解すれば、二酸化炭素資源化に向けてより効率よく植物を改変できるかもしれない。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

千葉氏は、本研究でポリA分解酵素の機能を明らかにし、本酵素の利用によって、二酸化炭素資源化につながる方策を考案することを目指した。その結果、標的遺伝子を明らかにするなど、一定の成果が出ている。しかし、当初目的である、ショ糖過剰耐性やバイオマスの相加に関連する標的遺伝子は未発見であるのは残念である。そのなかで、AtCCR4 が概日時計と関わりがあることはきわめて興味深いと思われる。時計遺伝子の広範な作用に、本研究の成果がどのようにかかわってくるか、注目してみたい。そのためには、その方面の研究者との共同研究なども積極的に進め、本研究成果を発展させる研究に挑戦して欲しい。その延長上に、二酸化炭素資源化に貢献できる研究成果を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Suzuki, Y., Arae, T., Green, P. J., Yamaguchi, J., Chiba, Y.\* AtCCR4a and AtCCR4b are involved in determining the poly(A) length of *Granule-bound starch synthase 1* transcript and modulating sucrose and starch metabolism in *Arabidopsis thaliana*. (2015) *Plant Cell Physiol.*, 56: 863-874.
2. Chiba, Y.\*, Mineta, K., Hirai, Y. M., Suzuki, Y., Kanaya, S., Takahashi, H., Onouchi, H., Yamaguchi, J., and Naito, S. Changes in mRNA stability associated with cold stress in *Arabidopsis* cells. (2013) *Plant Cell Physiol.*, 54: 180-194.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

■ 国内学会

1. 鈴木 悠也, Pamela J. Green, 山口 淳二, 千葉 由佳子, 脱アデニル化酵素 AtCCR4 はシ





ヨ糖代謝を負に制御する, 第 54 回日本植物生理学会年会, 平成 25 年 3 月 21 日~23 日,  
(口頭発表)

2. 鈴木 悠也, 平井 優美, Pamela J. Green, 山口 淳二, 千葉 由佳子, **植物の糖代謝に關与する脱アデニル化酵素 AtCCR4 の解析**, 第 15 回日本 RNA 学会年会, 平成 25 年 7 月 24~26 日, 愛媛県県民文化センター, 松本 (ポスター発表)
3. 鈴木 悠也, 以西 史織, 荒江 星拓, 峯田 克彦, 平井 優美, 山口 淳二, Pamela J. Green, 内藤 哲, 千葉 由佳子, **環境変化に適応するための mRNA 分解制御**, 第 55 回日本植物生理学会年会, 平成 26 年 3 月 18 日~20 日, 富山大学, 富山 (口頭発表)
4. 鈴木 悠也, 平井 優美, Pamela J. Green, 山口 淳二, 千葉 由佳子, **Arabidopsis deadenylases, AtCCR4a and AtCCR4b play an important role in determining the poly(A) length of CCA1 and TOC1 transcripts.** 第 56 回日本植物生理学会年会, 平成 27 年 3 月 16 日~18 日, 東京農業大学・東京 (口頭発表)
5. 鈴木 悠也, 平井 優美, Pamela J. Green, 山口 淳二, 千葉 由佳子, **AtCCR4 による概日時計遺伝子のポリ A 鎖長制御の意義**, 第 17 回日本 RNA 学会年会, 平成 27 年 7 月 15 日~17 日, ライフオーツ札幌, 札幌 (口頭発表)

#### ■ 国際学会

1. Yuya Suzuki, Masami Y. Hirai, Pamela J. Green, Junji Yamaguchi, Yukako Chiba, **Poly(A) specific ribonucleases, AtCCR4s are important for the starch metabolism.** The 24rd International Conference on Arabidopsis Research, June 24–28, Sydney Convention and Exhibition Centre, Sydney, Australia. (Poster presentation)
2. Yuya Suzuki, Masami Y. Hirai, Pamela J. Green, Junji Yamaguchi, Yukako Chiba, **Involvement of Arabidopsis Deadenylases, AtCCR4a and AtCCR4b in Sugar Metabolism,** Post-transcriptional Gene Regulation in Plants, July 25–26, 2013, Rhode Island Convention Center, Providence, USA (Oral presentation)
3. Yukako Chiba, **Control of mRNA Degradation Associated with Stress Responses in Arabidopsis,** July 29, 2013, Delaware Biotechnology Institute, Delaware, USA, (Oral presentation)
4. Yuya Suzuki, Pamela J. Green, Junji Yamaguchi, Yukako Chiba, **AtCCR4s degrade the poly(A) tail of GBSS1 mRNA which is responsible for amylose synthesis.** Post-transcriptional Gene Expression Regulation in Plants. June 30–July2, 2014, Collegium Biologicum UAM, Poznan (Poster presentation)

■ **学会・分科会・研究会などの立ち上げ**

2013年に植物のRNA研究に携わる研究者によるネットワーク (Researcher's Network for Plant RNA in Japan; <https://www.sci.hokudai.ac.jp/~yukako/RNA/index.html>) を立ち上げた。ホームページにおける研究者間の情報交換や定例のシンポジウムの開催を行っている。

■ **共同研究**

AtCCR4 による概日時計遺伝子の発現調節に関する研究において、2015年度よりアメリカ Dartmouth 大学の Dr. McClung と共同研究を進めている。

# 研究報告書

## 「バイオマス生産性を支配している細胞機能転換転写制御ネットワークの人工構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 塚越 啓央

### 1. 研究のねらい

根端における細胞の分裂から伸長への機能転換を制御している転写ネットワーク (intra-cellular Gene Regulatory Network: iGRN) をマルチカラーイメージングやシステムバイオロジー学的解析を用いて明らかにする。

根は物理的な支持組織としてだけでなく、土壌中の栄養を吸収して個体に循環させ、さらには周りの環境を敏感に感じ取って個体全体を環境へバランスよく適応させる重要な器官である。このバランスが崩れると植物個体全体が小さくなり、植物のバイオマス低下を引き起こす。よって根のサイズ決定機構を解明し、それを人為的にコントロールできることは環境要因に左右されにくい安定した植物バイオマスを供給する制御系の構築に繋がる。

正常な根の成長には根端での細胞分裂から細胞伸長への細胞機能転換が鍵となっている。しかし、植物細胞には細胞壁が存在し、細胞伸長の物理的障壁となっている。すなわち細胞の伸長には細胞壁のルーズニングが一過的に起こり、伸長を停止する際には強化させるといった複雑で連続的な細胞壁リモデリングが協調的に行われる必要がある。私は、根端の細胞分裂から細胞伸長への細胞機能転換を制御する UP BEAT1 (UPB1) 鍵転写因子と共に、ROS がシグナル因子として細胞機能転換を制御していることを見いだしている。UPB1 の機能解析から、UPB1 は細胞壁リモデリングに関わる遺伝子発現を直接制御していなかった。このことから、UPB1 の下流の転写因子が細胞壁リモデリングに関わると仮定された。細胞壁リモデリングに関わる一連の複雑な現象を制御していると考えられる UPB1 をノードとする細胞機能転換に関わる転写ネットワーク (iGRN) の解明は、単に根のサイズ決定のみならず細胞壁成分の人工制御という点においても優れている。

そこで本研究のねらいをおおまかに以下の二つとする。(1) UPB1 を介した iGRN のイメージングを行う。イメージングにより時空間的に制御される細胞機能転換を司る転写ネットワークを明らかにし、根のサイズ決定機構の人工構築を目標とする。(2) UPB1 の下流に位置する転写因子の標的因子をゲノムワイドに探索し、UPB1 をインプットとする細胞機能転換のシグナルを細胞壁合成というアウトプットまでシステムバイオロジー学的アプローチを利用してプロファイリングする。これらの知見から様々な植物種に展開可能な、ロバストな制御系を構築することで従来の育種学で得られてきたバイオマス生産性の向上を超えるような分子基盤技術の創出を目標とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

UPB1 が制御する iGRN を多色蛍光タンパク質 (マルチカラー) によるイメージング (1) とシステムバイオロジー (2) を組み合わせ解析する。本研究では根端の細胞機能転換の鍵転写因子

UPB1 を iGRN のインプットとし、細胞壁リモデリングにかかわる遺伝子をアウトプットと考え、UPB1 の iGRN を明らかにする。UPB1 の遺伝子破壊株では伸長領域の最後の細胞(伸長が完了した細胞)は長くなり、UPB1 の過剰発現株では短くなる。よって UPB1-iGRN を明らかにすることで細胞のサイズを人工デザインできると考えられる。

**(1)UPB1 が制御する iGRN をリアルタイムイメージングで可視化する。**

UPB1 には少なくとも 166 のダイレクトターゲット遺伝子があり、その中には 18 の転写因子遺伝子を含み、残りの遺伝子の中で細胞壁合成に関わるのはペルオキシダーゼのみであった。よって、マイクロアレイ解析でみられた多くの細胞壁合成系遺伝子発現の変化は UPB1 下流の転写因子に制御されていると考えられる。UPB1 標的転写因子の一つである MYB46 は細胞壁合成関連遺伝子の転写活性化因子であることが報告されている。そこで MYB46 を第一の候補とする。また、その他に MYB50 も報告は無いが MYB46 と同様の MYB 型の DNA 結合ドメインを持つことから、UPB1 の下流で細胞壁合成系遺伝子発現制御に関わっている可能性が考えられた。そこで、UPB1→MYB46/MYB50→細胞壁合成遺伝子という UPB1 の iGRN を想定した。UPB1、MYB46/MYB50、細胞壁合成関連遺伝子を 3 種の異なる蛍光タンパク質でラベルしたレポーターを持つ植物体(マルチカラーレポーター植物)を作成し、RootArray システムを用いた根のライブイメージングを行う。タイムラプスイメージング後に画像処理を行い、細胞の形態変化、細胞のサイズや蛍光強度を数値化することで UPB1 をインプットとする細胞機能転換に関わる iGRN の時空間的な動態を可視化する。

**(2)MYB46/MYB50 の転写制御ネットワークを分子生物学的に決定する。**

MYB46/MYB50 結合ゲノム配列を ChIP-seq 解析を行いゲノムワイドに同定する。ChIP-seq からは数多くの MYB46/MYB50 結合領域が検出されると予想されるが、同時に MYB46/MYB50 の誘導系の形質転換体を用いたトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子発現に変化が見られ、かつ ChIP-seq 解析でポジティブな領域を遺伝子コード領域近傍に持つ物をダイレクトターゲットとして同定する。UPB1 のトランスクリプトームデータと MYB46/MYB50 のダイレクトターゲット遺伝子の情報をシステムバイオロジー学的解析で統合することにより UPB1 をインプットとした細胞壁合成へ繋がる iGRN を構築する(図 1)。

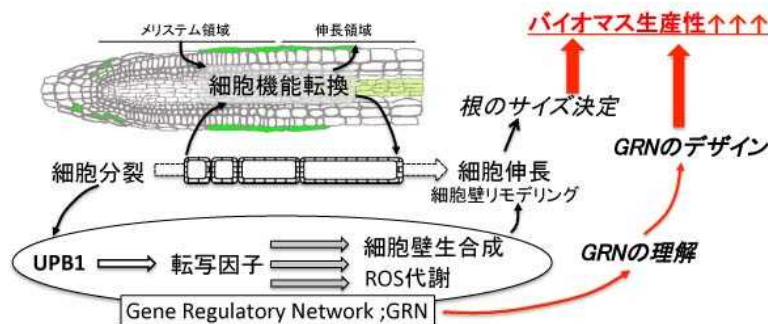


図1.細胞機能変換を制御しているGRNによるバイオマス生産性  
 根端における細胞分裂から細胞伸長への機能転換にはUPB1を中心としたGene Regulatory Network (GRN)が鍵となる。  
 このGRNを理解することで根のサイズ決定メカニズムを利用した植物のバイオマス生産性の向上が可能となる。  
 本研究ではライブイメージングとシステムバイオロジーを併せ、UPB1-GRNの人工デザインによるバイオマスの向上に挑む。

**(2) 詳細**

**(1) UPB1 が制御する iGRN をリアルタイムイメージングで可視化する。**

- ・マルチカラーレポーターラインの作成

インプットである UPB1 の機能を人為的に ON にする為に、UPB1 cDNA 断片の 5' 側に YFP、3' 側に GR レセプターを融合させたレポーターライン、また、UPB1 cDNA と GR レセプターの間には転写活性化ドメイン VP16x2 を融合させた。YFP-UPB1-GR および YFP-UPB1-VP16x2-GR を UPB1 プロモーター並びに 35S プロモーターと結合させた translational fusion をシロイヌナズナ *upb1-1* 変異株に導入した形質転換体を作成した。UPB1 下流の転写因子 MYB46 と MYB50 に関しても同様に MYB46/MYB50 プロモーターと MYB46 cDNA、MYB50 cDNA と GFP を融合させた translational fusion を *upb1-1* 変異株に導入した形質転換体を作成した。さらに、UPB1-iGRN のアウトプットとして細胞壁合成系遺伝子 *AtCesa04*, *AtCesa05*, *AtCesa07*, *AtCesa08*, *XTH18*, *IRX12*, *EXPL1*, *CTL1(POM1)*, *CTL2* の 9 つの遺伝子の各々のプロモーターと CFP と融合させた translational fusion を *upb1-1* に導入した形質転換体を作成した。これら細胞壁合成系遺伝子は UPB1 マイクロアレイデータより発現変動が有意であったものを選抜した。しかしながら細胞壁合成系の CFP 蛍光は非常に弱く、CFP の代わりに RFP を融合させた translational fusion を作成したが、これらも蛍光が弱く以後の解析には向いていないと判断した。そこで、translational fusion の代わりに transcriptional fusion に変換し、さらに蛍光強度を強める工夫として CFP を二回直列に繋いだ形質転換体を作成した。細胞壁合成関連遺伝子群の transcriptional fusion は CFP を 2 回繋いだため、強い蛍光を示す形質転換体を得ることができた。特に、*AtCesa04*, *XTH18*, *CTL1(POM1)* の発現が良好であった。T2 世代が得られた時点で、YFP-UPB1-GR, YFP-UPB1-VP16x2-GR, *pMYB50::cMYB50-GFP*, *pMYB46::cMYB46-GFP* ラインと掛け合わせを進めた。シングルレポーターラインの発現は良好で、UPB1-GR に関しては 10 $\mu$ M DEX 処理により核に移行することが観察された。MYB46 は維管束の分化を開始する細胞の核で特異的な GFP 蛍光が観察された。MYB50 は UPB1 と同様に根端伸長領域から強い発現を示した。実験項目 B で後述するが、*pMYB46::cMYB46-GFP* 形質転換体を用いたクロマチン免疫沈降から ChIP 解析に十分量のクロマチンを獲得できず、以後は MYB50 を中間転写因子とする UPB1-iGRN の構築に集中した (図 2)。

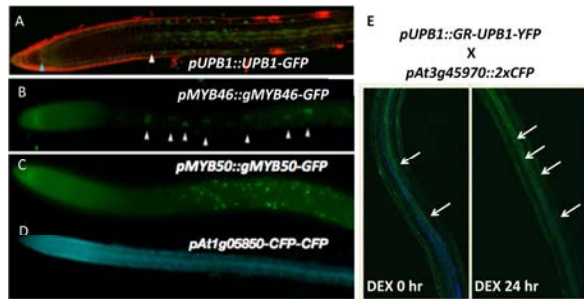


図2: UPB1をインプットとするマルチカラーレポーターラインの構築 (A) UPB1, (B) MYB46, (C) MYB50, (D) CTL1のそれぞれの根端での発現場所。(E) 二重レポーターラインの発現様式、UPB1をDEXで24hr誘導後、下流の細胞壁合成関連CFPの発現レベルが減少した。矢印はUPB1の発現を示す。

また上記 UPB1 の own promoter のみならず、UPB1 の発現を estradiol (est)により誘導的に強く発現させ、その際の UPB1-iGRN の劇的な変化を捉える為のレポーターラインの作成も行った。その為に est 誘導性プロモーター領域(*pXVE*)のクローニングを済ませ、その下流に YFP-UPB1 と YFP-MYB50 を融合させた形質転換体も作成した。これらの est による誘導タイムラプスイメージングを行った結果、これらのラインはいずれも est 添加後約1時間半という早い段階で核に強い蛍光を観察することができた。現在はこれら誘導系レポーターラインと細胞壁合成系遺伝子レポーターラインの掛け合わせを進めている。

これらのマルチカラーラインのタバコ培養細胞 BY2 を用いた GRN の構築も同時に行った。しかし、UPB1 プロモーターが BY2 細胞では発現しない・二番目のレポーターラインを導入した形質転換体を獲得することができなかったことから、培養細胞を用いた GRN の再構築は作成した誘導系 *pXVE::YFP-UPB1*・*pXVE::YFP-MYB50* の核での発現を確認したのみで留まった。

二重レポーターラインを獲得するのに2年以上経過したので、交配は継続しつつ新たなマルチレポーターライン作成の手法として、島根大学・中川強教授との共同研究でリサイクリング gateway システムを用いたマルチカラーレポーターラインの作成にも着手した。リサイクリングシステムは一つのバイナリーベクター上に多数の遺伝子単位を導入することが可能で、一度の形質転換によりマルチカラーレポーターラインをもつ T1 植物を獲得することが可能になる。そこで現在は *pUPB1::YFP-UPB1-GR* とその下流の *pMYB50::cMYB50-GFP* と *pCTL1::2xCFP* のリサイクリングベクターを作成した。現在までに一番目のレポーターラインを導入したクローンの作成は完了したが、2番目のレポータークローンを導入することが進まず、中川教授と原因究明を行いくローニングの加速を測っている。

#### ・タイムラプスイメージング

RootArray を生育させるための条件検討を行い、研究室内に RootArray 生育システムを立ち上げ、光、温度、培地循環速度の検討を行った。その結果、安定して RootArray 上でシロイヌナズナを生育させることが出来る条件を確定した(図 3)。しかしながら、実際に共焦点顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングにおいて培地成分の沈殿物が根の周りに付着してイメージングの支障をきたすことや夏場の室温をコントロールできない環境での温度上昇(30 度以上)と解析に資する為の高解像度イメージを得ることが困難を極めた。そこで、RootArray システムと比較してハイスループットではないが簡易なバージョンの RootArray 構築を進めた。様々な条件を試し、現在非常に簡便で高解像度のデータが得られるシステムを構築し、タイムラプスイメージングを順次進めている。

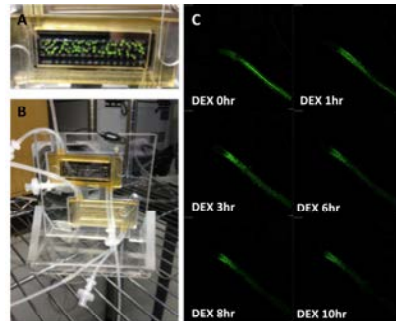


図3. RootArrayシステムと取得画像例。(A)RootArray本体。(B)RootArray培養方法。(C)RootArrayを用いて*pUPB1::GR-UPB1-VP32-YFP*のDEX誘導画像取得例。10  $\mu$ M Dexで10時間画像取得を行った。

#### (2) MYB46/MYB50 の転写制御ネットワークを分子生物学的に決定する。

実験項目(1)において作成した YFP-UPB1, MYB46-GFP 及び MYB50-GFP を持つ形質転換体からタンパク質を抽出して GFP によるクロマチン免疫沈降実験を行った。MYB46 の発現場所が道管細胞に限られており、タンパク質量が少ないことから、MYB46-GFP を発現する形質転換体からは免疫沈降をすることができなかった。一方、MYB50-GFP を発現する形質転換体からは良好な免疫沈降結果を得たので、ChIP-qPCR 解析を進めた。マルチカラーレポーターラインを作成した9つの細胞壁合成関連遺伝子のプロモーター領域を用いた ChIP-qPCR から、MYB50 が *CTL1(POM1)* のプロモーター領域に結合することを見いだした。この結果を受け、名古屋大学 ITbM・中道範人特任准教授と共同研究で ChIP-seq 解析を現在進めている。さらに、*est* 発現誘導系 *pXVE::YFP-UPB1* ならびに *pXVE::YFP-MYB50* 形質転換体を用いた発現解析を行った。まず UPB1 の誘導系のタイムコース解析を行った。その結果、以前に報告した UPB1 のダイレクトターゲット *Peroxidase57* と同様に MYB46 と MYB50 の発現抑制が時間依存的に検出された。ついで MYB50 のタイムコース解析では *Per57* の発現変動は見られなかったが、ChIP で得られた、*CTL1* は早い段階からその遺伝子発現が誘導を受けていた。当初使用していた *est* 濃度が根の伸長阻害を引きおこし、遺伝子発現に影響を受けることから *est* 濃度の条件検討を行い 1 $\mu$ M が適切であることを見いだし、現在この濃度でタイムコース処

理を行い龍谷大学・永野惇講師との共同研究で RNAseq 解析を行う準備をしている。

CTL1 はセルロース合成に関わっている事が報告されており、当初に想定した UPB1→中間転写因子(MYB50)→細胞壁合成関連遺伝子(CTL1)という転写ネットワークの一端を明らかにすることができた (図 4)。今後は実験項目(1)によりこの UPB1-iGRN の時空間的制御系の定量ならびに、実験項目(2)によるゲノムワイドな網羅的解析から MYB50 下流の CTL1 以外の細胞壁合成関連遺伝子への制御系を明らかにして行く。

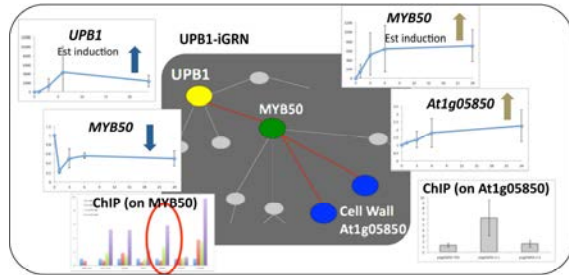


図4. 本研究より明らかになったUPB1-iGRNの一部。Est誘導系・ChIP-qPCRの結果から、UPB1はMYB50を介してCTL1 (At1g05850)の発現を調節し、細胞壁合成に関わり根の大きさを調節していることが示唆された。

### 3. 今後の展開

本“さきがけ”研究期間において根の伸長制御の鍵因子 UPB1 をインプットとした遺伝子発現ネットワーク(UPB1-iGRN)の一端を明らかにすることができた。研究のねらいでも述べたが、直接周りの環境変化に素早く応答し、個体全体の成長を支える根のサイズ決定機構を人為的に調節可能になれば、外環境に影響されにくいバイオマスの安定供給に繋がる。UPB1 の下流の転写因子 MYB50 が細胞壁合成因子 CTL1 を調節することが明らかになったことにより、MYB50 の発現量を人為的に変化させることにより、根の成長のみならず植物の重要なバイオマス成分であるセルロース量を調節することが可能になる。今後は MYB50 のオルソログをシロイヌナズナ以外の植物で過剰発現させることでセルロース含量を増やすことができるであろう。また、UPB1→ MYB50 と類似の GRN を他の植物種から抽出し、それらを DNA マーカーとして利用することで分子育種のスピードを上げる有効な手段となりうる。

現在進めている MYB50 のゲノムワイドな解析から、CTL1 以外の新たな標的因子群も発見できる物と考えられるので、今後はそれらの因子の解析をすすめ根の成長制御機構に新たな知見を得て行きたい。

また本研究でシステム構築を行ったマルチカラーレポーターラインを用いたイメージングは様々な目的に応用することが可能である。単に複数の転写因子の発現パターンを根の成長とともに時空間的に捉える事自体も非常に有効な分子メカニズム研究になる。さらに UPB1-iGRN を様々なストレスにさらすことでストレス応答と根の伸長制御と遺伝子発現ネットワークを可視化することが出来る。UPB1-iGRN のみならず、乾燥・塩ストレス応答に重要な転写因子をインプットとする iGRN のマルチカラーラインを作成することによりストレス応答と根の成長制御を評価することが可能になる。GRN の評価のみならず、有用物質の輸送や蓄積様式もライブで評価することが可能で、様々な現象の根における時空間制御機構を評価することが可能である。このライブイメージングによる遺伝子発現の可視化は、ストレス応答評価用のツールとしても使用可能で、非常に汎用性の高い基盤技術となるであろう。

### 4. 評価

- (1) 自己評価  
(研究者)

まず研究目的の達成状況に関する評価であるが、ゲノムワイドな網羅的な UPB1-iGRN を現時点で明らかにすることができていないことは評価できない。チャレンジングな研究課題を設定していたが、早い段階での方向修正や共同研究の開始をすべきであったと考えられる。しかしながら、UPB1→MYB50→CTL1 という少なくとも一本の多段階転写制御系を明らかにできたことは評価に値するであろう。自分が保持するマイクロアレイデータセットや ChIP-Chip データから仮想 GRN を抽出し、分子生物学的な検証を行えたことは研究者自身の研究の方向付けが正しかったことを裏付けている。実際には多くの形質転換体やタンパク質免疫沈降の条件検討に時間がかかってしまったが、上記 GRN を抽出できたことは着実に課題研究を遂行できたと考えられる。イメージングシステムに関しても、申請段階でのハイスループット化を継続できなかった事は反省すべき点である。問題点としてあげられるのが、顕微鏡設置場所の温度調節等物理的な障壁が大きかった。しかし今年度から顕微鏡の設置場所を変更し、温度コントロールができるプレハブを利用、また、RootArray に変わる小さなイメージングチャンバーの使用への変更で、ハイスループットではないが高解像度イメージングを可能とした。このイメージング基盤技術は汎用性が高く、植物成長制御機構の可視化と言う点では非常に大きな貢献が可能と考えられる。

ついで研究の進め方への自己評価であるが、技術補佐員一名との研究体制ではなく、研究室に配属された学生や技術補佐員を2名にする等、人数を増やす必要があったと考えられた。ただし、特任の立場であると学生の配属はままならず制度上不可能であった。研究費執行に関しては蛍光顕微鏡を一年目に購入したことは非常に良かったと考えられる。作成した形質転換体や培養細胞のイメージングや条件検討を非常にスムーズに行うことができた。また、リアルタイム qPCR 機器(illumine Eco)の購入により、遺伝子発現解析ならびに ChIP-qPCR も常時行うことができた。ChIP-seq や RNAseq 用の高額試薬を購入することもでき、分子生物学的な実験も非常に良く進めることができています。以上のように研究費執行は必要なレベルで行うことができ、研究の推進に非常に大きな力となった。

以上、二酸化炭素資源化研究領域において、本研究課題が果たすべき根の成長制御機構に関する転写ネットワークの人工構築に関わる基盤技術の構築に関しては最低限の成果をあげることができたといえる。すなわち、UPB1 をインプットとした細胞壁合成に関わる転写ネットワークの一端を可視化することができ、汎用性の高い根のタイムラプスイメージングの基盤を示すことができた。本研究課題の成果は根の成長制御に関する学樹的な重要な発見につながり、また、この研究成果を利用することによる根における根のセルロース含量の人為的コントロールへの基盤技術、ならびに根の環境応答に関する遺伝子発現と成長制御のモニタリングシステムへの展開と言う点で非常に有益な研究成果だと言える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

塚越氏は、バイオマス増産への一つの道筋として、根の発育を増進するシステムの解明のため、根の細胞における転写ネットワークの人工構築をめざした。その結果、基礎となった転写因子について、いくつかの標的因子を解明することに成功した。また、根の成長・発達について、遺伝子ネットワークをリアルタイムで解析できる細胞のイメージング技術実験系を確立した。し



かし、ネットワーク解析については、まだまだ全貌が見えてきたとはいえ、今後、このさきがけ研究の経験を生かして、自ら設定した研究テーマに果敢に挑戦して欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Hironaka Tsukagoshi, "Control of root growth and development by reactive oxygen species", *Curr. Opin. Plant Biol.*, (2016) 29:57-63

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

日本植物生理学会年会(第55回、第56回)においてシンポジウムのオーガナイザーを務めた。第56回年会においては当領域の協賛を得てのシンポジウムを開催した。さらに平成26年には第38回内藤コンファレンス「生物システムの物質的基盤」に採択されポスター発表を行った。同平成26年には第12回日仏植物科学ワークショップ「植物の環境応答」、日本農芸化学会 関西支部例会、日本植物学会第78回大会 シンポジウム、日本遺伝学会第86回大会ワークショップでの招待講演を行った。平成27年にはイメージングに関する共同研究をオーストリア Gregor Mendel Institute (GMI) Wolfgang Busch 博士と開始し、GMI 国際セミナーの講演者として招待講演を行った。

公募研究の応募として、新学術領域「発生ロジック 代表:東京大学 塚谷祐一教授」の公募班員として採択され、活性酸素シグナルと根の成長制御に関する研究を進めている。

また、科学研究費補助金 若手研究Bに採択され、アイスプラントの耐塩性機構に関する論文を PLoS One 誌に報告した(Hironaka Tsukagoshi et al., "RNA-Seq Analysis of the Response of the Halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* (Ice Plant) to High Salinity.", *PLoS One*, 2015, 10:e0118339)。

# 研究報告書

## 「固体ルイス酸による高効率バイオマス変換：植物由来の炭化水素類の必須化学資源化」

研究タイプ：通常型

研究期間：平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者：中島 清隆

### 1. 研究のねらい

植物由来の炭化水素類を石油に代わる化学資源として活用できれば、持続可能な炭素循環型社会を構築することができる。本研究ではバイオマス由来の含酸素炭化水素類から、化石資源に依存しているエンジニアリングプラスチックなどの必須化学品原料を、環境低負荷な化学プロセスで獲得するための基盤技術の構築を目的としている。具体的には、分離回収にエネルギーを必要とせず繰り返し利用可能な固体触媒を用いて、木質系バイオマスを構成する単糖類（グルコース、キシロースなどの 5 単糖・6 単糖）や、バイオディーゼル燃料合成/油脂化学工業にて副生する余剰のグリセロールを原料とし、フルフラール類・有機酸へと高効率で変換する化学反応系を構築する。得られたフルフラール類・有機酸は、既存の触媒反応プロセスと組み合わせることによりプラスチックを含む必須化成品全般の代替資源として利用可能となる。近年、木質系バイオマス（セルロース、ヘミセルロース）を単糖へと変換するプロセス（糖化反応系）が飛躍的に発展しており、この糖化技術と本研究の成果を組み合わせることで、植物を原料とした化学品合成の基盤経路が提案できる。

本研究のキーテクノロジーは、環境低負荷バイオリファイナリーを達成するための固体触媒の創出にある。プロジェクト開始段階から、ターゲットとなる反応系に対して水中で機能する固体ルイス酸が有効であることを見出しているが、複雑で多彩な併発反応を伴う糖変換反応を実用レベルで高度に制御した触媒材料および反応系の創生には至っていなかった。そこで、既存の固体ルイス酸の構造解析と基本的な触媒作用の解明に取り組み、その高機能化・高性能化や新規触媒群の開発を進めることにより、バイオマス資源を原料とした環境低負荷と高い効率を併せ持ったバルクケミカル、ファインケミカル合成の基礎を構築する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本課題の基盤テーマとなっている Phosphate/TiO<sub>2</sub> を用いて、グルコースからの HMF 合成およびトリオースからの乳酸合成に有効な Phosphate/TiO<sub>2</sub> による液相反応系を構築した。ターゲットを主に HMF 合成に絞り、まず他のルイス酸には見られない高い HMF 選択率発現の機構解明に取り組んだ。赤外プローブ分光法による詳細な表面解析により、導入したリン酸部位がルイス酸によって活性化された反応分子と水素結合を形成しており、これが分子間副反応を大幅に抑制していることが示唆された。また、重水素交換グルコースを用いた反応機構解析を進め、Phosphate/TiO<sub>2</sub> では一般的に提案されているフルクトースを中間体としたヒドリド移動・脱水反応ではなく、ジカルボニル化合物である 3-デオキシグルコソンを經由するグルコースの直接脱水反応によって進行することを見出した。さらに副反応に寄与する反応性の

高い中間体と基質・生成物の接触を阻害するため、Phosphate/TiO<sub>2</sub> 表面にテフロン骨格を持つ疎水性官能基の導入と、生成した HMF を触媒が存在する水相から速やかに抽出できる有機溶媒を添加したところ、高濃度グルコース水溶液からも高い選択率で HMF を合成できることが分かった。

新規固体酸を開発するため、高表面積なシリカ担体表面にルイス酸サイトとなる遷移金属種を高分散固定した担持型ルイス酸触媒と、ゾルゲル法や溶液沈殿法に基づいた高表面積を持つ単純または複合酸化物触媒の調製を検討した。前者について、前周期遷移金属にターゲットを絞って検討したところ、シリカ担持チタン触媒が有機合成反応のひとつである向山アルドール反応に高活性を示すことを見出した。一方、単純酸化物ではアルミナが固体ルイス酸として水中でも機能しグルコースからフルクトースを高効率で生成することが分かり、複合酸化物では WO<sub>x</sub>/ZrO<sub>2</sub> 触媒がブレンステッド酸とルイス酸を併せ持ち、トリオースからの乳酸合成に高活性を示すことを確認した。

挑戦的なテーマとして設定した“グリセロールを原料とした乳酸のワンポット合成”を可能にする固体触媒を創生するため、貴金属ナノ粒子を担持した固体ルイス酸触媒を調製し、グリセロール水溶液からの乳酸合成活性を評価した。様々な固体ルイス酸および貴金属ナノ粒子の組み合わせを検討したところ、白金ナノ粒子を固定した酸化チタンが、酸素を酸化剤とした条件下においてグリセロールから乳酸を効率よく合成できることを発見した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ1: Phosphate/TiO<sub>2</sub> の水中触媒作用の解明と高機能化(原著論文 No.1, 4, 5)

Phosphate/TiO<sub>2</sub> は水中で機能するルイス酸サイトを有し、グルコース水溶液からの HMF 合成に高活性を示す。Phosphate/TiO<sub>2</sub> の HMF 選択率とリン酸導入量のあいだには明確な相関性が確認されており、赤外ブローブ分光法を中心とした様々な表面分析と触媒活性の結果を組み合わせることにより、リン酸の役割について検証した。トリオースを用いた表面分析を進めたところ、ルイス酸によって活性化された糖基質は近傍のリン酸部位と水素結合を形成する。リン酸導入による選択率向上と連動して反応速度の低下が起こっており、この変化は導入したリン酸と基質のあいだの水素結合形成に由来すると考えた。すなわち、水素結合形成によって分子内反応の反応速度を低下させるため、HMF や乳酸のような目的物の生成速度は低下するが、一方で副生成物を誘発する分子間反応は水素結合形成によってそれ以上に大きく阻害される。この結果、Phosphate/TiO<sub>2</sub> による糖変換では TiO<sub>2</sub> に比べて反応速度は低下するものの、目的生成物の収率・選択率が大きく向上したと考えた。

次に、Phosphate/TiO<sub>2</sub> の高い HMF 収率を明らかにするため、2 種類の同位体交換グルコース(C1 位および C2 位)を用いて Phosphate/TiO<sub>2</sub> の HMF 生成機構を検討した。Phosphate/TiO<sub>2</sub> はフルクトースからの HMF 生成反応に対して活性が低い。よって Phosphate/TiO<sub>2</sub> による HMF 合成では、一般的に提案されているフルクトースを中間体とした経路で反応が進行していないと推察された。酸触媒によるグルコースからの HMF 合成の代表的な反応メカニズムは、グルコースからフルクトースへのヒドリド移動とフルクトースの脱水反応で構成される逐次反応である。水中機能ルイス酸触媒である金属錯体(Sc(OTf)<sub>3</sub>)では、ヒドリド移動・脱水反応で HMF が生成しているが、Phosphate/TiO<sub>2</sub> はフルクトースを経由しない

直接脱水反応でグルコースから HMF を生成することを見出した。さらに、この脱水反応の反応性中間体である 3-デオキシグルコソン(直鎖状のジカルボニル化合物)が酸化チタン表面で生成していることを固体 NMR によって観測できた。グルコースから HMF を直接合成できる固体ルイス酸はなく、フルクトースの脱水を促進するためのブレンステッド酸の添加が必須である。しかし、Phosphate/TiO<sub>2</sub>は単一の固体触媒によってグルコースからHMFを合成できる。この特性は、チタン由来のルイス酸が糖の脱水反応を促進できることに起因していた。

上記のメカニズム解明により、反応中間体として活性なジカルボニル化合物である 3-デオキシグルコソンが触媒表面で生成することが確認されており、この中間体の副反応への寄与を低下させることが触媒活性の更なる向上に寄与すると考えた。そこで、副反応に関与する基質の親水的な性質に着目し、固体表面での定常的な吸着量を低下させることを検討した。具体的には、①Phosphate/TiO<sub>2</sub> 表面にフルオロカーボンなどの疎水性官能基を導入すること、②水溶液に HMF を抽出する有機溶媒(2-sec-butylphenol, SBP)を添加することによって、副反応の更なる抑制を図った。抽出溶媒である SBP は水にまったく混和することがないこと、さらに SBP によって抽出された HMF は水-ヘキサン溶媒と混合することによって熱処理を経ずに水相へ再抽出できることが大きな利点である。疎水化した Phosphate/TiO<sub>2</sub> を高濃度(10wt%)グルコース水溶液と SBP と混合加熱すると、高いグルコース転化率(72%)および HMF 選択率(73%)を示した。この反応系は既報の THF-水系よりも HMF の分離回収が有利なだけでなく、高濃度のグルコース水溶液からでも高選択的に HMF を合成できることが大きく進歩した部分である。

Phosphate/TiO<sub>2</sub> の水中におけるルイス酸触媒作用は本課題の中心に位置づけされており、その基礎研究は本研究期間を通して飛躍的に進歩した。反応メカニズム解析を含む機構解明に加え、それら基礎研究の結果を受けてその触媒性能の更なる高機能化も達成できた。よって、当初の計画に沿って研究が進捗して目的を達成できたと評価している。

#### **研究テーマ 2: ルイス酸性チタン種を高分散固定した担持型固体触媒の開発(原著論文 No.2, 3)**

反応性をコントロールしたチタンアルコキッド誘導体を含浸法によりシリカ表面に担持することによって、ルイス酸性チタン(4 配位チタン種)が高分散固定されたシリカ担持型チタン触媒を開発した。シリカ表面のチタン種は 4 配位構造となっていること、さらに水中ルイス酸サイトとして機能することが確認されており、糖変換反応の重要な素反応となっている水中ヒドリド移動反応(ピルブアルデヒドからの乳酸生成)や有用な水中有機合成反応のひとつである向山アルドール反応に高活性を示した。さらに、触媒表面のシラノールを利用して疎水性アルキル基を固定することによって水溶液内における疎水性反応基質の吸着が大幅に促進されることを見出し、その疎水化触媒は界面活性剤フリーな向山アルドール反応にも極めて高い触媒活性を示した。このようなシリカ表面を基本として触媒活性サイト(ルイス酸サイト)と基質吸着場(疎水性官能基の導入)を自在にデザインできる設計技術は、従来の酸化物触媒調製と一線を画している。疎水性シリカ担持チタン触媒による向山アルドール反応系は、触媒表面の精密制御によって特定の反応に有効な固体触媒の開発例だと考えている。

シリカ担持チタン触媒は目的とした糖変換に対しては有効でなかったが、一方では酸化チタン表面に形成される配位不飽和サイトの構造規定に対して重要な知見を与えている。よっ

て、有用な固体触媒設計の技術を確立させるためには、バルク触媒と担持型触媒の研究が相乗的に進歩することが必要である。チタン以外にもルイス酸として有効なニオブ、ジルコニアの導入や、孤立・高分散担持ではなくクラスター状担持なども継続して検討している。研究計画に従い触媒調製法の確立という観点では目的を達成しているが、糖変換に対して有用な固体触媒とするためにはまだいくつかのハードルがあり、更なる継続検討が必要である。

### **研究テーマ 3: 単純酸化物および複合酸化物ルイス酸の開発**

糖変換に有用な低結晶性酸化物を開発するため、水熱合成法、錯体重合法、沈殿法をベースにして多様な単純酸化物( $\text{Sc}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{MoO}_3$ ,  $\text{WO}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Ga}_2\text{O}_3$ ,  $\text{In}_2\text{O}_3$ ) および複合酸化物( $\text{WO}_3/\text{TiO}_2$ ,  $\text{MoO}_3/\text{TiO}_2$ ,  $\text{WO}_3/\text{ZrO}_2$ ,  $\text{MoO}_3/\text{ZrO}_2$ ,  $\text{CaTiO}_3$ ,  $\text{SrTiO}_3$ ,  $\text{BaTiO}_3$ ,  $\text{YNbO}_4$ ,  $\text{LaNbO}_4$ ,  $\text{YbNbO}_4$ ,  $\text{AlNbO}_4$ )の合成を検討した。例えば、ゾル-ゲル反応によって合成した第 13 族酸化物( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Ga}_2\text{O}_3$ ,  $\text{In}_2\text{O}_3$ )が水中ルイス酸特性を示した。 $\text{Ga}_2\text{O}_3$  および  $\text{In}_2\text{O}_3$  は、低濃度であるが水溶性を示すため糖変換用固体酸としての使用は難しい。一方、 $\text{Al}_2\text{O}_3$  は非水溶性の酸化物であり、安定な水中機能固体ルイス酸性質を示す。 $\text{Al}_2\text{O}_3$  表面の強酸性ルイス酸は水溶液中で失活するが、弱酸性ルイス酸は水中でも糖変換のための活性サイトとして機能した。 $\text{Al}_2\text{O}_3$  をグルコース水溶液に加えて加熱攪拌すると、フルクトースのみが生成物として得られ、HMF はほとんど得られなかった。さらに、リン酸固定した  $\text{Al}_2\text{O}_3$  触媒は、15%以下の低いグルコース転化率領域に限定されるが 70-80%の高いフルクトース選択率を示した。

複合酸化物については、主に IV, V 族遷移金属を含む酸化物を検討した。 $\text{ZrO}_2$  または  $\text{TiO}_2$  にモリブデン、タングステンなどの 6 族遷移金属を含浸法によって固定した後に 500-600 °C で焼成することにより、複合酸化物( $\text{MoO}_x/\text{ZrO}_2$ ,  $\text{WO}_x/\text{ZrO}_2$ ,  $\text{MoO}_x/\text{TiO}_2$ ,  $\text{WO}_x/\text{TiO}_2$ )を調製した。これらの複合酸化物では、電気陰性度の差が大きな異種金属種間に位置する酸素原子が分極し、その電荷を保証するためにプロトンが生成する。よって、担体の酸化物( $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ )由来の水中機能ルイス酸と異種金属の導入に由来するブレンステッド酸を併せ持った固体酸となった。特に導入金属種が高分散担持している  $\text{WO}_x/\text{ZrO}_2$  では高密度のブレンステッド酸およびルイス酸を有しており、1,3-DHA からの乳酸合成反応において 80-90%の生成物収率を示した。 $\text{WO}_x/\text{ZrO}_2$  の高い触媒活性は高密度のブレンステッド酸・ルイス酸に起因しており、2つの異なる素反応(脱水反応, ヒドリド移動反応)にブレンステッド酸およびルイス酸が有効に機能したためである。

### **研究テーマ 4: グリセロールを原料とした水溶液内での直接乳酸合成の検討**

白金を担持した酸化チタン触媒( $\text{Pt}/\text{TiO}_2$ )を用いて、酸素雰囲気下でグリセロール水溶液を加熱攪拌することによって乳酸が生成することを見出した。反応条件を最適化したところ、微量の白金触媒(0.05-0.1 wt%)の条件下で白金触媒とグリセロール水溶液(100 mM)を 150 °C で加熱すると、グリセリン転化率 65%および乳酸選択率約 70%を示した。これは白金触媒による分子状酸素を酸化剤としたグリセリンの酸化と、ルイス酸による生成したトリオースからの乳酸合成が逐次的に進行したことを示している。酸化チタンに担持していない白金粒子を用いた場合、グリセロールの酸素酸化によってトリオースが生成しないため、本反応系は酸化チ

タンに担持した白金粒子による特異的な触媒作用(金属-担体相互作用)が寄与している。さらに金属種を検討した結果、ニッケルを用いた場合も白金に類似した触媒作用を確認しており、貴金属フリーの酸化反応系への発展が期待できる。

### 3. 今後の展開

研究開始当初は、水中で機能するルイス酸性質を持つ固体触媒が3種類の糖変換(グルコース→HMF, キシロース→フルフラール, トリオース→乳酸)に有効であることは分かっていたが、本研究を推進したことにより、なぜ?どのようにして?ルイス酸が有効なのかという疑問に対する答えが得られた。また、それぞれの反応に対してどのような性質の固体ルイス酸を合成すればよいかという設計指針も得られている。固体触媒開発と糖変換反応系に対する基礎的知見は体系的に構築されてきたが、工業触媒として重要な要素となる選択率 90%を越える高機能触媒の開発には至っていない。また、糖変換反応で生成する多様で複雑な副生成物の制御も、固体触媒による糖変換を実用プロセスへと展開する上では重要な要素となる。

固体触媒を用いた有用な糖変換反応を構築するための短期的な検討項目は、例えば有用なフラン類である HMF をさらに高収率で得られる固体触媒および反応プロセスの構築である。特にどのような種類の副生成物が生じているかを詳細に検討する必要がある。もう一つは、得られた HMF をどのようにして有用化学品の原料として活用するかである。実用的な側面から考えるとエネルギー源としての活用は難しく、ポリエステルなど有用なポリマーの原料として活用することが望ましい。そのためには更なる化学変換が必要となるが、HMF 合成に比べ下流側の展開は比較的ハードルが低い。これらを継続して検討することにより、植物資源を利用した化学品合成の道筋が確立できると考えている。

HMF やフルフラールなどのフラン類はポリマー原料としての用途が確立している一方、乳酸に関しては原料をグリセロールではなくグルコースなどの6炭糖として発酵プロセスよりも炭素利用率の高い有効な反応系構築が必要となる。さらに機能・価格の面でポリ乳酸合成の大きな進歩が必要となっており、現状ではそれらの進歩を待ちつつグルコースから乳酸を高収率で合成できる触媒開発を継続して検討すべきである。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

本申請課題は固体ルイス酸を基盤とした水溶液内での高効率な糖変換反応系の構築をめざして検討を進め、主に固体触媒の触媒開発と触媒作用の解明を中心に据えて検討を進めてきた。研究開始段階では糖変換反応用の固体酸触媒はスズ含有ゼオライトと含水酸化ニオブの2種類だったが、その種類は大きく拡張することができた。特に水中機能ルイス酸性質を示す元素群のリストアップが進んだこと、また Phosphate/TiO<sub>2</sub>の研究を進めるうえで糖変換に対するルイス酸塩基サイトの作用機序が明らかになったことにより、新たな触媒の設計指針を提案できるまでになった。研究推進のための3本の柱(材料合成、構造解析、触媒活性評価)を並行して進めるためには、高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフ質量分析計のような分析機器の定常的な使用や補助員雇用による安定した研究体制の構築が不可欠であり、当初の計画通りに研究を進めるための経費を適切に執行できたと考えている。また研究成果

の発表にも力を入れており、論文および学会発表を精力的に進めてきた。まだ道半ばの研究課題がいくつか含まれているため今後も継続した成果発表を続けるが、本プロジェクトで得られた成果はヨーロッパを中心としたバイオリファイナリーをテーマとした触媒研究者にも注目されている。また、国内外の研究交流を通していくつかの重要な共同研究を開始できたことも、本プロジェクトの成果であると考えている。

本課題の「二酸化炭素資源化」領域における位置づけはバイオマス資源の利活用であり、この研究成果を発展させるためには合成したフラン類・有機酸をどのように化学品原料として実用展開するかが重要である。これらの生成物が有用なポリマー原料となることは以前から知られており、原料の調達規模や LCA 的な観点からもポリマー合成への発展が有効である。今後は企業との共同プロジェクトを推進することによって、“実際に役に立つバイオマスからの化学品合成技術”として大きく展開したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

中島氏は、本研究において、固体ルイス酸を用いて、バイオマス成分の化学変換法の確立を目指した。その結果、本研究において、グルコース、キシロースなどの糖類を原料として、HMF やフルフラールへの変換、また、グリセロールからの乳酸への変換を行う水溶液中で機能する多様な固体触媒の開発に成功している。また、これらの触媒の反応機構なども明らかにしている。これらの成果は、高く評価されるもので、さらに反応収率を高めるなど、精密化することによって、実用化されることが期待される。中島氏は、来年度からの ALCA のプロジェクトに採択されているとのことで、本研究をさらに発展させ、本研究での成果を生かしてほしい。なお、化学という手法は、精製化合物を材料として設計されることが多いが、バイオマス自体が複雑な混合物系であることを考えるとき、そうした原料にも対応できるような工程や触媒が将来できていくことも期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Ryouhei Noma, **Kiyotaka Nakajima**, Keigo Kamata, Masaaki Kitano, Shigenobu Hayashi, Michikazu Hara, “Formation of 5-(Hydroxymethyl)furfural by Stepwise Dehydration over TiO<sub>2</sub> with Water-Tolerant Lewis Acid Sites”, Journal of Physical Chemistry C, 2015, 119, 17117-17125.
2. Hiroshi Shintaku, **Kiyotaka Nakajima**, Masaaki Kitano, Michikazu Hara, “Efficient Mukaiyama aldol reaction in water with TiO<sub>4</sub> tetrahedra on a hydrophobic mesoporous silica surface”, Chemical Communications, 2014, 50, 13473-13476.
3. Hiroshi Shintaku, **Kiyotaka Nakajima**, Masaaki Kitano, Nobuyuki Ichikuni, Michikazu Hara, “Lewis Acid Catalysis of TiO<sub>4</sub> Tetrahedra on Mesoporous Silica in Water”, ACS Catalysis, 2014, 4, 1198-1204.
4. **Kiyotaka Nakajima**, Ryouhei Noma, Masaaki Kitano, Michikazu Hara, “Selective glucose

transformation by titania as a heterogeneous Lewis acid catalyst”, Journal of Molecular Catalysis A: General, 2014, 338–339, 100–105.

5. **Kiyotaka Nakajima**, Ryouhei Noma, Masaaki Kitano, Michikazu Hara, “Titania as an Early Transition Metal Oxide with a High Density of Lewis Acid Sites workable in Water”, Journal of Physical Chemistry C, 2013, 117, 16028–16033.

## (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### その他の原著論文

1. Kiichi Fukuhara, Kiyotaka Nakajima, Masaaki Kitano, Shigenobu Hayashi, Michikazu Hara, Transesterification of Triolein over Hydrophobic Microporous Carbon with SO<sub>3</sub>H Groups, ChemCatChem, in press (DOI: 10.1002/cctc.201500525).
2. Michikazu Hara, Kiyotaka Nakajima, Keigo Kamata, Recent Progress in the Development of Solid Catalysts for Biomass Conversion into High Value-added Chemicals, Science and Technology of Advanced Materials, 2015, 16, 034903 (page 1–22)
3. Yusuke Koito, Kiyotaka Nakajima, Ryota Hasegawa, Hisayoshi Kobayashi, Masaaki Kitano, Michikazu Hara, Slow reactant–water exchange and high catalytic performance on metal triflates, Chemistry– A European Journal, 2014, 20, 8068–8075.
4. Yusuke Koito, Kiyotaka Nakajima, Ryota Hasegawa, Hisayoshi Kobayashi, Masaaki Kitano, Michikazu Hara, Lewis acid properties of some metal salts for lactic acid formation in water: <sup>31</sup>P NMR spectroscopy with trimethylphosphine oxide as a molecular probe, Catalysis Today, 2014, 226, 198–203.
5. Emiko Wada, Masaaki Kitano, Kiyotaka Nakajima, Michikazu Hara, Effect of Preparation Conditions on Structural and Acid Catalytic Properties of Protonated Titania Nanotubes, Journal of Materials Chemistry A, 2013, 1, 12768–12774.
6. Yusuke Koito, Kiyotaka Nakajima, Masaaki Kitano, Michikazu Hara, Efficient Conversion of Pyruvic Aldehyde into Lactic Acid by Lewis Acid Catalyst in Water, Chemistry Letters, 2013, 42,873–875.
7. Kiichi Fukuhara, Kiyotaka Nakajima, Masaaki Kitano, Shigenobu Hayashi, Michikazu Hara, Synthesis and Acid Catalysis of Zeolite–Templated Microporous Carbons with SO<sub>3</sub>H Groups, Physical Chemistry Chemical Physics, 2013, 15, 9343–9350.

### 主な依頼・招待講演

1. 中島清隆, タイトル: 固体ルイス酸による水溶液内での糖類の脱水・異性化反応, 触媒学会北海道支部主催, 札幌講演会, 平成24年12月7日, 北海道大学
2. 中島清隆, タイトル: カーボン固体酸の高機能化および含水ニオブ酸の水中ルイス酸触媒特性(奨励賞受賞講演), 第62回石油学会研究発表会, 平成25年5月28日, タワーホール船堀, 東京



3. 中島清隆, タイトル: 固体ルイス酸を用いた糖水溶液内からのフラン類・有機酸合成, 第 112 回触媒討論会, 平成 25 年 9 月 18 日, 秋田大学
4. 中島清隆, タイトル: 固体ルイス酸を用いた水中でのバイオマス変換: 植物から化学品原料の環境低負荷合成, 触媒学会規則性多孔体研究会主催, 第 16 回「規則性多孔体研究会」セミナー, 平成 26 年 3 月 4 日, 東京大学生産技術研究所
5. 中島清隆, タイトル: 固体ルイス酸による水中でのバイオリファイナリー, 大学附置研究所「ナノマクロ物質・デバイス・システム創製アライアンス」物質・デバイス領域共同研究拠点主催, 第 7 回ワークショップ「固体材料合成および評価技術の新展開」, 平成 26 年 9 月 2-4 日, 福島県二本松市
6. 中島清隆, タイトル: 固体ルイス酸による糖類からフラン類・有機酸の環境低負荷合成, 触媒学会規則性多孔体研究会主催, 第 17 回「規則性多孔体研究会」セミナー, 平成 26 年 11 月 13 日, 鳥取大学
7. 中島清隆, タイトル: 酸化チタンの水中ルイス酸特性とグリセロール水溶液からの乳酸合成への応用, 日本化学会第 95 回春季年会, 若い世代の特別講演会, 平成 27 年 3 月 27 日, 東京大学生産技術研究所
8. 中島清隆, タイトル: 固体酸化物の水中ルイス酸性質を利用した糖変換反応, 北海道大学触媒化学研究センター, 第 361 回コロキウム, 平成 27 年 4 月 8 日, 北海道大学触媒化学研究センター
9. 中島清隆, タイトル: 配位不飽和チタン種の水中ルイス酸性質と糖変換反応への応用, 触媒学会主催・第 55 回オーロラセミナー, 平成 27 年 7 月 26 日, 北海道雨竜郡沼田町
10. 中島清隆, タイトル: 水中で機能する固体ルイス酸の開発と糖変換反応への応用(奨励賞受賞講演), 第 116 回触媒討論会, 平成 27 年 9 月 16-18 日, 三重大学

#### 国際会議での学会発表(口頭)

1. Kiyotaka Nakajima, Masaaki Kitano, Michikazu Hara, Selective Production of Lactic Acid from Triose over Phosphate/TiO<sub>2</sub> with Water-Tolerant Lewis Acid sites, 7<sup>th</sup> International Symposium on Acid-Base Catalysis, Tokyo, Japan, May 12<sup>th</sup>-15<sup>th</sup>, 2013.
2. Kiyotaka Nakajima, Masaaki Kitano, Michikazu Hara, 5-hydroxymethyl furfural production from glucose aqueous solution over Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> with water-tolerant Lewis acid site, 8<sup>th</sup> International Symposium on Group Five Elements, Malaga, Spain, June 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup>, 2014
3. Kiyotaka Nakajima, Michikazu Hara, Lactic acid formation from 1,3-dihydroxyacetone in water over water-tolerant Lewis acid sites, 3<sup>rd</sup> international congress on catalysis for biorifineries, Rio de Janeiro, Brazil, September 28-30<sup>th</sup>, 2015.

#### 受賞歴

1. 平成 25 年度, 石油学会奨励賞(出光興産賞), 水中で機能する酸化ニオブおよびスルホン化カーボン固体酸触媒の開発とバイオマス変換反応への応用, 公益社団法人石油学会
2. 平成 26 年度, 挑戦的研究賞新規な水中機能触媒を用いた植物由来炭化水素からの必須化学品原料の環境低負荷合成, 国立大学法人東京工業大学
3. 平成 27 年度, 第 95 回春季年会・若い世代の特別講演会・講演賞, 酸化チタンの水中ルイ

ス酸特性とグリセロール水溶液からの乳酸合成への応用, 公益社団法人日本化学会

4. 平成 27 年度, 触媒学会奨励賞, 水中で機能する固体ルイス酸の開発と糖変換反応への応用, 公益社団法人触媒学会

#### 国内外の共同研究

1. 平成 25 年度～, Emiel Hensen 教授(オランダ, エイントフォーフェン工科大学)と固体触媒を用いた水中糖変換に関する研究
2. 平成 25 年度～, Barbara Onida 教授(イタリア, トリノ大学)との固体酸化物の酸塩基性質評価に関する研究
3. 平成 25 年度～, 加藤英樹准教授(東北大学多元物質科学研究所)との溶液プロセスによる高表面積酸化物の合成に関する研究
4. 平成 25 年度～, 上田渉教授(北海道大学触媒化学研究センター, 現神奈川大学工学部)との水熱合成で得られる層状ニオブ酸化物の水中ルイス酸特性に関する研究

#### 公募研究事業への応募

1. 平成 27 年度, 科研費:若手研究 A, 固体触媒を用いた植物由来炭化水素からのワンポット乳酸合成反応の構築(代表, 採択済)
2. 平成 27 年度, JST・ALCA 特別重点技術領域「ホワイトバイオテクノロジーによる次世代化成品創出」, 非可食バイオマス資源ならびに油脂からのカルボン酸およびアルコール製造方法の開発(代表, 採択済)

# 研究報告書

## 「フィールドオミクスによる野外環境応答の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 永野 惇

### 1. 研究のねらい

主たる農業生産の場であり、植物本来の生育場所である野外では、温度や光などが複雑に変動する。このような環境下で植物はどのように環境に対して応答しているのか？また、その応答はどのような遺伝的基盤によって支配されているのか？これらは未だ手つかずの問題である。一方、これまで分子生物学では、環境応答に関する膨大な知識が蓄えられてきた。しかし、それらは単純な実験室環境で得られた知見であるため、そこから野外での応答を推し量ることは難しい。そのため、分子生物学的な知識に基づいて候補遺伝子を選定し、導入する分子育種において、実験室での結果から期待されるパフォーマンスが実際の野外環境下では発揮されないという問題がしばしば起こっている。

そこで本研究では、野外での環境応答をそのまま捉え、理解するための方法として、“フィールドオミクス”を確立・発展させることを目指した。具体的には、野外で収集された大量のトランスクリプトームデータと気象データ(気温や日射量、降水量など)の統計モデリングによる統合を行う。これによって得られたモデルやパラメータを用いた解析から、遺伝子発現が、複合的に変動する野外環境や体内時計、植物の齢にどのように影響されているのかを明らかにする。さらに、前述の統計モデリングと量的遺伝学を融合させた手法を開発することで、野外環境応答の遺伝的基盤を明らかにする。同時に、これによって得られた遺伝子型情報を含んだモデルやパラメータを用いることで、任意の時刻、環境条件、遺伝子型におけるトランスクリプトームをシミュレーションすることを可能とする。最先端の生命科学と情報科学を用いて、野外と実験室のギャップを埋める本研究は、実験室で蓄積された知見を現実の問題解決に繋げるための基盤となる。なお、当初の計画ではトランスクリプトームに加え、メタボロームも対象として含んでいたが、研究資源を集中し成果を最大化するために、本研究ではトランスクリプトームを中心として進めることとし、メタボロームに関しては予備的な調査にとどめた。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、まず、野外トランスクリプトームデータと気象データとを統計モデリングにより統合的に解析する手法(フィールドオミクス)を開発し、野外におけるイネの葉のトランスクリプトーム変動における体内時計、環境要因、日齢の影響を定量的に明らかにした。さらにフィールドオミクスに量的遺伝学を組み合わせるための基盤技術の開発と概念実証を進めた。実験上の基盤技術として、大幅に多検体化・低コスト化した RNA-Seq ライブラリ調製手法を確立し

た。さらに、rRNA の選択的分解法をとりいれ、野外サンプルでしばしば見られるような分解を受けた RNA でも頑健に定量を行うことを可能とした。一方、データ解析上の基盤技術として、従来法を約 1000 倍高速化したプログラムを開発し、R のライブラリ(FieldTranscriptome3)として整備した。これらの基盤技術を用いて、イネを材料とした実証研究を行った。日本晴/コシヒカリ CSSL、BIL、コシヒカリ/タカナリ CSSL を 2013、2014、2015 年度に圃場で栽培し、合計約 4000 の葉サンプルを採集した。このうち、まず、日本晴・コシヒカリ CSSL 約 1000 サンプル分のトランスクリプトームデータを取得し、気象データと合わせて統計モデリングを行った。その結果、少数の遺伝子が品種間で異なるパラメータをもつことがわかった。今後は、CSSL の各系統のジェノタイプを考慮した解析を行うことで、品種間のパラメータの違いの原因と考えられるゲノム領域の特定と、トランスクリプトームの設計が可能になると考えられた。

並行して、野外での複雑な変動を再現しつつ高度にコントロールが可能な PC 制御高機能グロースチャンバ(SmartGC)を開発した。SmartGC では PC から、7波長の高輝度 LED をそれぞれ独立に 0.1 秒ごとに 1000 段階の調光制御が可能であり、また温度、湿度は 1 分間隔で制御できる。この SmartGC を用いて野外で見られたなだらかな気温・光変化を再現したところ、トランスクリプトームの変化を野外で見られたものに近づけることが出来た。この結果は、光、気温を高度に制御することで、植物にとっての野外環境をある程度再現することが可能であり、野外と実験室の違いをもたらす大きな要因の一つは光、気温の変化パターンであるということを示している。

以上の研究から、野外環境における植物の遺伝子発現の環境応答の実態解明に近づくとともに、予測・設計する技術の確立に向かって前進できたと考えられる。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「QTL 集団を利用した野外トランスクリプトームの遺伝学的基礎の解明」

野外トランスクリプトームデータと気象データとを統計モデリングにより統合的に解析する手法(フィールドオミクス)を開発し、イネの葉で発現する遺伝子の 97%について、野外での遺伝子発現における体内時計、気温など環境要因、日齢の影響を定量的に明らかにした(Nagano *et al.*, 2012, *Cell* 誌に掲載)。この研究はイネの標準系統である日本晴のみを対象としたモデルとなっており、遺伝的に異なった系統では何が起こるのかを予想することは難しい。そこで定量的遺伝学とフィールドオミクスを組み合わせることで、遺伝子型をモデルに組み込むことを目指して技術開発を行った。

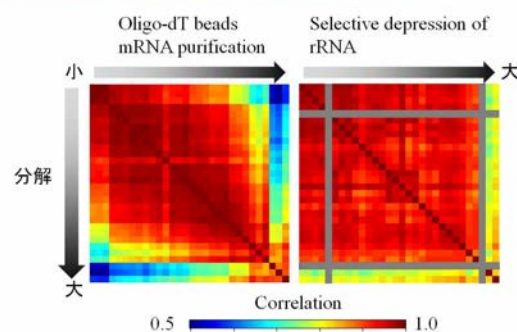
必要な基盤技術の一つとして、野外から得られた大量のサンプルから低コストかつ頑健にトランスクリプトームデータを得る技術がある。そのためにもまず、RNA-Seq の多検体化・低コスト化に取り組んだ。反応の小ボリューム化や、3D プリンタなどを用いて独自に改造した機器を用いた磁気ビーズ精製の自動化など、様々な工夫を組み合わせることによって、大幅な多検体化・低コスト化を実現した。また、野外サンプルでしばしば不可避な RNA の分解が、トランスクリプトームの定量に与える影響を実験的に検証したところ、従来のオリゴ dT ビーズによる mRNA 精製を用いた方法では影響が大きいことが確認された。そこで、耐熱性 RNaseH を用い

た rRNA の選択的分解法をとり入れ、分解を受けた RNA に対しても頑健な定量を可能とした(右図、Nagano *et al.*, 2015, **Methods in Molecular Biology** 誌に掲載)。さらにこの方法を応用し、イネの葉で特に高発現する数遺伝子の mRNA を選択的に除去することで、それ以外の大抵の遺伝子をより精度良く定量可能とする手法を確立した。

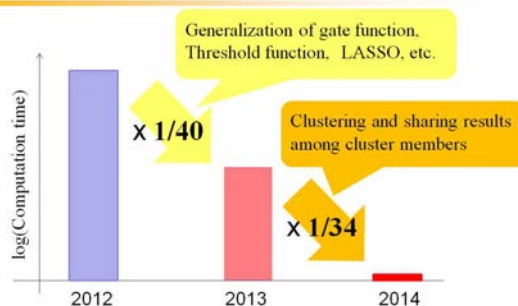
もうひとつの基盤技術として、トランスクリプトームデータと気象データとの統計モデリングがある。従来法では、非常に大きな計算時間を要していた。このままでは、そこにさらに遺伝子型データを加えた統計モデリングを行った場合、現実的な時間内に終了させることは出来ない。そこで、統計モデリングを行うプログラムの改良に取り組んだ。これまでに、LASSO 法、Affinity propagation によるクラスタリングの併用、コードのリファクタリングなどによって、従来の 1000 倍以上の高速化が可能となった(右図)。高速化したプログラムは R のライブラリ(FieldTranscriptome3)として、2015 年度中の公開を目指して準備中である。さらに従来法とは全く異なったアプローチでの解析手法の検討も行った。具体的には、最近、自然言語処理の分野で注目されているトピックモデルと呼ばれる手法が RNA-Seq データの解析にも適用可能であることを示した。従来法とトピックモデルの結果を比較したところ、それぞれ得意とする発現パターンが異なっていることが分かった。このことから、両者を併用することでより精度の高い発現予測が可能となると考えられる。

開発した基盤技術を用いてコンセプトの実証を行うためにイネを用いた研究を行った。日本晴/コシヒカリ CSSL、BIL、コシヒカリ/タカナリ CSSL を 2013、2014、2015 年度に圃場で栽培し、合計約 4000 の葉サンプルを取得した。このうち、まず、日本晴・コシヒカリ CSSL 約 1300 サンプルに集中し解析を進めることとした。これらのサンプルを用いて、前述した低コスト・多検体 RNA-Seq により約 1000 サンプル分のトランスクリプトームデータを得た。このトランスクリプトームデータ、気象データとこれまでに開発・高速化してきた統計モデリングプログラムを駆使して、日本晴背景、コシヒカリ背景、それぞれについての気象-トランスクリプトームモデリングを行った。その結果、日本晴とコシヒカリのそれぞれについて大部分の遺伝子についてモデリングを行うことが出来た。両品種のモデル・パラメータを比較したところ、少数の遺伝子が品種間で異なるパラメータをもつことがわかった。今後は、CSSL の各系統のジェノタイプを考慮した解析を行うことで、品種間のパラメータの違いの原因と考えられるゲノム領域の特定と、トランスクリプトームの設計が可能になると考えられた。

rRNAの選択的分解法を用いると  
分解に対して頑健に定量出来る



フィールドオミクスに必要な統計モデリングを  
約1000倍の高速化した



## 研究テーマ B「野外トランスクリプトーム、野外メタボロームにおける生物学的ノイズ」

フィールドオミクスによって、体内時計や気温など様々な要因の遺伝子発現への決定論的な影響に加えて、個体間での確率的な揺らぎ(生物学的ノイズ)の大きさを定量することが可能となった。生物学的ノイズの大きさと遺伝子機能の関連を調べたところ、内膜輸送など基本的な細胞機能に関わる遺伝子では生物学的ノイズが小さく、二次代謝など病虫害防御に関わる遺伝子では生物学的ノイズが大きいことが分かった。これらの結果をもとに非線形物理を専門とする栗津暁紀博士らと共同研究を進めたところ、多細胞植物では遺伝子発現の環境応答の大きさと生物学的ノイズの間に幅広く相関があることが明らかとなった(Hirao et al., 2015, **Journal of Theoretical Biology** 誌に掲載)。この結果は多細胞組織における遺伝子発現の揺らぎに関するある種の帰無仮説を与えるという意味で重要である。

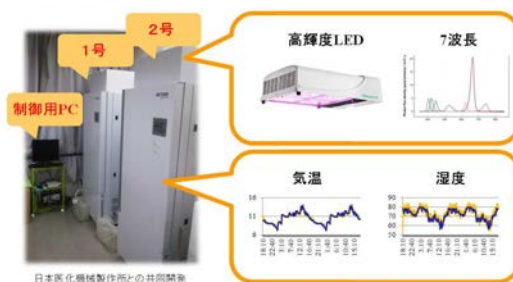
野外メタボロームの予備的解析として、約 100 サンプルからなる日週のメタボロームデータを取得し、解析を行った。その結果、トランスクリプトームと比較して、メタボロームでは気象、体内時計時刻によって規定される決定論的と思われる変動が小さく、個体間の生物学的ノイズが大きいことが明らかになった。非常に大きな生物学的ノイズが見られることそれ自体が興味深いことである。なぜメタボロームにこれほど大きな生物学的ノイズがあるなかで、圃場で見られるように均一な生育を示すのか、今後取り組むべき重要な問題が得られたことは成果といえる。

## 研究テーマ C「PC 制御高機能グロースチャンバ(SmartGC)の開発と野外環境再現」

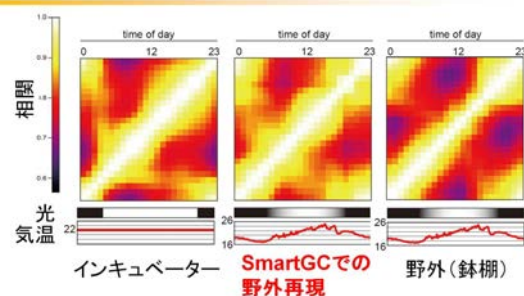
野外と実験室は植物にとって互いに異なった環境であることは明らかである。しかしながら、その違いが何によってもたらされているか、はこれまで明らかにされていない。この疑問に答えることは、野外と実験室のそれぞれから得られたデータの統一した解釈のために極めて重要と考えられた。そこで、野外での複雑な変動を再現しつつ高度にコントロールが可能な PC 制御高機能グロースチャンバ(SmartGC)を開発した(右上図)。SmartGCでは制御用PCに設定したプログラムに従って、7波長の高輝度LEDをそれぞれ独立に0.1秒ごとに1000段階の調光制御が可能であり、また温度、湿度は1分間隔で制御できる。

一般的なインキュベーターでの条件、野外(鉢棚)条件、SmartGCを用いて気温・光を野外に似せて変化させた条件で栽培を行

温度、光、湿度を高度にコントロールできる  
SmartGCを開発した



SmartGCによって  
野外のトランスクリプトームの  
日周変動に近いパターンが得られた



い、日周のトランスクリプトーム変化を測定した結果を示す(前項、右下図)。インキュベーター条件下では、朝、暗から明に切り替わったタイミングで急激なトランスクリプトーム変化が見られた。一方で、SmartGC を用いて野外で見られるようななだらかな気温・光変化を再現したところ、トランスクリプトームの変化を野外で見られたなだらかなものに近づけることが出来た。これらの結果は、光、気温を高度に制御することで、植物にとっての野外環境をある程度の水準で再現することが可能であり、野外と実験室の違いをもたらす大きな要因の一つは光、気温の変化パターンであるということを示している。

### 3. 今後の展開

本研究では、フィールドオミクスに関連する様々な基盤技術を整えることが出来た。加えて、SmartGC を開発し、野外環境をある程度再現しながら実験を行うことを可能にした。今後はこれらを活用して、野外環境における植物の遺伝子発現の環境応答の実態解明、予測・設計する技術の確立を進めていきたい。また、本研究ではいくつか基礎生物学的に重要と思われる発見もあった。そのひとつに遺伝子発現における生物学的ノイズと環境応答性の関係がある。前述したように、この結果は多細胞組織における遺伝子発現の揺らぎに関するある種の帰無仮説を与えるという意味で重要である。今後はこれをもとに、遺伝子発現における生物学的ノイズが生物の環境応答においてどのように影響しているのかについても、研究を深めていきたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では、植物の野外環境応答の解明のために、フィールドオミクスの確立とその量的遺伝学との融合を目指した研究を行った。そのための基盤技術として、多検体・低コスト RNA-Seq システムの開発、統計モデリングのためのプログラムの高速化・高度化を行った。これらの基盤技術については、いずれも当初必要と考えたスペックを達成することが出来た。実証研究のためには、圃場での多数のサンプルの取得が必要となる。3 シーズンで合計 54 セットの 24 時間サンプリングという過酷なサンプリングを完了出来たのは、研究補助者、アルバイト、農業生物資源研究所圃場、京大農学部高槻圃場の様々な方々に協力いただいたことのおかげであったと考える。この場を借りて感謝の意を示したい。多検体・低コスト RNA-Seq の安定稼働が遅れたことなどから、実際のサンプルからまとまった量のデータが得られたのが研究期間の後半になってからであった。そのため、野外トランスクリプトームの系統間差の原因となるゲノム領域の絞り込みや、その結果を用いた設計まで十分に時間が取れなかった点は残念であった。しかしながら、サンプル、解析技術は揃っているため、今後も解析を続けることで近日中に最終的な結果を得られる見込みである。本研究の先にある野外トランスクリプトームの予測・設計を行う技術と、並行して開発しているトランスクリプトームから形質の予測を行う技術を組み合わせることで、将来的には野外環境下での植物の環境応答の予測・設計を行う技術の確立へとつなげていきたい。

研究テーマ A で確立した多検体・低コストな次世代シーケンスライブラリ調整システムを用

いて、RNA-SeqだけでなくゲノムワイドSNP解析で用いられるRAD-Seqのライブラリも効率的に作成できるようになった。これらの技術をもちいた共同研究として、領域内ではCRESTの堤グループに技術移転を行ったことをはじめ、内藤健さきがけ研究者、藤本龍さきがけ研究者のサンプルの分析を行った。領域外も含めると、植物、動物、菌類問わず様々な生物種を対象とする研究者から、2013年度は約5000サンプル、2014年度以降は毎年10000検体以上のペースでRAD-Seq解析を請け負っている。共同研究を通じて、様々な研究者と交流し、様々な研究に触れることが出来たことが自分にとって良い経験であったとともに、多くの研究に貢献できたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

永野氏は、実験室と野外での実験環境の違いによる植物生育の状況のギャップを科学的に理解するために、フィールドオミックスという手法を導入し、野外環境下での気象条件などの環境要因と、トランスクリプトームなどのオミックス解析のデータを関連付け、ある環境下での発現パターンなどを予測できるモデルの構築を目指した。その結果永野氏は、膨大な試料についてRNA-Seqにあらたな方法を導入し、統計モデリングの高度化に成功した。また、野外環境での遺伝子発現を再現しうる植物培養装置の開発などにも成功した。こうした成果は高く評価される。さらに永野氏は、本領域内の研究者ネットワークの形成や、多くの共同研究などを通じて、本領域に大きく貢献してきた。永野氏には、植物科学に新しい領域を開いていく研究者として、今後のいっそうの進展を期待したい。永野氏は、あらたなCRESTの新規プロジェクトに採択されていることは、その中で、本さきがけの研究成果をさらに大きな研究として、発展させて行く機会が与えられたものであり、期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Hirao K, Nagano AJ, and Awazu A, Noise-plasticity correlations of gene expression in the multicellular organism *Arabidopsis thaliana*., **Journal of Theoretical Biology**, (2015) 387:13-22
2. Kubota S, Iwasaki T, Hanada K, Nagano AJ, Fujiyama A, Toyoda A, Sugano S, Suzuki Y, Hikosaka K, Ito M and Morinaga S, A Genome Scan for Genes Underlying Microgeographic-Scale Local Adaptation in a Wild Arabidopsis Species., **PLoS Genetics**, (2015) 14:11(7):e1005361.
3. Ushio M, Yamasaki E, Takasu H, Nagano AJ, Fujinaga S, Honjo NM, Ikemoto M, Sakai S and Kudoh H, Microbial Communities on Flower Surfaces Act as Signatures of Pollinator Visitation., **Scientific Reports**, (2015) 5: 8695.
4. Nagano AJ, Honjo MN, Mihara M, Sato M and Kudoh H, Detection of plant viruses in natural environments by using RNA-Seq, **Methods in Molecular Biology**, (2015) 1236: 89-98.



(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 4つの国際会議、31の国内会議・学会での招待講演を行った。
- 文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2014.4)を受賞した。
- 「データ科学の発展と植物科学との融合」ワークショップ(2014.11)を企画した。
- 大規模生物現象研究会の立ち上げに参加した。
- さきがけ研究をきっかけに数理工学、非線形物理学、統計学の専門家との本格的な共同研究を始めることが出来た。
- さきがけ研究者交流会で知り合った宇野毅明准教授(情報学研究所)を起点として、情報科学の研究者との交流のきっかけを得ることが出来た。

# 研究報告書

## 「セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の集積・近接化による協働作用の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 平野 展孝

### 1. 研究のねらい

持続可能な低炭素社会の実現は、近年の科学技術における最重要課題の一つである。中でも、再生可能資源であるバイオマスを原料としたバイオ燃料・化成品の発酵生産分野では、可食用デンプン系バイオマスから食糧と競合しない非食用リグノセルロース系バイオマスへの原料転換が急務とされている。リグノセルロース系植物バイオマスから微生物発酵原料(単糖)を得る際の生物系処理ではセルロース/ヘミセルロース分解酵素(糖化酵素)が用いられるが、植物バイオマスでは糖化対象であるセルロース/ヘミセルロース画分が、より強固な高分子リグニンで覆われていることから、セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の協働作用に着目した複合酵素システムの構築が重要と考えられる。本研究では、多種多様な糖質加水分解酵素が骨格蛋白質上に集積・近接化することで酵素活性間に強い相乗効果が生じる好熱嫌気性細菌由来セルロース/ヘミセルロース分解酵素複合体(セルロソーム)を対象に酵素組成—糖化活性相関の解析を行い、その蛋白質工学として、セルロソーム複合体中への異種酵素の導入やセルロソーム酵素組成の改変、及び、セルロソーム複合体の構造構築原理を利用したセルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の集積・近接化による協働作用の創出を目的とした研究を行った。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

セルロソームとは、嫌気性細菌の細胞表層に提示される、多種多様な糖質加水分解酵素が、長大な骨格蛋白質に結合した分子量数百万の巨大酵素複合体である。

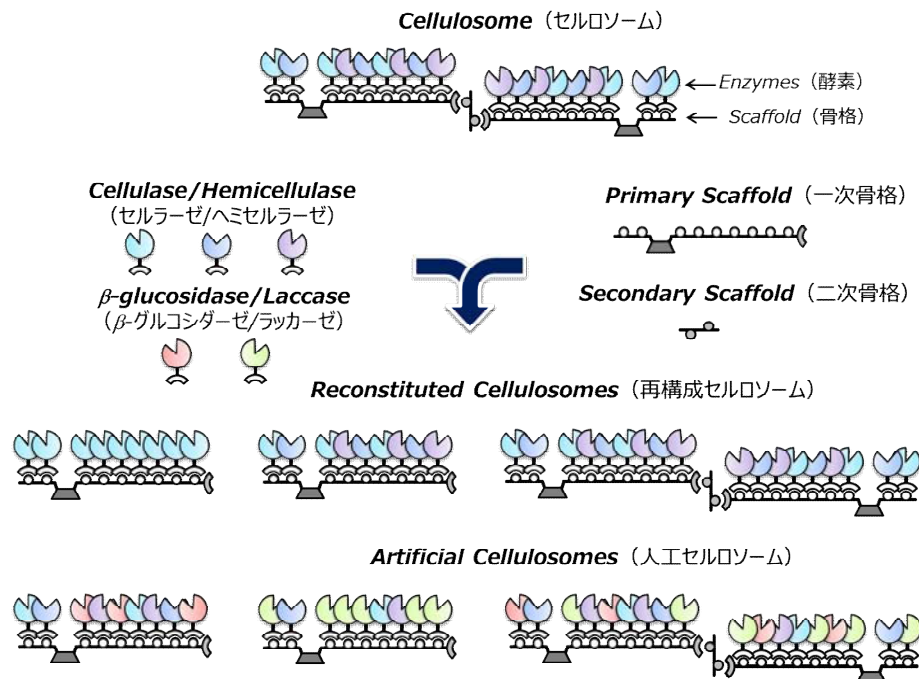
本研究では、高分子量蛋白質の多検体合成に適した小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を用いて、好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* 由来セルロソームの全長骨格蛋白質と 40 種類のセルロソーム酵素因子の多検体合成と、任意酵素組成の再構成セルロソームを用いて、セルロソーム酵素組成—糖化活性相関の解析を行い、複合体中に含まれる酵素種の多様性が、効率的な基質分解に対して極めて重要であることを明らかにした。

また、植物バイオマス分解活性の改善を目的としたセルロソームの蛋白質工学を行い、セルロソーム中に本来存在しないセロビオース分解酵素( $\beta$ -グルコシダーゼ)を複合体化することで、 $\beta$ -グルコシダーゼの添加量を大幅に低減出来ることや、植物バイオマス分解に対して天然型セルロソームの酵素組成よりも適した酵素組成が存在するを見出した。

また、セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素の協働作用の創出を目的として、好

熱好気性細菌由来セルラーゼ/キシラナーゼ/ラッカーゼをセルロソーム骨格上へ集積・近接化したハイブリッド型酵素複合体の構築を行い、植物バイオマス分解に対する最適酵素比率と様々な複合体形成様式を検討した結果、糖化酵素(セルラーゼ/キシラナーゼ)とラッカーゼを骨格上に集積・近接化させることで、リグニン含量の多少に関わらず、植物バイオマス(稲ワラ並びにスギ粉末)分解活性を上昇させることに成功した。

## (2) 詳細



### 再構成セルロソームを用いた酵素組成—糖化活性相関の解析と 異種酵素の複合体化による人工セルロソームの構築

#### 1). セルロソームの酵素組成—糖化活性相関

##### ・一次骨格複合体の解析

好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* 由来セルロソームでは、一次骨格蛋白質に酵素 9 個が結合することで、一次骨格複合体が形成される。

一次骨格複合体の酵素組成—糖化活性相関を解析するため、一次骨格蛋白質とセルロソームの酵素因子 40 種類の多検体無細胞合成と、天然型セルロソームの酵素組成を参考に、酵素の種類を段階的に増やした複合体の試験管内再構成を行い、各種セルロースと植物バイオマス(脱リグニン処理済稲ワラ)の分解活性を測定した。

まず、天然型セルロソームに多く含まれる主要酵素 3 種類と、全長一次骨格(酵素 9 個提示)を用いて、様々な酵素・骨格比率における複合体形成の解析と、各種セルロースに対する複合体の分解活性を測定した。その結果、全長一次骨格から成るセルロソーム複合体の化学量論的複合体形成の証明に成功し、一次骨格上に過不足無く酵素が提示された際に最

も高い結晶性セルロース分解活性が発揮されることを明らかにした(論文発表 1)。

また、無細胞合成系によって全長酵素因子の調製に成功したセルロソームの最大酵素因子の機能解析を行い、複数の触媒ドメインと基質結合ドメインから成る全長酵素因子の基質特異性を明らかにした(論文発表 2)。

次に、異なる炭素源(結晶性セルロースと脱リグニン処理済バイオマス)で培養された際の天然型セルロソームの酵素組成を参考に、酵素組成の異なる複合体の試験管内再構成を行い、結晶性セルロースと脱リグニン処理済稲ワラの分解活性を比較した。その結果、天然型セルロソームの酵素組成は、培養時に炭素源として用いた基質の分解に適しており、酵素種の多様性は、いずれの基質分解に対しても重要である結果を得た。また、結晶性セルロースよりも多様な糖質で構成される稲ワラの分解に対しては、酵素種の多様性がより重要となる結果を得た(学会発表 2)。

#### ・二次骨格複合体の解析

*C. thermocellum* 由来セルロソームでは、酵素9個から成る一次骨格複合体が二次骨格蛋白質に複数個結合することで、更に高分子量の二次骨格複合体が形成される。

二次骨格複合体の機能を解析するため、二次骨格蛋白質 3 種類(一次骨格複合体が 1 個・2 個・7 個結合)の無細胞合成と、二次骨格複合体の試験管内再構成を行い、結晶性セルロース分解活性を測定した。その結果、二次骨格を介した複合体化は、一次骨格を介した複合体化と異なり、結晶性セルロース分解活性に寄与しない結果を得た(学会発表 4)。

## 2). セルロソームの蛋白質工学

#### ・ $\beta$ -グルコシダーゼを含有する人工セルロソームの構築

天然型セルロソームには、セルロースの分解生成物(セロビオース)を、更に分解する酵素活性が存在しないため、基質分解時にはセロビオースによる生成物阻害を受ける。

セルロソームの糖化活性を改善するため、好熱嫌気性細菌由来セロビオース分解酵素( $\beta$ -グルコシダーゼ)を、セルロソーム複体内に様々な比率で導入した際の結晶性セルロース分解活性を測定した。その結果、 $\beta$ -グルコシダーゼを複合体化していない場合と比較して、複合体化した場合は、大幅に少ない $\beta$ -グルコシダーゼ活性量(U)で同等の結晶性セルロース分解活性が発揮出来ることを見出した(学会発表 5)。

#### ・酵素組成を改変した人工セルロソームの構築

脱リグニン処理済バイオマスを炭素源に培養・生産された天然型セルロソームの酵素組成よりも、脱リグニン処理済稲ワラ分解に適した酵素組成が存在するかを検討するため、基質特異性が同定されている酵素因子 30 種類を用いて、天然型セルロソームと大きく異なる酵素組成の人工セルロソームの構築を行い、稲ワラ分解活性を測定した。その結果、セルロース分解酵素に対してヘミセルロース分解酵素を過剰に含む酵素組成で再構成した場合、天然型セルロソームの酵素組成で再構成した複合体よりも、稲ワラ分解活性が上昇する結果を得た。

#### ・セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の協働作用の創出

セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群から成る複合酵素システムを構築するため、糖質加水分解酵素であるセルロース/ヘミセルロース分解酵素(セルラーゼ/キシラナーゼ)と、酸化還元酵素であるリグニン分解酵素(ラッカーゼ)の植物バイオマス分解に対する協働作用の検討を行った。

本来、嫌氣的(還元的)条件下で作用するセルロソーム構成セルロース/ヘミセルロース分解酵素と、好氣的(酸化的)条件下で作用するリグニン分解酵素(ラッカーゼ)では、双方の酵素活性を同時に維持できる条件設定が困難であったため、好氣的(酸化的)条件下で作用する好熱好氣性細菌由来セルラーゼ/キシラナーゼ/ラッカーゼをセルロソーム骨格上に集積したハイブリッド型酵素複合体の構築を行い、脱リグニン処理済稲ワラの分解活性を測定した。

まず、糖化酵素(セルラーゼ/キシラナーゼ)を用いて、複合体内の最適酵素比率を検討した結果、セルラーゼに対してキシラナーゼを過剰に集積する方が、稲ワラ分解活性が上昇する結果を得た(学会発表 3)。次に、ラッカーゼの最適酵素比率を検討した結果、糖化酵素の添加量によって、ラッカーゼの最適酵素比率が大きく異なることを見出した。これらの結果を踏まえ、様々な複合体形成様式の検討を行った結果、糖化酵素とラッカーゼを骨格上に集積・近接化させることで、稲ワラ分解活性を上昇させることに成功した(学会発表 1)。また、ラッカーゼに加え、好熱性セロビオース分解酵素( $\beta$ -グルコシダーゼ)や好熱性キシロオリゴ糖分解酵素( $\beta$ -キシロシダーゼ)に対しても同様の検討を行った結果、稲ワラ分解活性を上昇させることに成功した。これらの知見を基に、稲ワラよりも更にリグニン含量の高いスギ粉末の分解を検討した結果、リグニン含量に大きな違いがあるにも関わらず、稲ワラ分解に対する改善率と同程度の改善を得ることに成功した。

### 3. 今後の展開

セルロソームの酵素組成—糖化活性相関解析と蛋白質工学を通して、セルロソーム複合体を構成する酵素種の多様性が、多様な糖質から構成される植物バイオマスの分解に重要であること、また、天然型セルロソームと異なる人工的な酵素組成によって、植物バイオマス分解活性が更に上昇する可能性を見出した。今後は、これらの知見を基に、本研究を通して調製した酵素 40 種類と骨格蛋白質を用いて、各種脱リグニン処理済バイオマスの分解に最適化した人工セルロソームの構築に取り組む。

また、セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の協働作用の創出に関しては、これらの酵素比率や、セルロース/ヘミセルロース分解酵素(糖化酵素)の集積・近接化が、植物バイオマス分解活性の向上に重要であることを見出した。今後は、植物バイオマス分解活性の更なる改善に向けて、酵素種の多様性を増加させると共に、将来的な実用化の可能性を検証するため、スケールアップと酵素コスト削減に向けた酵素複合体の大量調製と再利用についての検討を行う。

### 4. 評価

#### (1)自己評価

(研究者)

セルロソームの基礎研究においては、無細胞合成系で調製した全長骨格を用いて、セルロソーム複合体の化学量論的複合体形成や、骨格上に過不足無く酵素が提示された際に最大の酵素活性を示すことを証明し、AEM 誌の“Spotlight”に選出された(論文発表 1)。また、酵素の種類を段階的に増やしたセルロソーム複合体の試験管内再構成からは、基質分解に対する酵素種の多様性の重要性など、セルロソームに関する幾つかのコンセプトの証明にも成功し、当該研究分野において一定の成果と評価を得たと考えられる。

セルロソームの蛋白質工学においては、植物バイオマス分解に対して天然型セルロソームの酵素組成よりも適した酵素組成が存在する可能性や、本来、セルロソーム中に存在しない異種酵素(セロビオース分解酵素・リグニン分解酵素)を様々な酵素比率・複合体形成様式で集積・近接化させることで、酵素使用量の低減や、植物バイオマス分解活性を向上する上での基盤となる様々な知見を得た。今後は、本研究で得た知見の実用化の可能性を検証するため、スケールアップや酵素コスト削減に向けた酵素複合体の大量調製や再利用などの研究が必要と考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

平野氏は、本研究で、セルロソーム複合体を再構成し、セルロース、ヘミセルロース、リグニンを分解する効率の良い系を確立することを目的とした。研究の過程で、多くの酵素の無細胞系での発現、セルロソームへの再構成など、セルロソーム活用のための基礎的な知見を得て、それが従来の微生物セルロソームより効率的にバイオマスを分解することを示した。またリグニン分解にはラッカーゼの存在が重要であり、糖化酵素とラッカーゼを同一セルロソーム骨格上に集積・近接化させることで稲わらのみならず、リグニンを含有するスギ粉末の分解活性を上昇させることに成功した。こうした生化学的な研究を着実にやってきたことは評価される。将来こうした技術を実用化するためには、長期的な展望に立って、研究を進めてほしい。実バイオマスをそのまま構成成分に分解できる酵素化学的な技術が開発されれば、バイオマスの利活用はいつそう進展することになる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Hirano, K., Nihei, S., Hasegawa, H., Haruki, M., and Hirano, N.  
Stoichiometric Assembly of the Cellulosome Generates Maximum Synergy for the Degradation of Crystalline Cellulose, as Revealed by *In Vitro* Reconstitution of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome.  
*Appl. Environ. Microbiol.* (2015) 81, 4756-4766.  
“Spotlight” of the Volume 81, Issue 14.

2. Hirano, N., Hasegawa, H., Nihei, S., and Haruki, M.  
Cell-Free Protein Synthesis and Substrate Specificity of Full-Length Endoglucanase CelJ  
(Cel9D-Cel44A), the Largest Multi-Enzyme Subunit of the *Clostridium thermocellum*  
Cellulosome.  
*FEMS Microbiol. Lett.* (2013) 344, 25-30.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 好熱性セルラーゼ/ヘミセルラーゼ/ラッカーゼによるバイオマス分解酵素複合体の構築  
篠田 優<sup>1</sup>, 本田 紘樹<sup>1</sup>, 黒崎 正浩<sup>1</sup>, 白澤 智行<sup>1</sup>, 平野 勝紹<sup>1</sup>, 春木 満<sup>1</sup>, 平野 展  
孝<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>日大・工・生命応化, <sup>2</sup>JST・PRESTO)  
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会  
2015 年 12 月 2 日 神戸ポートアイランド
2. *Clostridium thermocellum* セルロソームの試験管内再構成  
平野 勝紹<sup>1</sup>, 那須 涼介<sup>1</sup>, 田中 清志<sup>1</sup>, 二瓶 哲<sup>1</sup>, 篠田 優<sup>1</sup>, 春木 満<sup>1</sup>, 平野 展  
孝<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>日大・工・生命応化, <sup>2</sup>JST・PRESTO)  
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会  
2015 年 12 月 1 日 神戸ポートアイランド
3. *Thermobifida fusca* 由来糖質分解酵素から成る人工セルロソームによるバイオマス分  
解  
篠田 優<sup>1</sup>, 本田 紘樹<sup>1</sup>, 草野 大貴<sup>1</sup>, 黒崎 正浩<sup>1</sup>, 平野 勝紹<sup>1</sup>, 春木 満<sup>1</sup>, 平野 展  
孝<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>日大・工・生命応化, <sup>2</sup>JST・PRESTO)  
2015 年度日本農芸化学会  
2015 年 3 月 27 日 岡山大学
4. *Clostridium thermocellum* 由来セルロソーム二次骨格の機能解析  
平野 勝紹<sup>1</sup>, 高橋 祐介<sup>1</sup>, 田中 清志<sup>1</sup>, 二瓶 哲<sup>1</sup>, 白澤 智行<sup>1</sup>, 長谷川 裕樹<sup>1</sup>, 篠  
田 優<sup>1</sup>, 春木 満<sup>1</sup>, 平野 展孝<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>日大・工・生命応化, <sup>2</sup>JST・PRESTO)  
2015 年度日本農芸化学会  
2015 年 3 月 27 日 岡山大学

5.  $\beta$ -グルコシダーゼを含有する *Clostridium thermocellum* セルロソームの試験管内再構成  
平野 勝紹<sup>1</sup>, 古内 正紀<sup>1</sup>, 鈴木 優也<sup>1</sup>, 二瓶 哲<sup>1</sup>, 春木 満<sup>1</sup>, 平野 展孝<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>日大・工・生命応化, <sup>2</sup>JST・PRESTO)  
2014 年度日本農芸化学会  
2014 年 3 月 29 日 明治大学

#### 招待・依頼講演

1. 植物バイオマス分解酵素複合体の再構成  
平野 展孝<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>日大・工・生命応化, <sup>2</sup>JST・PRESTO)  
平成 26 年度化学系学協会東北大会 生体分子セッション  
2014 年 9 月 20 日 山形大学工学部

#### 総説・解説

1. 駕籠に乗る人、担ぐ人、そのまた草鞋を作る人  
平野 展孝  
生物工学会誌 (2014) 92, 305.

#### 報道発表

1. 福島民友新聞  
「環境、健康 活用図る」  
2015 年 2 月 17 日
2. 日経産業新聞  
「植物成分、糖に効率分解」  
2012 年 12 月 14 日

#### 展示発表

1. 第 10 回 再生可能エネルギー世界展示会 Renewable Energy 2015 Exhibition  
2015 年 7 月 29 日-7 月 31 日 東京ビッグサイト
2. REIF ふくしま 2014 ふくしま復興・再生可能エネルギー産業フェア 2014  
「科学技術によるグリーン・イノベーションの創出と東日本大震災からの復興・再生に向けて」  
2014 年 12 月 3-4 日 ビックパレットふくしま



3. 第9回 再生可能エネルギー世界展示会 Grand Renewable Energy 2014 Exhibition  
2014年7月30日-8月1日 東京ビッグサイト
  
4. REIF 福島 2013 福島復興・再生可能エネルギー産業フェア 2013  
「科学技術によるグリーン・イノベーションの創出と東日本大震災からの復興・再生に向けて」  
2013年11月6-7日 ビックパレット福島
  
5. REIF 福島 2012 福島復興・再生可能エネルギー産業フェア 2012  
「科学技術によるグリーン・イノベーションの創出と東日本大震災からの復興・再生に向けて」  
2012年11月7-8日 ビックパレット福島

# 研究報告書

## 「雑種強勢の分子機構の解明とその高バイオマス作物への活用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 藤本 龍

### 1. 研究のねらい

植物は、光合成により、大気中の二酸化炭素から糖類などの有機物を合成し、人にとって重要な炭素源の役割を担っている。人は、作物や野菜の物質生産機能の効率化を図り、その生産量の増大に成功してきた。これは、栽培技術や化学肥料の進歩に加え、育種（品種改良）によるところが大きい。

育種により、動植物の収量増加に貢献した遺伝現象としては、雑種強勢（ヘテロシス）がよく知られている。雑種強勢は、同一種内のある特定の両親間の交雑により得られた  $F_1$  個体が、両親の特性よりも優れた形質を示す現象である。多くの穀物や野菜では、雑種強勢を示す  $F_1$  種子を大量に採種し、品種とする一代雑種 ( $F_1$ ) 育種が世界的に行われている。トウモロコシでは、一般品種から  $F_1$  品種の転換が行われた 1940 年代から、1ha あたりの収量が 3 倍以上にもなり、 $F_1$  品種による収量改善効果が著しいことが明らかとなっている。日本国内においても、多くの野菜は一代雑種品種である。雑種強勢は品種育成において重要な現象であるが、未だその分子機構の全貌を理解するには至っていない。

本研究課題では、既に雑種強勢が見られる両親系統の選定が終了しているモデル植物のシロイヌナズナを用いて雑種強勢の分子機構の解明を目指す。シロイヌナズナでは、雑種強勢と両親系統間の遺伝距離には相関がないことが示されている。遺伝子の転写は、ジェネティックな制御だけではなく、エピジェネティックな制御も受けることから、遺伝的に近縁な両親系統間でも、エピジェネティックな修飾状態は多様である可能性が考えられる。シロイヌナズナでは、エピジェネティックな修飾に関わる遺伝子が数多く同定され、また解析方法も成熟していることから、エピジェネティクス研究の基盤が整っている。そこで、本研究では、従来のジェネティックなアプローチに加え、エピジェネティクスにも着目して研究を行う。

また、シロイヌナズナと最も近縁な野菜であるハクサイ (*Brassica rapa* var. *pekinensis*) についても、雑種強勢の分子機構の解明を目指して研究を行う。

本研究課題では、2 種の研究結果を元に、雑種強勢の分子機構の解明を目指し、雑種強勢に関わる領域或は遺伝子の機能を明らかにし、効率的に高収量作物を作出する方法を構築したい。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究課題では、モデル植物であるシロイヌナズナと、その近縁種で、国内の主要な野菜の一つであるハクサイを用いて、遺伝学的な側面とエピジェネティックな側面から解析を行

い、雑種強勢の分子機構を明らかにすることを目的としている。

シロイヌナズナを用いた課題では、以下の2つの内容について取り組んだ。

1. 戻し交雑集団や、染色体置換系統を片親とする F<sub>1</sub> を用いて、シュートサイズと遺伝子型情報を元に、雑種強勢に関わる領域の推定を行った。その結果、染色体の複数箇所の領域がヘテロ接合性を示すことが、雑種強勢の発現に重要であることを明らかにした。
2. Col と C24 系統の遺伝的背景をもつ機能欠失型の突然変異体同士を掛け合わせ、雑種強勢の発現を調べることで、特定の遺伝子或はその遺伝子が制御する現象が雑種強勢に関与するかを調べた。その結果、siRNA の生合成に重要な Pol4 や概日リズムの鍵因子である TOC1 は、雑種強勢には関与しないことを明らかにした。一方、DNA のメチル化の維持に関わる DDM1 の機能喪失は、雑種強勢の発現の低下を引き起こしたことから、DDM1 は雑種強勢に関与する可能性が示唆された。

ハクサイの研究においては、市販の一代雑種品種 'W77' の F<sub>2</sub> 集団を用いた QTL 解析により、収量に関わる領域を同定した。さらに、'W77' と両親系統を用いて、RNA-seq、small RNA-seq、MeDIP-seq、ChIP-seq を行い、両親系統と F<sub>1</sub> で発現量や遺伝子の修飾状態が異なる領域を明らかにした。

## (2) 詳細

### 1. シロイヌナズナの雑種強勢研究

#### 1-1. 分離後代、戻し交雑集団、染色体置換系統を用いた遺伝学的解析

Col 系統と C24 系統の F<sub>1</sub> では、シュートサイズに雑種強勢が見られたが、F<sub>2</sub> 世代あるいは F<sub>3</sub> 集団のシュートサイズの平均値は両親系統と同程度の値を示したことから、分離世代において、シュートサイズを遺伝的に固定することは難しいと考えられた。

戻し交雑集団を利用して、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 集団の中から、植物サイズが大きい個体（雑種強勢が F<sub>1</sub> と同程度、雑種強勢レベル+++）の遺伝子型を決定すると、植物サイズが小さい個体（雑種強勢レベル+）に比べて、全体的にヘテロ接合性を示す領域が多く、幾つかの領域がヘテロ型であると植物サイズが大きくなることを見出した（図1）。

少なくとも染色体1本が C24 系統のホモ型である CSL (Chromosome substitution line) 系統を各染色体について作成した。さらに、Single Seed Descent

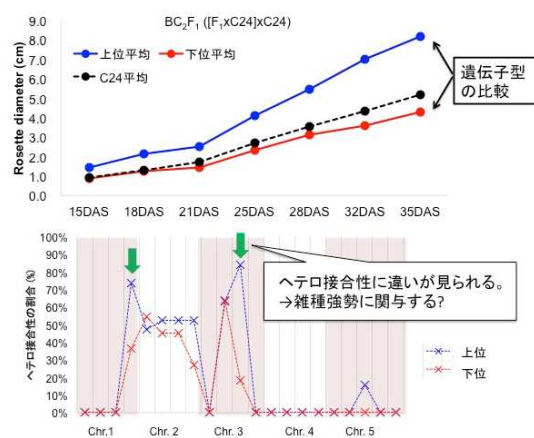


図1. 戻し交雑集団を用いた雑種強勢関連候補領域の特定

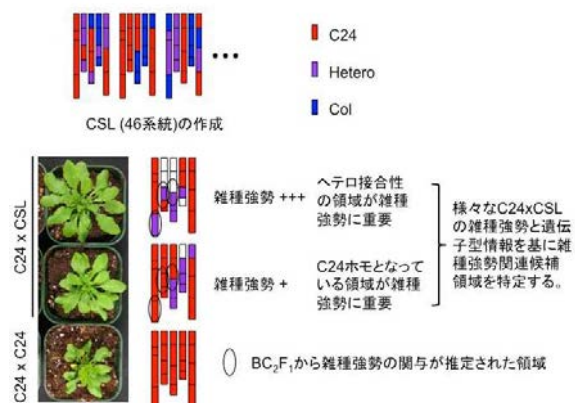


図2. CSLを用いた雑種強勢関連候補領域の特定

法により F<sub>6</sub> 集団から、独立した ~170 系

統の RIL (Recombinant Inbred line) を作成した。様々な CSL 系統と C24 系統を掛け合わせた F<sub>1</sub> の雑種強勢の発現と遺伝子型との関連性を調べた結果、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> の結果から得られた候補領域のヘテロ接合性と雑種強勢の発現に関連性が見られた (図 2)。

## 1-2. 突然変異体を用いたアプローチ

Col 系統と C24 系統の両者で同一遺伝子の突然変異体が存在すれば、その遺伝子やその遺伝子が制御する現象と雑種強勢の関連性を調べることができる。そこで、概日リズムの鍵遺伝子の 1 つである *TOC1*、24nt-siRNA の生合成に関わる *Pol4* の構成遺伝子である *NRPD1a*、DNA の維持メチル化に関わる *DDM1* について、突然変異体同士を掛け合わせて F<sub>1</sub> を作成し、雑種強勢の発現を調べた。その結果、*TOC1* と *NRPD1a* については機能を喪失していても雑種強勢が見られたことから、これらの遺伝子が雑種強勢に関わる可能性は低いと考えられた。

一方、*dmd1* (*d/d*) では雑種強勢の程度が低下した (図 3)。さらに、C24 系統 (*dmd1/DDM1*) と Col 系統 (*dmd1/dmd1*) を掛け合わせた F<sub>1</sub> では、雑種強勢の程度に分離が見られ、植物サイズが大きい個体 (雑種強勢レベル+++ ) の遺伝子型は *dmd1/DDM1* を、植物サイズが小さい個体 (雑種強勢レベル+ ) は *dmd1/dmd1* の遺伝子型を示す傾向にあった。しかし、*dmd1/DDM1* の遺伝子型でも植物サイズが小さい

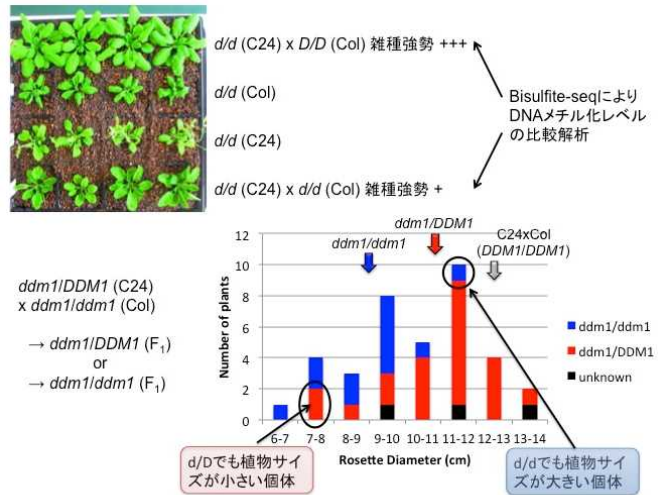


図3. DDM1依存的DNAのメチル化が雑種強勢に関与する?

い個体 (雑種強勢レベル+ ) や、*dmd1/dmd1* の遺伝子型でも植物サイズが大きい個体 (雑種強勢レベル+++ ) が得られた (図 3)。このことから、雑種強勢の発現と *DDM1* の機能喪失とは完全に連鎖しておらず、*DDM1* によって制御される DNA のメチル化等が、雑種強勢を安定的に発揮するのに重要である可能性が示唆された。

また、*Cvi* 系統の遺伝的背景を持つ *dmd1* 変異体を得られたのでそれを Col あるいは C24 系統の *dmd1* 変異体と交配して F<sub>1</sub> を作成した。その結果、Col 系統と *Cvi* 系統の F<sub>1</sub> や C24 系統と *Cvi* 系統の F<sub>1</sub> においても、*DDM1* の機能喪失により雑種強勢の発現が弱くなることが明らかとなった。そこで、4 つのサンプル (1. *dmd1-9* (C24) x *dmd1-1* (Col)、2. *dmd1-9* (C24) x WT (Col)、3. *dmd1-9* (C24) x *dmd1-1* (Cvi)、4. *dmd1-9* (C24) x WT (Cvi)) について、Bisulfite sequencing 解析を行った。*dmd1* がホモ型である 1 と 3 では、*dmd1* がヘテロ型である 2 と 4 に比べて、トランスポゾン領域の DNA のメチル化の低下が確認できた。現在、より詳細な解析を進めている。

## 2. ハクサイの雑種強勢研究

### 2-1. QTL 解析

市販のハクサイ代雑種品種‘W77’では、播種後数日から、最終的な収量に至るまで雑種強勢が現れる。そこで、収量の増加に関わる遺伝子座を明らかにすることを目的に QTL 解析を実施した。まず、QTL 解析の為に DNA マーカーのスクリーニングを行った。既存の SSR マーカーに加え、両親系統の RNA-seq やリシーケンスによって得られた SNP 情報を元に、200 以上の CAPS マーカーを開発した（各染色体 20 マーカー）。これらの DNA マーカーと RAD-seq により、F<sub>2</sub> 集団の遺伝子型判定を実施し、圃場試験による表現型調査の結果を用いて、収量に関わる QTL を検出した。

## 2-2. ハクサイにおけるオミクス解析

‘W77’とその両親系統を用いて、播種後 2 日の子葉と播種後 10 日の本葉を用いてホルモーム解析（43 種類）を実施したところ、播種後 2 日では、F<sub>1</sub> は種子親と植物ホルモンの組成が似ており、播種後 10 日では、F<sub>1</sub> は両親系統のどちらか一方あるいは両親系統の中間値を示し、F<sub>1</sub> のみで顕著に蓄積量が異なるような植物ホルモンは検出されなかった。

‘W77’とその両親系統の播種後 2、4、6 日の子葉、及び播種後 10、14 日の本葉を用いて、RNA-seq を行った。それぞれのステージで F<sub>1</sub> と両親系統で発現が異なる遺伝子が見出されたが、F<sub>1</sub> と両親系統で発現が異なる遺伝子は、ステージ間で重複しておらず、両親系統と F<sub>1</sub> で発現レベルが異なる遺伝子には時期・組織特異性があることが明らかとなった（図 4）。その中でも、Gene ontology 解析の結果、ストレス応答性の遺伝子の発現が F<sub>1</sub> で変化する傾向が見られた。

‘W77’とその両親系統の播種後 2 日の子葉、及び播種後 14 日の本葉を用いて、small RNA-seq を行った。両ステージとも、miRNA の発現量は、両親系統と F<sub>1</sub> で差が見られなかった。siRNA については、両親系統間で発現量が異なる傾向にあった。F<sub>1</sub> で特異的に変化する siRNA も検出されたが、両親系統間での差に比べるとその数は少なかった。

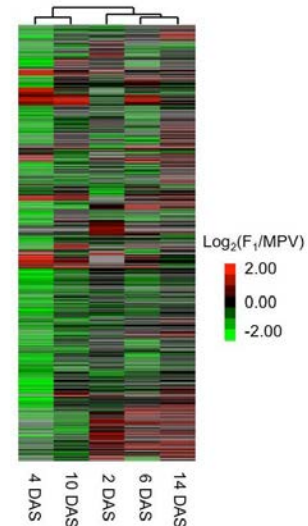


図4. F<sub>1</sub>と両親系統の平均値 (MPV)で発現レベルが異なる遺伝子のクラスター解析

## 2-3. ハクサイにおけるエピゲノム解析

‘W77’とその両親系統の播種後 14 日の本葉を用いて、MeDIP-seq と 4 種類のヒストンメチル化修飾抗体を用いた ChIP-seq を行った。MeDIP-seq では、両親系統と F<sub>1</sub> で DNA のメチル化レベルが異なる領域が見出されたが、F<sub>1</sub> で見られた遺伝子発現の変化との関連性は見られなかった。ヒストンのメチル化修飾においても、両親系統と F<sub>1</sub> で異なる領域が見出されたが、全体の傾向として、F<sub>1</sub> では、ヒストンのメチル化修飾の変化はドラスティックには起こっていないことが明らかとなった。

## 3. 今後の展開

シロイヌナズナの研究においては、雑種強勢に重要な候補領域を同定できたことから、今後更に絞り込みを進めることで、雑種強勢に重要な領域や遺伝子、更には領域間の相互作用を明らかにし、雑種強勢の分子機構の解明へと展開させたい。また、DNA のメチル化が雑種強

勢を安定的に発揮させるのに必要な可能性が出てきたことから、どの領域あるいは遺伝子の DNA のメチル化が雑種強勢の発現の安定性に関与するかを明らかにすることが今後の課題となる。

ハクサイにおいても、両親系統の遺伝的背景は近かったが、RNA-seq やリシーケンスにより、簡便に判別できる DNA マーカーを工夫して作成し、QTL 解析を実施できる準備を整えることができた。今後、QTL 解析やオミクス解析を通して、雑種強勢に関わる遺伝子座や遺伝子を同定する必要がある。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

雑種強勢の現象は昔からよく知られており、多くの研究者が取り組んできた研究課題であるが、未だその分子機構の共通理解には至っていない。シロイヌナズナの研究では、雑種強勢に関わる遺伝子領域が同定できた。また、DNA のメチル化が雑種強勢の安定発揮に関わる可能性を見出した。これらの研究知見は、雑種強勢の分子機構を理解する上で重要な知見となったと考えている。ハクサイにおいては、QTL 解析により、収量に関わる領域を同定できた。この領域は今後の品種育成において重要となる可能性がある。更なる反復実験や検証実験が応用に向けての課題となる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

藤本氏は、アブラナ科植物を用いて、育種学上の大きな課題である雑種強勢の分子機構の解明に取り組んだ。その結果、シロイヌナズナの雑種強勢において DNA メチル化に係わる遺伝子 DDM1 の関与や、特定領域のヘテロ接合性が雑種強勢に重要であることを明らかにした等の成果は評価できる。しかし、当初の計画のハクサイの QTL 解析に関しては収量に関わる領域の特定にとどまっており、雑種強勢との関係に関しては課題が残った。藤本氏の解析の手法が、従来行われていた研究手法の枠をあまり超えなかったのは、やや残念である。このテーマは、一研究者のライフワークにもなるような研究課題であり、この研究を一つの契機として、継続発展させ、雑種強勢の仕組みの解明に迫ってほしい。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Groszmann M, Greaves IK, Fujimoto R, Peacock WJ, Dennis ES (2013) The role of epigenetics in hybrid vigour. Trends in Genetics 29: 684-690.
2. Kawamura K, Kawanabe T, Shimizu M, Nagano AJ, Saeki N, Okazaki K, Kaji M, Dennis ES, Osabe K, Fujimoto R. Genetic distance of inbred lines of Chinese cabbage and its relationship to heterosis. Plant Gene (2016) 5: 1-7

3. Saeki N, Kawanabe T, Ying H, Shimizu M, Kojima M, Abe H, Okazaki K, Kaji M, Taylor JM, Sakakibara H, Peacock WJ, Dennis ES, Fujimoto R. Molecular and cellular characteristics of hybrid vigour in a commercial hybrid of Chinese cabbage. BMC Plant Biology (2016) 16:45

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 藤本龍 アブラナ科植物の種内、種間雑種に見られる非相加的遺伝子発現。日本育種学会第 123 回講演会 2013 年 3 月
2. Kawanabe T, Saeki N, Fujimoto R. Variation of the level of the heterosis among F<sub>1</sub> hybrid individuals in *Arabidopsis thaliana*. 24th International Conference on Arabidopsis Research. June 2013.
3. 川辺隆大、佐伯なつみ、阿部寛史、今野周平、加治誠、岡崎桂一、藤本龍。アブラナ科植物一代雑種品種における両親系統の対立遺伝子間相互作用。日本育種学会第 124 回講演会 2013 年 10 月
4. 川辺隆大、佐伯なつみ、阿部寛史、藤本龍。シロイヌナズナの雑種強勢に概日リズムは関わるか。日本育種学会第 126 回講演会 2014 年 9 月
5. 藤本龍、川辺隆大。アブラナ科の雑種強勢の分子機構の解明を目指した後成遺伝学的なアプローチ。日本遺伝学会第 87 回講演会 2015 年 9 月

# 研究報告書

## 「光合成と連動するバイオポリマー合成系の構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 松本 謙一郎

### 1. 研究のねらい

研究領域の目標である二酸化炭素の資源化を達成するためには、二酸化炭素の固定効率の向上のみならず、固定された炭素源を有用な化合物に変換する合成経路が不可欠である。一般に広く研究されている方法は、植物が光合成で固定化した炭素から合成する糖や油など（植物バイオマス）を前処理したのち、微生物を用いた物質変換を行う、あるいはさらに化学合成を組み合わせる目的物質を合成するものである。合成のターゲットとなる物質には、燃料、化成品原料、高分子などがあり、微生物の種類、微生物内で発現する物質生産関係の酵素群により、合成される物質を制御できる。したがって、微生物細胞内に高付加価値の化合物の合成経路を構築できれば、より有用なプロセスを作ることができる。本研究課題は、遺伝子組換え微生物を用いることにより、材料として利用できるポリエステルを合成すること、とくに、グリコール酸ポリマーを生物合成することを目的とした。グリコール酸ポリマーは、生体適合性と生体吸収性を有することから、医療用材料としても利用される有用なポリマーであるが、現在は石油を原料として化学合成により合成されている。ある種の微生物はポリヒドロキシアルカン酸と呼ばれるポリエステルを合成し、細胞内に蓄積する能力を有するが、これまでにグリコール酸ユニットが含まれたポリエステルを合成する生物は見つかっていない。そこで、ポリヒドロキシアルカン酸の生合成経路を人工的に改変する事で、グリコール酸ポリマーを合成できる経路を作ることを検討した。この生合成系は、ポリヒドロキシアルカン酸の生合成経路をベースにしているため、ポリヒドロキシアルカン酸のモノマーとグリコール酸の共重合した新規ポリマーが得られる点で興味深い。そこで本研究では、この新規グリコール酸ポリマーの効率的合成系を構築するとともに、本ポリマーの熱的・機械的性質などの物性を評価することを検討した。さらに、グリコール酸ポリマーを合成するための遺伝子を構築することができれば、その遺伝子を他の生物に導入して機能させることも可能である。そこで、研究の第二段階では、光合成能力を有する微生物である光合成細菌に、ポリマー生合成系を構築して、二酸化炭素を直接の炭素源としてポリマー合成を行うことを検討した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ポリマー合成系酵素遺伝子群を導入した組換え大腸菌を用いてグリコール酸ポリマーの合成を行った。グリコール酸ポリマーの合成には、グリコール酸モノマーであるグリコリル CoA を合成する CoA 転移酵素、3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) モノマーである 3HB-CoA を合成するベータケトチオラーゼとアセトアセチル CoA レダクターゼ、さらにこれらを重合する重合酵素の4つの酵素が必要である。これらの酵素をコードする遺伝子を導入した組換え大腸菌を、グリコール酸を含む培地で培養することにより、グリコール酸と3HB との共重合体が合成される。予備実験



により、組換え大腸菌を用いてグリコール酸ポリマーを合成することが可能であることは確認されていた。しかし、合成されるポリマー量が極めて微量であったため、合成されたポリマーの物性は不明であった。本研究では、種々の検討の結果、グリコール酸ポリマーの生産性が低くなる原因は、大腸菌の増殖とグリコール酸の細胞内への取り込みが両立していないことであることを見出した。そこで、グリコール酸ポリマー合成のための培養条件を検討することにより、大腸菌が良好に成育し、かつグリコール酸の細胞内への取り込みがスムーズに進行する条件を見出した。本条件を用いることにより、従来法の100倍以上の効率でグリコール酸ポリマーを合成することが可能となった。得られたポリマーは、半透明の伸張性を有するフィルムに加工することができた。透明性の向上とポリマーの融点が低下したことなどから、高分子の結晶化度が低下したことが示され、これはランダム共重合体によく観測される特徴と一致した。加えて、グリコール酸ポリマーは、加水分解性が高いことが知られ、その性質により、生体医療材料として使用されている。3HBのホモポリマーであるP(3HB)は、非酵素的な加水分解がほとんど進行しないが、今回合成した生合成グリコール酸ポリマーは、純水中で分解が進行したことから、グリコリルユニットの導入により、加水分解性が付与されたことがわかった。さらに、光合成細菌でのポリマー合成のため、ポリマー合成系遺伝子群を導入した組換え菌を作成し、ポリマー合成系の構築を行った。この実験については、現在構築作業が継続しているが、代謝中間体をモニターしながら一段階ずつ代謝経路を構築し、テスト系として用いた大腸菌ではポリマー合成系が作動することを確認できた。



生合成グリコール酸ポリマーのフィルム

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「グリコール酸ポリマーの効率的生合成」

研究プロジェクト開始時点で、組換え大腸菌を用いて細胞内でグリコール酸ポリマーを合成できることが確認されていた。しかし、得られるポリマー量は培地1リットル当たり数十ミリグラムであり、通常数グラムのポリマーが得られることと比較して極めて低かった。本研究課題では、生合成グリコール酸ポリマーの生産性を通常のレベルに増加させることを目標とした。最初に成功したグリコール酸ポリマーの合成条件は、脂肪酸の一種であるドデカン酸とグリコール酸を混合して培養するものであった。しかし、宿主として用いた大腸菌は脂肪酸の資化能力が低く、脂肪酸の資化能力を向上させた変異株を用いても、菌の生育は非常に遅くなるのが欠点であった。しかし、酵母エキスなどを含む栄養培地や、グルコースを含む培地など、大腸菌の培養に適した培地では、菌の生育は改善するがグリコール酸ポリマーは合成できな

った。これらの原因として、酵母エキスをを用いた培地では、培地中の窒素源に対する炭素源の量が少ないために、ポリマーの合成が促進されないこと、グルコースを含む培地では、グルコースの存在による代謝抑制(カタボライトリプレッション)が誘導されグリコール酸が大腸菌に取り込まれなくなることが考えられた。この仮説に基づいて、大腸菌の生育とポリマー合成を促進し、かつグリコール酸の取り込みを阻害しない炭素源を用いることを検討した。その結果、グリコール酸ポリマーの生産性を大幅に向上させ、培地1リットル当たり数グラム生産する条件を見出した。これは通常の天然型の微生物産生ポリエステルで得られる生産性と同程度であった。合成されるポリマーの組成は、培地中のグリコール酸濃度により制御でき、最大で 15 mol%まで導入することができた。これらの結果より、生合成グリコール酸の生産性の向上は、概ね目標どおり達成できた。

#### 研究テーマ B「グリコール酸ポリマーの物性評価」

生合成されたグリコール酸と 3HB のランダム共重合体は初めて合成されたポリマーであったため、その物性を調べた。上述した条件で、グリコール酸分率の異なるポリマーを合成し、ソルベントキャスト法でポリマーフィルムを調製した。得られたフィルムは、グリコール酸分率に応じて、白色からわずかに白濁した透明フィルムまで変化した。これらのフィルムは、グリコール酸分率の上昇に伴って融点が低下した。これは、共重合化により、ポリマーの結晶化度・結晶化速度が低下したためと考えられる。3HB ユニットを含むポリマーは、分子鎖の運動性が高いため、結晶化度を低下させると軟質で伸張性のある物性を示すと予想された。実際に、ポリマーフィルムの引っ張り試験を行ったところ、P(3HB)ホモポリマーと比較して伸張性が向上し、伸びる材料になっていた。これらのことから、生合成したグリコール酸ポリマーは、透明度と伸張性を有するポリマー材料として利用できることがわかった。

次にポリマーの加水分解性を評価した。分解性ポリマーには、微生物が分泌するエステル分解酵素などの作用を受けて分解される酵素分解性ポリマーと、酵素が存在しなくても分解が進行する非酵素的加水分解性ポリマーがある。人間の体内などで分解・吸収される生体吸収性材料としての用途では、非酵素的加水分解性が重要な因子となる。P(3HB)は環境中の微生物が分泌する酵素により分解される酵素分解性ポリマーであるが、非酵素的加水分解性は非常に低い。一方、化学合成グリコール酸ポリマーは高い加水分解性を有することが知られていた。生合成グリコール酸ポリマーからエマルジョンを調製し、純水中で一定時間インキュベーションした後の生成物を分析した。その結果、P(3HB)はわずかに分子量が低下したのみで、ほとんど加水分解性を示さないのに対し、グリコール酸ユニットを含むポリマーは可溶化するまで分解され、加水分解性が優位に向上することがわかった。分解産物の詳細な分析により、ポリマーは数量体前後のオリゴマーに分解されており、ポリマー中のグリコール酸ユニットはほぼ分解されていると予想された。生合成グリコール酸ポリマーには、化学合成グリコール酸ポリマーとは異なる構造上の特徴がある。化学的手法で合成されるグリコール酸ポリマーは、グリコール酸の環状二量体であるグリコリドを開環重合して得られる。この重合では、モノマーが二量体であるため、共重合体中を合成した場合、グリコール酸ユニットは必ず二個単位で存在する。一方、生合成グリコール酸ポリマーは、ポリマー鎖中にグリコール酸

ユニット1つずつ存在する。本結果により、本ポリマーの加水分解は、このようなモノマー配列に依存せず進行することがわかった。これらの結果から、生合成グリコール酸ポリマーは、フィルム等に加工でき、加水分解性を有することがわかった。

#### 研究テーマ C「光合成細菌を用いたグリコール酸ポリマーの合成」

植物などの光合成生物は大気中の二酸化炭素を固定し、糖や脂質などの有機化合物を合成する。二酸化炭素を炭素源としたモノづくりでは、光合成で合成された糖や脂質などを出発物質として、微生物発酵、化学変換、あるいはその組み合わせにより、目的化合物を合成する。一方で、遺伝子組換え技術を用いると、光合成生物内の代謝を改変して目的とする化合物を合成することも可能である。本研究課題では、光合成生物の細胞内に新規ポリエステルの生合成系を構築し、光合成の一次生産物を改変することを目的とした。研究開始時には、植物を宿主として使用することを計画していた。しかし、代謝の改変のしやすさと、実験に要する時間を考慮し、宿主を光合成細菌に変更した。

ポリエステルは複数の酵素反応を経て合成される。当然のことながら、このような複数ステップで合成される化合物は、代謝経路の一箇所でも進行しなければ合成されない。したがって、新しい合成経路を構築することを試みる場合、各酵素反応の進行が不確実な状態で、複数の酵素反応を連結して目的物質を合成するのは困難である。この問題を回避するための一つのシンプルな方法として、目的とする経路の上流から一つずつ酵素を発現させ、その反応産物が合成されていることを確認していくことが考えられる。ただし、代謝経路の途中の化合物は、通常細胞外に分泌されず、細胞内の濃度も非常に低い。細胞内の代謝中間体を分析する手法として、液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)を用いる方法がある。LC-MSは複雑な混合物中の目的物質を検出できる強力な手法ではあるが、分析対象が不安定な化合物であることに加え、使用できるカラムや移動相の制限が多く、良好な結果を得るためには、細胞内成分の抽出法、前処理、カラムおよび移動相、質量分析計の設定について、適切な実験条件を見つける必要がある。本研究課題では、大腸菌をモデル系として用い、代謝中間体の分析条件を確立した後に、これを利用して上述したような手法での代謝経路の構築を検討した。その結果、大腸菌内に目的としたポリエステルを合成・蓄積させることができた。この手法を光合成細菌に適用することにより、同様に合成経路を構築できると期待される。本プロジェクトの期間内には、光合成細菌への一部の遺伝子の導入と、一部代謝中間体の検出に成功しているが、目的としたポリエステルの合成は未達成であったため、本項目の達成度は半分程度であった。

### 3. 今後の展開

本研究成果により、生合成グリコール酸ポリマーの生産性が向上し、物性評価が可能となった。本ポリマーは、3-ヒドロキシ酪酸とのランダム共重合体であり、透明性と伸張性を持つ。また、天然の微生物産生ポリエステルと比較して、加水分解性が大幅に向上している。現在は、グリコール酸分率が15モル%までのポリマーが合成できている。今後は、合成条件のさ

らなる改良により、より幅広いグリコール酸分率の共重合体を合成できるようにするとともに、その用途開発にも取り組む。具体的には、本ポリマーの生体適合性の評価と材料開発のため、動物細胞培養系を用いた毒性評価と分解性評価などを行う。光合成によるポリマー生産系については、引き続き代謝経路の構築を進め、二酸化炭素を直接の炭素源としたポリマー合成系の確立を目指す。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

新規グリコール酸ポリマーの合成および物性解析においては、概ね期待通りの結果が得られた。光合成ポリマー合成系の構築については、現時点では未完成であるが、その中間段階として、新規ポリマー合成系を構築するための手法開発と大腸菌における予備実験に成功しているため、今後達成できると期待できる。研究の進め方としては、領域アドバイザーおよび同じ領域内のさきがけ研究者、CREST 研究者との議論を通じて有用な助言が得られたため、当初の研究計画から変更追加した項目もあり、当初計画に拘り過ぎず柔軟に進めた。研究体制は、コアメンバーとして大学院学生1, 2名と実験補助員1名で推進した。とくに一人の学生はポリマー合成系の構築で中心的な役割をはたし、さらに別テーマを担当した大学院生が、LC-MS 分析系の立ち上げに関して重要な貢献をした。一方で、遺伝子構築の配列ミスが遺伝子導入後に見つかり、遺伝子構築をやり直すなど、チェック不足による時間のロスがあったことは反省点である。研究費の使用目的としては、金額として大きいものとしては、実験補助員の雇用費とキャピラリー電気泳動装置(CE)の導入がある。実験補助員は、本プロジェクト期間を通じて、非常に大きな貢献をした。また、CE 装置は、低濃度のグリコール酸を検出するために、非常に有効であった。したがって、研究費は適正にかつ効果的に使用されたと考えている。本研究で得られた成果は、二酸化炭素からより高付加価値の化合物を合成する手法を提供するものであり、新たな生体医療材料の候補となるだけでなく、将来的には、植物バイオマスの有効利用、低炭素社会の実現などに貢献するものと期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

松本氏は、植物などの光合成生物の細胞内で、グリコール酸を直接ポリマーとして変換する経路を確立することを本研究の課題とした。その結果、組換え大腸菌を用いて、キシロースを炭素源として、グリコール酸経由でポリマーを生産する系の確立に成功した。この成果は、植物によるポリマー生産への道筋を付けたという点で評価できる。また、領域内からの多くの助言などを取り入れて研究を進めるなど、研究の進め方が着実であったことは評価したい。しかしながら、これまでの所では、二酸化炭素を材料とした光合成がこの工程の出発点となっていないのは残念である。なお、松本氏は、来年度から、ALCA での研究を実施することになっているが、本研究の成果を生かして、さらに研究を発展させていってほしい。

#### 5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Ken'ichiro MATSUMOTO, Kota TOBITANI, Shunsuke AOKI, Yuyang SONG, Toshihiko OOI, Seiichi TAGUCHI. Improved production of poly(lactic acid)-like polyester based on metabolite analysis to address the rate-limiting step. *AMB Express*. 2014, Vol. 4, 83
2. Toshinori YOKOO, Ken'ichiro MATSUMOTO, Takashi OOBA, Kenjiro MORIMOTO, Seiichi TAGUCHI. Enhanced poly(3-hydroxybutyrate) production in transgenic tobacco BY-2 cells using engineered acetoacetyl-CoA reductase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2015, Vol.3, pp.1-3

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・招待講演

1. 松本謙一郎: “糖質バイオマスを利用した非天然ポリエステル微生物合成”、日本木材学会バイオマス変換研究会夏季講演会「バイオマス変換の研究最前線」、北海道大学農学部、平成 27 年 7 月 11 日
2. K. Matsumoto, M. Miyake, S. Terai, T. Kabe, T. Shiba, T. Ooi, T. Iwata, S. Taguchi: “Production of Unusual Microbial Polyesters”, IPC2014 – The 10th SPSJ International Polymer Conference, Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Japan, 2014.12.2-5.
3. K. Matsumoto, J. M. Nduko, J. Sun, S. Taguchi: “Engineering of Bacteria and pathways toward efficient plastic production from renewable feedstock”, 5th Symposium on Academic Exchange and Collaborative Research, ETH, Zurich, Switzerland, 2014.11.27.
4. K. Matsumoto, J. Sun, T. Ooi, S. Taguchi: “Biosynthesis of polyesters consisting of 2-hydroxyalkanoates and their applications”, ISBP 2014 – International Symposium on Biopolymers, Mendes Plaza Hotel, Santos, Brazil, 2014.09.29.
5. 松本謙一郎、横尾俊憲、大井俊彦、田口精一: “二酸化炭素からプラスチックを合成する人工生命システムの創成 –最短の合成ルートは?–”、日本生物工学会大会シンポジウム、札幌コンベンションセンター、平成 26 年 9 月 9 日
6. 松本謙一郎、森本健二郎、大場貴史、横尾俊憲、田口精一: “微生物産生ポリエステルの植物合成 –植物の脂質代謝系はポリエステル合成に利用できるか–”、第 26 回 植物脂質シンポジウム、北海道大学学術交流会館、平成 25 年 9 月

・研究会の立ち上げ

さきがけ領域内のバイオマス利用に関する研究を展開する研究者で、バイオマス研究会を立ち上げ、これまでに二度の勉強会を企画した。

・学会内での活動

高分子学会:2013-2014 に北海道支部若手研究会の世話人を務め、若手研究者・学生が中心となり研究発表を行う研究会を二度開催した。

生物工学会:2014 年大会では、札幌が会場となり、実行委員および会場係りを担当した。2012 年より教育委員を担当し、学会の刊行物などの編集に協力した。

農芸化学会:2015 年大会では、札幌が会場となり、実行委員を務めた。

・研究事業への応募等

当さがけ研究プロジェクトで得られた結果に基づき、2015 年度 JST 先端的低炭素化技術開発(ALCA)に応募した。