

## 持続可能生存圏開拓診断 (DASH) / 森林バイオマス評価分析システム

### (FBAS) 全国国際共同利用専門委員会

#### 1. 共同利用施設および活動の概要

人類が持続的生存を維持するためには、太陽エネルギーによる再生可能な植物資源によって、食糧生産、資源確保、エネルギー供給を支えるシステムを構築することが、世界的な緊急課題となっている。また地球環境の保全のためには、植物を中心として、それを取り巻く大気、土壌、昆虫、微生物など様々な要素の相互作用、すなわち生態系のネットワークを正しく理解することも必要である。これらは当研究所のミッション1、4、およびアカシアプロジェクトに密接にかかわっている。そして、環境修復、持続的森林バイオマス生産、バイオエネルギー生産、高強度・高耐久性木質生産などを最終目標として、種々の有用遺伝子機能の検証と並び、樹木を含む様々な形質転換植物が作成されている。

こうした研究を支援するため、平成19年度の京都大学概算要求（特別支援事業・教育研究等設備）において、生存圏研究所は生態学研究センターと共同で「DASH システム」を申請し、これが認められて生存圏研究所に設置された。本システムは、樹木を含む様々な植物の成長制御、共生微生物と植物の相互作用、ストレス耐性など植物の生理機能の解析を行なうとともに、植物の分子育種を通じ、有用生物資源の開発を行なうものである。一方、平成18年度より全国共同利用として運用してきたFBASは、前者の分析装置サブシステムと内容的に重複するところが多いことから平成20年度よりDASHシステムと協調的に統合し、一つの全国・国際共同利用として運用することとした。後者は複雑な木質バイオマス、特にリグニンおよび関連化合物を中心として、細胞レベルから分子レベルにいたるまで正確に評価分析する、分析手法の提供をベースとした共同利用研究である。

本システムを構成する主要な機器と分析手法は以下の通りである。

#### 主要機器

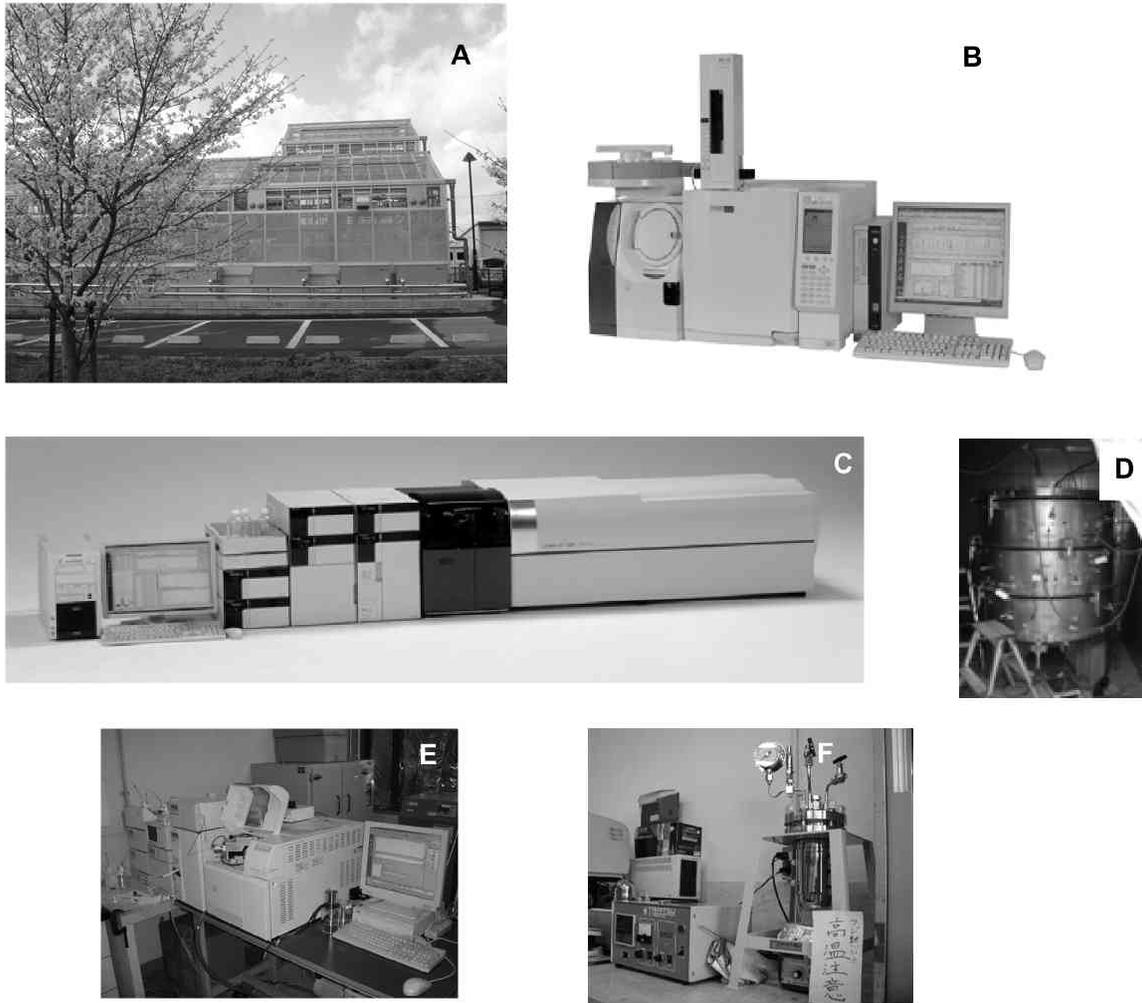
##### ・DASH 植物育成サブシステム

組換え植物育成用（8温室＋1培養室＋1準備処理作業室） [図 A]

大型の組換え樹木にも対応（温室の最大高さ6.9m）

##### ・DASH 分析装置サブシステム

- |                |             |          |
|----------------|-------------|----------|
| 1) 代謝産物分析装置    | LCMS-IT-TOF | 1台 [図 C] |
| 2) 植物揮発性成分分析装置 | GC-MS       | 2台 [図 B] |
| 3) 土壌成分分析装置    | ライシメータ      | 2台 [図 D] |



図：DASH/FBAS 構成機器（抜粋）

・FBAS として共同利用に供する設備

四重極型ガスクロマトグラフ質量分析装置

高分解能二重収束ガスクロマトグラフ質量分析装置 [図 E ]

四重極型液体クロマトグラフ質量分析装置 [図 F ]

ニトロベンゼン酸化反応装置

その他の装置

核磁気共鳴吸収分光装置

透過型電子顕微鏡

主な分析手法

チオアシドリシス、ニトロベンゼン酸化分解（リグニン化学構造分析）

クラークソンリグニン法、アセチルブロマイド法（リグニン定量分析）

## 2. 共同利用研究の成果

共同利用研究の成果の代表的な例として、本年度は遺伝子組み換えユーカリに関する共同利用（学外）と、遺伝子組み換えダイズを用いた機能性物質生産に関する共同利用（所外）の2例を取り上げて後に紹介する。

また共同利用研究活動の中で作成された修士論文、博士論文のリスト、共同利用研究の成果による学術賞および学術論文誌に発表された論文リストは以下のとおりである。

### 共同利用の研究活動の中で作成された修士論文（平成23年度）

- ・ミヤコグサの根粒におけるリンゴ酸輸送体 LjALMT1 の発現と機能（菅 智博）
- ・熱帯樹オオバギのフラボノイド・プレニル基転移酵素の機能解析（清水 亮）
- ・イネ種子を用いた有用ペプチド大量生産システムの構築（恵京敦史）
- ・ダイズ種子における変異導入型 11S グロブリンの蓄積挙動解析（横山和典）
- ・外生菌根菌オオキツネタケの有機酸代謝変動に対するアルミニウム塩の効果（小篠貴臣）
- ・褐色腐朽菌オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) のシュウ酸生合成に及ぼす銅の影響（久森弘道）
- ・*Erianthus ravennae* のリグノセルロース成分の解析（大竹雄一郎）

### 共同利用の研究活動の中で作成された博士論文（平成23年度）

- ・ホップの苦味酸生合成に関わるプレニル基転移酵素に関する研究（鶴丸優介）

### 共同利用研究の成果による学術賞、及び学術論文誌に発表された論文

#### <学会発表>

久森弘道、渡邊知樹、鈴木史朗、大川久美子、酒井温子、吉村 剛、梅澤俊明、銅耐性褐色腐朽菌オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) のシュウ酸生合成におけるオキサロ酢酸加水分解酵素の役割、第62回日本木材学会大会

山村正臣、大竹雄一郎、野田壮一郎、服部武文、高部圭司、鈴木史朗、櫻井望、鈴木秀幸、池正和、徳安健、菊地淳、柴田大輔、梅澤俊明、*Erianthus ravennae* のリグニン及び関連物質の基本的性状と酵素糖化性、第29回日本植物細胞分子生物学会（福岡）大会・シンポジウム

野田壮一郎、鈴木史朗、山口雅利、西窪伸之、櫻井望、服部武文、鈴木秀幸、出村拓、柴田大輔、梅澤俊明、RING finger タンパク質 ATL54 の機能解析、第29回日本植物細胞分子生物学会（福岡）大会・シンポジウム

小柴太一、廣瀬孝江、向井まい、山村正臣、坂本正弘、鈴木史朗、服部武文、梅澤俊明、イネにおけるシリングルリグニン生合成経路の解明、第56回リグニン討論会

山村正臣、大竹雄一郎、野田壮一郎、服部武文、高部圭司、鈴木史朗、櫻井望、鈴木秀幸、池正和、徳安健、菊地淳、柴田大輔、梅澤俊明、エリアンサスのリグニン及び関連物質の量と酵素糖化率の節間変動解析、日本農芸化学会2012年度大会

- 小柴太一、村上真也、向井まい、服部武文、宮尾安藝雄、廣近洋彦、鈴木史朗、坂本正弘、梅澤俊明、イネの *brown-midrib* mutant の解析、植物生理学会 2012 年度大会
- 横山和典、澤田真千子、奥田英子、石本政男、寺川輝彦、内海 成、丸山伸之、ダイズ種子におけるアルツハイマー病エピトープ導入型 11S グロブリンの蓄積挙動解析、日本農芸化学会 2011 年度大会
- 黒田 昌治、斉藤 雄飛、増村 威宏、長岡 利、高岩 文雄、内海 成、丸山 伸之、ダイズベータコングリシニンを大量集積した組換えイネの作出、日本農芸化学会 2011 年度大会
- 恵京 敦史、甘利 芳樹、加藤 直樹、黒田 昌治、長岡 利、高岩 文雄、内海 成、丸山伸之、ラクトスタチン高コピー導入型種子貯蔵タンパク質のイネ種子における集積挙動、日本農芸化学会 2011 年度大会
- Naoki Kato, Yoshiki Amari, Atsushi Ekyo, Cerrone Cabanos, Machiko Sawada, Eiko Okuda, Taro Masuda, Masaharu Kuroda, Satoshi Nagaoka, Fumio Takaiwa, Shigeru Utsumi, Nobuyuki Maruyama, Development of transgenic rice accumulating alpha' subunit of soybean beta- conglycinin in a low glutelin mutant of 'Koshihikari' rice variety, 3rd International Symposium Frontiers in Agriculture Proteome Research
- Masaomi Yamamura, Yuichiro Otake, Soichiro Noda, Takefumi Hattori, Keiji Takabe, Shiro Suzuki, Nozomu Sakurai, Hideyuki Suzuki, Masakazu Ike, Ken Tokuyasu, Jun Kikuchi, Daisuke Shibata, Toshiaki Umezawa, Characterization of lignin and related compounds of *Erianthus ravennae*, 50<sup>th</sup> PSNA Meeting, Hawaii, 2011.
- Toshiaki Umezawa, Safendrii Komara Ragamustari, Tomoyuki Nakatsubo, Eiichiro Ono, Shiro Suzuki, Takefumi Hattori, Stereoselective and Regioselective Control in Lignan Biosynthesis, 2nd ICMP, Jun, 30-Jul, 03, 2011, Qingdao, China
- Taichi Koshihara, Norie Hirose, Mai Mukai, Masaomi Yamamura, Masahiro Sakamoto, Shiro Suzuki, Takefumi Hattori, Toshiaki Umezawa, Syringyl lignin biosynthesis in rice (*Oryza sativa*), 3<sup>rd</sup> International Symposium of Indonesia Wood Research Society, Yogyakarta, Indonesia, Nov. 3-4, 2011

<論文>

- Tsurumaru, Y., Sasaki, K., Miyawaki, T., Uto, Y., Momma, T., Umemoto, N., Momose, M., and Yazaki, K., Characterization of HIPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 417(1): 393-398 (2012).
- Sugiyama, A., Linley, P.J., Sasaki, K., Kumano, T., Yamamoto, H., Shitan, N., Ohara, K., Takanashi, K., Harada, E., Hasegawa, H., Terakawa, T., Kuzuyama, T., Yazaki, K.,

- Metabolic engineering for the production of prenylated polyphenols in transgenic legume plants using bacterial and plant prenyltransferases, *Metab. Eng.*, 13, 629-637 (2011).
- Nakagawa, T., Kaku, H., Shimada, Y., Sugiyama, A., Shimomura, M., Takanashi, K., Yazaki, K., Aoki, T., Naoto, S., Kouchi, H., From defense to symbiosis: Limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-*Rhizobium* symbiosis, *Plant J.*, 65 (2), 169-180 (2011).
- Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Yamamoto, H., Yazaki, K., Molecular characterization of a membrane-bound prenyltransferase specific for isoflavone from *Sophora flavescens*, *J. Biol. Chem.*, 286 (27), 24125-24134 (2011).
- Shitan, N., Kamimoto, Y., Minami, S., Kubo, M., Ito, K., Moriyasu, M., Yazaki, K., A Tolerance gene for prenylated flavonoid encodes 26S proteasome regulatory subunit in *Sophora flavescens*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 75(5), 982-984 (2011).
- Hashimoto, A., Shimono, K., Horikawa, Y., Ichikawa, T., Wada, M., Imai, T., Sugiyama, J. "Extraction of cellulose-synthesizing activity of *Gluconacetobacter xylinus* by alkylmaltoside", *Carbohydrate Research*, 346, no.17, 2760-2768, (2011).
- Muroi, A., Ramadan, N., Nishihara M., Yamamoto, M., Ozawa, R., Takabayashi, J., Arimura, G. The Composite Effect of Transgenic Plant Volatiles for Acquired Immunity to Herbivory Caused by Inter-Plant Communications. *PLOS ONE* 6(10), e24594 (2011)
- Shimoda, T., Nishihara, M., Ozawa, R., Takabayashi, J., Arimura G. (2012) The effect of genetically enriched (*E*)- $\beta$ -ocimene and the role of floral scent in the attraction of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* to spider mite-induced volatile blends of *Torenia*. *New Phytol.*, 193, 1009-1021 (2012).
- Arimura, G., Muroi A., Nishihara M. Plant-plant-plant communications, mediated by (*E*)- $\beta$ -ocimene emitted from transgenic tobacco plants, prime indirect defense responses of lima beans. *J. Plant Interact.*, in press.

<総説>

- 小原一朗、矢崎一史、シソ由来リモネン合成酵素遺伝子を分子ツールにしたユーカリオイルの代謝工学、*におい・かおり環境学会誌*, 42 (4), 248-256 (2011)
- Maruyama, N., Mikami, B., Utsumi, S., Development of transgenic crops to improve human health by advanced utilization of seed storage proteins, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75, 823-828 (2011)
- Hattori, T., Shimada, M., Physiological roles for oxalate metabolism in wood-rotting basidiomycetes, *Advances in Chemistry Research*, Vol. 14 (2012) in press

<著書>

該当無し

#### 共同利用研究の成果の例

##### 1) 有用成分を高効率・高生産する組換え植物作出技術の研究開発

研究代表者：矢崎 一史（京大大学生存圏研究所）

【研究目的と意義】イソプレノイド側鎖を有するプレニル化ポリフェノール（プレニルフラボノイドやプレニルフェニルプロパン等）は、抗腫瘍活性、抗NO産生、抗チロシナーゼ活性等、様々な生理活性を有するものが多い。そのため、機能性食品やサプリメントなどの応用利用が期待され、効率的な生産が望まれている。しかし、これらプレニル化ポリフェノールは天然に存在する量が小さいこと、希少植物を起源とすることが多いこと等から安定供給が不可能であった。本研究では、放線菌や植物由来のプレニル化酵素遺伝子を用いた独自の代謝工学技術により、遺伝子組換え植物を用いてこれら生理活性プレニル化ポリフェノールを大量に生合成・蓄積する基盤技術を確立し、有用物質生産に資することを目的とした。

【研究成果】35S プロモーター制御下で放線菌由来のプレニル基転移酵素2種と TP-NovQ(M)、TP-HypSc、植物由来のプレニル基転移酵素 N8DT を発現させたマイクロトムを作出した。また、E8 プロモーター制御下で N8DT を発現させたマニーメーカーを作出した。このマニーメーカーの成分の分析は年度末までには終了しなかったが、トマトの矮性品種であるマイクロトムにこれらを導入した結果については、終了した。その結果、N8DT を発現させたばかり、予想通り 8-プレニルナリンゲニンが生産されたが、TP-HypSc を発現させたトマトの果実では、3'-プレニルナリンゲニンが検出された。これは本酵素を大腸菌で発現させた時に得られる化合物（6-プレニルナリンゲニン）とは異なっており、宿主生物種に依存した生産物特異性の違いが示唆された。

プレニル化酵素蛋白質の安定性、内在性基質の供給、プレニル化化合物の蓄積パターンを総合的に判断して、コドン改変、プラスチド局在、プロモーターの選択など、プレニル化化合物の生産性に寄与できるプレニル化酵素遺伝子の代謝工学デザインは、ほぼ明確にすることができた。これに関しては、論文として公表した（Sugiyama, A., *et al.*, *Metab. Eng.* 2011）。さらに、新たにイソフラボンの特異的基質とする新規のプレニル化酵素遺伝子 SfG6DT をクララ培養細胞から見出し、論文として報告した（Sasaki, K., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2011）

##### 2) 揮発性物質が媒介する生物間情報ネットワークの解明

研究代表者：高林 純示（京大大学生態学研究センター）

【研究目的と意義】植物が作るテルペンは、抗病虫害活性、抗酸化作用、熱耐性、周囲の草の成長を阻害するアレロパシー作用、環境適応、生物間相互作用に役立つことが知られる。中でも、食害を受けた植物の揮発性物質を介した間接防御システムは、様々な植物が

潜在的に持つ能力であり、害虫の天敵昆虫（捕食寄生者）を誘引して害虫を退治することで害虫密度抑制の役割を果たしている。また害虫の食害によって誘導される揮発性テルペンが植物間のコミュニケーション、いわゆる「植物の会話」の情報伝達物質としても機能することが知られる。従って、テルペンを介した植物の間接防御メカニズムに関する研究は、植物の防御応答や天敵昆虫を介した生態系システムを理解し、環境にやさしい害虫防除技術を開発する上で不可欠である。

本研究では、揮発性テルペンであるオシメンの生合成遺伝子を恒常的に発現させた組換えタバコ、トレニアを用いて、この組換え植物が放出する香り成分が害虫の活動を抑制する直接防衛、および害虫を捕食、減少させる天敵生物を誘引する間接防衛、植物間の相互作用に与える影響に注目した。昆虫の行動解析などの操作実験を、DASH（植物育成サブシステム）システムを用いて解析ことを目的とした。

【研究成果】オシメンの生合成遺伝子を恒常的に発現させた組換えトレニアを用いて、トレニア-ハダニ（植食者）-カブリダニ（捕食性天敵）の三者間相互作用系における組換え植物由来の揮発性物質の影響を解析した。異なる2トレニア品種（サマーウェーブ（SWB）：*Torenia hybrida*、クラウンミックス：*T. fournieri*）を用いて、ハダニ食害によって誘導される揮発性物質の化学分析を行った結果、SWB種のみが食害に応答して、カブリダニを誘引する揮発性物質を放出した。組換え植物から放出されるオシメンは、単独ではカブリダニを誘引する能力はないものの、ハダニに加害されたSWB種から放出される揮発性物質と混ざることによって、誘引効果を促進した。しかも、その促進効果は花卉植物であるトレニアの花の香りが混ざった場合には完全に阻害されるが、花の香り自身にはカブリダニの忌避効果は無いことも見出された。

さらに、植物育成サブシステム内での遺伝子組換え植物の有用性の評価を目指した組換えタバコを用いた研究では、これまで報告のない3植物者間による植物-植物-植物間コミュニケーションの発見につながった。室内と温室レベルで得られた本研究の結果は、組換え植物から放出される揮発性物質の生態系相互作用における複雑な作用を示唆するもので、今後の天敵を介した害虫防除技術を開発に資するものである。これらに関しては、論文にまとめて投稿した（Muroi *et al.*, PLoS One, 2011; Shimoda *et al.*, New Phytol., 2011; Arimura *et al.*, J. Plant Interact., in press）。

### 3. 共同利用状況

平成17年度から21年度に渡って共同利用状況については以下の通りである。本全国共同利用設備は、平成18年度と19年度FBASとして共同利用を開始した。その後平成19年度の京都大学概算要求にてDASHの設置が認められた。内容的に両者で重複する部分が多かったため、平成20年度からは両者を融合してDASH/FBASとして全国共同利用の運用をしている。

表1：DASH/FBASの利用状況

年度	平成17年	平成18年 FBAS	平成19年 FBAS	平成20年 DASH/FBAS	平成21年 DASH/FBAS	平成22年 DASH/FBAS	平成23年 DASH/FBAS
採択課題数		8	8	15	22	17	17
共同利用者 数(延べ人 数)**		25	45	97	129	95 (学内68 学外27)	86 (学内58 学外28)

\*：共同利用者数は各課題の研究代表者と研究協力者の延べ人数

#### 4. 専門委員会の構成及び開催状況（平成23年度）（18名）

平成24年1月現在の専門委員会を構成する委員名・所属先は以下の通りである。

矢崎一史（生存圏研究所・委員長）、西谷和彦（東北大学大学院）、村中俊哉（大阪大学大学院）、重岡成（近畿大学）、太田大策（大阪府立大学大学院）、松井健二（山口大学大学院）、柴田大輔（財団法人かずさDNA研究所）、明石良（宮崎大学）、青木俊夫（日本大学）、河合真吾（静岡大学）、高林純示（生態学研究センター）、大串孝之（生態学研究センター）、塩谷雅人（生存圏研究所）、渡邊隆司（生存圏研究所）、梅澤俊明（生存圏研究所）、山川宏（生存圏研究所）、黒田宏之（生存圏研究所）、今井友也（生存圏研究所）

平成23年度の専門委員会は、共同利用申請課題の審査、採択に関して、メール会議にて開催した。主な開催日は以下の通りである。

平成23年4月15日 植物培養室の運用について

平成24年1月31日 申請研究課題の審査依頼

#### 5. 特記事項

この年度の特記事項として、DASH分析サブシステムのLC-IT-TOFについて、3年に1回必要とされる大掛かりなメンテナンスを行ったことが上げられる。この分析機器のスペックを維持するためには、3年に1回、ターボポンプ等の一斉交換が必要とされ、毎年定額では賄えない維持管理上の問題がある。幸いに、他に大きなトラブルがなかったことに加え、全所的な理解とサポートが得られたため、必要とされるメンテナンスを行うことができた。次は3年後に向けての対策が必要となる。

第二に、耐震改修の第4工区が完成したことを受け、全国共同利用対応としてDASH植物育成サブシステムの拡充を目的に、本館北等に植物培養室（N565）を設置した。こちらはDASH温室側に設置してある植物培養室とは異なった運用方法を考えている。

その他の事項としては、樹木用の温室D室に足掛け3年間遺伝子組換えユーカリを育成していたプロジェクトが終わり、今年度からは遺伝子組み換えポプラを育成する新規プロジェクトを採択した。DASH温室の最も大きな特徴とも言うべきD室の外観がこれにより変わった。