

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	山本 千莉
論文題目	Generation and biomass characterization of engineered rice with altered cell wall cross-linking structure (細胞壁架橋構造を改変した形質転換イネの作出とバイオマス特性評価)		
(論文内容の要旨)			
単子葉類イネ科植物は、木質バイオマス生産性に優れた大型イネ科植物や、農業残渣として木質バイオマスを副生する穀類や糖作物を含み、樹木とともに、持続型社会構築を担う木質バイオマス供給源として重要な植物グループの一つである。イネ科植物は、様々な組織にフェルラ酸（FA）誘導体を蓄積し、特に木質バイオマスの大部分を占める二次細胞壁中では、FAがヘミセルロースおよびリグニン分子間を連結する架橋点として機能する。このようなFAを介した架橋構造（FA架橋構造）は、イネ科植物における細胞壁の機能発現やバイオマスとしての利用性に大きく寄与していると考えられているが、その形成機構及び特性については不明な点が多い。本研究では、イネ科植物におけるFA架橋構造の形成機構と特性を解明し、イネ科バイオマスの利用特性向上のためのバイオテクノロジー技術への応用の可能性を探索することを目的として、以下の研究を行なった。 （１）第一章では、FA架橋構造の形成機構の解明を主な目的として、イネ（<i>Oryza sativa</i> L.）におけるヒドロキシケイ皮アルデヒドデヒドロゲナーゼ（HCALDH）の機能解析を行なった。フェニルプロパノイド生合成酵素であるHCALDHは、双子葉類シロイヌナズナの花茎に蓄積するFA誘導体の生合成に寄与することが示されているものの、単子葉類イネ科植物を含む他の植物種における機能は不明であった。イネのHCALDHホモログの遺伝子発現解析を行なったところ、<i>OsHCALDH2</i> 及び<i>OsHCALDH3</i>が細胞壁形成と連動して強く発現していることが分かった。CRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集により、<i>OsHCALDH2</i>及び<i>OsHCALDH3</i>を破壊したHCALDH欠損変異イネ株を作出し、その細胞壁の化学構造を各種化学分析や二次元核磁気共鳴（NMR）スペクトル法を用いて解析したところ、HCALDH欠損変異イネ株では、細胞壁結合同型FAの含有量が、野生株と比較して最大で45%減少していた。さらに、HCALDH欠損変異イネ株では、細胞壁結合同型FAの減少とともに、細胞壁結合同型<i>p</i>-クマール酸及びシナップ酸の含有量も減少していた。これらの結果から、HCALDHが、イネのFA架橋構造を含む細胞壁結合同型ヒドロキシケイ皮酸類の生合成に寄与することが示された。一方、HCALDH欠損イネ株の種子におけるフェルロイルステロール類（γ-オリザノール）の含有量に大きな変化は見られなかったことから、HCALDHの種子γ-オリザノールの生合成に対する寄与は小さいことが示唆された。さらに、HCALDH欠損イネ株は、野生株と比較して高いバイオマス糖化性を示した。以上の結果から、HCALDHがFA架橋構造の改変によるイネ科バイオマスの利用性向上に有効な育種ターゲットとなることが示された。 （２）第二章では、FA架橋構造の増強によるバイオマス特性の向上を目指して、HCALDH過剰発現イネの作出を行った。FA架橋構造は、比較的温和なアルカリ処			

理などにより開裂できるエステル結合を有することから、特定のバイオマス分解条件下においては、その増強が有利に作用することが示されている。また、FA架橋構造や種々のFA系代謝物の増強は、バイオマスの機械特性や有用代謝産物生産性の向上につながる可能性もある。第一章で同定した*OsHCALDH3*を恒常発現プロモーター (*proPmubi1*) または細胞壁組織特異的発現プロモーター (*proOsC4H1*) 制御下で発現するコンストラクトを用いてイネの形質転換を行った。スクリーニングの結果、茎の細胞壁結合型FAの含有量が10–16%増加した*HCALDH*過剰発現株を得た。細胞壁結合型FAの増強には、特に*proOsC4H1*による*HCALDH*過剰発現が有効であることが示唆された。一方、*proOsC4H1*と*proPmubi1*のいずれを用いた場合も、種子 γ -オリザノール含有量が増加した系統は得られなかった。以上の結果から、*HCALDH*の過剰発現が、種子 γ -オリザノールの増強には改良が必要であるものの、細胞壁結合型FAの増強に有効であることが示された。

(3) 第三章では、FA架橋構造やリグニンの芳香核構造が細胞壁の機能・特性の基盤となるリグノセルロース超分子構造に及ぼす影響を解明するため、FA架橋構造及びリグニン芳香核組成を改変した形質転換イネ株における細胞壁の固体高次構造の比較解析を行った。固体NMR法 (CP/MASスペクトル解析及びスピン格子緩和時間測定) と広角X線回折法を用いた解析から、FA架橋構造の形成を抑制したイネ株の細胞壁において、セルロースの結晶性の低下と分子運動性の上昇が認められた。さらに、小角X線散乱法を用いた解析から、FA架橋構造の形成を抑制した一部のイネ株において、セルロースミクロフィブリル (CMF) の配向や分布に乱れが生じていることも示唆された。一方、リグニン芳香核組成を改変したイネ株では、セルロースの結晶性及び分子運動性、CMFの配向及び分布に大きな変化は認められなかった。また、FA架橋構造の形成を抑制したイネ株が、野生株やリグニン芳香核組成を改変したイネ株と比較して、より高いバイオマス糖化性を示すことも分かった。以上の結果から、イネ細胞壁中のリグノセルロース超分子構造の形成と分解に、FA架橋構造が大きく寄与していることが示された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

単子葉類イネ科植物は、樹木とともに、持続型社会構築を担う木質バイオマス供給源として重要な植物グループである。イネ科植物では、フェルラ酸(FA)を介したリグノセルロース成分間の架橋によって細胞壁が物理的・化学的に強化されていることが古くから知られているが、そのようなFAを介した架橋構造(FA架橋構造)の形成機構や細胞壁の特性に及ぼす寄与については多くが未解明である。本論文は、モデル植物としてイネを用い、FA架橋構造の形成機構と特性の解明、さらに、代謝工学によるバイオマス利用性の向上を目指した一連の研究成果を纏めたものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. ヒドロキシケイ皮アルデヒドデヒドロゲナーゼ(HCALDH)がイネにおけるFA架橋構造を含む細胞壁結合型ヒドロキシケイ皮酸類の生合成に寄与することを明らかにした。
2. ゲノム編集技術を用いたHCALDH遺伝子の機能破壊により、FA架橋構造を部分的に失い、バイオマス糖化性が向上したイネ変異株を作出した。さらに、HCALDH遺伝子の過剰発現により、バイオマスの化学分解特性の向上が期待されるFA架橋構造が増強された形質転換イネ株を作出した。
3. FA架橋構造やリグニンの芳香核組成を改変した一連の形質転換イネ株における細胞壁の固体高次構造及び分解特性の比較解析を通じて、FA架橋構造が階層的なリグノセルロース超分子構造の形成とその分解特性に大きく寄与していることを分子レベルで明らかにした。

以上のように、本論文は、イネにおけるFA架橋構造の形成に寄与する代謝経路を明らかにし、その代謝工学的制御によって、バイオマス利用性が向上した一連の形質転換イネ株を作出するとともに、リグノセルロース超分子構造の形成と分解に及ぼすFA架橋構造の寄与を分子レベルで明らかにしたものである。本論文の成果は、植物生化学、植物代謝工学、木質科学、作物育種学の基礎及び応用利用研究の発展に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和7年1月24日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)