

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	武田 ゆり
論文題目	Generation of transgenic rice with altered lignin composition and comparative characterization of their biomass utilization properties (リグニン組成を改変した形質転換イネの作出とそのバイオマス利用特性の評価)		
(論文内容の要旨)			
環境に調和した循環型社会の構築に向けて、リグノセルロース（木質）バイオマス資源の有効利用が求められている。樹木は、建材や紙・パルプの原料として重要である。一方、ソルガム、さとうきび、エリアンサスなどのイネ科バイオマス植物は、樹木の数倍～10倍もの高いリグノセルロースバイオマス生産性を示すことから、バイオマス由来化成品やバイオ燃料の生産拡大を担う新たな持続的バイオマス供給源として注目されている。 リグノセルロースバイオマスの15-30%の重量を占めるリグニンは、芳香核構造・モノマー間結合様式組成の異なる3種のH型、G型及びS型リグニンから構成されている。リグニンのH/G/S組成は、リグニンの諸物性や化学反応性を決定づける重要な因子であり、バイオマスの利用特性にも多大に影響すると考えられている。従って、代謝工学によるリグニンのH/G/S組成の改変により、バイオマス利用特性を向上させた植物の作出が可能と期待される。しかし、従来のリグニンの代謝工学研究では、イネ科植物とはバイオマス構造の大きく異なる双子葉植物がモデルとして使用されており、リグニンのH/G/S組成が高度に制御されたイネ科植物の報告例はこれまでにない。さらに、イネ科リグノセルロースバイオマスにおけるリグニンのH/G/S組成と各種利用特性の相関についても未解明である。 本論文では、イネ科植物のモデルとしてイネを用い、リグニンのH/G/S組成を従来より高度に制御した新たな形質転換体を作成した。次いで、その特性を評価することにより、イネ科バイオマスの各種利用特性に及ぼすリグニン芳香核組成の寄与に関する新知見を得た。その主な内容は以下の通りである。 (1) リグニン前駆体（モノリグノール）生合成経路における、G型芳香核からS型芳香核への変換に関わる芳香核水酸化酵素 <i>CAld5H</i> に着目し、イネ <i>CAld5H</i> (<i>OsCAld5H1</i>) をRNAi法で発現抑制させた形質転換イネ、及び改変ユビキチンプロモーターの制御下で<i>OsCAld5H1</i>過剰発現させた形質転換イネを作成した。次いで、得られた形質転換株につき、各種化学分析法と多次元NMR法を用い、リグニンの構造解析を行った。その結果、RNAi抑制株ではG型リグニン、過剰発現株ではS型リグニンの構成比が野生株に対して大きく増大していることを見出し、イネにおけるG型及びS型リグニンの増強に<i>OsCAld5H1</i>の発現制御が有効であることを示した。 さらに、<i>OsCAld5H1</i>の機能欠損の効果を検証するため、CRISPR/Cas9ゲノム編集法による<i>OsCAld5H1</i>機能欠損変異株の作出と特性解析を行った。その結果、前述の			

RNAi抑制株と同様、CRISPR/Cas9変異株においてG型リグニンの構成比が野生株に対して増強されているものの、なおS型リグニンが残存していることを認めた。更なる詳細なリグニン構造解析と遺伝子発現解析に基づき、従来から知られているCald5H関与のS型リグニン生成経路とは全く異なる新規な経路、すなわち、イネ科植物に特有のアシル化されたS型リグニンの生成に対する新規な生合成経路の存在が強く示唆された。

(2) H型リグニンの増強を目指し、モノリグノール生合成経路上のH型前駆体からG型及びS型前駆体への変換に関与する水酸化酵素C3'HをコードするイネC3'H (*OsC3'H1*) のRNAi抑制株ならびにCRISPR/Cas9機能欠損変異株の作出と特性解析を行った。その結果、各形質転換株において、H型リグニンの構成比が野生株に対し大きく増大しており、イネにおけるH型リグニンの増強に*OsC3'H1*の発現抑制が有効であることを示した。また、前述の*OsCald5H1*抑制株の解析結果に加え、*OsC3'H1*発現抑制株のリグニンの詳細構造解析に基づき、Cald5HやC3'Hの関与しない新規経路、すなわち、イネ科植物特有のアシル化されたG型及びS型リグニンの生成に寄与する新規な代謝経路の存在を明らかにした。また、RNAi抑制株は顕著な成長性の異常は示さないものの、CRISPR/Cas9変異株は著しい矮化、地上部及び根における組織構造の異常や異所的な木化、遺伝子発現異常などを示すことを明らかにした。

(3) 上記の研究で得られたリグニン改変形質転換イネ株について、各種バイオマスの反応特性及び利用特性の比較評価を行った。未処理ならびに希アルカリ、希酸、加圧熱水処理試料のバイオマス構造解析から、リグニンの各芳香核種の化学反応特性の違いに関する知見を得た。また、酵素糖化性試験より、H型及びS型リグニンの増強が、各種前処理法を組合せたバイオマス酵素糖化反応効率の向上に寄与することを見出した。一方、発熱量については、今回用いたイネバイオマス試料においては有意な違いは認められなかったものの、人工リグニンを用いた発熱量の解析から、H型及びG型リグニンの増強がバイオマス発熱量の向上に有効となり得ることも明らかとなった。

本論文は、分子育種を通じた大型イネ科バイオマス植物の利用性向上への基盤となると共に、本論文で作成されたリグニン改変イネ株は、バイオマスの利用特性のみならず細胞壁特性や植物生理に及ぼすリグニンの寄与を明らかにするための有用な研究材料となり得る。

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)

環境に調和した持続型社会の構築に向けて、リグノセルロースバイオマス資源の有効利用が求められている。特に、ソルガムやエリアンサスなどの大型イネ科バイオマス植物は、そのバイオマス生産性の高さから特に注目を集めている。本論文では、大型イネ科植物の利用性向上への基盤構築として、イネをモデル植物として用い、イネ科植物において初めてリグニンの芳香核組成を高度に制御した形質転換体を作出した。次いで、得られた形質転換植物を用いた各種バイオマス利用特性の比較解析を通じて、イネ科バイオマスの各種利用特性に及ぼすリグニン芳香核組成の寄与を明らかにした。評価すべき点は以下の通りである。

1. イネCald5H及びC3'Hの発現制御により、H型、G型及びS型リグニンがそれぞれ増強された形質転換イネ株の作出に成功した。
2. イネ科植物特有のアシル化されたG型及びS型リグニンの生成に寄与する、Cald5H及びC3'Hが関与しない新規な代謝経路の存在を見出した。
3. 形質転換イネ株の利用特性解析などを通じ、リグニンの各芳香核種の反応性の違いを見出すとともに、H型及びS型リグニンの増強が各種前処理法を組合せたバイオマス酵素糖化反応の効率向上に、また、H型及びG型リグニンの増強がバイオマス発熱量の向上に有効となり得ることを実証した。

以上のように、本研究成果は、植物代謝工学、木質科学及び植物生理学の基礎及び応用利用研究の発展に寄与するところが多い。

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、平成31年2月14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）