

木質バイオマス改変に向けた *Lac-CBD* 融合遺伝子導入ポプラの作出

吉川 樹 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小口 太一 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景】

今日の人類の発展は、化石資源の利用によるところが大きい、環境意識の高まりからクリーンで持続可能な資源利用への転換への期待が高まっている。リグノセルロースバイオマスはイネ科植物の葉や樹木の幹など存在量が大きいこと、加えてそれらは食料と競合しないことから、新たな化石資源の代替資源として注目される。しかし、リグノセルロースは既に利用が進められている他のバイオマスと比べて前処理や糖化処理等の利用に関するコストが高く、実用への障壁になっている。リグノセルロースバイオマスを利用するためには、リグニンを除去する必要があるがリグニンの除去にはコストや環境負荷がかかる。そこで、本研究ではリグニンの除去を必要としない、リグノセルロースを改変した植物の開発を目指した。

*Lac-CBD* 融合遺伝子は、*Trametes versicolor* 由来のリグニン分解酵素であるラッカーゼ (*Lac*) と *Clostridium cellulovorans* 由来のセルロース結合ドメイン (*CBD*) を連結した融合遺伝子である。*Lac-CBD* 融合酵素はリグノセルロース中のセルロース近辺のリグニンのみを分解することが期待され、その結果として、脱リグニン処理なくとも酵素による糖化が可能なリグノセルロースを与えると仮説した。先行研究において、*Lac-CBD* 融合遺伝子の導入は、イネ (*Oryza sativa*) やシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において、生育や形態の変化を与えることなく、非脱リグニン処理条件における酵素糖化効率の改善が報告されている。

本研究では、リグノセルロースの酵素糖化性改良における *Lac-CBD* 融合遺伝子の樹木での有効性の検証を目的とし、樹木のモデル植物であるポプラを宿主として *Lac-CBD* 融合遺伝子導入形質転換体の作成を試みた。

## 【材料】

## ● 植物

ポプラ T89 系統 (*Populus sieboldii* × *P. tremuloides*) を利用した。底面の直径 9 cm 高さ 14 cm のポットに 1/2 MS + 1% sucrose + 0.1% PPM + 2.7 g/L Gellan Gum の培地を加え、挿し木を行い、25°C, 16h Light/8h Dark で制御された培養室で培養し、2 か月おきに継代した。形質転換には高さが 14 cm に達した植物体の葉と腋芽を含まない茎を利用した。

## ● 導入コンストラクト

先行研究 (R, Iiyoshi *et al.*, 2017) で用いられた pTF012 プラスミドベクターを使用した (図)。



図 pTF012 ベクターの T-DNA 領域の模式図

## 【方法】

## ◆ 形質転換体の作成

形質転換は、Nilsson の方法を参考とした (Nilsson, O. *et al.*, 1992)。アグロバクテリウムの感染は、外植片を 25 μM カナマイシン (Km) 及び 25 μM ストレプトマイシンを含む YEB 液体培地で 2 夜培養したアグロバクテリウムを懸濁した MS 液体培地中で 0.5-2h 振盪することで行った。シュート誘導培地 (MS + 2% sucrose + 0.2 mg/ml BAP + 0.2 mg/ml IBA + 0.01 mg/ml TDZ) にて暗所で 2 日間共存培養後、オーグメンチンを含む滅菌水で洗浄し、新たなシュート誘導培地に静置した。2-3 週間後、シュートが誘導された外植片はシュート伸長培地 (MS + 2% sucrose + 0.2 mg/ml BAP + 0.2 mg/ml IBA) に移植した。さらに 1 ヶ月ほど培養し、3 cm 程度に達したシュートは外植片から切り離し、発根培地 (MS + 2% sucrose) に移植した。なお、滅菌後の培地には Km25 mg/L とオーグメンチン 250s 1 錠/L を加えた。

## ◆ 導入遺伝子の有無の確認

再分化シュートよりゲノム DNA を抽出し、PCR により導入遺伝子断片 (35S プロモーター領域等) を増幅することで遺伝子が導入されているか確認を行った。対照として、ポプラ内在性遺伝子である *eIF4A* 遺伝子の部分断片に対する増幅を対象とした。

## 【結果】

## ➤ 再分化効率の確認

ポプラ形質転換系を導入するにあたり、初めに細分化効率の測定を行った。アグロバクテリウムに感染させずに再分化を誘導した場合、全ての外植片でシュートが誘導された (n=58)。また、発根培地に移植したすべてのシュートで発根が確認できた (n=17)。

## ➤ 形質転換

pTF012 ベクターを持つアグロバクテリウムの感染により、22 のカナマイシン耐性系統を得た (約 47%)。最終的に発根が確認できた系統 9 系統を得た。

## ➤ 遺伝子導入の有無の確認

現在、発根系統 9 系統について、PCR による導入遺伝子の確認を進めている。

## 【考察・展望】

カナマイシンが添加された選抜培地で発根した個体は形質転換体であると考えられ、この個体を 9 系統得ることが出来た。これらの系統が形質転換体であることを支持するため、PCR により導入遺伝子を確認することが現在の課題である。

導入遺伝子が確認できた後は、系統の維持と形質転換体の評価を行う必要がある。評価は導入遺伝子が植物体の生育や形態に悪影響を与えないかという点と非脱リグニン条件において酵素糖化効率の改善がみられるかという点に関して行うことを計画している。