

Lac-CBD 導入遺伝子組換えポプラバイオマスの酵素糖化性の評価

高野 俊介 (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・目的】

世界的な気候変動への対策として、CO₂排出量削減が急務である。植物バイオマスは化石資源の代替として期待され、その中でも木質バイオマスは賦存量が大きく、かつ食料生産とも競合しないことから魅力的な資源である。しかし、木質バイオマスの主体を成すリグノセルロースバイオマスはリグニンの除去のための前処理、糖化处理等に要するコストがネックとなり、実用化が進んでいない。そこで、リグニンの除去工程を必要としない、リグノセルロースを改変した植物の開発を目的が望まれている。

Lac-CBD 融合遺伝子は、カワラタケ *Trametes versicolor* 由来のリグニン分解酵素であるラッカーゼ (*Lac*) とセルロース分解菌 *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 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部分的に分解し、脱リグニン処理を要しないリグノセルロースバイオマスが得られると仮説に基づき設計された。これまでに、Lac-CBD 融合遺伝子の導入により草本では酵素糖化性が向上することが確認されたが、樹木における事例はない。本研究では、Lac-CBD 融合遺伝子の樹木での有効性の検証を目的とし、Lac-CBD 導入組換えポプラの特性評価を行った。

【材料】

■植物材料

ポプラ T89 系統 (*Populus sieboldii* × *P. tremuloides*) の非組換え体 (NT) と、同 T89 系統に対して TF012 コントラスト (図 1) を導入した 3 つの組換え体系統 L1、L2、L3 を用いた。



図 1 TF-012 の T-DNA 領域の模式図

ポプラは、25°C、16 h 明期/ 8 h 暗期で制御された培養室において、MS 寒天培地 (組換え系統については 50 mg/L Kanamycin を含む) で無菌培養により維持された。

【方法】

○ 栽培評価

各系統ポプラは、約 1 ヶ月間馴化後、40 日間特定網室での生育を評価した (2022. 6. 13 ~ 7. 23)。

評価項目は樹高、基部直径、光合成量子収量 (QY) の 3 つである。各評価項目は 1 週間毎に計測し、基部直径 (地上 3 cm 部分) についてはノギスを使用し、QY 値については午前 6 時において Fluor Pen 100 を使用してそれぞれ計測を行った。

○ 発現量解析

無菌栽培の各系統ポプラから RNA を抽出、cDNA の合成を行い、RT-qPCR により Lac-CBD の発現量をポプラ内である *PteIF4A* の発現量との比として定量、比較した。

○ 酵素糖化性評価

栽培評価に用いたポプラの地上部 3 cm 以上をフードプロセッサー (CRUSH MILLSER IFM-C20G) で粉碎し、ステンレスメッシュで粒径が 75 μm 以下の木粉のみを酵素糖化試験の試料とした。

上記の木粉を 10 mg ずつ量り取り、クエン酸緩衝液 (pH. 5) 950 μl に加えた後、Cellulose, enzyme blend (Sigma-Aldrich Co. LLC) 50 μl を添加しよく攪拌した。その内、10 μl を分取し 1, 990 μl のクエン酸緩衝液に加え、これを 0 h の試料とした。残りの混合液は HYBRIDIZATION INCUBATOR (HB-80) で 50 °C、59 r/min でそれぞれインキュベートし、インキュベート開始から 24 h と 72 h で、0 h と同様にサンプリングし試料を得た。

分取した試料は Glucose Assay Kit-WST (株式会社 同仁化学研究所) 及びそのプロトコルを用い、グルコース含量を定量した。

【結果】

➤ 栽培評価

栽培期間を通じて、組換え系統はいずれも NT と比較して有意に小さかった。葉の健全度の指標とした QY については全ての系統間で有意な差は生じなかった。

➤ 発現量解析

Lac-CBD の発現量は LP3 で最も高く、次いで L1 で高い値を示した。L2 の Lac-CBD の発現量は極めて低かった (n=3)。

➤ 酵素糖化性

脱リグニン処理なしでの酵素糖化处理 72 h の溶出グルコース量は、4 系統間では大きな差はみられなかった。

一方、酵素処理 24 h 時点での溶出グルコース量に着目すると、L3 系統は他の系統と比較して高い値を示すことが確認されたことから、酵素糖化性が高いことが示唆された。

【考察・展望】

脱リグニン処理なしの酵素糖化性試験により L3 における酵素糖化性の向上が示唆された。L3 は、Lac-CBD 発現量が最も高い系統であることから、Lac-CBD 発現と酵素糖化性向上との関係が期待される。一方で、酵素糖化試験に関しては定量値の乱れから再現性の確認が十分ではなく、今後反復実施が必要である。加えて、本研究で使用した試料は特定網室で 5 週程度しか栽培しておらず、二次木部組織が十分に発達していなかった。今後、二次木部組織が十分に成長した成長段階における Lac-CBD 発現と酵素糖化性について評価することで、Lac-CBD のポプラにおけるリグノセルロース改変の有効性を検証したい。