

小川 健一

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
植物レドックス制御研究グループ・グループ長

CO₂ 固定の新規促進機構を活用したバイオマテリアルの増産技術開発

§1. 研究実施の概要

本研究では、CREST「植物の機能と制御」の研究成果を基盤として、グルタチオンという生物界に遍在するトリペプチドを活用し、植物の CO₂ 固定量、同化産物の転流量、種子収穫量/バイオマス量のそれぞれを 50% 程度増加させる基礎技術(組換え技術を含む)を確立し、これを基盤としてカーボンニュートラルな油糧植物のダイズとセルロース原料のユーカリの生産性を 100% 以上向上させる技術を開発することを目的にし、その技術開発を達成することで化石燃料由来の CO₂ 排出量を大幅に抑制することを目指す。

平成 22 年度は、前年に引き続き、ダイズとポプラへの遺伝子導入を継続して行う一方で、グルタチオンの投与の効果を生ロイヌナズナ、ユーカリ、ダイズで様々な角度から調査し、その効果の発現メカニズムを考察した。グルタチオンは酸化型、還元型が存在するが、その両者とも葉の CO₂ 固定能力を向上させ、地上部バイオマス量および収量性を大幅に向上させた。しかしながら、代謝分析等からそのメカニズムは全く異なることが明らかになった。化合物の安定性は酸化型グルタチオンであるので、野外試験では酸化型グルタチオンによる試験を優先して行い、野外で生育するユーカリでも実験室で生育させた生ロイヌナズナと類似な現象がグルタチオンで観察されることも明らかになった。特に、オーストラリアに設定した試験区では、ダイズの炭素トレーサー実験と矛盾せず、ユーカリ個葉の最大光合成活性値がグルタチオン投与によって通常施肥区の 150% を超える値になり、光飽和点のシフトも観察された。つまり、林業の現場でもすぐに応用検討の価値があると考えられた。今後は、詳細なデータ解析ができるように国内でも試験地を再設定し、オーストラリアおよびブラジルで継続して試験と調査を行う予定である。

一般に光合成能力が高められた場合、挿し木などでも発根が促進される。グルタチオンの光合成能力向上による発根率改善効果を期待し、挿し木増殖でグルタチオンを利用したところ、様々な樹木の挿し木による発根の効率を向上させることに成功した。特に、発根率の低いクローンや生育にばらつきがあるクローンに有効であることが判明した。この技術は茶のクローン苗生産に活用

されることが検討されており、10万本程度の生産が見込まれている。実生苗による生産は、苗の性質にばらつきがある(遺伝的なばらつきが大きい)ため、材質のむらや生産性低下の原因となる。バイオマスの土地生産性を高める技術として期待されるため、PCT出願を行った。

§2. 研究実施体制

(1) 光合成・転流制御グループ1

① 研究分担グループ長: 小川 健一(岡山県農林水産総合センター、グループ長)

② 研究項目

- ・ダイズとポプラへの遺伝子導入コンストラクトの作製
- ・気孔数の制御とグルタチオンの効果との関係
- ・グルタチオンによるCO₂固定促進機構の更なる解明
- ・グルタチオン関連変異体の整備
- ・グルタチオン投与によるユーカリおよびダイズの生産性の改善効果の評価

(2) 光合成・転流制御グループ2

① 研究分担グループ長: 山田 哲也(北海道大学、助教)

② 研究項目

- ・ダイズへの遺伝子導入

(3) 光合成・転流制御グループ3

① 研究分担グループ長: 藤巻 秀(日本原子力研究開発機構、サブリーダー)

② 研究項目

- ・炭素固定・転流活性の定量的評価

(4) 光合成・転流制御グループ4

① 研究分担グループ長: 中西 友子(東京大学、教授)

② 研究項目

- ・シロイヌナズナにおける施用グルタチオンの動態解析

(5) 光合成・転流制御グループ5

① 研究分担グループ長: 二瓶 直登(福島県農業総合センター、主任研究員)

② 研究項目

- ・グルタチオン投与によるダイズの生産性の改善効果の評価

(6) オイル蓄積制御グループ1

①研究分担グループ長:西村 いくこ(京都大学、教授)

②研究項目

- ・気孔密度調節機構の解析と物質転流に異常を示す変異体の単離と解析
- ・種子のオイル集積に関わる因子の網羅的同定を目指した、遺伝子欠損株プールの近赤外分光分析

(7)オイル蓄積制御グループ2

①研究分担グループ長:西村 幹夫(基礎生物学研究所、教授)

②研究項目

- ・種子のオイルの集積に異常を示すシロイヌナズナ変異体の単離と解析
- ・オイルを集積する細胞小器官オイルボディ形成異常の変異体の単離と解析

(8)バイオマス蓄積制御グループ1

①研究分担グループ長:高部 圭司(京都大学、教授)

②研究項目

- ・グルタチオン処理した樹木の生長解析
- ・グルタチオンによるセルロース蓄積に変化を生じる変異体の単離

(9)バイオマス蓄積制御グループ2

①研究分担グループ長:河岡 明義(日本製紙株式会社、主席研究員)

②研究項目

- ・有用遺伝子の樹木における評価
- ・グルタチオンの樹木への応用

§3. 研究実施内容

(1) CO₂ 固定と転流の促進機構のさらなる増強によるソース能力の向上

既に小川グループで明らかにしたシロイヌナズナの遺伝子資源についてはダイズで解析を進めるべく、組換え用ベクターを構築し、山田グループではダイズの組換え体の作製を進めた。組換え体は順調に生育し、解析に十分な系統数を確保したものもあり、純化が完了すれば、形質の評価が開始できる状況になった。次年度には形質評価も行いながら、十分な解析に耐えられる数の組換え系統を確保する予定である。

小川グループと藤巻グループでは、固定された炭素 (C) の転流と分配をダイズとポプラでリアルタイムに定量評価できるようにするために、系の設定を再度調整する実験を行った。その結果、従来よりも定量性が確保できた分析を確立できた。今後、スクリーニングを視野に入れた評価を実施する一方、ユーカリやポプラでの評価も検討する予定である。さらに、気孔数と CO₂ 取込み量との関係についても解析を進める予定である。

グルタチオンは、酸化型と還元型が存在する。中西グループでは ³⁵S 標識グルタチオンの投与後の ³⁵S の動態を行った(図1)。その結果、数時間以内に ³⁵S は茎頂まで達し、若い組織に比較的優先的に移動することが判明した。小川グループでは、グルタチオン施用の効果を様々な角度から解析した。どちらのグルタチオンの投与も長期的には、植物体内の窒素量を向上させたが、その効果は還元型の方が強かった。一方、どちらのグルタチオンも光合成活性を向上させたが、その効果は酸化型グルタチオンの方が高かった。代謝物変化や光化学系とカルビン回路酵素量の変化、葉緑体の構造変化、葉の構造変化などから、酸化型グルタチオン

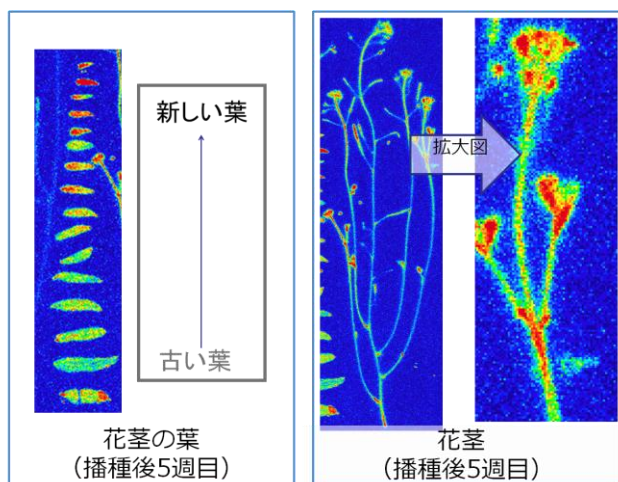


図1. ³⁵S 標識グルタチオンの投与

放射性標識グルタチオンを底面灌水によって投与し、6 時間後のシロイヌナズナ花茎における ³⁵S のオートラジオグラフィー。

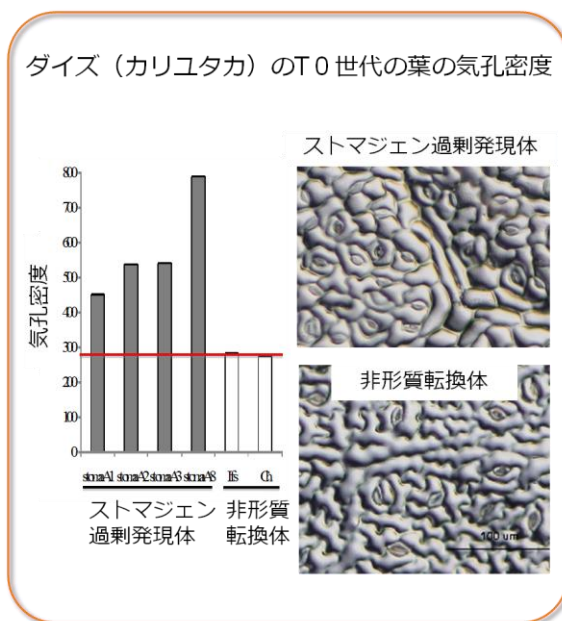


図2. ストマジエン遺伝子過剰発現ダイズ

と還元型グルタチオンが光合成能力を向上させるメカニズムはそれぞれ異なることが明らかになった。

西村・京大グループでは、気孔数を制御するストマジエンというペプチド因子を見出している。本年度は、山田グループの協力のもと、ストマジエン合成遺伝子をダイズに導入した(図2)が、十分な系統数は確保される見込みである。次年度には、そのダイズを使い、CO₂固定能と気孔数の関係、さらにグルタチオンの効果との関係について解析を進める予定である。

(2) 結実と油蓄積促進のさらなる増強による油生産性の向上

種子オイルは細胞内のオイルボディに集積されている。前年度までに、西村・京大グループはオイルボディのサイズや含量に関連する遺伝子を選抜した。一方、西村・基研グループは、モデル植物シロイヌナズナの正遺伝学的手法でオイル含量とタンパク質含量のバランス調節遺伝子を同定した。本年度は、両グループで単離された遺伝子を大量発現する形質転換ダイズの作製を、山田グループとの共同研究で行い、一部は十分な解析ができる段階になった。次年度には、得られた形質転換ダイズ種子のオイル含量の定量を行う。

(3) 生育促進機構のさらなる増強によるセルロース生産性の向上

小川グループで既にシロイヌナズナで明らかにした遺伝子資源を樹木でも解析すべく、河岡グループでは、ポプラに導入を行っている(図3)。導入コンストラクトあたり、最低 20 系統の形質転換体を確保し、順調に形質転換個体の生育が認められた。今後、ユーカリに導入すべき遺伝子を特定するため、藤巻グループの協力を得ながら、形質評価を行っていく予定である。

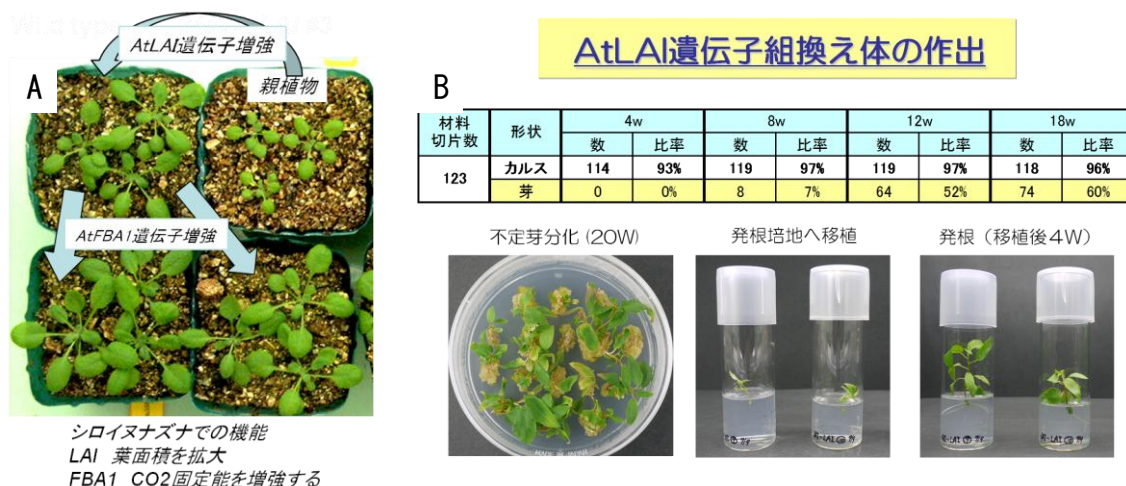


図 3. シロイヌナズナの遺伝子例(A)とその遺伝子を導入したポプラの様子(B)

(A)シロイヌナズナ LAI 遺伝子の導入では葉面積が増加し、さらに CO₂ 固定能力決定する FBA1 遺伝子の導入によって植物の生育が促進された様子を示す。(B) LAI 遺伝子を導入したポプラの様子を示し、上段の表にはカルスからの形質転換効率を示した。

種子を形成する植物の場合、グルタチオン処理で、バイオマス量あたりの種子量の割合(収穫指数)が向上するが、高部グループでは、グルタチオン処理によるシロイヌナズナ花茎(結実する茎)の細胞の様子を観察した。その結果、無処理に比べ細胞壁が薄い可能性が見出されたが、X線CT解析では、随にX線で陰になる構造が観察された。また、グルタチオン処理したユーカリの樹幹の横断面を観察したところ、グルタチオンにより断面構造に変化が認められ、肥大生長が促進されている可能性が示された。今後は、試験地を再設定し、強度や成分などの詳しい分析を継続し、セルロース蓄積との関係を調査する予定である。

一般に光合成能力が高められた場合、挿し木などでも発根が促進される。グルタチオンの光合成能力向上による発根率改善効果を期待し、挿し木増殖でグルタチオンを利用したところ、様々な樹木の挿し木による発根の効率を向上させることに成功した。特に、発根率の低いクローンや生育にばらつきがあるクローンに有効であることが判明した。この技術は茶のクローン苗生産に活用されることが検討されており、10万本程度の生産が見込まれている。実生苗による生産は、苗の性質にばらつきがある(遺伝的なばらつきが大きい)ため、材質のむらや生産性低下の原因となる。このため、本効果は、エリートクローンの大量増殖によってバイオマスの土地生産性を大幅に高めることができる技術に応用が期待できるため、PCT出願を行った。

(4) CO₂削減効果の評価

このプロジェクトで開発される技術のCO₂削減効果を評価すべく、グルタチオン処理によるダイズとユーカリの生産性を圃場レベルで評価することになっている。

高部グループと河岡グループでは、小川グループの協力のもと、将来の植林地での利用を念頭に、京大内に植栽したユーカリに対する現在のCREST有効性に関する予備調査を行っている。その結果、グルタチオンにより地上部の生育促進が認められたが、細胞数が増加した一方、細胞壁が薄くなるという傾向であった。今後、さらに詳しい解析を行い、セルロース蓄積との関係を調べる。一方、河岡グループでは、現地での有用性を検討した。それらの結果を考慮し、植林地の大規模試験を予定よりも1年早めて行うことにした。今年度は、ブラジルとオーストラリアでの試験を計画したが、オーストラリアの計画が先行して行われた。オーストラリアでの通関にも大幅な時間を要したが、ブラジルでは、グルタチオンを含む資材の輸入許可がブラジル通関当局から未だに下りないため、その手続きを引き続き行っているところである。許可が下り次第、試験を開始する予定である。オーストラリアの試験では、施用3カ月後の植物に大幅な光合成活性の向上が認められ、ダイズやシロイヌナズナでのグルタチオンの効果と矛盾しない結果が得られた。様々な施用時期を検討したが、どの試験区でも差が出る傾向が認められ、実生苗から生育させた場合には、グルタチオン施用によって最大光合成活性が150%程度に向上し、光飽和点も高照度側にシフトしていた。今後は、継続的に調査するとともに、さらなる詳細な解析を国内でも行えるように試験地を再設定することにした。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Kawachi, N., Suzui, N., Ishii, S., Ito, S., Ishioka, N.S., Yamazaki, H., Hatano-Iwasaki, A., Ogawa, K., Fujimaki, S. (2010) "Real-time whole-plant imaging of ^{11}C translocation using positron emitting tracer imaging", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. doi:10.1016/j.nima.2010.10.152

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)