

# 地球規模課題対応国際科学技術協力

(環境・エネルギー研究分野「低炭素社会の実現に向けたエネルギーシステムに関する研究」領域)

「ボツワナの乾燥冷害地域における  
ヤトロファ・バイオエネルギー生産のシステム開発」  
(ボツワナ)

平成 25 年度実施報告書

明石 欣也

国立大学法人鳥取大学農学部・准教授

<平成 24 年度採択>

## 1. プロジェクト全体の実施概要

世界の南北回帰線付近の乾燥地帯は太陽エネルギー照射量が豊富であるが、植物一次生産量が低く、地球規模での低炭素社会の実現を図る上で律速点になっている。アフリカのボツワナ共和国は、循環型エネルギー社会の構築のため、ヤトロファ植物によるバイオ・ディーゼル燃料生産をその主要戦略に掲げるが、国土の厳しい乾燥冷害環境により十分な生産性が確立されていない。従って、ボツワナ国土の乾燥冷害地域におけるヤトロファ・バイオ燃料生産を確立するための科学技術を創出することが必須である。そこで本研究では、次の3つの戦略、すなわち、(1) ボツワナ生物資源を利用した、環境ストレス耐性の高い精鋭ヤトロファ品種の分子ゲノム育種と、(2) 乾燥冷害環境に適応したヤトロファ ICT 農法の確立、さらに(3) ヤトロファ圃場生物叢の理解とヤトロファ増産に向けた基盤技術開発を推進する。これらにより、ボツワナが有する野生生物資源と、遺伝子/生理/気象/圃場生物叢情報に立脚した、ヤトロファ・バイオ燃料生産のシステムを、ボツワナ乾燥冷害地帯において展開するための技術基盤を確立することを目的としている。

本プロジェクトは平成 23 年 6 月から平成 24 年 3 月までのプロジェクト準備期間の後、平成 24 年 4 月に本格始動した。平成 24 年の 4 月からは本プロジェクトの業務調整員がボツワナに赴任し、また同 24 年の 9 月からは栽培開発を専門とする長期専門家がボツワナに赴任し、ボツワナ側研究者および行政担当者との連携を構築するに至っている。本プロジェクトでは、ボツワナ国内の Gaborone 地域の DAR 農場をヤトロファの主要試験農場と定め、ボツワナ側研究者と共に約 2ヘクタールの圃場整備を行い、灌漑設備、科学計測機器を備えるフィールド構築を進めている。乾燥地の圃場環境における植物の光合成特性について、極めてユニークなデータを既に取得しており、今後の栽培技術確立に向け基盤的な科学的データが集積し始めている。また土壌サンプリングを行い、DGGE 解析をはじめとする圃場生物叢の統合的解析に着手すると共に、分析手法の技術供与を推進中である。加えて、ヤトロファのバイオマスを有効利用するために、その各組織の物理化学的性質の解析に着手し、その化学組成比の相違についてデータを得ている。さらに、優良ヤトロファ品種の作出のため、ヤトロファへの遺伝子導入を試み形質転換法を確立すると共に、ストレス耐性遺伝子群の導入を行い、形質転換ヤトロファ幼植物候補を得ている。さらに本プロジェクトでは、ICT に基づくヤトロファ栽培生産の最適化を目指し、ボツワナ国内 4 か所の気象ステーションを連携させる気象観測システムの設置とヤトロファ試験栽培を計画している。今後は、Gaborone 現地において気象ステーションの稼働が予定されており、ICT データに基づく栽培手法の開発とデータベース構築を本格的に進める予定である。また、ボツワナのヤトロファ自生種のゲノム解析およびメタ解析について、初期データが取得される予定であり、ヤトロファの栽培手法、ボツワナ固有種の育種利用、ストレス耐性遺伝子を導入したヤトロファ育種、土壌微生物層の遺伝分析、これら情報を統合したデータベース構築および高度利用等について、研究開発を推進する予定である。

## 2. 研究グループ別の実施内容

### 研究題目 1: 乾燥冷害地域に適合したヤトロファ系統の分子ゲノム育種

#### ①研究のねらい

ボツワナ各地に存在するヤトロファ固有種の生産性およびストレス耐性を評価し、乾燥冷害耐性に優れた系統の選抜育種を行う。また、ボツワナ中央部のカラハリ砂漠に自生する野生植物のストレス耐性遺伝子を導入した形質転換ヤトロファを作出し、乾燥ストレス下での生産性を強化したヤトロファ品種を確立する。

## ②研究実施方法

まず初めに種子収穫量が多く実用品種として用いられているインドネシア由来のヤトロファ品種 IP-2P をモデルとし、次世代シーケンサーによる遺伝子発現情報を定量化し代謝地図を作成する。次に、ボツワナ自生 80 系統を分別するための分子マーカーを探索し、自生系統の系統関係についての情報を収集する。この情報をもとに、自生系統群の生理・生産性との相関を調査する。さらに、次世代シーケンサー等を用いてボツワナ自生系統の EST 等の遺伝子情報を包括的に取得し、生理・生産性との相関性から、乾燥冷害下での生産性に寄与する遺伝子座位を探索同定し、系統選抜を効率化する技術確立をおこなう。さらに、アグロバクテリウム法によるヤトロファへの遺伝子導入手法を開発しその効率化を図ると共に、根伸長促進遺伝子など、ヤトロファの生産性増強遺伝子の導入を行う。

## ③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

ヤトロファ IP-2P 品種をモデルとした次世代シーケンサーによる遺伝子発現情報の定量化より、ウェブ上での代謝地図閲覧システムを開発した。ボツワナのヤトロファ自生系統 80 種について、その採取位置を GPS 記録すると共に、Gaborone のヤトロファ実験農場における試験栽培を始動させ、その生産性比較を開始した。また、一部の系統についてはゲノム DNA の単離実験を行うとともに、RAPD 等の分子マーカーによる系統判別手法の開発を指導した。ヤトロファの遺伝子組換え実験については、新規薬剤を用いた選抜法を開発し、その遺伝子導入及び選抜効率を飛躍的に改善することに成功した。この手法を用いてヤトロファに根伸長遺伝子 CLZFB1、低温耐性遺伝子 TPS、乾燥耐性遺伝子 DHN の導入を試み、形質転換候補株を得た。さらに、ボツワナ自生系統である JK-01 系統を用いた形質転換方法の確立のため、効率よい再分化系を構築した。さらに、遺伝子導入に係るアグロバクテリウムの感染実験条件を最適化した。

## ④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

ヤトロファ植物体からのゲノム DNA の調整法および RAPD によるヤトロファ自生種の系統分別手法について、ボツワナ研究者側に技術指導を行った。ヤトロファの遺伝子組み換え実験について、本邦研修において技術講習を行った。

## ⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

研究題目 2: 生産制御のための環境メタ解析

## ①研究のねらい

ボツワナでは、灌水を施した場合においてもヤトロファ生育に遅延が生じるケースが見出されており、土壌中の微生物・菌類・線虫類・昆虫類等の生物群が、ヤトロファ生育に影響している可能性が考えられている。そこで、ヤトロファ生育と圃場生物叢との相互作用を理解し、ヤトロファ栽培最適化に向けた圃場生物叢制御技術を開発する。

## ②研究実施方法

ボツワナ国内の各地域の圃場中の土壌生物相を、DGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)計測し、マトリクスデータとして数値データベース化すると共に、代表的な生物種については DNA シーケンスにより特定する。圃場生育させた各種ヤトロファ系統の葉・茎・種子・根の各組織について、気象および生物ストレスに応じて、化学プロファイリングの変化を NIR 法および NMR 法等の化学プロファイリング解析により解析する。加えて、土壌生物叢の変動にも土壌化学成分の影響が大きいと想定されることから、

NIR、NMR の有機成分解析に加えて、元素プロファイリング解析も遂行する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

ボツワナ国内のうち Gaborone と Maun については、圃場土壌試料のサンプリングを開始した。ボツワナ国内にて DNA 抽出のための実験設備の立ち上げを行っている。また、分析対象はユニバーサル 16S-rDNA プライマーを用いた原核微生物叢、同 18S-rDNA プライマーを用いた真核微生物叢に加え、ヤトロファ自体が線虫の忌避効果を有するという過去の報告情報から、線虫群に特化した 18S-rDNA プライマーを設計し、PCR 条件の最適化も遂行した。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

24 年度において、土壌微生物叢からの DNA 抽出法、PCR 条件検討およびそのデータ確認法、DGGE 装置の基本的な操作法についてボツワナでの研修を行った。加えて、25 年度においても再度ボツワナでの研修を行った。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

24 年度前期訪問時まで、試料前処理に必要な凍結乾燥機、試料破砕機や DGGE 装置の納品が間に合わず、ボツワナ大学へ凍結乾燥機を借りに往復する等の手間がかかった。また DGGE 装置は重要なので代替機を日本から空送したものの、途中で機器が大破し修理が必要となるトラブルにも見舞われた。25 年度における研修時にも、日本との使用電圧の違いから電気系部位が破損するトラブルが生じ、日本に持ち帰り修理依頼することとなった。こうした予期せぬ事態から、当初予定していた通りには土壌微生物叢データを取得できなかった。

### 研究題目3: 子実収量2.5t/haを目指したICT農法の開発

①研究のねらい

ボツワナ乾燥冷害環境におけるヤトロファ生産技術を開発するために、現地の気象観測データや土壌水分含量データに基づいた ICT 栽培管理を確立し、マニュアル化する。これらのデータに加え、ボツワナ農務省が収集したヤトロファの固有種の位置データ、土壌成分データ、土壌生物叢データを網羅的に表現できる GIS ソフトを共同開発し、ボツワナ乾燥冷害地域におけるヤトロファ農法のモデルを構築する。

②研究実施方法

ヤトロファ圃場の気象データや土壌水分含量をオンサイト、オンタイムで計測する ICT 技術を開発し、それに基づいた栽培管理を行うと同時に観測結果をデータベース化する。また、計測データをボツワナ並びに日本側からも共有できるモニタリングソフトを開発する。ボツワナ農務省が収集したヤトロファの固有種を用いて、光合成速度、蒸散速度、気孔の環境応答および水分生理的応答を基礎に、土中灌漑、樹型選定管理、開花収穫管理の最適化を行う。乾燥、低温、強日射などを組み合わせた外的環境が生理的要因に及ぼす影響について解明する。また、特に冬季前の樹枝剪定によるヤトロファ樹形管理等により、冬季の乾燥冷害障害を抑止する手法を、光合成速度、蒸散速度、気孔反応等により定量的に評価する方法を確立する。さらに、樹枝剪定に伴い大量に発生する樹枝バイオマスを炭化し、土壌保湿剤として有効利用するモデル手法の効果を LCA 的に評価する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

ボツワナのヤトロファ固有種 40 種について、Gaborone のヤトロファ実験農場における試験栽培を開始するとともに、外国産品種も併せて栽培をスタートさせた。気象ステーションの設置用コンテナハウスを

製作し設置した。2013年に現地ボツワナに気象ステーションの設置作業を行い、データ取得を開始した。貯水タンクおよび灌水用ドリッピングチューブの設置を行った。また2013年5月にボツワナ DAR 圃場へ気象ステーションおよびソーラーパネルを設置し、気象データの収集を開始した。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

ヤトロファ固有種の試験栽培に際して、栽培手法の一部を日本側からボツワナ側に技術移転した。また、1月に導入された携帯型光合成蒸散同時測定装置(LI-6400)を用いてヤトロファの光合成速度、蒸散速度、クロロフィル蛍光の測定方法をC/Pに技術移転した。短期研修で琉球大学へ招致したC/Pに、ヤトロファの光合成測定・生育調査法、炭化・炭化物評価法および栽培技術の技術移転を行った。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

野生動物が灌漑設備を破壊するケース、また、実験圃場の実験設備の盗難が頻発し、セキュリティの確保が緊急を要する課題であったが、3月にフェンスを設置し、対策した。2013年11月28日に突風を伴う降雹が発生し、植物体およびソーラーパネルや観測機器が被害にあった。くみ上げポンプが1機しか稼働していない。他部署との調整のため、灌漑水が十分に確保できず、予定していた量の灌水が行えていない。そのため、新たな井戸の掘削を検討している。

### 3. 成果発表等

#### (1) 原著論文発表

① 本年度発表総数(国内 0件、国際 7件)

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、海外 15件)

③ 論文詳細情報

Boyer, J.S., Kawamitsu, Y. (2011) Photosynthesis gas exchange system with internal CO<sub>2</sub> directly measured. *Environ. Control Biol.* 49, 193-207.

Fukuzawa, Y., Tominaga, J., Akashi, K., Yabuta, S., Ueno, M., Kawamitsu, Y. (2012) Photosynthetic Gas Exchange Characteristics in *Jatropha curcas* L. *Plant Biotechnol.*, 29, 155-162.

Sano, R., Ara, T., Akimoto, N., Sakurai, N., Suzuki, H., Fukuzawa, Y., Kawamitsu, Y., Ueno, M., Shibata, D. (2012). Dynamic metabolic changes during fruit maturation in *Jatropha curcas* L. *Plant Biotechnol.* 29, 175-178.

Watanabe, T., Shino, A., Akashi, K., Kikuchi, J. (2012) Spectroscopic investigation of tissue-specific biomass profiling for *Jatropha curcas* L. *Plant Biotechnol.*, 29, 163-170.

Sakurai, N., Ogata, Y., Ara, T., Sano, R., Akimoto, N., Hiruta, A., Suzuki, H., Kajikawa, M., Widyastuti, U., Suharsono, S., Yokota, A., Akashi, K., Kikuchi, J., Shibata D. (2012) Development of KaPPA-View4 for omics studies on *Jatropha* and a database system KaPPA-Loader for construction of local omics databases. *Plant Biotechnol.*, 29, 131-135.

Kajikawa, M., Morikawa, K., Inoue, M., Widyastuti, U., Suharsono, S., Yokota, A., Akashi, K. (2012) Establishment of bispyribac selection protocols for *Agrobacterium tumefaciens*- and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of the oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Plant Biotechnol.*, 145-153.

Maroušek, J., Itoh, S., Higa, O., Kondo, Y., Ueno, M., Suwa, R., Komiyama, Y., Tominaga, J., and Kawamitsu, Y. (2012) The use of underwater high-voltage discharges to improve the efficiency of *Jatropha curcas* L.

- biodiesel production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9, 451–456.
- Kondo, Y., Fukuzawa, Y., Kawamitsu, Y., Ueno, M., Tsutsumi, J., Takemoto, T., and Kawasaki, S. (2012) A new application of bagasse char as a solar energy absorption and accumulation material. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 103, 1–8.
- Hoshiyasu, S., Kohzuma, K., Yoshida, K., Fujiwara, M., Fukao, Y., Yokota, A., Akashi, K. (2013) Potential involvement of N-terminal acetylation in the quantitative regulation of the  $\epsilon$  subunit of chloroplast ATP synthase under drought stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 998–1007.
- Maroušek, J., Itoh, S., Higa, O., Kondo, Y., Ueno, M., Suwa, R., Komiya, Y., Tominaga J., and Kawamitsu Y. (2013) Pressure shockwaves to enhance oil extraction from *Jatropha curcas* L. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 2013, 27(2), 3654–3658.
- Maroušek, J., Itoh, S., Higa, O., Kondo, Y., Ueno, M., Suwa, R., Tominaga J., and Kawamitsu Y. (2013) Enzymatic hydrolysis enhanced by pressure shockwaves opening new possibilities in *Jatropha curcas* L. processing. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, Volume 88, issue 9 (September), p. 1650–1653. ISSN: 0268–2575 DOI: 10.1002/jctb.4014. John Wiley & Sons, Ltd
- Maroušek, J., Kondo, Y., Ueno, M., and Kawamitsu, Y. (2013) Commercial-scale utilization of greenhouse residues. *Biotechnology and Applied Biochemistry* Vol. 60(2): 253–258, March/April.
- Ogura, T., Date, Y. and Kikuchi, J. (2013) Differences in cellulosic supramolecular structure of compositionally similar rice straw affect biomass metabolism by paddy soil microbiota. *PLoS ONE* 8, e66919.
- Inafuku–Teramoto, S., Mazereku, C., Coetzee, T., Gwafila, C., Lekgari, LA., Ketumile D., Fukuzawa, Y., Yabuta, S., Masukujane, M., George DGM., Chite, SM., Ueno, M., Kawamitsu, Y., Akashi, K. (2013) Production approaches to establish effective cultivation methods for *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) under cold and semi-arid climate conditions. *International J. of Agronomy and Plant Production*, 4(S), 3804–3815.
- Yamazawa, A., Date, Y., Ito, K. and Kikuchi, J. (2014) Visualizing microbial dechlorination processes in underground ecosystem by statistical correlation and network analysis approach. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 305–309.

## (2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳 (国内 0 件、国際 0 件、特許出願した発明数 0 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数 (国内 0 件、国際 0 件)

## 4. プロジェクト実施体制

### (1) 「鳥取大学」グループ (乾燥冷害地域に適合したヤトロファ系統の分子ゲノム育種)

- ① 研究者グループリーダー名: 明石 欣也 (鳥取大学・准教授)
- ② 研究項目
  - 研究項目 1-1: ボツワナ固有種ヤトロファを用いた乾燥冷害耐性系統のゲノム育種
  - 研究項目 1-2: ボツワナ植物遺伝子資源を利用した悪環境適応型ヤトロファの分子育種

### (2) 「理化学研究所」グループ (生産制御のための環境メタ解析)

①研究者グループリーダー名： 菊地 淳（理化学研究所植物科学研究センター・教授）

②研究項目

研究項目 2-1: 圃場生物叢およびヤトロファ化学プロファイリング

研究項目 2-2: ヤトロファ遺伝・化学的要因と環境要因の相関解析

研究項目 2-3: 生物・化学バイオマーカーの探索と利用

(3)「琉球大学」グループ(子実収量 2.5t/ha を目指した ICT 農法の開発)

①研究者グループリーダー名： 川満 芳信（琉球大学・教授）

②研究項目

(Plan of Operation (PO) や Master Plan の項目によって箇条書きまたは数行程度に記載下さい。)

研究項目 3-1: 気象観測データモニタリングシステムの確立

研究項目 3-2: 計測データに基づき冷害を回避し乾燥を凌駕する農法の開発

研究項目 3-3: ボツワナ在来系統の生理特性評価

研究項目 3-4: 遺伝資源、環境、土壌生物叢データを統合した GIS 開発

以上