

「二酸化炭素排出抑制に資する革新的技術の創出」  
平成21年度採択研究代表者

小川 健一

岡山県生物科学総合研究所植物レドックス制御研究グループ・グループ長

CO<sub>2</sub>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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 排出量を大幅に抑制することを目指す。

平成 21 年度は、本格的に研究を始動するための小規模試験やダイズなどの組換え体作製など準備、基盤となるデータの収集等を中心に行った。グルタチオンによってダイズの個葉 CO<sub>2</sub> 固定を促進した場合、放射性同位体ラベルした CO<sub>2</sub> が多量に固定されるだけでなく、子実への炭素蓄積も促進されることを確認した。圃場レベルでは、統計的な有意差が出ない試験もあったが、概ね増収条件は共通であったため、今後も複数個所のダイズ増収試験を継続し、技術のブラッシュアップを行うとともに、優位性・安定性を評価する。ユーカリにおいてグルタチオンの有用性を生産地で確認したため、生産地で行う本格的な圃場試験を当初の計画から前倒して平成 22 年度から行う予定である。一方、現状の CO<sub>2</sub> 固定促進技術をさらに促進する遺伝子を見出すための分子生物学的な研究も行った。変異体の選抜に加えて、既に候補になる遺伝子に関してはダイズとポプラで形質転換体の作製に着手した。ダイズについては、平成 22 年度後半から機構解明および技術開発に利用可能な組換え体が得られる予定である。今後、解明される機構を踏まえて有用と判断される分子機構はユーカリにも適用していく計画である。

## § 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 (岡山県生物科学総合研究所、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
- ・グルタチオンによる CO<sub>2</sub> 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

(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、研究副主幹)

②研究項目

- ・転流活性の定量的評価技術の開発

(4) 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

(5) 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

(6) 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、准教授)

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

(7) 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
- ・植林地におけるグルタチオン処理試験のための予備検討

### § 3. 研究実施内容

(1) CO<sub>2</sub> 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

小川グループが既にシロイヌナズナで明らかにした遺伝子資源についてダイズで解析を進めるべく、組換え用ベクターを構築し、山田グループと河岡グループでダイズとポプラで組換え体の作製を開始した。組換え体は順調に生育し(図1)、早ければ平成22年度後半からダイズの組換え体による収量性に関連した形質実験を開始できる予定である。

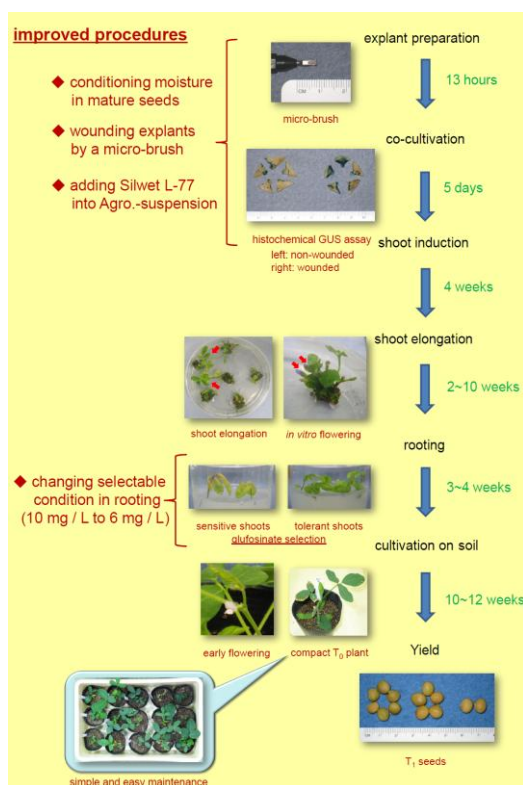


図1. ダイズ形質転換体作製手順と形質転換体の様子。左には、このプロジェクトで行っている、形質転換操作の手順を示した。上の写真は具体的にこのプロジェクトで得られた形質転換体を示しており、左の図に示した手順でどの段階まで進んでいるか、示すものである。

小川グループ、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。その過程で、グルタチオン処理がダイズの個葉 CO<sub>2</sub> 固定を促進するだけでなく、炭素(C)の子実への蓄積も促進するデータを得た。今後、個体でのグルタチオンによる炭素の分配を明確にする定量解析を継続するとともに、生育に大きな影響を与える土壌からの窒素(N)成分の吸収

等への効果についても定量的な解析を行う予定である。PETIS による動態解析には回数的な限界があるため、放射性同位体や安定同位体ラベルを用いた他のトレーサー実験も組合わせて実験を行う予定で、そのシステムを構築した。

小川グループでは、既に明らかにしたシロイヌナズナにおけるCO<sub>2</sub>固定促進遺伝子が関わる機構のさらなる解明を行い、これまでの解明した経路の光環境及び貧栄養環境適応に関する重要性を再確認した。グルタチオンの代謝を改変すべく、クラミドモナスを用いたグルタチオン代謝の調節系因子の単離系を立ち上げた。これは、高等植物でその遺伝資源を利用しながらも、藻類への応用も視野に入れるための工夫である。

### (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。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・基生研グループは、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。種子のオイル蓄積促進を目指して、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開始した。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。

組み換え植物の作出には、形質転換体の選抜が必須であるが、この過程に時間と労力を要していた。西村・京大グループは形質転換体の選抜のための新しいマーカー (FAST と命名した) をシロイヌナズナで開発した (Plant J., 2010, 61, 519)。FAST 法を用いると、遺伝子導入された種子が蛍光を発するため、T1 世代の種子を蛍光実体顕微鏡観察するだけでその中からヘテロ個体の選抜が可能で、T2 世代の種子の中からホモ個体を選抜することができる (図2)。本 FAST 法をダイズの形質転換に適用できるかどうかの検討を始めた。本手法が確立できれば、前処理することなく乾燥種子の段階でダイズ形質転換体の選抜が可能になるため、組み換え体取得の迅速化と栽培面積の縮小が可能になり、本研究課題の加速化が期待できる。

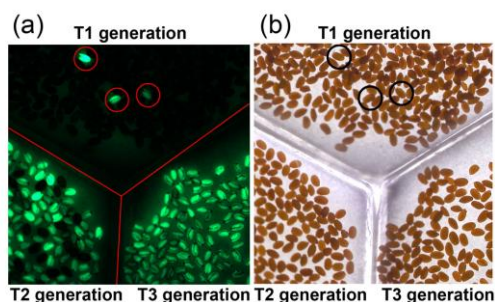


図2. 形質転換体の迅速選抜法 (FAST 法)。選抜マーカーとしてオイルボディ膜型 GFP (緑色蛍光タンパク質) を利用しているため、形質転換された種子は緑色蛍光を発する。従って、この蛍光を指標に蛍光実体顕微鏡下で形質転換体を非破壊的に即座に選抜することができる。

### (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



図3. ポプラの形質転換体作製の進行状況。  
左には、改変グルタチオン合成関連遺伝子を発現させたポプラを示す。形質転換体は葉を出し生育している個体である。形質転換体が取得されていることを示している。

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、ポプラに導入を開始した。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、研究を進めることにしていたが、順調に形質転換個体の生育が認められている(図3)。今後、ユーカリに導入すべき遺伝子を特定するため、形質評価を行っていく予定である。

種子を形成する植物の場合、グルタチオン処理では、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。これは、多収系統に見られる形質と似ているため、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。

#### (4) CO2 削減効果の評価

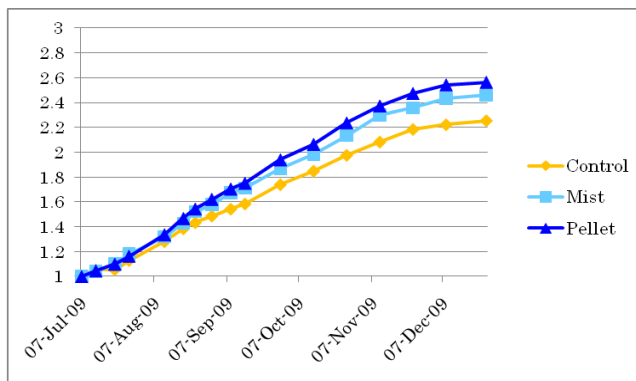


図4. ユーカリ苗を 30 本植栽し、10 本に対しグルタチオン噴霧処理 (Mist) を行い、10 本に対しグルタチオン顆粒処理 (Pellet)、残りの 10 本は無処理で、それぞれの伸長成長量(測定時の樹高/植栽時の樹高)の平均を求めた。

このプロジェクトで開発される技術の CO2 削減効果の評価すべく、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としている。

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、将来の植林地での試験に備え、苗畑のユーカリに対する現在の CREST 有効性に関する調査を開始した。予備的な調査では、グルタチオンにより地上部の生育促進が認められた(図4)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、そのための準備(現地との綿密な打合せ、処理製剤の製造、運搬等)も行った。

小川グループでは、グルタチオン施用によるダイズの収量増加の条件を検討し、処理時期による収量の大きな変化を見出した。これまでの試験も踏まえて、平成 22 年度は、処理時期・及び方法の最適化を図るだけでなく、岡山に加えて、福島と福岡で圃場試験を行う予定である。