

「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

H23 年度

実績報告

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. 研究実施体制

(1) 光合成・転流制御グループ①

①研究代表者: 小川 健一(岡山県農林水産総合センター生物科学研究所、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
- ・形質転換体の評価
- ・気孔数の制御とグルタチオンの関係についての解析
- ・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解析
- ・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主たる共同研究者: 山田 哲也(北海道大学農学研究院、助教)

②研究項目

- ・ダイズへの遺伝子導入と評価

(3) 光合成・転流制御グループ③

①主たる共同研究者: 藤巻 秀((独)日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門、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主たる共同研究者: 田野井 慶太朗(東京大学大学院農学生命科学研究科、准教授(生物生産工学研究センター、助教))

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) オイル蓄積制御グループ①

①主たる共同研究者: 西村 いくこ(京都大学大学院理学研究科、教授)

②研究項目

- ・気孔密度と光合成量の関係についての解析
- ・気孔密度を増加させたダイズの作出
- ・種子のオイル収量を上げる因子を導入したダイズの作出

(6) オイル蓄積制御グループ②

①主たる共同研究者: 西村 幹夫(自然科学研究機構基礎生物学研究所、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
- ・環境によるダイズ油脂の蓄積過程の詳細な解析
- ・新規に脂質合成に重要と特定された遺伝子のオイル集積に対する最適化改変
- ・ダイズのオイル集積能を増大させる改変型遺伝子の構築

(7) バイオマス蓄積制御グループ①

①主たる共同研究者: 高部 圭司(京都大学大学院農学研究科、教授)

②研究項目

- ・ユーカリ、スギ、ヒノキの苗木を用いたグルタチオン施用効果の詳細な評価
- ・FT-IR スペクトル法などによる、シロイヌナズナでセルロース蓄積の促進に寄与する遺伝子群の探索
- ・グルタチオン施用による共発現遺伝子群の解析

(8) バイオマス蓄積制御グループ②

①主たる共同研究者: 河岡 明義(日本製紙株式会社アグリ・バイオ研究所、所長代理)

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
- ・グルタチオンの発根促進に対する効果の解析

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

1. グルタチオンの CO₂固定促進とバイオマス生産性向上

・代謝分析を行うことで、グルタチオン施用による代謝変化(図1)が従来の緑の革命効果とは全く異なることを示し、さらに、グルタチオンの CO₂固定促進メカニズムに重要と想定しているカルビン

回路酵素と従来の酵素の代謝系的な違いを明確に示すことに成功した。今後は、その遺伝子を発現させた組換え体を用いた成長速度解析を行い、どの生育時期の純同化速度の増加に貢献できるかとグルタチオン施用のタイミングとの関係を明確に示すことで、グルタチオン技術の高度化の参考とする。

・ポジットronイメージング技術を発展させて、プレート上で育成した多数の幼植物個体(シロイヌナズナ、交雑ヤマナラシ)が有する炭素固定速度と転流率の2つの能力を、画像から一括して定量評価する系を構築した。今後はこの系を用いて、着目した変異系統や形質転換体が有する能力や、グルタチオン施用との相乗効果などについて、多数個体を対象に統計的な評価を行う。

・(シロイヌナズナにおいて)気孔数がCO₂固定の律速要因となり、気孔数の向上が光合成能を増強しうることを示したが、同時にグルタチオン施用による光合成能向上には、気孔数の増加以外の要因も存在していることが分かった。今後は、気孔数の増加がもたらす効果について、個体・群落レベルでの評価を行う予定である。

・シロイヌナズナで油脂蓄積に重要な遺伝子を特定し、その遺伝子の発現を制御することで親株の種子油脂含量を150%に高める方法を確立した。次年度は、そのメカニズム類似性と相違性を考慮し、ダイズでの技術構築に取り組む。油脂蓄積に異常のある変異体から特定される遺伝子の機能解析を行い、さらに詳細なメカニズムを明らかにし、その知見に基づき、さらなる技術の高度化を図る。

・網羅的な遺伝子発現解析によって、グルタチオン施用で特異的に挙動する遺伝子群の特定を行った。その結果、特に注目すべきは、通常は糖飢餓(C不足)で遺伝子発現が変化する遺伝子群が共発現変動することが明らかになった。つまり、植物は炭素不足と認識しているため、グルタチオン施用によって炭素を多く固定しようとしていると理解された。こうした条件での共発現遺伝子には、バイオマス増産が期待できる遺伝子が存在する可能性が高いと考え、今後は、バイオマス形成に重要と想定される遺伝子と共発現する遺伝子の機能解析を行う。本技術に関与する遺

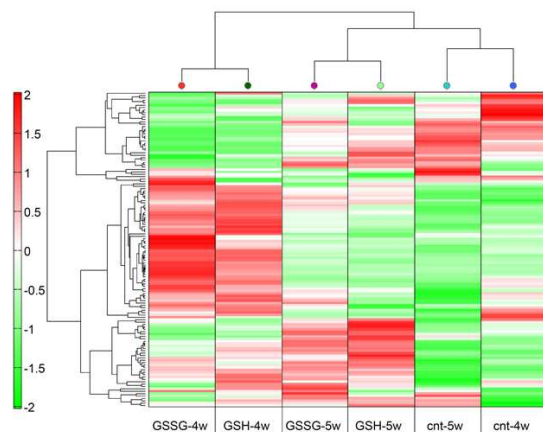


図1. GSHおよびGSSG施用によるシロイヌナズナ葉内代謝物プロファイルの変化。横軸はサンプル(施用方法とサンプリング時期<播種後4週または5週>で名前を付けている: Ctn、通常栽培; GSH、GSH施用; GSSG、GSSG施用)を示し、縦軸はピークを示す。

伝子を少なくとも1つは新たに明らかにすることを目標にする。

・グルタチオン施用の効果が、植物ホルモンであるオーキシンと密接に関連することを特定し、その応答は、グルタチオン施用から時間オーダーで認められる比較的早い反応であることが明らかになった。これまでにシュートのクローン化技術を国際出願したが、その発根と根系の発達に裏付けられたと考えられる。今後は、その応答を他の植物(特に有用植物)で活用できるかどうかについて評価し、想定メカニズムの普遍性を評価する。特に有用植物としては、根系が活用されバイオマス資源として注目されるキャッサバも含めて検討を行う。

・トウモロコシおよび微細藻類でのグルタチオン技術の適用時には、蓄積デンプンの分子的性質に変化が起きる可能性を得た。今後は、バイオマテリアルとしての活用(発酵材量としてなど)を想定し、その性質の変化をはっきりさせるとともに、バイオマテリアルとしての性質の制御を可能にする機構の解明に取り組む。

・副次的に得られた成果である、微細藻での炭化水素化合物(デンプンや油脂)の効率的生産技術は、通常は精製に必要な破碎操作や培養途中での目的物質の蓄積誘導等の工程が不要となる極めてユニークで有望な技術であり、PCT 国際出願中である。この技術の目玉である、自動的にデンプン粒子を細胞液中に放出する現象は、グルタチオン関連遺伝子の導入によってオートファジー(細胞の自己消化)が誘導されることで、起きる現象であることを明らかにした。今後は、この現象を引き起こす分子の特定に着手し、他の微細藻でも広く応用できる技術にすることを目指す。

2. 開発技術の評価

・フィールド試験でグルタチオン施用が光合成能力を短期的(時間単位)にも長期的にも(月単位)にも高めることを明確にでき、しかも、ユーカリについては、その光合成能力と樹幹容積(成長量)とに強い相関が見出すことができた。成長量の差は、150%以上に達していたが、成長曲線的に増大しており、現状ではバイオマス生産性の向上効果の最大値を見積ることができていない(図2～図4を参照)。

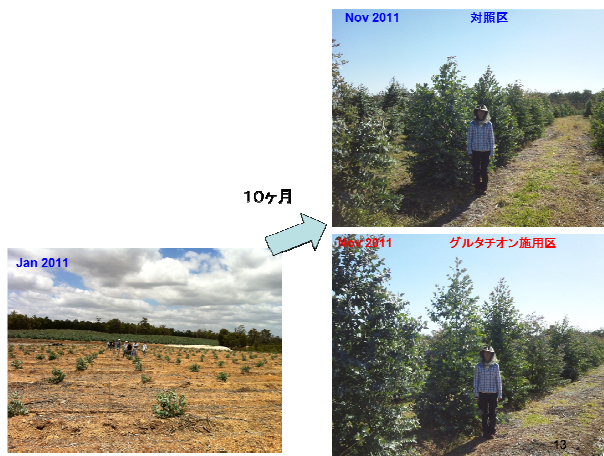


図2. グルタチオン施用区および対照区に生育するユーカリの様子。左図：施用後 4 ヶ月後。右図：施用後 14 か月後の対象区とグルタチオン施用区の植物。

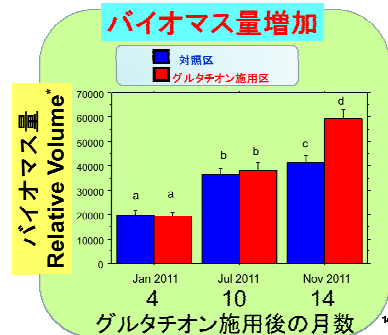


図3. グルタチオン施用区によるバイオマス量の推移。植栽後 2 年目のクローン木にグルタチオン施用し、その後の容積の推移。

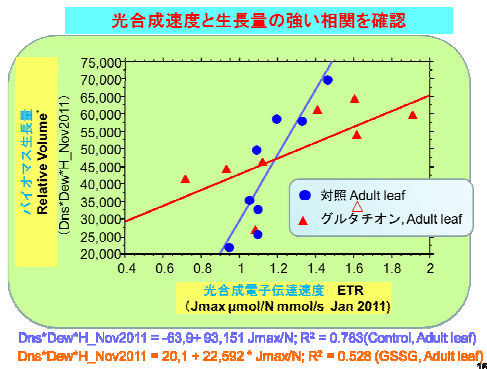


図4. 光合成量とその後の生育量との相関。

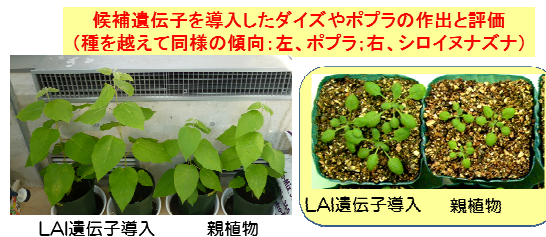


図5. シロイヌナズナで有望視した遺伝子をポプラに導入した場合の表現型の例。

そこで、今後は、その最大値を見極める調査を継続する。また、フィールドからのサンプリングによって、炭素の年間固定量や品質・材質の変化等についてのデータ精度を高める。世界でも類を見ないレベルでの、光合成の促進効果(対照区比 150%)のデータの取得について、分析精度と信頼性を高めるため、今年度に購入した光合成測定器を最大限活用する。

・組換えダイズおよびポプラの評価を開始し、ポプラでは、シロイヌナズナでのメカニズムに想定される遺伝子で、シロイヌナズナとみられた表現型が観察された(図5)。最終的には、複数の遺伝子導入の効果を遺伝子プロモーターの発現調節で最適化し、バイオマス生産性の向上技術を目指しているが、本年度は、成長解析と材質の評価をすることで、生育のどの段階でもっとも導入遺伝子の効果が得られるのかを見積もる。ダイズでも同様な遺伝子の導入によってシロイヌナズナやポプラと同様な表現型が確認されると期待される。技術の重要性和想定メカニズムの普遍性を明ら

かにするために、ダイズでの組換え体の評価を行う。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Aya Hatano-Iwasaki, Ken'ichi Ogawa (2012) "Biomass production is promoted by increasing an aldolase undergoing glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*.", International Journal of Plant Developmental Biology 7, 2012 (in press).
2. Naoki Negishi, Kazuya Nanto, Kazunori Hayashi, Shinichi Onogi and Akiyoshi kawaoka, "Wood quality-related gene expression of *Eucalyptus globulus* grown in greenhouse", BMC Proceedings, Vol.5, Supple 7, pp.115, 2011 (DOI: 10.1186/1753-6561-5-S7-P115)
3. Naoki Negishi, Masatoshi Oishi and Akiyoshi Kawaoka, "Chemical screening for promotion of adventitious root formation in *Eucalyptus globulus*", BMC Proceedings, Vol.5, Supple 7, pp.139, 2011 (DOI: 10.1186/1753-6561-5-S7-P139)
4. Aya Hatano-Iwasaki, Ken'ichi Ogawa, "Increased glutathione biosynthesis induces a gene expression pattern observed during seed vernalization treatment in *Arabidopsis thaliana*", Plant & Cell Physiology 53, 2012 (in press)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 2 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 4 件)