

「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

H24 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) (小川グループ)

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

・グルタチオンによる CO₂ 固定促進機構の更なる解明

 気孔数の制御とグルタチオンとの関係について

 CO₂ 固定とグルタチオン制御との関係について

 転流におけるグルタチオンとの関係について

 窒素吸収とグルタチオンとの関係について

・ダイズとポプラの遺伝子組換え体の表現型の評価

・グルタチオン施用によるユーカリおよびダイズ、キャッサバ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) (山田グループ)

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形質評価

(3) 光合成・転流制御グループ(3) (藤巻グループ)

①主たる共同研究者:藤巻 秀(日本原子力研究開発機構量子応用研究所、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) (田野井グループ)

①主たる共同研究者:田野井慶太郎(東京大学大学院農学生命科学研究科、准教授)

②研究項目

- ・ダイズ、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) (西村・京大グループ)

- 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と解析

(6) オイル蓄積制御グループ(2) (西村・基生研グループ)

- ①主たる共同研究者: 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解析
- ・ダイズ油脂の蓄積過程の詳細な解析
- ・ダイズのオイル集積能を増大させる改変型遺伝子の組換えダイズの作出と評価

(7) バイオマス蓄積制御グループ(1) (高部グループ)

- 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
- ・グルタチオン施用植物の顕微鏡レベルでの解析
- ・グルタチオン施用による共発現遺伝子群の遺伝学的解析

(8) バイオマス蓄積制御グループ(2) (河岡グループ)

- ①主たる共同研究者: 河岡 明義(日本製紙株式会社、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

(9) バイオマス蓄積制御グループ(3) (関グループ)

- ①主たる共同研究者: 関 原明(理化学研究所、チームリーダー)

②研究項目

- ・グルタチオン施用によるキャッサバの生産性評価
- ・グルタチオン技術関連遺伝子導入によるキャッサバの生産性評価

§ 2. 研究実施内容

最終目標として、面積あたりの二酸化炭素固定促進効果について、現状技術の 2 倍の効果をもたらす技術の確立を目指しているが、H24 年度には、予定していた計画項目に対してグルタチオン技術の効果を高めるための進捗もあり、下記には、今後の方針も踏まえてその進捗を説明する。

1. グルタチオンの CO₂ 固定促進とバイオマス生産性向上の基盤構築

【光合成系】

・ グルタチオン投与による CO₂ 固定の促進は、受光した光エネルギーの熱エネルギーへの放散が抑制され、光利用効率が高められたことによる電子伝達速度の向上によることを明らかにした。藻類でも全く類似の表現型となったことから、このメカニズムは藻類から陸上植物まで普遍と考えられた。

・ さらに、投与実験と組換え体解析によって、グルタチオンが CO₂ 固定を促進する際に必要な分子は、これまでにグルタチオンと結合することが明らかになった新規な CO₂ 固定回路酵素 FBA1 であり、FBA1 量を増加させた植物体は、その増加量に応じて CO₂ 固定能力が高められることを明確化した。

・ しかし、グルタチオンが結合するアミノ酸残基は藻類には保存されておらず、しかも、光捕捉アンテナ複合体が欠損した場合、グルタチオンの CO₂ 固定促進効果は、縮小するもの、ゼロにならない。つまり、グルタチオンは光化学系にも影響を与えていることが新たに明らかになった。

そこで、光合成・転流制御グループでは、平成 25 年度には、グルタチオンで制御される光化学系タンパク質の同定を試みる。これにより、植物が過剰な光エネルギーを感受する機構にグルタチオンが関わる機構について考察できるようになり、グルタチオンによって効果的に光エネルギーを還元力に転換させるための基盤的に知見になりうると考えられる。また、ダイズやイネ、ポプラに導入した形質転換体の生産性の高さが見え始めている。H 25 年度は、そうした組換え植物の代謝変化とグルタチオン投与との関係について全グループの協力により評価することで、グルタチオンによる CO₂ 固定促進メカニズムのさらなる理解を深め、最新の科学的な知見をうるだけでなく、技術の高度化に向けた基盤を整備する。

・ グルタチオン施用は、気孔数や大きさを変化させたが、光合成促進の場合とは、その量依存性が異なることから、気孔制御と光合成制御の作用点が異なることが明らかになった。一方、ユーカリなどでは、CO₂ 固定促進に最適なグルタチオン施用量でも、気孔による CO₂ 吸収は最適化されていなかった。Stomagen によって気孔数を増加させた植物の葉の CO₂ 固定が改善されることが明らかになったことを考え合わせると、グルタチオン施用の効果を最大限高めるためには、依然として気孔制御が重要である可能性がある。H25 年度以降も、オイル蓄積グループと光合成・転流グループは共同で組換えダイズを用いて、気

孔制御によるグルタチオン施用効果の増幅効果について検討する。

【転流系】

・グルタチオンは、光合成速度だけでなく、転流系に作用し、転流量を変化させることが明らかになった。 H25 年度以降、光合成・転流グループおよびオイル蓄積グループの共同で、転流量が変化する組換え体系統があるかについてスクリーニングし、見出した場合には、光合成促進とシンクへの流れ（次の進捗説明との関係）との関係について調査する。特に転流を行うことができない藻類との違いからも、注目したい。

【シンク系<バイオマス蓄積制御>】

・グルタチオン施用によって収穫目的物の増収を目指す場合、時期特異性や品種特異性等があり、ターゲットとするシンク器官の性質や発達時期を見極め、その適正に応じて作用させることが重要であるが、H24 年度までの結果から考察された。 地上部全身がシンクであるユーカリの場合とイモが大きなシンクであるキャッサバでは、その作用効果は収穫物としては大きく異なった。 また、日本産のダイズの場合、グルタチオン施用は、種子量の増加分のオイル増収は認められたものの、むしろ、タンパク質含量が高まった。 つまり、残念ながら、グルタチオンは、直接的に目的シンク器官への流れを制御するわけではなさそうであることが考察された。

一方で、H24 年度までに、グルタチオン施用による共発現遺伝子群には、バイオマス蓄積に関係ある遺伝子が含まれている可能性がバイオマス蓄積制御グループから示された。その変異体および組換え体解析によって、共発現遺伝子の転流やバイオマス蓄積との関係について調査し、グルタチオン施用によるバイオマス蓄積増幅効果が期待できるかを評価したい。

【栄養素吸収】

・グルタチオン施用した植物（ユーカリやダイズ、シロイヌナズナ）の安定同位体分析やパルスチェイス実験によって、グルタチオン施用が、栄養素であるNやPの吸収を変化させることが明らかになった。 特に、安定同位体標識した窒素化合物の実験から、エネルギー的には有利だが、通常は毒性が高いために取込が制限されるアンモニアの吸収が促進されることが明らかになった。つまり、グルタチオンによる増収効果を高めるためには、施肥管理自体が重要であることが明らかになった。これは、多くの全く異なった条件で行ったフィールド試験の結果を包括的に解析した結果から得られたものである。逆に、H24 年度までの結果を踏まえて、H25 年度以降の試験では、バイオマス蓄積グループと光合成転流制御グループ共同で、積極的にN施肥効果との関係について考察できるための実験に取り組む（フィールド試験との関係）。

2. 開発技術のポテンシャルの評価

・通常、植物は植栽密度が高まるにつれ、個体あたりのバイオマス量は減少し、面積あたりのバイオマス生産性には上限が存在する。ところが、H24 年度までに実施したシロイヌ

ナズナの栽培試験では、グルタチオンは、植栽密度による効果を打ち破り、面積あたりのCO₂固定能力を増進し、栽培密度が高まるにつれてバイオマス生産性がさらに高めることが明確化した。また、豪州のユーカリ調査地でも同様の傾向が観察された。つまり、この面では、当初の想定のとおり、面積ベースでのバイオマス蓄積促進を促す技術として、本技術が有用であることが明確化した。技術のポテンシャルという意味では、ブラジル、豪州、徳島、京都で行ったユーカリ植林地の途中結果では、気象要因以上に施肥の重要性が明らかになり、現状 6 か月で 20~30%程度以上（1 年間で最大 5 割前後以上）のバイオマス増産が期待されるものの、施肥が全く最適化されていないことから、その面での基盤知見を強化すべく、H25 年度の徳島での試験地では、N施肥を工夫したグルタチオン投与実験を行う予定である。H24 年度に実施した掘り起し調査では、ユーカリの細根の発達が著しいことが観察され、経験的に得られていた「事前グルタチオン施用、その後の施肥」の重要性が裏付けられる形となったので、想定ポテンシャルが飛躍的に高まることを期待したい。一般に、植栽から伐採までのユーカリ植林の材積の変化のうち、初期の生育差は、最終的な差と相関している。さらに、変化の推移は指数関数的な曲線を描くので、グルタチオン施用によるバイオマス増産の上限が実際にどの程度になるのかは、このプロジェクトの最終まで継続して明らかにしたい。

H24 年度から国際共同研究支援で実施した「キャッサバ増産に向けた課題」では、組換え体の作製と生産性評価を行う予定にしておき、現在、組換え体作製の育成中である。一方、グルタチオンによる根系発達が著しい（必ずしも根バイオマス量が増すことにはならないが）ことに注目してのキャッサバプロジェクトの追加提案であったので、技術のポテンシャルをキャッサバでも評価すべく、ベトナム国内 2 か所でグルタチオン投与のフィールド試験を実施した。ここでは、グルタチオンの土壌吸着や pH などの影響を評価すると同時に、グルタチオン施用のタイミングを解析できるように数多くの試験プロットを各試験地に設定した。ベトナムの収穫は 1 月までに実施した。土地のばらつきのあるものの、重回帰分析の結果、キャッサバ塊根の形成が開始されて以降のグルタチオン施用が効果的であることが判明し、プロットによっては、顕著な収量区（対照区 18~20 トン程度／ヘクタールに対し、最大 30 トンを超える）が認められた。一方、地上部の生育にそれほど差は認められず、「グルタチオンはもともとのシンク器官への流れを強める働きをするが、その流れを大きくは変えない」という H24 年度までに実施した研究に対する考察と矛盾しない結果となった。ユーカリやダイズ、シロイヌナズナで施肥タイミングと種類の重要性が明らかになってきたので、その点も踏まえて、H25 年度からは、施肥や土壌の栄養状態についての視点を重視して、解析を行う。ポテンシャルの上限をさらに評価するフィールド試験を日本グループとベトナムグループと共同で実施したい。

国内のダイズフィールド試験では、増収効果の絶対値がさらに高められた 4 トン／ヘクタール以上の増収が確認された（国の目標は 3 トン／ヘクタールの安定収量を目標としており、2011 年の日本の全国平均は 1.6 トン／ヘクタール）。シンクの変化についての考察を

組換え体以外でも確認する意味で、欧米の搾油品種での試験をポットレベルで行い、面積ベースで現状の2倍のオイル生産増収が見込めるかを見極めたい。



図1. グルタチオン施用によるユーカリ樹の根系の発達
 グルタチオン無施用区(左)、グルタチオン施用区(右)
 重機と人手15人で掘り起した結果、ユーカリでも根系の発達が確認された。

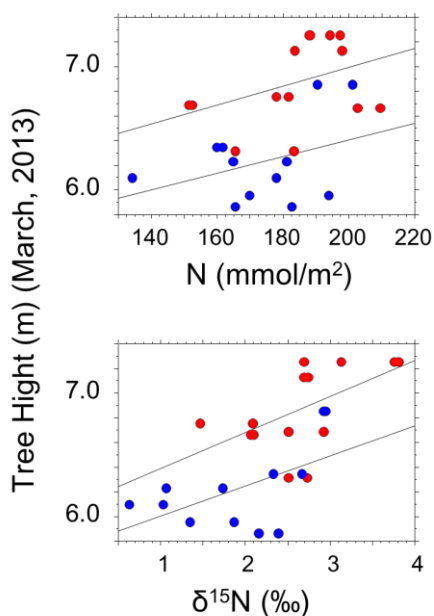


図2. 葉身の窒素含量およびN安定同位体比
 グルタチオン施用区(赤)により葉内窒素量が向上し、それに応じて生育が促進されたと考えられた。

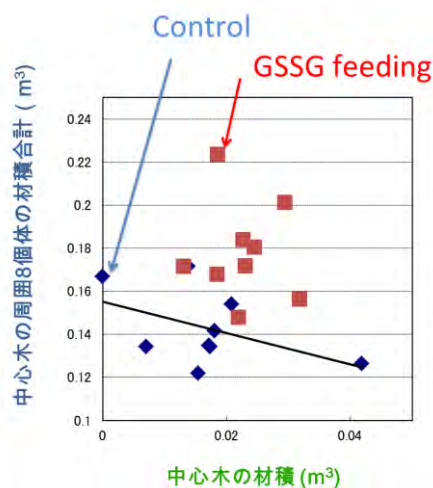


図3. 西豪州試験地のユーカリ植林
 中心木を囲む周囲木とそれぞれの材積をプロットした。グルタチオン施用区の方が、面積ベースのバイオマス生産性が高いことが明らかになった。



図4. 西豪州フィールドのユーカリ植林における光合成測定の様子



図5. ベトナムでのキャッサバ収穫の様子

§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, “Overexpression of GSH1 gene mimics transcriptional response to low temperature during seed vernalization treatment of *Arabidopsis*.”. *Plant & Cell Physiology* 53, 1195-1203, 2012 (DOI: 10.1093/pcp/pcs075v1/53/7/1195)
2. Yu Tanaka, Shigeo S. Sugano, Tomoo Shimada, and Ikuko Hara-Nishimura “Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in *Arabidopsis*”. *New Phytologist*, 198, 757-764 (DOI: 10.1111/nph.12186)
3. 小川健一、「グルタチオンによる澱粉バイオマスの増産」、*化学と生物* (accepted)

(3-2) 知財出願

- ①平成 24 年度特許出願件数(国内 2 件)
- ②CREST 研究期間累積件数(国内 6 件)