

日産科学振興財団助成研究

特別研究課題

植物環境応答機能を利用した樹木炭酸ガス吸収能拡大

成果報告書
(2008年～2010年)

研究代表者

横田明穂

(奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 教授)

共同研究者

明石欣也

(奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 助教)

蘆田弘樹

(奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 助教)

2011年7月22日 提出

1. 特別研究課題の概要

・研究の学術的・社会的意義

我々に課せられた緊急の課題は、気候変動を抑えるために、石油などの化石燃料に頼らず、地球がその営みの中で持続的に生み出すことができる自然エネルギーへの移行である。ヤトロファ (*Jatropha curcas* L.、和名：ナンヨウアブラギリ) はトウダイグサ科 (Euphorbiaceae) の顕花植物で、その種子は毒性を持ち、30~40%の低温融解性油脂を含む。油脂生産性は1.75 トン/ha/年で、ダイズ油脂の10 倍程度である。地球上での生育可能範囲は南北回帰線で挟まれる範囲で、高温多湿を好むが、環境ストレスに強く半燥地での生育も可能である。現在、ヤトロファ油脂のメチルエステル化によるディーゼル燃料生産プロジェクトが、アフリカ、東南および南アジアと欧米との合同プロジェクトとして活発化している。本特別研究課題においては、我々がこれまでの研究で見出し、現在知財化を目指して研究を進めている光合成強化と乾燥・強光ストレス耐性遺伝子をヤトロファ植物に導入してその生産性を飛躍的に向上させるための基盤技術開発を目的として研究を行った。

・研究概要

樹木の光合成は、その構造的特徴から乾燥・強光などの環境要因により葉内CO₂濃度が低下しやすく、非効率で高リスクな生産性を余儀なくされている。しかしながら植物科学が過去10 年間に獲得してきた研究成果は、樹木光合成を律速する負の要因を解決する基盤的技術を提供し始めている。本研究は、基礎植物科学の樹木への展開に焦点を絞り、樹木光合成の環境ストレス耐性能を飛躍的に向上させ、樹木生産性の拡大を図ることにより環境CO₂削減に資する理想型樹木光合成の実現を目指すものである。具体的には、極限環境ストレス下においても高度な生産能力を示す砂漠植物や原始紅藻が有する高付加価値遺伝子資源を探索利用し、それら有用遺伝子群を、次世代型の燃料植物として期待されているヤトロファへ遺伝子導入し、環境調和型の生産性強化樹木を創出するための基盤技術の確立を図る。

- ・ 研究内容

植物光合成は、葉の細胞内小器官である葉緑体で行われる太陽エネルギー固定反応である。一般に植物においては、葉表面に存在する気孔を通してCO₂を吸収すると同時に、その際に気孔から水が蒸散し、蒸散水の気化熱によって葉面温度は低く調整される。根系から葉までの距離の短い草本植物は、葉の水分含量を高く保つことができ、気孔は全開可能である。その結果、光合成中の葉内のCO₂濃度は大気中の70%程度となる。しかしながら、土壌水から光合成組織である葉までの距離が長いヤトロファを含む木本植物では、水の確保が難しく、気孔を全開することができない。その結果、葉は水の蒸散を抑制する代わりに葉内のCO₂濃度が低くなり、大気の半分以下のCO₂濃度で光合成することを強いられている。したがって、樹木地上部の最先端では直射日光が照射され太陽エネルギーは豊富に存在するが気孔が閉鎖気味で葉内CO₂濃度は低く、生産性は葉が有する光合成能力ほどには達せず、逆に活性酸素の生成など、光酸化ストレスを蒙る危険性が大きい。このように、樹木の光合成は、その生産性において多くの不都合を不可避的に有している。言わば、非効率、高リスク、低生産性プロセスであるが、これらの負の要因は、植物科学が過去に研究してきた成果で解決可能な過程であり、本研究はまさにそこに焦点を絞り、樹木生産性の拡大を図ることによって環境CO₂削減に資する理想型樹木光合成の実現を目指すものである。

本特別研究課題では、これまでの研究で獲得してきた光合成強化遺伝子とストレス耐性遺伝子をヤトロファに導入するための（1）ヤトロファ核形質転換系の確立と（2）ヤトロファ葉緑体形質転換系の確立を目指した。また、ヤトロファは遺伝的多様性が大きく、最終的な生産栽培地帯に適合する精鋭ヤトロファの選定が重要であり、さらにヤトロファの栽培域である熱帯・亜熱帯および乾燥地域での栽培実験が不可欠であるため、当面の生産栽培地としてインドネシアとボツワナを選び、これら地域との（3）ヤトロファの海外連携研究を行った。さらに、ヤトロファの光合成機能・ストレス耐性能強化を行うための有用遺伝子探索と技術確立のために、（4）野生種スイカからの環境応答遺伝子の単離と機能解析と（5）光合成CO₂固定酵素ルビスコに機能強化部位を導入した植物の創成とその植物体の解析を行った。

・ 3カ年の目標値

1. ヤトロファ核と葉緑体の形質転換系の確立

2. 環境応答遺伝子の単離と機能解析

3. ルビスコ機能強化部位の植物における評価

4. 1の技術を利用した2と3成果のヤトロファへの応用と評価

・ 研究従事者と研究分担

研究代表者：横田明穂（国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 教授）
本研究プロジェクトの全進行指揮と統括

共同研究者1：明石欣也（国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 助教）

（1）ヤトロファの核形質転換系の確立、（3）ヤトロファの海外連携研究、（4）野生種スイカからの環境応答遺伝子の単離と機能解析に関する研究を担当した。

共同研究者2：蘆田弘樹（国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 助教）

（2）ヤトロファの葉緑体形質転換系の確立、（5）ルビスコに機能強化部位を導入した植物の創成とその植物体の解析に関する研究を担当した。

2. 研究成果の総括

(1) ヤトロファの核形質転換系の確立 (報告者：明石欣也、梶川昌孝、横田明穂)

ヤトロファ熱帯樹はその種子における油脂生産性が驚異的に高く、熱帯から亜熱帯にかけての荒廃地砂漠等の緑化のみならず、バイオ・ディーゼル燃料の原料供給源として、次世代の本命として期待が集まっている。本研究では、インドネシア共和国ボゴール農業大学生物資源バイオテクノロジー研究センター、およびボツワナ共和国農務省農業研究部とともに、高生産性ヤトロファ熱帯樹を分子育種しその生産性を拡大する技術を共同で確立することを最終目標として、油脂生産植物ヤトロファの再分化実験系と、ヤトロファへ外来有用遺伝子を導入する際の諸条件を検討した。ヤトロファは、形質転換が困難な植物として知られていた。そこで、新規な選抜マーカー遺伝子の検討や、植物ホルモンの多段階処方による不定芽および発根の促進など、新規な形質転換プロトコルの開発を行った。その結果、形質転換カルス、形質転換シュートおよび発根個体を作成選抜する個々の工程効率を飛躍的に向上させることに成功し、形質転換ヤトロファ個体を取得する一連の技術を確立することができた。そこで、本手法を用いて、根成長促進因子である DRIP-49 遺伝子をヤトロファに導入することを試み、同遺伝子を導入した遺伝子組み換えヤトロファの作出に成功した。

ヤトロファ核ゲノムへの遺伝子組み換え技術の確立



目標に対する達成度と今後の課題：

遺伝子組換えヤトロファの作出に関しては、当初は非常に効率が悪く外来遺伝子の導入が困難であった。しかしながら、本研究により、ヤトロファ植物に生産性を倍加させる遺伝子を導入するための、遺伝子組み換え技術の確立に成功した。このように、分子育種によりヤトロファの生産性を向上させる技術手法を本プロジェクトにおいて完成させ、本目標を達成することができた。今後は、有用遺伝子を導入したヤトロファの育種をさらに積極的に行うとともに、海外パートナーと連携して、熱帯・亜熱帯・乾燥地において有用ヤトロファを機能評価するための植物バイオ技術をさらに発展させていく予定である。

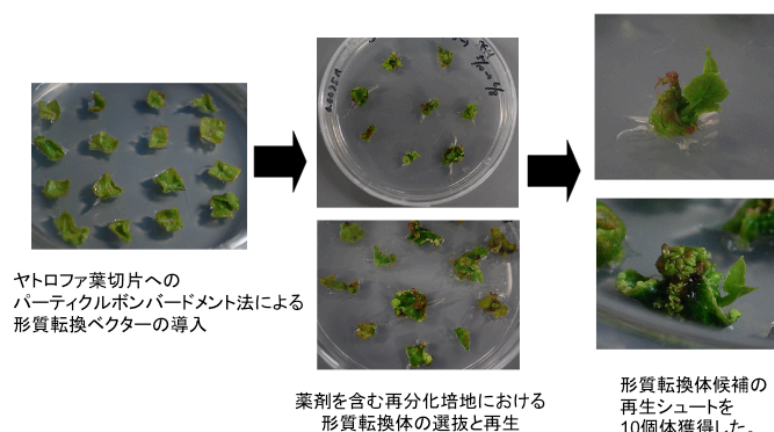
(2) ヤトロファの葉緑体形質転換系の確立（報告者：蘆田弘樹、横田明穂）

これまで、葉緑体形質転換により、光合成強化遺伝子やストレス耐性遺伝子を植物葉緑体ゲノムへ導入することにより、光合成機能向上と生産性向上が報告されている。特に、光合成CO₂固定回路の律速段階をラン藻由来のフルクトースビスリン酸／セドヘプツロースビスリン酸ホスファターゼ遺伝子を葉緑体ゲノムへ導入発現させて解除することによって、タバコにおいて光合成CO₂固定速度を1.7倍、乾燥重量を1.8倍に増加させることが可能である。この生産性向上技術をヤトロファに応用することができれば、ヤトロファ油脂生産量の増加が期待できる。しかし、葉緑体形質転換技術は、主に草本植物でしか確立されておらず、樹木に応用された例はポプラのみである。これは草本植物と比較して、ゲノム情報、組織培養・再分化・薬剤選抜系に関わる知見が樹木において不足しているからである。そこで、本研究では、これらの問題点を解決しながら、ヤトロファの葉緑体形質転換系の確立を目指し研究を行った。葉緑体形質転換実験のモデルとなっているタバコの系をそのままヤトロファへ持ち込み、形質転換を行ったが、遺伝子導入の成功には至らなかった。そこで、ヤトロファ葉緑体ゲノムから取得した多数の遺伝子発現制御配列を利用したヤトロファに最適化した形質転換ベクターの開発、再分化条件、選抜薬剤、パーティクルボンバードメントによる遺伝子導入条件等の検討を行い、外来遺伝子である葉

剤耐性遺伝子が導入されると期待される形質転換候補植物体を得ることに成功した。

なお、これらの成果は、株式会社植物ハイテック研究所との共同研究によるものである。

ヤトロファの葉緑体形質転換体候補の取得



目標に対する達成度と今後の課題：

今回、ヤトロファ葉緑体ゲノムへの遺伝子導入の一連の基盤技術を作製することができたと考えている。今後は、まず、現在得られている形質転換候補植物体の葉緑体ゲノムの目的位置に、目的遺伝子が正確に導入することができるかを解析する必要がある。目的遺伝子の導入が確認できれば、ヤトロファの葉緑体形質転換系が確立できたことになる。この場合、形質転換効率を高めるための系の最適化を行い、FBP/SBPaseなどの光合成機能強化遺伝子の導入を行うことで、ヤトロファの生産性50%増加の実現が大いに期待できる。

(3) ヤトロファの海外連携研究（報告者：明石欣也、横田明穂）

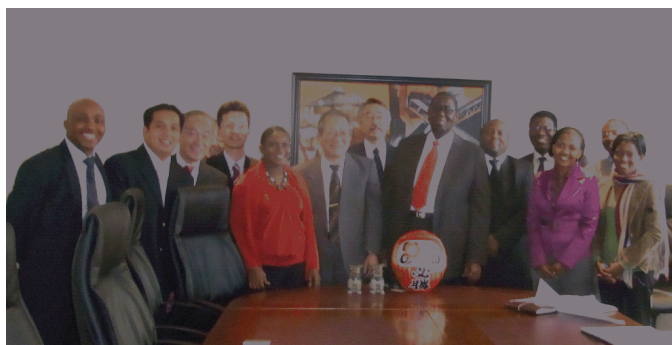
ヤトロファによる循環型バイオ・エネルギー社会を確立していくためには、その栽培域である熱帯・亜熱帯および乾燥地域での栽培実験が不可欠である。そこで、様々なヤトロファ系統植物を亜熱帯・熱帯およびサバンナ地域隔離圃場で生育検定するために、インドネシアおよびボツワナにおいて、ヤトロファ生産性検定に特化した温室および圃場を共同で整備し、コントロールとなる野

生株ヤトロファ苗の生育試験を開始した。インドネシアにおいては、西ジャワ地域において、種子収量の高い高生産型ヤトロファが選抜されていた。そこでボゴール農業大学と連携し、同品種の DNA 分子マーカーを取得することに成功し、さらなる育種に向けての基盤データを取得した。またボツワナにおいては、カラハリ砂漠の一带において、現在までに 44 系統のヤトロファ固有種が見出されていた。そこでボツワナ共和国農務省農業研究部とともに、これらの系統を評価するために、その生産性およびストレス耐性試験を行った。その結果、厳しい乾燥冷害気候に対して耐性を示すいくつかのヤトロファ系統を見出した。後者については、本プロジェクトにより共同研究交流が促進されたことにより、ボツワナ・農務省研究部および資源省と、奈良先端大および琉球大学による共同研究提案が、JST および JICA の共同事業である SATREPS（地球規模課題対応国際科学技術協力事業）に、本研究室の明石欣也を研究代表者として、H23 年度において暫定採択された。今後 5 年間の事業本格的始動に向け、日本とアジア・アフリカ間の共同研究活動が非常に活発になっている。

バイオ燃料植物ヤトロファの国際プロジェクト始動

地球規模課題対応事業 (SATREPS: JICA -JST) に採択 (H23-H28)

研究代表者: 明石 欣也 (奈良先端大・バイオ・助教)
Benoni Erskine (ボツワナ資源省エネルギー局長)



目標に対する達成度と今後の課題：

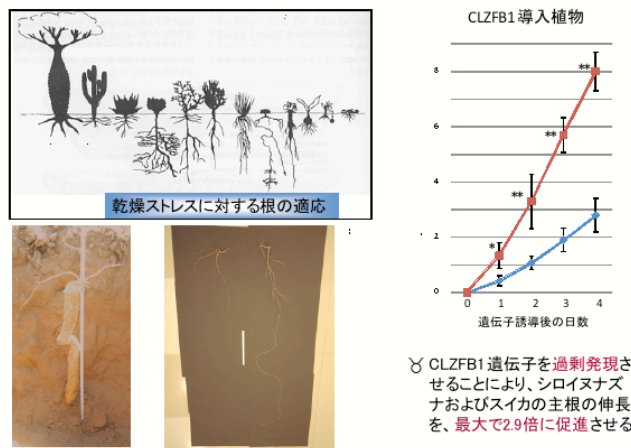
上述のように、ヤトロファの海外連携研究は、極めて順調に目標を達成することができた。特に上述した SATREPS プロジェクトにおいては、インドネシア生物資源に由来するヤトロファ系統に、ボツワナ生物資源に由来する有用遺伝子を導入することで、乾燥地・熱帯地でのヤトロファ生産性拡大を図ることを目的とするものであり、ヤトロファ国際連携研究は、さらに活発になると期待

される。今後は、研究および事業の発展に伴って、人的育成の強化が重要となると考えられ、同分野における体制づくりが望まれる。

(4) 野生種スイカからの環境応答遺伝子の単離と機能解析 (報告者: 明石欣也、梶川昌孝、横田明穂)

荒廃地において植物生産性を改善するためには、その根系の発達を促進させて水分獲得能力を向上させることが有効である。ボツワナのカラハリ砂漠に自生する野生種スイカは、乾燥化でその根系を高度に発達させる。そこで、野生種スイカのプロテオーム情報およびトランスクリプトーム情報を実験的に収集し活用することで、根系発達の形質を担う遺伝子を探索した。さらに、候補遺伝子の機能解析を行うために、野生種スイカの毛状根遺伝子導入実験系を構築し、根の発達を正に制御する因子を探索同定した。その結果、当研究室によりプロテオーム解析により単離していた DRIP-49 遺伝子に加え、新たに CLZFB1 遺伝子を単離した。本遺伝子を、誘導型遺伝子発現ベクター pER8 にクローニングして毛状根に導入した場合、 β -estradiol により CLZFB1 遺伝子を過剰発現させることにより、毛状根の伸長が顕著に促進されることが見出された。また、同遺伝子をシロイヌナズナに導入し過剰発現させることにより、同様に根の生長が促進されることを見出した。これらの結果は、CLZFB1 遺伝子が、先に同定されていた DRIP-49 遺伝子と同様に、野生種スイカの根の伸長を正に制御する因子であることを示唆している。また、これらの遺伝子を過剰発現体させることにより、ヤトロファの根系発達を促進させ、荒廃地でのヤトロファ生産性を改善できることが期待された。

転写因子CLZFB1は、根伸長促進を正に制御する



目標に対する達成度と今後の課題：

砂漠植物の形質に着目し、その根の伸長促進に関与する新規遺伝子の単離同定に成功し、研究目的を達成することができた。今後は、上述の CLZFB1 および DRIP-49 遺伝子の作用機序をさらに詳細に解析するとともに、これら有用遺伝子を活用して、荒廃地での植物生産性を強化させるための研究開発にさらに力を入れる必要がある。

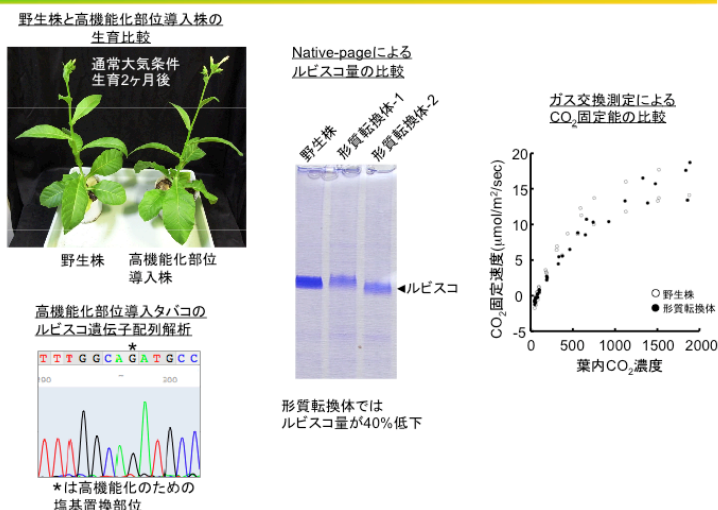
(5) ルビスコに機能強化部位を導入した植物の創成とその植物体の解析
(報告者：蘆田弘樹、横田明穂)

光合成 CO_2 固定酵素ルビスコの酵素特性は、植物にとって劣悪である。 CO_2 固定速度は 2-3/秒/反応部位と極めて遅く、更に O_2 を CO_2 と誤認識して反応するため、その能力は 25%程度しか発揮できていない。植物はルビスコ CO_2 固定の非効率性を克服するために、大量にルビスコを合成蓄積し、水の損失も顧みず CO_2 取り込み口（同時に水の損失口）である気孔を大きく開けて光合成を行っている。それでもなお、ルビスコが植物の CO_2 固定のボトルネックとなっているのが現状である。一方、ヤトロファを含む樹木の光合成はルビスコの劣悪さに加え、光合成器官である葉が地表から高く、葉への水の供給が草本類に比べ低い。この二重苦が原因で、樹木葉の光合成能力は一般的に高くない。ヤトロファを含む樹木の光合成機能を向上させるためには、 CO_2 への親和性が高く、 O_2 と反応性が抑制されたルビスコを利用させることが重要であると考えられる。これまで、本研究者は、 CO_2 親和性が高く、 O_2 との反応性が植物ルビスコよりも大きく抑制された紅藻由来のルビスコから、このルビスコの高機能性を可能としている部位を同定してきた。実際、植物ルビスコのモデルとして研究されているラン藻ルビスコへこの部位を導入することにより O_2 反応性を 17%抑制することに成功している。そこで、このルビスコ高機能化部位をルビスコに導入したタバコを作製し、その効果を評価することを目指した。

葉緑体形質転換によりタバコ葉緑体ゲノムにコードされるルビスコラージサブユニット遺伝子に高機能化部位を導入するための変異導入を行った。得られた形質転換体の葉緑体ゲノムのルビスコ遺伝子配列解析を行った結果、高機能

化部位導入のための変異導入が正確に行われていることが分かった。また、葉緑体ゲノムはマルチコピーで存在するが、ほとんどの葉緑体ゲノムが高機能化部位導入ルビスコ遺伝子に置換された葉緑体ゲノムであることを確認した。通常大気条件下での生育は、野生型と導入株で変わらなかった。ルビスコを高機能化部位を導入していないコントロール植物体と高機能化部位導入タバコのルビスコ合成量と生葉における光合成CO₂固定速度を解析した結果、導入植物体はルビスコ量が約40%低下していたにも拘わらず、CO₂固定速度はコントロールと殆ど変わらなかった。これらの結果から、導入タバコにおける高機能化部位を導入したルビスコの活性化率が高くなっている、またはCO₂固定効率が高くなっていることが予想された。

ルビスコ高機能化部位を導入したタバコの創成と解析



目標に対する達成度と今後の課題：

本研究により、ラン藻ルビスコにおいてO₂反応性を17%抑制できる高機能化部位を導入したタバコ葉緑体形質転換体の創成に成功した。解析の結果、形質転換体における高機能化部位導入ルビスコは、活性化率が野生株よりも高くなっている、またはCO₂固定能力が高くなっている可能性が示唆された。今後、形質転換体の葉からルビスコを精製し、CO₂親和性、CO₂固定速度、O₂反応性などの酵素特性を解析し、野生型ルビスコと比較することで、高機能化部位導入効果の分子的效果を評価する必要がある。また、将来的にヤトロファ葉緑体形質転

換系が確立されれば、この高機能化部位を導入したルビスコを利用してヤトロファの光合成 CO₂ 固定能強化が期待される。