ISSN 1349-0605

森林総合研究所

交付金プロジェクト研究　成果集　37

環境保全に貢献するスーパー樹木の創出に向けた基盤技術開発

独立行政法人　森林総合研究所

２０１１．１２

「交付金プロジェクト」は、平成１３年度に森林総合研究所が独立行政法人となるにあたり、これまで推進してきた農林水産技術会議によるプロジェクト研究（特別研究など）の一部、および森林総合研究所の経費による特別研究調査費（特定研究）を統合し、研究所の運営費交付金により運営する新たな行政ニーズへの対応、中期計画の推進、所の研究基盤高揚のためのプロジェクト研究として設立・運営するものである。

この成果集は、交付金プロジェクト研究の終了課題について、研究の成果を研究開発や、行政等の関係者に総合的且つ体系的に報告することにより、今後の研究と行政の連携協力に基づいた効率的施策推進等に資することを目的に、「森林総合研究所交付金プロジェクト研究成果集」として公表するものである。

ISSN1349－0605

森林総合研究所交付金プロジェクト研究成果集３７

「環境保全に貢献するスーパー樹木の創出に向けた
基盤技術開発」

発行日　平成23年12月31日

発　行　独立行政法人森林総合研究所

〒305－8687茨城県つくば市松の里１番地

電話 029－873－3211（代表）

序　文

植物のバイオテクノロジーの進展により、様々な遺伝子組換え作物が開発され、その栽培国と作付面積は年々増加している。我が国でも、平成 21 年からサントリーの開発した「青いバラ」の栽培が岡山県で開始されている。この遺伝子組換え技術を活用して植物の機能を最大限に発揮させることができれば、人類を取り巻く地球規模の環境問題、エネルギー問題、食料問題などの解決が可能になる。

平成 15 年 12 月イタリアのミラノで開催された第 9 回気候変動枠組条約締約国会議(COP9)で、CO_2 吸収源として換算する植林に組換え樹木の使用が条件付きで認められた。2025 年までを視野に入れた成長に貢献するイノベーションの創造のための長期戦略指針「イノベーション２５」（平成 19 年 6 月 1 日閣議決定）でも、「環境保全に貢献するスーパー樹木の開発」の重要性が指摘され、初めてスーパー樹木という言葉が使用された。ここでは、スーパー樹木とは遺伝子組換え樹木（genetically modified trees）のことを指しているという。林野庁は、「森林・林業分野における遺伝子組換え技術に関する研究開発の今後の展開方向について」（平成 19 年 8 月 31 日）をプレスリリースしており、地球温暖化軽減に貢献する組換え樹木の開発のためには、ゲノム情報の基盤整備、乾燥耐性・耐塩性等環境ストレス耐性の付与技術、バイオマス生産を向上させるための成長制御技術や実用化に向けた花成制御技術等が必要であるとしている。ＢＴ戦略推進官民会議は、バイオテクノロジーの推進により活力ある日本を築くため、「ドリームＢＴジャパン（バイオテクノロジーによるイノベーション促進に向けた抜本的強化方策）」（平成 20 年 12 月 11 日）をまとめた。森林分野では、「バイオテクノロジー研究で得られた情報のデータベース化・生物遺伝資源の保存により、国民共有の財産としての研究や医療、農業等に活用するための研究基盤整備」、「環境に優しい低酸素社会実現と環境修復のための技術開発と実用化支援」が重要と考えられる。

植物の遺伝子組換えが初めて成功してから約 25 年が経ち、その間に樹木を含む数多くの植物種で遺伝子組換えが可能となった。組換え作物などの商業栽培が各国で開始され、組換え作物やそれらを利用した加工品が市場に出回っている。日本では組換え植物の商業栽培は遅れ、平成 21 年からサントリーの開発した「青いバラ」が岡山県で栽培されるようになった。一方、樹木のゲノム研究の進展により、利用可能な有用遺伝子の情報は急増している。最近、中国は食葉害虫抵抗性組換えポプラを開発し、世界初の商業植林（約 400ha）を開始している。組換え樹木の商業植林は人類に多大な恩恵をもたらす可能性がある。

真のスーパー樹木を開発するには、一つの有用形質だけでなく、複数の有用形質を付与する必要がある。例えば、遺伝子組換え技術により、乾燥耐性や耐塩性などの環境ストレス耐性、高バイオマス生産性を付与し、さらに不稔性を導入できれば、荒漠地の緑化が可能となり、しかも木質バイオマスの生産性が向上し、しかも在来種との交雑も防止でき、生態系への組換え遺伝子の拡散を完全に防ぐことができる。今後は、それぞれの有用形質を付与する際に利用する最適遺伝子を特定する必要があり、それには様々な遺伝子を導入した組換え樹木を作製し、それぞれの組換え樹木の特性を比較することが重要である。そして、スーパー樹木の商業植林が進むと、地球温暖化軽減や木質バイオマスの持続的利用に貢献できると期待されている。

本研究では、植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたストレス耐性付与技術やバイオマス生産性向上技術の開発に成功したが、これらの研究成果が環境保全に貢献するスーパー樹木創出の加速化の一助になることを期待している。

平成２３年１２月

独立行政法人　森林総合研究所
理事長　鈴木　和夫

研究課題：環境保全に貢献するスーパー樹木の創出に向けた基盤技術開発

目　　　　　　次

研究の要約　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　１

第１章　植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたストレス耐性付与技術の開発　・・・・・・　５

　１　エチレン合成酵素遺伝子を用いたストレス耐性付与技術の開発　・・・・・・・・・・　５

　２　アブシジン酸合成酵素遺伝子等を導入した組換えポプラの作出　・・・・・・・・・・１９

　３　ストレス耐性付与に有効な新たな遺伝子の探索　・・・・・・・・・・・・・・・・・・２３

第２章　植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたバイオマス生産性向上技術の開発　・・・・２８

研　究　の　要　約

Ⅰ　研究の年次及び予算区分

平成２１～２２年度（２か年）

森林総合研究所交付金プロジェクトI

Ⅱ　主任研究者

主査：篠原健司（研究コーディネータ）

取りまとめ責任者：篠原健司（研究コーディネータ）

Ⅲ　研究場所

森林総合研究所生物工学研究領域

理化学研究所植物科学研究センター

Ⅳ　研究目的

地球温暖化軽減策として、森林の保全や植林が高く評価されている。平成15年12月、イタリアのミラノで開催された第9回気候変動枠組条約締約国会議(COP9)では、CO_2吸収源として換算する植林に遺伝子組換え樹木の使用が条件付きで認められた。２０２５年までを視野に入れた成長に貢献するイノベーションの創造のための長期戦略指針「イノベーション２５」（平成19年6月1日閣議決定）でも、「環境保全に貢献するスーパー樹木の開発」の重要性が指摘されている。スーパー樹木とは遺伝子組換え樹木（genetically modified trees）のことである。林野庁は、「森林・林業分野における遺伝子組換え技術に関する研究開発の今後の展開方向について」（平成19年8月31日）をプレスリリースしており、地球温暖化軽減に貢献する組換え樹木の開発のためには、ゲノム情報の基盤整備、乾燥耐性・耐塩性等環境ストレス耐性の付与技術、バイオマス生産を向上させるための成長制御技術や実用化に向けた花成制御技術等が必要であるとしている。

本研究では、環境保全に貢献するスーパー樹木の創出に向けた基盤技術を開発するため、植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたストレス耐性付与技術やバイオマス生産性向上技術を開発することを目的とする。

Ⅴ　研究方法

オゾン耐性を高めるためにエチレン合成のキー酵素であるアミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素（ACS）の遺伝子発現を抑制した組換えポプラ（*Populus nigra*）について、乾燥ストレス及び塩ストレスに対する耐性をそれぞれ評価した。乾燥ストレス処理は、砂耕栽培の挿し木苗への灌水を停止して施し、葉の萎凋が観察される時期にエチレン合成量を測定した。塩ストレス処理は、挿し木苗を育成する水耕液に80 mM塩化ナトリウムを添加して進め、枯死過程を観察した。また、乾燥や高塩濃度等環境ストレスに応答するアブシジン酸（ABA）合成酵素遺伝子やオリゴ糖合成酵素遺伝子を単離し、それら遺伝子を利用した高ストレス耐性組換えポプラの開発を進め

た。さらに、ポプラのストレス誘導性遺伝子を組込んだバイナリーベクターを構築し、組換えシロイヌナズナを作製し、組換えシロイヌナズナの特性を評価した。

バイオマス生産を向上させた組換えポプラの開発では、ポプラから単離したジベレリン合成酵素及び代謝酵素遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター下流に連結し、アグロバクテリウム法を用いて過剰発現する組換えポプラを作出した。組換えポプラの選抜には、抗生物質カナマイシンを用いた。得られた組換えポプラについては、導入遺伝子の確認や、その発現量の測定、さらには単離した組換えポプラを人工気象室で育成し、成長量やバイオマス量の測定を行い、バイオマス生産を向上させた組換えポプラを開発した。

Ⅵ　研究結果

環境保全に貢献するスーパー樹木の創出に向けた基盤技術を開発するため、植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたストレス耐性付与技術やバイオマス生産性向上技術の開発を進めた。

植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたストレス耐性付与技術を開発するため、エチレン合成酵素遺伝子を発現抑制し、エチレン合成を阻害した組換えポプラを作出し、この組換えポプラがオゾン耐性だけでなく、耐乾燥性や耐塩性も保持することを明らかにした。一方、エチレン合成酵素遺伝子を過剰発現させた組換えポプラでは、オゾン感受性を示した。この結果は、ストレスによる葉の障害発生過程にエチレン合成が深く関与し、エチレン合成を抑制することでストレス耐性を獲得したと説明できる。これらの知見は、樹木の環境ストレス応答機構解明に繋がる重要な発見であり、荒漠地緑化や大気浄化等環境保全に貢献するスーパー樹木の開発に役立つ。その他にも、アブシジン合成酵素遺伝子やオリゴ糖合成酵素遺伝子を導入した組換えポプラを作出し、さらに3種類のポプラストレス応答性遺伝子が耐塩性向上に有効であることを明らかにし、スーパー樹木の創出に向けた基盤技術開発に十分貢献した。

植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたバイオマス生産性向上技術を開発するため、ジベレリン合成酵素遺伝子及び代謝酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラを作出した。その結果、GA20酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラでは成長量が促進され、GA2β水酸化酵素遺伝子を過剰発現するものは矮化する表現型を示した。これらの組換えポプラについて、ジベレリン生合成系酵素遺伝子の発現量をそれぞれ測定したところ、導入した遺伝子の効果を一定に保つように各遺伝子の発現量の変化が観察された。さらに、内性ジベレリン量もこうした遺伝子の発現量に伴って変化していた。これらの結果は、植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたバイオマス生産性向上技術の開発に成功したことを示しており、高バイオマス生産性スーパー樹木の開発への応用が期待される。

Ⅶ　成果の利活用

エチレン合成酵素遺伝子を発現抑制した組換えポプラは大気汚染耐性を示すだけでなく、耐乾燥性や耐塩性を示すことを明らかにした。この組換えポプラは大気浄化に役立ち、現在問題視されつつある越境環境問題の解決に貢献できる。また、ジベレリン合成酵素を導入した組換えポプラの特性解明では、GA20酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラは成長を促進し、GA2β水酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラは矮小化する表現型を示し、遺伝子組換えによる樹木の成長制御に成功した。こうした研究成果は季刊森林総研第11号の特集記事に掲載された。さ

らに、将来を担う学生を対象にした教科書「森林遺伝育種学」（文永堂出版）で、「樹木のバイオテクノロジー」の章で紹介される予定である。得られた知見の一部は、第3期の交付金プロⅠ「高バイオマス生産性と高ストレス耐性を付与した組換え樹木の開発」でさらに研究を進めるための基盤となっている。

Ⅷ　今後の問題点

遺伝子組換えポプラを作出して、その生理学的特性を評価するには最短でも2年という期間が必要である。環境保全に貢献するスーパー樹木の開発には、高ストレス耐性、高バイオマス生産性や不稔性等複合的な有用形質を付与することが重要であり、それぞれの有用形質を支配するための最適遺伝子の情報を集積させる必要がある。本研究では、エチレンやジベレリンの合成酵素遺伝子等を利用して、ストレス耐性の付与技術を開発し、さらにバイオマス生産性を向上させるための成長制御技術の開発に成功した。また、アブシジン合成酵素遺伝子やオリゴ糖合成酵素遺伝子を導入した組換えポプラの作出、新たに耐塩性向上に役立つ3種類のポプラ遺伝子を発見するなど副次的な成果も得ている。これらは、モデル植物での知見や組換えシロイヌナズナでの評価結果に基づいて得たものであり、さらに樹木での科学的検証を進める必要がある。そこで、交付金プロⅠ「高バイオマス生産性と高ストレス耐性を付与した組換え樹木の開発」（平成23～25年度）において、スーパー樹木の開発に向けた研究開発を進める。

Ⅸ　研究発表

１）篠原健司（2009）スーパー樹木が描く未来像－遺伝子組換え樹木は何を換えるのか、神籬 39: 3-8

２）伊ヶ崎知弘、渡辺由美子、辻井伊久美、小嶋美紀子、榊原均、篠原健司（2010）ポプラのジベレリン生合成系酵素遺伝子の解析．日本植物生理学会年会要旨集 51: P2B046

３）毛利武、古川原聡、中嶋信美、篠原健司（2010）ACC 合成酵素遺伝子を導入した組換えポプラの生理特性．日本森林学会大会学術講演集 121: Pc2-26

４）Igasaki T., Watanabe Y., Kojima M., Sakakibara H., Shinohara K.（2010）The genes for gibberellin biosynthesis and deactivation in Lombardy poplar. 20thIPGSA PS01

５）毛利武、古川原聡、篠原健司（2010）オゾン耐性遺伝子組換えポプラは耐乾燥性や耐塩性を保持する．森林総合研究所平成 22 年度版研究成果選集 46-47

６）Mohri T., Kogawara S., Igasaki T., Nakajima N., Shinohara K.（2010）Improvement in ozone tolerance of poplar plants with an antisense DNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. The International Forestry Review 12: 106

７）古川原聡、毛利武、中嶋信美、篠原健司（2010）エチレン合成を抑制した遺伝子組換えポプラの環境ストレス耐性．日本植物学会大会研究発表記録 74: P-069

８）伊ヶ崎知弘（2010）地球の未来を切り開く GM 樹木．季刊森林総研 11: 5-6

９）篠原健司（2010）遺伝子組換えによるスーパー樹木の開発．日本エネルギー学会誌 89: 1160-1165

１０）古川原聡、毛利武、中嶋信美、篠原健司（2011）ACS遺伝子の発現を抑制した遺伝子組換えポプラの環境ストレス耐性．日本植物生理学会年会要旨集 52: 3aM01

１１）伊ヶ崎知弘、辻井伊久美、渡辺由美子、小嶋美紀子、榊原均、篠原健司（2011）ジベレリン２水酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラ. 日本植物生理学会年会要旨集 52: PF025
１２）伊ヶ崎知弘、篠原健司（2011）遺伝子組換え技術を用いてポプラの成長を制御することに成功！　森林総合研究所平成23年度版研究成果選集 50-51
１３）Mohri T., Kogawara S., Igasaki T., Yasutani I., Aono M., Nakajima N., Shinohara K.（2011）Improvement in the ozone tolerance of poplar plants with an antisense DNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. Plant Biotecnology 28: 417-421

X　研究担当者

１．植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたストレス耐性付与技術の開発：
毛利武・楠城時彦（生物工学・ストレス応答研究室）・出村拓（理研・植物科学研究センター）・篠原健司（研究コーディネータ）
実施年度：H21－H22

２．植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたバイオマス生産性向上技術の開発：
伊ヶ崎知弘（生物工学・分子生物研）・毛利武（生物工学・ストレス応答研）・篠原健司（研究コーディネータ）
実施年度：H21－H22

（篠原健司）

第１章　植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたストレス耐性付与技術の開発

1. エチレン合成酵素遺伝子を用いたストレス耐性付与技術の開発

１）オゾン耐性遺伝子組換えポプラの作出

ア　研究目的

光化学オキシダントなどの大気汚染物質は人体の健康に悪影響を及ぼすだけではなく、樹木の生育を阻害して森林を衰退させる因子としても近年問題となっている。樹木に大気汚染物質に対する耐性を付与する技術が開発されれば，その技術は緑化事業に貢献するだけではなく、汚染物質を樹木に取り込ませることで大気を浄化する効果が期待できる。また、大気汚染に感受性を示す樹木を作り出すことができれば，大気汚染を検知するための生物指標として利用できる。光化学オキシダントの主な成分であるオゾンは植物の葉に可視傷害を引き起こすことが一般的に知られているが、この傷害が発生するメカニズムには老化ホルモンのエチレンが深く関与しているといわれる。オゾンを吸収した葉ではエチレン合成系の主要酵素の一つであるアミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素（ACS）の遺伝子発現および活性が誘導され、その結果としてエチレン合成が促進されることが多くの植物種について報告されている。このことから、オゾンを暴露した葉に特徴的な可視傷害はエチレンシグナルを介して引き起こされると考えられる。こうした背景のもと、遺伝子組換えによって ACS 遺伝子の発現を調節することでオゾンが誘導するエチレン合成を抑制または促進することを進めた。本研究では、ポプラ（*Poplus nigra* L. var. *italica* Koehne）のオゾンに対する耐性あるいは感受性を高めることを目的とした。

イ　研究方法

ポプラの遺伝子組換えは、アグロバクテリウム法によって行った。ハイグロマイシン耐性遺伝子（HPT）を選抜薬剤耐性マーカー遺伝子として、カリフラワーモザイクウィルス 35S プロモーターに連結した HPT と ACS 遺伝子が組み込まれた T-DNA 領域を持つプラスミドを２種類作成した（図１－１）。ACS 遺伝子をアンチセンス方向に挿入した配列（図１－１A）を ACS 遺伝子の発現が抑制された組換え体の作出に使用し、逆に発現が高められた組換え体の作出には、ACS 遺伝子をセンス方向に挿入した配列を使用した（図１－１B)。これらのプラスミドをバイナリーベクターとして導入したアグロバクテリウムをポプラの組織培養体から得た組織切片と共存培養により感染させた。2 日間の共存培養の後、アグロバクテリウムを除去するために組織切片をセフォタキシムとカルベニシリンを含む培地に置いて 2 週間培養した。次に、ハイグロマイシンを含むカルス誘導培地に組織切片を移植し、薬剤耐性カルスを誘導した。それらの薬剤耐性カルスは、シュート誘導培地に移植した。カルスから再生したシュートは、適宜摘出して発根培地に移植した。発根した薬剤耐性幼植物体が組換え体であるかどうかを調べるために、葉から抽出した DNA に対して HPT 遺伝子の配列から設計したプライマーを用いて PCR を行い、目的の遺伝子が導入

されているかを確認した。組換え体であることが確認できた個体から挿し木によってクローン個体を増やし、オゾンに対する耐性あるいは感受性を評価する試験に用いた。オゾン暴露処理をした組換えポプラと非組換えポプラで可視傷害の程度及び葉からのエチレン発生量を比較した。エチレンの定量はガスクロマトグラフィーによって行った。また、オゾン暴露処理をした組換えポプラと非組換え体ポプラの葉から RNA を抽出して RT-PCR により ACS 遺伝子の発現解析を行い、オゾンストレスによる発現誘導を比較した。

ウ　結果

組換えポプラは、ハイグロマイシン含有選択発根培地で成長させた。アンチセンスコンストラクト 2 種類、センスコンストラクト 2 種類の合計 4 種類のバイナリーベクターについて、それぞれを過剰発現させた組換えポプラ組織培養苗を合計で 40 ライン以上得た。組換えポプラ組織培養苗の特徴として、フラスコ内無菌苗の状態で通常は観察されない分枝化している個体が一部含まれていた。また、エチレン合成酵素遺伝子をアンチセンス方向に過剰発現させた組換えポプラは非組換え体と比較して老化が遅い個体の割合が多かった。

遺伝子導入が確認された個体は順次、馴化し、成長させた。水、蛍光灯下で成育すると非組換えポプラと比較してアンチセンス個体は成育が良く、センス個体は成長が遅い特徴が見受けられた。しかし、馴化個体を生物環境調節室（高光度、高栄養の水耕液）に移して成長させたところ、アンチセンス個体とセンス個体及び非組換えポプラ間の顕著な成長の差は、ほとんど観察されなかった。

オゾン暴露実験（0.6 ppm）では、非組換えポプラの葉が褐変化したのに対して、アンチセンス組換えポプラはオゾン耐性を示し、葉に傷害が観察されなかった（図１－２）。オゾン暴露した葉のエチレン生成量をガスクロマトグラフィー法によって測定したところ、アンチセンス組換えポプラの葉のエチレン生成量は、非組換えポプラのエチレン生成量と比較して約 60％まで減少していた（図１－３）。さらに、それらの結果を実証するために、オゾン暴露したアンチセンス組換えポプラと非組換えポプラの RNA を抽出し、ACS 遺伝子の発現量をそれぞれ比較したところ、アンチセンス組換えポプラでは非組換えポプラと比べて低く抑えられていることが判明した。オゾン暴露後の両者の ACS 発現量は 2 時間後に最大に達した（図１－４）。一方で、センス組換えポプラは、非組換え体の葉に障害が観察されなかったオゾン暴露濃度 0.2 ppm でオゾン感受性を示し、葉が褐変した（図１－２）。

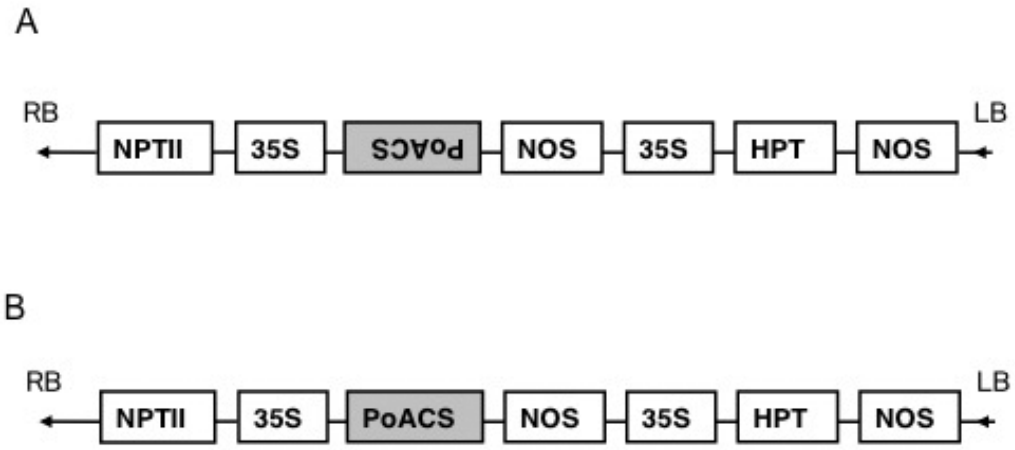

図１－１　組換えポプラ作製に用いたバイナリーベクターの T-DNA 領域
A；アンチセンスコンストラクト、B；センスコンストラクト
PoACS; ポプラエチレン合成酵素遺伝子、HPT; ハイグロマイシン耐性遺伝子、
35S; プロモーター、 NOS; ターミネーター

図１－２　アンチセンス組換えポプラのオゾン暴露実験
左列：非組換えポプラ。中央列：エチレン合成酵素遺伝子を過剰発現させた組換えポプラ。
右列：同じ遺伝子の発現を抑制した組換えポプラ。

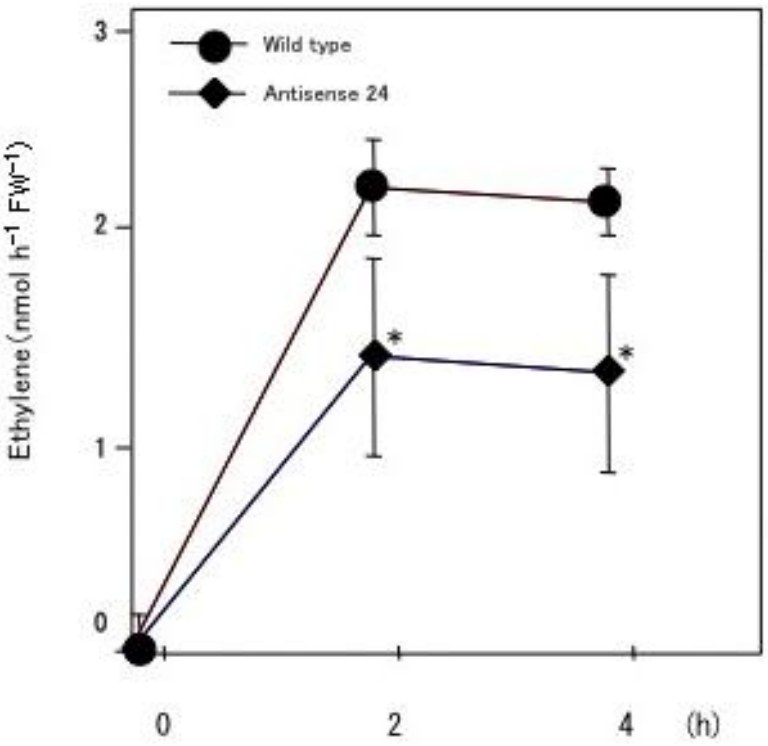

図１－３　オゾン暴露後のエチレン生成量の比較
Wild type; 非組換えポプラ、Antisense 24; 組換えポプラ

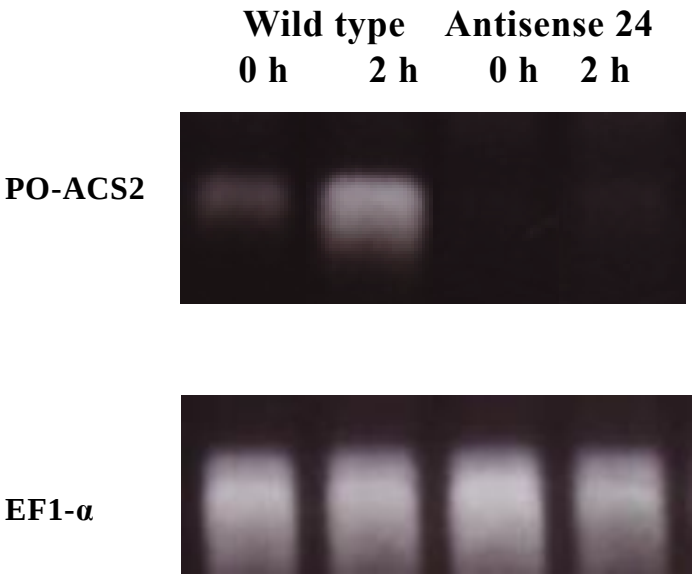

図１－４　オゾン暴露後の遺伝子発現の比較

Wild type; 非組換えポプラ、Antisense 24; 組換えポプラ、

PO-ACS2; ポプラ ACS 遺伝子、EF1-α;ポリペプチド鎖伸長因子遺伝子

エ　考察

樹木でもオゾンによる葉の障害発生過程にエチ レン合成が深く関与することを示しており、エチレン合成を抑制することで組換えポプラはオゾン耐性を獲得したと説明できる。今回の遺伝子組換え技術は、他の植物ホルモン合成酵素遺伝子にも応用でき、より有効な環境ストレス耐性組換え樹木の開発に役立つと言える。開発した組換えポプラは、将来、大気汚染の著しい地域での植栽品種として活用できると期待される。

オ　今後の問題点

スーパー樹木の開発には、高ストレス耐性、高バイオマス生産性や不稔性等複合的な有用形質を付与することが重要であり、それぞれの有用形質を支配するための最適遺伝子の情報をより充実させる必要がある。

カ　要約

エチレン合成酵素遺伝子を利用して、オゾン耐性やオゾン感受性の付与に成功した。本研究で作出したアンチセンス組換えポプラは，大気汚染耐性樹木としての実用化が期待される。また、センス組換えポプラは, オゾンに低濃度で反応することから環境指標樹木として利用可能である。

キ　引用文献

１）毛利武、古川原聡、篠原健司（2010）オゾン耐性遺伝子組換えポプラは耐乾燥性や耐塩性を保持する。森林総合研究所平成 22 年度版研究成果選集、46-47

２）Mohri T., Kogawara S., Igasaki T., Nakajima N., Shinohara K.（2010）Improvement in ozone tolerance of poplar plants with an antisense DNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. The International Forestry Review、12: 106

３）毛利武（2011）ストレス耐性植物の作出．林木の育種　239: 1-5

４）Mohri T., Kogawara S., Igasaki T., Yasutani I., Aono M., Nakajima N., Shinohara K.（2011）Improvement in the ozone tolerance of poplar plants with an antisense DNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. Plant Biotechnology 28: 417-421

（毛利武）

２）オゾン耐性遺伝子組換えポプラの耐塩性と耐乾性

ア　研究目的

特定の環境ストレスに対する耐性を向上させるために適用した遺伝子組換え技術は、他の環境ストレスに対する耐性や感受性にも影響を及ぼす可能性がある。そこで、遺伝子組換え樹木の有用性を議論するためには､複数の環境ストレスに対する耐性を評価する必要がある｡本研究では、エチレン合成を抑制したオゾン耐性組換えポプラの耐塩性と耐乾性について評価するために、高塩ストレスと乾燥ストレスに対する応答を解析した。

イ　研究方法

オゾン耐性組換えポプラを材料として、挿し木によるクローン個体を増殖した。土耕で挿し木苗を 3 ヶ月間育成した後、以下のストレス処理を施した栽培実験に供試した。

【乾燥ストレス】アンチセンス組換えポプラと非組換えポプラの挿し木苗をそれぞれ 8 本ずつ砂耕ポットに移植した。2 週間馴化させた後、半数の挿し木苗への灌水を停止した。灌水停止後から砂の含水率をモニターしながら、光合成蒸散測定装置（Li-6400　LI-COR 社）で光合成速度と気孔コンダクタンスを継続的に測定した。処理開始後 5 日目に上から 2−3 枚目の成熟葉を採取して試験管内に 1 時間密閉し、その間に生成したエチレンをガスクロマトグラフ（GC-7 A　島津製作所）で定量した。

【高塩ストレス】組換えポプラと非組換えポプラの挿し木苗をそれぞれ 8 本ずつ塩ビ板の穴に差し込み、コンテナー内の培養液に塩ビ板を浮かして水耕栽培を開始した。2 週間馴化させた後、培養液中の NaCl 濃度を 80 mM として塩ストレス処理を開始し、光合成速度と気孔コンダクタンスを継続的に測定した。処理開始後 2 週間目に上部の未成熟葉と下部の成熟葉を採取して、エチレンを定量した。

ウ　結果

乾燥ストレスによる組換えポプラの光合成速度と気孔コンダクタンスの低下は、非組換えポプラと同程度であった。両者とも処理開始後 4 日目以降に葉の褐変化が起こり始めたが、組換えポプラではその進行が抑制されていた（図１－５）。また、組換えポプラでは、乾燥ストレスによって誘導されるエチレン生成量が非組換えポプラに比べて少なかった(図１－６)。これらの結果は、組換えポプラではエチレン合成の抑制によって乾燥ストレスによる葉の褐変化の進行が緩和されていたことを示唆している。

オゾンストレスや乾燥ストレスと同様に、高塩ストレスにもポプラの葉を褐変化させる作用があった。この褐変化の程度は組換えポプラの方が非組換えポプラよりも小さかった。さらに、非組換えポプラが高塩ストレスによって萎れきった段階において、組換えポプラは萎れる葉が少なく（図１－７)、また光合成活性を維持していた（図１－８)。高塩ストレス下のエチレン合成速度はストレスによる褐変化が顕著な未成熟葉で高かったが、組換えポプラでは非組換えポプラに比べて抑制されていた（図１－９)。ACS 遺伝子の発現を抑制した組換えポプラでは、高塩ストレスによるエチレン合成の誘導が小さいために葉の褐変化が緩和されたと考えられる。

図１－５　乾燥処理５日目のポプラ苗

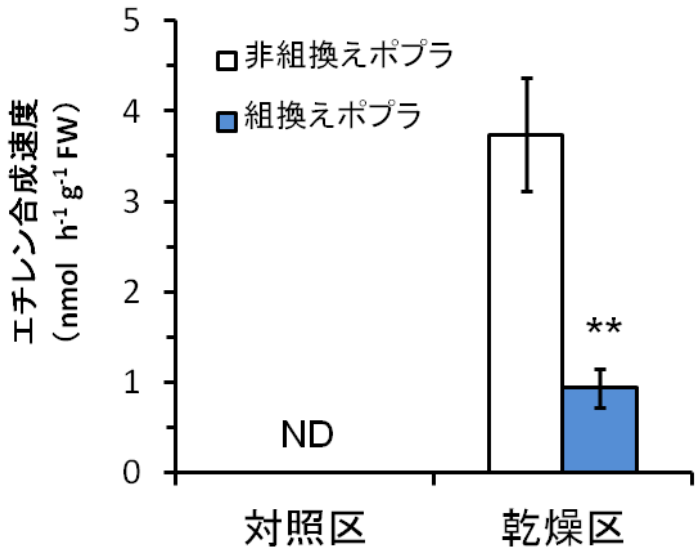

図１－６　乾燥ストレスによるエチレン合成の誘導
灌水停止 5 日目の挿し木苗の成熟葉から発生するエチレンを定量。 バーは標準誤差（N=4），（**）は T 検定における有意差（*P<0.01*）を示す。 ND: 検出不能 。

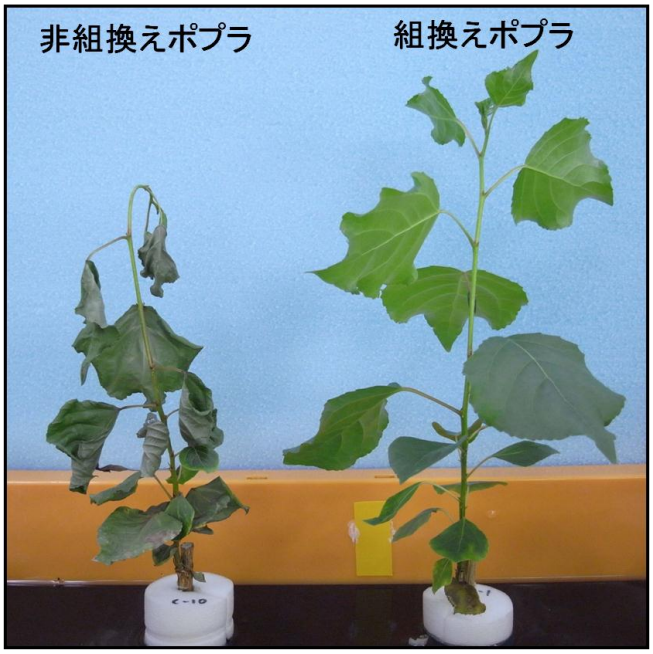

図１－７　高塩ストレスによるポプラ苗の萎凋

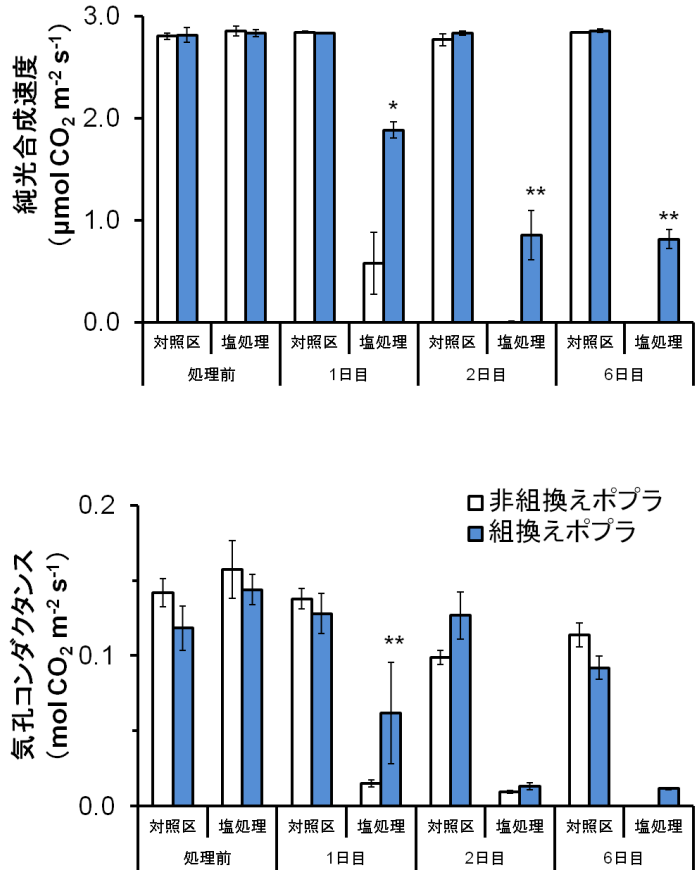

図１－８　高塩ストレスによる光合成阻害と気孔コンダクタンスの低下
ポプラ挿し木苗の光合成速度と気孔コンダクタンスを測定。バーは標準誤差（N=4）。（*）と（**）はＴ検定における有意差（*P<0.05*、*P<0.01*）を示す。

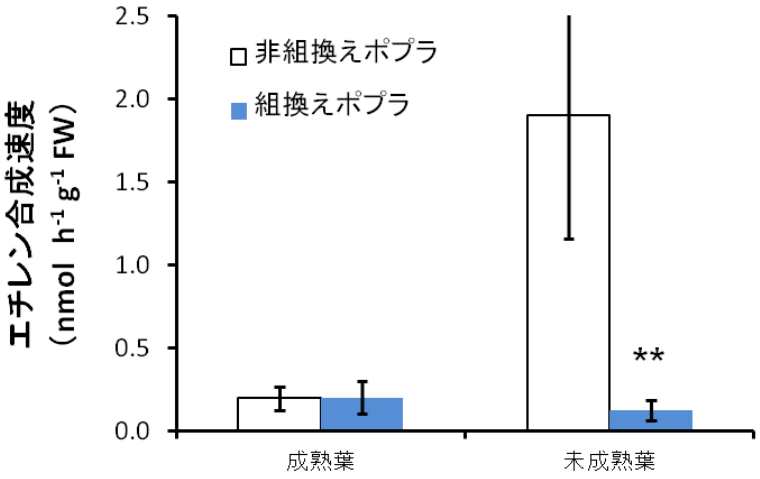

図１－９　高塩ストレスによるエチレン合成の誘導
塩ストレス処理（80 mM NaCl）3 日目の葉から発生するエチレンを定量。バーは標準誤差（N=4）。（**）は T 検定における有意差（*P<0.01*）を示す

エ　考察

乾燥ストレスや塩ストレスによってエチレン合成が誘導され、またオゾンストレスと同様の葉の褐変化が見られたことから、これらのストレスによる傷害発生機構にはエチレンが関与していると考えられる。ACS 遺伝子の発現が抑制されたオゾン耐性組換えポプラでは、エチレン合成の誘導が抑えられてこのような可視傷害が緩和されたことから、遺伝子組換えによるエチレン合成の抑制がポプラに複合ストレスに対する耐性を高めるのに有効な手段であると言える。

オ　今後の問題点

エチレンは、オゾン、乾燥や高塩以外のストレス処理に対する環境応答に関与している可能性がある。そこで、別のストレス処理についても、エチレン合成を抑制した組換えポプラの耐性を評価しなくてはならない。また、ACS 遺伝子以外の遺伝子の利用を検討するためには、耐性機構にまで踏み込んだ解析が必要となる。

カ　要約

オゾンストレスと同様に､乾燥ストレスや塩ストレスによってポプラの葉に可視傷害が現れた。本研究では、ACS 遺伝子の発現を抑制してオゾン耐性を付与した組換えポプラにおいて、これらのストレスによって誘導されるエチレン合成が減少すること、またこれらのストレスに共通の可視傷害が緩和されることを明らかにした。

キ　引用文献

1）Nakajima N., Itoh T., Takikawa S., Asai N., Tamaoki M., Aono M., Kubo A., Azumi Y., Kamada H., Saji H.（2002）Improvement in ozone tolerance of tobacco plants with an antisense DNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. Plant, Cell & Environment 25: 727–735

2）Brinker M., Brosché M., Vinocur B., Abo-Ogiala A., Fayyaz P., Janz D., Ottow E.A., Cullmann A.D., Saborowski J., Kangasjärvi J., Altman A., Polle A.（2010）Linking the salt transcriptome with physiological responses of a salt-resistant *Populus* species as a strategy to identify genes important for stress acclimation. Plant Physiology 154: 1697-1709

（毛利武・古川原聡）

２．アブシジン酸合成酵素遺伝子等を導入した組換えポプラの作出

ア　研究目的

植物ホルモンのアブシジン酸（ABA）は、種子の発達や休眠に関与するだけではなく、気孔の閉鎖や水ストレスのシグナル伝達を媒介することにより、植物の乾燥ストレス応答やストレス耐性に深く関わっている。近年、ABA の受容体が発見されるとともに、ABA によって制御されるストレス応答の分子機構の解明が急速に進んでいる。

高等植物における ABA は､主にピルビン酸とグルタルアルデヒド 3-リン酸からカロテノイド、キサントキシン、アブシシンアルデヒドを経由して合成される。カロテノイドまでは色素体内で生成され、キサントキシンから後は細胞質で合成される。カロテノイドからキサントキシンが生成される反応を触媒する 9-シス-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ (NCED) が ABA 生合成の律速酵素であると考えられている（図１－１０）。シロイヌナズナでは、NCED 遺伝子を過剰発現させた形質転換体において耐乾性の向上が確認されている。樹木においても、ABA により種々の環境ストレス応答機構やストレス耐性機構が制御されている可能性がある。本研究では、ポプラの ABA 合成酵素遺伝子を単離し、得られた遺伝子を過剰させることにより ABA 産生能の向上した組換えポプラを作製することを目的とした。

イ　研究方法

ポプラ（セイヨウハコヤナギ、*Populus nigra* var. *italica*）完全長 cDNA 由来の EST データベースを対象として、ABA 合成酵素遺伝子 NCED の相同性検索をおこなった。同定したポプラの NCED 遺伝子に対応する cDNA をシーケンシング用プラスミドベクター（pFLCIII）から制限酵素 *Sfi*I によって切り出し、過剰発現用の大腸菌・アグロバクテリウム系バイナリーベクター（pBIG2113SF）の *Sfi*I サイトに組み込んだ。構築したコンストラクトをエレクトロポレーション法によってアグロバクテリウム GV3101 株に導入した。目的の遺伝子を導入したアグロバクテリウムを感染させることにより組換えポプラの作製を進めた。

ウ　結果

相同性検索の結果、ポプラ完全長 cDNA クローンの中から 16 個の NCED ホモログ（PnFL2-019_J17、PnFL2-018_M05、PnFL2-034_G22、PnFL2-030_D13、PnFL2-003_J18、PnFL2-006_P14、PnFL2-008_G03、PnFL2-003_A23、PnFL2-003_A21、PnFL2-013_E01、PnFL2-034_G13、PnFL2-024_D03、PnFL2-026_H16、PnFL2-047_H01、PnFL2-012_J06、PnFL2-025_E17）を同定した。

シロイヌナズナで過剰発現させることにより耐乾性の向上に成功した *AtNCED3* 遺伝子に近縁な PnFL2-18_M05 及び PnFL2-19_J17 に注目し、これらの遺伝子をそれぞれ過剰発現するポプラ組換え体の作製を進めた（図１－１１）。

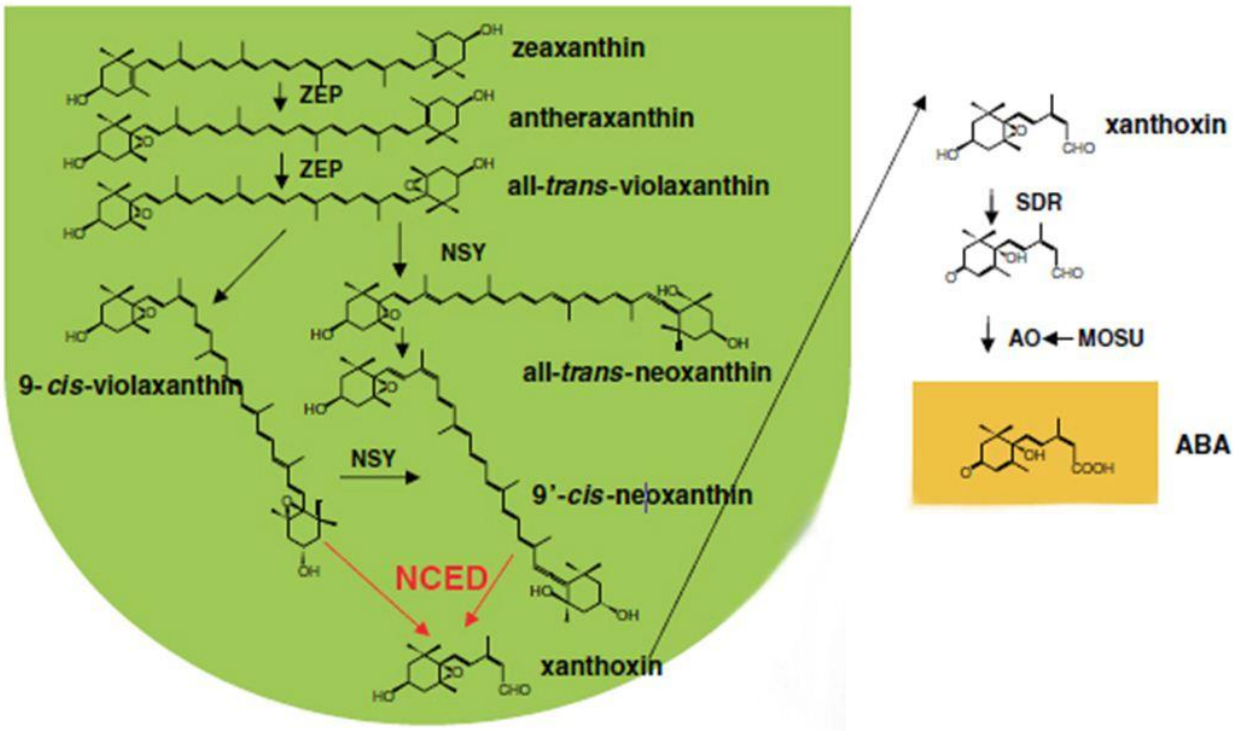

図１－１０　高等植物細胞内のアブシジン酸（ABA）生合成経路

緑色で示した部分は葉緑体内における反応である。キサントキシン（xanthoxin）以降の反応は細胞質内でおこなわれる。ABA 生合成の律速段階を触媒するキー酵素は、9-シス-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ (NCED)である（朱記部分）。

図１－１１　ポプラ NCED 遺伝子を過剰発現させたポプラ組換え体の作製

エ　考察

草本植物と同様に、樹木でも植物ホルモンの ABA が乾燥や高塩濃度といった環境ストレスに対する細胞の応答・耐性機構に関わっている可能性がある。実際、ポプラ完全長 EST を検索した結果、多数の ABA 生合成酵素遺伝子（NCED）の候補が見つかった。NCED を過剰発現させることにより ABA 産生能を高めた組換えポプラの作製は、高環境ストレス耐性樹木の開発につながる。

オ　今後の問題点

ABA は、高等植物の細胞内においてストレス時の情報伝達を媒介する。ABA 生合成を促進することにより、樹木に高環境ストレス耐性を付与できる可能性がある。しかし、植物ホルモンは、微量でも強い生理作用を持つだけではなく異種ホルモンとのクロストーク作用を有する。このため、１つの植物ホルモンだけを過剰に産生させた場合、予期せぬ副作用が生じる可能性がある。これは、植物ホルモンの生合成系やシグナル伝達系を改変した組換え植物の開発にとって留意すべきポイントである。

カ　要約

環境ストレス耐性に関わる植物ホルモンであるポプラの ABA 合成酵素遺伝子を同定した。これらの遺伝子をポプラで過剰発現させることにより、高環境耐性組換え樹木の開発を進めた。

（楠城時彦）

３．ストレス耐性付与に有効な新たな遺伝子の探索

ア　研究目的

高等植物の環境ストレス応答の分子機構は、シロイヌナズナなど草本植物を用いた研究により近年急速に進展した。また、ストレス関連遺伝子を導入することにより、乾燥、高塩濃度や低温といった環境ストレスに対して高い耐性を示す組換え体の報告も多数ある。しかし、樹木におけるストレス耐性機構の解明は草本植物に比べて遅れており、ストレス耐性を付与した組換え体の開発例も極めて少ない。本研究では、ポプラのストレス応答性遺伝子をシロイヌナズナに導入して環境耐性を評価することにより、スーパー樹木の開発に最適なストレス応答性遺伝子を選抜することを目的とした。

イ　研究方法

ポプラ（セイヨウハコヤナギ、*Populus nigra* var. *italica*）完全長 EST をもとに設計した DNA マイクロアレイを用い、乾燥、高塩濃度、低温およびアブシジン酸（ABA）処理により発現が誘導される遺伝子を調べた。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果から、候補遺伝子を選抜した。それら候補遺伝子の cDNA をそれぞれシーケンシング用プラスミドベクター（pFLCIII）から制限酵素 *Sfi*I によって切り出し、過剰発現用の大腸菌・アグロバクテリウム系バイナリーベクター（pBIG2113SF）の *Sfi*I サイトに組み込んだ（図１－１２）。構築したコンストラクトを、アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナに導入した。

ポプラの遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナを寒天培地（1/2MS 塩および 1%スクロースを含む）に播種し、発芽後 4 日目の芽生えを 200mM NaCl を含む寒天培地（1/2MS 塩および 1%スクロースを含む）に移植してその後の生育状況を調べた（図１－１３）。

ウ　結果

ポプラの DNA マイクロアレイを用いた発現解析の結果、乾燥、高塩濃度、低温およびアブシジン酸（ABA）いずれかの処理によって発現の上昇が認められる 100 種類の遺伝子を選抜した。それらのうち 56 種類の遺伝子をそれぞれシロイヌナズナで過剰発現させた。シロイヌナズナ形質転換体の耐塩性試験をおこなった結果、3 種類のポプラ遺伝子（PnFL2-005_M04、PnFL2-026_G19、PnFL2-094_F14）がシロイヌナズナに耐塩性を付与する可能性があることがわかった（表１－１）。

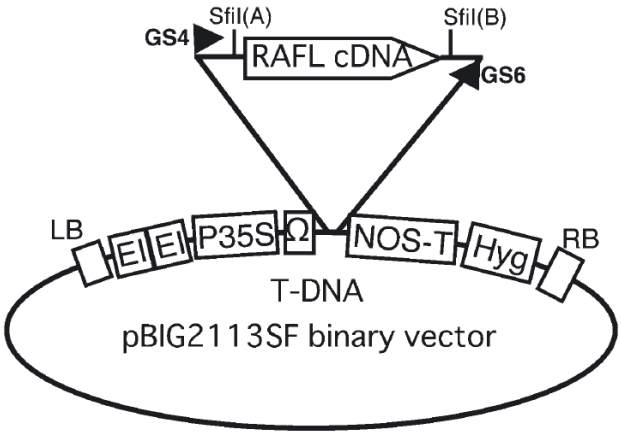

図１－１２　組換えシロイヌナズナの作出に用いたベクターpBIG2113SF の構造
ポプラ完全長 cDNA プラスミドから制限酵素 *Sfi*I で切り出した各フラグメントを、バイナリーベクターpBIG2113 の *Sfi*I サイトに挿入して組換えシロイヌナズナの作出に用いた。

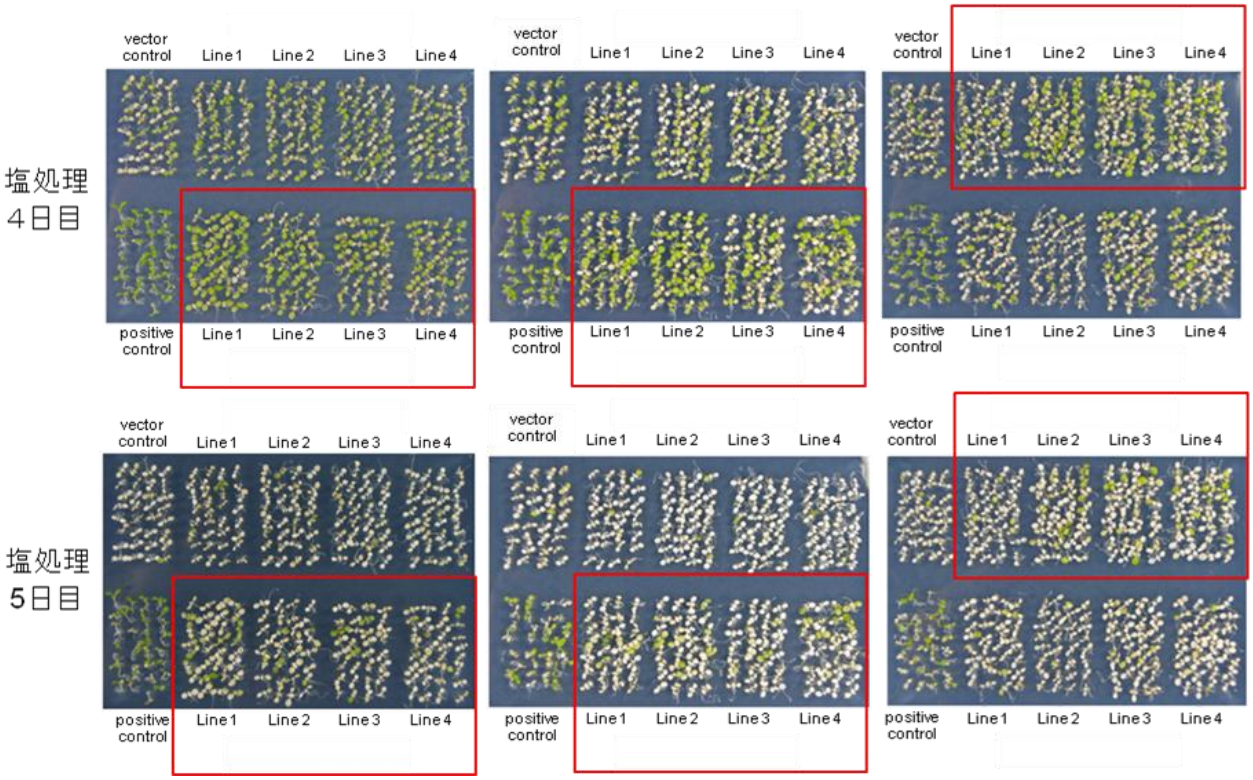

図１－１３　組換えシロイヌナズナの耐塩性評価試験

ポプラの遺伝子を過剰発現させた組換えシロイヌナズナを、NaCl 含有培地に移植して生育を観察した。赤枠で囲んだ形質転換ラインの芽生えは、ベクターのみを導入したネガティブコントロールと比較して高い耐塩性を示している。

表１－１　ストレス耐性付与に有効なポプラ遺伝子候補

Clone Name	*P. trichocarpa* gene locus	Putative Molecular Function	Probe	Dry-2d (FC)	Dry-10d (FC)	NaCl-2d (FC)	NaCl-10d (FC)
PnFL2-005_M04	POPTR_0010s13800	unknown	PtpAffx.208964.1.S1_at	603.80	76.96	690.82	153.42
PnFL2-026_G19	POPTR_0008s08640	Ribonuclease T2 family	PtpAffx.162370.1.S1_at	136.22	110.01	401.85	938.81
PnFL2-094_F14	POPTR_0006s10210	Iron/ascorbate family oxidoreductases	PtpAffx.159543.2.A1_at	632.06	83.68	677.96	151.04

シロイヌナズナを用いた耐塩性試験の結果、3 種類のポプラ遺伝子が植物のストレス耐性付与に有効であることがわかった。FC（fold change）：DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析における未処理と比較した相対値。

エ　考察

新規の遺伝子の機能を、組換えポプラを作出して網羅的に解析することは、時間的及び空間的な制約を受けるために極めて困難である。本研究では、高環境耐性組換え樹木を開発するための候補遺伝子の効率的選抜法として、モデル草本植物であるシロイヌナズナの系を用いて耐塩性試験をおこなった。その結果、3 種類の新規のポプラ遺伝子が、ストレス耐性付与に有効である可能性を比較的短時間に示すことができた。

オ　今後の問題点

シロイヌナズナで過剰発現させることにより、耐塩性を向上させることに成功したポプラの遺伝子には、機能が判然としないものが含まれている。高環境ストレス耐性を付与したスーパー樹木の開発のためには、本研究のようなモデル植物を利用したスクリーニングは有効であるが、今後は得られた候補遺伝子の機能解析を進める必要がある。また、それら遺伝子をポプラに導入して、樹木においても耐塩性を付与できるかどうか検証しなければならない。

カ　要約

ポプラのストレス応答性遺伝子をシロイヌナズナに効率的に導入し、短時間で 3 種類の有用遺伝子候補を同定した。これらの遺伝子は、高環境ストレス耐性組換え樹木の開発に利用できる可能性がある。

（楠城時彦・出村拓）

第２章　植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたバイオマス生産性向上技術の開発

ア　研究目的

ジベレリン（GA）は、高等植物の発芽や伸長成長、開花時期の制御等を行うことが知られている植物ホルモンの一種である。実験植物等を中心に、GA合成に関わる酵素やその遺伝子はすでに単離されている。我々は、GA合成酵素遺伝子の発現量を制御することで、内生のGA合成量が制御できる可能性があると考え、既に機能が解析されているタバコのGA20酸化酵素遺伝子やGA3β水酸化酵素遺伝子等の既存の遺伝子を木本植物ポプラで過剰発現することで、成長量やバイオマス生産量、さらには内生GA量に変化が生じるかを調べる。また、実験材料であるポプラからも複数のGA合成酵素遺伝子の単離を進め、その遺伝子の発現量を制御した組換え体を作出し、GA合成量の変化や、成長量やバイオマス生産量の変化についての解析を進める。このように、本課題では、バイオマス生産の向上を目指した組換え樹木の作出手法を開発することを目的とする。

イ　研究方法

１）ポプラGA20酸化酵素遺伝子及びポプラGA3β水酸化酵素遺伝子の単離

既に機能が解析されているタバコやシロイヌナズナ等のGA20酸化酵素やGA3β水酸化酵素の推定アミノ酸配列が保存されている2カ所に対し縮重プライマーを設計し、ポプラ由来のcDNAを鋳型にPCRを行い、ポプラ由来のGA20酸化酵素遺伝子やGA3β水酸化酵素の部分配列を得た。この塩基配列を解読し、逆PCRを実行できるように特異的なプライマーを構築し、逆PCRにより増幅した部分の塩基配列を決定することで、ポプラ由来のGA20酸化酵素やGA3β水酸化酵素の開始コドンや終止コドンを予測し、その周辺の配列を利用したプライマーを構築し、ポプラ由来の全長GA20酸化酵素遺伝子やGA3β水酸化酵素遺伝子を単離した。公表されたポプラゲノム配列等と比較し、必要な遺伝子種がすべて単離できていることを確認した。

２）ポプラGA2β水酸化酵素遺伝子の単離

公表されているポプラESTやポプラゲノム配列に対し探索をかけ、ポプラGA2β水酸化酵素遺伝子と予測できる配列に基づき開始コドンや終止コドンとなる領域に設計したプライマーを用いて、ポプラ由来の全長GA2β水酸化酵素遺伝子を単離した。

３）GA酸化酵素と予測できる2-オキソグルタル酸要求型酸素添加酵素ファミリー遺伝子の単離

ポプラGA2β水酸化酵素遺伝子の単離と同様な手法を用いて、系統進化学的解析によりポプラGA20酸化酵素遺伝子と近隣のクレードを構成するGA酸化酵素様遺伝子を単離した。

４）GA合成系酵素遺伝子等を過剰に発現する組換えポプラの作出

GA合成酵素及び代謝酵素遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（CaMV35Sプロ）下流に連結し、導入遺伝子が過剰発現する様にしたアグロバクテリウム系バイナリーベクターを構築した。これらを用い、アグロバクテリウム法により、組換えポプラを作出した。なお、組換えポプラの選抜には、抗生物質カナマイシンを用いた。

５） 組換えポプラの成長量の測定

得られた組換えポプラについて、導入遺伝子の確認や、その発現量の測定を行った後、組換えポプラを馴化し、人工気象室で育成し、成長量等の測定を行い、バイオマス生産性等についての評価を行った。

ウ　結果

１） ポプラGA酸化酵素遺伝子の単離

タバコやシロイヌナズナなどの高等植物の既知の配列情報や既存のポプラゲノム情報を利用することで、合計28種類の2-オキソグルタル酸要求型GA酸化酵素様遺伝子（図２－１）を単離することに成功した。系統進化学的解析では、これらがGA20酸化酵素(GA20ox)、GA3水酸化酵素（GA3ox）、炭素数19のGA2水酸化酵素（C19GA2ox）、炭素数20のGA2水酸化酵素（C20GA2ox）等の5つのクレードに大別することができた（図２－２）。

２） GA合成系酵素遺伝子等、2-オキソグルタル酸要求型酸素添加酵素ファミリー遺伝子を過剰に発現する組換えポプラの作出

アグロバクテリウム法により、GA20酸化酵素、GA3β水酸化酵素、GA代謝酵素遺伝子である、GA2β水酸化酵素（PnGA2ox1）で組換えポプラを作出した。また、タバコGA20酸化酵素（NtGA20ox1）、タバコGA3β水酸化酵素(NtGA3ox1)及びエンドウGA2β水酸化酵素（PsGA2ox1）についても過剰発現する組換えポプラを作出した。

GA20酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラは、複数の系統において、茎の伸長が観察され、これらの組換えポプラは、長日の人工光条件下では、野生型と比較して最大で約200%の成長量を示した（図２－３）。

また、炭素数19のGA2β水酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラは、複数の系統において、成長が抑制された。これらの組換えポプラは、長日の人工光条件下では、野生型の約40％の伸長成長速度を示した（図２－４）。

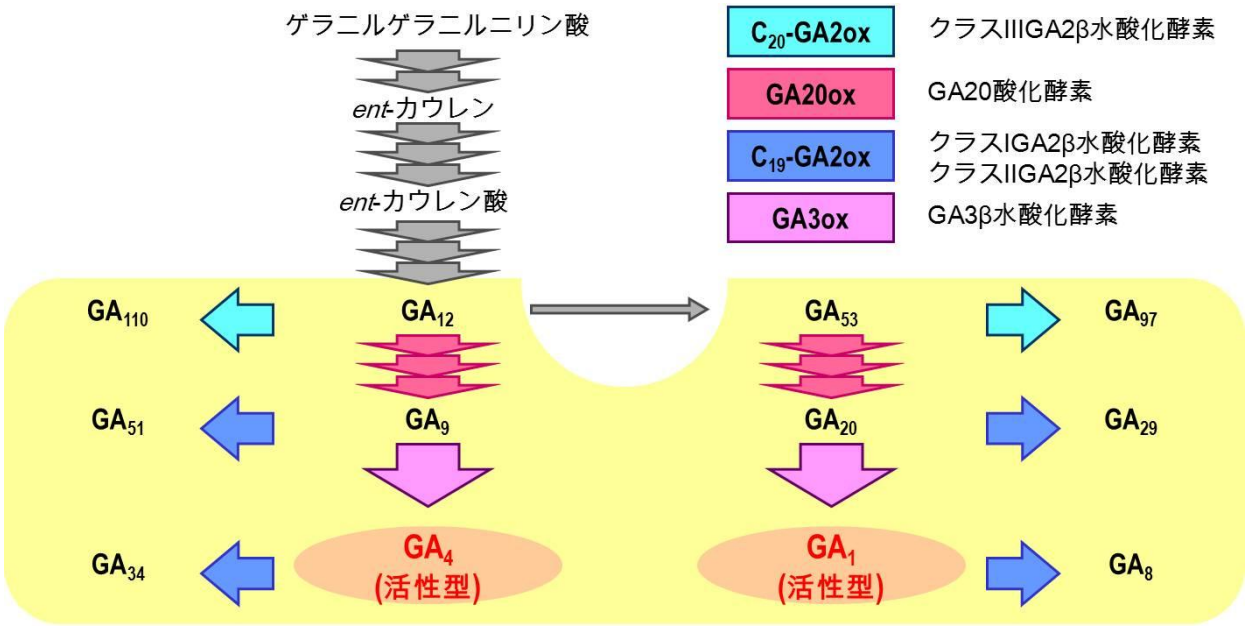

図２－１　植物内での主要な GA 合成・代謝経路

色矢印で示された部分は、2-オキソグルタル酸要求型 GA 酸化酵素遺伝子による反応を示す。

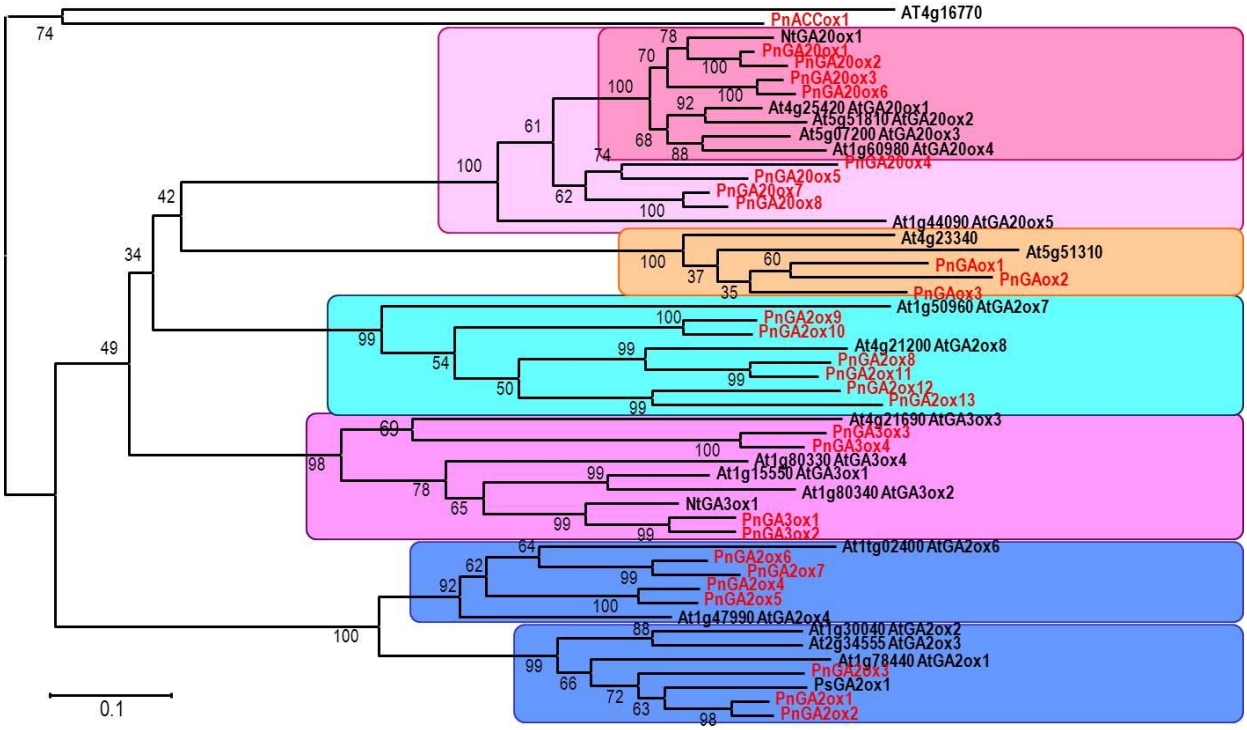

図２－２　ポプラ GA 酸化酵素遺伝子の系統解析

ポプラ及びシロイヌナズナ、タバコ、エンドウマメの同酵素ファミリーを Neighbor-joining 法で分類した。赤色で示された遺伝子はポプラ由来の遺伝子。外群の遺伝子として ACC 酸化酵素遺伝子（PnACCox1）の配列を用いた。

図２－３　GA20 酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラの表現型
左：野生型、右： GA20 酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラ。GA20 酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラは、樹高成長が促進された。

図２－４　炭素数 19 の GA2β水酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラの表現型
左：野生型、右： GA2β水酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラ。GA2β水酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラは、樹高成長が抑制され、葉も小さく、緑色が濃かった。

エ　考察

植物ホルモン合成酵素遺伝子を遺伝子組換えによりポプラへ導入し、バイオマス生産量等の表現型について、有効な変化の観察される遺伝子を特定することを目的とした。植物ホルモンの一種であるGAは、高等植物の発芽や伸長成長、開花時期の制御等を行うことが知られており、GA合成に関わる遺伝子を組換えによりポプラに導入することで、成長量が調節され、バイオマス生産量が変化すると予測した。高等植物では、活性型GAの合成には、2-オキソグルタル酸要求型酸素添加酵素ファミリーに属する酵素が多く関与していることが知られている。そこで、本酵素ファミリーに属する多くの遺伝子を単離し（図２－２）、成長量やバイオマス生産量に変化をもたらす遺伝子を特定する作業を進めた。

生物工学研究領域では、平成15年度からの「果樹等における花成制御技術の開発」で培った遺伝子単離手法や解析手法、平成15年度からの「ポストゲノムとしてのポプラ完全長cDNAライブラリーコレクションの整備」や平成18年度からの「ポプラ等樹木の完全長cDNA塩基配列情報の充実」といった交付金プロジェクトの成果、さらには、2006年に公開されたポプラゲノム配列を利用し、28種類という非常に多くの全長候補遺伝子を単離・獲得することができた。また、それら遺伝子の発現パターンの解析結果や組換えシロイヌナズナの表現系の解析結果から、ポプラの成長に大きく影響を及ぼすと考えられた遺伝子をいくつか選抜し、それぞれを過剰に発現する組換えポプラを作出したところ、顕著に成長が促進するものや矮小化するものという当初の予測と同様の表現型を示す組換えポプラも得られた（図２－３、図２－４）。これらの組換えポプラについて、GA生合成系酵素遺伝子の発現量を測定したところ、導入した遺伝子の効果を一定に保つように各遺伝子の発現量の変化が観察された。さらに、内性のGA量もこうした遺伝子の発現量に従って変化していた。これらの結果は、植物ホルモン合成酵素遺伝子を用いたバイオマス生産性向上技術の開発に成功したことを示しており、高バイオマス生産性スーパー樹木の開発への応用が期待される。

オ　今後の問題点

本課題の研究期間は2年間と短めであったが、当初の目標は全て達成した。今後は、得られた成果を論文として公表する必要がある。また、今後、さらなるスーパー樹木の開発を推進するためには、高ストレス耐性、高バイオマス生産性や不稔性等複合的な有用形質を付与することが重要であり、それぞれの有用形質を支配するための最適遺伝子の情報を集積させる必要がある。また、クラスIのジベレリン２β水酸化酵素を過剰に発現する組換えポプラは、成長量が約40%と減少したにもかかわらず、活性型のGA_4が野生型よりも多く検出されること、側芽の休眠がほとんど無いことなど、説明が難しい現象も観察されている（データ不掲載）。この現象は、ポプラにおいてGA_4とGA_1が異なる作用をしていることを示唆している可能性もある。したがって、ポプラのGA酸化酵素の基質特異性や、ポプラのGAのレセプター遺伝子のGA_4やGA_1に対する親和性の差異を調査し、より有効な組換えポプラ作出のための知見としていきたい。

カ　要約

ポプラのGA合成に重要な役割を持つと考えられる2オキソグルタル酸依存型GA酸化酵素遺伝子

酵素遺伝子を網羅的に28種類単離した。*GA20ox1*遺伝子を過剰に発現する組換えポプラは成長が増大し、*GA2ox1*遺伝子を過剰に発現する組換えポプラは矮小化することを解明した。こうした研究成果は季刊森林総研第11号の特集記事に掲載された。さらに、将来を担う学生を対象にした教科書「森林遺伝育種学」（文永堂出版）で、「樹木のバイオテクノロジー」の章で紹介される予定である。得られた知見の一部は、第3期交付金プロジェクト「高バイオマス生産性と高ストレス耐性を付与した組換え樹木の開発」でさらに研究を進めるための基盤となっている。

キ　引用文献

1) 伊ヶ崎知弘、渡辺由美子、辻井伊久美、小嶋美紀子、榊原均、篠原健司 （2010）ポプラのジベレリン生合成系酵素遺伝子の解析． 日本植物生理学会年会要旨集 51: P2B046.
2) Igasaki T., Watanabe Y., Tsujii I., Kojima M., Sakakibara H., Shinohara K. （2010）The genes for gibberellin biosynthesis and deactivation in Lombardy poplar. IPGSA 20: PS01.
3) 伊ヶ崎知弘 （2010） 地球の未来を切り開く GM 樹木．季刊森林総研 11: 5-6
4) 篠原健司（2010）遺伝子組換えによるスーパー樹木の開発．日本エネルギー学会誌 89: 1160-1165
5) 伊ヶ崎知弘、辻井伊久美、渡辺由美子、小嶋美紀子、榊原均、篠原健司 （2011）ジベレリン２水酸化酵素遺伝子を過剰発現する組換えポプラ．日本植物生理学会年会要旨集 52: PF025

（伊ヶ崎知弘）