

平成16年度 地球環境国際共同研究推進事業  
多様生物ゲノム高度利用による植生 (CO<sub>2</sub> 吸収源) 拡大基盤技術開発

要約

本研究開発は、複合的な過酷環境ストレス下で生息する野生生物に遺伝資源を求め、その多様なゲノムの高度利用を目的とした環境ストレス耐性遺伝子の収集・確保および機能評価、そこで見いだされた有用遺伝子を用いた植生再生植物の作出と機能評価を行い、さらに、これらの過程を通じて、植生再生のための植物バイオ技術の実用化に向けた基盤技術を確立することを目的としている。研究開発は、①極限異常環境生育植物・微生物の探索およびその機構解析、②極限異常環境生育微生物のゲノム解析とポストゲノムの利用、③極限異常環境生育植物由来の新規ストレス耐性遺伝子の探索・解析の項目から構成され、平成16年度は、高温・強光環境下で高CO<sub>2</sub>固定能をもつ樹木モンパノキの光合成生理・生化学的解析、苛酷環境生育藍藻のゲノム解析とポストゲノム解析による過酷環境適応関連遺伝子の探索、菌根菌のゲノム解析・有効利用技術、耐塩性野生植物由来の新規ストレス耐性遺伝子の解析と評価の具体的項目を実施し、それぞれ以下の成果を得た。

沖縄県西表島沿岸に自生する中・低木樹のムラサキ科モンパノキ (*Messerschmidia argentea*) について高CO<sub>2</sub>濃度下でガス交換特性を調べた。光合成有効光量子束 1000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 葉温 30°C, 相対湿度 60~70%の条件で測定した個葉の正味光合成速度は、CO<sub>2</sub>濃度 350ppm のとき 18±4 μmolCO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>であり、700ppm では 28±2 μmolCO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 1000ppm では 30±3 μmolCO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>であった。この値は温帯域の樹木葉の正味光合成速度と比較するとかなり高く、モンパノキはガス交換機能が高いことが明らかとなった。特に光合成速度は木本植物の中でも高い値を示し、CO<sub>2</sub>濃度が倍増した場合も光合成能はきわめて高く、CO<sub>2</sub>吸収能の視点からも関心が持てる植物といえる。そこで、モンパノキの光合成速度のCO<sub>2</sub>分圧依存性解析を行い、生葉レベルで光合成速度を決定している要因を推定した。そのために、西表島沿岸地にて光飽和下でモンパノキのガス交換解析を行うとともにRITE研究室へサンプリング生葉を持ち込みその窒素定量、クロロフィル定量を行った。その結果、大気CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>下での光合成速度および高CO<sub>2</sub>分圧下での光合成速度ともに葉面積あたりのチッソ量に比例した。また、ルビスコ量も窒素量に比例した。また、窒素に対する光合成速度は一般のC3草本植物と同等であった。さらに、葉肉細胞コンダクタンスもまた一般のC3草本植物と同等であった。これらの結果は、RITE実験室内で栽培したモンパノキで得られた結果とほぼ一致した。以上の結果から、樹木・モンパノキにおいても、その光合成はルビスコによるCO<sub>2</sub>固定反応により律速されていることが示唆された。モンパノキがほかの樹木と比べて高い光合成速度を示す理由として、1:葉面積あたりの窒素量が多い、2:窒素量あたりのルビスコ量が多い、3:ルビスコ触媒部位でのCO<sub>2</sub>分圧が高い、以上3点が考えられた。

単細胞性窒素固定藍藻の遺伝資源の確保するため、沖縄の外離島海岸に漂っていた分解中の海草の試料から集積培養法で単離された海産単細胞性の窒素固定藍藻 *Cyanothece* sp. TU126 の

ゲノム解析を実施した。本藍藻ゲノムの予想サイズのほぼ 100%をカバーするドラフト配列（重複度 7.8、1,000 bp 以上の contig 数 155、総塩基配列 5,996,689 bp）を取得し、データベースを構築した。その結果、6396 個の遺伝子候補が見いだされ、そのうち 4020 個の遺伝子候補は、他の微生物ゲノムとクラスタを形成できない新規な遺伝子であった。

沖縄の海浜植物に共生するアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）相について、感染根を対象とした調査を DNA 解析によって実施し、*Glomus* 属菌のうち、互いに近縁な関係にある二つのグループ（Type 0A と Type 0B）が優占していたこと、Type 0B の菌は *Glomus intraradices* と同種もしくは近縁種であること、Type 0A の菌は植物群落の海側の縁近くに特に優占していたことをそれぞれ明らかにした。この単孢子由来の増殖菌株のうち、Type 0B の 1 菌株について、マリーゴールドを宿主植物として乾燥と養分ストレスの有無が成長差におよぼす影響について試験を行った。その結果、乾燥と養分ストレスがかかった試験区でも、AM 菌の接種があった場合には、そのようなストレスがない試験区の AM 菌非接種区よりも成長量が上回り、AM 菌との共生が乾燥や養分ストレスの条件下でも宿主植物の成長に効果的であることが確認された。また、Type 0A, 0B それぞれの代表菌株 1 菌株ずつについて、マリーゴールドを宿主植物として、塩ストレスの有無が成長差におよぼす影響を試験した。AM 菌の成長促進効果は塩ストレス条件下で高くなり、Type 0A の AM 菌で効果が特に高かった。この結果は海浜植物群落の海側の縁近くに優占していた Type 0A の AM 菌が、塩ストレス条件下で有効であることを示している。さらに、西オーストラリア州の乾燥地および対照区としてチリの *E. globulus* の植林地において菌根をサンプリングし、菌根菌の rDNA-ITS 領域の塩基配列に基づいて菌根菌相の比較を行った。西オーストラリア州の乾燥地で、全体約 2000 km の行程中 27 地点でユーカリ属樹木に共生している菌根菌の子実体 55 点をサンプリングし、分離培養により 17 菌株の純粋培養株を取得した。

荒廃土壌より単離した乾燥耐性の陸生藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の生理特性に着目し、ポストゲノム的手法による本藍藻の乾燥耐性機構の解明と環境ストレス耐性遺伝子の探索を目的に、以下の研究を実施した。完全ゲノム解析されているモデル藍藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 は *Nostoc* sp. HK-01 の近縁種であったことから、*Anabaena* sp. PCC 7120 DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、トレハロース代謝酵素遺伝子群と予想される *all10168*, *all10167*, *all10166* が乾燥ストレスにより誘導されることを明らかにした。そこで、*Anabaena* sp. PCC 7120 に乾燥ストレスを与えたところ、少量のトレハロースと多量のスクロースの蓄積が観察された。さらに、*Anabaena* sp. PCC 7120 の *mth* 遺伝子破壊株 TRM11 (*mth::W*) を作成したところ、乾燥ストレス時のトレハロース含量の減少と生存率の低下が認められた。一方、*treh* 破壊株 TRM31 (*treh::W*) では、乾燥ストレス時のトレハロース含量が野生株に比べ 2 倍に増加し、生存率も若干高まった。以上の結果から、*Anabaena* sp. PCC 7120 の乾燥耐性能にトレハロースが寄与していることが示唆された。

マングローブの一種である *Bruguiera sexangula* から大腸菌を用いた機能スクリーニング法で、耐塩性に関与する遺伝子を探索した結果、伸長因子 eukaryotic elongation factor 1A

(eEF1A) をコードすると考えられる cDNA の単離に成功した。eEF1A はタンパク質の合成に関与し、全ての真核生物において保存されているタンパク質である。*B. sexangula* eEF1A (Bs-eEF1A) を導入した大腸菌は、コントロールとしてベクターのみを導入した大腸菌と比べ、耐塩性の向上が確認された。また、大腸菌に発現させた His-Tag 融合 eEF1A タンパク質を用いて、分子シャペロン機能の評価を試みた結果、Bs-eEF1A タンパク質は分子シャペロン様の活性を有することが確認された。Bs-eEF1A は分子シャペロン様活性を有することにより、*B. sexangula* の耐塩性機構に関与している可能性が示唆された。また、Bs-eEF1A を導入したタバコ培養細胞及び植物体を作成した。