

機関番号：32658

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19405030

研究課題名（和文） 遺伝子組換え樹木：野外試験の海外調査

研究課題名（英文） Transgenic trees for field trial in the world

研究代表者

林 隆久（HAYASHI Takahisa）

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70231529

研究成果の概要（和文）：キシログルカナーゼ遺伝子を発現する組換えユーカリをイスラエルの圃場で野外試験した。キシログルカナーゼ遺伝子を発現する組換えマンギウムはインドネシアの圃場で野外試験する予定である。仏国、スペイン、米国、カナダにおける組換え樹木野外試験の状況と比較するとともに解析した。

研究成果の概要（英文）：The transgenic eucalyptus overexpressing xyloglucanase (AaXEG2) have been tested at the field of Israel and the transgenic mangium overexpressing xyloglucanase (AaXEG2) expects to be tested at the field of Indonesia. Critical analysis has been done in the field trials for transgenic trees in the world.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	8,200,000	2,460,000	10,660,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質学

キーワード：組織構造・材形成

## 1. 研究開始当初の背景

再造林 (reforestation) や裸地造林 (afforestation) による森林の再生、それに連動したバイオマス産業促進による経済の活性化が、先進国においても発展途上国においても、地球レベルで望まれている。このような「自然・ヒト・地球共生型社会」をベースにした循環型社会の構築のために、樹木の育種が重要視されている。とくに遺伝子組換え技術は、より早く、より確実に樹木を改良できる手法として最も有力なものである。交配に時間のかかる樹木の育種では早く確実に出来るメリットは、はかり知れない。ただし、遺伝子の拡散や一斉植林による生態系の

攪乱など、新たな環境問題を起こさないよう、生物多様性等の試験は検討しなければならない。世界に発信できる有効な技術・政策を考動しながら植林を進める必要がある。

中国では、河北農業大学のグループによって遺伝子組換えポプラのライセンスが 2003 年に発効された。白楊ポプラ (*Populus tomentosa* Carr.) をホストとし、B T トキシン (*Bacillus thuringiensis* 由来の殺虫タンパク) を構成発現させたものである。野性株のポプラや他の植物と何ら区別せずに中国国内で植林できる。用途も紙パルプ生産や防風・砂漠抑止林として、その他家具や工事用丸太、板材等にも考えられている。遺伝子

組換え樹木の植林は、中国が先頭を切ったが、数年後にイスラエルやブラジルがそれに続くと言われている。一年草の作物を対象としてきた組換え植物の環境評価は、多年草の樹木の場合と異なるものであり、その生物多様性の検討方法を再評価して「安全」と「安心」を確実にしたいという社会的ニーズもある。

我が国では、キシログルカナーゼを過剰発現させたポプラ（ギンドロ、*Populus alba*）が、野性型と比べて早い成長、高い材比重、高いセルロース含量を示し、炭酸固定能力が高く、かつ歩留まりの高いバイオマス原料の供給源として期待される。2007年春より林木育種センターで産業利用を目的とした遺伝子組換えポプラの野外試験を実施する。この産業利用を目的とした樹木の野外試験（第一種使用）は、我が国で最初のものである。

海外では、キシログルカナーゼ遺伝子組換えユーカリの野外試験が、同じく2007年4月にイスラエルのRehovot近くの圃場で開始される。一方、インドネシア科学院（LIPI）が、同じくキシログルカナーゼを発現するアカシアとファルカータの組換え体作出に成功している。これらDNA組換え熱帯早生樹については、CibinongにあるP1グリーンハウスの中で安全評価・材質評価を行っているレベルであるが、近いうちにインドネシア国内での野外試験も始まる可能性がある。

## 2．研究の目的

海外における遺伝子組換えユーカリ、アカシア、ファルカータの野外試験と、わが国において実施される遺伝子組換えポプラの野外試験を比較解析する。野外試験では同じキシログルカナーゼ遺伝子の発現を見ることになる。すなわち「異なる樹種」や「異なる風土」における遺伝子発現の効果を比較解析することは極めて学術的かつ独創的であると言える。樹木育種目標、とくに遺伝子組換えによる樹木の育種は、今までの林木育種の戦略手法にイノベーションを与えるものである。比較的最近組換えが可能となった、国産材スギ、ヒノキの育種にイノベーションを吹き込む要素となる。野外試験の短縮化も検討したい。本研究は具体的なデータや問題点を査定しながら、よりグローバルな観点から組換え樹木の野外試験と実用化を研究するものである。内容は、より俯瞰的に、より分野横断的に調査研究されることを特徴としている。

林木育種センターで産業利用を目的とした遺伝子組換えポプラの野外試験（農水省第一種使用）の管理主任者谷口 亨を本連携研究者に加えた。

組換えポプラの野外試験をするために、産業利用を目的とした野外評価試験（農水省第一種使用）として農林水産大臣と環境大臣に

平成17年10月申請した。その後、平成17年11月から平成18年にかけて計5回、生物多様性影響評価検討会林木分科会が開かれ、平成18年9月20日での検討会で終了した。この生物多様性影響評価検討会林木分科会委員長の井出雄二を本連携研究者に加えた。

## 3．研究の方法

インドネシア及びイスラエルでのキシログルカナーゼを発現する樹木の評価試験（野外試験）に立ち会う。これを我が国林木育種センターで実施する遺伝子組換えポプラの野外試験（基盤研究A）と比較解析した。インドネシア科学院（LIPI）では遺伝子組換えアカシアの環境評価試験、イスラエルCBDテクノロジーではユーカリの野外試験に入る。また、米国及び南米（コロンビア及びブラジル）での組換え樹木の野外試験についても調査する。

インドネシア科学院では、キシログルカナーゼを発現するアカシアとファルカータの作出に成功した。現在はまだ栽培試験中であるが、これら遺伝子組換え樹木はP1レベルの特定網室の中で栽培試験に入った。来年の乾季（6月～9月）にデータをまとめて野外試験申請書（いわゆる第一種使用）をインドネシア政府に提出する予定である。

イスラエルCBDテクノロジーは、ヘブライ大学と共同でキシログルカナーゼを発現するユーカリの作出に成功した。遺伝子組換えユーカリの野外試験申請書は既にイスラエル政府に提出されており、2009年よりRehovotの近くで野外試験された。野外試験に立会い、わが国の組換えポプラの野外試験と比較した。わが国の場合、同じキシログルカナーゼ遺伝子による発現効果をポプラでみるが、海外では樹種が異なり、風土も異なることから、その効果がグローバルに評価解析できることになる。

森林の再生に連動したバイオマス産業促進による経済の活性化を戦略的に進める。循環型社会の構築を最終的な到達点として研究体制を構築した。遺伝子の拡散や一斉植林による生態系の攪乱など、新たな環境問題を起こさないよう、世界での野外試験の実態を調査する。海外での野外試験とわが国の野外試験を直接比較し、世界に発信できる有効な技術・政策を考動しながら具体化する。

## 4．研究成果

組換え樹木による産業林への植林を考えると、我が国には効率的に栽培する土地がない。従って、将来的には植物の成長が活発な赤道直下の東南アジアが適地と考えられている。組換え熱帯樹木を出口として、あらゆる要因を組換えポプラで検証する。

東南アジアの熱帯天然林が乱伐により減少

して行く一方、現地政府主導による大規模な人工植林によって産業林が構築されつつある。インドネシアでは、人口の増大により森林が畑地化したジャワ島、森林が破壊されて荒廃地化したスマトラ島、森林が破壊されつつあるボルネオ島でアカシア樹種を用いた人工産業林が起こりつつある。このような熱帯産業林の歴史はまだ10年程度であり、人工林を産業林として持続させるためには様々な問題点がある。地域の森林会社は、森林持続に対する危機感を持ち、これら人工林を海外の自然科学系研究者にオープンにして現在の問題解決を図り、将来起こりうる問題について熱心に耳を傾けている。

東南アジア産業林で用いられている樹木の主な樹種は、アカシヤマンギウム、ファルカータ、ユーカリ、そしてチークなどがある。ファルカータは、世界で一番成長の早い樹木である。桐に似た材質で、用材に多く用いられている。アカシヤやファルカータは、ともにマメ科の樹木であるため、根粒菌 (*Rhizobium*属)と共生して空気中の窒素 ( $N_2$ )を固定することが出来る。更にファルカータは、菌根菌と共生してリンも獲得できる。チツソとリンの肥料を必要としないメリットは大きい。

インドネシア科学院では、ポプラセルラーゼを発現するファルカータの作出に成功した。続いてキシログルカナーゼを発現するマンギウムの作出にも成功した。現在、インドネシアでは、組換え樹木の野外試験は認められていないため、多くの植林会社はその推移を見守っている。昨年、林業省が組換え樹木の調査を行い、そのひとつとしてインドネシア科学院の組換えマンギウムが認証された。まだ栽培試験中であるが、この組換え樹木はP1レベルの特定網室の中で環境評価試験されつつある。

我々は、日本国内ではポプラを使って組換え樹木の研究を遂行してきた。温室で育成した組換えポプラは野生株に比べて成育が活発であったが、野外ではストレスに弱いことが分った。そこで、ストレス耐性の遺伝子 (Dnak) の共発現を試みた。

ファルカータは、インドネシア政府が勧める推奨林木である。ジャワ島では、ほとんどの家の庭に必ず数本植えている。大きくして用材として売る目的である。植林会社はこれをサポートする責務を持っている。子供でも、誰にでも、苗木を無償で得られるようになっていく。

ファルカータの問題点は、さし木の技術が確立していないために、クローン苗による植林が出来ないことである。不稔の樹木はジャワ島にも認められているので、そのクローン苗のさし木が今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計26件)

- 1) Yamamoto R, Saito T, Isogai A, Kurita M, Kondo T, Taniguchi T, Kaida R, Baba K, Hayashi T (2010) Enlargement of Individual cellulose microfibril in transgenic poplars overexpressing xyloglucanase. *J Wood Sci*, 57, 71-75.
- 2) Hayashi T, Kaida R (2010) Functions of xyloglucan in plant cells. *Mol Plant* 4, 17-24.
- 3) Hayashi T, Kaida R, Mistuda N, Ohme-Takagi M, Nishikubo N, Kidou S, Yoshida K (2010) Enhancing primary raw materials for biofuels. In Biomass to Biofuels, eds Vertes AA, Qureshi N, Blaschek HP, Yukawa H, Wiley, pp 459-489.
- 4) Hayashi T, Kaida R, Kaku T, Baba K (2010) Loosening xyloglucan prevents tensile stress in tree stem bending but accelerates the enzymatic degradation of cellulose. *Russian J Plant Physiol* 57, 316-320.
- 5) Kaida, R, Serada, S, Norioka, N, Norioka, S, Neumetzler, L, Pauly, M, Sampedro, J, Zarra, I, Hayashi, T, Kaneko, TS (2010) Potential role for purple acid phosphatase in the dephosphorylation of wall proteins in tobacco cells, *Plant Physiol* 153, 603-610.
- 6) Kaida R, Sugawara S, Negoro K, Maki H, Hayashi T, Kaneko TS (2010). Acceleration of cell growth by xyloglucan oligosaccharides in suspension-cultured tobacco cells, *Mol Plant* 3, 549-554.
- 7) Fujii S, Hayashi T, Mizuno K (2010) Sucrose synthase is an integral component of the cellulose synthesis machinery. *Plant Cell Physiol* 51, 294-301.
- 8) Alonso-Simon A, Neumetzler L, Garcia-Angulo P, Encina AE, Acebes JL, Alvarez JM, Hayashi T (2010) Plasticity of xyloglucan composition in bean (*Phaseolus vulgaris*)-cultured cells during habituation and dehabituation to lethal concentrations of dichlobenil, *Mol Plant* 3: 603-609.
- 9) Kaku T, Serada S, Baba K, Tanaka F, Hayashi T (2009) Proteomic analysis of the G-layer in poplar tension wood, *J. Wood Sci.* 55, 250-257.
- 10) Kaida R, Satoh Y, Bulone V, Yamada Y, Kaku T, Hayashi T, Kaneko T (2009) Activation of  $\beta$ -glucan synthases by wall-bound purple acid phosphatase in

- tobacco cells. *Plant Physiol* **150**, 1822-1830.
- 11) Baba K, Park WP, Kaku T, Kaida R, Takeuchi M, Yoshida M, Hosoo Y, Ojio Y, Okuyama T, Taniguchi T, Ohmiya Y, Kondo T, Shani J, Shoseyov O, Awano T, Serada S, Norioka N, Norioka S, Hayashi T (2009) Xyloglucan for generating tensile stress to bend tree stem. *Mol Plant* **2**, 893-903.
  - 12) Kaida R, Kaku T, Baba K, Oyadomari M, Watanabe T, Nishida K, Kanaya T, Shani Z, Shoseyov O, Hayashi T (2009) Loosening xyloglucan accelerates the enzymatic degradation of cellulose in wood. *Mol Plant* **2**, 904-909.
  - 13) Kaida R, Kaku T, Baba K, Hartati S, Sudarmonowati E, Hayashi T (2009) Enhancement of saccharification by overexpression of poplar cellulase in sengon. *J Wood Sci* **55**, 435-440.
  - 14) Kaida R, Kaku T, Baba K, Hayashi T (2009) Enzymatic saccharification and ethanol production of *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* wood, and oil palm trunk. *J Wood Sci* **55**, 381-386.
  - 15) K Ozaki, A Uchida, T Takabe, F Shinagawa, Y Tanaka, T Takabe, T Hayashi, T Hattori, AK. Raid, T Takabe, Enrichment of sugar content in melon fruits by hydrogen peroxide treatment, *J Plant Physiol*, 166: 569-578 (2009)
  - 16) T Hayashi, YW Park, A Isogai and T Nomura, Cross-linking of plant cell walls with dehydrated fructose by smoke-heat treatment. *J Wood Sci*, 54: 90-93 (2008)
  - 17) T Taniguchi, Y Ohmiya, M, Kurita, M Tsubomura, T Kondo, YW Park, K Baba, T Hayashi, Biosafety assessment of transgenic poplars overexpressing xyloglucanase (AaXEG2) prior to field trials, *J Wood Sci*, 54:408-413 (2008)
  - 18) R Kaida, T Hayashi, TS Kaneko, Purple acid phosphatase in the walls of tobacco cells, *Phytochem*, 69: 2546-2551 (2008)
  - 19) T Takabe T, A Uchida A, F Shinagawa, Y Terada, H Kajita, Y Tanaka, T Takabe, T Hayashi, T Kawai, T Takabe, Overexpression of DnaK from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* enhances growth rate as well as abiotic stress tolerance of poplar plants, *Plant Growth Reg*, 56: 265-273 (2008)
  - 20) S Hartati, E Sudarmonowati E, YW Park YW, T Kaku, R Kaida, K Baba, T Hayashi, Overexpression of poplar cellulase accelerates growth and disturbs the closing movements of leaves in sengon, *Plant Physiol*, 147: 552-561 (2008)
  - 21) H Ikegaya, T Hayashi, T Kaku, K Twata, S Sonobe, T Shimmen: Presence of xyloglucan-like polysaccharide in *Spirogyra* and possible involvement in cell-cell attachment, *Phycological Res*, 56: 216-222 (2008)
  - 22) T Hayashi, R Kaida, T Kaku, K Baba, Enhancement of saccharification by overexpression of various endoglycanase in poplar, *J Brasil Sci*, 55: 145-149, (2008)
  - 23) EJ Mellerowicz, P Immerzeel, T Hayashi, Xyloglucan: The molecular muscle of trees, *Annals Bot*, 102: 659-665 (2008)
  - 24) A Alonso-Simon, P Garcia-Angulo, AE Encina, JM Alvarez, JL Acebes and T Hayashi 2007 Increase in XET activity in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cells habituated to dichlobenil, *Planta*, 226: 765-771.
  - 25) N Nishikubo, T Awano, A Banasiak, V Bourquin, F Ibatullin, R Funada, H Brumer, TT Teeri, T Hayashi, B Sundberg and EJ Mellerowicz 2007 Xyloglucan Endo-transglycosylase (XET) Functions in Gelatinous Layers of Tension Wood Fibers in Poplar—A Glimpse into the Mechanism of the Balancing Act of Trees, *Plant Cell Physiol*, 48: 843-855.
  - 26) BR Urbanowicz, AB Bennett, E del Campillo, C Catalá, T Hayashi, B Henrissat, H Höfte, SJ McQueen-Mason, SE Patterson, O Shoseyov, TT Teeri, and JKC Rose 2007 Structural organization and a standardized nomenclature for plant endo-1,4- $\beta$ -glucanases (cellulases) of glycosyl hydrolase family 9. *Plant Physiology*, 144: 1693-1696.
- [学会発表](計4件)
- 1) Hayashi T and Kaida R: Occurrence of xyloglucan in the cellulose microfibrils of the secondary wall, XII Cell Wall Meeting, July 27, 2010.
  - 2) T. Hayashi, M. Takeuchi, Y.W. Park, T. Kaku, M. Yoshida, T. Awano, R. Kaida, K. Baba: Xyloglucan creates tensile stress in the secondary wall. XI Cell Wall Meeting 15<sup>th</sup> August 2007.
  - 3) 林 隆久: Current situation of researches on genetically modified trees in Japan, フィーラム: 少資源国日本のバイオマス研究、日本分子生物学会生化学会合同大会、パシフィコ横浜、12月14日(2007)
  - 4) 林 隆久、馬場啓一: さまざまな細胞壁分解酵素を発現する組換えポプラ、理研シ

ンポジウム、理研横浜、2月18日(2008)

[図書](計2件)

- 1) 林 隆久編：森をとりもどすために2  
 林木の育種、p171、海青社、大津、滋賀  
 (2010)
- 2) 林 隆久編：森をとりもどすために、  
 p102、海青社、大津、滋賀 (2008)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林 隆久 (HAYASHI Takahisa)  
 東京農業大学・応用生物科学部・教授  
 研究者番号：70231529

##### (2) 研究分担者

無

##### (3) 連携研究者

谷口 亨 (TANIGUCHI Toru)  
 森林総合研究所・森林バイオ研究セン  
 ター・研究員  
 研究者番号：00360470

井出 雄二 (IDE Yuji)  
 東京大学・農学生命科学研究科・教授  
 研究者番号：90213024