

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780055

研究課題名 (和文) 油糧植物ジャトロファの乾燥耐性の向上を目指して

研究課題名 (英文) For the improvement of drought tolerance in *Jatropha curcas*

研究代表者

柴垣 奈佳子 (SHIBAGAKI NAKAKO)

大阪大学・工学研究科・寄附講座准教授

研究者番号：50525152

研究成果の概要 (和文)：

科学的知見の未だに乏しい植物 *Jatropha curcas* L. (ジャトロファ) について、水分の不足した環境におかれたときの生理学的解析を行い、その結果に基づいて決定したタイムコースで、乾燥ストレス付加後一定時間までの代謝産物や転写産物の蓄積の変動を調べ、ジャトロファの代謝経路の活性の水欠乏条件への応答を明らかにした。また一方で、ジャトロファの乾燥耐性強化を目指した遺伝子改変のために必要な、形質転換の条件を決定した。

研究成果の概要 (英文)：

*Jatropha curcas* L. is one of the promising oil plants as a feed stock for future biodiesel production in the world. Despite the fact that *J. curcas* is believed to grow and yield oil even in semi-dry area, its physiological responses to water deficit has not been studied at molecular level. In this work, we successfully determined the changes in profile of primary metabolite accumulation and gene expression upon drought in *J. curcas*. Physiological responses, such as stomatal conductance, growth, water and ABA content in leaf, were also examined. Some metabolic pathways and genes were suggested as possible targets for genetic improvement aiming to enhance *Jatropha*'s drought tolerance. To perform such genetic manipulation, we also investigated various conditions for efficient transformation of *J. curcas* using *Agrobacterium tumefaciens* in this work.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 植物栄養学・土壌学

キーワード：植物代謝調節

## 1. 研究開始当初の背景

動植物の堆積物が数億年かけて変化した化石燃料の恩恵によって、文明は発展してきた。しかしその埋蔵量は有限であり、代替エ

ネルギー源を早急に確保する必要がある。植物由来の燃料は再生可能エネルギーの一つである。植物は光合成により、無機物から有機物(炭素化合物)を作ることができる。太

陽光のエネルギーを糖質、油脂などの炭素結合にかえて蓄積することができるのである。しかし、植物をエネルギー源として用いる際には、地球上の耕作可能な土地の面積は限られているため、その土地を油糧作物が食用作物と競合するという問題が生じる。

そこでジャトロファという植物が有望視されている。ジャトロファは他の植物が生育できない、水と栄養についての限界領域で、比較的良好に生育することができるという報告されている。よって、ジャトロファの栽培は食用作物の作付面積を減らすことがないと期待される。そして何よりも、ジャトロファは、良質の油脂を多く含んだ種子をつける。その油脂は加水分解によりバイオディーゼルとなる。

ところが、ジャトロファの生育や生理などについては、科学的な研究に基づく知見に乏しい。本研究は、ジャトロファの乾燥応答の機構について分子レベルでの知見を与え、また将来的には、ジャトロファの乾燥地での生産性の増加を目指した遺伝子改変を有効なものにすることを目指して行なわれた。

## 2. 研究の目的

ジャトロファは年間降水量の少ない土地でも、比較的生育が可能であることが知られている。この性質は、乾燥地の有効利用と緑化のために非常に有益である。しかし乾燥に強いジャトロファといえども、十分な降水量のある土地でのプランテーションでは年間における実の収穫回数が多く、結果、食用作物に適した土地でのジャトロファの作付につながる。このことは、食用作物生産と競合しない油糧植物の開発という理想と相反する。そこで遺伝子改変により、乾燥耐性、特に乾季の生産性を強化したジャトロファの作出を目指す。そのためにはまず、ジャトロファの乾燥ストレス応答そして耐性の仕組みを分子レベルで明らかにすることが必須である。

### 目的 1—ジャトロファの乾燥ストレスへの応答の解析

ジャトロファでは、乾燥にさらされた際にどのような代謝物の蓄積変化を示すか、そしてどの遺伝子発現が関わりどのように制御されており、どのように馴化するのかを明らかにする。それによって、本申請研究の後の、遺伝子改変による高性能ジャトロファの作出を目指す際の改良のターゲットとなる経路、遺伝子の決定へとつなげる。

### 目的 2—形質転換ジャトロファの作出を可能

## にする

他の植物種において、過剰発現により乾燥耐性を与えることが明らかにされている遺伝子について、ジャトロファの形質転換体でも同様の効果が得られるかを調べる。**目的 1**によってジャトロファの内生的な乾燥ストレス応答を調べて、さらなる乾燥耐性を付与するために好適な遺伝子を検討すると同時に、既に得られている知見に基づき、有望と思われる遺伝子について先に検定することで、形質転換体作成のための時間を節約できる。

## 3. 研究の方法

ジャトロファを人工気象器の中で2カ月生育させた後、根を空気中に出すことにより急激な乾燥条件を付与し、気孔の開度、葉の水分含量、タンパク質・アブシジン酸含量の他、GC-TOFMSを用いて代謝産物の蓄積を測定した。あるいは、灌漑を停止することにより緩やかな乾燥条件の付与を行ない、土壌中の水分含量の低下と葉の伸長の停止などの生理学的応答の相関の他、代謝産物、転写産物の蓄積の変化を調べた。

比較的若い葉の組織にアグロバクテリアを感染させて行なう形質転換方法について、アグロバクテリアの系統や、光条件による感染効率の違いを調べた。また減圧を用いることによる、感染工程の簡便化を試した。

## 4. 研究成果

土壌の水分含量が低下すると速やかに気孔を閉じ、光合成活性の低下により主な糖の蓄積が低下、タンパク質含量も低下、また、生長も停止する一方で、ラムノースなどの糖やグリシンベタインの蓄積を増加させ、葉の水分保持能力が上昇することが分かった。ラムノースの蓄積の増加については、灌漑の停止による緩やかな水欠乏処理を与えられた葉において顕著であり、急激な水欠乏処理では、大きな増加は見られなかった。

図1に示すように、急激な乾燥処理を与えた場合、若い葉（図中L0-L2）を除いて、成熟した葉は落葉する傾向にあるが、緩やかな乾燥処理によって、植物体が水欠乏条件に馴化させると（図中”acclimated”）その後急激な水欠乏処理を与えた場合にも全ての葉が残る。このような差を与える原因のひとつとしてラムノースの蓄積による葉での水分保持が考えられる。

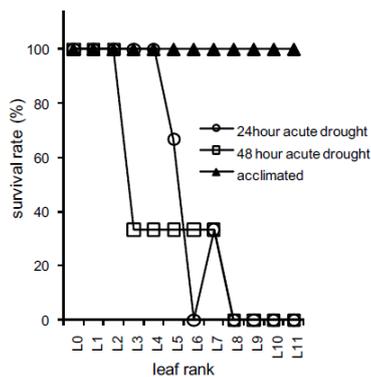


図 1

そこで葉の水分含量を測定したところ、急激な乾燥を与えることにより速やかに低下するが（図2）、緩やかに水分欠乏を与えた場合には、4-7日後にも高く維持される（図3）ことが明らかとなった。

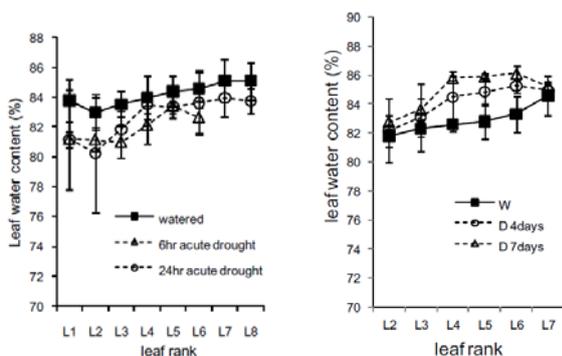


図 2

図 3

また芳香族アミノ酸や分岐鎖アミノ酸なども乾燥条件下で顕著に増加し、これらの蓄積が過剰な光エネルギーによる酸化障害の緩和に働いている可能性が示唆された。転写産物解析の結果から、これらのアミノ酸の蓄積は、生合成活性の増加が寄与していると思われる。

他にも、緩やかな乾燥処理によってアミン化合物の蓄積が増加することや、それらの蓄積の変化のパターンは、若い葉と成熟した葉の間で異なることなどが明らかとなった。その一例として、グルタミンの蓄積の変化を図4に示した。これらの結果より、葉の位置（成熟度）によって窒素代謝の乾燥条件への応答が異なると示唆された。

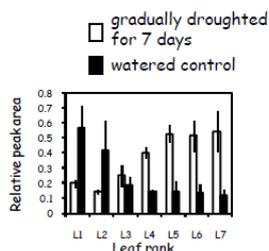


図 4

これらの結果は、降水量の少ない土地でも生産性の高いジャトロファの創出を目的とした遺伝子改変のための有効な戦略を示唆するが、遺伝子改変のために必要となる、ジャトロファの形質転換法の高効率化を目的とした研究も同時に進めてきた。汎用性の高い方法としてアグロバクテリウムを用いた形質転換法が用いられるが、アグロバクテリウムの系統間でのジャトロファへの感染のしやすさには有意な差がないこと、また、光条件も感染に有意な差を与えないことなどを明らかにした。また、減圧湿潤法による葉全体へのアグロバクテリウムの感染を用いることにより、形質転換法の操作の中で、組織培養以前の過程を簡略化することができた。

## 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4件）

(1) Sato S, ... (25) ..., Shibagaki N, ... (7).

2011 “Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas*” DNA Research Epub, ahead of print, (Dec 13, 2010) 2011, 18(1), 65-76, IF 4.917, 査読有

(2) Khemkladngoen N, Cartagena J, Shibagaki N, and Fukui K 2010

“Adventitious Shoot Regeneration from Juvenile Cotyledons of a Biodiesel Producing Plant, *Jatropha curcas* L.” Journal of Bioscience and Bioengineering Epub 2010 Oct 2, 111(1), 67-70, 2011-01 査読有

(3) Shibagaki N and Grossman AR. 2010

“Binding of cysteine synthase to the STAS domain of sulfate transporter and its regulatory consequences” Journal of Biological Chemistry 2010 Aug 6;285(32):25094-102. Epub 2010 Jun 7, Times cited 2, IF 5.33 査読有

(4) Witkowska M, Ohmido N, Cartagena J, Shibagaki N and Fukui K. 2009.

“Physical mapping of ribosomal DNA genes on *Jatropha curcas* chromosomes by multicolor FISH”. Cytologia Vol. 74 No. 2, 133-139 査読有

〔学会発表〕（計7件）

(1) 2011年3月23日 NTSセミナー 文京区、東京 招待講演 「ヤトロファ研究の最新動向」 柴垣 奈佳子

(2) 2010年9月7日 3<sup>rd</sup> Aachen-Osaka Joint Symposium on Biological and Chemical

Approaches to Selective Processes at RWTH Aachen, Germany, Invited talk, Shibagaki, N.

“Genetic Engineering of *Jatropha curcas* L. for improvement of drought resistance”

(3) 2010.11.22-27

8<sup>th</sup> International Workshop Sulfur metabolism in higher plants at the University of Melbourne, Creswick, Victoria, Australia

“Regulation of sulfate transport by interaction between sulfate transporter and cysteine synthase”

Nakako Shibagaki-presenter and Arthur R Grossman (oral)

(4) 2010.8.1-5

Annual Meeting of American Society of Plant Biologist at Congress Center, Montreal, Quebec, Canada

“Changes in the profiles of primary metabolite accumulation upon drought stress in *Jatropha curcas* L.”

Nakako Shibagaki-presenter, Hiroshi Tsugawa<sup>a</sup>, Eiichiro Fukusaki (poster)

(5) 2010.6.6-10

International Conference on Arabidopsis Research at Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan

“Interaction between a sulfate transporter and cysteine synthase”

Nakako Shibagaki-presenter and Arthur R Grossman (poster)

(6) 2009年9月25日日本生物工学会大会シンポジウム「油糧植物ジャトロファの改良に向けてー日本における遺伝子改変のための基盤整備と方向性ー」

を、開催。以下の題名で講演。「半乾燥地における生産性の高い遺伝子改変型ジャトロファの作製を目指して」

(7) 2009年7月23日 Biofuels World 2009 招待講演 (パシフィコ横浜)

「ヤトロファにおける遺伝解析と遺伝子改変による改良」柴垣 奈佳子

〔図書〕(計1件)

(1) Fukui K, Katakura Y, Shibagaki N 分担執筆 「バイオディーゼルの開発」福住俊一監修「環境を支える科学技術」朝倉書店 (2011)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計5件)

(1) 出願にかかる特許の表題: 「遺伝子導入植物体の形成方法」

種類: 特許権

出願者: 柴垣 奈佳子、Suthitar Singkaravanit、池口 直樹、湯塩 泰久

権利者: 同上

出願番号: 特願2010-262581

出願日: 平成22年11月25日

出願国: 日本国内

(2) 出願にかかる特許の表題: 「アグロバクテリウム媒介形質転換方法及びこれを用いた形質転換植物の作出方法」

種類: 特許権

出願者: 柴垣 奈佳子、Suthitar Singkaravanit、池口 直樹、湯塩 泰久

権利者: 同上

出願番号: 特願2010-261982

出願日: 平成22年11月25日

出願国: 日本国内

(3) 出願にかかる特許の表題: 「植物の遺伝子導入方法及び形質転換植物の作出方法」

種類: 特許権

出願者: 柴垣 奈佳子、Suthitar Singkaravanit、池口 直樹、湯塩 泰久

権利者: 同上

出願番号: 特願2010-262180

出願日: 平成22年11月25日

出願国: 日本国内

(4) 出願にかかる特許の表題: 「ジャトロファ属植物の栽培方法」

種類: 特許権

出願者: 柴垣 奈佳子、津川裕司、福崎英一郎、ジョイス カルタヘナ、福井希一

権利者: 同上

出願番号: 特願2010-066359

出願日: 平成22年3月24日

出願国: 日本国内

(5) 出願にかかる特許の表題: 「組織培養法」

種類: 特許権

出願者: 柴垣 奈佳子、ナルモン ケムクラゲン、ジョイス カルタヘナ、福井希一

権利者: 同上

出願番号: 特願2010-003150

出願日: 平成22年1月8日 出願国: 日本国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-bie-sei.mls.eng.osaka-u.ac.jp/home/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴垣 奈佳子 (SHIBAGAKI NAKAKO)

大阪大学・工学研究科・寄附講座准教授

研究者番号 : 50525152