

低強度の塩ストレス処理による耐塩性遺伝子組換えユーカリ評価方法の開発

石川 絵里 (筑波大学 生物学類)

指導教員：菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

近年、地球規模での環境変動、およびそれに伴う森林面積減少が引き起こす二酸化炭素収支の悪化や耕作可能な土地の減少、その結果としての温暖化の促進や食糧不足問題が深刻化することが危惧される。そこで、この問題の解決策の一つとして、半乾燥地や塩害地でも植林可能な遺伝子組換え樹木の開発・実用化が期待されている。本研究では、以前から植生限界地での植林を目標とし、遺伝子組換え技術を用いた環境ストレス耐性樹木の開発・評価に関する研究を行っている。本研究が実験に用いている樹木は、早生樹種であるユーカリである。ユーカリは産業上重要な樹木であるため、植林するにあたってかなり有用性があると考えられる。また、ユーカリは日本に近縁野生種がないため、他の植林木と比べて周辺生態系への遺伝子流動等の環境リスクも低いと考えられる。しかし、実際の塩害地を想定した場合、塩存在下で持続的に成長する形質がより重要になると考えられる。そこで本研究では、新たに低強度の塩ストレスをユーカリに与えるための塩処理方法の検討および、本条件で栽培した際の成長量による耐塩性評価方法の開発・検討を行った。

材料と方法

1. 植物材料

異なる耐塩性遺伝子を導入した遺伝子組換えユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) 9 系統及び、非組換え体 2 系統 (CML2, cam6) を植物材料とした。遺伝子組換え体はいずれも共同研究先の日本製紙 (株) で作出されたもので、その内訳は塩生土壌微生物 (*Arthrobacter globiformis*) 由来の *codA* 遺伝子導入系統を 4 系統 (A1, A2, A10, B25)、塩生植物であるアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) 由来の *RBP* 遺伝子導入系統を 3 系統 (R1, R4, R10)、マングローブ (*Bruguiera sexangula*) 由来の *mangrin* 遺伝子導入系統を 2 系統 (man15, man40) である。まず、日本製紙で生産した *in vitro* 苗を栽培室 (閉鎖系) で馴化した後、特定網室で直径 10.5 cm の黒丸ポットに移植し、2 ヶ月以上の馴化を行った。馴化後、高さを基準に通常灌水と塩水処理の 2 つのグループに分け、耐塩性評価試験を開始した。

2. 耐塩性評価試験

特定網室で馴化した植物を 70mM NaCl 水溶液を底面吸水で与え栽培し、系統間、および、水道水を底面吸水した対照区との間で成長量を比較することで、耐塩性を評価した。塩処理は、2012 年 5 月 9 日から 2012 年 10 月 24 日まで 24 週間、週 3 回実施した。塩処理による土壌中の塩環境を評価のため、灌水の度に土壌の電気伝導度 (EC 値) を測定した。塩処理期間中は、およそ 1 週間毎に樹高および基部直径を計測した。また、試験終了後の乾燥重量を計測した。これらの測定値から各個体のバイオマス量および成長量、成長速度を算出した。

結果と考察

塩処理条件

実験開始から約 1 ヶ月後、塩水処理区の土壌の EC 値が 8~10 ms/cm 程度で安定し、この状態を実験終了時までのおよそ 20 週間に渡って維持することができた。これは、比較的塩害に強い植物でも塩ダメージが出始める塩濃度である。この条件の下植物を栽培したところ、いずれの系統もほぼすべての個体が生き残った。このことから、本研究で行った塩処理条件は、塩害地で育成するという観点からユーカリ (*E. camaldulensis*) の耐塩性を評価するにあたって適切な実験方法であると考えられる。

評価方法の開発

各系統のバイオマス量 (基部直径×基部直径×高さ) の経時的变化を見ると、いずれの系統も塩処理条件下での成長量の低下が見られたが持続的に成長を続けた。より詳細に成長の比較を行うために、処理区間・系統間で最終的なバイオマス生産量を比較した。バイオマス容積の最終値を比較したところ、いずれの系統でも、塩処理条件下でのバイオマス量が通常灌水に比べて低下していて、特に非組換え体での低下が著しかった。絶対成長量では、*RBP* 導入系統である R4, R10 以外の組換え体系統で非組換え体に比べて塩ストレス下でのバイオマス生産が向上していることが分かった。特に *codA* 導入系統が、塩処理条件下でも非組換え体と比べて良好な成長を示すことが分かった。しかし、塩処理条件で良好な成長を示した系統は、総じて塩処理開始時の個体サイズが大きい傾向があった。このため、植物サイズを考慮するために相対成長量を算出することにした。絶対成長量を塩処理開始時のバイオマス量で割った値を相対成長量として比較したところ、*mangrin* 遺伝子導入系統である man40 系統は初期サイズの 2.7 倍であった。それに対し man40 以外の系統では、いずれも平均で初期サイズの 1.6 倍程度であった。このことから、*mangrin* 遺伝子は、低強度の塩ストレスに対する耐性の付与に関して優れていることが示唆される。また、*mangrin* 遺伝子導入系統は、塩処理開始の早い段階から下方の成熟した葉を落とすという特徴が確認された。現在、ユーカリの形質転換は種子由来の胚軸を対象として行っているため、今の技術では系統ごとに遺伝的背景の差が生じる。したがって、この遺伝的背景が植物の耐塩性に影響することを考慮する必要がある。例えば、今回使用した組換え体系統のもととなった非組換え体の耐塩性試験をして、宿主の元来の耐塩性を評価する必要があるだろう。今後耐塩性試験についての結論を出すには、今回開発した耐塩性評価法での再現性を確認しなくてはならない。本耐塩性評価法は、不毛な土地での産業植林や環境植林に適した環境ストレス耐性ユーカリの選抜に有効であると考えられる。今後、選抜されたユーカリに対して適切な環境リスク評価を行うことで、半乾燥地や塩害地での実用化を果たし、地球温暖化や食糧不足といった現代が抱える問題の解決策となることが期待される。