

バイオテクノロジーを利用したパルプ材の育種

王子製紙株式会社 森林資源研究所

河津 哲、土肥敬悟、日尾野隆、伊藤一弥、柴田 勝

1. はじめに

近年の地球環境保護の高まりによって、多くの国が木材の伐採規制、輸出規制を強化したため、製紙原料となる木材が高騰すると同時にその安定確保が困難になるという状況が生まれてきた。このような状況下で当社は、“資源の消費者は生産者でもあるべきである”との考えのもと、1991年にオセアニア、東南アジアなど太平洋地域の5ヶ所においてユーカリ類、アカシア類の植林を開始した。これらの海外植林を支援するため、従来育種とバイオテクノロジーを利用した育種（バイオ育種）を組み合わせた育種法によって、植林対象樹種（ユーカリ）のパルプ特性の向上をめざした研究を行っている。

これまで行われたユーカリ育種の代表例としては、ブラジルのアラクルス社の例を挙げることができる。彼らは、ユーカリ類に対して、林木育種で通常行われている成長性に加えて、紙パルプ産業上重要な因子である容積重やパルプ収率を指標にして従来育種（選抜、交雑）を行い、育種前と比較して材積では2.3倍、パルプ収率では2.4倍も増加したことを報告している¹⁾。このことは、ユーカリにおける材質を直接的な目的とする育種の有効性を示唆している。しかし、この育種も従来育種法のみ依存したのでは、他殖性でかつライフサイクルが長い林木に対して、育種に長い年月を必要とするため、効率が悪い。そこでわれわれは、パルプ材を育種する手段として、従来育種法と平行してバイオ育種に着手した。ここでは、ユーカリにおいて、われわれが行ってきたバイオ育種に関して、①組織培養系の確立、②形質転換系の確立、③リグニン合成の制御の順に紹介する。

2. ユーカリの組織培養系の確立

われわれはユーカリの中でも特に *Eucalyptus camaldulensis*（以下、カマルドレンシス (Fig.1-A)）に着目した。このカマルドレンシスは成長性はもとより、耐乾燥性、耐塩性、耐霜性さらにはパルプ適性等においても優れていることから、乾燥地を中心として世界で最も広範囲に植林されている主要植林樹木である²⁾。このユーカリに対してバイオ育種を適用するには、まずその基礎となる組織培養系が必要である。われわれは広島大学で開発された苗条原基法³⁾を数種のユーカリの組織培養に応用して、苗条原基と呼ばれる細胞集塊の作出に成功した⁴⁾。この苗条原基は、茎頂を植物ホルモンの存在下でゆっくり回転培養 (Fig.1-B) することによって得られ、組織的には成長点が集合した培養物 (Fig.1-C) である。また、この苗条原基は継代して維持することができ、苗化培地に置床することによって、多数の苗条を安定して得ることができる (Fig.1-D)。苗条原基法は当初茎頂からのクローン増殖方法として利用してきたが、茎頂だけでなく、成葉、子葉、胚軸等のさまざまな組織からも苗条原基が誘導できることが明らかになり、また苗条原基に由来するプロトプラストからもカルスを経由して苗条原基が誘導でき、苗条の再分化も可能であることがわかった⁵⁾。このことは、カルスからの器官分化が困難であったカマルドレンシスからも、苗条原基を経由させることによって再分化できることを示しており、ユーカリにおいてもバイオ育種の基本技術であるクローン増殖、遺伝子導入、細胞融合、体細胞変異個体の作出が可能であることが示唆された。

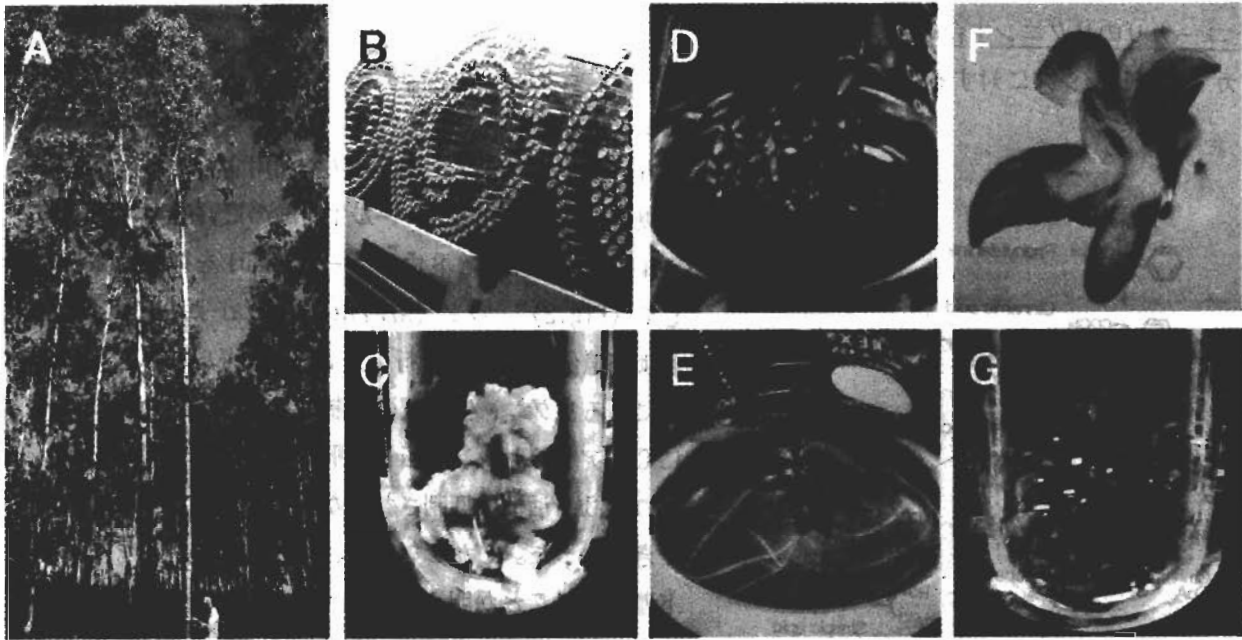


Fig. 1 ユーカリの組織培養と遺伝子組換え

A: ベトナムに試験植際されたユーカリ (*E.camaldulensis*) B: 苗条原基誘導に使用する回転培養器
 C: ユーカリ苗条原基 D: 苗条原基からの苗化 E: 発根 F: 遺伝子組換えユーカリの苗条で GUS 遺伝子発現を検出 G: ユーカリ茎頂から誘導した早生分枝

3. ユーカリの形質転換系の確立

ユーカリの組織培養系に関しては、これまでいくつかの報告^{6) 7) 8)}がなされているが、安定的な形質転換植物の再生に関する報告は少ない^{9) 10)}。一方、われわれは、苗条原基系を利用して、数種のユーカリにおいてプロトプラストに遺伝子導入するエレクトロポレーション法¹¹⁾、あるいはアグロバクテリウム法による形質転換系を開発している。しかし、エレクトロポレーション法は、遺伝子導入から植物体の再生に平均 2 年間を要すること、また形質転換率が低い ($1 \times 10^{-5} \sim 10^{-6}$) 等の理由によって、実用性に乏しいと判断し、アグロバクテリウム法による形質転換系の構築について詳細に検討した。

アグロバクテリウム法による形質転換系の開発において、留意されるべきことは、①再分化が可能な組織に、②アグロバクテリウムを感染させることである。カマルドレンシスを対象樹木とした場合、①に関しては、根以外のさまざまな組織から苗条原基を経由して再分化が可能であるので問題はない。しかし、②各組織のアグロバクテリウムあるいは抗生物質に対する感受性を調べたところ、成葉、幼葉、茎頂の各組織は、これらの刺激に対して感受性が高く、処理後、黒変して枯死した。一方、子葉、胚軸は耐性を示すと同時に、形質転換カルスが得られ、再現性の高い形質転換が可能になった。次いで形質転換率を左右する要因として、アグロバクテリウム菌株、アグロバクテリウム菌の生育状態、共存培養時の添加物、抗生物質による選抜濃度、選抜の時期等の条件について至適化を行い、共存培養した胚軸の 2~3% から、平均 1 年で形質転換植物体が得られた¹²⁾。また、 β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を導入した形質転換植物において、GUS 発現が検出できたことから (Fig.1-F)、形質転換系として機能していることが確認できたが、成長等に優れた特定個体 (精英樹) に遺伝子を導入することが困難であった。この問題を解決するために、成木に由来する種々の組織を材料として形質転換を行った結果、成木の茎頂を含む組織を回転培養して誘導した早生分枝 (Fig. 1-G) を用いることにより、成木の形質転換が可能になった。

4. ユーカリのリグニン生合成の制御

カマルドレンシスに対するバイオ育種の目標をパルプ製造工程において除去されるリグニン含量の低減に設定した。

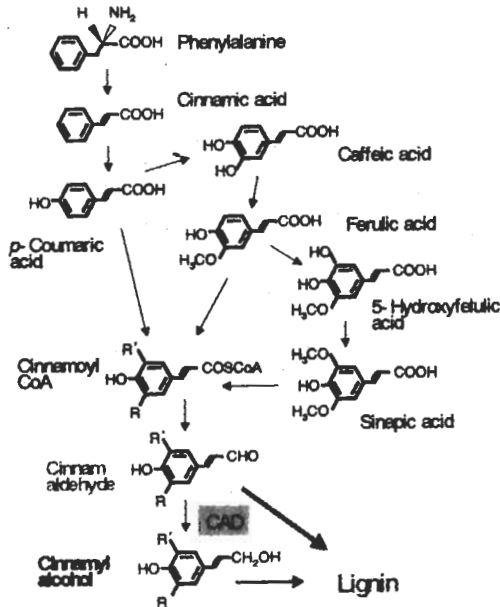
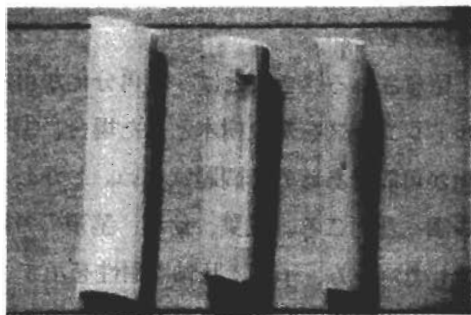


Fig. 2 リグニン生合成経路

さらに、そのリグニン生合成を代謝経路上で抑制する方法として、アンチセンス法を利用するため、リグニンの前駆体であるモノリグノール生合成の最終酵素であるシナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (CAD) を抑制の標的酵素として (Fig.2)、ウド (*Aralia cordata*) から CAD の精製¹³⁾ および遺伝子単離¹⁴⁾ を行った。そこで得られたウド CAD 遺伝子によるリグニン生合成の抑制効果を調べるために、タバコに CAD アンチセンス遺伝子を形質転換した結果、形質転換タバコの CAD 活性は抑制されたが、リグニン含量の低減は検出できなかった。しかしながら、生成したリグニンがアルデヒド基に富むことが明らかになった^{15) 16)}。また、同様の方法でリグニン成分の改質を試みている研究グループは、タバコで CAD 活性の抑制によって、パルプ製造工程における蒸解性が向上していることを報告している¹⁷⁾。

これらの結果より CAD アンチセンス遺伝子の導入によって、ユーカリの蒸解性を向上させる育種が有効であることが推測できた。そこで、アンチセンス遺伝子として使用するカマルドレンシスの CAD 遺伝子を cDNA ライブラリーから PCR 法によって単離した後、そのアンチセンス遺伝子をカマルドレンシスに遺伝子導入して 200 種の形質転換個体を得た。形質転換個体について早生分枝を誘導し、その基部における CAD 活性を指標に一次スクリーニングを行った。さらに、幼植物体の生育と CAD 活性の抑制を考慮して候補個体を選抜し、樹幹における CAD 活性を測定したところ、コントロール個体の CAD 活性に対して約 50~5% に低減した形質転換個体を得られた。CAD 活性の抑制されたユーカリの木部表面に赤色の着色が見られる個体を得られているが、この着色はアルデヒド基に富むリグニンが生成されたことによると考えている (Fig.3)。これらのリグニン生合成の活性が低減した候補ユーカリはリグニン成分の変化により、現状より低温で蒸解が可能になること、パルプ収率が增大すること



Control F19 F332
形質転換体

Fig. 3 遺伝子組換えユーカリの木部表面

等、パルプ製造工程における蒸解効率が向上することが期待できる。最近、ポプラにおいても CAD 活性の抑制によって蒸解効率が向上したとの報告があった¹⁸⁾。今後ますます樹木においてもバイオ育種が積極的に試みられ、材質成分の改良によってパルプ生産性の向上を図られるとともに、環境ストレス耐性 (耐乾燥性、耐塩性等々) を樹木に付与する研究も進展するものと考えられる。

5. 引用文献

- 1) Zobel, B. J. et al. 1984. Wallenberg Prize Symposium, Faul, Sweden
- 2) Eldridge, K., Davidson, J., Harwood, C., van Wyk, G. 1993. Eucalypt Domestication and Breeding, Clarendon Press. Oxford
- 3) Tanaka, R. and Ikeda, H. 1983. Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* (2n=4) by shoot tip cloning. Jpn. J. Genet. 58:65-70.
- 4) Ito, K., Doi, K., Tatemichi, Y., Shibata, M. 1996. Plant regeneration of eucalypts from rotating nodule culture. Plant Cell Rep. in press
- 5) Ito, K., Doi, K., Tatemichi, Y., Shibata, M. 1990. Plant regeneration from protoplasts of *Eucalyptus*. Abstr VIIth Int Congr Plant tissue and cell culture. IAPTC Amsterdam, p 19
- 6) Subbaiah, M.M. and Minocha, S.C. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. Plant Cell Rep. 9:370-373.
- 7) Warrag, E., Lesney, M.S., Rockwood, D.J. 1991. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. Plant Cell Rep. 9:586-589.
- 8) Laine, E. and David, A. 1994. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *E. grandis*. Plant Cell Rep.13:473-476.
- 9) Mullins, KV., Llewellyn, DJ., Hartney, VJ., Struss, S., Dennis, ES. 1997. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Cell Rep.16:787-791.
- 10) Ho, CK., Chang, SH., Tsay, JY., Tsai, CJ., Chiang, VL., Chen, ZZ. 1998. Agrobacteriumtumefaciens-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. Plant Cell Rep.17:675-680.
- 11) Kawazu, T., Doi, K., Ohta, T., Shinohara, Y., Ito, K. and Shibata, M. 1990 Transformation of *Eucalyptus* (*Eucalyptus saligna*) using electroporation. IAPTC Amsterdam, p 64
- 12) Kawazu, T., Doi, K., Tatemichi, Y., Ito, K., Shibata, M. 1996. In: Matheson, M.J, Nikles, A.C, Harwood D.G, Walker, S.M. (eds) Tree Improvement for Sustainable Tropical Forestry, p492
- 13) Hibino, T., Shibata, D., Umezawa, T., Higuchi, T. 1993. Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Aralia cordata*. Phytochemistry 32:565-567
- 14) Hibino, T., Shibata, D., Chen, J.-Q., Higuchi, T. 1993. Cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Aralia cordata*: cloning of the cDNA and expression of the gene in lignified tissues. Plant Cell Physiol. 34:659-665
- 15) Hibino, T., Takabe, K., Kawazu, T., Shibata, D., Higuchi, T. 1995. Increase of cinnamaldehyde groups in lignin of transgenic tobacco plants carrying an antisense gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase. Biosci. Biotech. Biochem. 59:929-931
- 16) Higuchi, T., Ito, T., Umezawa, T., Hibino, T., Shibata, D. 1994. Red-brown color of lignified tissues of transgenic plants with antisense CAD gene: wine-red lignin from coniferyl aldehyde. J Biotechnol. 37: 151-158
- 17) Schuch, W. 1993. Manipulation of genes involved in lignin biosynthesis. Abstr XV International Botanical Congress, Yokohama, Japan, p 185
- 18) Lapiere, C., Pollet, B., Petit-Conil, M., Toval, G., Romero, J., Pilate, G., Leple, JC., Boerjan, W., Ferret, V., De Nadai, V., Jouanin, L. 1999. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. Plant Physiol. 1999. 119: 153-64