

形質転換植物デザイン研究拠点

# 成果報告会

令和元年度

会期：令和2年3月9日・10日

会場：筑波大学春日エリア

情報メディアユニオン3階

共同研究会議室1

主催



つくば機能植物イノベーション研究センター  
Tsukuba-Plant Innovation Research Center



筑波大学T-PIRC遺伝子実験センター  
形質転換植物デザイン研究拠点



筑波大学 つくば機能植物イノベーション研究センター  
遺伝子実験センター 形質転換植物デザイン研究拠点

## 令和元年度成果報告会

会期：令和2年3月9日・10日

会場：筑波大学春日エリア 情報メディアユニオン3階 共同研究会議室1

## プログラム

---

3月9日[月]

13:30 ~ 13:45 開会挨拶 江面 浩（筑波大学／T-PIRCセンター長）

### 第一部 遺伝資源の取り扱いに関するミニシンポジウム

13:45 ~ 14:45 海外生物・遺伝資源のアクセスとフィールド調査の留意事項  
渡邊 和男（筑波大学／T-PIRC副センター長）

14:45 ~ 15:05 休憩

### 第二部 形質転換植物デザイン研究拠点令和元年度成果報告会

セッション 1 座長：大澤 良（筑波大学T-PIRC）

15:05 ~ 15:25 効果的なコミュニケーション活動のための情報基盤整備  
山口 富子（国際基督教大学）

15:25 ~ 15:45 ヒメツリガネゴケにおける窒素応答現象の解明  
養老 瑛美子（立教大学）

15:45 ~ 16:05 ミヤコグサ根粒を用いた有用物質生産プラットフォーム開発に向けた基盤研究  
川勝 泰二（農研機構）

16:05 ~ 16:25 休憩

セッション 2 座長：松倉 千昭（筑波大学T-PIRC）

16:25 ~ 16:45 植物によるアグロバクテリウム認識システムを解明する  
門田 康弘（理研CSRS）

16:45 ~ 17:05 ハマウツボ科寄生植物の安定的形質転換法の確立  
吉田 聡子（奈良先端科学技術大学院大学）

17:05 ~ 17:25 ベタレイン色素合成経路の導入によるアサガオの新規花色の分子育種  
佐々木 伸大（東洋大学）

## 3月10日[火]

### セッション 3 座長：柴 博史（筑波大学 T-PIRC）

9:30～9:50 高温耐性をもつ接ぎ木トマトの特性解析  
西口 正通（愛媛大学）

9:50～10:10 マイクロトムのカロテノイド酸化開裂酵素CCD7欠損変異体の探索  
梅原 三貴久（東洋大学）

10:10～10:30 生物多様性影響評価の基盤となるアサガオゲノム中のT-DNA配列の解析手法の開発  
小野 道之（筑波大学）

10:30～10:50 休憩

### セッション 4 座長：渡邊 和男（筑波大学 T-PIRC）

10:50～11:10 バレイショ近縁種からの環境ストレス耐性形質導入  
波部 一平（長崎県農林技術開発センター）

11:10～11:30 遺伝資源の共有財産としての保全と利活用に資する  
制度枠組みとしての地理的表示保護の活用実態  
内山 愉太（名古屋大学）

11:30～11:50 デジタル配列情報/遺伝的配列データを巡る食料農業植物遺伝資源に関する  
国際条約における抗争 一条約実施と科学的知見の相互作用の観点から  
小林 邦彦（総合地球環境学研究所）

11:50～12:00 閉会挨拶 柴 博史（筑波大学／T-PIRC／形質転換植物デザイン研究拠点長）



## **第一部 遺伝資源の取り扱いに関するミニシンポジウム**

## 海外生物・遺伝資源のアクセスとフィールド調査の留意事項

渡邊和男<sup>1</sup>、岡田祥宏<sup>1</sup>、河瀬眞琴<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>筑波大学 T-PIRC、<sup>2</sup>筑波大学グローバルコモンズ機構、<sup>3</sup>東京農業大学農学部  
NBRP-ABS 学術対策チーム 分担機関 筑波大学グループ

海外からの生物・遺伝資源の取得は、提供者（組織）の所在する国の法的管理や手続きがある。生物多様性条約（CBD）及びその名古屋議定書（NP）については、生物多様性全般を取り扱うものであり、特に、CBD は、米国とバチカン市国を除くほとんどの国家が加盟しており、各国研究機関との生物多様性に関わる研究実施において、要点の理解は必要である。NP は、生物・遺伝資源の取得や探索調査に関わっては、注意事項である。いくつかの関連国際法例を表 1 に上げる。

当該発表では、特に名古屋議定書（生物の多様性に関する条約の遺伝資源の取得の機会及びその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分に関する名古屋議定書、<https://www.cbd.int/abs/>）について対処すべき事項の全般を解説し、実際の遺伝資源等の取得等の手続きの詳細をする。なお、当該国際法に関わり用語としての [ 遺伝資源 ] (GR) は、植物育種学辞典や遺伝学関連の教科書で学問的に説明されているようなものではなく、法律、外交、政治等の絡んだ多様な理解と世俗的な現場運用が諸国で適用されていることを留意されたい。

遺伝資源の取得には、ジーンバンク等からのコレクションの配布を受ける場合、個別の研究者の管理下の材料の提供を受ける場合などや海外での探索収集などがある。海外からの遺伝資源取得や探索収集フィールド調査は、個人ではなく、できうる限り相手方組織を特定し、組織間契約を締結し、実施手続きをすることを勧奨する。国によって要求される手続きは異なり、CBD-NP 関連の手続きが簡略化できる場合もあるが、できる限り生物多様性条約及びその名古屋議定書のスキームの枠組みに従うことを検討いただきたい。PIC (Prior Informed Consent、相手政府の所定の手続きあるいは協定等)、MAT (Mutually Agreed Terms、おおよそ実施計画契約を意味する) 及び MTA (Material Transfer Agreement、材料譲渡契約) 等を締結する。文部科学省を主務省とする日本の国立大学等大学法人や研究開発法人は、文部科学省より管理体制を整えるように指導があるので、各所属組織での支援をまずはご確認されたい。

生物多様性関連の国際法とそれぞれの加盟国の諸法においては、学術研究は除外されておらず、また、相手組織の生半可な了解で安易に取得や調査を進めることには留意が必要である。許認可の手続きは、必ずしも政府組織に限らず、地方自治体や先住民民族あるいは特定の個人との契約等が必要な場合もある。また、生物・遺伝資源の入手に限らず、海外でのフィールド調査全般に、政府の手続きや調査地の地元との折衝が必要となる。先住民民族地域等ではさらに事前の周到的な確認と手続きが必要となる。ここでは、特に探索収集調査についての要点を、発表者らの経験に基づき紹介する。

## GR取得・移転等に関する他の条約・法規制・機関

### 〈国際条約〉

FAO食料農業植物遺伝資源条約 (ITPGRFA)

植物の新品種の保護に関する国際条約 (UPOV)

特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約 (ブダペスト条約)

絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引に関する条約 (ワシントン条約/CITES)

知的所有権の貿易関連の側面に関する協定 (TRIPS協定)

特に水鳥の生息地として国際的に重要な湿地に関する条約 (ラムサール条約)

国際植物防疫条約 (IPPC)

生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書 (カルタヘナ議定書)

細菌兵器(生物兵器)及び毒素兵器の開発、生産及び貯蔵の禁止並びに廃棄に関する条約 (生物兵器禁止条約/BWC)

### 〈地域条約〉

例) カスピ海海洋環境保護枠組み条約 (テヘラン条約)

### 〈その他〉

例) 国連危険物輸送勧告 (UNRTDG)

### 〈関連機関〉

世界保健機関 (WHO) 国際獣疫事務局 (OIE) 世界知的所有権機関 (WIPO)等

問い合わせ先：

1. 筑波大学 T-PIRC 遺伝資源・国際部門内 NBRP 学術対策チーム 分担機関 筑波大学グループ  
渡邊 (029-853-4663) , 岡田 (029-853-6977)  
メール： watanabe.kazuo.fa@u.tsukuba.ac.jp, okada.yoshihiro.gn@u.tsukuba.ac.jp
2. 国立遺伝学研究所 NBRP ABS 学術対策チーム 事務局： [http://nig-chizai.sakura.ne.jp/abs\\_tft/](http://nig-chizai.sakura.ne.jp/abs_tft/)



**第二部 形質転換植物デザイン研究拠点  
令和元年度成果報告会**

## 効果的なコミュニケーション活動のための情報基盤整備

山口 富子<sup>1</sup>、金子 秋穂<sup>2</sup>、津田 麻衣<sup>3</sup>、

<sup>1</sup>国際基督教大学教養学部、<sup>2</sup>東京大学総合文化研究科、<sup>3</sup>筑波大学 T-PIRC

### 問題の所在

効果的にコミュニケーション活動を行う為には、その活動の「目的」と「対象」が明確に定義されそれらに合った手法を採用する必要がある。また、コミュニケーション活動には、情報共有のためのアーキテクチャーの整備や情報共有の為の文化の醸成も求められる（科学コミュニケーションセンター 2014）。T-PIRC 遺伝子実験センター（GRC）は、これまで遺伝子組換え技術の実験方法の研修など法律によって要請されるプログラムをはじめ、日本の食料問題等、広く社会に関わる問題をテーマとするイベントに至るまで、さまざまな形式や規模の活動を展開してきた。しかし、これらの活動実態が必ずしも幅広く知られているとは言えず、活動で培われた知見の伝達や類似の活動を実施したい者へのノウハウの伝授という意味で、GRCの活動について情報発信をする事が求められる。これまでそうした情報発信が行われなかった理由のひとつとして、活動についての情報整理がなされていないという事が想定されるが、記録として残されている情報は、日本におけるコミュニケーション活動の変遷を示す貴重な資料であり、それらを整理して内外に公表する事は意義深い。そこで、本課題では遺伝子実験センターがこれまでに実施した、遺伝子組換え植物、農作物、飼料、食品に関わるコミュニケーション活動に関わる情報を整理し、情報共有のためのアーキテクチャーの整備に向けての準備に取り組む。初年度は、これまでの活動についての情報を収集する事、また収集した情報から読み取る事ができる遺伝子実験センターのコミュニケーション活動の傾向やその特徴を明らかにすることを目標とした。主な手法は、遺伝子実験センターの関係者から得られた活動記録の内容分析（2004年から2019年まで）、またコミュニケーション活動に関与した関係者への聞き取りである。

### コミュニケーション活動の傾向と特徴

先に述べた問題意識を踏まえ、今年度はこれまでの活動記録をエクセルファイルに入力し、体系的な整理を試みた。以下に、そこから読み取る事ができる活動の大まかな傾向と特徴を示す。

グラフ 1 は、GRC がこれまで実施したイベント開催数の経年変化を示す。このグラフから2009年頃からイベント数が増え、2012年にピークを迎えた事、また2014年に開催数が落ち込んだ事が分かる。2012年の開催数の増加は、サイエンスカフェの実施回数が増えた事、

2014 年の開催数の減少は、セミナーの数が減った事による。近年は、総じて年間 30 件程度のイベントが開催されている。

グラフ 1. 2004 年からの開催数の経年変化

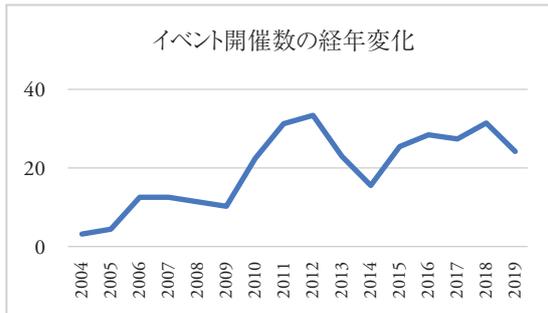


表 1 は、イベント名を使い作成した項目別の開催数を示す。例えば、「研修会」とは、家庭科教員のための組換え DNA 実験教員研修会、理科教員のための組換え DNA 実験教育研修会等を指し、「講習会」とは、遺伝子組換え実験従事者のためのビデオ講習会等を指す。また、イベント名を反映し、セミナー、技術セミナー、研修セミナーを分けて示した。こ

こから、これまで GRC で開催されたイベントとしては、サイエンスカフェやセミナー、シンポジウムの頻度が高いという事が分かる。先に述べた研修会と講習会は類似したイベントなのか、またさまざまな名称で呼ばれているセミナーを分けて分類すべきか一元化すべきか、今後、関係者へのヒヤリングを通して精査する必要がある。しかし、総じて 2004 年以来実施されてきた遺伝子実験センターのコミュニケーション活動は、近隣住民や学生・学内関係者を対象とする教育目的のイベントが中心であった。コミュニケーション活動の目的や機能には、「教育・啓発」、「信頼醸成」、「問題発見」、「意志決定」、「回復と和解」があるという事を踏まえ（科学技術コミュニケーションセンター 2014）、本課題により作成予定のデータベースを活用し、その他の目的や機能を持つコミュニケーション活動へ活動の幅を広げるのか、教育に軸足を置く形式でコミュニケーション活動を継続するのか今後の議論が待たれる。

表 1 項目別の開催数

項目	回数
サイエンスカフェ	153
セミナー	38
シンポジウム	27
技術セミナー	22
講習会	20
研究セミナー	20
研修会	14
説明会	10
講演会	8
展示（科学技術週間）	7
ワークショップ	6
講義	1
見学会	1
計	327

参考文献

科学技術振興機構・科学コミュニケーションセンター  
 『リスクコミュニケーション調査事例報告書』、  
 2014年3月発行。

## ヒメツリガネゴケにおける窒素応答現象の解明

養老 瑛美子<sup>1</sup>、壽崎 拓哉<sup>2</sup>、榊原 恵子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>立教大学理学部、<sup>2</sup>筑波大学 T-PIRC

植物の生育に必須の三大要素の一つである窒素は大気中の約 7 割を占めるが、植物は大気中の窒素を直接利用できず、硝酸やアンモニアを窒素源として吸収する。これまで、被子植物マメ科植物による根粒共生をはじめ、貧窒素環境下における植物の窒素獲得機構に関する研究が展開されてきたが、陸上植物の環境適応の理解に重要な、コケ植物における窒素応答についてはその大部分が未解明である。本研究では、浮遊生活から定着生活への転換で陸上植物が直面したであろう、貧窒素環境への適応戦略の一端の解明を目指して、コケ植物のモデルであるヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を用い、①窒素源が関わるコケ植物の発生現象の解明、②窒素応答遺伝子の一つ、NIN-like protein (NLP) 相同遺伝子の機能解析を進めた。

【① 窒素源が関わるコケ植物の発生現象の解明】：コケ植物はその生活環において、複相世代が優占する被子植物とは異なり、単相世代が優占する。まず、単相世代では、胞子発芽後、細胞が一行に並んだ原糸体を形成し、その後原糸体の側枝から茎葉構造をもつ茎葉体が形成する。茎葉体を低温短日条件で培養すると、茎葉体の茎頂に造卵器と造精器を形成し、受精によって複相世代である胞子体を形成する。成熟した胞子体は、減数分裂により胞子を形成し、生活環が一巡する。我々はまず、ヒメツリガネゴケの単相世代を主に培養するために用いられてきた汎用培地 (BCDAT 培地) の成分のうち、硝酸とアンモニアの濃度をそれぞれ変化させた培地を作製し、単相世代の生育を比較した。原糸体では、2 つの原糸体の状態であるプロトネマとカウロネマのうち、アンモニア濃度が高いとカウロネマへの分化が促進された。また、茎葉体では、窒素飢餓条件において固着器官である仮根の形成が促進された。さらに、低温短日条件での茎葉体培養時の窒素条件を検討したところ、複相世代である胞子体形成には窒素飢餓培地が最適であることを見出した。これまで、培地での培養では胞子体形成率が著しく低く、胞子体誘導には完全に無菌ではない培養土 (ジーフィー 7) が使用されてきた。本研究により、完全無菌条件である培地を用い、短期間かつ小スペースで、ほぼ 100% の茎葉体に胞子体を形成させる胞子体誘導系の確立に成功したことになる。窒素源を含む培地で育てた茎葉体にも、造卵器と造精器は形成されたことから、窒素飢餓条件が受精または受精直後の胞子体発生進行の効率を上昇させているのではないかと考えられる。

【② NIN-like protein (NLP) 相同遺伝子の機能解析】：被子植物において、硝酸は生育に必須の窒素源であるとともに、根の発生制御、窒素の吸収や同化の制御、シュートと根の発生バランスの制御、気孔開閉などの様々な細胞プロセスのシグナル分子として機能することが報告されている。近年、シロイヌナズナにおいて、硝酸シグナル応答の鍵となる転写因子として、NIN-like-protein (NLP) が同定された。NLP は、N 末端に硝酸に応答するドメイン、DNA 結合ドメインとして RWP-RK ドメイン、タンパク質相互作用に寄与する PB1 ドメインをそれぞれ有し、硝酸同化関連遺伝子やその他の発生を制御する転写因子の発現を直接誘導する転写因子である。また、マメ科植物においては、硝酸応答ドメインを欠く NIN が根粒形成の実行因子であること、NIN 以外のマメ科 NLP は窒素存在下での根粒形成の抑制に機能することが明らかにされた。我々は、コケ植物ヒメツリガネゴケの NLP の機能を解明することで、基部陸上植物における硝酸応答シグナルの果たす役割の解明を目指した。ヒメツリガネゴケ NLP 相同遺伝子 (PpNLP) は、ゲノム中に 8 コピー存在した。PpNLP 転写因子の機能の冗長性を考慮し、エストロゲン遺伝子発現誘導系を用いた過剰発現株、および転写抑制ドメイン (SRDX) を付加した機能抑制株を作製した。さらに、CRISPR-Cas9 システムによる PpNLP のノックアウト株を作製した。これらの表現型解析の結果を報告する。また、ヒメツリガネゴケにおける機能解析に加え、植物間での NLP の機能の保存性を検証するため、マメ科のミヤコグサ *nlp* 変異体に PpNLP を導入し、表現型が回復するかを検証した結果についても報告する予定である。

## ミヤコグサ根粒を用いた有用物質生産プラットフォーム開発に向けた 基盤研究

川勝 泰二、西田 帆那

農研機構生物機能利用研究部門

植物を用いた物質生産プラットフォームの主流は、穀物の種子およびタバコの植物体全体である。これらの植物をプラットフォームとした物質生産はいわば二酸化炭素の資源化であるが、マメ科植物は根粒菌との共生によって大気中窒素を固定して窒素源として利用できる。従って、マメ科植物根粒の物質生産プラットフォームとしての利用は、非工業的な「二酸化炭素と大気中窒素の資源化」を可能とする。マメ科作物であるダイズはバイオマス生産には適しているが形質転換が容易でない。一方でマメ科モデル植物であるミヤコグサは簡便な形質転換系を含めた実験栽培系が確立しており、物質生産プラットフォームとしての条件を満たしている。ミヤコグサは非食用植物であり、小型でライフサイクルも短い。従って、ミヤコグサ根粒を用いた物質生産プラットフォームの開発は、温室やグロースチャンバーにおける小規模・多品目の高価値有用物質生産によるイノベーション創出に繋がる可能性がある。

外来遺伝子産物の高蓄積には、組織特異的高発現誘導プロモーターが不可欠である。これまでにレグヘモグロビン等、根粒特異的高発現誘導プロモーターが同定されているが、定量的な比較はされておらず、これらのプロモーターが物質生産に最適かは不明である。そこで本研究では、根粒特異的高発現誘導プロモーターを複数同定するとともに既知のプロモーターと比較し、物質生産に適したプロモーターを同定することを目的とする。現在根粒特異的に高発現する遺伝子の同定に向けて、未成熟根粒、成熟根粒、根粒非感染の根をサンプルとした RNA-seq 解析を実施している (図 1)。成果報告会ではその解析結果について報告したい。

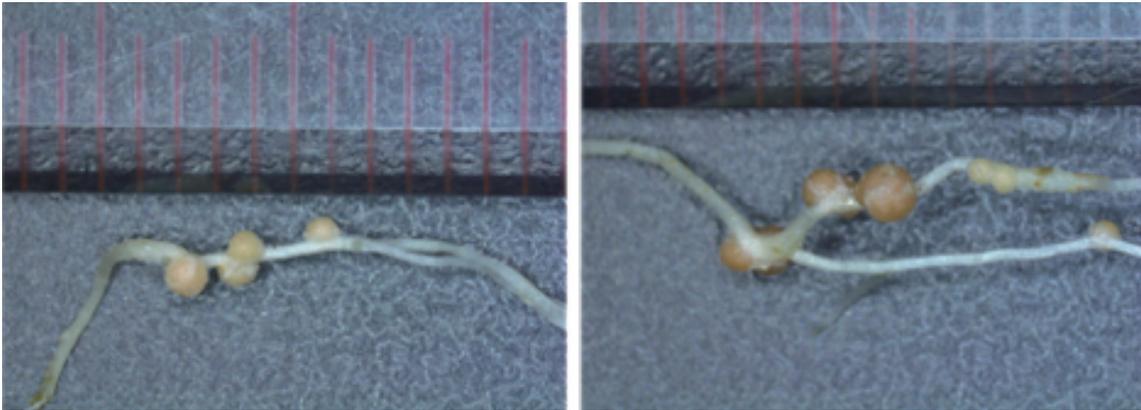


図 1. 発達過程のミヤコグサ根粒

A. 感染後 10 日目の未成熟な根粒。B. 感染後 21 日目の成熟根粒。

## 植物によるアグロバクテリウム認識システムを解明する

門田 康弘<sup>1</sup>、白須 賢<sup>1,2</sup>

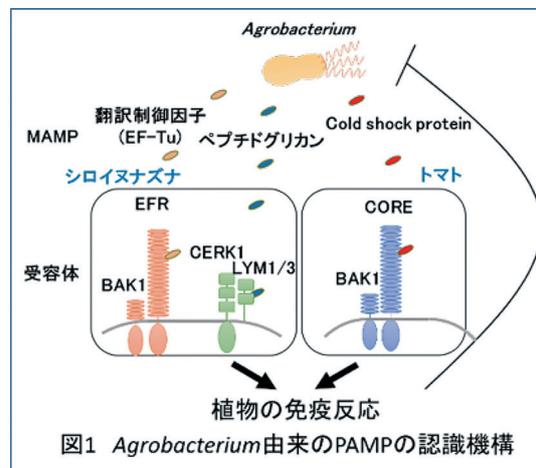
<sup>1</sup>理研 CSRS 植物免疫研究グループ、<sup>2</sup>東京大学 理学系研究科

アグロバクテリウムを用いた形質転換技術（以下、アグロバクテリウム法）は植物への遺伝子導入に最も幅広く利用されており、植物の遺伝子機能解析に欠かすことができない。また、遺伝子組換作物の作出や、ゲノム編集等の NBTs (new plant breeding techniques) の多くもアグロバクテリウム法を必要とする。しかし、この技術はアグロバクテリウムが感染できない非宿主植物には利用できない。このアグロバクテリウムの宿主範囲が植物科学研究、及び植物バイオテクノロジーの発展の律速となっている。この宿主範囲を決定しているのは植物の免疫である。これまでの研究から、植物は微生物が共通に持つ MAMPs (microbe-associated molecular patterns) と総称される物質を認識し、

免疫反応を誘導することが明らかにされた。モデル植物のシロイヌナズナはアグロバクテリウム由来の翻訳伸長因子（EF-Tu）を細胞膜上の MAMP 受容体（EFR）を介して認識する（Cell, 125:749-760）（図 1）。また、トマトはアグロバクテリウム由来の Cold shock protein を MAMP として認識する。EFR を欠損したシロイヌナズナではアグロバクテリウムによる遺伝子発現が亢進することから（図 2）、MAMP 認識がアグロバクテリウムによる形質転換を阻む要因であることが分かった。そこで、本研究ではアグロバクテリウムをステルス化して植物による認識を回避させる技術を確認する。そしてこの技術により、様々な植物種での形質転換効率の向上を目指す。具体的にはアグロバクテリウムから MAMPs を同定するとともに、アグロバクテリウムの MAMPs を改変したり、

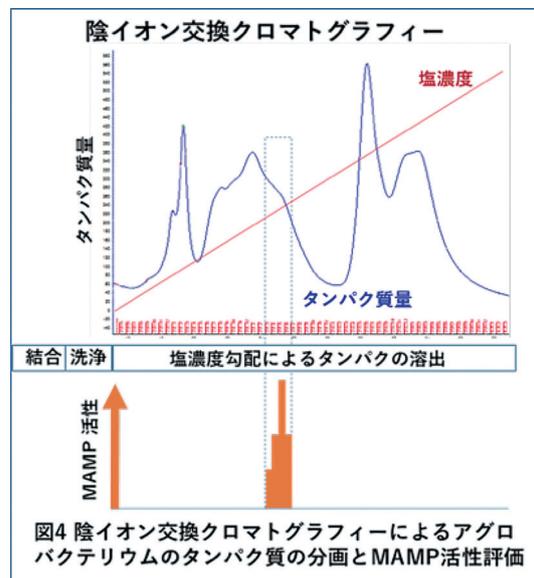
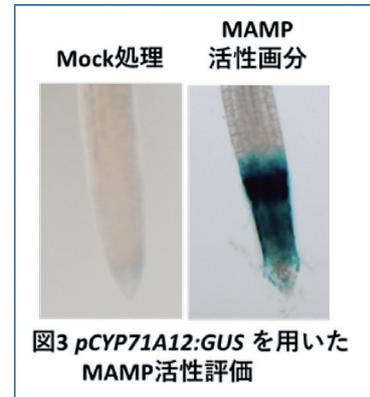
MAMPs の認識を阻害するペプチドを設計して処理することで、植物からの認識を回避させる。

そこで、クロマトグラフィーによるタンパク質性の MAMPs の単離同定を進めている。



MAMP 活性の測定にはシロイヌナズナの MAMP 誘導性遺伝子である *CYP71A12* のプロモーター GUS 植物 (*pCYP71A12:GUS*) を用いて、根における発現を簡便に調べるシステムを構築した。*CYP71A12* はインドールグルコシノレート系の抗菌性物質の合成に関わる酵素であり、MAMP 活性画分処理により、根端部位で強い発現が誘導される (図 3)。アグロバクテリウムを破碎して陰イオン交換クロマトグラフィーによる分画を行ったところ、MAMP 活性のピークを検出した (図 4)。EFR は根での発現が低く EF-Tu は *CYP71A12* の根端での発現を誘導しないことから (Plant Cell, 22: 973–990)、この画分に含まれるタンパク質は新規な MAMP であると考えられる。現在は様々なクロマトグラフィーカラムを用いて、この MAMP のさらなる精製を進めており、精製後は質量分析により MAMP の同定を行う。

MAMPs の中には特定の植物種にのみ認識されるものもある。例えば、EFR はアブラナ科植物しか持っていないが、Cold shock protein の受容体はナス科植物しか持っていない。そこで、トマト、タバコなどにおいても、MAMP 応答を測定する実験系を立ち上げ、これら植物が認識する MAMPs の単離、同定も目指す。



## ハマウツボ科寄生植物の安定的形質転換法の確立

谷澤 美杜里<sup>1</sup>、Songkui Cui<sup>1</sup>、吉田 聡子<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>奈良先端科学技術大学院大学、<sup>2</sup>JST さきがけ

ストライガやオロバンキなどのハマウツボ科の絶対寄生植物は、穀物や野菜類に寄生し大きな農業被害をもたらしている。しかし、その寄生の分子機構は未解明な部分が多く、根本的な解決策は見つかっていない。私たちはこれまで、日本に自生するハマウツボ科の条件的寄生植物であるコシオガマ (*Phtheirospermum japonicum*) をモデル植物として位置付け、分子遺伝学的な実験系やゲノム解析、トランスクリプトーム解析を駆使して、寄生に関わる遺伝子の単離を行っている。しかし、コシオガマでは、*Agrobacterium rhizogenes* を用いた毛状根形質転換系は確立できたものの、種子を介して遺伝させることができる安定的な形質転換法の確立には至っていない。安定的形質転換法が確立できれば、地下部のみではなく地上部で機能する遺伝子の機能解析も可能となり、分子レベルでの寄生の理解が一層進むと考えられる。そこで、本研究では、コシオガマの安定的形質転換法の確立を目指して、様々な方法を試みた。

### 1. フローラルドロップ法

*Agrobacterium tumefaciens* を用いたフローラルドロップ (フローラルディップ) 法はシロイヌナズナで定法として用いられる、簡便な形質転換法である。一定時期の花芽をアグロバクテリウム懸濁液に浸すことにより、アグロバクテリウムが胚珠に入り遺伝子導入がおこる。しかし、この方法は一部のシロイヌナズナ近縁種で成功が報告されているものの、他の植物種では、再現性のある良好な結果が得られていない。私たちは、コシオガマでもフローラルドロップ法が使えないかと考え、実験を試みた。

コシオガマのつぼみに GUS 遺伝子を持つプラスミドが入ったアグロバクテリウムの懸濁液をかけると、数日以内に花卉や雌しべが黒く変色して枯死する様子が観察された。コシオガマは、胚軸や根においても、傷を与えアグロバクテリウムを感染させると黒く変色した組織が見られるため、菌に対して過敏に反応していると考えられる。しかし、感染後に花を染色してみると花粉に GUS 遺伝子由来の青色呈色反応が確認された。そこで、花の発達段階に応じてアグロバクテリウム感染を試してみると、花のステージに応じて GUS 染色される花粉の割合が異なることがわかった。次に、蛍光マーカー遺伝子を用いてフローラルドロップ法を試みた。しかし、最適な花のステージを用いても蛍光を観察することはできなかった。この結果は、花粉におい

て観察された GUS 染色が偽陽性、またはアグロバクテリウム由来である可能性を示唆している。

## 2. Pollen magnetofection 法

プラスミド DNA をマグネットナノパーティクル (MNP) に吸着させ、細胞と懸濁してマグネットフィールドに置くことにより磁力で細胞内に導入する方法を magnetofection 法と呼ぶ。動物細胞では一般的に用いられている手法であるが、植物では近年までほとんど用いられていなかった。最近、ワタの花粉を使って magnetofection で形質転換が成功したという報告があったので、コシオガマを使って pollen magnetofection を試みた。蛍光ラベルしたオリゴ DNA、蛍光タンパク質をコードしたプラスミドをそれぞれ MNP に吸着させ、magnetofection によりコシオガマ花粉に導入した。結果として、蛍光ラベルしたオリゴ DNA の導入は確認できたが、プラスミド DNA にコードされた蛍光タンパク質由来の蛍光は観察することができなかった。

これら以外にもカルスによる再分化系の検討やパーティクルガンを用いた形質転換などを試みている。コシオガマの例をもとに、非モデル植物をモデル植物化する際のボトルネックについて議論したい。

## ベタレイン色素合成経路の導入によるアサガオの新規花色の分子育種

佐々木 伸大<sup>1</sup>、澁谷 美乃里<sup>2</sup>、渡邊 健太<sup>2</sup>、小野 公代<sup>2</sup>、西原 昌宏<sup>3</sup>、小野 道之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東洋大学食環境科学部、<sup>2</sup>筑波大学 T-PIRC、<sup>3</sup>岩手生物工学研究センター

アサガオ (*Ipomoea nil*) は日本独自に発展した園芸植物である。江戸時代にはさまざまな色や形をした変化朝顔が作られ、それらの一部は現在ナショナルバイオリソース (NBRP) にも保存されている。一方、江戸時代の図版にはあるが現存しないものもある。黄花のアサガオもその一つであり、その作出は育種家の夢となっている。ベタレインは、チロシンを出発物質とする植物色素であり、黄色いベタキサンチンと赤色のベタシアニンに大別される。ナデシコ目植物のみで合成されるため、ナス目のアサガオはこれを合成できない。本研究では遺伝子組換えにより、ベタキサンチン生合成経路の導入による黄花アサガオの作出、ベタシアニン生合成経路の導入による赤花アサガオの作出を試みた。

植物材料はアントシアニン生合成酵素 DFR-B (dihydroflavonol 4-reductase) の変異体で白花のアサガオ系統 AK77 を用いた。アサガオの未熟胚由来の不定胚に対し、アグロバクテリウム法により、ベタキサンチン (黄色) 生合成経路であるビート (*Beta vulgaris*) の *BvCYP76AD6* とオシロイバナ (*Mirabilis jalapa*) の *MjDOD* (DOPA 4,5-dioxygenase)、または、ベタシアニン (赤色) 生合成経路であるビートの *BvCYP76AD1*、オシロイバナの *MjDOPA5GT* (cyclo-DOPA 5-O-glucosyltransferase) と *MjDOD* のそれぞれの cDNA を CaMV 35S promoter の制御下で発現するように形質転換した。

色素の分析は、花卉や組織を 1% TFA を含む 50% のメタノール水溶液に一晩浸潤して抽出し、LC/MS 装置 (ACQUITY UPLC-SYNAPT G2, Waters) を用いて行った。カラムには ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 ID×150 mm, Waters) を使用し、溶離液 A (0.1% ギ酸水溶液)、B (0.1% ギ酸 / アセトニトリル) を用いて、15 分間で B% が 2–35% となるリニアグラジェント (流速 0.4 mL/min) で分離を行った。化合物の検出はフォトダイオードアレイ (PDA) 検出と MS 検出器を用いて行った。

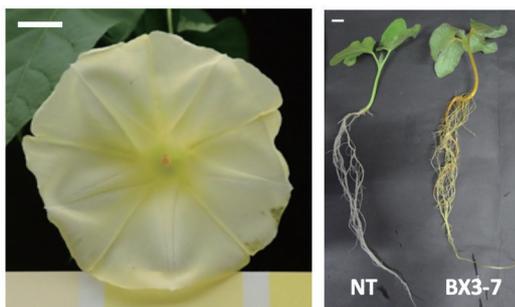
ベタキサンチン (黄色) 合成経路導入の形質転換植物では、形質転換体の 66% (10/15) で花卉や根に黄色色素が蓄積した。黄色には濃淡があり、花卉で最も濃いものは王立園芸協会のカラーチャートの黄 4C であった (図)。これらの色素を LC/MS 分析したところ、吸収極大を 460 ~ 470 nm に持つ極性の高い化合物が複数種検出された。水溶性の色素で 460 nm 付近に吸収極大を持つことから、これらの色素はベタキサンチンであることが推定された。これらの化合物はこれまでに報告のあるベタキサンチンより極性が高く、また、それらの化合物のものと目されるイオンピークもこれまでに報告のあるベタキサンチン分子のそれらとは一致しなかった。これらの結果から、蓄積されたベタキサンチンは新規のものである可能性が示唆された。また、意外なことに、複数の系統で柱頭にピンク色の色素が蓄積した。アサガオの野生型の柱頭は白色であり、着色することはない。分析の結果、柱頭に蓄積していた主な色素は betanin と isobetanin などのベタシアニンであることが推定された。ベタシアニンの合成経路を導入していないにも関わらず、ベタシアニンが柱頭のみで合成されたことは大変興味深い。また、黄色花卉にピンク色の柱頭

の組み合わせは、花のデザインとして面白い。しかし、根やシュートの伸長が遅れる、葉が枯れ込む、開花時に花が開き切らないといった生育障害も観察された。稔性には問題はなかったが、特に初期生育には影響があった。これらはバタキサンチン代謝経路の代謝物による直接・間接的な影響であると推察された。黄色色素の着色の程度とは相関が無いことから、バタキサンチン自身の毒性ではなく、初発物質となるチロシンの不足や、中間産物の DOPA の影響などが考えられる。DOPA にはアレロパシーの原因物質として、活性酸素を発生することが知られており、障害を生じる植物がある。今後は、*BvCYP76AD6* のプロモーターとして、花卉特異的プロモーターを用いることで、生育障害を回避するとともに、より濃い黄色の花弁が期待できる。今後は、液胞におけるアントシアニンとの共存の効果などについても解析したい。

一方、バタシアニン（赤色）合成経路導入の形質転換植物では、形質転換体の 70% (7/10) で根に赤色色素が蓄積したが、花弁は着色しなかった。しかし、いくつかの系統では、開花翌日の朝に萎んだ花弁の先端に赤色色素が観察された。これらは、色素合成に時間がかかるためか、花弁が萎むことで色素が濃縮されたためと考えられる。翌朝の花弁の色素については分析中である。また、柱頭がバタシアニンと思われる赤色に着色した。白花に赤色の柱頭は、花のデザインとして面白い。

バタシアニン合成経路を導入しても花弁では赤色を生産しない原因については、中間産物であるベタラミン酸について、生合成量が少ないか、細胞内で液胞に収納されていないか、の2つが原因として推測された。後者については、花弁をすりつぶすことで赤色色素が生成されることで証明できるが、花弁の抽出液に赤色色素を生じなかった。一方、花弁の抽出液にベタラミン酸を添加したところ、一部の花弁抽出液に赤色色素が生じ、それらは分析の結果、betanin であることが判った。RT-PCR による発現解析の結果などから、ベタラミン酸を合成する DOD の酵素活性が低いことが主な原因であることが推察された。これは、バタキサンチンによる黄花アサガオにおける生育障害の原因が、DOD の酵素活性が低いために蓄積した DOPA が原因ではないかという推察とも矛盾しない。今後、より活性の強い DOD を用いる、あるいは、多酵素複合体を形成し易いように、同種植物由来の DOD を用いる、などの改良が有効ではないかと考える。*BvDOD* を用いることで、明確な赤花や黄花が期待できる。

[謝辞] 小関良宏博士（東京農工大学）と松本宏博士（筑波大学）の示唆に富むディスカッションに対し深く感謝いたします。AK77 の種子は NBRP「アサガオ」の星野敦博士（基礎生物学研究所）から頂きました。西崎雄三博士（国立医薬品食品衛生研究所）には LC/MS 分析について有意義なご助言をいただきました。



図：バタキサンチン合成経路形質転換アサガオ  
BX3-2-2 の花とカラーチャート（左）、野生型（NT）と  
BX3-7 の芽生え（右）。スケールは 1 cm。

## 高温耐性をもつ接ぎ木トマトの特性解析

西口 正通<sup>1</sup>、小林 括平<sup>1</sup>、篠崎 良仁<sup>2</sup>、江面 浩<sup>2</sup>

<sup>1</sup>愛媛大学農学部、<sup>2</sup>筑波大学 T-PIRC

新育種技術 (NBT) としていくつかの技術が注目されているが、形質転換体の台木に非形質転換体を穂木に接ぎ木する技術もその一つに挙げられている (1)。演者らは、これまで遺伝子の RNA サイレンシングに焦点をおき、基礎的な研究から応用的研究まで幅広く実施してきた。この中で、RNA サイレンシングの接ぎ木移行という現象の応用として、有用形質を接ぎ木により、穂木に付与する研究を行っている。また、最近の植物工場による農産物生産が注目され、農水省のみならず経済産業省、文部科学省などで予算上の支援が行われている。愛媛大学では植物工場をめぐる開発研究の全国的拠点として産学連携によりこれまで大きな実績を積み重ねている。トマトは植物工場生産の主要なターゲット作物であり、同大学キャンパスには、大学としては我が国最大規模の太陽光利用型植物工場が建設され、その成果産物は「あいだいトマト」のブランドでマーケットに出回っている。トマトの植物工場における栽培は、我が国では夏季高温による開花・結実不良のため、栽培体系の上では夏季は土壌調整・育苗管理にあてられ、果実の収穫期間は主に 10 月から 7 月となっている。この夏季の高温障害がネックになり、トマト果実の通年収穫は不可能であることが実情である。一方、この分野の先進国オランダにおいてはトマト果実の通年収穫が技術として確立しており、面積あたりのトマトの生産高は我が国のほぼ 2 倍以上である。

以上のような現状の中で、我が国の植物工場においてトマトの夏季栽培技術の開発は重要な貢献をもたらすものと考えられている。また、一般圃場でのトマト栽培においても、夏季高温は障害となっている。このような事情から、トマトの高温耐性を付与することは強く求められている課題である。あいにく周辺野生種を含めトマトの遺伝資源には、高温耐性をもつものは見つかっていない。そこで、演者らは高温耐性関与遺伝子を RNA サイレンシングすることにより、高温耐性をトマトに付与し、さらに古くから利用されている接ぎ木技術を組み合わせ、栽培されている普通のトマト品種の穂木に高温耐性を付与する研究を行ってきたが、実験室レベルでは高温耐性が栽培品種に付与されることを見出した (2)。ここでは、さらにこの接ぎ木トマトを特定網室の環境条件下で栽培し、開花・結実等の特性を対照の栽培品種と比較・検討することにより、高温耐性の接ぎ木トマトがどのような特性を示すか、どのようなメリットがもたらされるか等に答えようとする研究課題である。

本課題で用いる RNA サイレンシングしたトマトは、トマト品種、マイクロトム DNA より、

脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*SIFAD7*) を PCR により増幅後、ORF 部分あるいは 3' NTR 部分を逆向きに配置したサイレンシング誘導プラスミドをアグロバクテリウムにより、トマトの台木用品種 (ブロック) を形質転換したものである。*SIFAD7* の RNA サイレncing の目印である siRNA を検出できたもので、その T1 種子を接ぎ木実験に供試した。穂木にはかなり栽培に供試されるトマト (品種、ハウス桃太郎) を供試した。これらの T1 個体から DNA を抽出し、PCR により、カナマイシン耐性遺伝子 (*NPTII*) の存在を確認している (Fig. 1)。台木トマトに穂木を接ぎ木し、目下、特定網室において生育中である (Fig. 2)。現在のところ、対照の非形質転換体台木の接ぎ木 2 個体を含め形質転換 3 系統の合計 9 個体の接ぎ木個体は順調に生育し、すべての接ぎ木個体において、花芽分化・開花がみられ、一部においては果実の結実が見られている。今後は、果実収量を中心に、果実の大きさ、個数等の量的・質的検討ならびに分子生物学的解析等を行う予定である。今回は、実験の開始時期と関係して、あいにく接ぎ木個体の花芽分化・開花の時期が 11・12 月にずれ込んだため、夏季高温の影響の解析が不可能にならざるを得ない状況である。この重要な点はさらに検討する必要があると考えている。

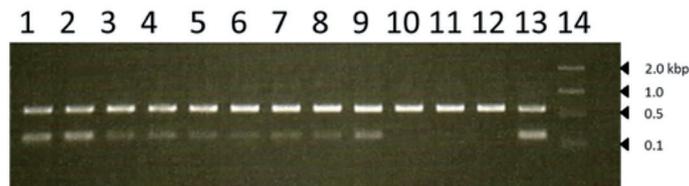


Fig. 1 Detection of transgene in transgenic plants by PCR

Upper, actin (internal control); Lower, *NPTII*. 1, 3-2; 2, 3-3; 3, 3-4; 4, 3-5; 5, 3-6; 6, 4-1; 7, 4-2; 8, 4-5; 9, 4-6; 10-12, non-transgenic control; 13, positive control; 14, size marker.



Fig. 2 Grafted tomato plants

#### 引用文献

1. Madre and Agostino (2017) <https://www.farm-europe.eu/travaux/new-plant-breeding-techniques-what-are-we-talking-about/>
2. Nakamura *et al.* (2016) *Plant Biotechnology Journal* 14,783–790

## マイクロトムのカロテノイド酸化開裂酵素 CCD7 欠損変異体の探索

梅原 三貴久<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>東洋大学生命学部、<sup>2</sup>東洋大学大学院生命科学研究科

植物ホルモンの機能を解析する上で、生合成遺伝子欠損変異体の存在は必要不可欠である。ストリゴラクトン (SL) は、植物の根から土壤中に分泌され、ストライガやオロバンキなど根寄生植物の発芽刺激活性やアーバスキュラー菌根菌という共生菌の菌糸分岐誘導活性を示す物質として知られている。その後の研究から、SLが植物の枝分かれ、葉の老化、根の伸長、茎の太さ、葉の角度などを制御する植物ホルモンであることが報告された。SL の生合成では、 $\beta$ -カロテンを基質として D27 という鉄を含む  $\beta$ -カロテニンソメラーゼ、カロテノイド酸化開裂酵素 (CCD) の CCD7 および CCD8 の働きによって SL 生合成前駆体カーラクトン (CL) を産生する。CCD8 の下流でシトクロム P450 酸素添加酵素ファミリーのひとつ、CYP711A (MAX1) による酸化反応を経てさまざまな構造の SL が産生される。さらにその下流で、2 オキソグルタル酸依存的酸化酵素の LBO が働く。これまでに、筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター形質転換デザイン研究拠点の共同利用・共同研究で、マイクロトムの CCD8、MAX1、LBO 欠損変異体を得た。本研究では、筑波大学 T-PIRC 遺伝子実験センターが保有するマイクロトムの約 10,000 系統もの変異誘発系統の中から、TILLING 法により、CCD7 の欠損変異体を探索した。

トマトの CCD7 遺伝子 (Solyc01g090660) で特異的な TILLING 用プライマーを 2 セット設計し、筑波大学の方で TILLING を実施していただいた。CCD7 の第 1 エキソンと第 2 エキソンを含む領域から E6498、E6768、W1076、W1316 の 4 系統が候補として得られた。しかし、これらの系統の変異箇所は全てに同じ場所で、転写開始点から 436 番目の T が C に置換し、146 番目のアミノ酸が F から L に変化したミスセンス変異であった。CCD7 の第 6 エキソンと第 7 エキソンを含む領域から W930 の 1 系統が得られた。この系統の変異箇所は、転写開始点から 2800 番目の T が C に置換し、549 番目のアミノ酸が V から A に変化したミスセンス変異であった。これら 5 系統の種子を筑波大学から分譲していただき、現在、東洋大学で形質評価を進めている。

本成果報告会では、他の SL 生合成変異体の進捗状況についても合わせて報告する。マイクロトムで CCD8 遺伝子 (Solyc08g066650) がどの部位で発現しているのか調べるために、リン酸十分条件とリン酸欠乏条件で栽培した野生型の茎、根、葉、茎頂、花、果実における遺伝子発現解析を行った。リン酸欠乏条件で栽培した根で最も CCD8 の発現が高かった。花や果実では CCD8 の発現量は少なかった。TILLING の結果、CCD8 欠損変異体として E5291 と E2757 の 2 系統が該当し、これらの系統の枝分かれの数は、野生型に比べて約 2 倍に増加して

いた。次に、LC-MS/MS を用いて *SICCD8* 欠損系統の根の内生 SL 量を定量したところ、検出限界以下であった。内生 SL による枝分かれ抑制効果を調べるために接ぎ木実験を行った。野生型を台木に *CCD8* 欠損変異体を穂木とした組み合わせで接ぎ木すると、*CCD8* 欠損変異体の過剰な枝分かれの数が野生型と同数まで減少した。さらに、接ぎ木した *CCD8* 変異体の根の内生 SL 量を定量すると、野生型を穂木にしても、内生 SL は検出限界以下であった。さらに、トマトはトルコヤチリなどでは根寄生植物オロバンキの感染が問題となっている。そこで、*Phelipanche aegyptiaca* の感染実験を行った結果、野生型に比べて *CCD8* 変異体の根への感染率は低かった（下図）。このことから、SL が欠損したトマトは、根寄生植物による被害を軽減できる可能性があると考えられる<sup>1)</sup>。この *CCD8* 欠損変異体の種子は、すでにいくつかの研究グループに分譲されており、新規 SL 生合成遺伝子欠損変異体との比較に利用される事例が報告されている<sup>2)</sup>。

また、SL 生合成の下流の遺伝子 *MAX1* (Solyc08g062950) と *LBO* (Solyc01g067620) についても TILLING で欠損変異体の探索を行った。TILLING で得られた *MAX1* 欠損変異体の候補 7 系統のうち、2 系統の枝分かれの数が野生型に比べて約 2 倍に増加し、内生 SL 量が検出限界以下であった。TILLING で得られた *LBO* 欠損変異体の候補 8 系統のうち 2 系統は、枝分かれの数は野生型にとほぼ同等であったにも関わらず、内生 SL 量が検出限界以下であった。これは、トマトの中で蓄積した *LBO* の基質が枝分かれの数を抑えていると考えられる。トマトにおける *LBO* の機能を明らかにすることで、トマトにおける SL 生合成の下流の経路が明らかになると期待される。

今後は SL の生合成だけでなく、情報伝達欠損変異体も獲得し、トマトの SL 研究のツールを増やすことで、筑波大学が保有するマイクロトムの変異体コレクションの需要を増やすことに貢献したい。

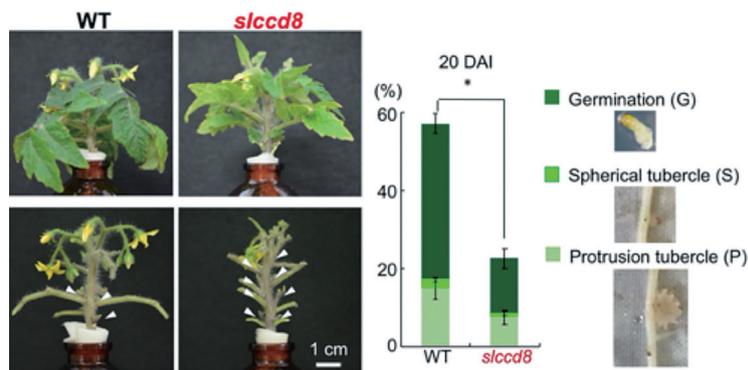


図 CCD8 欠損変異体の枝分かれの数と根寄生植物の感染率

#### 関連文献

1. Hasegawa *et al.* (2018) Low infection of *Phelipanche aegyptiaca* in Micro-Tom mutants deficient in *CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8*. *Int. J. Mol. Sci.* 19, E2645
2. Wakabayashi *et al.* (2019) Direct conversion of carlactonoic acid to orobanchol by cytochrome P450 CYP722C in strigolactone biosynthesis. *Sci. Adv.* 5, eaax9067

## 生物多様性影響評価の基盤となる アサガオゲノム中の T-DNA 配列の解析手法の開発

小野 道之<sup>1</sup>、小野 公代<sup>1,2</sup>、中嶋 信美<sup>2</sup>

<sup>1</sup>筑波大学 T-PIRC、<sup>2</sup>国立環境研究所

ゲノム編集を用いた遺伝子のノックアウト体を作成する方法として、植物では、通常の形質転換体の作成と同様にアグロバクテリウムの T-DNA を用いた形質転換体を作成し、自殖後代の T-DNA を持たないゲノム編集体を得ることができる。T-DNA を除いた後代はヌルセグリガントと称される。ゲノム編集による単純な遺伝子ノックアウト体 (SDN-1: Site-Directed Nuclease 1) のヌルセグリガントは、プロセスベースの遺伝子組換え体であるが、プロダクトベースではゲノム編集体となり、外来核酸 (T-DNA と gRNA などの持ち込み核酸) が残存していないことを証明することで、所定の手続きの後、一定の条件下において、遺伝子組換え体の扱いをする必要がなくなることが期待される。本研究では、ゲノム編集された花卉植物を用いて、NGS (次世代シーケンサー) を用いた全ゲノムシーケンス解析による外来核酸の残存が無いことの証明を試みた。

外来核酸がゲノム中に残存し無いことの証明は、これまでもサザンブロッティング、PCR、NGS を用いたいくつかの方法が行われている。それぞれの方法には利点や弱点があり、直接的な比較は難しい。これらの中で、NGS を用いた全ゲノムシーケンス解析は、技術革新が進み、価格も下がり、今後、中心的な解析方法になることが予想される。本研究では、全ゲノムシーケンス解析で得たペアエンドのショートリードによる配列解析結果を、市販の解析ソフト等を用いて解析した。

ゲノム編集体の花卉植物としてはアサガオ (*Ipomoea nil*) を用いた。アサガオは、江戸時代から続く伝統的な花卉のモデル植物、植物生理の特に短日植物としてのモデル植物であり、ナショナルバイリソースの「アサガオ」として植物 9 種の 1 つに選定されている。さらに、初等教育教材として小学 1 年生が 1 人 1 鉢を初めて科学的に栽培・観察する植物として、また、夏の風物詩として広く国民に親しまれている。2016 年に標準系統の全ゲノムシーケンスが公開され、2017 年には CRISPR/Cas9 によるノックアウト変異体の作出が始まり、外来核酸が残存し無いことの証明実験に適している。

解析に用いたゲノム編集体は、先行研究においてゲノム編集が計画通りに生じていることをサングー法による塩基配列により確認済みの 4 系統を用いた。それらは、CRISPR/Cas9 により花色を改変した最初の植物である、アントシアニン合成酵素の 1 つをコードする

*Dehydroflavonol-4-Reductase-B* (*DFR-B*) をノックアウトした *dfiB-9* (Watanabe *et al.* 2017)、カロテノイド開裂酵素の1つをコードする *Carotenoid Cleavage Dioxygenase4* (*CCD4*) をノックアウトした *ccd4-1* (Watanabe *et al.* 2018)、花卉の老化を司る NAC 転写因子をコードする *EPHEMERAL1* (*EPH1*) をノックアウトした *eph1-1* (Shibuya *et al.* 2018)、及び、光周性花成の中心的な転写因子をコードする *InCONSTANS* (*CO*) をノックアウトした *co-3* である。また、ポジティブコントロールとして *eph1-1* の兄弟系統でノックアウトに用いた T-DNA が残る *eph1-1P* を用いた。

解析は次のように行った。まず、簡易抽出した全 DNA を PCR とアガロース電気泳動で分析し、T-DNA の左端に位置する CRISPR/Cas9 と、右端に位置する *NPTII* (*Neomycin Phosphotransferase II*) の PCR 増幅バンドが生じない系統を選んだ。続いて、芽生えの水耕栽培した根より、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出し、微量分光光度計とアガロースゲル電気泳動により、定量と品質検査を行った後、外部委託によるクオリティチェックと NGS を行った。アサガオのゲノムは 750 Mb とされ、精度の高いゲノムが公開されている (Hoshino *et al.* 2016)。Illumina NovaSeq 6000 によりゲノムの 70-100 倍をシーケンスした。350 base の PCR フリーのペアエンドライブラリーを用いて、151 base を 350-500 M リード、トータル 55-78 G bp を得た。これを CLC Genomics Workbench ver. 12 (Qiagen; Filgen Inc.) を用いて解析した。塩基配列は、Q=30 のクオリティトリミングの後、形質転換に用いたオールインワンベクター [pDeCas9\_Km; Ritter *et al.* 2017; CRISPR/Cas9 遺伝子、gRNA カセットを入れる Gateway Cassette、選抜マーカー遺伝子 (*NPTII*) を T-DNA 領域に含むバイナリープラスミド] に対して、厳しいマッピング (Similarity fraction=0.99) を行った。その結果、T-DNA が残る親系統 *eph1-1P* では、オールインワンベクターの T-DNA 領域に mapping されたが、残りの 4 系統では有意な mapping は検出されなかった。また、*eph1-1P* の T-DNA の両端のボーダー配列付近の境界配列が第 9 染色体と一致した。今後、T-DNA の両端に由来する極小領域の探索、配列解読量を含む解析条件等の適正化について、他の既存のプログラムなどと比較して検討したい。

## バレイショ近縁種からの環境ストレス耐性形質導入

波部 一平<sup>1</sup>、坂本 悠<sup>1</sup>、井上 智博<sup>2</sup>、渡邊 和男<sup>2</sup>、菊池 彰<sup>2</sup>

<sup>1</sup>長崎県農林技術開発センター、<sup>2</sup>筑波大学 T-PIRC

バレイショは、ムギやイネと比較して水利用効率が 2 倍以上であるが、地下茎の発達量が少なく、水不足に対する感受性が高い。水不足が生じると植物体の生育量が減少し、塊茎の数とサイズが小さくなり、収量が大きく減少する。一方、気候変動により無雨期間が長くなってきている地域が増加しており、バレイショ栽培において水不足が世界的な課題となっている。そのため、効率的な解決法として、乾燥耐性品種の育成が望まれている。しかし、乾燥耐性品種の報告はなく、本研究では将来的な乾燥耐性品種育成を目指して、バレイショ近縁野生種の乾燥耐性を栽培種に導入し、選抜を行った。

バレイショは、ナス科ナス属に属し、栽培種と野生種を含めると 200 種以上が確認されている。栽培種は、2 倍体から 5 倍体まで知られており、主要な栽培種は *Solanum tuberosum* の 4 倍体である。一方、野生種は、主に 2 倍体であり、野生種の有用な形質を栽培種に導入するには、種間交雑を行う必要がある。バレイショでは、種間交雑の親和性は、胚形成の成否を支配する遺伝的因子である胚乳均衡数 endosperm balanced number (EBN) により推測でき、ほとんどの野生種の EBN は体系化されている。交配個体の EBN を合わせることで、種間での交配が可能になると考えられる。EBN は、倍数性操作により調節が可能である。例えば、主な栽培種の *S. tuberosum* は 4 倍体の 4EBN であり、近縁野生種の多くは 2 倍体の 2EBN である。そのため、4 倍体栽培種と 2 倍体野生種は直接交配ができないが、2 倍体野生種について染色体倍加処理して 4 倍体を作成することで、EBN も倍加して 4EBN となり、栽培種 4 倍体と野生種倍加体の交配が可能になる。

我々は、室内で簡易に乾燥耐性を評価できる室内検定法を開発し、これまでに約 30 種の野生種から乾燥耐性の 3 系統を選抜している。これらは、2 倍体 (2EBN) の *S. chillonanum*、2 倍体 (1EBN) の *S. jamesii*、2 倍体 (EBN 不明) の *S. okadae* である。本研究では、これら系統を染色体倍加処理し、4 倍体の倍加系統を作成した。作成した系統と 2 倍体および 4 倍体栽培種との交配を行い、種間交雑を成功させ、種子を獲得したが、交雑効率が低かった。

バレイショは他殖性であるが、近縁野生種である *S. chacoense* では自殖する個体が確認されている。これは、自家不和合抑制遺伝子 *S* locus inhibitor gene (*Sli* gene) によるものであり、本遺伝子は一遺伝子支配の優性遺伝である。*Sli* gene は、自殖を可能にする効果のみこれまで報

告されてきたが、花粉の交配能力が向上している可能性に着目して、本研究では、*Sli gene* を付与した栽培種を花粉親として交配に用いた。その結果、*Sli gene* を付与した個体では、交雑成功率および獲得種子数が大きく向上した。

得られた種子について乾燥耐性室内検定と同じ条件で選抜を行う事とした。まず、選抜強度の評価を約 100 粒の雑種種子を用いて 2 度行ったところ、30%程度の種子しか発芽せず、多くの種子が発芽能を失った異常個体である可能性が考えられた。そこで、発芽しなかった種子を滅菌水で洗浄し、乾燥ストレスの掛からない培地に移植し、発芽の有無を観察した。その結果、ほとんどの種子は正常に発芽したことから、種子の状態は問題なく、ストレス条件で発芽できなかったことが明らかとなった。本結果から、雑種種子の選抜は機能しており、全体の 30%程度が発芽し、10%程度が子葉を展開する条件であることが判明した。本条件で、評価期間中に子葉展開を起こした個体を選抜個体とし、雑種種子の選抜を継続して進行中している。現在まで、150 個体ほどの選抜個体を得ており、未評価の種子数を勘案すると 200 程度になると考えられる。各選抜回で子葉展開までの期間を記録していることから、子葉展開に掛かる期間の短い個体上位 10%から、二次選抜を進め、強い耐性を示す個体の選抜を行う。

今後は、塊茎の生産性評価を加味し、優良系統候補を 2-3 系統得て、乾燥耐性系統を育成する。加えて、交配後代を用いて耐性評価を行い、関連遺伝子座のマーカー開発に繋げる。

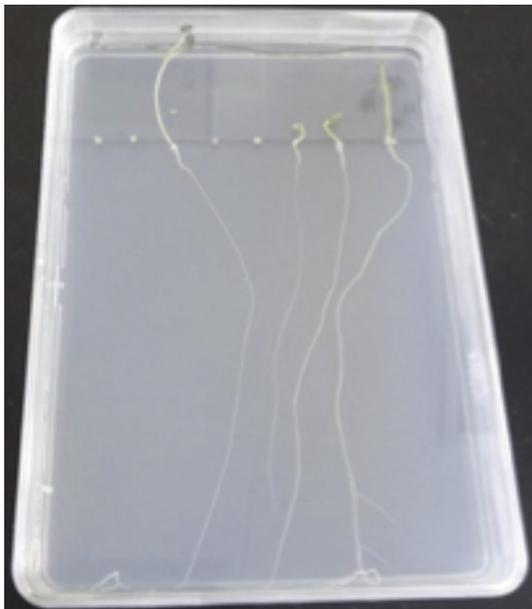


図 1. 室内検定法による乾燥耐性個体の選抜



発芽



子葉展開

図 2. 室内検定法における子葉展開個体

## 遺伝資源の共有財産としての保全と利活用に資する 制度枠組みとしての地理的表示保護の活用実態

内山 愉太<sup>1</sup>、香坂 玲<sup>2</sup>、渡邊 和男<sup>3</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学大学院環境学研究科、<sup>2</sup>筑波大学 T-PIRC

農業分野における遺伝資源を巡る利益配分の問題については、生物多様性や農民の権利を含む社会、経済、環境といった多角的観点から議論の蓄積が進められている。国際的なプロセスとしては、生物多様性条約や食料・農業植物遺伝資源条約などの国際条約が関わる。国際レベルにおいては、国、事業者、個人の「権利」の位置づけとその明確化を目指して議論が進行してきた経緯がある。国同士が合意形成を行い、権利の明確化を進めることは、製品の生産者の権利を守ることも目的としていたとしても、現場レベルの多様な権利概念と親和性が無く、机上の議論に終始してしまうことが懸念されている。また、国同士の交渉では、南北問題の典型として、発展途上国における資源ナショナリズムが、国毎の資源の囲い込みにつながり、権利の議論以前に資源が流通し得ない状況へとつながるような動きもある。ただし、権利に関する議論の難しさの根本には、遺伝資源としての農産物は地域の共有財産であり、その「地域」の境界や伝統性の定義に関わる「時間」の捉え方は曖昧であるという性格がある（香坂ほか 2018）。資源を個人で所有するという考え方や、権利が及ぶ明確な地域範囲を設定すること等は、共有財産としての農産物や、境界の曖昧な地域といった各地で歴史的に培われた考え方との親和性が低い。

このように、現場レベルと国際レベルの緊張関係がある中で、「制度」としてトップダウン的な性格を有しつつも、「地域」における共有を許容し得る制度として、地理的表示保護制度（以下、GI）が注目されている。GIは、製品名に地名を冠する製品名とその生産プロセスの両者を登録し、歴史的に産地と環境または文化について密接なつながりを有する製品の知的財産を保護する制度である。フランス発の制度であり、当初は各地域のワインの模造品の流通を防ぐ目的で誕生した。現在も、模造品防止のためにも活用されているが、ボルドーワインや、松坂牛、夕張メロンといった有名産品のみならず、地域において受け継がれてきた産品で、生産量も多くなく、いわば文化財的存在の産品を保護する制度としても活用されている（香坂ほか 2018）。特に後者の活用方法は、農村開発の文脈でも採用されており（Belletti *et al.* 2017）、地域において歴史的に培われた環境を維持、保全するという観点から、生物多様性保全にも貢献することが期待されている（Kohsaka & Uchiyama 2019）。産品自体が貴重な遺伝資源としての性格を帯びることがあり、GIは、遺伝資源としての産品の保全に寄与し得ると同時に、産地の周辺の地域生態系の保全にも貢献することで、広域での遺伝資源の維持管理に有用な制度となり得る。

GIの特徴として、ある地域において同じ生産方法で、同じ品質の産品を生産することができれば、

その産品名を名乗ることができるというややオープンな側面がある。その点は商標とは異なり、権利者を設定してその権利を保護するという性格よりも、あくまで地域において共有しようとする性格に特徴がある。その結果、GIの登録産品は、市場等で流通し、ある特定の地域の産品として認知されることを通じて得られた利益は「地域」の生産者へと配分される。このためGIは、制度として政府によって設計・運営されながら、市場を通して利益を発生させ、遺伝資源としての産品が生産される地域へと利益を配分する半官半民のツールとしても位置付けられる。

本報で紹介する「遺伝資源としての産品」という捉え方は、GIを活用した遺伝資源の保全と利活用を推進するうえでの捉え方であるが、必ずしも全てのGI登録産品が遺伝資源として有用であるということの意味しない。産品の遺伝資源としての位置付けを如何に解釈し、活用するかは、科学者サイドや現場の生産者サイドからのアプローチが考えられる。具体的には、科学者サイドには研究を進めるうえで遺伝資源を活用するニーズがあり、生産者サイドには、遺伝資源としての産品の特性を理解し、生産者が考える理想的な産品の生産と安定供給、ブランド化の推進といったニーズがある。

それらのニーズに応える実践的試みとして、GI登録産品を遺伝資源として捉え、遺伝資源としての位置付けを一般に流通している産品等と比較することを通じて、科学研究において遺伝資源としての産品の理解を進めることや、産品の系統、出自を遺伝子情報解析によって解明し、得られた情報を歴史的資料と照らし合わせること等により、これまで口頭伝承等により語り継がれていたストーリーを科学的なエビデンスと共に提示する産品のブランド化手法等が、本要旨の著者らによる研究プロジェクトの枠組みにおいて形成されている。

本報では、日本よりも先行してGIを導入しているタイにおけるGI登録産品の特徴と、遺伝資源としての産品を保全、継続的に生産する方法論について、これまでの研究プロジェクトの手法を参照しながら検討した結果を報告する。さらに、遺伝資源としての位置付けを理解する対象としてのGI産品について、特に生産者または消費者サイドを中心に関心が持たれている産品の歴史的な特徴に関して、産品の登録情報のテキストを分析することによって産品の類型化を行う手法について提示する。産品のブランド化に関わる観点から、産品の歴史性、地域性を理解するというものみならず、資源の保全の方向性として、遺伝資源としての保全を行うことが適当と考えられる資源の特定に向けて、産品の社会・文化、環境に関する側面を統合的に理解する方法論についても議論する。

#### 参考文献

- 香坂玲, 梶間周一郎, 田代藍, & 内山愉太. (2018) 農林業分野における地理的表示の分析: 産品の時間・空間的多層性と制度の関係性に着目して. 日本知財学会誌, 15(1), 4-10.
- Belletti, G., Marescotti, A., & Touzard, J. M. (2017) Geographical indications, public goods, and sustainable development: The roles of actors' strategies and public policies. *World Development*, 98, 45-57.
- Kohsaka, R., Uchiyama, Y., (2019) Geographical Indications and Regional Trade Agreements: Facilitating International Partnerships for Sustainable Development, *Encyclopedia of the UN Sustainable Development Goals, Partnerships for the Goals*, Springer Nature, 1-12.

## デジタル配列情報／遺伝的配列データを巡る 食料農業植物遺伝資源に関する国際条約における抗争 —条約実施と科学的知見の相互作用の観点から—

小林 邦彦<sup>1</sup>、鈴木 睦昭<sup>2</sup>

<sup>1</sup>総合地球環境学研究所、<sup>2</sup>国立遺伝学研究所

条約と科学的知見は、1. 条約の起草に係る問題提起に科学的知見が提示される場合（例えば、オゾン層保護）、2. 条約の起草時に規制対象に関する用語やその定義、対象範囲、規制される対象行為を整理する場合（バイオセイフティに関するカルタヘナ議定書）、3. 技術発展によって新たに開発された科学技術と条約の規制対象が関係するのかどうか検討する場合（本稿が取り上げるデジタル配列情報／遺伝的配列データ）（場合によっては、1 と重なることもある）、以上 3 つの場合に関連してくる。つまり、条約の起草過程だけでなく、条約の実施過程においても、科学的知見は必要とされる。また、科学的知見は、研究者など科学コミュニティによって、最新の知見が蓄積されていくことを前提としており、気候変動分野では、気候変動に関する政府間パネル、生物多様性の分野では、生物多様性及び生態系サービスに関する政府間科学政策プラットフォーム (IPBES) など、特に環境分野でそのような知見を蓄積するプラットフォームの構築が進められている。その他、化学物質や漁業管理、植物防疫など様々な分野で科学的知見の役割を期待していることが、条約文やその設立の動向などから確認される。

近年、人工知能をはじめ、様々な分野で技術発展・革新が起きている。バイオテクノロジー分野においても、CRISPR-Cas9 といったゲノム編集技術や酵素や細胞等を模したものを人工的に生成することができる合成生物学技術が挙げられる。このような技術発展による生物多様性条約 (Convention on Biological Diversity : CBD) の目的（特に、第三の目的である遺伝資源の利用から生じた利益の公正かつ衡平な配分）への影響を懸念する主張が、2016 年 11 月にメキシコで開催された第 13 回締約国会議でアフリカ地域から提起された。つまり、遺伝資源の利用者が、合成生物学技術によって、目的とする遺伝資源が存する開発途上国に出向かず、ジェンバンク (GenBank) などの塩基配列データベースが、公開しているデータベースにアクセスし、遺伝資源に内在される遺伝的な情報を入手、利益配分の義務を免れているのではないかというものである。そして、このような問題提起は、全ての遺伝資源を対象とする生物多様性条約だけでなく、食料農業植物遺伝資源 (Plant Genetic Resource for Food and Agriculture : PGRFA) を対象にした食料農業植物遺伝資源に関する国際条約 (International Treaty on Plant Genetic Resource for food and agriculture : ITPGR) の理事会でも提起された。しかし、ITPGR は、遺伝資源の取得に関する実

体的な権利及び義務を条約で定めず、各国の国内法に委任している CBD と異なり、多国間制度 (Multilateral System : MLS) 及び定型の素材移転契約 (Standard Material Transfer Agreement : SMTA) を通じて条約上のシステムを構築している。そのため、理事会での議論、決定が条約の実施、つまりは実際に PGRFA を取得、利用する研究者や企業に影響を及ぼす可能性も考えられる。

そこで、本研究では、ITPGR での議論を参照し、各国が科学的知見をどのように受容し、条約の規制対象との関係を含む、条約実施に取り込もうとしていくのか、デジタル配列情報 (Digital Sequence Information : DSI) / 遺伝的配列データ (Genetic Sequence Data : GSD) に関する交渉を事例にその動態を分析することを目的とする。なお、本稿で言う“科学的知見”とは、科学的な中立性及び独立性を担保する機関又はグループによって作成された研究論文 (査読された論文を含む) を指す。また、DSI / GSD という書き方をしているが、これは、交渉過程が議論の道中にあるため、両論併記をしていることに留意されたい。

ITPGR における DSI / GSD に関連した主な論点は、1. DSI に代わる適当な用語、2. DSI / GSD は、条約の適用範囲内に含まれているのかどうか、3. 現行の MLS、SMTA が、DSI / GSD をどのように取り扱っているのか、以上 3 点である。この論点の内、1 点目の適当な用語と 3 点目の DSI / GSD の取り扱いの 2 つの論点が科学的知見を必要とすると考えられる。

ここでは、1 点目に焦点を充てる。2018 年に公表された “A Fact-Finding and Scoping Study on DSI on Genetic Resources in the Context of the CBD and the Nagoya Protocol” によると、DSI という用語は科学コミュニティ分野で用いられず、GSD、ヌクレオチド配列データ (Nucleotide Sequence Data)、ヌクレオチド配列情報 (Nucleotide Sequence Information)、遺伝子配列情報 (Genetic Sequence Information) という用語が挙げられている。このような用語の違いは、「言及される素材の違いとともに、今日の科学技術の変化の速さ及び変容性を反映している」ため、統一した用語を定めることが、困難であると指摘している。しかし、交渉過程を見ると、各国・地域でその受容に若干の変化が見られる。例えば、米国は、交渉当初から DSI ではなく、GSD という用語を指摘しているものの、2019 年の第 8 回理事会では、GSD という用語も使用せず、「素材から生成された情報 (information generated from the material)」や「PGRFA に関連する情報 (information associated with PGRFA)」を使用している (なお、最終的に使用されている用語に関しては、日本や欧州地域も支持している)。科学的知見を受容していくことは、条約の規制対象を明確にすると共に実施を効果的及び効率的にしていくことが期待されることを意味する。この動態を、科学的知見の受容の観点から評価すると、議論過程で GSD という用語を使用しているため、受容しているように考えられる。その上で、異なる用語を使用しているということは、政策上の調整 (オプション 1) 又は今後の技術発展の考慮 (オプション 2) したのではないかと考えられる。しかし、このような用語を使用することは、条約の運用に様々な解釈を与えてしまう可能性があり、条約の実施上、締約国だけでなく、利害関係者も理解しやすい用語を使用することが望ましいのではないかと考えられる。そのため、科学的知見を受容した “GSD” という用語を使用することが期待される。

# MEMO





2017-2020 Tsukuba-Plant Innovation Research Center  
©つくば機能植物イノベーション研究センター



2010-2020 Plant Transgenic Design Initiative  
©形質転換植物デザイン研究拠点