



筑波大学 形質転換植物デザイン研究拠点

令和3年度

成果報告会

会 期：令和4年3月8日(火)

会 場：オンライン開催(Zoom)

【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3年度成果報告会

会期：令和4年3月8日

開催：オンライン開催（Zoom）

プログラム

3月8日[火]

- | | |
|---------------|--|
| 10:00 ~ 10:05 | 開会の挨拶
柴 博史(筑波大学／T-PIRC形質転換デザイン研究拠点長) |
| 10:05 ~ 11:05 | 生物遺伝資源に関わるABSを主点としたELSIの留意事項についての概説
渡邊 和男(筑波大学／T-PIRC副センター長) |
| 11:05 ~ 11:15 | 休憩 |
| 11:15 ~ 11:30 | 植物免疫の改変によるアグロバクテリウムの形質転換効率向上の試み
門田 康弘(理化学研究所 環境資源科学研究センター) |
| 11:30 ~ 11:45 | トマト形質転換交配系統の作出と器官間炭素動態解析
尹 永根(量子科学技術研究開発機構 高崎量子応用研究所) |
| 11:45 ~ 12:00 | 気孔開口の促進に基づくトマトの生産性向上に向けた研究開発
矢守 航(東京大学大学院 農学生命科学研究科) |
| 12:00 ~ 13:00 | 休憩 |
| 13:00 ~ 13:15 | 植物の生殖システムに関する研究
村瀬 浩司(東京大学大学院 農学生命科学研究科) |
| 13:15 ~ 13:30 | 葉緑体シグナル因子GUN1タンパクの大量発現
望月 伸悦(京都大学大学院 理学研究科生物科学専攻) |
| 13:30 ~ 13:45 | <i>Brassica rapa</i>の春化応答因子の同定に向けて
藤本 龍(神戸大学大学院 農学研究科) |
| 13:45 ~ 14:00 | ゲノム編集による酒米品種‘山田錦’の短稈化
奥崎 文子(玉川大学 農学部) |
| 14:00 ~ 14:15 | 遺伝資源の遺伝的配列データの利用と利益配分を取り巻く国際交渉プロセスとその正当性
小林 邦彦(海外環境協力センター) |
| 14:15 ~ 14:25 | 休憩 |
| 14:25 ~ 14:40 | 合成生物学アプローチによる植物器官の成長角度操作と理解への挑戦
川本 望(自然科学研究機構 基礎生物学的研究所) |
| 14:40 ~ 14:55 | 高温耐性をもつ接ぎ木トマトの解析
西口 正通(愛媛大学大学院 農学研究科) |
| 14:55 ~ 15:10 | ストリゴラクトン受容体欠損変異体の探索とその機能解析
梅原 三貴久(東洋大学生命科学部 応用生物科学科) |
| 15:10 ~ 15:15 | 閉会の挨拶と次年度の拠点について
江面 浩(筑波大学／T-PIRCセンター長) |

要 旨

生物遺伝資源に関わる ABS を主点とした ELSI の留意事項についての概説

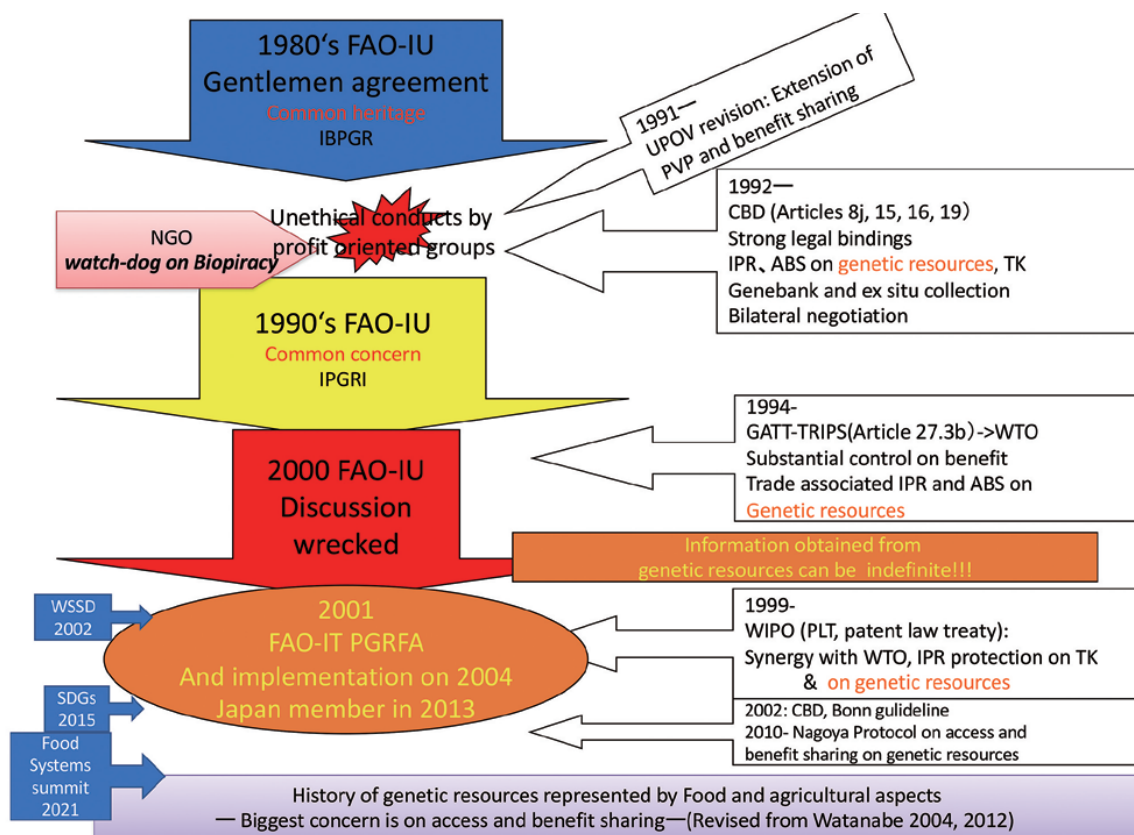
渡邊 和男

筑波大学 生命環境系・T-PIRC

「植物遺伝資源とバイオテクノロジーの両用から無限の価値を探り出すこと」及び「21 世紀のパラダイムにおいて法令遵守と倫理的配慮は必須であること」を視点に、植物科学と社会をつなぐ多様な事項を概論する。特に、アクセスと利益配分に関わる遺伝資源有体物の権利、遺伝資源に係る知的所有権、法律や規制等について俯瞰する。生命倫理、環境倫理等や科学者の社会対話について事例を検討する。特に、遺伝資源のアクセスと利益配分に関わる諸事項の説明と国際環境での議論を説明し、バイオディプロマシーコンセプトなどの今後の展望を紹介する。

References

- Kobayashi K, Domon E & Watanabe KN. (2020) Interaction of scientific knowledge and implementation of the Multilateral Environment Agreements in relation to digital sequence information on genetic resources. *Frontiers in Genetics* 11 doi: 10.3389/fgene.2020.01028.
- Rudebjer P, Watanabe K, Sebastian L (Eds). (2010) Reviewing Plant Genetic Resources Education in East and Southeast Asia. *Proceedings of an International Workshop*. Biodiversity International, Serdang, Malaysia and University of Tsukuba, Japan. ISBN: 978-92-9043-878-6
- Watanabe KN, Teh Guat Hong (2011) Wanted: bioprospecting consultants. *Nat. Biotechnology* 27: 873-875.

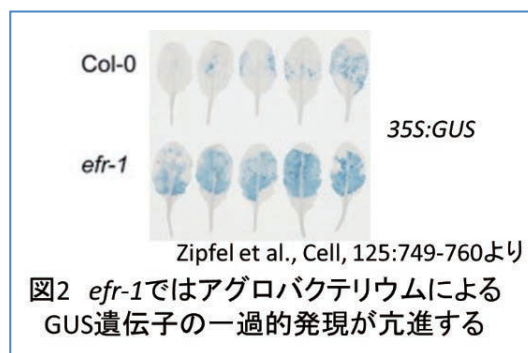
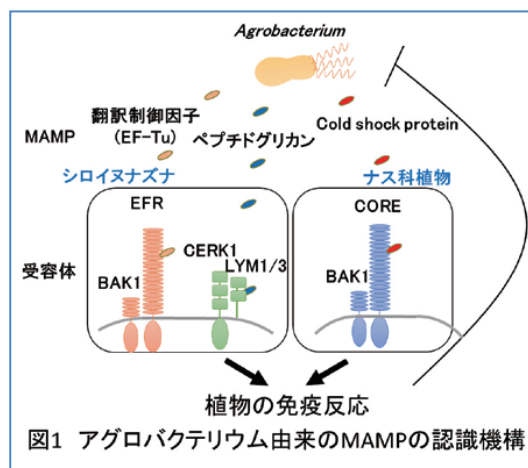


植物免疫の改変によるアグロバクテリウムの形質転換効率向上の試み

門田 康弘

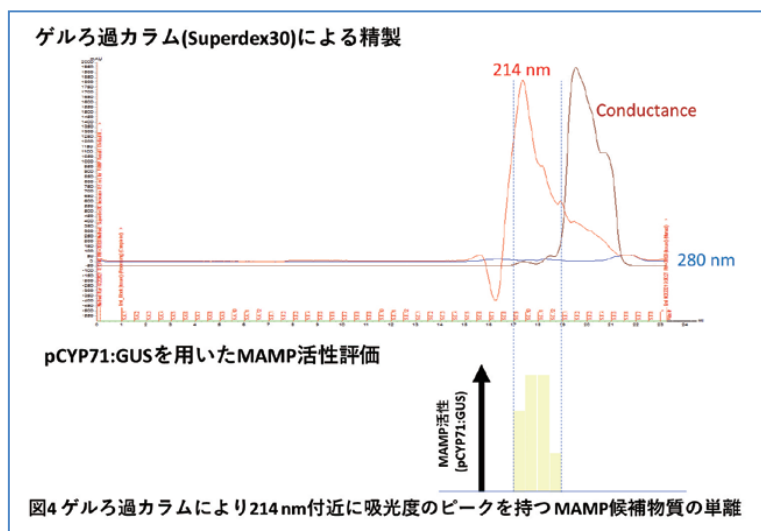
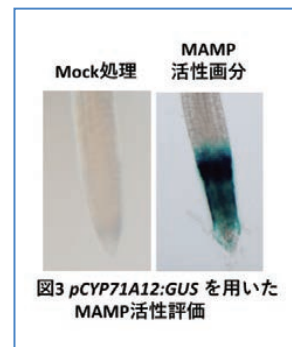
理研 CSRS 植物免疫研究グループ

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、遺伝子組換え作物の作出や、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。よって、これら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が困難である。つまり、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アグロバクテリウムの病原性と植物の免疫である。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分かっている。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、ナス科植物はアグロバクテリウム由来の MAMP である Cold shock protein を MAMP 受容体 (CORE) により認識する (Nat Plants 2:16185)。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の 1 つであることが分かった。そこで (1) アグロバクテリウムの MAMP 認識をより詳細に理解すること、そして (2) 人工的に MAMP 認識を抑制することで、アグロバクテリウムの形質転換効率の向上を目指している。



(1) 植物により認識されるアグロバクテリウム由来の MAMP の探索

アグロバクテリウム由来の MAMP と植物による認識機構を理解するため、生化学的アプローチにより、アグロバクテリウムの新規 MAMPs の探索を進めている。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の培養上清に含まれる MAMP 活性物質を様々なクロマトグラフィーカラムにより精製を行ったところ、214 nm 付近に吸光度のピークを持つ MAMP 候補物質を含む画分を



得ることができた (図 4)。現在、この MAMP 候補物質の同定を目指して解析を行っている。

(2) MAMP 認識抑制によるアグロバクテリウムの形質転換効率向上の試み

シロイヌナズナが認識する EF-Tu 領域の合成ペプチド elf18 は強い MAMP 活性を持つ。同様に、ナス科植物が認識する Cold shock protein の領域の合成ペプチド csp15 も強い MAMP 活性を持つ。興味深いことに、elf18 より 4 アミノ酸短いペプチド elf18 や、csp15 の 10 番目のフェニルアラニン残基をアラニンに置換したペプチドは MAMP 活性を持たないが、植物による elf18 や csp15 の認識を阻害する活性を持つ。さらに、これらペプチドはアグロバクテリウム破碎液により誘導される植物の初期応答反応を阻害する。そこでこれらペプチドを用いることで植物によるアグロバクテリウムの MAMP 認識を低下させ形質転換効率を向上できるか検証している。

また、植物に強い感染力を持つ病原体は、病原性エフェクターと呼ばれるタンパク質を植物細胞内に注入して植物免疫をかく乱して感染する。そこで、病原性エフェクターを用いて植物免疫を抑制することでアグロバクテリウムの形質転換効率の向上を目指している。本発表ではこれらの試みについても紹介したい。

トマト形質転換交配システムの作出と器官間炭素動態解析

○尹 永根¹、鈴木 伸郎¹、三好 悠太¹、余曉然²、野田 祐作¹、河地 有木¹、松倉 千昭²

¹量研・高崎研、²筑波大学 T-PIRC

トマトにおいて葉で作られた光合成産物（炭素）の果実への転流とその蓄積量の最大化は、果実の収穫量だけではなく品質（糖度など）の向上に直結する重要な課題である。我々はトマト果実内の炭素の貯蔵形態であるデンプンの代謝制御機構に着目し、これまでに未熟～緑熟期の果実への炭素の分配およびデンプンの蓄積量の増加が赤熟果実の可溶性糖含有量の増加をもたらし、果実高糖度化に重要な役割を担っていることを明らかにした。また、デンプン生合成の律速酵素である ADP-Glucose Pyrophosphorylase (AGPase) の 4 つのアイソフォームのうち、大サブユニットおよび小サブユニットを各々コードする *AgpL1*、*AgpS1* 遺伝子が果実の発達初期に高発現していること、ショ糖によって発現誘導を受けること、*AgpS1* が維管束組織周辺で高発現していることを明らかにした (Yin *et al.*, 2010, Goto *et al.*, 2013)。そこで、トマト (*Solanum lycopersicum* L. cv., 'Micro-Tom') を材料に AGPase 遺伝子の発現を抑制したデンプン生合成欠損形質転換体を作出したところ、果実重および赤熟果実における可溶性糖含有量の低下が見られた。これによって、果実内のデンプン蓄積量は果実のシンク能および品質を左右する鍵因子であること、その生合成は葉からの炭素の転流による調節を受ける可能性があることが示された。しかし、AGPase 遺伝子の機能欠損がソース / シンクの炭素転流様式や農業形質に対してどのような影響を及ぼすかは、供試系統が矮性ミニトマト品種 'Micro-Tom' であったため不明であった。そこで、本研究課題では形質転換系統に中玉品種 'Moneymaker' を戻し交配することで草姿が 'Moneymaker' に近い AGPase 機能欠損系統を作出し、デンプン欠損が重要農業形質（草丈、果実収量、糖度等）やソース / シンク間の炭素転流動態に与える影響を解析した。

まず、筑波大学において *AgpS1* 遺伝子発現を 35S プロモーター / RNAi で抑制した全身欠損型 (S1-67 系統) と未熟～緑熟期果実特異的に発現する *PEPC2* プロモーター / RNAi で抑制した果実欠損型 (S1-36 系統) の 2 タイプの 'Micro-Tom' 形質転換系統に対して、それぞれ 'Moneymaker' を 2 回戻し交配し、BC₂F₂ 系統の作出を行った。その中から、草姿などの形質が 'Moneymaker' に近く、葉、果実においてデンプン蓄積が抑制された系統を選抜した (図 1)。得られた S1-67/BC₂F₂ 系統に対して、デンプン欠損がシンク / ソース間の光合成産物の転流様式に与える影響を定量的に解析するため、量研・高崎量子応用研究所において¹⁴C (半減期 20 分) 標識二酸化炭素 (¹⁴CO₂) とポジトロンイメージング装置 (PETIS) を利用して植物体内の光合成産物の転流動態の可視化を行った。PETIS は、生きたままの転流動態をリアルタイムで計測することが可

能であり、 ^{11}C の半減期が短いため同一植物体に対して繰り返し $^{11}\text{CO}_2$ の投与と撮像が可能という利点を有する。具体的には、水耕栽培で第2果房開花まで育てた WT および S1-67 系統それぞれの第1果房を PETIS の撮像視野内にセットし、その上より2番目に位置する葉に対して $^{11}\text{CO}_2$ を投与すると同時に PETIS での撮像を開始した (図 2 A)。3 時間の撮像データ (10 秒ごとの連続画像 1080 枚) から積算した画像 (図 2 B) および 10 分おきの連続画像 (図 2 C) を作成した。その結果、WT および S1-67 系統の両方において、果房内の個別果実への分配が偏っており、偶数列の果実を優先して光合成産物を輸送するという同じ転流様式を示した。一方、S1-67 系統の方が果実への光合成産物の到達タイミングが WT より早い傾向を示した (図 2 B、C の右)。しかし、実験反復が少ないことから、今後すべての系統における繰り返し実験を実施することでソースとシンク間の光合成産物の転流と分配に与えるデンプン代謝の役割について定量的に解析する予定である。

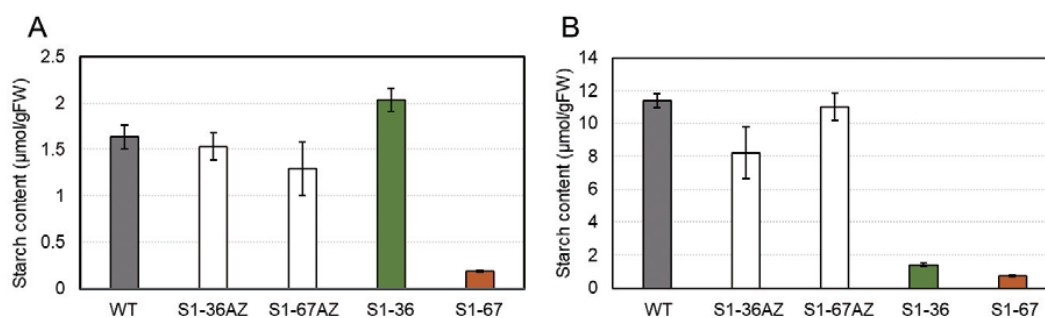


図1 BC₂F₂ 系統の葉 (A) 及び緑熟期果実 (B) におけるデンプン含有量。AZ (Azygous) はそれぞれ形質転換系統のネガティブコントロールである。

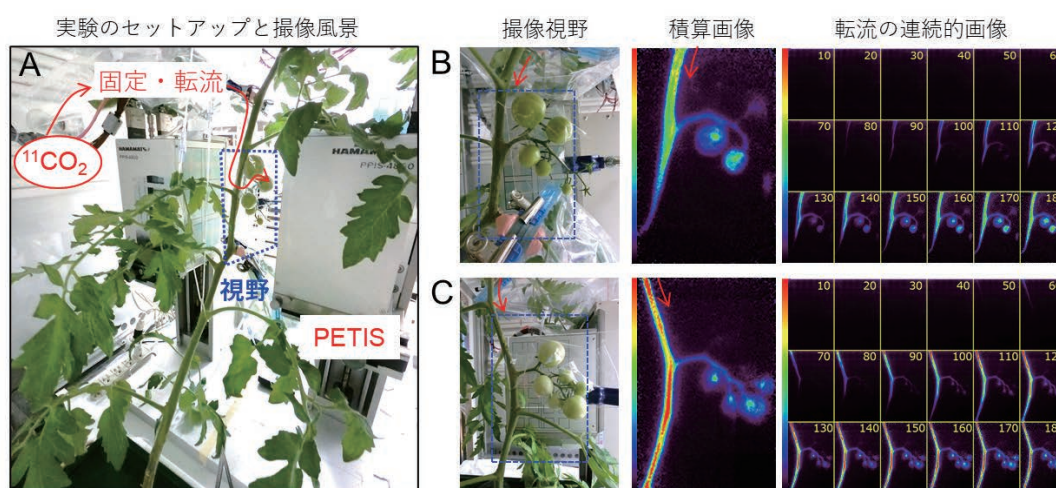


図2 PETIS による果実への光合成産物の転流の撮像実験。PETIS にそれぞれの実験植物をセットアップ (A) して、WT (B) 及び S1-67 (C) の第1果房への光合成産物の転流を連続的に可視化した。PETIS 画像は 180 分の積算画像及び 10 分おきの連続画像を示す。

【参考文献】

1. Yin et al., 2010 *J. Exp. Bot.* 61: 563-574 [DOI:10.1093/jxb/erp333]
2. Goto et al., 2013 *Plant Biotechnol.* 30: 279-286 [DOI:10.5511/plantbiotechnology.13.0603a]

気孔開口の促進に基づくトマトの生産性向上に向けた研究開発

○矢守 航¹、瀬尾 光範²、杉本 貢一³、江面 浩³

¹東京大学・大学院農学生命科学研究科、²理化学研究所・環境資源科学研究センター、

³筑波大学・T-PIRC 遺伝子実験センター

光合成は植物生産性を決定する最も重要な代謝である。多くの光合成研究では、環境が一定に保たれた定常状態における光合成の環境応答メカニズムの解明やその能力強化が焦点となっている。しかし、自然界において植物の受ける光環境は、天候の影響や植物体同士の相互被陰によって一日を通して常に変動している。光強度の突然の上昇に対して、光合成反応は瞬時に最大の能力を発揮することができず、10分以上かけてようやく定常状態に達することが多い（この現象を光合成誘導と呼ぶ）。現在のところ、どのような因子が変動する光環境下における光合成を律速しているのか、その分子機構は未だ解明されてない点が多い。これまでの我々の研究成果によって、大気中のCO₂を葉内に取り込む「玄関」となる気孔の開閉応答が変動光下における光合成や植物成長を大きく律速することを明らかにしてきた。

気孔閉鎖を誘導するABAの輸送体は機能重複性が高く、シロイヌナズナにおける単独の機能欠損変異体では、様々なストレスに対する感受性は野生型と同等である。一方で、それらの変異体は特に野外で見られる変動光環境で高い光合成能力を発揮し、その結果として、植物成長量が増加することが明らかとなっている（Shimadzu *et al.*, 2019）。このことから、ABA輸送体の機能欠質を利用することで、トマトなどの作物種の生産性を高めることが可能であると予想される。そこで、本申請課題では、トマトにおいてABA輸送体として機能し、気孔閉鎖の促進に働くことが明らかになっている因子についてゲノム編集によって遺伝子破壊株を作成し、その光合成と生産性を解析することを目的としている。現在、ゲノム編集トマトを選抜中である。植物の光合成誘導を促進し、定常状態に達するまでの時間を短縮することができれば、野外の変動光環境における光合成速度の促進と生産性強化を実現できると考えている。

植物の生殖システムに関する研究

○村瀬 浩司¹、板倉 健¹、柴 博史²

¹東京大学大学院農学生命科学研究科、²筑波大学 T-PIRC

被子植物の多くは一つの花に雄蕊と雌蕊をもつ両性花であり、自己の花粉で受粉しやすい性質がある。多くの植物は種内における遺伝的な多様性を確保するために、自己の花粉を拒絶して、非自己の花粉を受容する自家不和合性と呼ばれる性質を進化させてきた。アマ科植物では二形花自家不和合性と呼ばれ、花の形態と自家不和合性が連動する現象が観察される。アマ科植物の一種である宿根アマ (*Linum perenne*) の二形花型自家不和合性は S および s の 2 種類の遺伝子型で構成される S 遺伝子座によって制御されており、遺伝子型が Ss のときスラムと呼ばれる長い雄蕊と短い雌蕊をもつ花をつけ、 ss のときにピンと呼ばれる短い雄蕊と長い雌蕊をもつ花をつける (図 1)。これらの花は同型花由来の花粉を柱頭上で拒絶し、異型花由来の花粉のみと受精する自家不和合性の形質も示すため、子世代のピンとスラムの割合は常に 1 : 1 となる。また、ピンとスラムは花粉表層の模様も異なっており、 S 遺伝子座にはそれぞれ雌蕊および雄蕊の長さを制御する遺伝子、花粉および雌蕊で自家不和合性を制御する遺伝子、花粉の形態を制御する遺伝子の少なくとも 5 つの遺伝子がコードされていると推測されている。これまでのトラ

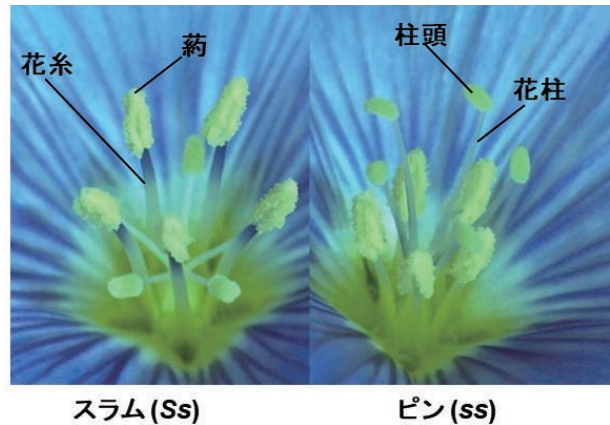


図1 宿根アマの花

ンスクリプトームおよびゲノム解析により、 S 遺伝子座にコードされている遺伝子としてスラムの雌蕊で特異的に発現する *TSSI* (Ushizima *et al.*, 2011) およびスラムの花糸で特異的に発現する *TWD1* が同定されているが、これらの遺伝子が二形花型自家不和合性に関わっているかは不明である。本研究では *TSSI* および *TWD1* について遺伝子導入および CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウト個体を作製し、それらの表現型の観察することによって、二形花型自家不和合性におけるこれらの遺伝子機能を解明する。

形質転換体の作製は *TSS1* および *TWD1* 遺伝子のゲノム断片を入れた遺伝子導入用コンストラクトおよび *TSS1* (2 種類) および *TWD1* (3 種類) を標的としたガイド RNA を含む CRISPR/Cas9 ノックアウト用コンストラクトを用いた (図 2)。

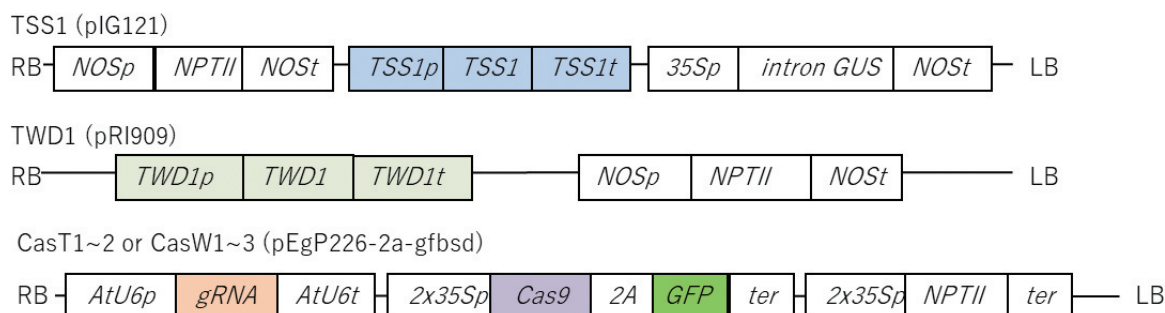


図2 形質転換体作製用コンストラクト

形質転換体はそれぞれのバイナリーベクターをもつアグロバクテリウムを宿根アマの胚軸に感染させ、得られた形質転換カルスからシュートを再分化させることによって作製した (図 3)。*TSS1* および *TWD1* 導入個体は 1 株ずつ、CRISPR/Cas9 ノックアウト用の個体は *TSS1* が 4 株、*TWD1* が 6 株得られた。形質転換体作製に用いた胚軸はピンとスラムが混合しているため、それぞれの *S* 遺伝子型を調べたところ、すべての個体がピン (ss) であったため、CRISPR/Cas9 ノックアウト用の個体は当代では表現型が観察できないことが判明した。形質転換体は 9 cm ポットで育成し、4℃、3 か月の春化処理を行った後、筑波大学の特定網室にて鉢に植え替えて栽培した (図 3)。*TSS1* 導入個体 1 株と *TWD1* ノックアウト用個体 4 株が開花したため、表現型の観察できない *TWD1* ノックアウト用個体については野生株と交配して T_1 種子を回収した。*TSS1* 導入株について表現型を観察したところ、花の形態および自家不和合性ともに表現型の変化は観察されなかった。



図3 形質転換宿根アマ

35S:GUS も同時に導入しているため、*TSS1* 導入株のつぼみを GUS 染色したところ、つぼみ全体で GUS による染色が観察された。次に定量 PCR 法によって *TSS1* mRNA の発現を観察したところ、*TSS1* はほとんど発現していないことが判明した。開花しなかった個体については自然条件下で春化処理を行っており、来年度以降に種子の回収および表現型の観察を行う予定である。

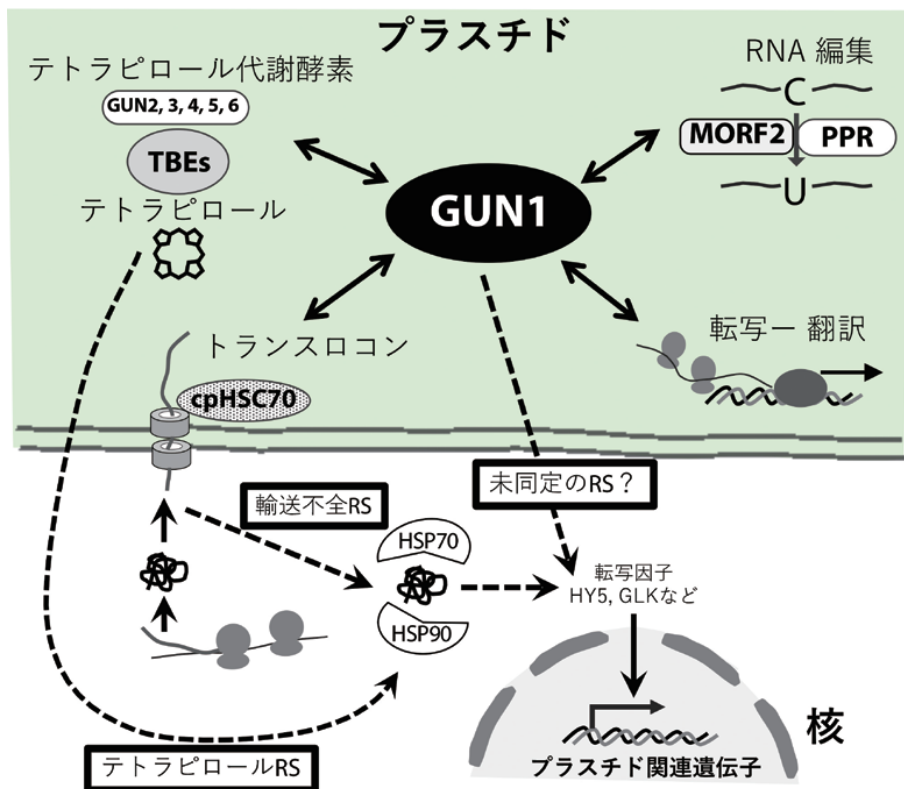
葉緑体シグナル因子 GUN1 タンパクの大量発現

望月 伸悦

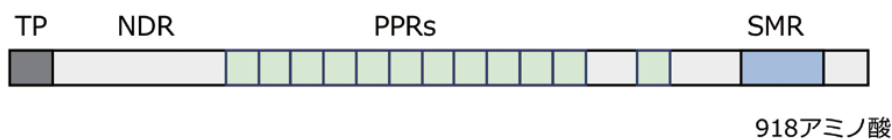
京都大学大学院理学研究科生物科学専攻

プラスチド（葉緑体）は、10-20 億年前に宿主細胞に細胞内共生したラン藻型の祖先生物に由来するオルガネラである。ラン藻型生物が持っていた遺伝情報の大部分は宿主細胞核に水平移動したが、プラスチドは細胞核を巧みに操り、必要な遺伝情報を引き出す術（プラスチドシグナル）を発達させた。さまざまな環境変化にともなうプラスチドにおけるテトラピロール・転写・翻訳・レドックス変化は、プラスチドに局在する GUN1-GUN6（Genomes UNcoupled）によって細胞核に伝えられ、核ゲノムの光合成関連遺伝子を含む広範な遺伝子の発現が調節される。シロイヌナズナを用いた研究により、プラスチドシグナルは強光・低温・酸化ストレスや糖、ホルモンに対する応答、光形態形成や葉の器官形成など、植物の重要な生理応答に関わることが示されている。

GUN1 は GUN プラスチドシグナルを統合する因子と考えられており、「天然変性領域」と PPR-SMR（Pentatricopeptide Repeat-Small MutS-Related）をもつタンパクである。GUN1 はプラスチド内の多様なタンパク（リボソームタンパク、テトラピロール合成酵素、RNA 編集装置、プラスチドタンパク輸送装置など）やヘムなどのテトラピロール分子と物理的相互作用することが報告されている。しかし、GUN1 によるシグナル伝達機構や、それぞれのドメインと分子機能について理解が進んでいない。その原因の一端は、GUN1 タンパクの細胞内局在量が低く、かつ全長の組換えタンパクを得ることが難しいためである。これらを解決するため、三浦謙治博士と共同でタバコ・ジェミニウイルスベクター系による GUN1 タンパクの大量発現と精製をこころみた。シロイヌナズナ GUN1 cDNA 塩基配列は、宿主となる *Nicotiana benthamiana* のコドン利用率に最適化し、pBYR2HS ベクターに導入した。このクローンをアグロバクテリアに形質転換し、タバコ葉にインフィルトレーションした。N 末端および C 末端にタグを付加した全長 GUN1 の高レベルな発現に成功しており、可溶化条件の検討や部分精製の結果を含めて現状を報告したい。



GUN1の多機能性とレトログレードシグナル



シロイヌナズナGUN1のドメイン構造

- TP : 葉緑体移行シグナル
- NDR : 天然変性領域
- PPR : ペンタトリコペプチドリピート
- SMR : Small MusS-Related領域

Brassica rapa の春化応答因子の同定に向けて

○藤本 龍¹、アクタ アヤシャ¹、ブザス ディアナ²

¹神戸大学大学院農学研究科、²筑波大学生命環境系

アブラナ科野菜であるハクサイ、コマツナ、カブ等の *Brassica rapa* 種やキャベツ等の *Brassica oleracea* 種は、花成誘導には、長期間の低温にさらされる必要がある。このような現象を春化（バーナリゼーション）とよぶ。ハクサイやカブなどのアブラナ科葉根菜は栽培中に花芽が形成されると、臺立ち（とうだち）によって商品価値が損なわれる。そのため、低温にさらされても花芽が形成されにくい（臺立ちしにくい）晩抽性品種が育成されている。特に、ハクサイの冬・春まき栽培では、臺立ちの危険性が高く、より強い晩抽性品種の開発が求められている。このことから、アブラナ科葉根菜の品種育成において、春化メカニズムの理解が重要となる。

アブラナ科葉根菜の春化においても、モデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 同様、*FLOWERING LOCUS C (FLC)* が中心的な役割を担っている。シロイヌナズナの *AtFLC* はゲノム中に 1 コピーであるのに対して、ハクサイでは 4 つの *BrFLC* パラログ (*BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3*、*BrFLC5*) が存在する。多くのハクサイ系統・品種では、*BrFLC5* は突然変異により機能喪失していることが明らかにされている (Xi *et al.* 2018)。残り 3 つの *BrFLC* (*BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3*) は全て、シロイヌナズナの *AtFLC* 同様、開花抑制機能を有する (Takada *et al.* 2019)。一般的なハクサイ系統・品種では、低温処理期間に応じて 4 つ全ての *BrFLC* の発現量が低下し、転写抑制型のヒストン化学修飾の一つであるヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) が *BrFLC* の転写開始点付近に見られる (図 1)。その後、通常温度 (22℃) に戻すと、H3K27me3 の蓄積が *BrFLC* 全体に広がり、*BrFLC* の発現は抑制された状態のまま維持される (図 1) (Akter *et al.* 2019)。これらの結果は、シロイヌナズナで見られる現象と類似している。一方、シロイヌナズナでは、低温によって発現が誘導される 2 つの長鎖非コード RNA (long noncoding RNA; lncRNA) (COLDAIR, COLDWRAP) が H3K27me3 の蓄積に関わっていると考えられているが、4 週間の低温処理したハクサイの葉から網羅的に lncRNA を同定したところ、4 つの *BrFLC* 遺伝子座全てにおいて、COLDAIR と COOLWRAP に類似性が見られる lncRNA の発現が確認されなかった (Shea *et al.* 2019)。よって、低温下でハクサイの *BrFLC* 遺伝子座に見られる H3K27me3 の蓄積が lncRNA を介さずに生じている可能性が示唆され、*BrFLC* 遺伝子座には春化応答に重要な cis 配列が存在し、これが H3K27me3 の蓄積 (PRC2 のリクルート) に重要である可能性を考えた (Akter *et al.* 2021)。本共同研究では、*B. rapa* の春化応答に重要な配列を特定することを目的としている。

B. rapa の極晩抽性系統である「つけな中間母本農2号」では、*BrFLC2* と *BrFLC3* の第一イントロンにトランスポゾン様配列の挿入が見られ、*BrFLC2* は低温処理を行っても発現レベルの低下が見られず、*BrFLC3* は発現低下は見られるがその減少率は他の *B. rapa* 系統と比べると小さいことが明らかとなっている (Kitamoto *et al.* 2014)。我々の低温処理条件においても同様の結果が得られた。そこで、本研究では、第一イントロンに挿入されたトランスポゾン様配列の DNA メチル化状態について調べたところ、高度に DNA メチル化されていることを明らかにした。また、DNA メチル化は低温処理の有無によって変動しないことを明らかにした。次に、低温処理による H3K27me3 の蓄積について調べたところ、4、6、12 週間の低温処理を行っても、*BrFLC2* と *BrFLC3* 遺伝子座には H3K27me3 の蓄積が見られないことを明らかにした。以上の結果から、「つけな中間母本農2号」において、低温処理後に *BrFLC2* と *BrFLC3* 遺伝子座に H3K27me3 が蓄積されない理由として 2 つの可能性が考えられた。

- (1) 第一イントロンに挿入されたトランスポゾン様配列の DNA メチル化が、H3K27me3 を行う PRC2 複合体のリクルートを阻害する可能性
- (2) トランスポゾンが春化応答に重要な領域に挿入された可能性

これらの可能性を検証するために、シロイヌナズナを用いた実験系の構築を試みた。まず、*B. rapa* の *BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3* のゲノム断片をそれぞれシロイヌナズナに形質転換した。得られた形質転換体は全て遅咲きの形質を示した。現在、導入したそれぞれの *BrFLC* がシロイヌナズナの遺伝的背景で春化応答するか調べているところである。(1) の可能性の検証では、*BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3* の第一イントロンに RNAi により *de novo* DNA メチル化を導入し、春化応答性が失われるかを調べる。現在、RNAi コンストラクトを導入したシロイヌナズナの形質転換体を作成している。(2) の可能性の検証では、第一イントロンの春化応答性因子の候補領域に変異を入れたコンストラクトの作製を進めている。これらの実験により、*B. rapa* の春化応答に重要な領域を特定したいと考えている。

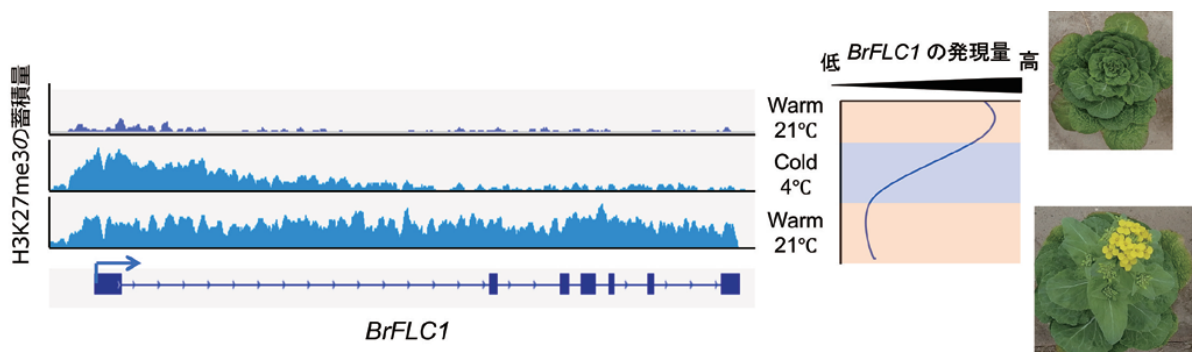


図1 温処理前後での *BrFLC1* 遺伝子における H3K27me3 の蓄積
BrFLC2、*BrFLC3*、*BrFLC5* でも同様の H3K27me3 蓄積パターンを示す。

ゲノム編集による酒米品種‘山田錦’の短稈化

玉腰 竜之介¹、津田 麻衣²、大嶋 雅夫²、肥塚 信也¹、○奥崎 文子¹

¹玉川大学大学院農学研究科、²筑波大学 T-PIRC

‘山田錦’ (*Oryza sativa* L.) は 80 年以上前に育種された品種でありながら、‘酒米の王様’ と称され、現在も最も生産されている。酒米は玄米が大きく、胚乳中央に「心白」とよばれる白色部位を有しており、特に山田錦は心白形質等の特性のバランスが良く、優れた醸造適性を持つ (池上, 2021)。一方、その栽培特性としては晩生で稈長が 1 m を超える長稈のため、倒伏しやすく栽培が難しいという問題点がある。そのため、山田錦を交配母本とした短稈の酒米品種の育成も行われてきたが、胚乳形質に関する因子については未解明な点が多く、交配育種では山田錦の胚乳形質を完全に維持することは難しい。よって、山田錦のゲノム背景をそのままに稈長に関する因子のみを改変できれば、より望ましい山田錦由来の短稈系統の育成に貢献すると考えた。イネの短稈育種に利用される因子の一つに、「緑の革命」で利用された半矮性遺伝子 *semidwarf gene 1 (sd1)* がある。*SD1* 遺伝子は、イネの茎葉の伸長を促すジベレリン (GA) の生合成において働く GA20ox2 をコードしており、*sd1* 変異による GA 不足は短稈形質を付与するものの、他に 3 コピーある GA20ox ファミリー遺伝子の作用により収量性には影響しないと報告されている (Ashikari *et al.* 2002)。そこで、本研究においては、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて山田錦の *SD1* 遺伝子を機能破壊して短稈化することを目的とした。

まず、山田錦 *SD1* に特異的な *gRNA* を 1 つ設計し、*SD1* 編集ベクターを構築した。アグロバクテリウム法により山田錦に *SD1* 編集ベクターを導入し、独立な 2 系統の再分化系統 (#1, #2) を取得した。両系統において *SD1* 標的配列周辺のクローニングをしてシーケンス分析をした結果、いずれの系統においても 9 割以上のクローンに 1 塩基の挿入または欠失による機能欠失型の変異が検出された。#1 系統当代 (T_0) は可稈であり、自殖次代 (T_1) が得られた。多数の #1 (T_1) について *SD1* 変異を判別可能な CAPS 分析で調査した結果より、 T_1 世代の全てが *sd1* 変異を両染色体に持つことが推測された。そこで、本来は T_2 世代で実施予定だった形質の調査を、 T_1 世代を材料として実施することにした。まず、幼植物において矮性形質の調査と GA₃ の添加による回復試験を行った。その結果、GA₃ 無処理の場合 #1 (T_1) は野生型に比べ矮性を示したが、GA₃ 処理により #1 (T_1) の矮性形質は回復した。よって、#1 (T_1) は *sd1* 変異により内生の活性型 GA が不足していることが示唆された。並行して、#1 (T_1) において、PCR 選抜により T-DNA のヌルセグリガント分離系統 (ヌル) を複数選抜し、そのうち 4 個体を野生型とともに筑波大 T-PIRC の特定網室で栽培した。栽培中、#1 (T_1) は野生型よりも草丈が低いことが観察された (図 1)。稈長を測定した結果、野生

型に比べ #1 (T_1) は有意に稈長が短かったことから、ゲノム編集による *sd1* 変異により目的とする短稈形質が付与されたことが示された。一方、酒造に重要な玄米の形質については野生型と同等であることが望ましい。そこで、#1 (T_1) から得た T_2 種子の玄米について、まずはサイズ、心白に関する調査を行った。その結果、調査した項目において WT と #1 (T_2) が同等であることが示唆された。今後、収量性やタンパク質含量等の胚乳成分についても調査し、機能欠失型 *sd1* 変異による胚乳形質への影響の有無も評価することが必要であると考えている。

本研究では、*SD1* のゲノム編集により短期間で山田錦を短稈化することができた。得られた系統が酒米育種に貢献することを期待し、胚乳形質等の評価も進めていきたい。また、山田錦においてもゲノム編集技術が利用可能と示されたことから、胚乳形質に関与しないその他の不良形質についても改良の可能性が広がると考えられる。



図1. #1系統 (T_1) の出穂中の様子
山田錦の野生型 (WT) と #1 系統の自殖次代 (T_1)
を7号ポットで栽培した。

【参考文献】

- 池上勝 (2021) 酒米「山田錦」は奇跡のお米. 生物の科学 遺伝, 75 (3), 194-199.
- Ashikari, M., Sasaki, A., Ueguchi M., Itoh H., Nishimura A., Datta S., Ishiyama K., Saito T., Kobayashi M., Khush G., Kitano H., M. Matsuoka (2002) Loss-of-function of a Rice Gibberellin Biosynthetic Gene, *GA20 oxidase* (*GA20ox-2*), Led to the Rice 'Green Revolution' . *Breeding Science*, 52, 143-150.

遺伝資源の遺伝的配列データの利用と利益配分を取り巻く 国際交渉プロセスとその正当性

○小林 邦彦¹、渡邊 和男²

¹一般社団法人海外環境協力センター、²筑波大学生命環境系

遺伝資源は、植物の新しい品種を開発するために、その素材として用いられるなど、遺伝的な価値に焦点があてられた資源である。1993年に生物多様性条約が発効され以降、開発途上国を中心に様々な国（豪州やスペインといった先進国も含む）が、遺伝資源の取得や利用を規制してきた。しかし、昨今、遺伝資源だけでなく、遺伝資源に関する遺伝的配列データをその規制の枠組みに取り入れる国々が出てきており、生物多様性条約、食料及び農業のための植物遺伝資源に関する国際条約（ITPGRFA）、WHOなど様々な国際条約・国際機関で議論されている。

とはいえ、まだまだ議論の途上で、何か新しい議定書や国際条約を構築するといった具体的な話には及んでおらず、様々な政策オプションが提示されている所である。しかし、現行の各国制度ごとの枠組みに対する課題として取引費用の増大などが指摘されており（Bertioli *et al.* 2021; Mekonnen & Spielmann, 2021）、各国共通の枠組みを構築する意見などが出ている（Sara *et al.* 2021）。このような枠組みは、生物多様性条約においても、条約改正、議定書採択又は締約国会議の決議（締約国の法的確信を採択時に表明する必要がある）を通じて構築することは可能である。実際に、条約上の枠組みとして、植物遺伝資源を対象にした ITPGRFA では、国家の主権的権利の行使として多国間制度（multilateral system：MLS）を構築している（図1）。

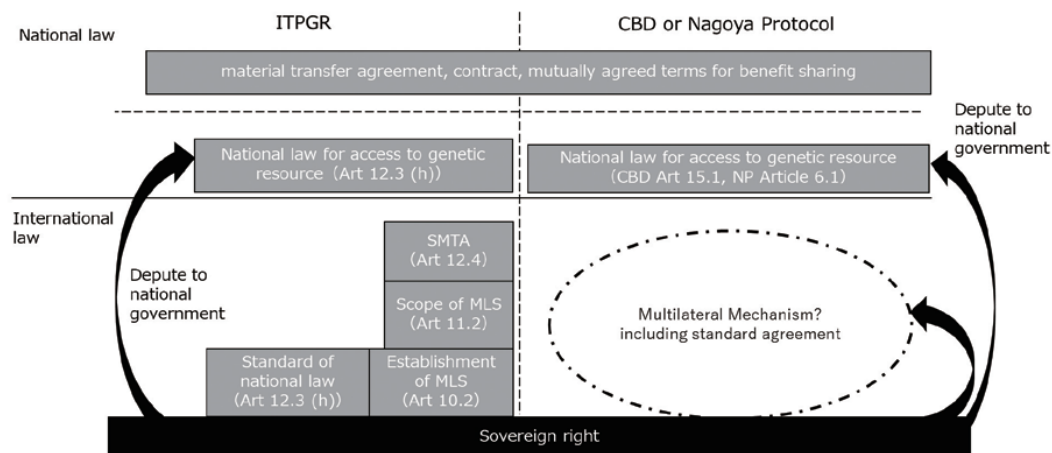


図1 現行の枠組みと生物多様性条約における多国間制度の法的位置づけの可能性

しかし、遺伝資源に関する遺伝的配列データという現行枠組みの対象範囲や定義との課題など様々な論点が顕在している中で、どのようなプロセスで本検討が行われるのか、また、そのプロセスが、正当性（Legitimacy）という観点からどのように評価できるのか、検討を行った。正当性の評価にあたっては、1. ガバナンスを行う組織の権限の妥当性、2. 法律または民主的な命令によって付与されているかどうか、3. ステークホルダーの支持を得たものかどうかの3点から行った（Lockwood, 2010）。

検討の結果、ステークホルダーからの反対はされていないものの、生物多様性条約の下で議論されるのが適切であるかどうかは、他の事項を所掌する国際条約や国際機関との観点から疑義が残る。そのため、今後の様々なフォーラムでの議論を注視していく必要がある。

【参考文献】

1. Bertoli DJ, Clevenger J, Godoy IJ, Stalker HT, Wood S, Santos JF, Ballén-Taborda C, Abernathy B, Azevedo V, Campbell J (2021) Legacy genetics of *Arachis cardenasii* in the peanut crop shows the profound benefits of international seed exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 118: e2104899118
2. Lockwood M. 2010. Good governance for terrestrial protected areas: a framework, principles and performance outcomes. *Journal of Environmental Management* 91:754–766
3. Mekonnen DW, Spielman DJ (2021) Changing patterns in genebank acquisitions of crop genetic materials: an analysis of global policy drivers and potential consequences. *Food Policy* 105: 102161
4. Sara, R.; Wyss, M.; Custers, R.; in't Veld, A.; Muyldermans, D. (2021) A need for recalibration of the discussions on Access and Benefit Sharing. *EMBO Rep.* e53973.

合成生物学アプローチによる植物器官の成長角度操作と理解への挑戦

○川本 望¹ 中楚 洋介² 吉田 祐樹³ 小口 太一⁴

¹基礎生物学研究所・植物環境応答研究部門 ²東京大学・生産技術研究所

³熊本大学・大学院・先端科学研究部 ⁴筑波大学・生命環境系・T-PIRC

植物は光や温度など様々な外的な環境に応答し、柔軟にその形態を変化させる。重力はこれら環境要因のひとつであり、植物は重力の方向を認識し、応答することで、根、枝葉や花などの器官を適切な位置に配置することで生育の最適化をはかっている。一般に、植物の根は重力の方向に、地上部は重力とは反対の方向に成長する。主根や主茎はこの法則に従い、重力方向、あるいは重力とは反対方向へと成長するが、側方器官である側根や側枝は植物種に固有のある一定の角度を保って傾斜して成長する。この成長も重力に応答した結果であり、傾斜重力屈性と呼ばれる。傾斜重力屈性を説明する仮説として、重力屈性に拮抗する Anti-gravitropic Offset (AGO、抗重力屈性とも呼ぶ)の存在が想定され、重力に応答した植物器官の成長角度 (Gravitropic setpoint angle, GSA) は重力屈性と AGO のバランスによって制御されるという説が提案されている。

シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的な解析から胚軸、主茎、側枝などの地上部器官においては内皮細胞、地下部器官である主根、側根においては根端に存在するコルメラ細胞が重力感受細胞として機能していることが明らかとされている。これらの重力感受細胞において、重力シグナル伝達に重要な働きを担う因子として、我々は双子葉植物のみならず、単子葉植物や樹木においても保存されている植物固有の *LAZY1-LIKE* (*LZY*) ファミリー遺伝子を同定し、解析を進めてきた。シロイヌナズナにおいては6種の *LZY* ファミリー遺伝子が存在しており、貢献度はそれぞれ異なるものの、*LZY1*、*LZY2* および *LZY3* が地上部において、*LZY2*、*LZY3*、*LZY4* は地下部において冗長的に機能している。

GSA が真に重力屈性と AGO のバランスによって制御することができるのであれば、重力屈性と AGO を人工的に制御することで、GSA を任意の値に制御することができると考えることができる。しかしながら、現在の変異体を用いたアプローチでは限界があった。そこで、GAL4-UAS による遺伝子発現システムと dCas9-SRDX による遺伝子発現抑制を組み合わせた人工遺伝子発現制御回路を用いて、草本植物のモデル系としてのシロイヌナズナに加えて、樹木のモデル植物としてポプラ T89 をモデル系として GSA の精緻な制御を目指した。

GAL4-VP16 の発現制御に用いるポプラ T89 の *LZY1* 相同遺伝子を探索するため、2 段階の BLAST 検索を行なった。1 段階目にシロイヌナズナ *LZY1*(At5g14090) の配列をクエリーに用いてポプラゲノムデータベース PopGenIE 上の *Populus trichocarpa* のゲノム配列に対して BLAST 検索を

行い、Potri.001G059100 と Potri.001G327500 を *LZY1* 相同遺伝子の候補として同定した。空間的な発現パターンから Potri.001G327500 を用いてさらなる検索を進めた。2段階目に Potri.001G327500 の配列をクエリーに用いて、*P. tremula* x *P. tremuloides* の F1 交雑系統である T89 のドラフトゲノムに対して BLAST 検索を行ない、Potrx054992g17519 をシロイヌナズナ *LZY1* 相同遺伝子とした。Potrx054992g17519 の 5' 側上流約 3kb を転写制御領域としてクローニングし、人工転写活性化因子 GAL4-VP16 の上流に連結した。さらに 5xUAS: dCas9-SRDX と 5xUAS:erGFP およびガイド RNA の発現ユニットを同一プラスミド上に配置した。Cas9 のガイド RNA として Potrx054992g17519 の遺伝子コード領域に 4 種のガイド RNA を設計し、最終的に 4 種類のコンストラクトを作成した。これらのプラスミドとアグロバクテリウムを用いて、ポプラ T89 に遺伝子導入を行なった。カナマイシン耐性を指標に形質転換体の選抜を行い、現在までに複数の形質転換個体を取得している。また GAL4-VP16 が期待した組織・細胞において発現し、UAS 下流の遺伝子発現を促進しているか小胞体局在型 GFP(erGFP)の発現を指標に検討した。その結果、複数系統において期待通り、葉の維管束において特異的に GFP のシグナルが見られ (図 1A-C)、このシグナルは小胞体に局在している様子も観察された (図 1D-F)。この発現パターンはシロイヌナズナ *LZY1* の発現パターンとよく一致することから、dCas9-SRDX も内皮細胞において発現していると期待される。今後は、得られた形質転換体から根の再分化を進め、特定網室での栽培試験を進める。また、並行してシロイヌナズナを用いて同様の実験を進めており、GSA の操作を通じて、GSA 決定機構の独自性と多様性の理解を進めていきたい。

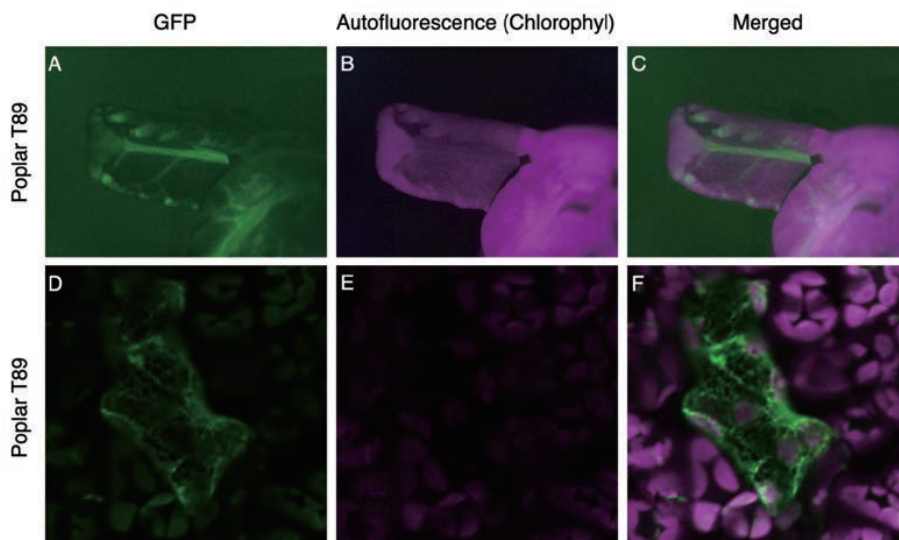


図1 形質転換ポプラ T89 における erGFP の発現パターン。
緑色で GFP 由来シグナル (A,B)、マゼンタで自家蛍光由来シグナル (B,E)、と重ね合わせ像 (C,F) を示した。葉の維管束において GFP シグナルが観察され (A-C)、そのシグナルは小胞体に局在していた (E,F)。

高温耐性をもつ接ぎ木トマトの解析

○西口 正通¹、小林 括平¹、杉本 貢一²、篠崎 良仁^{2,3}、有泉 亨²、江面 浩²

¹愛媛大農、²筑波大生命環境系 ³現、農工大院グローバルイノベ

新育種技術（NBT）の一つに、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、基礎的研究から応用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。近年、植物工場による作物栽培が注目され、農林水産省、経済産業省、文部科学省などでプロジェクト支援が行われている。愛媛大学では全学の付属施設として植物工場研究センターが設立され、開発研究の全国的拠点の一つとして大きな実績を積み重ねている。トマトを主要ターゲットとして、研究が進行中であり、農学部キャンパスには、大学としては我が国最大規模の太陽光利用型植物工場（合計面積約 1,800 m²）、また、宇和島市内では、約 8,000 m²の太陽光利用型植物工場が稼働している。成果としての産物は「あいだいトマト」のブランドで近隣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、栽培体系上、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 月となり、年 1 作で終了する。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。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、単位面積あたりのトマトの生産量は我が国のほぼ 2 倍以上である（仁科、私信）。

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。あいにく近縁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、演者らは高温感受性関連遺伝子を 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、在来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。これまでに、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）。本共同研究課題は、この接ぎ木トマトを筑波大学の特定網室において夏季の高温時期を含む環境条件下で栽培し、着果等の特性を対照の栽培品種と比較・検討することを目的とする。

本課題で用いている 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' UTR 部分の逆位反復配列を挿入したサイレンシング誘導プラスミドを構築し、アグロバクテリウム法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 サイレンシングの目印である siRNA を検出できたもので、その T1 (初年度)、T2 (2 年度) および T3 世代 (3 年度) を接ぎ木実験に供試した。穂木には我が国において市販の栽培トマト (品種、ハウス桃太郎) を供試した。台木トマトに穂木を接ぎ木し、目下、特定網室において栽培試験を実施中である (3, 4)。これまでに、下記の着果数についての結果が得られている (Table 1、Fig. 1)。対照トマト (台木、ブロック; 穂木、ハウス桃太郎) の 3 個体のトマトでは 8 月に出現した花房からの着果数がゼロであったのに対し、*SIFAD7* サイレンシング系統を台木に、ハウス桃太郎を穂木にした接ぎ木トマト (5 個体) では、いずれも着果が見られた (合計 11 着果)。このことから、サイレンシング台木の接ぎ木トマトにおいては着果までの過程において高温耐性が誘導されたものと考えられた。さらにこれらの現象について、RNAseq 等の技術を用い検討する予定である。

Table 1 Total number of fruits in flower clusters appeared in August								
Line no. ¹⁾	1	2	3	4	5	6	7	8
Total no. fruits	4	2	1	1	3	0	0	0
1) 1; B7O1: 2, 3, 4, 5; B7U1: 6, 7, 8; Control								



Fig. 1 Fruits from flower cluster developed in August in grafted tomato

【参考文献】

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
3. 西口ら(2020) RNAサイレンシング接ぎ木トマトの特性解析(1): *SIFAD7* 育種学研究 22 (別冊 1) p151
4. 西口ら(2021) RNAサイレンシング接ぎ木トマトの特性解析(2): *SIFAD7* 育種学研究 23 (別冊 1) p149

マイクロトムのストリゴラクトン受容体欠損変異体の探索とその機能解析

梅原 三貴久

東洋大学生命学部応用生物科学科

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の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もつ根圏シグナル物質として知られていた。その後、SL が植物の枝分かれ抑制を始め、さまざまな生理作用を示す植物ホルモンであることが明らかにされた。SL の生合成では、カロテノイドイソメラーゼの D27、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、 β -カロテンから SL 生合成前駆体カーラクトン (CL) に変換される。その後、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カーラクトン酸に変換され、メチル基転移酵素のはたらきによってカーラクトン酸メチルとなる。カーラクトン酸メチルは、*LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE (LBO)* がコードする 2 オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼのはたらきによってヒドロキシメチルカーラクトン酸に変換される。また同時に脱メチル反応によってカーラクトン酸に戻る。さらに、トマトでは CYP722C のはたらきによってカーラクトン酸からオロバンコールが合成され、そこからソラナコールが合成されると推定されている。これまでの形質転換植物デザイン研究拠点の共同利用研究において、マイクロトムの CCD7、CCD8、MAX1、LBO 遺伝子欠損変異体を TILLING 法で探索し、CCD8、MAX1、LBO については遺伝子機能欠損変異体を得ることができた (表)。しかしながら、SL 情報伝達欠損変異体については未着手であった。そこで本研究では、マイクロトム (*Solanum lycopersicum* L.) の α/β -hydrolase ファミリーをコードする SL 受容体遺伝子 *DI4* 欠損変異体の形質評価を行った。

トマトの *DI4* は、第 4 染色体上に 1 コピー存在する (Solyc04g077860)。まず、Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) 法で筑波大学が保有するマイクロトム突然変異系統の中から *SID14* 欠損系統を探索した。*SID14* 欠損系統の候補 W2471 は、第 1 エキソン上の 197 番目の G が A に、66 番目のアミノ酸が Arg から Ala に置換したミスセンス変異体だった。しかしながら、W2471 の枝分かれの数は野生型ほぼ同等で、SL 関連変異体の特徴である分枝の増加は確認できなかった。そこで、CRISPR/Cas9 を使ったゲノム編集で *SID14* 欠損変異体を作成し、第 1 エキソンに欠失と挿入を含む変異体が 2 系統 (*d14-1*、*d14-2*) 得られた。これらの変異体では、いずれもフレームシフトが生じ、配列途中で終始コドンが入ったことで加水分解酵素の触媒三つ組残基の His と Asp が欠損していた。筑波大学から *SID14* 欠損変異体の種子を分譲していただいた後、東洋大学で種子を十分確保した上で、野生型や SL 生合成欠損変異体とともに水耕栽培を行い、枝分かれの数

の測定、根寄生植物 *Orobanchе minor* の発芽試験による SL 産生量の推定、根滲出液および根の内生 SL (オロバンコールとソラナコール) の LC-MS/MS 分析を行った。*d14-1* および *d14-2* の枝分かれの数はいずれも野生型の約 2 倍に増加した(図)。SL 合成アナログ GR24 を 1 μ M で処理すると、SL 生合成変異体 *ccd8* および *max1* の枝分かれは野生型と同数まで減少したのに対し、*d14-1* および *d14-2* の枝分かれの数は減少しなかった。さらに、*d14* のオロバンコールとソラナコールは野生型より多く蓄積しており、*d14* の根滲出液を *Orobanchе minor* の種子に与えると野生型より高い発芽率を示した。したがって、ゲノム編集で作出した *d14-1* および *d14-2* はノックアウト変異体として利用できると考えられる。

また、*D14* とよく似た配列を持つ *SID14LIKE* 遺伝子は、トマトの第 2 染色体上に 4 コピー存在する (Solyс02g064760、Solyс02g064770、Solyс02g092760、Solyс02g092770)。*SID14LIKE* は KARRIKIN INSENSITIVE2 (KAI2) / HYPOSENSITIVE TO LIGHT (HTL) とも呼ばれ、カリキンという植物が燃焼した際の煙に含まれる種子発芽促進物質の受容に関わっている。現在、*SID14* 同様、*SID14LIKE* 全て欠損した変異体をゲノム編集で作出し、形質を調査している。

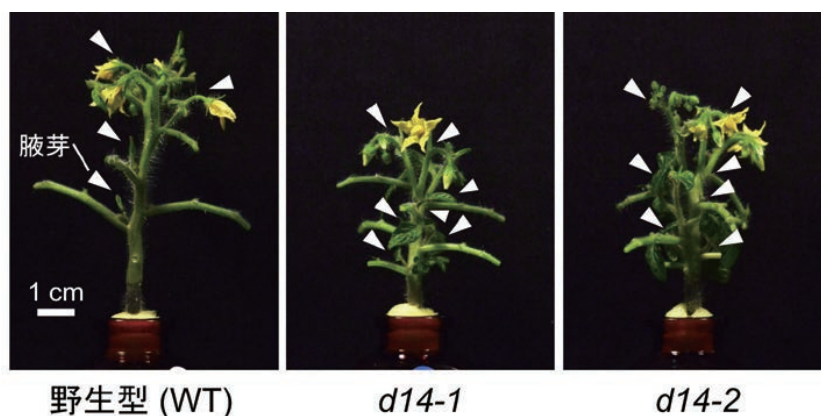


図 ゲノム編集で作出した *d14-1* および *d14-2* の枝分かれ

表 これまでに得られた SL 関連変異体リスト

Strain ID	Strain Name	Background cultivar	Origin	Reference (DOI)
TOMJPC00003	<i>ccd8-1</i> (BC ₄)	Micro-Tom	TILLING	10.3390/ijms19092645
TOMJPC00004	<i>ccd8-2</i> (BC ₄)	Micro-Tom	TILLING	10.3390/ijms19092645
TOMJPC00005	<i>max1-1</i> (BC ₄)	Micro-Tom	TILLING	—
TOMJPC00006	<i>max1-2</i> (BC ₄)	Micro-Tom	TILLING	—
TOMJPS00001	<i>d14-1</i>	Micro-Tom	CRSPR/Cas9	—
TOMJPS00002	<i>d14-2</i>	Micro-Tom	CRSPR/Cas9	—

ccd8-1 と *ccd8-2* はすでに TOMATOMA で公開され、分譲可能です。その他の系統を使いたい場合には直接お問い合わせください。*lbo* 変異体はまだ形質調査中です。



2017-2021 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



2010-2021 Plant Transgenic Design Initiative
©形質転換植物デザイン研究拠点



<https://gene.t-pirc.tsukuba.ac.jp>