

形質転換植物デザイン研究拠点

令和4年度

成果報告会

会期:令和5年3月6日・7日

【ハイブリッド開催】

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

オンライン- ZOOM

主催



筑波大学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



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
形質転換植物デザイン研究拠点

令和4年度 成果報告会

会期：令和5年3月6日・7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

オンライン：ZOOM

プログラム

3月6日[月]

13:15～13:25 開会挨拶 福田 直也（筑波大学 T-PIRCセンター長/形質転換デザイン研究拠点長）

セッション 1 座長：柴 博史（筑波大学T-PIRC）

13:25～13:40 **植物研究拠点アライアンスの展望について**
柴 博史（筑波大学/T-PIRC副センター長）

13:40～14:00 **転写因子タンパク質を利用したプロトプラストからの
高効率植物体再生技術の確立** 坂本 真吾（産業技術総合研究所）

14:00～14:20 **シロイヌナズナの早期開花変異体の原因遺伝子同定に向けて**
藤本 龍（神戸大学）

14:20～14:30 休憩

セッション 2 座長：有泉 亨（筑波大学T-PIRC）

14:30～14:50 **耐暑性及び感受性トマトの表現型解析**
星川 健（国際農研）

14:50～15:10 **植物の香り受容機構へのアプローチ**
松井 健二（山口大学）

15:10～15:30 **植物-微生物相互作用解析のためのプロモーターレポータートマト株の
作出と整備に向けて** 別役 重之（龍谷大学）

15:30～15:40 休憩

セッション 3 座長：渡邊 和男（筑波大学T-PIRC）

15:40～16:00 **成長相転換制御化合物によるジャガイモ収量増大への試み**
菊池 彰（筑波大学T-PIRC）

16:00～16:20 **COP15における生物多様性とバイオエンジニアリングの今後の課題・展望**
香坂 玲（東京大学）

16:20～16:40 **栄養シグナルによるトマト果実形成とソース-シンク機能制御機構の解明**
佐藤 長緒（北海道大学）

3月7日[火]

セッション 4 座長：松倉 千昭（筑波大学 T-PIRC）

10:00 ~ 10:20 **ミヤコグサGF14 遺伝子の開花時期決定への寄与と進化**
若林 智美（奈良先端科学技術大学院大学）

10:20 ~ 10:40 **持続的な資源利用に向けた利益配分と最新技術に関する社会調査結果の考察**
内山 愉太（神戸大学）

10:40 ~ 11:00 **活性カルボニル種消去ペプチドを合成する植物の作成**
真野 純一（山口大学）

11:00 ~ 11:20 閉会挨拶 渡邊 和男（筑波大学 T-PIRC副センター長）

転写因子タンパク質を利用したプロトプラストからの 高効率植物体再生技術の確立

○坂本 真吾¹、野崎 翔平²

¹産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門、²筑波大学 生命環境系

<背景・目的>

現在の植物における遺伝子工学実験においてはアグロバクテリウム法が広くかつ汎用的に利用されているが、2010年代以降、非組換え技術による植物の改良、すなわちゲノム編集技術が注目されるようになってからは、プロトプラストからの個体再生技術が注目を集めるようになってきた。なぜなら、現在のゲノム編集の実用例の多くは、CRISPR-Cas9等の遺伝子発現カセットをゲノムに挿入し、狙った配列が編集された細胞から植物体を再生・作出した後、交配を繰り返すことで先述の遺伝子発現カセットを抜くことによって達成するという「遺伝子組換え技術」をベースにしているためである。しかしこの方法では、アグロバクテリウム法が適応できない植物種（特に実用品種ほど難しいと言われている）や、世代期間が長い植物種（木本植物等）に展開することは難しい。またその代替法としてプロトプラスト等の植物細胞にCRISPR-Cas9等の発現カセットもしくはタンパク質を一過的（非組換えとして）に導入し、編集が起こった細胞を植物体へと再生させる方法も試されているが、既存法では植物体再生効率が極めて低いことが依然として技術課題となっている。本研究が目指す転写因子タンパク質を利用したプロトプラストからの高効率植物体再生技術の確立は、先述した課題全てを解決するポテンシャルを有している。加えて、一過的導入の場合、核酸の方が細胞内で恒常的にタンパク質を産生できるため、タンパク質そのものを導入するよりも効果が大きいといわれているが、核酸を導入した細胞はゲノムへの挿入の有無を完全に否定できない限りは組換え植物とみなされてしまうため、実利用においてそれを回避する技術も求められている。そこで本研究では、プロトプラストからの細胞壁再生および個体再生を促進させる転写因子群を探索し、さらにその転写因子タンパク質を利用することで核酸フリーな高効率植物体再生技術の確立を目指し研究をおこなっている。

<方法、結果、および、現在の進捗状況>

まず最初に、エフェクター・レポーターアッセイによる候補因子の絞り込みを行った。プロトプラストにおける個体再生の最初の段階である「細胞壁再生」を促進させることが期待される10転写因子遺伝子を選定し、それらについて、1. 転写因子のみ、2. 転写因子に転写活性化ドメインを付加した遺伝子、をそれぞれ一過的に過剰発現させる計20種のエフェクタープラスミドを調製した。それらエフェクタープラスミドとともに、セルロース合成酵素遺伝子（CESA）プロモーターでルシフェラーゼ遺

伝子をドライブしたレポータープラスミドをプロトプラストに共導入し、ルシフェラーゼの活性を指標に、候補エフェクターの選抜をおこなった。その結果、転写因子 A および VP16 ドメイン融合転写因子 A を導入した際、高いレポーター活性が見られた。続いて、選抜した転写因子 A を導入したプロトプラストについて細胞壁再生能を測定したところ、上述のレポーターアッセイと同様、転写因子 A および VP16 ドメイン融合転写因子 A を一過的に導入したプロトプラストでは非導入プロトプラストに比べ顕著に高い細胞壁再生能が見られた。さらにサイクリンに YFP を融合した細胞分裂M期のマーカーに対する効果を検証したところ、上述の細胞壁再生と同じくコントロールに比べ細胞分裂マーカーの発現を顕著に上昇させることが明らかとなった（図1）。すなわち、転写因子 A を一過的に発現させることでプロトプラストからの個体再生の最初のステップである細胞壁再生と細胞分裂の両方を促進させることが示唆された。現在、転写因子 A 導入プロトプラストの個体再生能について検証を進めるとともに、上述転写因子 A の組換えタンパクを用いた試験を実施すべく、組換えタンパクの調製をすすめている。

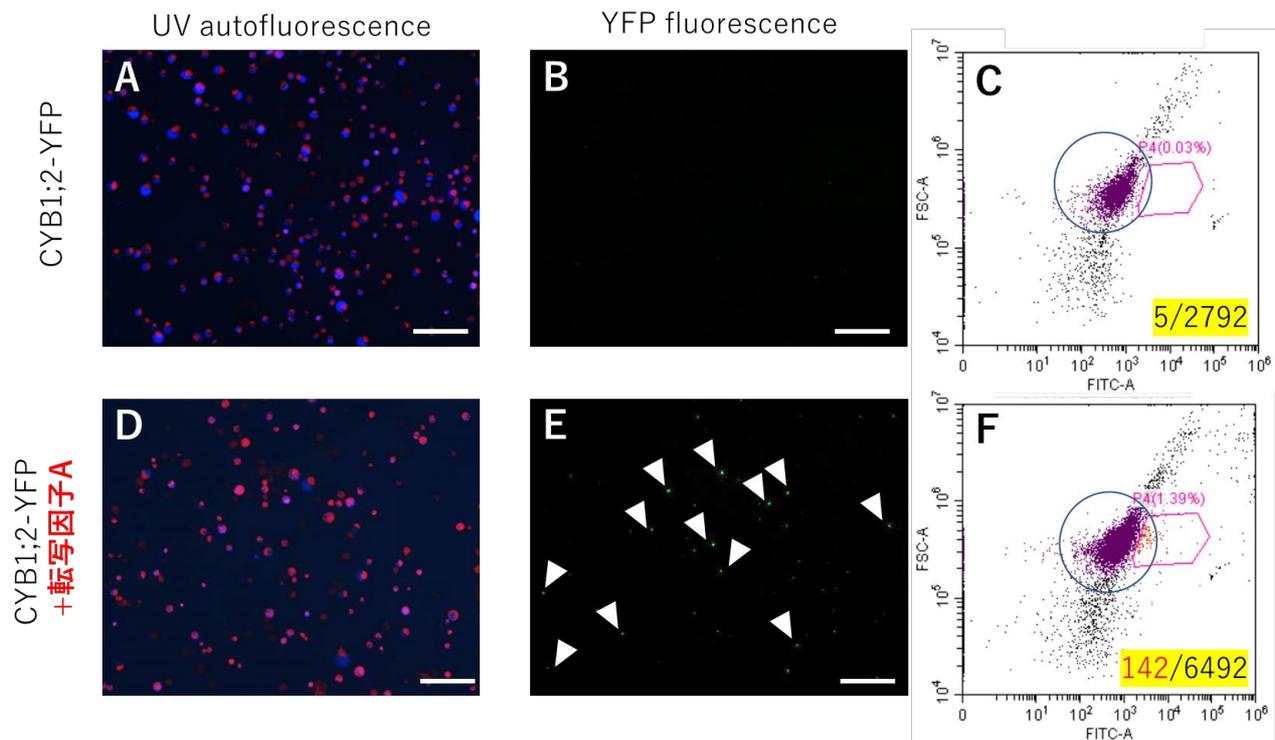


図1. 転写因子 A 導入による CYB1;2-YFP マーカーの活性化. CYB1;2-YFP のみ導入したプロトプラストでは YFP 蛍光は観察できなかったが (A-C)、マーカーと同時に転写因子 A を導入すると YFP 蛍光を発する細胞の出現頻度が顕著に増加した(D-F). △は YFP 蛍光を示す (E). 青色で囲った領域は葉緑体の自家蛍光のカウント数、ピンクで囲った領域は YFP 蛍光のカウント数をそれぞれプロットしたものをあらわす (C,F). バーはそれぞれ 100 μ m をあらわす (A,B,D,E).

シロイヌナズナの早期開花変異体の原因遺伝子同定に向けて

○藤本 龍¹、國田 康平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

遺伝子の発現情報の伝達は塩基配列に依存するジェネティックな遺伝と塩基配列によらず遺伝子の修飾状態の変化に依存するエピジェネティックな遺伝が存在する。エピジェネティックな転写制御に関わる修飾として、DNA メチル化やヒストンの化学修飾が知られている。突然変異体を用いた解析により、植物における DNA メチル化の役割が明らかにされている。例えば、クロマチンリモデリング因子である Decrease in DNA methylation 1 (DDM1)の機能喪失変異体 (*ddm1*)では、ゲノム全体の DNA メチル化レベルの低下が見られることから、この遺伝子は DNA メチル化の維持に関わることが分かっている (Vongs et al. 1993)。また、一度失われた DNA メチル化は、その後、DDM1 の機能が回復しても、失われたままの状態の後代へ遺伝することも明らかとなっている (Kakutani et al. 1999)。*ddm1* 変異体では 1 世代目から DNA メチル化レベルの低下は見られるが植物の発達には大きな変化が見られない。しかし、世代を経るにつれて、様々な生育異常が確認されることが明らかとなっている (Kakutani et al. 1996)。この生育異常には、DNA メチル化が直接原因遺伝子の発現調節に異常をもたらすことで生じるものや (Facilitated)、DNA メチル化によって転移抑制されていたトランスポゾンの抑制が解除され、遺伝子に挿入された結果生じるもの (Obligatory)などがある (Richards 2006)。シロイヌナズナの突然変異体を用いた研究の多くは、Columbia-0 (Col)系統が用いられている。我々は、C24 系統の *ddm1-9* 変異体では、野生型と比較して、開花が極端に早くなる現象を見出した。一方、Col 系統の *ddm1-1* 変異体では、自殖後代で開花遅延する個体が見出されることは報告されているものの、早期開花を示す個体は見出されていない (Kakutani 1997)。そこで、本研究では、C24 系統の *ddm1-9* 変異体を示す早期開花の原因を明らかにすることを目的とした。

C24 系統の野生型 (*D/D*)、*ddm1-9* (*d/d*)、それらの F₁ (*D/d*) について、開花時の葉枚数を測定したところ、*ddm1-9* は、野生型よりも少なく、F₁ は両親の中間値程度であった (図 1)。次に F₂ 集団について、開花時の葉枚数の計測と DDMI の遺伝子型判別を行ったところ、早期開花個体では *d/d* の遺伝子型を示す F₂ の個体数が *D/D* の遺伝子型を示す F₂ の個体数より多く、開花遅延を示した F₂ 個体では *d/d* の遺伝子型を示すものは見られなかった (図 2)。*D/D* の遺伝子型で早期開花を示した F₂ 個体の後代 (F₃)では、早期開花の形質を示したことから、DDM1 の機能が回復しても、早期開花の形質は後代に遺伝し、エピジェネティック変異体であると考えられた。

Col 系統の *ddm1-1* 変異体の自殖後代で見出された開花遅延変異体 *fwa* は、野生型のプロモーター領域に見られる DNA メチル化が完全に消失し、葉において *FWA* の発現抑制が解除されること (異所的発現) によって生じることが明らかとなっている。そこで、*ddm1-9* について *FWA* の発現レベルを RT-qPCR によって測定したところ、*ddm1-9* でも *FWA* の発現抑制の解除が見られたが、*fwa* 変異体の *FWA* の発現量と比べるとその発現レベルは低かった。

C24 の野生型系統と *ddm1-9* 変異体の播種後 14 日の地上部を用いて、RNA-sequencing (RNA-seq) 解析を行った。RNA-seq 解析の結果、1,357 の発現変動遺伝子 (DEGs) (FDR<0.05) が見出され、1,132 遺伝子は、*ddm1-9* の方が野生型よりも高い発現レベルを示し、225 遺伝子は、*ddm1-9* の方が野生型よりも低い発現レベルを示した。*ddm1-9* で発現レベルが高かった 1,132 遺伝子のうち、565 遺伝子 (49.9%) はトランスポゾン様配列であった。発現変動遺伝子を用いて、Gene ontology 解析を行った結果、ストレス応答に関わる遺伝子は、*ddm1-9* で発現レベルが高くなる傾向にあり、概日リズムに関わる遺伝子は、*ddm1-9* で発現レベルが低くなる傾向が見られた。同じ組織を用いて、Whole genome bisulfite sequencing (WGBS) や、ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) の抗体を用いた Chromatin Immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) も行っており、遺伝子発現の変化とエピジェネティックな修飾の変化との関連性について調べている。

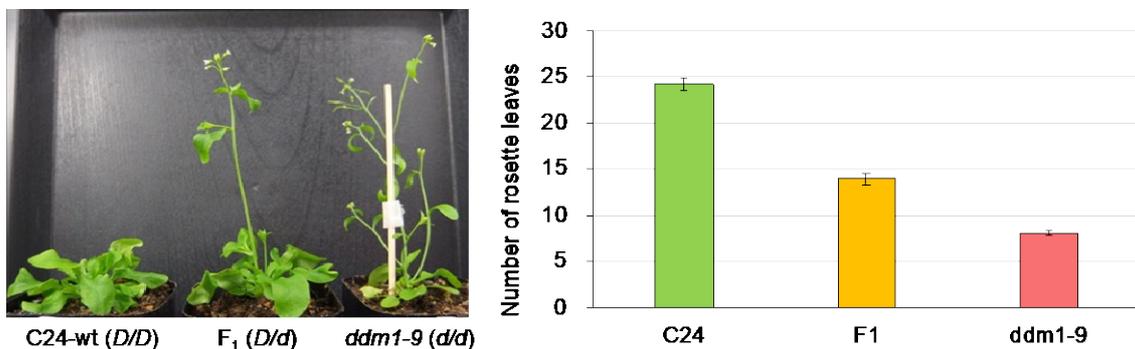


図 1. *ddm1-9* 変異体に見られる早期開花

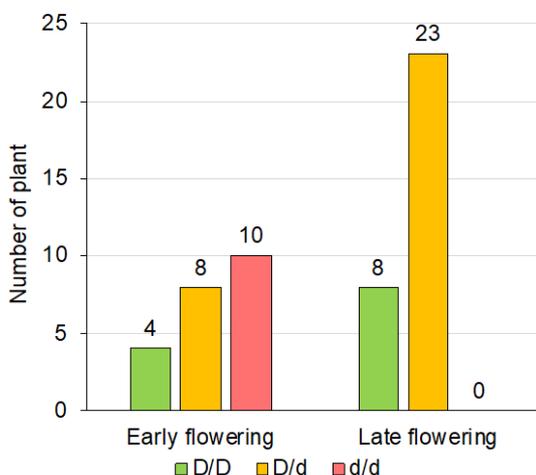


図 2. 早期開花 F₂ 個体と開花遅延 F₂ 個体の *DDM1* の遺伝子型

耐暑性及び感受性トマトの表現型解析

○星川 健^{1,2}、Ya-ping Lin²、杉本 貢一³、有泉 亨³、江面 浩³

¹国際農研・生物資源・利用領域、²World Vegetable Center、³筑波大学・T-PIRC

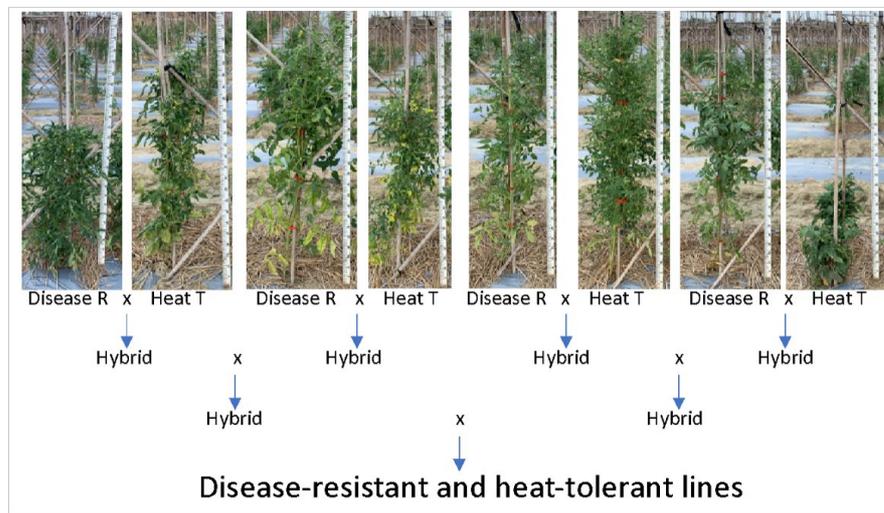
近年、地球温暖化によって引き起こされる地球規模の気候変動が大きな社会問題となっている。世界の食料安全保障において、大規模な気候変動によって引き起こされる様々なリスクが報告・懸念されており、食料供給、食料へのアクセス、食品の安定性及び栄養性など多岐に渡り、特に、東南アジア及びアフリカ（サブサハラ）等の開発途上地域では新たな飢餓や貧困の原因となり得る可能性が指摘されている。様々な環境ストレスの中でも、高温による熱ストレスは植物の成長に重篤な生理障害を引き起こし、世界の作物生産に大きな影響を与えている。トマト栽培においても、夏季の熱ストレスによる着果・着色不良、小玉化、品質低下などの生育障害が問題となっており、東南アジア及びアフリカ（サブサハラ）等の開発途上地域における野菜生産は、先進国に比べ、生育環境が脆弱であり、高温障害や病虫害による収量減が顕著である。このような問題を解決するために、熱ストレス下においても着果安定性が確保される耐暑性品種の育種は急務である。台湾にある World Vegetable Center (研究代表者が長期滞在し研究を実施) では、耐暑性トマト品種の作出のための研究が実施されており、MAGIC (Multi-parent advanced generation inter-cross) population (多系交雑集団) が開発されている (図 1)。この集団は、耐暑性トマトを作出し、熱ストレス下での多様な表現型の遺伝的メカニズムを研究するために設計されている。研究代表者等は、2021・2022 年に MAGIC population (F₆ 世代 250 系統) を用いて、台湾の夏季温室で多様な表現型データを収集し、それらの候補となる遺伝子座を同定し、同定された候補遺伝子の機能を今後検証する予定である。本研究では、植物検疫の観点から、MAGIC population 全系統の日本への輸入は、コスト・労力において、現実的ではないため、MAGIC population の作出に使用された 8 種親系統を用いる。8 種親系統は、4 種の耐暑性野生種及び 4 種の多様な病害抵抗性を有す栽培種 (熱ストレス感受性) が含まれる。8 種親系統の表現型は、前述の栽培試験において、すでに収集済みであるが、制御された熱ストレス及びコントロール環境下における表現型解析は実施されておらず、これらの系統のどの表現型が耐暑性付与に起因するかは、完全には分かっていない。

そこで、本研究では、T-PIRC 遺伝子実験センターに設置される熱ストレス及びコントロール環境

を制御可能な閉鎖系温室で、8種親系統を栽培し、耐暑性及び感受性トマトの収量性、花粉特性等の表現型、熱ストレス誘導遺伝子 (*HsfA1* や *HSP101* 等) の遺伝子発現を検出し、熱ストレス下における表現型と遺伝子発現を明らかにする。

閉鎖系植物栽培室で熱ストレス (35°C/ 25°C, 16時間日長) 及びコントロール (25°C/ 25°C, 16時間日長) 環境下で耐暑性及び感受性トマトを含む8種親系統を生育し、開花数、花粉総数、花粉生存率等の花粉稔性に関わる形質、種子を有す果実の比率、着果数、総重量等の収量に関わる形質を調査する。現在、閉鎖系植物栽培室で8種の親系統を生育しており、令和4年度内に表現型解析が終了予定である (図2)。

Tomato MAGIC population - pyramiding multiple desired traits



Phenotyping of F₆ progeny (~250) in summer, 2012, 2022

図1 MAGIC population の設計



図2 閉鎖系栽培室で栽培される8種親系統

植物の香り受容機構へのアプローチ

○松井 健二¹、田中 康大¹、鷹取 雄介¹、杉本 貢一²

¹山口大学創成科学研究科、²筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター

昨年11月6日にNHKスペシャル 超・進化論 (1)「植物からのメッセージ ～地球を彩る驚異の世界～」で植物の香り化合物が植物-植食者、植物-植食者-肉食者、そして植物-植物の相互作用を媒介する情報化学物質として機能していることが紹介された。これまでに私達は香り化合物を介した植物-植物相互作用で植物は少なくともふたつの仕組みで香り化合物を受容していることを示してきた。そのひとつは受容植物の香り化合物取り込みとその代謝変換である。この仕組みについては共同研究者の杉本らを中心として解明が進み、アワヨトウ食害を受けたトマト葉から放散される多様な香り化合物のうち、(Z)-3-ヘキセノールが受容植物に取り込まれ、その組織内で二糖配糖体へと変換されること、こうして生成蓄積した二糖配糖体がアワヨトウに対し弱いながら毒性を示すことを明らかにした (Sugimoto et al., 2014)。最近、この仕組みを支える(Z)-3-ヘキセノール配糖体化酵素を同定することにも成功した (投稿中)。もう一つの仕組みは、受容植物での香り化合物による信号伝達経路の活性化である。例えばシロイヌナズナを(Z)-3-ヘキセノールなどに曝露するとグルタチオンS-トランスフェラーゼなど防衛に関連する遺伝子が誘導されるがジャスモン酸信号伝達系不全変異体の *jar1* ではその誘導が抑制される (Kishimoto et al., 2005)。シロイヌナズナで香り化合物を変えると誘導される遺伝子の種類が異なり、シロイヌナズナが香り化合物を構造特異的に受容している可能性が示唆された。トウモロコシ実生に(Z)-3-hexenyl acetate を曝露するとプロテアーゼインヒビター遺伝子が誘導される。この実験系で(Z)-3-hexenyl acetate をリード化合物とした様々な構造類縁体を用いて構造活性相関解析を実施すると(Z)-3-hexenol 構造がその受容に必須であることが明らかとなった (投稿準備中)。このように化合物曝露から信号伝達経路の活性化、引き続き防衛遺伝子発現上昇は香り化合物の取り込み・代謝とは異なる

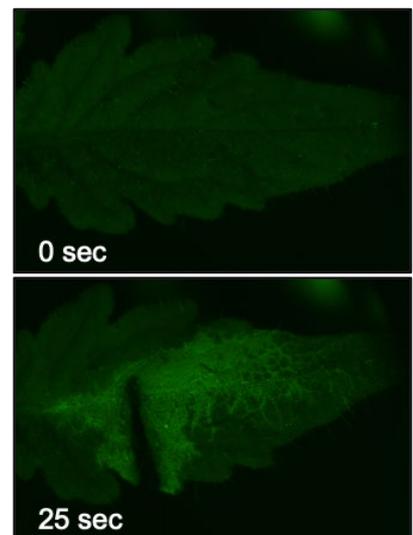


図 GCaMP3発現トマトでの機械傷によるCa²⁺流入のモニタリング

仕組みであり、香り化合物がレセプターとしての機能を持ちうる何らかの因子と構造特異的に相互作用することが香り受容の初期イベントであると考えられる。しかしどのような因子が香り化合物受容に関わっているのかは明らかになっていない。私達はトマト葉を香り化合物に曝露すると膜ポテンシャルの脱分極と細胞質へのカルシウム流入が促進されることを確認した (Zebelo et al., 2012)。埼玉大学の豊田らは GCaMP3 が細胞質カルシウム濃度のリアルタイムインジケータとして極めて有効であることを示している。そこで、私達はトマトの香り化合物受容の初期イベントとしてのカルシウム流入を効率よくモニターする実験系を開発するため、トマトに GCaMP3 を過剰発現させた。現在、得られた組換えトマトで機械傷による GCaMP3 蛍光の増大を確認しており (図)、安定な組換え体の確立後、引き続いて (Z)-3-hexenol などの曝露による細胞内カルシウム動態の詳細な解析を進める予定である。更に香り化合物受容因子同定の端緒としてこの組換え体でカルシウムチャネル遺伝子を順次ゲノム編集し、香り化合物受容によるカルシウム流入に寄与するチャネルの同定を進める予定である。

(引用文献)

- Sugimoto, K., Matsui, K*, Iijima, Y., Akakabe, Y., Muramoto, S., Ozawa, R., Uefune, M., Sasaki, R., Alamgir, K.M., Akitake, S., Nobuke, T., Galis, I., Aoki, K., Shibata, D., Takabayashi, J. (2014) Intake and transformation to a glycoside of (Z)-3-hexenol from infested neighbors reveals a mode of plant odor reception and defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 111, 7144-7149
- Kishimoto, K., Matsui, K*, Ozawa, R., and Takabayashi, J. (2005) Volatile C6-aldehydes and allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 46: 1093-1102.
- Zebelo, SA, Matsui, K., Ozawa, R., and Maffei, ME (2012) Plasma membrane potential depolarization and cytosolic calcium flux are early events involved in tomato (*Solanum lycopersicon*) plant-to-plant communication. *Plant Sci.*, 196, 93-100.

植物-微生物相互作用解析のためのプロモーターレポータートマト株 の作出と整備に向けて

松山 大輝¹、別役 恵理子¹、○別役 重之¹
¹龍谷大学農学部

植物の周辺には様々な微生物が存在する。特に病原性微生物に関しては農作物に甚大な被害を与えて我々人類の「食の安全」を脅かすものも存在することから、それら病原微生物と植物との相互作用様式の研究が進んできた。その結果、植物は二層構造からなる免疫システムにより病原微生物の感染に対抗していることが知られるようになってきた。その一つが、鞭毛などある種の微生物群に広く保存された分子パターンを植物細胞膜受容体が認識して誘導されるパターン誘導免疫 (Pattern-triggered immunity; PTI) であり、病原微生物のみならず、広く微生物全般の感染を抑制する免疫機構であると考えられている。一方、ある種の微生物は感染時にエフェクターと呼ばれるタンパク質などを作用させて PTI を阻害することで病原体化してきたと考えられている。そしてさらに、植物は特定のエフェクター作用を認識する細胞内センサーである NOD-like receptor (NLR) タンパク質を用いて、より強力な免疫応答であるエフェクター誘導免疫 (Effector-triggered immunity; ETI) を発動し、病原体化した微生物の感染に対抗していると考えられている。PTI や ETI といった免疫は、それぞれサリチル酸 (SA) やジャスモン酸 (JA) などの植物ホルモンの複雑な相互作用によって制御されていることも明らかとされてきた。農作物育種において遺伝資源として用いられる、いわゆる (品種特異的) 抵抗性遺伝子も、それらほとんどは異なる NLR タンパク質をコードする遺伝子座であることが知られており、SA や JA の類縁化合物は農薬としても利用されている。このように、植物と微生物の相互作用に関する基礎的知見は、農作物の病害防除における重要な科学的基盤となってきた。

その一方で、農作物育種や、シロイヌナズナなどのモデル植物を用いた基礎研究が遺伝学に強く根ざしたものであったことから、例えば、上記の相互作用に関わる遺伝子が明らかでも、その具体的な機能などは未知のものも多い。特に、感染という現象はまず局所的に起きることからも必ず感染組織と非感染組織が存在するが、植物免疫の空間的な制御機構、すなわち細胞間相互作用に関してはほとんどわかっていない。このような現状を打開し、植物-微生物相互作用の新たな研究の切り口を開拓するため、著者らは防御応答関連遺伝子のプロモーターレポーターシロイヌナズナを作出し、植物免疫の時空

間的制御機構の解析を行ってきた。プロモーターレポーターは古くからある分子生物学の基礎技術ではあるが、蛍光タンパク質をレポーターとすることで、同一組織・個体内での時間的変化も扱うことができるようになってきている。

著者らは、核局在型 YFP を用いて、上述の SA および JA マーカー遺伝子のプロモーターレポーターを作出し、ETI を誘導する *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 株を接種したところ、ETI によって誘導された過敏感細胞死組織を縁取るように SA 活性が、そしてその外周部に JA 活性を示す蛍光が検出された。このことは、ETI において、SA と JA のシグナル系が空間的に異なる部位で活性化して感染部周辺に防御応答の二層構造を形成していることを示している (Betsuyaku et al, 2018 ; 図 1)。現在、より高精細な可視化に向けて、3 連の核局在型 mVenus もしくは mCherry に、それぞれタンパク質分解を促進する PEST 配列を付加した 3VNP および 3CNP レポーターを持つ T-DNA バイナリーベクターを構築し (徳永、別役ら、未発表)、この二層構造の形成機構やその意義の解明、そしてさらに他の興味深い挙動を示す免疫関連遺伝子プロモーター解析に取り組んでいる。

植物-微生物相互作用の分子基盤はモデル植物を用いた研究により明らかとされてきたが、農作物の病害を見れば、特殊化した各論的現象も数多く存在する。そこで著者らのグループでは、上述のプロモーターレポーターを用いた解析系を、果菜類のモデル植物であるトマトに移植し、実際の農作物でのさまざまな植物-微生物相互作用解析に役立てることを想起した。その第一歩として、現在、SA マーカーである *Pathogenesis-Related Gene 1 (PR1)*、JA マーカー遺伝子である *Proteinase Inhibitor 1 (PIN1)* および *Proteinase Inhibitor 2 (PIN2)*、*Lipoxygenase D (LOXD)* (5)、過敏感反応マーカー遺伝子である *Hypersensitivity-Related Gene 203 (HSR203)* の 5 遺伝子に関して、3 VNP ベクターを用いたプロモーターレポーターコンストラクト構築を済ませ、中玉トマトである Moneymaker 品種背景でのこれら防御関連遺伝子プロモーターレポータートマト構築を試みている (図 1)。複数分子種が知られている *PR1* に関しては、SA 特異的であると言われている P4 に焦点を当てている。上述の DC3000 株や、SA・JA などの薬剤処理でプロモーターレポーター植物を評価し、SA や JA、過敏感反応に関わるシグナル経路のマーカー植物として整備

することで、農業現場で問題となっているさまざまな病原体や、近年、注目を集めている根圏有用微生物などの相互作用を組織・個体レベルで理解することに役立つことが期待される。また、各種抵抗性誘導剤のトマトでの作用機作解明など広範な応用利用も可能となると期待される (図 1)。

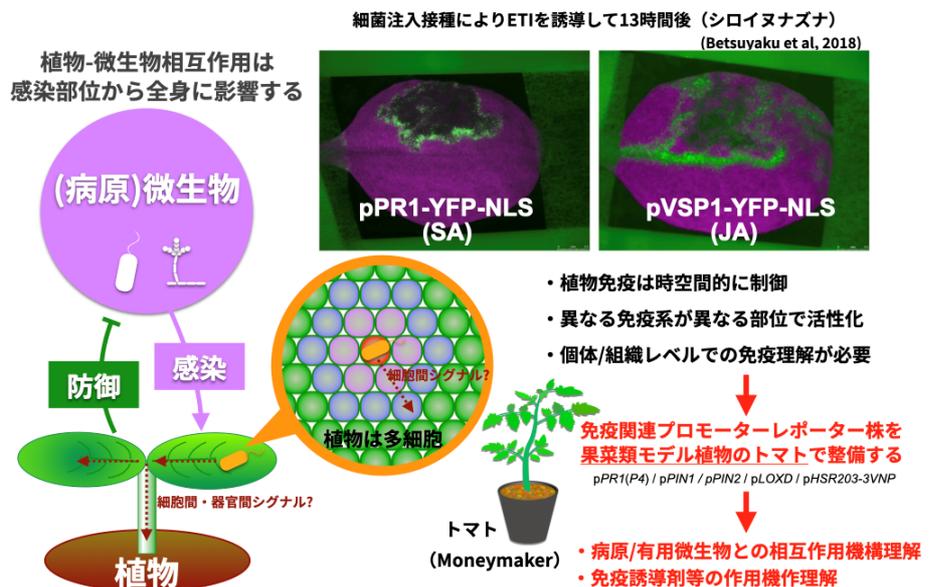


図 1 本研究の目的と概略

成長相転換制御化合物によるジャガイモ収量増大への試み

児嶋長次郎¹、田中 悠亮²、田岡健一郎³、○菊池 彰²

¹横浜国立大学・大学院工学研究院、²筑波大学 生命環境系(T-PRIC)、³神戸大学・科学技術イノベーション研究科

FT タンパク質は、被子植物の栄養成長から生殖成長への切り替え（相転換）を誘導する。これまでに、FT タンパク質ならびに、転写因子を含む FT タンパク質複合体の構造と相互作用が明らかにされてきた。FT タンパク質の機能発揮には複合体形成が必須であることから、複合体形成を阻害できれば、FT 活性を抑制し植物の生殖成長のタイミングを遅らせられるものと期待される。試験管内での FT 複合体構成要素の相互作用強度を定量的にモニターできる実験系を構築し、その系を用いて、化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、FT 複合体形成を抑制できる化合物 S4 を同定した。そして、植物体への投与により、これらの阻害化合物が、ウキクサの花成を抑制することもすでに明らかにしている。近年、FT タンパク質の活性を適度に弱めるようなアミノ酸置換を導入することで作物の収量を増加させられることが、イネやトマトで明らかになってきており、FT 活性の抑制は育種において重要な戦略となってきた。ジャガイモの生産物、塊茎は栄養体組織では有るものの、その形成制御には FT タンパク質複合体が作用しており、日長を感受した葉で FT タンパク質の SP6A が作られ、地下部に移動した後、FT タンパク質複合体が形成されて塊茎形成に至ることが明らかとされている。

本研究では、早生品種のジャガイモに S4 を投与し、塊茎形成時期を遅らせることにより、地上部が繁茂する時間を長くし、栽培期間を長くすることによって収量の増加を目指し、どのように S4 を添加することが効果的かについての検討を行った。既に、培地に S4 を添加することにより塊茎形成が抑制出来ることが明らかとなっており、ジャガイモの FT タンパク質複合体にも S4 が効果を持つことを確認している。

まず、ポット栽培のジャガイモに対して、SP6A が作られる葉への散布による効果を確認したが、塊茎形成の時期に影響を与える結果は得られなかった。次に、ポット栽培のジャガイモに対して、地下部への投与を行ったが、やはり塊茎形成抑制効果は認められなかった。S4 は疎水性化合物であることから、栽培土壌に優先的に吸着され、植物体に充分投与出来ていない可能性が考えられた。そこで、簡易水耕栽培による投与方法の検討を行った。

ジャガイモの水耕栽培を行うにあたり、塊茎形成部位が水没しない様に設定する必要があるため、初期版では S4 を含む水耕液を定期的にスプレーし、乾燥を抑制するためにプラスチックボックス内

に入れて栽培を行った(図1A)。しかし、S4を溶解するために用いるDMSOがボックス内に残り、栽培期間が長くなるにつれ植物にダメージが現れる様になった。そこで、根の部分のみが水耕液に浸かるタイプ(図1B)に変更することで、乾燥と溶媒のダメージを回避する事ができた。

改良型の水耕システムを用いて、早生品種のワセシロを材料に、S4処理区と溶媒のDMSOのみの対象区を設定し、2ないし3日置に水耕液の交換を行い、14週間の栽培試験を実施した。S4の投与は、水耕栽培3週間目から開始した。栽培9週間目で、S4処理区での草丈が対象区に比べ有意に高くなり、その後の植物体の成長が盛んであることが伺える。一方、塊茎形成に関しては、9週間目に対象区で形成が認められ、12週間目からその数が増加したが、14週間目までにS4処理区では形成されなかった。

本試験から、S4の添加により塊茎形成を抑制し、地上部の生育を旺盛にすることが出来、S4の処理を中止することで塊茎形成を誘導出来れば、塊茎の増収に繋げられることが考えられた。ワセシロの塊茎形成が期待した時期より3~4週間程度遅く、S4処理を止める試験を実施できなかった。

今後は、通常の栽培土よりも非多孔性の珪砂を栽培土に使い、投与時のS4吸着を抑制させるため、あらかじめ珪砂をS4溶液に浸すことにより吸着飽和させて試験を実施し、S4の効果を発揮させることが出来る栽培法の検討を行いたい。

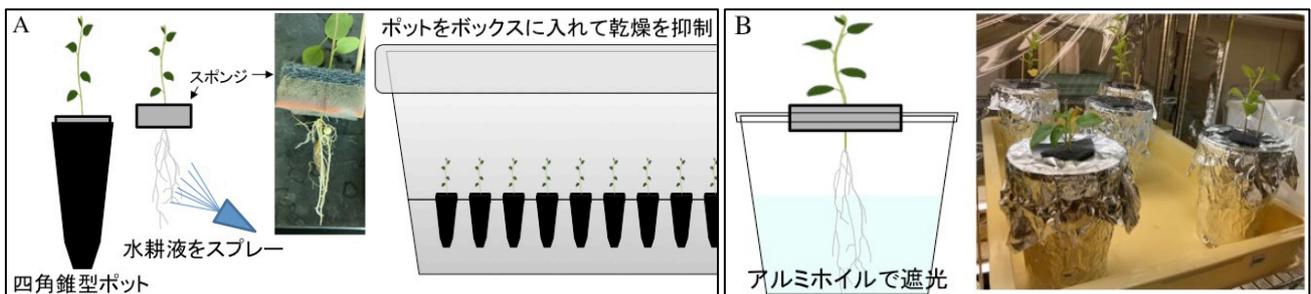


図1 水耕栽培システムの概略図

A)スプレー式の旧型、B)水浸式の改良型

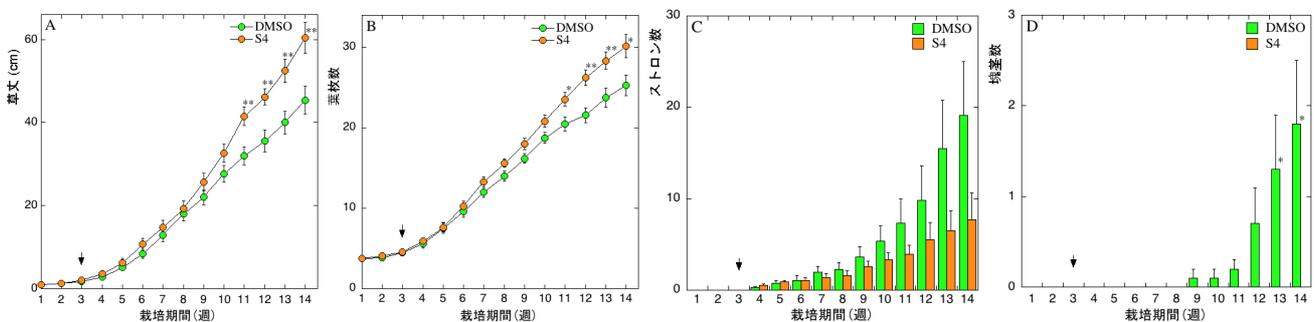


図2 水耕栽培での成長

A)草丈、B)葉枚数、C)ストロン数、D)塊茎数を示すグラフ。矢印はS4の処理開始時期。処理区の有為差検定はT検定を用いた(*: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)。

COP15 における生物多様性とバイオエンジニアリングの今後の課題・展望

○香坂 玲¹、小林 邦彦²、木島 梨沙子¹

¹東京大学農学生命科学研究科、²一般社団法人海外環境協力センター

昨年末、生物多様性条約第15回締約国会議（COP15）第二部が開催され、2010年に合意に至った2020年を目標年とする「愛知目標」の後継となる2030年までの新たな生物多様性に関する世界目標「昆明・モントリオール生物多様性枠組」が採択された。定められたターゲットは、陸と海のそれぞれ30%以上を2030年までに健全に保全する目標「30 by 30」（サーティバイサーティ）、環境に流出する過剰な栄養素や農薬及び有害性の高い化学物質等による汚染のリスクの削減、農業・養殖業・漁業・林業地域の持続的な管理の向上、産業界の情報開示の促進など23項目である。加えて同枠組では、汚染リスクなどによる生物多様性への直接的な脅威に関連するターゲットのほか、生物多様性に有害なインセンティブ（補助金等）の削減と、有益なインセンティブの拡大が盛り込まれた。2022年のCOP15を振り返り、2030年に向けて生物多様性の発信はどうかを考えていく。

先ず全ての締約国（パチカン市国と米国を除く）のコミット、とくに経済水準も文化も違う国々が合意できたという一定の評価ができる。他にも劣化した自然地域の30%の再生、外来種定着の半減がある。産業界では、ビジネス、主流化に関する目標としてビジネスにおける影響評価・情報公開の促進、自然が持つ調整力を防災・減災等に活用することなども盛り込まれた。エリアや中身においても、保護地域外の空間保全、あるいは種や生態系に加えた遺伝的多様性、海洋、土壌、都市、民間参画、人間の健康といった諸要素も反映された。更に愛知目標からの反省もあり、今後の進捗を見ていく仕組み（レビューメカニズム）として、2年後の締約国会議のCOP16までに国家戦略を改訂し、その後のCOP17での進捗レビューの実施を含む実施状況の評価枠組を決定した。進捗を測る指標については、COP16までに専門家会合で更なる議論を予定している。

個々の分野に目を向けると、遺伝資源に関する塩基配列情報（DSI：Digital Sequence Information on genetic resources）については、これまでの生物多様性条約においては、遺伝資源や遺伝資源に関連する伝統的知識を対象に、利益配分をすることを定めていた。しかし、今回の決議では、DSIの利用から得られる利益を配分すべき（should）ということに合意した。またGBF（Global Biodiversity Framework）

の一部として、グローバルファンドを含む、DSI の利用から生じる利益配分のための多数国間メカニズムを確立することを決定した。さらに多数国間メカニズムを発展、運用するための公正で、透明で、参加型で、期限付きのプロセスを確立し、第 16 回締約国会議において最終決定することを決定し、そのためのオープン・エンド作業部会（OEWG：Open-ended Working Group）を設立した。

DSI とのオーバーラップについても議論された合成生物学分野においては、ホライズンスキニング(将来展望の分析・解釈)、リスクアセスメント、モニタリングをアドホック技術専門家会合(AHTEG)のもとに継続すること、生物多様性保全に対する合成生物学の潜在的なポジティブとネガティブな影響を科学技術補助機関会合においてレビューすることが決定した。

また今回 COP15 の部会や参加団体の対話では、遺伝子ドライブがバイオテクノロジーと生物多様性保全の相互における重要な話題の一つとして扱われた。とくに遺伝子ドライブのすべての種や自然環境に広がる可能性があり、エコシステムを永久的に変える結果をもたらすことへの懸念が示された。

総括としてバイオテクノロジーの発展と利用（実装）については規制緩和を求める国と規制強化や予防的アプローチを求める国とで対立し、部会でも数多の不一致があった。多くの議論がされたもの各国が独自の関心事に重点を置きコンセンサスが得られず、最終的にはバイオセーフティ（措置）という一般的な単語を使用することで合意した。その一方でターゲット 17 として条約の共通枠組みに採択されたことは特筆すべきである（ただし利益に関する記載にとどまり潜在的リスクに関する記載はない）。

2022 年の COP は評価としては、成功した部分、課題となった部分の双方があるが、2030 年の目標年まで残り 7 年となったなかで、対策に向けた活動が走り出せる意義は大きい。特に数値目標のなかでも目玉、柱となるものが合意に至ったことから、その点では多くの報道にあるように「成功」ともいえる。なかでも 2030 年までに陸と海の 30%以上を健全な生態系として効果的に保全しようとする 30by30 は、柱となるもので、早くも国際的なキーワードとなる。その達成に向けては、国や公的な機関が指定するエリアだけでは達成が難しく、地域住民（国によっては先住民）の協力、民間の参画が不可欠であることが必要となる国が多いからだ。目下、民間等の取組により保全が図られている地域や保全を主目的とする保護地域以外で生物多様性保全に資する地域（OECM：Other Effective area-based Conservation Measures）に注目が集まっている。

国内においても、生物多様性国家戦略と、農林漁業の分野に関わるみどりの食料システム戦略の深化も期待される。生物多様性は不確実性の高い領域であり、科学的な堅固さと分かりやすさのバランスでも試行錯誤をしながら着地点を探る必要があるだろう。

栄養シグナルによるトマト果実形成とソース-シンク機能制御機構の解明

眞木 美帆¹、久保 晃生²、高木 純平¹、○佐藤 長緒¹

¹北海道大学大学院理学研究院、²北海道大学大学院生命科学院

植物の成長や代謝は、細胞内で利用可能な様々な栄養素の状態により影響を受ける。特に、窒素は、植物にとって最も必要量の多い栄養素であり、植物の生育に大きな影響を与える。窒素は、基幹代謝を支えるだけでなく、細胞内シグナル伝達系を介して、多様な遺伝子の発現にも作用することが知られている。これまで主に短期的な栄養欠乏に応じた代謝最適化に関する研究が盛んに行われてきた。その一方で、より長期的な栄養欠乏により誘導される花成やソース-シンク機能転換といった、植物個体レベルのダイナミックな成長様式の変化を誘導するシグナル伝達機構についてはあまり分かっていない。最近、当研究室におけるシロイヌナズナを用いた研究から、窒素欠乏に応じた花成誘導に関わる鍵因子として転写因子 FBH4 および上流キナーゼ SnRK1 を同定し、長年謎であった窒素欠乏による花成早期化の分子機構の一端を明らかにした (Sanagi et al., 2021, PNAS)。FBH4 は、窒素欠乏下でリン酸化状態が変動し、花成ホルモン (フロリゲン) 合成を促進することで、花成早期化を誘導することが分かっている (図 1)。さらに、この研究過程で、SnRK1 および FBH4 は窒素欠乏に応じた植物個体内での栄養リサイクル (オートファジーや代謝酵素等) や栄養分配 (硝酸糖輸送体等) に関わる遺伝子発現制御にも関与することを見出した。よって、SnRK1-FBH4 モジュールは、窒素欠乏に応答した花成に加えて、それに伴い誘導されるソース-シンク機能制御にも関与することが示唆された。

本研究課題では、こうしたシロイヌナズナで得られた知見を基に、主要作物種のモデル植物であり、果実形成に伴うソース-シンク機能制御の重要性が高いトマト (マイクロトム) での研究に取り組むことで、未解明な点が多い、栄養シグナルによる果実形成とソース-シンク機能制御機構の解明に挑んでいる。さらに、こうした研究を通して、過剰窒素肥料投与によるトマトの花成遅延 (過繁茂) 機構を明らかにすることで、窒素十分条件下でより効率的に果実形成を行うことが可能なトマト株の作出に貢献することを目指している。

これまでに、マイクロトムを用いた窒素欠乏応答性花成の解析を行っている。また、マイクロトムにおける SnRK1 および FBH4 相同遺伝子の単離および機能改変株の作出に取り組んでいる。加えて、これまで謎の多かった *in vivo* での SnRK1 活性変動解析を可能とする新規レポーター (ACC レポーター) (図 2) を発現するマイクロトムの作出に取り組んでおり、各生育ステージや栄養条件における

SnRK1 活性変動とソース-シンク機能制御の関係性についても解析を計画している。本発表では、こうした本研究の背景および進捗について報告する。

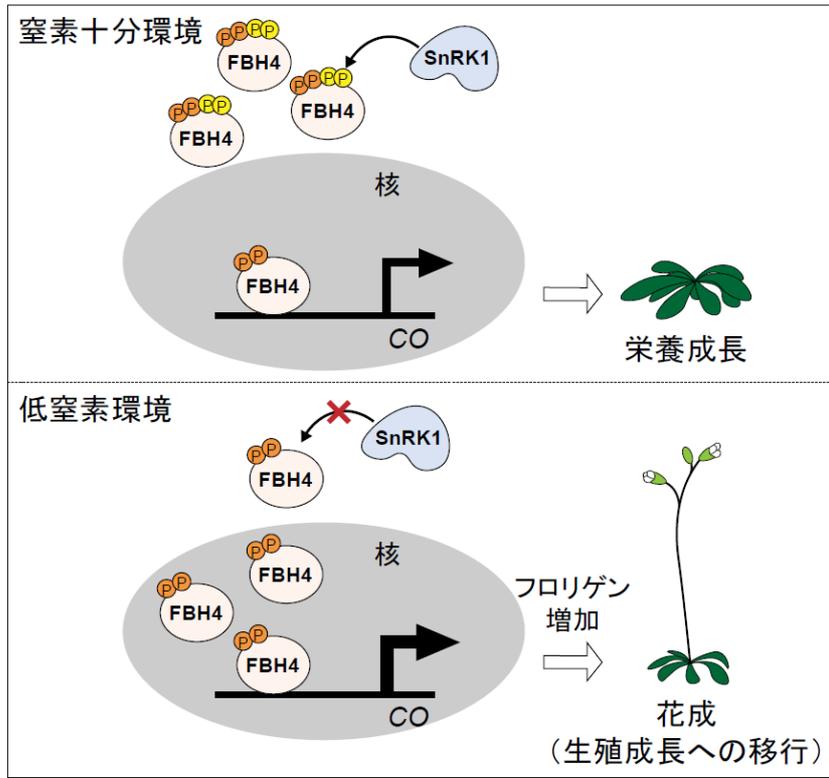


図 1. SnRK1-FBH4 による窒素応答性花成制御モデル

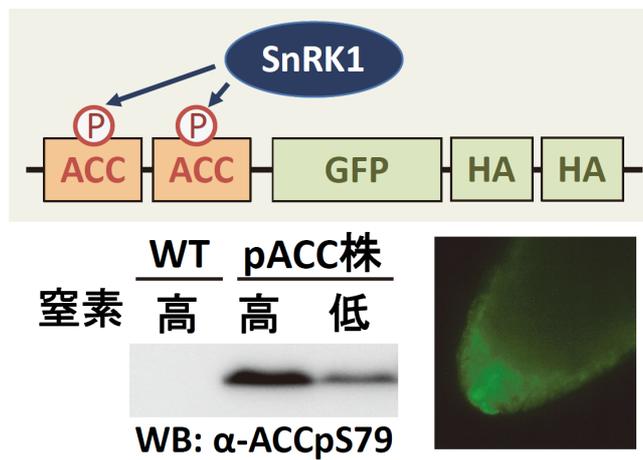


図 2. ACC レポーターによる SnRK1 活性評価

ミヤコグサ *GF14* 遺伝子の開花時期決定への寄与と進化

○若林 智美¹、西田 帆那²、佐藤 修正³、和久 渉³、藤井 清矢¹、池田 啓⁴、武田 征士⁵、
加藤 晃¹、寿崎 拓哉⁶

¹奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス領域、²農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用
研究部門、³東北大学大学院生命科学研究科、⁴岡山大学資源植物科学研究所、⁵京都府立大学大学院生
命環境科学研究科、⁶筑波大学生命環境系

植物にとって開花時期は次代の質や量に影響する重要なタイミングであり、環境適応とも密接に関連する。マメ科のミヤコグサは日本列島に広く連続的に分布しており、種内に開花時期の多型を維持している。また、本種はモデル植物として広く研究に用いられている種の一つで、全ゲノム配列が解読されていることや、国内から採取され系統化された野生系統と、そのゲノム網羅的な塩基多型データを利用することができる。これらの野生系統を同一条件下で栽培すると、採取地の緯度に沿った開花時期の違いが観察される。これまでの研究で、本種の野生系統についての開花時期多型データと塩基多型データを用いた全ゲノム関連解析により、開花時期の違いに関連する候補遺伝子として、イネなどで開花時期決定に関与することが知られる *GF14* の相同遺伝子を検出した。本研究では、*LjGF14* の本種の開花時期決定への寄与と、本種の野生集団における適応進化への貢献について明らかにすることを目的とした。この目的のために、まず、ゲノム編集技術を用いて作出した knockout 系統の開花時期を WT との比較により実験的に評価し、さらに、RNA-seq 解析によりゲノム網羅的な遺伝子発現変動を解析した。また、分子進化学的解析と系統解析により *LjGF14* 領域にかかる自然選択の影響を評価した。

gf14 knockout 系統の作出では、実験系統 MG20 (野生型) をもとに、1塩基を挿入したフレームシフトによる当該遺伝子の knockout 系統の作出に成功した。この knockout 系統と野生型系統を長日条件、短日条件の2つの条件下で栽培し、開花所要日数を比較したところ、両条件下で knockout 系統の開花遅延が確認された (図1)。但し、イネとは異なり、その差は数日程度で、大きな影響を与える遺伝要因ではないことが明らかになった。次に、*gf14* knockout 系統と、野生型系統のゲノム網羅的遺伝子発現量の比較解析により、本種における当該遺伝子の機能を推定することを試みた。有意に発現差のあった 846 遺伝子が検出され、これらの遺伝子について Gene Ontology 解析を行なったところ、花発生に関わる遺伝子群などの濃縮が確認された。

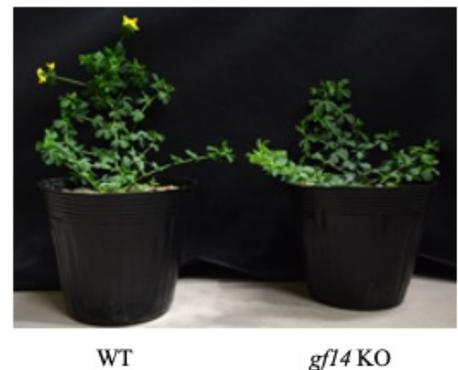


図1. 開花所要日数計測の様子を示す。

さらに、種内に維持される遺伝的多型に基づいて、Lj*GF14* 遺伝子領域にかかった過去の自然選択の影響を評価した。この評価のために、ゲノム網羅的に収集された塩基多型情報を用いて、ゲノム全体を 1,000 bp に区切って Tajima's *D* をそれぞれに算出したところ、当該領域においては他のゲノム上の領域と比較して Tajima's *D* の値が極めて高かった。より詳しく自然選択の影響を評価するため、Lj*GF14* 遺伝子領域を対象に、100 bp ごとに算出した Tajima's *D* では、いくつかの非コード領域で高い値が示された。これに加え、Lj*GF14* 遺伝子のハプロタイプは、種内におおよそ 2 通り存在し、国内に地理的な偏りなく分布することが明らかになった。これらの結果から、Lj*GF14* 遺伝子の特に非コード領域は、多型を積極的に維持する平衡選択の影響を強く受けた可能性が示唆された。その一方で、Lj*GF14* 遺伝子の CDS 領域には塩基置換が少なく、確認された塩基置換は全て同義的置換であった。そこで、Lj*GF14* の CDS 領域の配列保存性を評価するため、近縁種である *Lotus burttii* を比較対象として加えて、Lj*GF14* の CDS 領域と、ゲノム網羅的な 571 の single copy 遺伝子の CDS 配列のそれぞれに基づく系統解析を行った。ゲノム網羅的な配列に基づく系統関係では、ミヤコグサの野生系統のみで有意に支持されるクレードを形成し、*L. burttii* とは明確に分けられたが、Lj*GF14* CDS 領域に基づく系統関係では、ミヤコグサの野生系統のみで明確にクレードは形成されず、*L. burttii* を含むクレードが形成された (図 2)。このことから、Lj*GF14* においては、CDS 領域が浄化選択の影響を受けたことが示唆された。

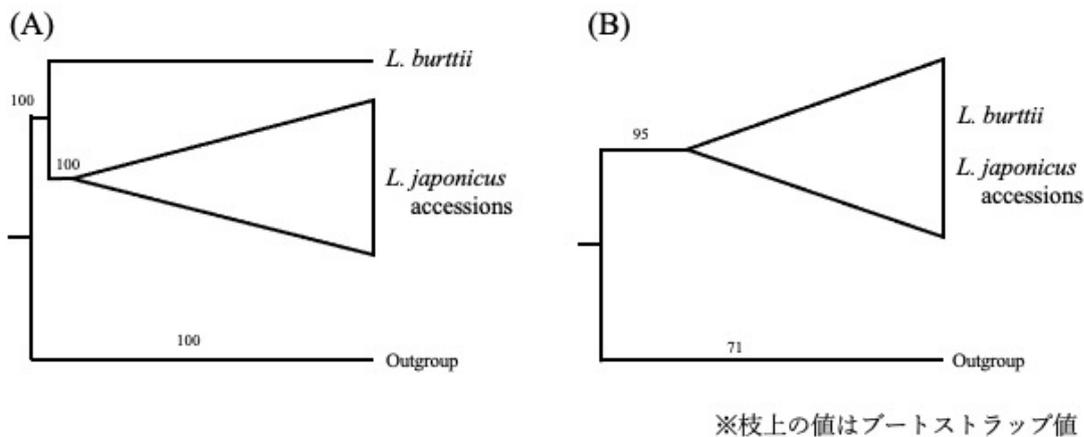


図 2. 系統解析結果の略図を示す。(A)は571のCDS領域に基づく系統関係、
 (B)はLj*GF14*のCDS領域に基づく系統関係をそれぞれ示す。

これらの結果を総合すると、Lj*GF14* 遺伝子はミヤコグサにおいても開花時期決定に関連する遺伝子の 1 つであり、野生集団においては、開花時期の微妙な違いを制御する因子として平衡選択の影響を受けて、種内もしくは集団内に多型を維持することで、本種の環境適応に貢献したと考えられる。

持続的な資源利用に向けた利益配分と最新技術に関する社会調査結果の考察

○内山 愉太¹、香坂 玲²、小林 邦彦³、渡邊 和男⁴

¹神戸大学大学院人間発達環境学研究科、²東京大学大学院農学生命科学研究科、

³一般社団法人海外環境協力センター⁴筑波大学大学院生命環境系

資源利用をめぐる利益配分の制度、実践を展開していくことは、資源の保全と持続的な利用に貢献し得る。他方で、資源の所有の概念については、既存の法等において設定されている排他的な所有権の持続的な資源管理における弊害や限界が指摘されるなど、これまでの延長で資源の管理、ガバナンスを構想することが難しい状況も把握されている。そのような状況においても、概念的、制度的な議論にとどまらず、各地で利益配分の実践が進められ、実用的なスキームの発展が行われている。

本研究では、そのような状況において非専門家を主な対象として、遺伝資源の利用における利益配分に関する制度のあり方や、関連する最新技術としての遺伝子操作技術に対する認識について調査を行った結果を報告する。名古屋議定書の内容や利益配分の実践、遺伝子操作技術の情報については、非専門家は十分な知識を持ち合わせている訳ではないが、いずれも今後の生物多様性保全や実生活において多大な影響が予想されるトピックである。そのため、完全に専門家に意思決定を任せる形は社会としてリスクが大きく、多様な主体を巻き込んだ意思決定プロセスが必要とされている。そのため求められるのが知識の普及や科学コミュニケーションであるが、知識の普及を画一的に進めることや、コミュニケーションの対象の特徴を理解せずに情報を一方的に発信することは効果的でない。そこで本研究における調査では、調査対象の基本属性に加えて、自然とのつながりや海外のうち特に途上国への渡航経験等の属性を合わせて調査分析を行い、属性によって異なる認識や傾向を把握することを試みた。本調査結果は、今後の知識普及やコミュニケーションのプロセスにおいて、対象によって異なるより効果的なアプローチを模索する際に有用な基礎的知見となる。今回の調査は初期的な調査であり、属性毎に回答傾向が異なっている、その属性に強い影響を与える別の変数が存在するといった可能性にも注意する必要があるが、遺伝資源の利用における利益配分や遺伝子操作技術等に係る意思決定を社会が行う際に、準備段階において効果的に知識を共有していくことや、コミュニケーションを活性化するための方法論としても有用であると考えられる。以下では具体的な調査結果について一部の報告を行う。

本研究では、大都市圏の住民を対象として東京都、神奈川県、大阪府、兵庫県を対象に、地域の年齢性別構成比を基に各年齢、性別における目標サンプル数を設定してオンライン調査を行った。結果、886件の回答を取得し、世帯収入について解答のあった701件の回答を対象に分析を行った。以下の図1、2では、それぞれ二指標の組み合わせで相関関係を分析した結果を示している。図中に示すKruskal-Wallis検定の結果及び線形的な回帰分析による相関係数もそれぞれ、1%水準で有意であった。図1では、自然とのつながり指標としてNisbet and Zelenski (2013)のNR-6を用いた。自然とのつながりが主観的に高い傾向の人は利益配分のあり方について意見が分かれるものの、意見が比較的明確で、国際的に義務化すべきと回答した回答者の自然とのつながり指標の値は特に高かった。義務化する内容の詳細については本調査では触れなかったが、国際的な取り組みの必要性について認識している回答者は上記の指標値が高い傾向が把握された。また、年齢に関して、遺伝子操作技術に関する情報の入手のしやすさについては、高齢者ほど情報アクセスに困難さを抱える傾向がみられた。以上の結果は、世帯年収をコントロールしても有意な結果が得られており、環境や社会側面の属性に応じた知識の普及やコミュニケーションが必要であることを示唆している。なお、調査対象者の属性による類型化や、統計モデルによる分析は今後の課題として順次行う計画である。

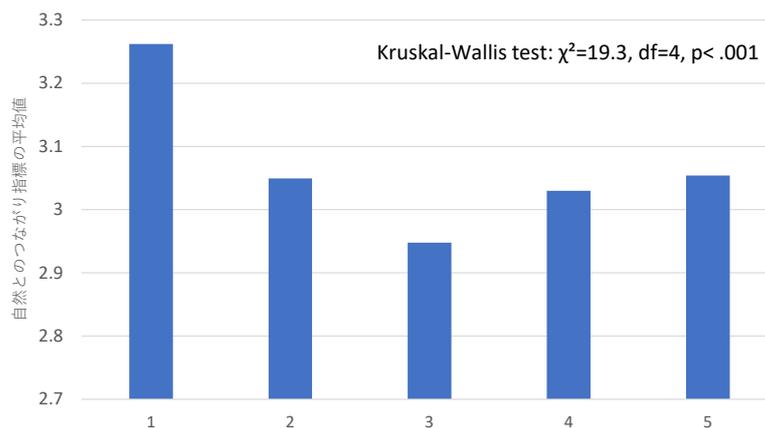


図1 利益配分に対する認識と自然とのつながり指標の関係性

1：国際的に義務化すべき、2：どちらかといえば国際的に義務化すべき、3：どちらともいえない、4：どちらかといえば資源の利用者・提供者の当事者間の裁量に任せるべき、5：資源の利用者・提供者の当事者間の裁量に任せるべき

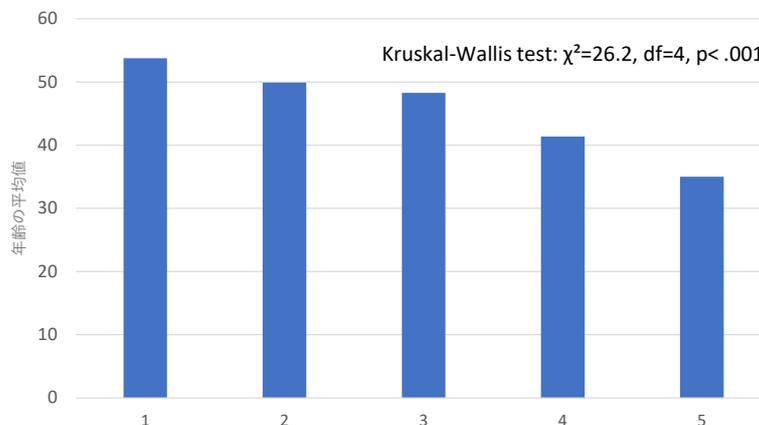


図2 遺伝子操作技術に関する情報の入手のしやすさと年齢の関係性

1：入手しにくい、2：やや入手しにくい、3：どちらともいえない、4：やや入手しやすい、5：入手しやすい

活性カルボニル種消去ペプチドを合成する植物の作成

○真野 純一¹、磯合 勇斗²、野中 聡子³、松倉 千昭³

¹山口大学大学研究推進機構、²山口大学大学院創成科学研究科、³筑波大学 T-PIRC

植物への環境ストレス（乾燥、土壌塩分など）は、細胞内での活性酸素種（ROS）レベル上昇を引き起こす。ROS は防御遺伝子の発現誘導シグナルとなるが、そのレベルが高すぎると植物に障害をもたらす。ROS による細胞障害の作用因子のひとつが、過酸化脂質から生成する活性カルボニル種（RCS）である。RCS とは、過酸化脂質の分解により生じる α, β -不飽和アルデヒドまたはケトンをいう。代表的な RCS としてアクロレイン、4-ヒドロキシノネナール（HNE）などがある。RCS はタンパク質に求電子的に結合するため、細胞に障害をもたらす。RCS を消去するアルドケトレダクターゼ、2-アルケナールレダクターゼを過剰発現させた植物は塩ストレス耐性や紫外線ストレス耐性が向上しており、RCS が植物のストレス障害の要因であることが示されている。

動物では RCS を消去する低分子としてヒスチジンを含むジペプチドが知られている。これらは筋肉や脳に数 mM レベル存在し、カルノシンは β -Ala と His から、ホモカルノシンは γ -アミノ酪酸（GABA）と His から成るジペプチドである（図 1）。我々は、シロイヌナズナにこれらの RCS 消去ペプチドを与えることによって、塩ストレスがもたらす発芽遅延や成長阻害を抑制できることを最近発見した（図 2）。すなわち、植物の塩ストレスでは RCS が増大しこれが細胞に障害をもたらしているのである（Sultana et al. 2022）。我々は、RCS 消去ペプチドを植物に合成させればストレス耐性を高めることができると考え、これらの RCS 消去ペプチドを合成する植物の作成を共同研究課題として提案した。

含 His ジペプチド合成を触媒するカルノシンシンターゼ（CS；図 1）は植物には存在しないが、基質である β -Ala、His、GABA は植物細胞にも含まれている。そこで、ニワトリの CS 遺伝子（*CS1*）の植物への導入・発現を試みた。ニワトリ *CS1* の cDNA 配列から、シロイヌナズナのコードン利用頻度に最適化した人工遺伝子 cDNA を作成し、オワンクラゲ緑色蛍光タンパク（GFP）との融合タンパクとして CaMV 35S プロモータで発現させるプラスミドを作成し、アグロバクテリウム法によりシロイヌナズナ Col-0 株に遺伝子導入した。

CS1-GFP タンパクを発現する組換え体として、3つの独立した T1 種子からホモ接合体を確立した。GFP 蛍光から発現タンパクは細胞質に局在することがわかった。組換え植物の抽出液には、Col-0 では検出できなかったカルノシンが含まれており、存在量は 0.015~0.059 nmol/g FW であった。すなわち、発現させたニワトリ *CS1* タンパクは植物組織中の β -Ala と His からのカルノシン合成反応を触媒した。一方、GABA と His から同じ酵素反応で合成されるホモカルノシンは全く検出されなかった。ニワ

トリ CS1 は GABA に対する K_M 値が β -Ala に対する値より一桁大きい。シロイヌナズナ細胞質の GABA 濃度が十分高くなかったためにホモカルノシンは合成されなかったと考えられる。

植物体内で合成させたカルノシンはストレス耐性に寄与するだろうか？ MS 寒天培地上での発芽試験では、野生株は NaCl 100 mM 添加によって発芽が 12 時間遅延したが、もっともカルノシン含量が高かった組換え系統 CS1-sGFP#1 では発芽遅延は認められなかった (図 3)。これは、植物体内でカルノシンを合成させることで塩ストレス耐性を強化できることを示している。

今後は、成長阻害など多面的なストレス評価を行い、CS1 過剰発現による塩ストレス耐性向上を確立する。また、野生株と CS1 過剰発現株とで RCS レベルやタンパク質のカルボニル化レベルを比較し、RCS 除去能の増強がストレス耐性に寄与したことを検証する必要がある。さらに、植物でのカルノシン生成が高塩分以外の環境ストレスに対しても耐性向上効果をもつか、評価する。また、GABA 高蓄積トマトに *CS1* を導入し、ホモカルノシンを大量蓄積する植物を作成したいと考えている。

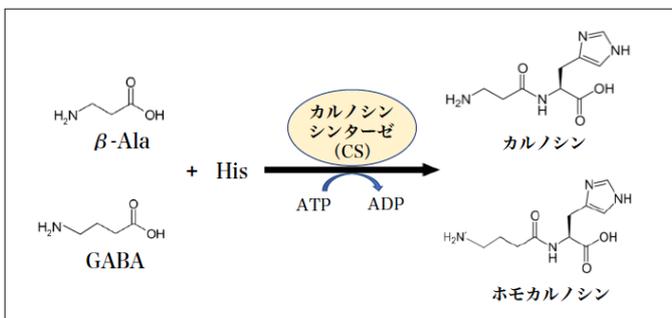


図 1 カルノシンとホモカルノシンの構造および動物での生合成経路

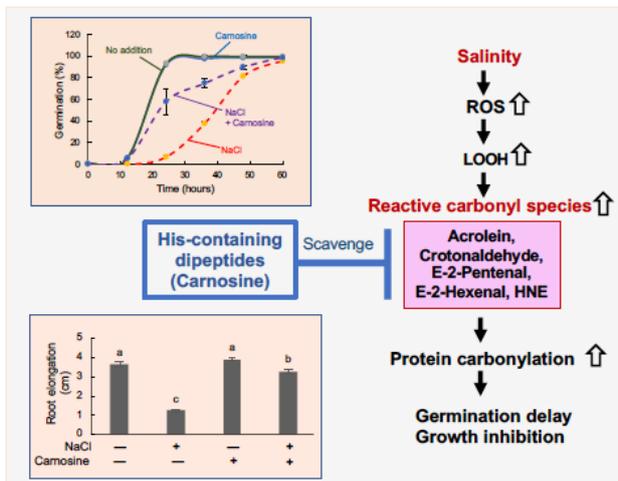


図 2 NaCl (100 mM)によりシロイヌナズナは発芽遅延、根の伸長阻害を被るが、カルノシン (5 mM)を加えておくと、塩ストレス障害が低減する。(Sultana et al. (2022) *J. Agric. Food Chem.* 70: 11169–11178)

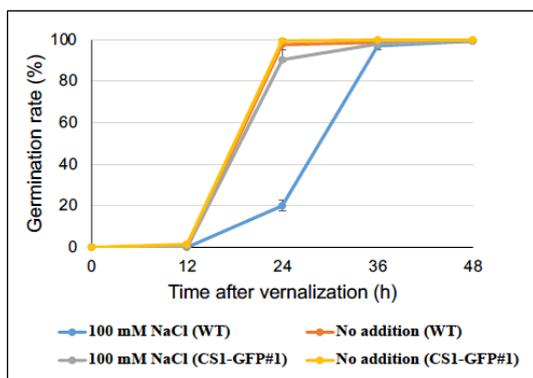
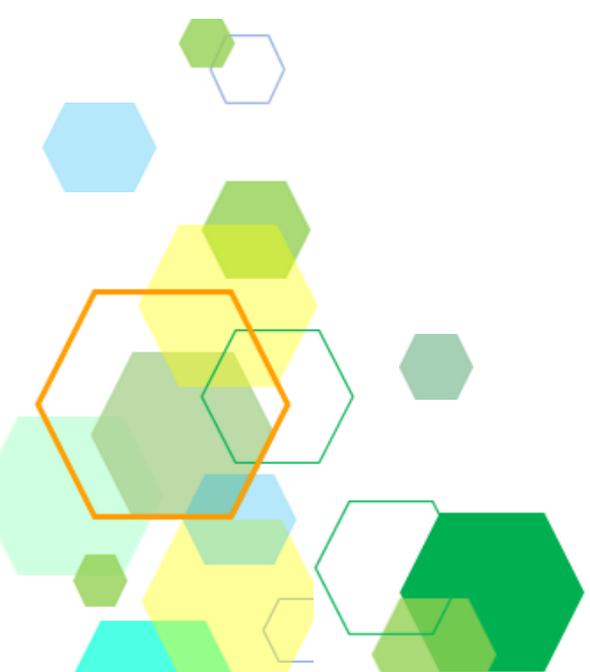


図 3 野生株 (WT) に 100 mM NaCl を与えると発芽が遅延する (—●—) が、CS1-sGFP#1 株では発芽遅延は認められない (—●—)。



●2017-2023 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



●2010-2023 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>