

形質転換植物デザイン研究拠点

令和5年度

成果報告会

日時：令和6年3月5日(火)～3月6日(水)

場所：筑波大学総合研究A棟 110室(公開講義室)

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

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5年度 成果報告会

会期：令和6年3月5日・3月6日

会場：筑波大学総合研究A棟110室（公開講義室）

1日目【3月5日】13:30~17:40

13:30-13:40 開会あいさつ 福田 直也 (T-PIRCセンター長)

セッション1 座長 江面 浩

13:40-14:00

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 農学部】

14:00-14:20

トウガラシの多心室果実変異体*maf-2*の解析
田中義行【京都大学 農学研究科】

14:20-14:40

イネもみ枯細菌病抵抗性遺伝子*RBGI*の塩基配列情報を活用したトマト青枯病抵抗性遺伝子の探索と検証
溝淵律子【農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究部門】

14:40-14:50 休憩

セッション2 座長 菊池 彰

14:50-15:10

イネが生産するジテルペン型ファイトアレキシンがもたらすチョウ目害虫抵抗性の解析
神田 恭和【農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門】

15:10-15:30

ヒト*UGT1*遺伝子の過剰発現がポプラ木部特性に与える影響
大谷 美沙都【東京大学 大学院 新領域創成科学研究科】

15:30-15:50

代謝改変によりL-DOPAを生産する植物の生理学的解析
朝比奈 雅志【帝京大学 理工学部 バイオサイエンス学科】

15:50-16:00 休憩

セッション3 座長 柴 博史

16:00-16:20

根粒共生遺伝子のイメージングを用いた窒素栄養による根粒形成及び窒素固定抑制機構の解析
西田 帆那【農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門】

16:20-16:40

非典型BZR転写因子の分子機能の植物種間比較解析
古谷 朋之【立命館大学 生命科学部】

16:40-17:00

病原菌応答におけるトマトSYLKタンパク質
(SYNTAXIN 6-LIKE PROTEIN IN VASCULAR PLANT)の機能解明
植村 知博【お茶の水女子大学 基幹研究院】

17:00-17:20

植物近傍の温度変化がイチゴ果実への光合成産物の転流動態に及ぼす影響
三好 悠太【量子科学技術研究開発機構 高崎量子応用研究所】

17:20-17:40

ベトナム遺伝資源の利用(遺伝資源の取得と管理についての研究)
深見 克哉【九州大学 有体物管理センター】

2日目【3月6日】10:00~10:50

セッション4 座長 渡邊 和男

10:00-10:20

タマネギの鱗茎肥大メカニズム解明に向けた形質転換系の確立

池田 裕樹【宇都宮大学 農学部附属農場】

10:20-10:40

植物病抵抗性遺伝子を有するジャガイモ野生種を利用したMESO培地作用メカニズムの
解明および物質の同定

牧 慎也【長岡技術科学大学 大学院】

10:40-10:50 閉会のあいさつ 柴 博史【T-PIRC副センター長】

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²、江面 浩³、別役 重之²

¹龍谷大学大学院農学研究科、²龍谷大学農学部、³筑波大学生命環境系

植物-微生物相互作用を司る分子機構を正しく理解することは、我々人類の「食の安全」を脅かす植物病害の防除に貢献するだけでなく、近年、注目されている根圏有用微生物の農業への有効利用を図る上でも非常に重要である。これまで、主に病原微生物とモデル植物との相互作用メカニズムに着目した数多くの研究が行われ、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、鞭毛など特定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、現在では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重要な免疫システムであると考えられている。そのような植物の免疫機構を逃れるために、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 を阻害し、植物の生理機能を改変することで病原体として感染できるようになってきたと考えられている。このように「病原体化」した微生物の感染に対しては、植物は細胞内の NOD-like receptor (NLR) タンパク質を特定のエフェクター作用を検知するセンサーとして用いて、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) を発動することで、「病原体化」した微生物から身を守ることができるようになったと考えられている。農作物育種でも頻繁に用いられる抵抗性遺伝子も、それらの多くは異なる 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いる。また、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作用を介して制御されていることも明らかとされてきたが、SA や JA 経路を刺激する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。

しかし、これら研究成果の多くが遺伝学に強く根ざしたものであったため、NLR タンパク質の作用機作やシグナル分子としての SA や JA の作用など、まだまだブラックボックスとなっていることも多く、植物-微生物相互作用メカニズムのさらなる詳細な理解に向けた数多くの研究が行われているのが現状である。我々のグループでは、一つの新たな試みとして植物の免疫や微生物の病原性の時空間的な制御機構に着目した研究を展開している。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、それら細胞間での植物免疫の空間的な制御機構、すなわち細胞間相互作用

用に関してはほとんどわかっていない。単細胞の病原細菌も、感染時には多個体が集まった集合体として感染するが、すべての細菌細胞が同様の機能を発揮しているかどうかは未解明である。このような現状を打開し、植物-微生物相互作用研究の新たな切り口を開拓するため、著者らはイメージング技術に着目した。核局在型 YFP を用いた防御応答関連遺伝子プロモーターレポーターシロイヌナズナを作成し、植物免疫の時空間的制御機構の解析を行った結果、シロイヌナズナの細菌に対する 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することを見出し、現在、その空間的制御を司る分子機構の解明を目指している (Betsuyaku et al, 2018 ; 図 1)。

このような植物免疫応答の「見える化」は、基礎研究はもとより、圃場で問題となっている病原体の感染戦略やその感染に対抗する植物防御応答の理解、さらには各種抵抗性誘導剤の開発など、実際の農作物の病害防除の現場でこそ役立つ可能性がある。そこで、果菜類のモデル植物であるトマトに着目し、新たに構築した 3VNP (3 連の核局在型 mVenus に、タンパク質分解を促進する PEST 配列を付加したもの) レポーターを持つ T-DNA バイナリーベクターを用いて、SA や JA などの防御応答マーカー遺伝子のプロモーターレポータートマト構築を進めている。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)*、過敏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、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)。形質転換手法が確立している MicroTom とは異なる背景であるため、標準プロトコールをもとにさまざまな条件検討を行いつつ、ようやく形質転換体とみられる株が得られ始めている。また、上記 5 遺伝子の中で、特に第 9 染色体上の *PR1* 遺

伝子座に関しては、トマト系統間で大きな多型が存在することなども見えてきた。本講演では、プロモーターレポータートマト株構築の進捗に加え、上述の *PR1* 遺伝子座の多型情報や、マーカーとして選択した 5 遺伝子の SA や JA 処理時の発現解析によるマーカーとしての妥当性の検討結果などに関して紹介したい。

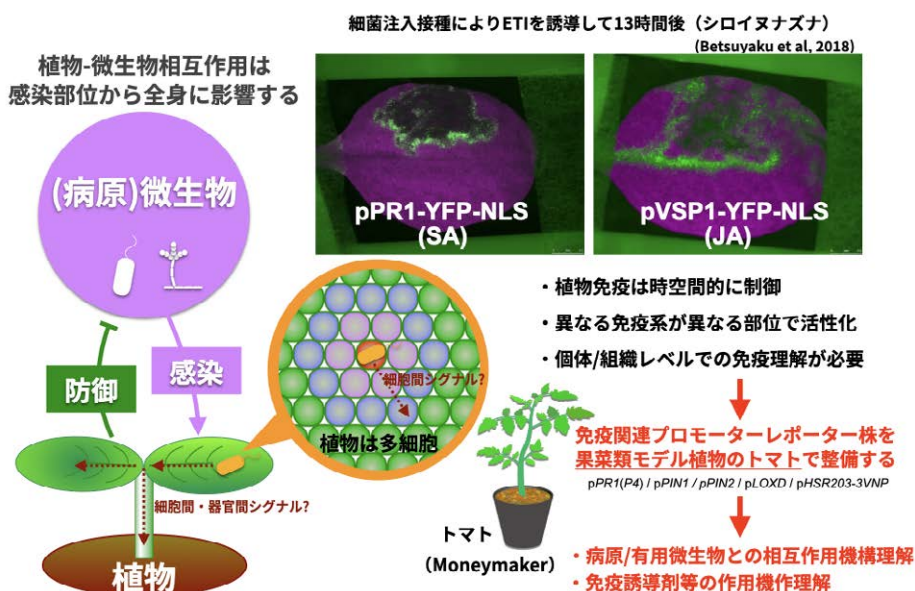


図 1 本研究の目的と概略

トウガラシの多心室果実変異体 *maf-2* の解析

Xu Yunmin^{1,2}、横田 瑞季¹、杉山 立志³、大野 翔¹、田中 義行¹

¹京都大学農学研究科、²浙江農林大学、³東京農業大学農学部

【目的】 トウガラシは、ナス科カプシカム属の植物であり、その果実は香辛料や野菜として世界中で消費されている。様々な果実サイズのトウガラシ系統が存在するが、その果実形態を決めるメカニズムは明らかになっていない。我々は、観賞用トウガラシ‘夢まつり’の EMS 変異集団から、果実形態の変異体を単離し、*malformed fruit-2* (*maf-2*) と名付けた。本研究では、*maf-2* 変異体の特徴づけと原因候補遺伝子の同定、*maf-2* 変異体の果実多心室化のメカニズムの解明を目的とした。

【材料および方法】

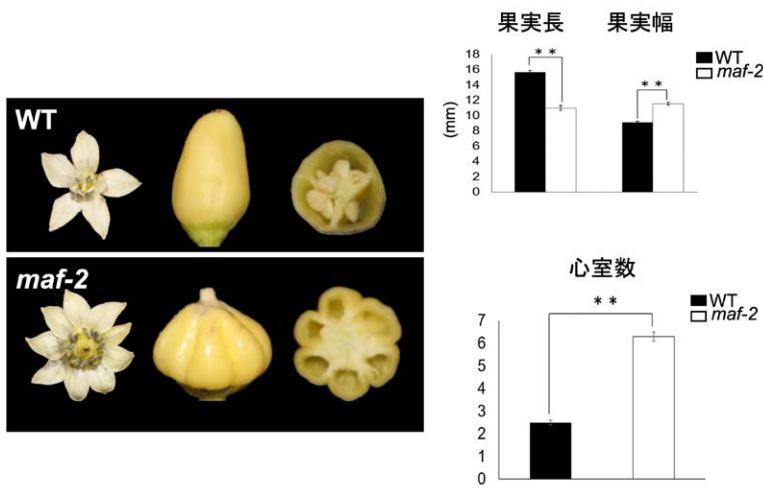
<実験1 形態・組織学的観察> *maf-2* 変異体の花および果実をサンプリングし、果実形態や花器官について野生型‘夢まつり’ (WT) と比較した。果実重量(g)、果実幅(mm)、果実長(mm)を測定した。また、花蕾の樹脂切片を作製し、内部構造を観察した。<実験2 原因遺伝子の探索> WT×*maf-2*F₂ 集団から WT 個体と *maf-2* 変異個体それぞれ 20 個体を選抜した。DNA を抽出し、表現型ごとに DNA をバルク化した。両バルクの全ゲノムリシーケンスを行い、得られたシーケンスリードをトウガラシのゲノム配列(Pepper.v.1.55.total.chr.fa)にアライメントし、SNP を保有するリードの割合(SNP-index)を計算した。ΔSNP-index(= 変異型バルク SNP-index – 野生型バルク SNP-index)を算出し、高い ΔSNP-index を示す SNP を探索した。<実験3 *CaCLV1* 遺伝子のゲノム配列比較> WT 個体と *maf-2* 変異個体の DNA をテンプレートとしたゲノミック PCR により *CaCLV1* (CA04g21950) の全長配列を増幅した。PCR 産物をシーケンスし、WT 個体と *maf-2* 変異個体の塩基配列を比較した。候補 SNP に基づいて dCAPS マーカーを設計し、WT×*maf-2*F₂ 集団由来の 87 個体を用いて、表現型と *CaCLV1* 変異の共分離を確認した。<実験4 花芽分裂組織におけるトランスクリプトーム解析> WT 個体と *maf-2* 変異個体の花芽分裂組織から total RNA を抽出し、RNA-seq を行った。得られたリードを HISAT2 でリファレンスゲノムにアライメントし、StringTie で発現量を算出し、edgeR で DEG を検出した。

【材料および方法】

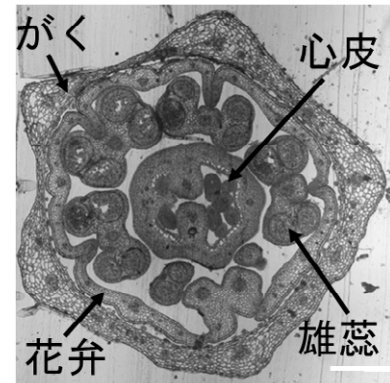
maf-2 変異体では、WT と比較して、花卉や雄蕊の数が増加し、雌蕊内部には種子が形成されていなかった(第1図)。*maf-2* 変異体では、果実重に有意差はみられなかったが、果実幅が増加し果実長が減少した。WT 果実では心室数が 2-3 であったのに対して、*maf-2* 変異体の果実では心室数が 6-8 に増加していた(第1図、第2図)。以上より、*maf-2* 変異体は心室数が増加し、横長の果実をつける変異体であると特徴付けられた。

WT バルクと *maf-2*変異バルクの全ゲノム SNP 比較により、CA04g21950 において *maf-2*変異バルクに特異的な SNP が検出された。WT×*maf-2*F₂集団において、本 SNP と果実表現型の共分離が確認された。CA04g21950 はシロイヌナズナの *CLV1* オースログであったことから、*CaCLV1*とした。SNP(C->T)は *CaCLV1* の第2 エキソンに位置しており、*maf-2*では、終止コドン(TGA)が生じ、*CaCLV1* のキナーゼドメインが欠失していた (第3図)。CLV1 は CLV3 に対する受容体として役割を果たし、WUS を負に制御して分裂組織の維持に関わっている。トマトでは、CLV3-CLV1-WUS 経路の突然変異により、心室数が変化し、果実のサイズが増加することが報告されている (Xu et al., 2015; Chu et al., 2019)。

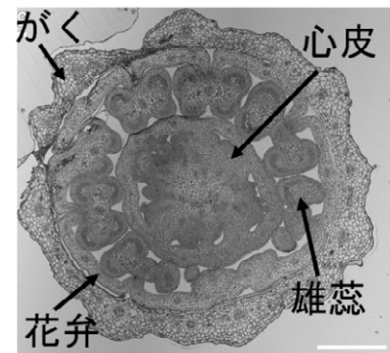
花芽分裂組織における比較トランスクリプトームの結果、WT と比較して *maf-2*で発現変動していた遺伝子 DEG (LogFC₂>1.0, FDR<0.05) は 184 遺伝子であった。その中で最も顕著な違いが認められたのは、*CLV3*であり、野生型より 20 倍以上発現量が上昇していた。*maf-2*変異体では野生型と比べて、花芽分裂組織の幅が 1.5 倍程度大きくなり、花芽分裂組織の肥大が認められた。これらの結果から、トウガラシにおいても、トマトと同様に *CLV1*変異により CLV3-WUS 間の負のフィードバックがなくなり、幹細胞領域の拡大が起こり、花器官数が増加すると考えられた。*maf-2*変異体はトウガラシ・ピーマン類の果実形態を改変する上で新たな遺伝資源となる可能性がある。



第1図 野生型 (WT) と *maf-2* 変異体の花および果実形態の比較
 **: t 検定により 1%水準で有意差あり



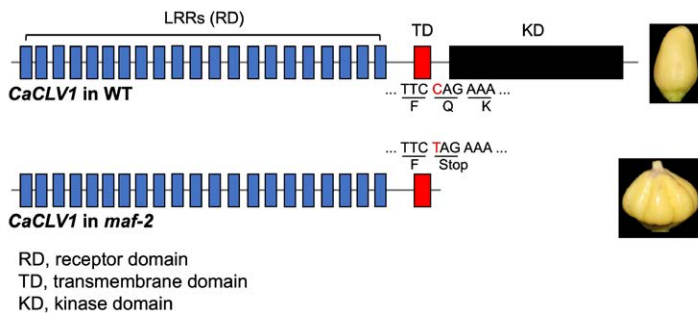
野生型 (WT)



*maf-2*変異体

(バーは500 μm)

第2図 野生型 (WT) および *maf-2* 変異体の花蕾の水平切片



第3図 野生型 (WT) と *maf-2* 変異体の *CaCLV1* の遺伝子構造の比較

イネもみ枯細菌病抵抗性遺伝子 *RBG1* の塩基配列情報を活用した

トマト青枯病抵抗性遺伝子の探索と検証

○溝淵 律子¹、瀬尾 茂美²、杉本 貢一³、江面 浩³

¹農研機構・作物研、²農研機構・生物研、³筑波大学・T-PIRC

持続可能な開発目標（SDGs：Sustainable Development Goals）は2015年9月の国連サミットで加盟国の全会一致で採択された「2030年までに持続可能でよりよい世界を目指す国際目標」である。日本の農業分野では持続的な食料システムの構築に向けて、2021年5月に農林水産省において「みどりの食料システム戦略」が策定されている。このような状況において、化学農薬の使用量の大幅削減を実現するために、著者の所属する農研機構では、水稻の品種育成において、いもち病抵抗性遺伝子（*pi21*、*Pb1*、*Pi39*等）および縞葉枯病抵抗性遺伝子（*Stvb-i*）等の導入が積極的に進められている。一方、地球温暖化により多発生が懸念されるようになった病害があり、そのような病害に対する抵抗性育種が喫緊の課題であり、その一つがイネもみ枯細菌病である。イネもみ枯細菌病は種子伝染性の細菌病害であり、日本における防除面積は30年前に比べて約2倍に増えている。もみ枯細菌病の病徴として、苗が腐敗し枯死してしまう症状（苗腐敗症）と籾が褐変する症状があるが、いずれの病徴に対しても抵抗性を示す栽培品種は今まで見つかっていないため、現在は殺菌剤を用いた防除が主流であるため薬剤耐性菌の発生が問題となっている。著者らは、インド由来の在来品種「Nona Bokra」がもみ枯細菌病菌（*Burkholderia glumae*）による苗腐敗症に抵抗性を示すことを明らかにし、「Nona Bokra」の抵抗性遺伝子を世界で初めて見出したため、遺伝子名を *RBG1* (*Resistance to Burkholderia glumae 1*) と付名した。その後、*RBG1* を同定し、その機能が既報の他の抵抗性遺伝子とは異なるユニークなメカニズムによることを明らかにした (Mizobuchi et al. *Scientific Reports*, 2023)。 *RBG1* 遺伝子は MAP キナーゼカスケードと呼ばれるシグナルの伝達経路に属する新規の MAPKKK (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase) と呼ばれる酵素をコードし、抵抗性品種「Nona Bokra」型 MAPKKK は OsMKK3 タンパク質をリン酸化する能力が高まっていることが明らかになった。 *RBG1-NIL* (*RBG1* 遺伝子を罹病性品種コシヒカリに導入した系統) は菌の感染後に ABA レポーター遺伝子 (ABA により発現が誘導される遺伝子) の発現がコシヒカリより少なく植物体内の ABA がコシヒカリより少ないと推測されること、*RBG1-NIL* にもみ枯細菌病菌を接種後に、ABA をスプレーで葉面に添加してやると発病度が高まることから、*RBG1* は植物体内の ABA を抑制することにより発病を抑えていると考えられた。さらに、*RBG1-NIL* は *Burkholderia* 属の別の菌である苗立枯細菌病菌 (*B. plantarii*) にも抵抗性

を示すことを明らかにした(図1)。異なる植物種間において、オーソログ遺伝子と言われる相同遺伝子が存在し、オーソログ遺伝子は共通の祖先をもつ様々な種のゲノムで見つかり、それらの遺伝子の機能は種分化プロセスを通じて保存されていることが多い。そこで、*RBG1*のオーソログ遺伝子(異なる種で見られる相同遺伝子)がイネ以外の植物においても、*Burkholderia*属に近い細菌に対する抵抗性に関与し得ると考え、農研機構ジーンバンクの微生物遺伝資源データベースで「*Burkholderia*」で検索したところ、現在では別の属に分類されている菌を含めて593株が検出された。そのなかに、トマト等における難防除病害である青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)が58株含まれることがわかった。トマトにおいてABAを添加すると青枯病に対する発病度が上がることが報告されていることから(Zhou et al. *J. of Experimental Botany*, 2008)、青枯病ともみ枯細菌病の発病メカニズムが近い可能性が考えられる。土壌伝染性の難防除病害である青枯病は、トマト、ナス、ピーマン、ジャガイモ等の多くの作物に甚大な被害を及ぼす重要病害の一つである。トマトはナスと比べると青枯病菌に弱く、抵抗性の育種素材がない状況である。従って、トマトにおける青枯病抵抗性育種は、遺伝資源から抵抗性品種・系統を見出すという戦略をとることは困難な状況である。

そこで、本研究の最終目標は、*RBG1*の塩基配列情報を活用して、もみ枯細菌病菌と近縁の青枯病菌に対するトマトの抵抗性遺伝子を探索し、その効果を検証し、新たな抵抗性育種素材を開発することである。イネもみ枯細菌病抵抗性遺伝子*RBG1*はMAPKKK酵素をコードしておりトマトにおいてMAPKKKのうち、*RBG1*が属するMEKKファミリー遺伝子は33個あると報告されている(Wu et al.



図1 苗立枯細菌病菌(*B. plantarii*)を種子に付着させて播種7日後の発病程度(コシヒカリは枯死するが、*RBG1*-NILは抵抗性を示し生育する)

PLoS ONE, 2014)。現在、33個のMEKKファミリー遺伝子から、ターゲット遺伝子を選定し、ゲノム編集個体を作成中である。青枯病抵抗性検定は青枯病菌は菌株により病原力が異なるため、青枯病抵抗性検定は一般的に非常に難しいが、著者らは精度の高い青枯病抵抗性検定法を有している(Seo et al. *Plant Cell Physiol.* 2016)。そこでその検定法を改変し、ゲノム編集個体から青枯病抵抗性に変異が生じた系統を選抜する予定である。

イネが生産するジテルペン型ファイトアレキシンがもたらす

チョウ目害虫抵抗性の解析

神田 恭和¹、藏満 司夢²、高橋 章¹、津田 麻衣³、戒能 洋一²、森 昌樹¹

¹農研機構・生物機能利用研究部門、²筑波大学・生命環境系、³筑波大学・T-PIRC

病原細菌・糸状菌や害虫等による加害を受けた植物はそれを認識し、防御応答シグナリング経路の活性化や防御関連遺伝子の発現、二次代謝産物の生合成といった一連の防御応答を起こす。イネは病原細菌・糸状菌に対する応答として、ジテルペン型ファイトアレキシン (DP) と総称される二次代謝産物を生産する。イネ DP 化合物は病害抵抗性に寄与する化合物であると考えられてきた。しかし、DP 化合物を恒常的に高蓄積するイネにおいて必ずしも病害抵抗性が増強されないことから、別の生物学的意義を有する可能性が想像されてきた。一方で、害虫等とイネ DP 化合物の関連は解析されていなかった。

我々はこれまでに、防御応答シグナリングタンパク質を解析の糸口として、イネ DP 化合物とチョウ目害虫抵抗性との関連に注目した研究を進めてきた。当研究グループが以前同定したイネ遺伝子 *BROAD-SPECTRUM RESISTANCE 1 (BSRI)* は植物細胞内の防御応答シグナリングを担っており、過剰発現時にいもち病・白葉枯病等の広範な病害に対する複合病害抵抗性を賦与する。最近の解析によって、*BSRI* 遺伝子がクサシロキヨトウ *Mythimna loreyi* (イネを食害するチョウ目害虫) による食害に対する抵抗性をも増強することを見出している。この害虫抵抗性のメカニズムについて解析した結果、害虫による食害を受けた *BSRI* 過剰発現イネでは DP 化合物が高蓄積することが明らかになった。さらに、高蓄積していたイネ DP 化合物の一種であるモミラクトン B を人工餌に添加してクサシロキヨトウ幼虫に与えたところ、幼虫の生長が抑制された。以上の結果より、イネが生産する DP 化合物の生物学的意義が病害抵抗性よりむしろ害虫抵抗性にあることが強く示唆されていた (Kanda et al., *Int. J. Mol. Sci.* 2023)。

そこで本研究では、イネ-害虫相互作用における DP 化合物の寄与を裏付けること、及び将来的な害虫防除技術への活用可能性を検討することを目的として、DP 化合物を高蓄積するイネを解析した。イネにおいて DP 化合物の生合成遺伝子群は鍵転写因子 *DITERPENOID PHYTOALEXIN FACTOR (DPF)* によって制御されており、*DPF* 遺伝子を過剰発現するイネは DP 化合物を恒常的に高蓄積することが報告されている (Yamamura et al., *Plant J.* 2015)。そこで、農業生産上の被害が大きい2種のチョウ目害虫 (ツマジロクサヨトウ *Spodoptera frugiperda* 及びアワヨトウ *M. separata*) の食害に対する *DPF* 過剰発現の影響を解析することとした。ツマジロクサヨトウはアメリカ大陸原産で、世界中に分布域を拡

大しているイネ科作物 (トウモロコシ、サトウキビ) 等の害虫である。アフリカにおいては年間約 60 億ドルにもものぼる被害をもたらしている他、近年はアジアにも分布域を広げ、2019 年以降日本に侵入、定着しており農作物への被害が警戒されている。アワヨトウは東アジア地域でイネ科作物を加害しており、国内においても発生面積 4.6 万 ha (イネ、2017 年) に及ぶ被害をもたらしている。DPF 過剰発現イネまたは野生型イネの葉のみを与えてシャーレ内でツマジロクサヨトウ幼虫を飼育し、体重を経時的に測定する実験を行った。その結果、野生型イネと比べて DPF 過剰発現イネを餌として飼育した幼虫では生長 (体重の増加) が顕著に抑制された (図 1A, B)。同様に、アワヨトウ幼虫の生長もまた DPF 過剰発現によって有意に抑制された (図 1C, D)。これらの結果はイネが生産して植物体内に蓄積した DP 化合物がチョウ目害虫に対して防除効果を発揮できることを示している。

今後は、野生型イネが本来有するチョウ目害虫抵抗性への DP 化合物の寄与を明らかにするために、DP 生合成遺伝子等をノックアウトしたイネの害虫抵抗性を評価する予定である。イネは複数の DP 生合成酵素によって 10 種以上の DP 化合物を生産しており、どの DP 化合物が害虫抵抗性において重要であるかを明らかにすることが期待される。

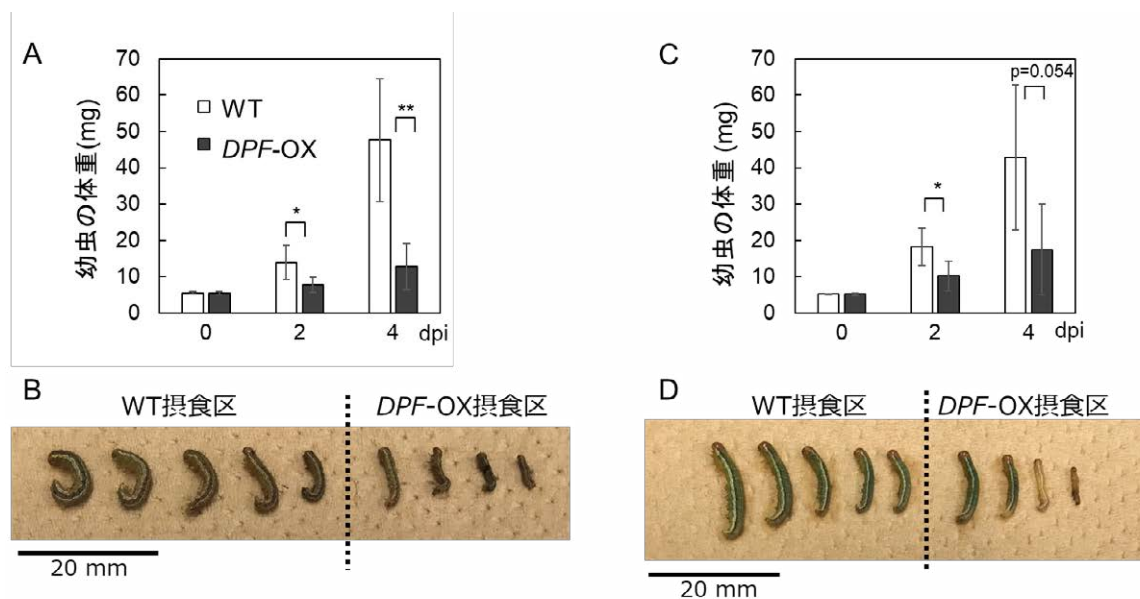


図 1. DPF 過剰発現イネが示すチョウ目害虫抵抗性。イネ葉を与えて飼育したツマジロクサヨトウ幼虫の体重(A)と4日後の写真(B)、及びアワヨトウ幼虫の体重(C)と4日後の写真(D)。DPF 過剰発現イネを摂食した群では個体サイズ (体重) が顕著に抑制された。* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (t-test; $n = 4-5$). WT, 野生型イネ; DPF-OX, DPF 過剰発現イネ。

ヒト *UGT1* 遺伝子の過剰発現がポプラ木部特性に与える影響

Wenbo Shan¹, 井原 あゆみ¹, 秋吉 信宏¹, 小竹 敬久³, 出村 拓^{2,4}, 大谷 美沙都^{1,2,4}

¹東京大学新領域創成科学研究科、²奈良先端科学技術大学院大学、

³埼玉大学理工学研究科、⁴理研環境資源科学研究センター

木質バイオマスは、木部組織に蓄積されたセルロース、ヘミセルロース、リグニンを含む二次細胞壁 (SCW) に由来する。木質バイオマスは、カーボンニュートラル社会の観点から、持続可能なバイオ資源として期待されている。しかしながら、その分解性の低さから、化石由来原料を木質バイオマス由来原料に置き換えることは現時点では成功していない。木質バイオマスのさらなる利用のためには、木質バイオマスの生合成プロセスを理解し、その特性を改変・改善することが重要である。

アラビノガラクタンタンパク質 (AGP) は、細胞壁ヒドロキシプロリンリッチ糖タンパク質ファミリーに属する植物特異的な高グリコシル化タンパク質である。AGP は植物細胞の機能性、植物の成長および発生過程において、さらに SCW 形成において重要な役割を果たしていることが知られている。AGP のグリコシル化はゴルジ体で行われるため、ゴルジ装置で発現する特定の UDP-糖輸送体を操作することにより、AGP の生合成を変化させることがいくつかの研究により試みられてきた。そのうちの 하나가、UDP-ガラクトース (Gal) トランスポーター (UGT) の利用である。UGT は、UDP-Gal をゴルジ体に輸送するヌクレオチド糖輸送体である (図 1A)。ヒト *UGT1* (*hUGT1*) 遺伝子をタバコ植物で過剰発現させると、トランスジェニック植物は成長が促進され、AGP 量が増加する (Khalil et al. 2010) 。この結果は、*hUGT1* 遺伝子が木質バイオマス生産を研究・改善するための優れたツールであることを示している。以上を受けて、本研究では、木質バイオマス改変に向けて、*hUGT1* 遺伝子をポプラ (*Populus tremula* × *tremuloides*, line T89) にて過剰発現した *hUGT1ox* ポプラを作製し、その特性評価を行った。

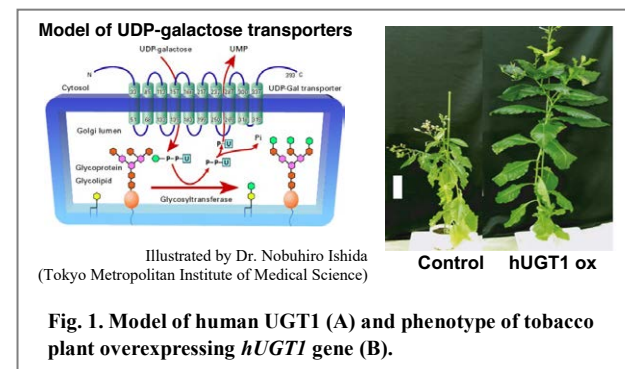
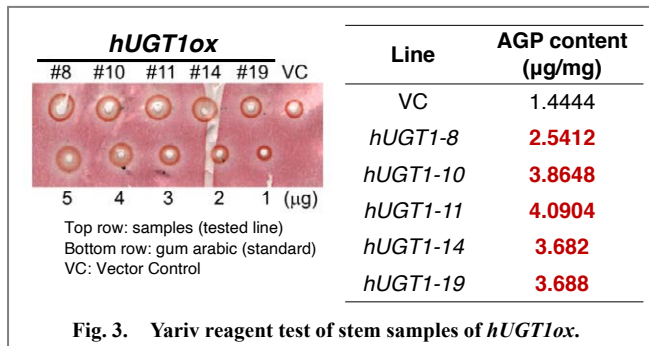


Fig. 2. Transgenic poplars overexpressing *hUGT1* genes. VC, vector control. Bar = 10 cm.

hUGT1ox ポプラでは、ベクター対照と比較して形態に明

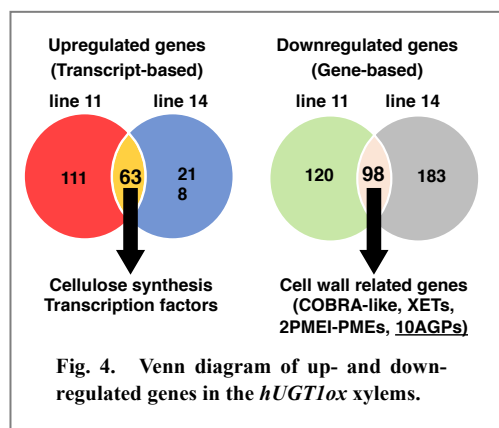
確な違いは見られなかった (図 2)。ポットの土植えで 2 ヶ月間生育させた *hUGT1ox* ポプラの樹高と茎径を連続的に測定した結果、生育もコントロールと同等であることがわかった。さらに、木部形成に対する *hUGT1* 過剰発現の影響を確認するために、茎の断面を観察したところ、対照株では 5 節目や 6 節目より後に二次成長が始まる一方、*hUGT1ox* ポプラでは 4 節目ですでに二次木部が形成されていた。この



ことから、*hUGT1ox* ポプラでは茎の二次成長の開始が早まっていることがわかった。興味深いことに、土壌で生育させた 4 ヶ月齢の *hUGT1ox* ポプラでは、木部組織の構造や大きさに違いは見られなかった。これらの観察結果から、*hUGT1* 過剰発現の効果はポプラにおいては木部形成の初期段階に限定的であると考えられる。

木質バイオマスの性質を調べるため、粉末化した茎試料について細胞壁分析およびヤリブ試薬試験を行ったところ、*hUGT1ox* 株ではペクチンおよび AGP 画分の量が増加していること (図 3)、しかしながら予想に反して Gal 量は変化しないことが示された。さらに若い茎サンプルを用いた RNA-seq 解析により、*hUGT1* の過剰発現が遺伝子発現に与える影響を調べた。その結果、*hUGT1ox* ポプラでは、二次成長の促進を反映するように、いくつかのセルロースおよび形成層関連遺伝子の発現が上昇していた (図 4)。興味深いことに、*hUGT1ox* ポプラの木部では、細胞壁関連遺伝子群の発現が低下しており、とくに複数の AGP 遺伝子の発現が有意に低下していることがわかった (図 4)。AGP 遺伝子発現データのヒートマップ解析から、*hUGT1ox* 木部では AGP 遺伝子の大半が発現低下しているものの、6 つの AGP 遺伝子だけが高発現していることが示され、*hUGT1ox* ポプラでは、特定のタイプの AGP が木部組織に蓄積していると推測された。

以上の結果から、*hUGT1ox* ポプラでは AGP 量は予想通り増加するものの、Gal 含有多糖は増加しないことが明らかとなった。このことから、*hUGT1* はポプラ木部においては AGP 生合成のためのグリコシル化酵素と機能的にリンクしている可能性が示唆された。さらに *hUGT1ox* ポプラでは、6 つの AGP 遺伝子のみの発現が高まることも



わかり、これらの 6 つの AGP が、二次成長の早期開始など、*hUGT1ox* の表現型において支配的な役割を果たしている可能性がある。今後は、*hUGT1ox* ポプラのさらなる生理的特性評価を進めるとともに、今回見出された 6 つのポプラ AGP 遺伝子の機能解析を進め、木質バイオマス生産の改善のためのさらなる知見の獲得を進めたい。

代謝変化により L-DOPA を生産する植物の生理学的解析

朝比奈 雅志^{1,2}、湯本 絵美²、安納 萌香³、小野 道之⁴

¹帝京大学理工学部バイオサイエンス学科、²帝京大学先端機器分析センター、

³筑波大学生命環境学群生物学類、⁴筑波大学生命環境系

L-DOPA は、植物では二次代謝経路のアルカロイド合成の初発物質となる一方で、体内では酸化され易く ROS の発生源となる。L-DOPA を合成する酵素を持つ植物種は少ないが、根圏から L-DOPA をアレロケミカルとして放出する植物があり、周囲の植物にダメージを与える。L-DOPA から合成される代謝物としては、黄色色素ベタキサンチンが知られる。ベタキサンチンは、ナデシコ科の限られた種、色素のアントシアニンを合成できなくなった種でのみ、その代替品として合成される。筑波大学における、江戸時代に存在したアサガオの黄花を復元する試みの中で、ベタキサンチンの合成経路遺伝子を導入することによる黄花の作出が行われ、実際に花卉は黄色化した。一方で激しい生育障害が観察されていた。そこで、帝京大学において新規に確立した LC-MS/MS を用いた L-DOPA の定量法 (Yumoto *et al.* 2022) を用いて、生育障害が発生している葉における L-DOPA を試みに定量した結果、自然界および遺伝子組換え植物 (トマト) などの蓄積量を遥かに超えた量が蓄積されていることが発見された。本研究では、L-DOPA 蓄積による生育障害の回避と同時に、L-DOPA からベタキサンチンへの代謝を促進することにより、生育障害を軽減したベタキサンチン産生植物の育成を目指すための改良を試みた。

1) L-DOPA の内生量の測定

アサガオの既作出の形質転換植物は、ベタキサンチン合成経路の酵素遺伝子を CaMV 35S プロモーターにより、植物全体で過剰発現させている。その結果、葉において多量に L-DOPA が蓄積していた。そこで、生育段階が異なる他の器官における L-DOPA の内生量を測定し、生育障害との関係を解析する。特に開花前から開花時における花卉における L-DOPA 量の測定を進めている (図 1)。今後、必要に応じて、植物ホルモンの内生量の変化や、ROS の発生なども解析する予定である。

2) DODA (DOPA 4,5-dioxygenase) の液胞への導入

DODA は L-DOPA をベタラミン酸に代謝する酵素である。DODA を持つ天然の植物種においては、DODA は細胞質で酵素反応を行うとされ、配列を比較した 8 種類の DODA の酵素は、液胞への移行シグナルが無い。一方、アサガオの形質転換葉において多量の L-DOPA が蓄積されていたことから、この L-DOPA の蓄積は、細胞質ではなくて液胞にあることが推察された。本研究では、DODA に液胞移行シグナルを付加することにより、液胞に取り込まれた L-DOPA をベタラミン酸へ代謝し、さらにベタキサンチンへと自然代謝させることを試みる。

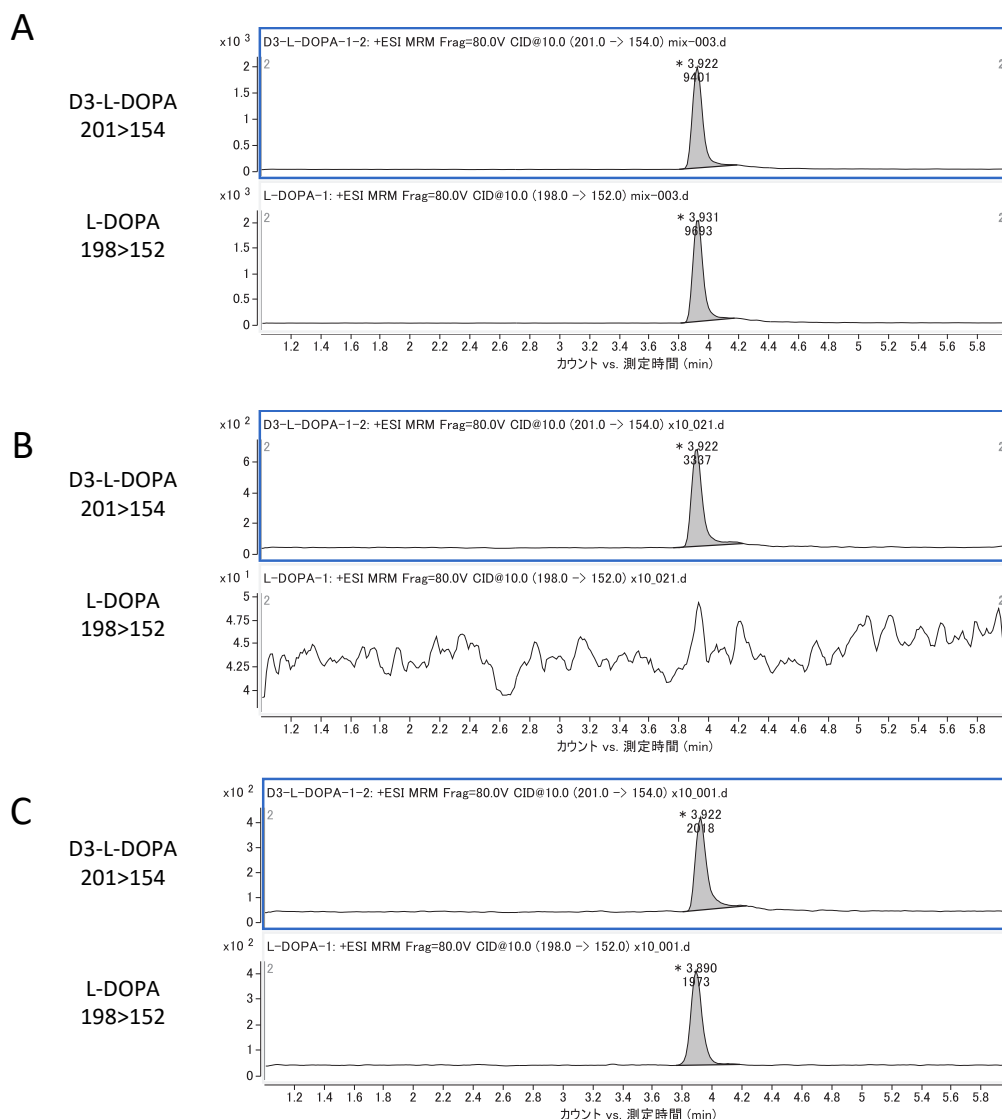


図1 L-DOPA 標準物質及びアサガオ花弁抽出液のクロマトグラム

A) L-DOPA 標準物質、B)形質転換体#1、C)形質転換体#2

マイクロ乳棒で破碎したサンプルに 80 % (v/v)メタノールを加え、内部標準物質として安定同位体ラベルした L-DOPA を添加した。抽出液の上清を 80 % (v/v)メタノール で平衡化した C18 カラム (Bond Elut C18, Agilent Technologies) に滴下し、通過液を回収・希釈した後、LC-MS/MS (Agilent 6460, Agilent Technologies) を用いて測定を行った。それぞれ、上段が安定同位体ラベルした L-DOPA、下段が標準物質または植物体抽出液のクロマトグラムを示す。

根粒共生遺伝子のイメージングを用いた窒素栄養による

根粒形成及び窒素固定抑制機構の解析

○西田 帆那¹、下田 宜司¹、Khin Thuzar Win¹、今泉 (安楽) 温子¹、壽崎 拓哉²

¹農研機構・生物機能利用研究部門、²筑波大学・生命環境系

マメ科植物は根粒菌との相互作用によって根粒を形成し、根粒内部に根粒菌が共生して大気中の窒素を固定することで、宿主植物は低窒素土壌でも旺盛に生育することが可能である。一方で土壌中に存在する硝酸などの窒素栄養が根粒共生を抑制すること（窒素抑制）が知られている。これまでにマメ科のモデル植物であるミヤコグサの NLP 転写因子が硝酸に応答して様々な下流因子の発現を制御することにより、根粒共生を多面的に抑制することを明らかにした^{1,2}。一方で、NLP 転写因子による窒素抑制制御が、根粒共生のどの過程において、植物体のどこで発現し、根粒共生を抑制しているかの理解は不十分である。本研究では、様々な窒素栄養条件下における根粒共生の連続的な観察と、根粒共生関連遺伝子の時空間的発現パターンの解析から、窒素栄養による遺伝子発現制御と根粒共生抑制現象の関連性を明らかにすることを目的とした。

従来の根粒共生研究では土から掘り出した根を観察する破壊的観察が主流であり、観察時に観察点で生じた一時的な現象を捉えるにとどまっていた。そこで土壌中の根粒共生現象の連続的な観察をおこなうために、透明なアクリルで構成された薄い箱型の植物栽培装置「Rhizosphere Frame ; RhizoFrame」を開発した (図 1 A)³。RhizoFrame に土をつめて植物を植えた後、アクリル面に根を露出させるよう 60 度傾けて栽培し、任意のタイミングで根の観察を行った。RhizoFrame を用いてミヤコ

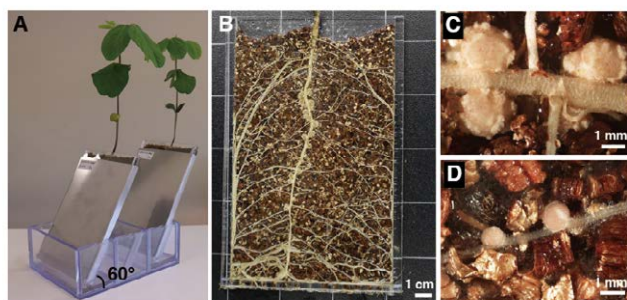


図 1. 非破壊的な根粒共生の観察

(A) RhizoFrame を用いてダイズを栽培する様子。

(B-D)アクリル板越しに観察したダイズ(B, C)およびミヤコグサ(D)の根と根粒。

グサおよびダイズに根粒菌を感染させた結果、土から掘り出すことなく根の成長や根粒形成の様子を観察することができた (図 1 B-D)。さらに根粒菌と根の相互作用を詳細に観察するため、蛍光タンパク質を発現させた根粒菌を植物に感染させた。蛍光顕微鏡を用いて観察した結果、カーリングした根毛の中を伸長する感染糸 (宿主が根粒菌を細胞内へと導くために形成する構造) や、根粒原基に根粒菌が侵入していく様子が確認された (図 2 A, B)。さらに、土の中で根粒が発達していく様子や、根粒菌が根粒内部

へ侵入し増殖する過程を連続的に可視化することができた (図2C)。

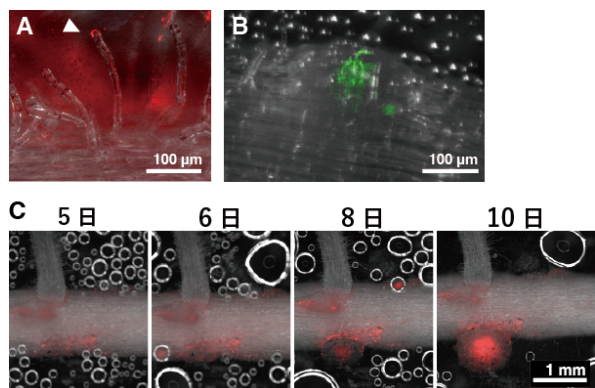


図2. RhizoFrame を用いた根と根粒菌の相互作用の観察

(A, B) DsRed (A: 赤)および GFP (B: 緑)根粒菌を接種したミヤコグサの観察。矢尻は感染糸を示す。
(C) DsRed 根粒菌(赤)を接種したダイズの感染5日目から10日目までの経時観察。

続いて RhizoFrame を用いたレポーターアッセイの可能性を検証するために、オーキシンレポーターである DR5::GFP-NLS を発現するミヤコグサの観察を実施した。先行研究から、皮層細胞分裂に先立ってオーキシン蓄積が根粒原基形成に重要であることが明らかにされている⁴。蛍光顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングの結果、オーキシンの蓄積を示す GFP の蛍光が見られた細胞の付近に感染糸が観察され、根粒原基形成のための細胞分裂と同調的に GFP の発現が強くなっていく様子が確認された (図3)。以上の結果から、RhizoFrame を用いることで土壌中の根における非破壊的なレポーターアッセイが可能であり、根粒共生動態と遺伝子発現動態を連動させた経時的解析を行えることが示唆された。

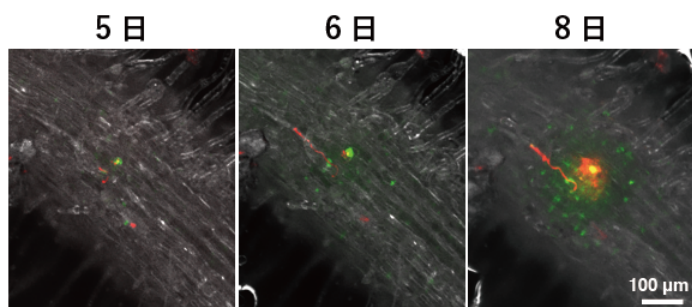


図3. RhizoFrame を用いた根粒共生過程におけるオーキシン応答の観察

DsRed 根粒菌(赤)を接種した DR5::GFP-NLS ミヤコグサの感染5日目から8日目までの経時観察。GFP (緑)はオーキシンの蓄積を示す。

本研究では、根粒菌感染及び高濃度硝酸処理条件下におけるミヤコグサ野生型および *Ljnlp* 変異体を用いた RNA-seq 解析から、窒素抑制制御に関与する候補遺伝子を複数同定している⁵。今後は、RhizoFrame を用いて、様々な窒素栄養条件下における候補遺伝子の時空間的発現パターンを観察し、候補遺伝子の発現制御と根粒共生抑制現象との関連性を解析する。

【引用文献】

1. Nishida H, Tanaka S, Handa Y, Ito M, Sakamoto Y, Matsunaga S, Betsuyaku S, Miura K, Soyano T, Kawaguchi M, Suzaki T (2018) Nat Commun 9:499
2. Nishida H, Nosaki S, Suzuki T, Ito M, Miyakawa T, Nomoto M, Tada Y, Miura K, Tanokura M, Kawaguchi M, Suzaki T (2021) Plant Cell 33:2340-2359
3. Nishida H, Shimoda Y, Win KT, Imaizumi-Anraku H (2023) J Plant Res 136:769-780
4. Suzaki T, Yano K, Ito M, Umehara Y, Sukanuma N, Kawaguchi M (2012) Development 139:3997-4006
5. Nishida H and Suzaki T (2023) Genes Genet Syst 97:257-260

非典型 BZR 転写因子の分子機能の植物種間比較解析

○古谷 朋之¹、梅北 葵衣¹、岩佐 碧泉¹、野崎 翔平^{2,3}、杉本 貢一^{2,3}、
 近藤 侑貴⁴、笠原 賢洋¹

¹立命館大学生命科学部、²筑波大学生命環境系、³筑波大学 T-PIRC、⁴大阪大学大学院理学研究科

有性生殖は幅広い生物種に見られる生殖様式であり、その過程で遺伝子セットの組み換えが生じることによって集団の遺伝的多様性の獲得を推進する。植物においても有性生殖は重要なイベントであり、進化の過程でダイナミックに変遷させていった。被子植物が孢子体世代において有性生殖器官である花を作り出すのに対し、コケ植物や小葉植物、シダ植物では配偶体世代において造卵器や造精器といった配偶子器(配偶子嚢)を発生する。しかしながら、その発生制御メカニズムは未解明の部分が多い。近年、モデル

コケ植物として注目されているタイ類ゼニゴケは有性生殖システムの解析にも適しており、研究が進展している。ゼニゴケは環境に応じて生殖成長へ相転換すると、配偶子器(雌株では造卵器、雄株では造精器)の始原細胞が分化する。これら配偶子器始原細胞の分化に伴い、生殖枝(雌器托と雄器托)も発生する。生殖枝では継続的に配偶子器始原細胞が生まれ、最終的に雌器托と雄器托には多数の造卵器と造精器が発生する(図1)。

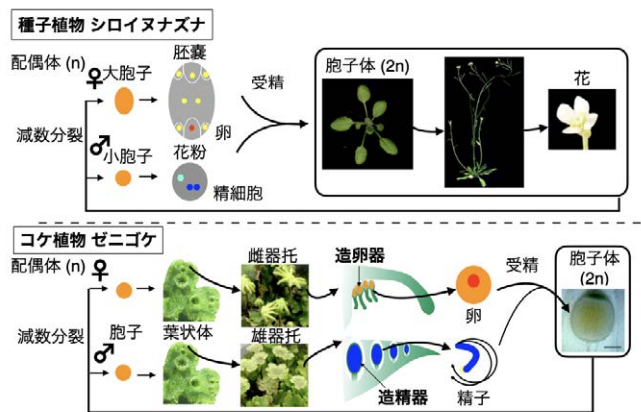


図1.陸上植物の有性生殖システムの変遷

これまでにゼニゴケを用いた研究から、植物特異的な BZR/BES 転写因子に属する MpBZR3 がこれら配偶子器の発生制御において重要な役割を持つことを見出してきた (Furuya et al. under review)。MpBZR3 の機能欠損変異体では、造精器発生が初期過程で停止することや、造卵器では卵細胞が崩壊すると異所的に造精器、造卵器が誘導できることもわかってきた(図2)。植物特異的な転写因子ファミリーである BZR 転写因子は、これまでモデル被子植物シロイヌナズナを用いて研究が展開され植物ホルモンブラシノステロイドへの応答、維管束や葯の発生における細胞分化の

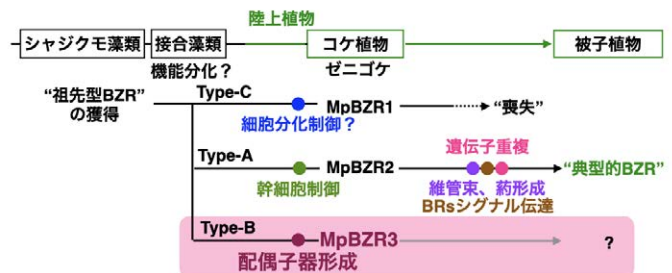


図2 植物進化の過程におけるBZR転写因子の変遷

制御など多岐にわたる発生プログラムにおいて多面的かつ中心的な役割を持っていることが明らかになってきた。私たちの系統解析の結果、BZR/BES 転写因子は大きく3つのサブグループに分類できることがわかってきたが、興味深いことに MpBZR3 は、シロイヌナズナの BZR 転写因子 (Type-A BZR 転写因子) とは別の系統群に属する“非典型”Type-B BZR 転写因子であることがわかってきた(図2)。さらにゼニゴケはそれぞれのサブグループの一つずつ計3つの BZR/BES 転写因子を持つが、過剰発現した際に、配偶子器様構造体を誘導できるのは“非典型”Type-B BZR 転写因子 MpBZR3 のみであった。つまり、Type-B BZR 転写因子は他のサブグループとは異なる配偶子器発生制御因子としての新規機能を獲得したサブグループであることが推測される(図2)。そして、Type-B BZR 転写因子は幅広い植物種に存在しているが、シロイヌナズナを含むいくつかの被子植物からは見つかっておらず、これまで研究はほとんど進んでいなかった。一方で、興味深いことに“非典型”BZR/BES 転写因子はシロイヌナズナにおいては存在が確認できないが、トマトやイネをはじめとするいくつかの被子植物においては存在している。当該研究では、これまでにシロイヌナズナに存在しなかったためにほとんど着目されてこなかった、“非典型”Type-B BZR/BES 転写因子に注目して研究を進めてきた。

被子植物でもトマトは MpBZR3 オースログを持っており、発現量は少ないながらも他の組織と比較して花芽で発現しており、有性生殖器官での機能が期待される。トマトでの Type-B BZR 転写因子の過剰発現体が花や葉の発生に影響することが他の研究グループから報告されたが、機能欠損変異体における明確な表現型は見出されていない。私たちも昨年度より本共同利用研究で機能欠損変異体の作出を進めている。現在、複数の機能欠損変異株が確立できており、表現系の観察を始めたところである(図3)。



図3 トマトMpBZR3オースログをターゲットにした
トマトゲノムゲノム編集株作出過程の一例

また、さまざまな植物種 (トマト、イネ、ヒメツリガネゴケ等) から Type-B BZR/BES 転写因子をクローニングし、ゼニゴケにおける過剰発現体を作成し、分子機能の保存性を評価した。他のコケ植物であるヒメツリガネゴケの Type-B BZR 転写因子はゼニゴケで過剰発現すると造精器を誘導したが、裸子植物オウシュウトウヒや被子植物イネ、トマト由来の Type-B BZR 転写因子の過剰発現体では造精器の誘導は観察されなかった(図4)。このことは、コケ植物と種子植物の間で Type-B BZR 転写因子の分子機能に違いが生じていることを示唆している。さらに、これら植物種間の Type-B BZR 転写因子の機能の違いに迫るために各植物由来の Type-B BZR 転写因子の DNA 結合能の比較解析も始めている。これらを踏まえて Type-B BZR 転写因子の機能の変遷と生殖器官発生について考察も交えながら報告したい。

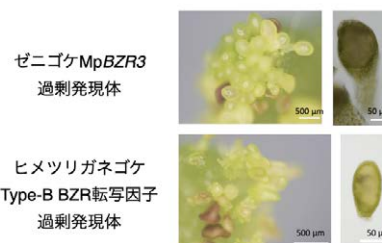


図4 ゼニゴケにおけるType-B BZR転写因子
過剰発現の影響

病原菌応答におけるトマト SYLK タンパク質 (SYNTAXIN 6-LIKE PROTEIN IN VASCULAR PLANT) の機能解明

植村 知博^{1,2}、伊藤 瑛海²

¹お茶の水女子大学基幹研究院、²お茶の水女子大学ヒューマンライフサイエンス研究所

真核細胞のなかには、オルガネラと呼ばれる機能ユニットに区画化されており、細胞のなかで合成されたタンパク質や脂質が各オルガネラへと正しく分配されることにより細胞は正常に機能することができる。このような物質の分配の仕組みは、「膜交通」(小胞輸送)と総称される。我々のグループでは、膜交通制御の鍵因子である SNARE タンパク質群の植物の発生や環境応答における役割の全容解明に向けて世界に先駆けた研究を展開しており、最近、新規の機能分子として SYNTAXIN 6-LIKE PROTEIN IN VASCULAR PLANT (SYLK) タンパク質群の同定に成功した。

Alpha fold による SYLK の構造予測を行ったところ、SYLK は、真核生物で保存されている Syntaxin-6 (Qc-SNARE のひとつ) の N 末端領域と膜貫通領域を有するものの、SNARE タンパク質の機能に重要とされる SNARE ドメインを持たないことがわかった (図 1)。モデル植物シロイヌナズナには 3 種類の SYLK 遺伝子が存在する (SYLK1-3)。これら SYLK 遺伝子について CRISPR-Cas9 システムを利用したゲノム編集により、それぞれの変異体を作成したが、単独変異体では野生型とは異なった表現型を示さなかった。そこで人工交配により *sylk1/sylk2/sylk3* 三重変異体 (*sylk* 変異体) を作成したところ、通常の生育条件下では野生型と比べて目立った表現型が観察されなかったが、炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*) を感染させたところ、野生型に比べて病斑の程度が亢進し、炭疽病菌に対する抵抗性が低下していることを発見した (図 2)。これらの研究結果から、「ゴルジ体が制御する植物免疫システム」の存在が示唆された。

本研究は、シロイヌナズナの知見を世界主要農作物であるトマトへと展開する。NBRP リソースやゲノム編集などの技術を用いることで、SYLK をノックアウトしたマイクロトム (*Solanum lycopersicum* cv. *Micro-Tom*) 系統を作成し、耐病性や環境ストレスに対する応答性を解析することで、病原菌に耐性をもったトマトを作成することを目的とする。本発表会では、シロイヌナズナにおける SYLK の知見とトマトへの研究展開の進捗について報告する。

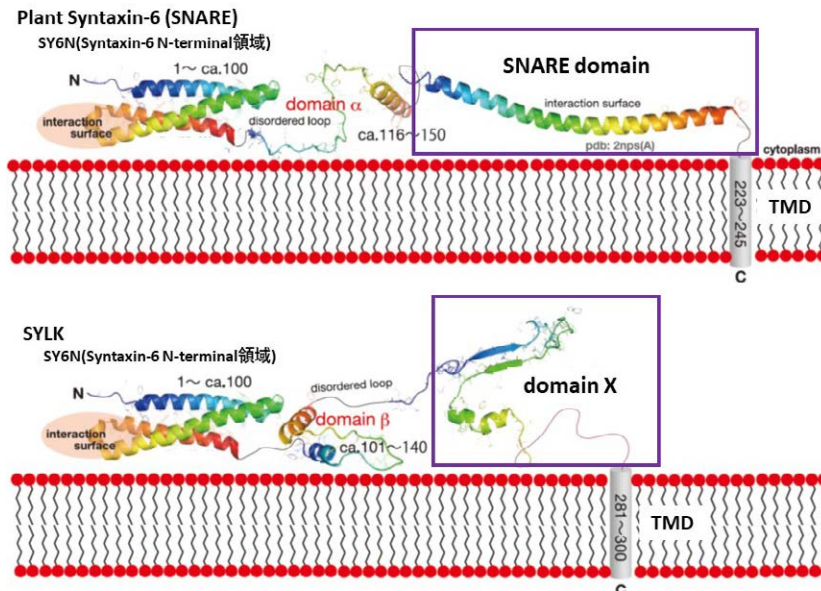


図1 SYLKの立体構造予測



図2 SYLK変異体の表現型

植物近傍の温度変化がイチゴ果実への光合成産物の転流動態に及ぼす影響

三好 悠太¹、日高 功太²、尹 永根¹、鈴木 伸郎¹、野田 祐作¹、榎本 一之¹、河地 有木¹

¹量研・高崎研、²農研機構

1. 緒言

イチゴ生産において、光合成産物の葉から果実への転流は収穫部への炭素栄養の集積を左右し、収量や品質に直接影響を及ぼす重要な生理機能である。高収益かつ安定したイチゴ生産の実現のためには、転流の詳細を理解し、これを適切に制御する必要がある。そこで我々は、生きた植物体内の栄養元素の動態を可視化し定量的に解析できるポジトロンイメージング技術(PETIS: Positron-emitting tracer imaging system) とポジトロン放出核種 ^{11}C を用いて、イチゴ果実への転流プロセスの解明に取り組んできた。本研究では、植物近傍の温度環境の変化が、果実への光合成産物の転流動態に及ぼす影響について検討した。本要旨では葉近傍の温度上昇が転流へ及ぼす影響について記載する。

2. 材料および方法

イチゴ‘福岡 S6 号’をプラスチックポットで栽培し供試した。果実は赤熟期の 1 番果が 1 果 (図 1 ; 果実①)、白熟期の 2 番果が 2 果 (図 1 ; 果実②, ③)、緑熟期の 3 番果が 4 果着果していた (図 1 ; 果実④~⑦)。PETIS の撮像視野に全ての果実が収まるよう植物体を設置した。面状ヒーターを取り付けたアクリルチャンバー内に展開第 4 葉 (果房直下葉) を入れ、アクリルチャンバー内の気温をイチゴの生育適温である 20°C に保ち、約 150MBq の $^{11}\text{CO}_2$ を投与した。投与と同時に PETIS 撮像を開始し、果房直下葉から各果実への ^{11}C -光合成産物の転流動態を 150 分間撮像した (20°C 区)。 ^{11}C の半減期の長さ (20 分) のため同一個体を繰り返し供試できる利点を活かし、PETIS 撮像終了後に面状ヒーターによってアクリルチャンバー内の気温を約 30°C まで加温して、再び $^{11}\text{CO}_2$ を投与し、同一個体の果実への ^{11}C -光合成産物の転流動態を 150 分間撮像した (30°C 区)。

3. 結果

^{11}C -光合成産物が果実へ転流する様子の可視化に成功した (図 1)。得られた画像より、果実②、果実③、果実④、果実⑤への転流が確認された。 20°C 区と 30°C 区では ^{11}C -光合成産物の転流が確認される果実に変化は無かったが、 20°C 区よりも 30°C 区の方が各果実への転流が活発であった。転流が確認された果実における ^{11}C 放射活性の経時変化を比較すると (図 2)、 20°C 区では $^{11}\text{CO}_2$ を投与してから約 80 分後に ^{11}C -光合成産物の各果実への転流が確認されたが、 30°C 区では $^{11}\text{CO}_2$ の投与から約 30 分後に各果実への転流が確認された。 20°C 区と 30°C 区における $^{11}\text{CO}_2$ 投与から 150 分後の各果実の ^{11}C 放射活性を比較すると果実②の 30°C 区の放射活性は 20°C 区の約 6.3 倍、果実③では約 4.6 倍、果実④では約 7.5 倍、果実⑤では約 2.8 倍に増加していた。葉近傍の気温の上昇によって、果実への転流速度が増加することが

示唆された。口頭発表では果柄冷却による低温への転流応答についても紹介する。

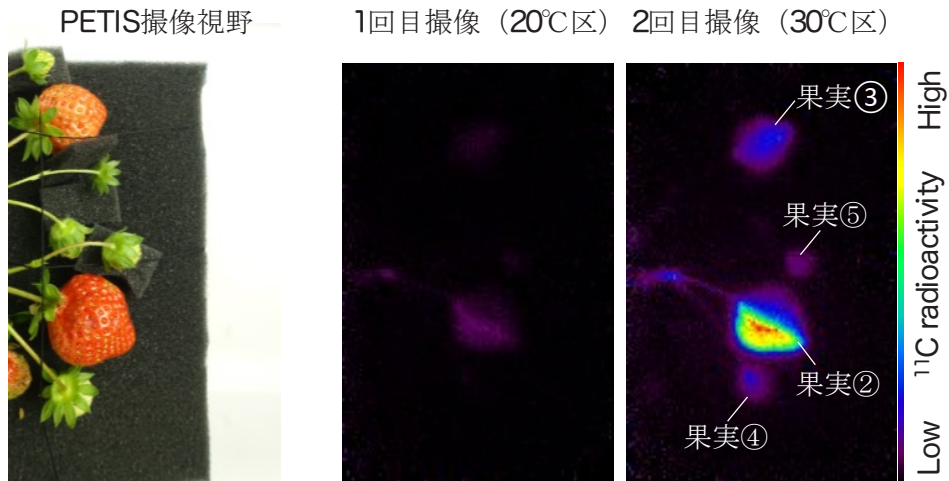


図1 PETIS 撮像視野に設置したイチゴ果実、および 20°C区と 30°C区における PETIS 撮像より得られた ^{11}C -光合成産物の分布画像。

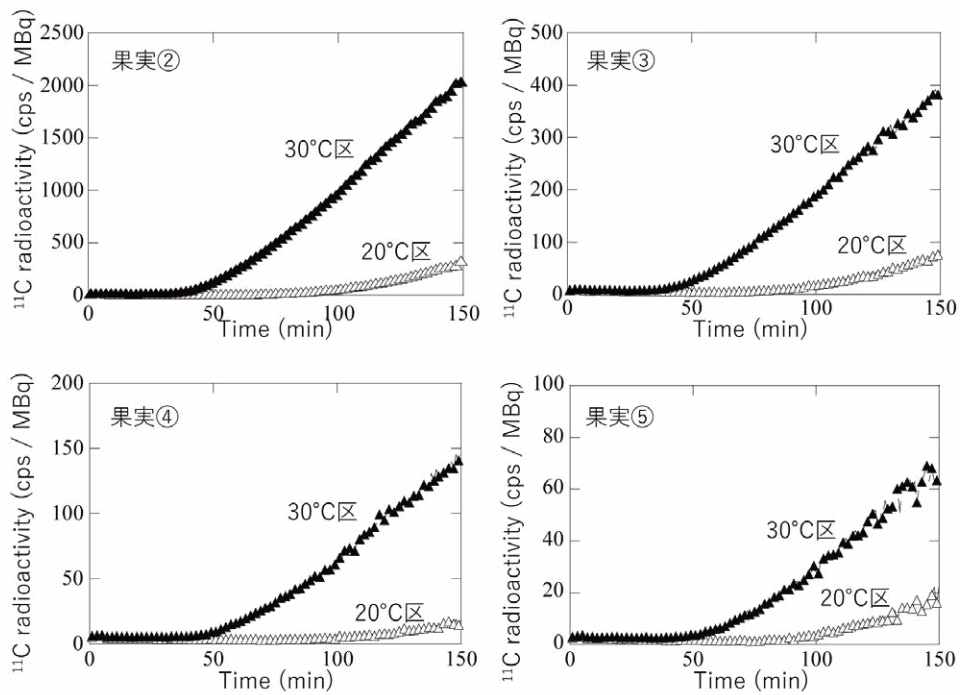


図2 果実②、果実③、果実④、果実⑤における 20°C区と 30°C区の ^{11}C 放射活性 (cps) の経時変化。0min は $^{11}\text{CO}_2$ の果房直下葉への投与時である。また全ての放射活性は果房直下葉の $^{11}\text{CO}_2$ の固定量 (MBq) で正規化されている。

ベトナム遺伝資源の利用

(遺伝資源の取得と管理についての研究)

深見 克哉

国立大学法人九州大学 有体物管理センター

(背景と目的) 海外の遺伝資源利用において、日本の研究者が必要になった遺伝資源毎に提供国国内法令の確認や共同研究者が居ればその研究者との交渉を行い、かなりの重層な手続きを経て入手する現状にある。今までの研究者間での研究材料の授受と違い、契約締結や法令遵守等の研究以外の作業がかなりの負担になることは明らかであり、事実、そうなっていることで研究を停止したりする事例も見られる。本事例研究では、ベトナムでの拠点の足場を持っている筑波大学と協働し、ベトナムの国立研究所である薬草研究所 (National Institute of Medical Materials (NIMM))とベトナムの私立大学であるフェニカ大学 (Phenikaa University)を対象にして、ベトナム遺伝資源の日本のアカデミアでの利用における包括利用の仕組み構築を試み、容易に研究のための遺伝資源取得が出来る新たな道筋を確立することが可能か、これらの連携を遺伝資源利用のプラットフォーム化できるかどうか検証することを目的としている。

(ベトナムの法令) ベトナムは、遺伝資源に関する国際条約について、1995年に生物多様性条約を、2014年に名古屋議定書の締約国となっている。しかし、植物遺伝資源に関する国際条約である食料及び農業のための植物遺伝資源に関する国際条約は未締約国である。名古屋議定書の第15条(取得の機会及び利益配分に関する国内法令又は規則の遵守)、第16条(遺伝資源に関する伝統的な知識の取得の機会及び利益配分に関する国内法令又は規則の遵守)に従い、ベトナム政府は遺伝資源の利用に関する政令(DECREE On The Management Of Access To Genetic Resources And The Sharing of Benefits Arising From Their Utilization (No.:59/2017/ND-CP))を2017年5月に施行した。これによると、本政令第20条(Requirements for Vietnamese students, doctoral students, or science and technology organizations who wish to transfer genetic resources abroad)に、ベトナム研究者等が海外の研究機関と共同研究する場合の特例が示されており、ベトナム研究者が必要書類を環境省担当窓口に提出することでベトナム遺伝資源の提供が可能になると定めてある。この条件については、幾つかの国においても同様にこのような研究振興を阻害することのない措置が取られており、提供国に共同研究者が居る場合、ある程度の遺伝資源入手に関する手続きの軽減がある。

九州大学農学研究院・有体物管理センターは、2017年3月(ベトナム国内法が措置される2ヶ月前)にベトナム薬草研究所とMOUを、続いて共同研究契約を締結し、ベトナムの薬草に関する共同研究を開始した。薬草については、当事者間の協議の結果、薬草2種類(ベトナムにおける伝統的薬用植

物の有用成分の特定とダイエット効果のある薬草の植生と潜在量の調査)をターゲットにして、その研究計画と期待される成果の社会実装を双方でイメージを共有して開始した。社会実装についてのイメージを共有することの意味は、利益配分に関する将来のイメージを共有することである。共同研究においては、単に研究成果の共有が非金銭的利益として理解されるが、その研究成果が社会的インパクトを持つ場合は、将来のトラブルになる可能性もあり、その点について十分な配慮をして進めている。本政令第20条に従い、分析を日本で行うための手続きを(現地共同研究者が)進め、これらの材料の薬草研究所とのMTAも締結し入手しての研究を進めている。このMTAについては、その他海外での国との遺伝資源入手において合意を得た雛型として研究者に共有している⁽¹⁾。

(今回の成果) 上述の背景を基に、研究を進めある程度の成果を得たので、その成果を共有し、今後の研究計画と契約の延長、遺伝資源(研究材料)の継続的提供について協議を行った。ベトナムの遺伝資源利用に関する政令において、伝統的知識の利用に関する定めも記載されていることから、ベトナム伝統的薬用植物については、成果の取扱いに双方で十分な配慮をもって進める必要も確認した。ダイエット効果のある薬草については、遺伝子解析による判別法を確立した報告を行い、今後サンプルの遺伝子解析による選抜(日本)と選抜株の成分抽出による薬効の確認(ベトナム)で作業分担を明確にして効率的に推進することとした。



薬草研究所と平行して、フェニカ大学の研究で、ベトナムの土地(農地)における課題として、化学物質の汚染があるが、これらの化学物質を資化する微生物の単離を成功していたことから、微生物処理におけるファイトレメディエーション(社会実装のための基礎研究)を共同で実施できないかの協議を行い、遺伝資源の授受には研究を進めていく上で特段の問題はなく、MTA案についても合意を得た。それぞれの機関における役割分担を検討した結果、概ね研究テーマとそれぞれの役割分担が合意され研究を進めていくことで、MOUの締結を急ぐこととした。MOUについての雛型の提供と先方の修正が完了し、双方での決裁へと進むことができた。また、今後の資金獲得のためSATREPSへの申請も進めることとした。今後、筑波大学、九州大学を含めた日本側の連携とベトナム側での連携体制を協議しながら、申請を進めていく。



今回の研究拠点の支援により、ベトナムの遺伝資源の授受の手続きや契約も双方が合意の上、簡便化・定型化が可能となったことの確認ができたことで、この事例をベトナムモデルとして研究者への共有を進めるとともに、これら共同研究プラットフォームを他大学でも利用可能な体制にしていく計画である。また、伝統的知識については、課題として薬草研究所との意見交換を継続していくが、伝統的知識の利用もハードルが高いものではないことも示すことができた。

(1) 「基礎研究における海外遺伝資源入手の際のMTA雛型」化学と生物、56巻,1号, p52-58, 2018

タマネギの鱗茎肥大メカニズム解明に向けた形質転換系の確立

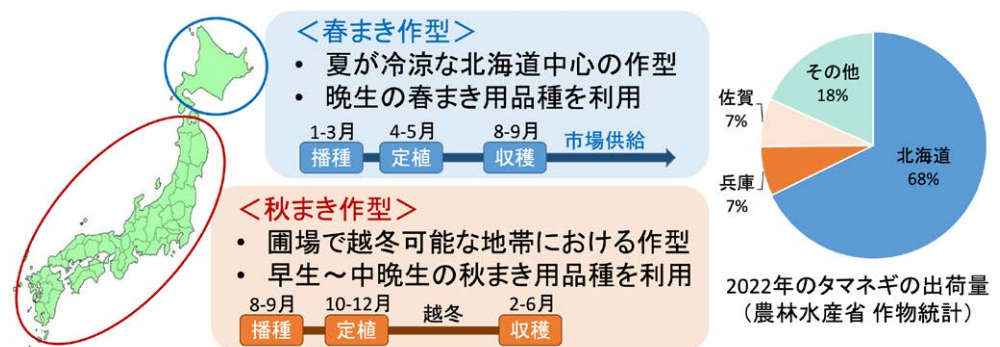
木内 大空¹、野中 聡子²、松倉 千昭²、○池田 裕樹¹

¹宇都宮大学農学部、²筑波大学 T-PIRC

ネギ属には約 500 種の植物が分類され、鱗茎や地下茎といった多様な形態を有し、経済的に重要である。その中でもタマネギ (*Allium cepa* L.) は、世界中で生産・消費されている、主要な野菜である。国際連合食糧農業機関 (FAO) と農林水産省の統計によると、2022 年に世界では約 1 億 1,000 万トンが、国内では北海道や兵庫県、佐賀県を中心に約 122 万トンが生産されている。

タマネギは可食部である鱗茎の肥大程度が、収量を決定づける最も重要な要素であることから、鱗茎を十分に肥大させることが栽培における主要な目標となる。我が国を含む北半球におけるタマネギの栽培方法は、春まき作型と秋まき作型の 2 種類に大別される (第 1 図)。国内の春まき作型は、夏季が冷涼で梅雨のない北海道が中心で、融雪後の 4~5 月に苗を圃場に定植し、8~9 月ごろに収穫する。一方の秋まき作型は、冬季の積雪が少ない本州から九州までの広い地域で行われており、10~12 月に苗を圃場に定植し、2~6 月ごろにかけて収穫する。これまでの研究で、播種日および移植日が遅れると、鱗茎が小さくなることが実証されている。そのため、いずれの作型においても、温度や日長といった栽培地の環境条件が生産性に影響するため、十分な収量を確保できる栽培時期は限られている。

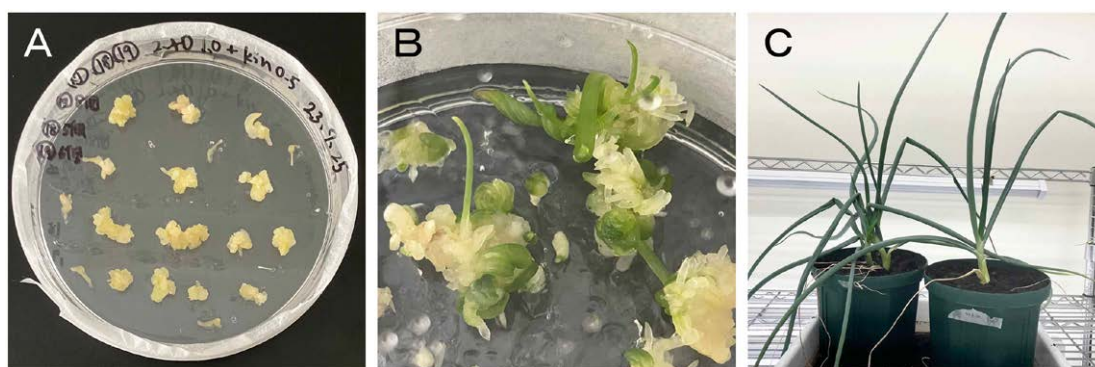
タマネギの鱗茎肥大は日長と温度によって制御されており、日長に関しては日長反応性遺伝子の 1 つである *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 様遺伝子が、鱗茎肥大に重要な役割を果たすとされている。タマネギではこれまでに、*AcFT* 遺伝子が少なくとも 6 遺伝子明らかにされているが、鱗茎肥大を制御しているのは 2 遺伝子である。このうち鱗茎肥大を促進する *AcFT1* の発現は、長日条件で上昇し、短日条件では減少する。一方、鱗茎肥大を抑制し、葉身の展開を促進する *AcFT4* は、短日条件で発現が上昇し、長日条件で減少する。演者らはこれまでに、露地栽培したタマネギにおいて両遺伝子の発現解析を行い、*AcFT1* および *AcFT4* の発現は、収穫期に向けてそれぞれ上昇および減少することを報告している。



また、シロイヌナズナにおいて概日リズムや開花を制御する *GIGANTEA* の相同遺伝子である *AcGI* を、鱗茎肥大に関する遺伝子として見出している。

シロイヌナズナにおいて *FT* 遺伝子は、FT タンパク質に翻訳された後、茎頂分裂組織へ移動して FD タンパク質と結合し、*API*、*FUL* 等のさらに下流で機能する遺伝子を制御する。前述のようにタマネギの *AcFT1* および *AcFT4* は、鱗茎の肥大を促進あるいは抑制しているが、*AcFT* 遺伝子の下流で機能する遺伝子については知見が不足している。演者らはこれまでに、タマネギの茎頂を含む組織(茎盤)において、*AcFT* 遺伝子の下流で鱗茎肥大を制御している鍵遺伝子が機能していると考え、研究を進めてきた。その結果、シロイヌナズナの花芽分化に関わる遺伝子の1つが、鱗茎肥大を制御する新たな候補遺伝子として見出された。そこで本共同利用・共同研究課題では、この遺伝子をタマネギにおいて過剰発現、あるいは発現を抑制させた形質転換体を作成し、機能証明を目指すことにした。一方でタマネギの形質転換体作出については、海外のグループによる研究報告があるものの、植物体の再分化や形質転換効率が非常に低い。また植物体の再分化や形質転換効率は、品種や植物ホルモンの種類・濃度に依存するが、現在日本国内で入手可能な品種を用いた知見は限られている。そこで形質転換体の作出に先立ち、国内で入手可能な品種を用いた、効率的な再分化系の確立を試みた。

再分化系の確立には、中晩生の固定種‘泉州黄’を用いた。種子を無菌播種し、播種1週間後に発芽した種子から根端組織を切り出し、カルス誘導のためのMS培地(1.0 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L kinetin)に静置した(第2図A)。培養開始から8週後にカルス誘導率を算出したところ、69.23%と比較的高い結果が得られた。その後カルスを細断し、カルス誘導培地で引き続き6週間培養した。培養後は、シュート再生のためのMS培地に移した(第2図B)。シュート再生培地は、ABAの濃度を0.125 mg/Lあるいは0.0625 mg/L、kinetinの濃度を0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/Lのいずれかとし、6通りの組み合わせで12週間培養した。その結果、0.125 mg/L ABA、1.5 mg/L kinetinのMS培地において、シュート再生率が100%となった。再生したシュートは発根培地で発根後に順化し、明期16時間/暗期8時間、25°Cで栽培した(第2図C)。現在は確立した再分化系を用いて、形質転換体の作出を進めている。



第2図 タマネギ品種‘泉州黄’を用いた再分化系の確立

A：根端組織からのカルス誘導、B：カルスからのシュート再生、C：順化
が完了した植物体

植物病抵抗性遺伝子を有するジャガイモ野生種を利用した

MESO 培地作用メカニズムの解明および物質の同定

牧 慎也¹、松本 敏一²、山本 伸一³、渡邊 和男⁴

¹長岡技術科学大学 技術科学イノベーション系、²島根大学 生物資源科学部、

³農研機構 遺伝資源研究センター、⁴筑波大学

ジャガイモ生産農家は、収量が高く、植物病原菌に対して強い抵抗性を持つ種芋を求めている。ジャガイモ種芋は、生産に6年以上長い年月がかかることから、地元栽培県などの調査・要望により、数年前から計画生産されている。しかしながら、コストを抑えるためにぎりぎりの生産体制をおこなっている為、ひとたび洪水・干ばつがおこると、種芋生産量は激減し、青果用、加工用含め日本国内消費をまかなう生産量を確保することが出来ない。記憶に新しいところでは、ポテトチップスが店頭から消えたり、異常に高騰した値段で店頭販売されたり、未知の植物病原菌が日本国内に侵入することを防ぐために、加工用に厳格に管理されている海外産を輸入せざるを得ない状況になってきている。それゆえ、未知の病原菌が日本の圃場に侵入するリスクが非常に高くなっている。さらに海外産を導入するときは数年間の契約が必要な場合も多々あり、国内生産量が回復した時の価格下落につながる事が予想され、栽培者の高齢化、後継者不足、作物の病害虫被害、肥料等栽培に関わる肥料高騰により収入減などの様々な理由が重なることにより、栽培をやめる農家が増加傾向にあり、店頭価格が高騰し続けていくことが予想されている。世界第3位のジャガイモ生産量を誇るウクライナから輸出が見込めないことから食糧が世界的にさらに高騰し続ける不安定要素も重なり、国民の安価な貴重な栄養源を得る機会を失いかけている。

我が国ではジャガイモ種芋は北海道で主に生産されているが、洪水・干ばつなど地球気候変動により、近年、5か年のうち2年、九州地方では3割ジャガイモ種芋が不足している。九州地方で栽培されているサツマイモ生産はさらに基腐れ病などの植物病原菌が蔓延し、鹿児島県で生産量が毎年30%減少している。有効な解決策である種芋・ウイルスフリークローン種苗が絶対的に不足している。

ジャガイモ種芋生産方法はGHQが生産方法を指導したのが始まりで、NARO種苗管理センターが現在も生産しているが、50年以上前の栽培方法と大きな変更はない。

ウイルスフリークローン種苗は本来植物が持っている最大限の能力を発揮できるため、収量が高く、霜などの被害にも強く、世界中で利用されている。しかしながら、冷暖房設備、専用の栽培環境設

備が必要なためコストが高い。我々が開発した MESOS 技術を応用した種苗生産技術は、冷暖房設備や光調整専用設備を不要として、SDG s 循環型社会を実現できる革新的種芋・種苗生産技術である。

MESOS は、スーパーコンピューターを活用した画期的なウイルスフリー種苗を生産する独創的技術である。MESOS を発展させた技術は低コストで安定してウイルスフリークローン種苗・種芋生産が可能となり、食糧の安定供給を身近に感じることが可能である。

日本にジャガイモがもたらされたのはスコットランドからといわれている。そのため、寒いところに育つ特性を持つ。日本で品種改良を重ねられ、新しい品種が数多く開発されているが、植物病原性を有していない品種が、特に九州地方で主に栽培されている。本研究では、筑波大学が保有している植物病原性抵抗性品種を MESOS 培地に適用し、有効性を確認した。さらに、今後の品種改良さらには、植物病防除のための知見を得るために、熱分解型 TOF-GC/MS 分析装置にて、植物病抵抗性物質の同定を試みた結果について報告する。



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



2017-2020 Plant Transgenic Design Initiative
©形質転換植物デザイン研究拠点

