
ERAプロジェクト調査報告

March 2021

バイオテクノロジー研究会



特定非営利活動法人

国際生命科学研究機構

International Life Sciences Institute Japan

International Life Sciences Institute, ILSI は、1978年にアメリカで設立された非営利の団体です。ILSI は、科学的な視点で、健康・栄養・安全性・環境に関わる問題の解決および正しい理解を目指すとともに、今後発生する恐れのある問題を事前に予測して対応していくなど、活発な活動を行っています。現在、世界中の400社以上の企業が会員となって、その活動を支えています。多くの人々にとって重大な関心事であるこれらの問題の解決には、しっかりとした科学的アプローチが不可欠です。ILSI はこれらに関連する科学研究を行い、あるいは支援し、その成果を会合や出版物を通じて公表しています。そしてその活動の内容は世界の各方面から高く評価されています。アメリカ、ヨーロッパをはじめ各国で、国際協調を目指した政策を決定する際には、科学的データの提供者としても国際的に高い信頼を得ています。特定非営利活動法人国際生命科学研究機構（ILSI Japan）は、ILSI の日本支部として1981年に設立されました。ILSI の一員として世界的な活動の一翼を担うとともに、日本独自の問題にも積極的に取り組んでいます。

まえがき

2021.3

バイオテクノロジー研究会

2021年の調査報告書第1号（通算第54号）をお届けします。

本号では、遺伝子組換え技術を用いた報告として、No.530でアイスプラントの遺伝子を利用した耐塩性ユーカリの作出を、鉄含有量を増加させたコムギ（No.531）及びキャッサバ（No.533）の作出を、No.534で miRNA を利用した草型改良により、収量を増加させたダイズの作出を、No.535で乾燥耐性を向上させたワタの作出を紹介しています。ジャガイモ疫病についての報告が2つあり、No.536で3つのジャガイモ疫病菌抵抗性遺伝子を導入させ、完全に抵抗性を導入したことによって収量が増加した研究を、No.538でジャガイモ疫病抵抗性遺伝子を導入したジャガイモは土壌微生物相へ影響を与えなかったことを紹介しています。また、No.537でナタネの種子の発育における母系組織と接合性との関係の研究を紹介しています。

さらに、遺伝子流動について2つの研究を紹介しています。No.539で遺伝子組換えナタネ（*B.napus*）から交雑可能なアブラナ（*B.rapa*）への除草剤抵抗性遺伝子の流動についての調査を報告し、No.532で遺伝子組換えトウモロコシからメキシコ在来のトウモロコシへの遺伝子流動はなかったと報告しています。

なお、これまでの調査報告書は、以下の URL で閲覧可能です。<http://www.ilsijapan.org/ILSIJapan/COM/Rcom-bi.php>

目次

No.530	新規耐塩性ユーカリの開発と評価—アイスプラント由来の RNA 結合タンパク質遺伝子の使用による分子育種の適用— Development and evaluation of novel salt-tolerant <i>Eucalyptus</i> trees by molecular breeding using an RNA-Binding-Protein gene derived from common ice plant (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.)	1
No.531	代謝工学的的手法によるパンコムギ種子（穀粒）の鉄含量及び生物的可給態鉄の増加系統の作出 Metabolic engineering of bread wheat improves grain iron concentration and bioavailability	2
No.532	組換えトウモロコシ交雑種からメキシコ在来種への遺伝子流動に伴う仮想的リスクの評価 Assessment of potential impacts associated with gene flow from transgenic hybrids to Mexican maize landraces	3
No.533	鉄輸送体及び鉄含有タンパク質の発現技術に基づく圃場生育キャッサバの生物的特性の強化 Biofortification of field-grown cassava by engineering expression of an iron transporter and ferritin	4
No.534	<i>GmmiR156b</i> の操作によるダイズの草型及び収量の遺伝的向上 Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soya bean plants via the manipulation of <i>GmmiR156b</i>	5
No.535	組換えワタにおけるシロイヌナズナ由来の E3 ユビキチンリガーゼ <i>HUB2</i> によるヒストン H2B のモノユビキチン化とそれに伴う乾燥耐性の向上 An <i>Arabidopsis</i> E3 ligase <i>HUB2</i> increases histone H2B monoubiquitination and enhances drought tolerance in transgenic cotton	6
No.536	野生種由来の 3 つのジャガイモ疫病抵抗性遺伝子のバレイショ品種への多重導入による現地疫病菌レースに対する完全抵抗性の作出 Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races	7
No.537	ナタネ (<i>Brassica napus</i> L.) 種子重の母系的制御：莢のサイズ（母親、ソース）と種子（子、シンク）との間の生物的連関 Maternal control of seed weight in rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.) : the causal link between the size of pod (mother, source) and seed (offspring, sink)	8
No.538	シスジェニックバレイショのは場栽培は土壤微生物叢に具体的な影響を与えない No tangible effects of field-grown cisgenic potatoes on soil microbial communities	9
No.539	イミダゾリノン系除草剤抵抗性の雑種ナタネ (<i>B.rapa</i> × <i>B.napus</i>) の遺伝型分析 Molecular characterization of imidazolinone-resistant <i>Brassica rapa</i> × <i>B.napus</i> hybrids	10

Development and evaluation of novel salt-tolerant *Eucalyptus* trees by molecular breeding using an RNA-Binding-Protein gene derived from common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.)

新規耐塩性ユーカリの開発と評価—アイスプラント由来のRNA結合タンパク質遺伝子の使用による分子育種の適用—

Tran NT *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 801-811

日本の大学（筑波大、農工大）及び企業（日本製紙）の研究者による原著論文である。森林は地球の炭素循環の重要な役割を有するが、近年は330万ヘクタール/年ずつ減少しつつある。一方、耕地の塩類集積も増加中であり、2050年には耕地の50%がNaCl塩害土壌となると危惧されている。このため、林木の植栽・植林は極めて重要である。ユーカリはオーストラリア原産で600種あるが、主要10種は熱帯～亜熱帯に広く分布・栽培され、パルプ原料、材木、薪材、境界樹、エッセンシャルオイルなどに使用されている。以上の状況から著者らは、NaCl耐性組換えユーカリの作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 組換えユーカリの作出：アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) は、北・南西アフリカに自生する塩生植物であり、乾燥・塩類地帯に適応している。アイスプラントが有するNaCl耐性遺伝子 *McRBP* を特定し、アグロバクテリウム法によりユーカリに導入し、組換え系統が作出された。同遺伝子は複数のRNAシャペロンの役割を有していた。
- (2) 高濃度塩類ストレスに対する耐性の検定：高濃度ストレスに対する急性耐性を検定するために、400 mM NaCl 灌水土壌で栽培試験を行った（ポット栽培）。土壌EC（電気伝導度）は1週間で14 mS/cm、2週間で20 mS/cm、4週間で20 mS/cm以上、6週間後の再吸水2週間で6 mS/cmへと低下した。組換え・非組換え区とも生育は一時的に停止された。植物体健康度指標として用いた光合成量子収量（QY）は、最初の3週間で70.1～74.6%から55.1～67.5%、4週間で33.6～47.3%、最終第6週目は、17.1～55.8%へと低下した。組換えの有無に有意差はなかった。また再灌水による回復もなかった。6週間後の無傷害の茎頂の比率（平均値）は組換え区が71.4%で対照の38.1%より有意に高かった。6週間再灌水後では、非組換え区が全葉萎凋したのに対し、組換え区では萎凋は軽度で緑色を維持し、高濃度塩類ストレスへの耐性が明示された。
- (3) 中程度塩類ストレスに対する耐性の検定：将来の植林・植栽候補地帯への適応性検定を視野に、中程度ストレスの70 mM NaCl 灌水土壌試験を行った（ポット栽培）。土壌ECは8週間で9.0 mS/cm、次の16週間も8.2～9.1 mS/cmであった。1ヶ月後の再灌水で3.5 mS/cmへと低下した。QY値は2週間で63.7～77.3%、20週間後の組換え区は47.3～63.3%で対照の14.8～35.2%より有意に高かった。塩処理期間中のバイオマス生産量（比数）は組換え区が8.0～10.0で対照の4.6～6.0の1.6倍であった。15週間後の葉身Na含量は組換え区が対照より30%低かった。6ヶ月間両区とも生存したが、非組換え区には塩害が散発したが、組換え区には皆無であり完全な耐性を示した。
- (4) 総括：アイスプラント由来の耐塩性遺伝子 (*McRBP*) が導入された組換えユーカリが作出された。急性高濃度塩類ストレス条件（400 mM NaCl 灌水区）では組換えユーカリの70%以上が生育を維持したが、非組換えユーカリでは40%が委凋した。慢性中程度塩類ストレス条件（70 mM NaCl 灌水区）では両区とも6ヶ月間生育したが、組換えユーカリは非組換えユーカリより生育・健康度など明らかに優れた耐性を示し、将来の植林・材料としての可能性を示した。
(林 健一)

Metabolic engineering of bread wheat improves grain iron concentration and bioavailability

代謝工学的手法によるパンコムギ種子（穀粒）の鉄含量及び生物的可給態鉄の増加系統の作出

Beasley JT *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 1514-1526

オーストラリアの大学及び米国農務省国研の研究者による原著論文である。コムギ種子はデンプン（60～75%）、タンパク質（12～14%）及び微量の無機養分（鉄、亜鉛など）を含有している。現在、東南アジア、中近東、北アフリカなどの20億の人々、特に婦人及び子供で無機微量栄養素が欠乏している。既往育種では有効な遺伝資源がなく、対応が遅れている。著者らはイネ科植物に多く見られる微量金属元素のキレート分子であるムギネ酸の前駆体であり、かつそれ自身もキレート分子であるニコチアミンの合成酵素遺伝子を利用したバイオテクによる無機養分増強コムギ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) 組換えコムギ系統の作出：コムギ品種 Bobwhite にイネ *nicotianamine synthase2* (*OsNAS2*) 遺伝子をパーティクルボンバードメント法で導入し、6つの T1 イベント（CE-1、CE-5、CE-7、CE-8、CE-13、CE-15）を得た。CE-1 及び CE-5 は表現型において対照と差異がなかった。CE-1、CE-8、CE-13、CE-15 は種子鉄含量が、また CE-5 は種子亜鉛含量（いずれも T2 世代）が対照より有意に高かった。組換えイベントの代表として CE-1 を選定し、T3～T6 にわたり各種特性を調査した。ヌル分離体と野生型とは差異がなく、以後の対照としてヌル分離体を定めた。
- (2) 登熟期における各組織の鉄及び亜鉛蓄積：種子及び苞葉（Brad）は開花～成熟にわたって、鉄及び亜鉛濃度がヌル分離体よりもより高かった。穂軸（rachis）及び止葉の鉄及び亜鉛は、登熟中期まで高く、成熟期には低下して対照と差がなかった。バイオマスには CE-1 と対照とは有意差がなかった。
- (3) 種子内の鉄及び亜鉛の分布：鉄は種子内胚乳全体に分布し、亜鉛はアリューロン層及び粒溝に分布していた。
- (4) 他の無機物の分布：リンはアリューロン層に局在し、内胚乳の鉄とは隔離されている。硫黄は CE-1 では澱粉層でヌル分離体より低下したが内胚乳では差がなかった。銅とマンガンの分布と蓄積量には特徴的なものはなかった。
- (5) 圃場試験：以上のガラス室試験に加えて、オーストラリア内 2ヶ所の圃場試験を行った。主要表現型形質（草丈、穂数、バイオマス、千粒重、収量）には CE-1 と対照との間には有意差はなかった。全粒の鉄及び亜鉛は対照より有意に高かった。ニコチアミン及びムギネ酸も対照より有意に高かった。精白粉の鉄及び亜鉛並びにニコチアミン及びムギネ酸も CE-1 が対照より有意に高かった。
- (6) 生物的可給態鉄：全粒粉の可給態鉄は微少であり対照と差がなかった。これはフィチン酸などの粒の外側の有害物質の影響と思われた。対照的に精白粉の可給態鉄は CE-1 が対照より有意に高かった。可給態鉄はニコチアミンと $r = +0.711$ 、ムギネ酸と $r = +0.812$ 、の正の相関を示した。しかし鉄含量とは有意な相関を示さず、可給態鉄を決定するのはニコチアミン及びムギネ酸であることを示した。
- (7) 総括：途上国で多発している無機微量栄養素欠乏症を軽減するために、イネ由来の *OsNAS2* 遺伝子を導入した組換えコムギ系統が作出された。組換え系統は種子及び精白粉で対照より高い鉄及び亜鉛含量を示した。精白粉の可給態鉄は金属のキレーターであるニコチアミン及びムギネ酸と有意な正の相関を示した。これらの情報はコムギの品質向上育種に貢献すると考えられる。
(林 健一)

Assessment of potential impacts associated with gene flow from transgenic hybrids to Mexican maize landraces

組換えトウモロコシ交雑種からメキシコ在来種への遺伝子流動に伴う仮想的リスクの評価

Duncan B *et al.*

2019

Transgenic Research 28: 509-523

バイエル社（米国・メキシコ）の研究者による原著論文である。2015年のGMトウモロコシの世界栽培面積は6,060万 haに達し、米国（92%）、ブラジル（88%）、アルゼンチン（78%）などに広く栽培され、多収、農薬減少、利益増加などで貢献している。メキシコはトウモロコシの原産地及び多様性の中心であり、全農地の28%、750万 haにトウモロコシを栽培しているが、なお全需要量の1/3を輸入に頼っている。栽培の2/3は開放受粉の反覆による多様な在来種（landraces）で構成されている。しかし、GMトウモロコシの導入については在来種に対するインパクトに対する根深い懸念が存在し、認可されていない。著者らは試験的にGM特性を導入したメキシコ在来種を作出し、圃場試験によりその各種特性を精査し、以下の結果を得た。

- (1) 試験材料の作出：代表的メキシコ在来種として、広範かつ対称的特性を有する2つの品種（Tuxpeño及びTabloncillo）が選出された。GMトウモロコシとして、MON89034（害虫抵抗性（Cry1A.105・Cry2Ab2））及びMON88017（害虫抵抗性（Cry3Bb1）及び除草剤耐性（CP4 EPSPS））のスタック系統である市販産物VT3Proが選出された。本総合特性の在来種への導入は伝統的戻し交配（在来種を反覆親）3世代により実施され、最終的に特性導入在来種TuxpeñoVT3Pro及びTabloncillo VT3Pro、並びに各対照Tuxpeño control及びTabloncillo controlが作出され、圃場試験に供された。さらに参考品種として広範囲の在来10品種が加えられた。
- (2) 圃場試験：米国2ヶ所（アリゾナ州・テキサス州）、2ヶ年（2015・16）各区4反覆、参加14系統・品種について以下の特性を精査した。
- (3) 記述的特性：雄穂色比（白：赤）；穂軸色比（白：赤）；殻粒色比（白：やや黄：やや赤）のすべてにおいてGM特性導入在来種とその対照との間には有意差はなかった。
- (4) 表現型特性（農業特性）：解析された22特性（開花及び絹糸抽出まで日数、雄穂長及び分枝数、緑色維持、穂高、草丈、脱落穂、茎及び根の倒伏、苗立ち数、最終株数、穂長、穂直径、穂軸直径、粒高、粒列数、一穂粒数、100粒重、殻粒含水率、殻粒容積重（kg/100l）、収量（kg/ha））のうち、粒列数を除くすべてにおいて、GM特性導入在来種は対照に対し有意差を示さなかったのに対し、対照品種間では粒列数を含む多くの特性で有意差が認められた。参考品種は、以下の特性において導入在来種よりはるかに大きい変異を示した：開花・絹糸抽出日数、雄穂分枝数、穂高及び草丈、粒高、粒列数、一穂粒数、収量。
- (5) 殻粒成分：基本特性（タンパク質、脂肪、灰分、炭水化物）、可溶性炭水化物（ショ糖、グルコース、フラクトース）において、導入在来種は対照に対し、有意差を示さなかった。
- (6) その他の特性：病害虫に対するストレス耐性、導入特性のメンデルの法則への適合など、対照との間に有意差はなかった。
- (7) 総括：GMトウモロコシ2大特性（害虫抵抗性及び除草剤耐性）が試験的に導入されたGM特性導入メキシコ在来トウモロコシが作出された。同導入在来トウモロコシは非導入の在来対照トウモロコシに対し、記述的表現型、農業的表現型、殻粒成分などで有意差を示さなかった。これにより、非意図的・取扱いミスなどでメキシコ在来トウモロコシ（landraces）に導入されたGM特性は、同在来種の表現型特性等を変化させないことが示された。このことはメキシコへのGMトウモロコシの導入に関する討議において考慮されるべき事項と考えられる。

（林 健一）

Biofortification of field-grown cassava by engineering expression of an iron transporter and ferritin

鉄輸送体及び鉄含有タンパク質の発現技術に基づく 圃場生育キャッサバの生物的特性の強化

Narayanan N *et al.*

2019

Nature Biotechnology 37: 144-151

米国の大学・国研・研究所、プエルトリコの大学、ナイジェリアの国研の研究者による原著論文である。現在世界の8億の人がキャッサバを食料とし、サハラ砂漠以南の人々の3分の1は、必要カロリーの50%以上をキャッサバから摂取している。キャッサバは、デンプン含量は高いが、鉄及び亜鉛含量は低い。幼児及び妊婦の多くは鉄及び亜鉛欠乏症（貧血、免疫低下、認知症、下痢）などを発症している。著者らは、バイオテクによる鉄及び亜鉛増加キャッサバ系統の作出に基づく栄養改善を目的に研究し、以下の結果を得た。

- (1) 組換えキャッサバ系統の作出：新系統 A：シロイヌナズナ由来の液胞膜局在性鉄輸送体 (*VIT*) 遺伝子を導入した組換え系統（系統 A と略記）、新系統 B：シロイヌナズナ由来の鉄輸送体 (*IRT1*) 遺伝子及び鉄含有タンパク質 (*FER1*) 遺伝子を導入した組換え系統（系統 B と略記）を以下の圃場試験に供した。
- (2) 圃場試験：系統 A 及び B ならびにその対照系統をプエルトリコ大学隔離圃場で2014～2017年に通常栽培し、各種特性を調査した。
- (3) 組換え系統 A 及び B の各種特性：系統 A：生育12ヶ月を通じて、根及び茎葉バイオマス、根収物含有率、根域収穫指数などにおいて対照と有意差を示さなかった。10/15系統の鉄含量は対照の3～7倍高かった。亜鉛の増加率は低かった。系統 B：16ヶ月の期間にわたり、生育・表現型に対照と差はなかった。根の鉄及び亜鉛含量は対照の5～6倍、鉄含量は対照の $10 \pm 2 \mu\text{g/g}$ 乾物重に対し 55 ± 13 、亜鉛は対照の 5 ± 1 に対し 26 ± 12 に達した。葉の鉄含量は対照の2～3倍高かったが亜鉛含量は差がなかった。
- (4) 他の無機金属の吸収：系統 A は銅、マンガン、ニッケルが微量増加したが、カドニウムは検出限界未満の低含量であった。系統 B も銅、マンガンが微増したがニッケル、カドニウムは検出限界未満の低含量であった。
- (5) 鉄及び亜鉛の存在組織：系統 A 及び B とともに、鉄及び亜鉛は茎及び根の維管束組織に存在していた。
- (6) 挿穂 (stake cutting) による継代栽培：12ヶ月後の収穫物において、系統 A の鉄含量は対照の6～7倍の $62 \pm 14 \mu\text{g/g}$ 乾物重を示し、亜鉛含量も微増した。系統 B の鉄含量は $80 \mu\text{g/g}$ 乾物重、亜鉛は $60 \mu\text{g}$ に達した。系統 A 及び B の鉄及び亜鉛含量は継代前の前作に匹敵しており、栄養体継代栽培が保証された。
- (7) 生物学的可給性 (Bioaccessibility)：ヒトがキャッサバを摂食・消化し、キャッサバに含まれる鉄及び亜鉛がどれくらい栄養素として利用可能かについて検討した。小児及び妊婦に対する現在の供給量は鉄が必要量の5～8%、亜鉛は13～14%にすぎない。新組換えキャッサバでは、標準的な摂食により、鉄は必要量の65～75%、亜鉛は60～70%を供給できると推定された。
- (8) 総括：シロイヌナズナ由来の鉄輸送体遺伝子及び鉄含有タンパク質遺伝子の導入による組換えキャッサバが作出された。本系統はアフリカの幼児及び妊婦に対し、必要量の鉄40～50%、亜鉛は60～70%を供給できると推定された。本結果はサツマイモなどの他の根菜類の育種にも参考になると考えられる。

(林 健一)

Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soya bean plants via the manipulation of *GmmiR156b*

GmmiR156b の操作によるダイズの草型及び収量の遺伝的向上

Sun Z *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 50-62

中国の大学・国研の研究者による原著論文である。ダイズはタンパク質及び油脂の供給源として世界的に栽培されている重要作物であり、とくに多収性は長年の大課題である。作物の草型 (Architecture) は多収性における最重要特性であり、とくに枝條の分枝性 (branching) は草型の重要因子である。しかし、草型の機能の研究は少なく、多収性育種は停滞している。著者らは草型を一元的に制御する機能を有する遺伝子を特定し、これの導入による改良草型多収ダイズ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) ダイズ草型の特徴：ダイズは特徴的草型を有し、各節に葉・花・莢を有する。そのため理想的草型では、分枝性 (branching：分枝数・長さ・角度) と縦方向生育 (茎構成主要節) との間の協調が必須となる。草型は、腋芽分裂組織 (axillary meristem; AM) と茎頂分裂組織 (shoot apical meristem; SAM) とのバランスにより構成される。
- (2) 組換え系統の作出：植物生育の鍵となる *miR156b* は草型及び分枝性に関与している。ダイズ品種 Williams82 に、花浸漬法によるアグロバクテリウム媒介法により *miR156b* 発現カセットを含む T-DNA を導入し、自殖 4 代を経て生育良好な T₄ 系統 (*miR156b*OE-5 系統 (系統 A) 及び *miR156b*OE-11 (系統 B)) が作出された。
- (3) 圃場試験 (2 段階の栽培密度 (40×40 及び 50×50 cm) の差異による影響はなかった)。1 株分枝数は両系統とも 12~15 で、対照非組換え体の 8~9 より有意に多かった。草丈には有意差はなかったが、茎は対照より太く頑丈で、各器官も全般的に大であった。
- (4) 収量特性 (系統 A・系統 B・対照の順に列記)：株莢数：210・200・170 (組換え体-対照間に有意差あり)；1 株種子数：440・400・340 (有意)；100 粒重：21・20・17 (有意)；1 株収量：85・75・55 (有意；増収 63%・46%)。タンパク質及び油脂含量は、組換え体-対照間に有意差なかった。
- (5) 3 小葉葉間期：組換え系統は対照より小葉の分化・生長が早く、葉間期も対照の 4.5 日 / 葉に対し両系統とも 3.5 日 / 葉と短縮していた。主茎を含めた総葉数は両系統とも対照より 20% 増加していた。
- (6) SAM 及び AM の活性 (ポット試験)：発芽後 15 日の幼植物の枝條頂点は対照よりはるかに大きく、また側壁に小型の腋芽を発生していた。SAM 及び AM とともに両系統では対照より生育が促進されていた。
- (7) 草型の分子的基盤：各種の検討の結果、2 種類の主要因子 (*GmSPL9D* 及び *GmWUSs*) が協同して草型を遺伝子レベルで構築していることが示された。
- (8) 総括：ダイズ由来の *GmmiR156b* 遺伝子を導入した改良草型ダイズ系統が作出された。本系統は草型の改良及び増収の成果に加えて、以下の諸特性の向上をもたらした。i) 頑丈な茎による倒伏耐性の増強、ii) 粒数・粒大の増加による収量増加、iii) 葉間期縮小による全葉数の増加に基づく総光合成量の増加によるシンク器官への同化産物の補給の確保、iv) 収穫種子の品質 (タンパク質・油脂) 保持、などである。本研究により多収ダイズ育種の一つの方向が示されたと評価される。

(林 健一)

An *Arabidopsis* E3 ligase *HUB2* increases histone H2B monoubiquitination and enhances drought tolerance in transgenic cotton

組換えワタにおけるシロイヌナズナ由来の E3ユビキチンリガーゼ *HUB2* によるヒストン H2B のモノユビキチン化とそれに伴う乾燥耐性の向上

Chen H *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 556-568

中国の大学・国研の研究者による原著論文である。1950年以来、0.13℃/10年の気温上昇及び雨量減少により、世界農地の10%が砂漠化し、50%以上の減収を生んでいる。ワタは、繊維は織物原料、種子は食用油の給源として、重要な作物である。主として、中国新疆省、南アフリカ、中央アジアなどの乾燥熱帯地域に栽培されている。乾燥耐性ワタの育種は優れた遺伝資源が乏しく、停滞している。著者らはバイテク手法による乾燥耐性組換えワタの作出を試み、以下の結果を得た。

- (1) シロイヌナズナ由来の E3ユビキチンリガーゼ *HUB2* の役割：*HUB2* は、ヒストン H2B を、モノユビキチン化する機能を有する。これにより、植物の種子休眠性、開花調節、防御反応、乾燥耐性の制御など、広範囲な機能に参与している。
- (2) *AtHUB2* 遺伝子の特定と組換えワタ系統の作出：乾燥耐性遺伝子として *AtHUB2* を特定し、クローニングを経てアグロバクテリウム法によりワタ品種 CCRI24 に導入し、T₀ 世代12個体を得た。自殖により T₂ 世代3系統（系統2、系統4、系統6）を作出し、各種の乾燥耐性検定に供試した。
- (3) シロイヌナズナ（野生型）による予備検定：（省略）
- (4) 組換えワタ系統の乾燥耐性検定（ガラス室試験）：通常灌水栽培4週間後に灌水停止による乾燥処理を行った。20～28日後には対照（非組換え）はかなりの萎凋を示した。35日後では対照は完全に萎凋したが、組換え区はなお緑葉を維持し、萎凋も少なかった。再灌水1週間後の生存率は、対照の48%に対し、組換え区では80～98%であった。可溶性糖、プロリン、葉身含水率も、組換え区が対照より高かった。以上から、*AtHUB2* がワタの乾燥耐性向上に参与していることが示された。
- (5) 組換えワタ系統農業特性の乾燥耐性検定（防水枠圃場試験）：5系統（対照、組換え3系統、参考品種 ZR409）を供試。防水枠内で播種後3ヶ月の灌水停止乾燥処理を行った。農業特性値（対照、組換え区）は、草丈（cm）：50、70～90；着果枝数：9、11～12；着果率（%）：25、35～45；脱落幼果（%）：70、50～60。以上から、組換えワタ系統農業特性の乾燥処理による対照に対する向上が示された。
- (6) 総括：シロイヌナズナ由来の E3ユビキチンリガーゼ遺伝子 *AtHUB2* の導入により、乾燥耐性組換えワタ系統が作出された。同系統の農業特性（草丈、着果枝数、着果率、脱落幼果など）は乾燥条件下で対照に対し、顕著な向上を示した。本結果は、今後の乾燥耐性作物育種に有用な情報を与えると考えられる。

（林 健一）

Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races

野生種由来の3つのジャガイモ疫病抵抗性遺伝子のバレイショ品種への多重導入による現地疫病菌レースに対する完全抵抗性の作出

Ghislain M *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 1119-1129

CGIAR 傘下の国際バレイショセンター（CIP：ケニア・ペルー）及びウガンダの国研研究者による原著論文である。バレイショ（*Solanum tuberosum* L.）のジャガイモ疫病（late blight：LB）は180年前にアイルランドバレイショ飢饉をもたらし、200万人の死者を出した大病害である。現在でも全世界栽培面積1300万 ha のうち途上国 2～300万 ha で15～25%の減収を生じている。ウガンダでは零細農家が13～57%の減収をうけ、唯一の対抗策である農薬散布によりコスト増及び健康障害が生じている。既往の育種では抵抗性、収量性が不十分で効果が上がっていない。著者らは野生種由来の耐病性遺伝子（*R* 遺伝子）の三重スタック系統による LB 抵抗性バレイショの作出を試み以下の結果を得た。

- (1) 組換えバレイショ系統の作出：定評ある LB 抵抗性に基づいて、野生種 *S.bulbocastanum* から 2 遺伝子（*RB* 及び *Rpi-blb2*）及び、*S.venturii* からの 1 遺伝子（*Rpi-vnt1.1*）の *R* 遺伝子を特定し、それぞれ単独及び三重スタック遺伝子として市販バレイショ品種 Desirée 及び Victoria に導入した。当初の組換えイベントは Desirée 由来が331、Victoria 由来が149であった。さらに、ベクターバックボーンの不在、3つの *R* 遺伝子の存在、*nptII* 単一コピーの存在、LB に対する高度抵抗性の存在、などの指標について選抜し、最終的に三重スタック遺伝子系統の代表として、Desiree 由来26系統、Victoria 由来15系統を選出した。
- (2) 組換えバレイショ系統の LB 抵抗性（ガラス室接種試験）：LB 単離病原系統 POX067による接種試験を行った単一 *R* 遺伝子系統の抵抗性は 3～9%と極めて低率であった。しかし三重スタック系統の LB 抵抗性は75%に上昇した。
- (3) 組換えバレイショ系統の LB 抵抗性（隔離圃場試験）：LB 自然発生条件下の抵抗性が検定された。非組換え Desirée 及び Victoria では、LB は植付け30～45日後から発生し、発生20日後にすべて枯死した。しかし、三重スタック系統は全く発病せず100%の完全抵抗性を示した。黄熟期でも病変葉はなく、土壌中の塊茎は羅病せずに次期栽培へと継承されたと考えられた。
- (4) 無農薬隔離栽培における形態的特徴及び収量：第2・第3隔離栽培において、塊茎表皮・外層・形態では異状は認められなかった。第4隔離栽培で収量が測定され、三重スタック系統は Desirée 背景が29 t/ha Victoria 背景が45 t/ha の収量（国内平均の3～4倍）が記録された。
- (5) 総括：バレイショ 2 野生種から同定された 3 種類の抵抗性遺伝子（*R* 遺伝子）の三重導入スタック系統が 2 市販品種を背景として作出された。同三重スタック系統は接種試験で75%、圃場試験では100%の LB 完全抵抗性を示し、29～45 t/ha（国内平均収量の3～4倍）の収量を記録した。ウガンダ国内の市場化承認が可及的速やかに終了し、本三重スタック組換え系統の農業栽培の実験が望まれる。

(林 健一)

Maternal control of seed weight in rapeseed (*Brassica napus* L.) : the causal link between the size of pod (mother, source) and seed (offspring, sink)

ナタネ (*Brassica napus* L.) 種子重の母系的制御：莢のサイズ（母親、ソース）と種子（子、シンク）との間の生物的連関

Li N *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 736-749

中国の国研研究者による原著論文である。種子は遺伝的に異なる3つの器官からなっている。2倍体胚（接合体）・3倍体胚乳（接合体）・2倍体種皮（母系組織）である。しかし、ナタネ種子の発育における母系組織と接合体との関係は未解明である。著者らはこの関係を組織的に研究し、以下の結果を得た。

- (1) 大粒種子系統（L系統）及び小粒種子系統（S系統）の作出：ナタネ品種 Zhongshuang11及びNo.73290との交雑種第2代（F₂）1150個体から、千粒重5.5g以上及び3.5g以下の10個体を選び、自殖・選抜を繰り返し、F₈~F₉世代からL集団（平均千粒重6.67g）及びS集団（平均千粒重3.12g）を選出した。さらに代表的大粒系統として、L_RIL₀₉₇₄（L系統）、代表的小粒系統として、S_RIL₁₁₄₈（S系統）が選定された。
- (2) L系統及びS系統間の自殖及び交雑F₁の各種特性値：大粒系統（L×L及びL×S）及び小粒系統（S×S及びS×L）の各種特性におけるF₁値は以下の通りであった。
 - i) 形態的特性：種子直径（mm）2.19・2.19：1.81・1.84；種子表面積（mm²）15.08・15.08：10.24・10.60；種子容積（mm³）5.51・5.51：3.08・3.25、3特性に対する母系効果は、大粒系では1.00・0.99・0.99、小粒系では0.92・0.93・0.93であった。以上を通じ、各特性に対する母系遺伝子型が卓越した影響を与えることが明示され、また、正逆交雑間の有意差はなかった。
 - ii) 細胞学的特性：大粒系と小粒系との有意差は、種皮細胞数・子葉サイズ・子葉細胞数に存在し、種皮細胞サイズには存在しなかった。母系効果は、大粒系では0.78・0.82・0.49；小粒系では0.99・1.00・0.78であった。母系効果が特に細胞数に大きいことが示された。
- (3) 環状剥皮試験：開花後25日及び35日の登熟期に小花梗節管部に環状剥皮処理を行った。最終種子重は処理の有無の間には差異がなく、緑葉及び茎からの光合成産物の供給は激減し、実質的には莢の光合成産物が登熟期の種子への光合成産物の供給源であることが示された。
- (4) 莢壁面光合成の役割：開花25日後（光合成最盛期）の各種特性値を調査した。L系統とS系統の間には、光合成率（ $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ ）には有意差はなかった。しかし、前者は後者より莢表面積が有意に大であり、これはさらに莢長が有意に長いことに起因していた。さらに光合成産物である可溶性糖及びデンプンについては、含有率にはL系統とS系統間には有意差がなかった。しかし、1種子当たりあるいは1莢当区総含量では、前者が後者より有意に大であり、これが最終種子量の有意差の基となっていた。いずれも母系遺伝子の効果が顕著であった。
- (5) 総括：ナタネ種子重の自然変異の原因を知るために、大粒系統（L系統）と小粒系統（S系統）が作出され、各種の組織的研究が実施された。L系統はS系統より、細胞数増による種子サイズの増大、莢長増大による莢表面積（光合成面積）の増大などいずれも母系遺伝子の効果による量的増大が顕著に示された。本結果は、今後のナタネの収量（種子重）育種に有用な情報となることが期待される。

(林 健一)

No tangible effects of field-grown cisgenic potatoes on soil microbial communities

シスジェニックバレイシヨのほ場栽培は土壤微生物叢に具体的な影響を与えない

Krause SM *et al.*
2020

Frontier in Bioengineering and Biotechnology 8: 603145

ドイツ、アイルランドの公的研究機関及び中国、ベルギーの大学研究者による原著論文。バレイシヨは最重要非穀物作物であり、その最大の病害はジャガイモ疫病である。著者らは、バレイシヨ近縁野生種の疫病耐性遺伝子（*R* 遺伝子）をバレイシヨ栽培種に導入したシスジェニックバレイシヨを作出し、土壤微生物叢への影響について評価した。

- (1) 抗性遺伝子：バレイシヨ近縁野生種 *S.venturii* から同定された *R* 遺伝子 (*Rpi-vnt1.1*) を用いた。*S.venturii* は栽培種バレイシヨ (*Solanum tuberosum* L.) と交雑可能であることから、*S.venturii* 由来の遺伝子のバレイシヨへの導入は欧州の定義によるシスジェニック作物に該当する。
- (2) 植物材料：i) 慣行疫病菌抵抗性品種 Sarpo Mira (SM)。ii) 栽培種品種 Desirée (デジレー) (罹病性)。iii) 品種デジレー-clone A15-031：品種デジレーに *S.venturii* 由来の *R* 遺伝子を導入したもの (シスジェニック)。
- (3) 試験地：i) アイルランド：3 x 3 m の区画、2013と2014年の2回実施。ii) オランダ：6 x 6 m の区画、2014年のみ。各試験ほ場の土壤の化学的特性：pH はアイルランドは6.5-7.1、オランダは4.5-4.8。炭素量はオランダの方が高く、窒素量は同等であった。
- (4) 微生物量：微生物の量は、土壤から抽出した試料の定量 PCR 分析によって評価した。標的配列は、細菌及び古細菌の16S rRNA、細菌の硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*、*nirS*)、糸状菌の ITS 領域である。いずれも、試験地や年の違いによる変動はあるものの、SM、デジレー、及びシスジェニックデジレーの間での大きな違いはなかった。
- (5) 多様度：細菌の16S rRNA 及び硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*、*nirS*) の増幅断片について、次世代シーケンサによる配列解析をし、配列情報をもとに分類し、その分布構造を調べた。いずれも、試験地や年の違いによる変動はあるものの、SM、デジレー、及びシスジェニックデジレーの間での大きな違いはなかった。
- (6) 主成分分析：試験地、年と多様度 (16S rRNA、*nirK*、*nirS*) を統合した主成分分析を行ったところ、いずれの多様度の指標においても、試験地 x 年 (アイルランド2013年、アイルランド2014年、オランダ2014年) の3群で大分され、品種差やシスジェニックの有無による違いは殆どないことが示された。
- (7) 総括：全体的に見て、シスジェニックな改変は、バレイシヨ根圏における土壤微生物叢の多様性に対して具体的な影響を与えていないことが示された。

(小口 太一)

Molecular characterization of imidazolinone-resistant *Brassica rapa* × *B.napus* hybrids

イミダゾリノン系除草剤抵抗性の 雑種ナタネ (*B.rapa* × *B.napus*) の遺伝型分析

Carbonell FT *et al.*

2020

Environmental Monitoring and Assessment 192, 746

アルゼンチンの大学研究者による原著論文。2008年より、アルゼンチンではイミダゾリノン系除草剤耐性組換えナタネ (*B.napus*) の商業栽培が認可・開始されているが、ナタネ栽培地域には、ナタネと交雑可能なアブラナ (*B.rapa*) が存在する。両者の花成期は重なることから、花粉によるジーンフローの可能性が考えられる。著者らは、イミダゾリノン系除草剤耐性組換えナタネの栽培地の近傍から採取したアブラナ集団のイミダゾリノン系除草剤耐性評価及び耐性個体の遺伝型分析を行うことで、イミダゾリノン系除草剤耐性組換えナタネ栽培区からのジーンフローについて調査した。

- (1) 植物材料：アルゼンチン・バルカルセ近郊で、2008年、イミダゾリノン系除草剤耐性組換えナタネ (Nexera 8450) と慣行品種 Gospel を大規模栽培している農地の近傍で組換えナタネと慣行品種の両方の栽培区に挟まれる地点2か所 (BAL1、BAL2) で自生するアブラナから種子を採取した。
- (2) イミダゾリノン系除草剤耐性試験：BAL1、BAL2より採取した種子を温室内でセルトレイに播種し、2-3葉ステージになったところで、イミダゾリノン系除草剤を噴霧し、生存率を調査した。生存率は、BAL1で10.64%、BAL2で3.64%であった。また、別地域で採取したアブラナでは生存率0%、Nexera 8450種子は生存率100%であった。
- (3) 遺伝型解析：2つのSSRマーカーによる多型解析、及 *BnAHAS3* 遺伝子 (組換え体には、イミダゾリノン系除草剤非感受性の変異型 *BnAHAS3* が導入されている) の遺伝型解析の結果、BAL1及びBAL2から採取されたイミダゾリノン系除草剤耐性個体は全て *B.rapa* とイミダゾリノン系除草剤耐性組換え *B.napus* との雑種第一代であることが示された。
- (4) 総括：イミダゾリノン系除草剤耐性組換えナタネ栽培区に隣接地から見つかったイミダゾリノン系除草剤耐性個体は全て *B.rapa* とイミダゾリノン系除草剤耐性組換え *B.napus* の雑種第一代の交雑種であることから、圃場周辺のアブラナにみられたイミダゾリノン系除草剤耐性は、イミダゾリノン系除草剤耐性組換えナタネに由来すると結論した。交雑可能な野生種が存在する場合は、花粉を介した遺伝子流入による耐性獲得個体の管理が組換え体を用いた雑草防除における優位性を維持するためには留意が必要である。

(小口 太一)

ERA プロジェクト調査報告

2021年 3月 印刷発行

特定非営利活動法人
国際生命科学研究機構 (ILSI JAPAN)

会 長 宮澤陽夫

理事長 安川拓次

〒102-0083東京都千代田区麴町3-5-19

にしかわビル5F

TEL 03-5215-3535

FAX 03-5215-3537

[http:// www.ilsijapan.org](http://www.ilsijapan.org)