
ERAプロジェクト調査報告

June 2022

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

2022.6

バイオテクノロジー研究会

2022年の調査報告書第2号（通算第59号）をお届けします。

本号では、遺伝子組換え技術を用いたイネに関する報告として、*ureide permease1* 遺伝子の過剰発現による窒素化合物（アラントイン）の蓄積による窒素制限条件下でのイネ生育の改善（No.577）、イネの乾燥耐性・塩類耐性授与におけるアクチン脱重合因子の役割（No.578）、中国南部での高収量・高品質のジャポニカ型イネ品種の育成を目標としたインディカ型イネ由来の *Hdl1* 遺伝子の利用（No.581）、*Xa13* 遺伝子に対して CRISPR/Cas9 を用いた白葉枯病抵抗性イネを作出する新育種法（No.582）について紹介しています。その他に、圃場における *Bt* ワタの害虫集団及び葉食害に与える影響に対する隣接作物の多様性の関与（No.579）、CRISPR/Cas9 を用いた *SUAZ2* 遺伝子のゲノム編集による斑葉細菌病抵抗性トマトの設計（No.580）、乾燥・熱・塩類に対する耐性の一斉強化による半乾燥農業地域におけるワタの繊維収量倍増戦略（No.583）、原形質膜タンパク質の発現による広範囲病害虫抵抗性組換えダイズの作出（No.584）について報告しています。

また、バイオテク作物と微生物の相互作用に関する論文として、No.585では遺伝子組換えタバコを用いたサツマイモ Agrocinopine Synthase による Agrocinopine A の生産とその根圏微生物群集への影響について、No.586ではポプラのリグニン改変の圃場栽培が内圏（endosphere）細菌叢に与える影響について紹介しています。

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.577	<i>ureide permease1</i> の過剰発現によるアラントイン蓄積は、窒素制限条件におけるイネの生育を改善する Allantoin accumulation through overexpression of <i>ureide permease1</i> improves rice growth under limited nitrogen conditions	1
No.578	イネの乾燥耐性・塩類耐性授与におけるアクチン脱重合因子の役割—塩生植物 smooth cordgrass (<i>Spartina alterniflora</i>) 由来の <i>SaADF2</i> のイネ相同遺伝子 <i>OsADF2</i> に対する優越性— An actin-depolymerizing factor from the halophyte smooth cordgrass, <i>Spartina alterniflora</i> (<i>SaADF2</i>), is superior to its rice homolog (<i>OsADF2</i>) in conferring drought and salt tolerance when constitutively overexpressed in rice	3
No.579	圃場における <i>Bt</i> ワタの害虫集団及び葉食害に与える影響に対する隣接作物の多様性の関与 Neighbouring crop diversity mediates the effect of <i>Bt</i> cotton on insect community and leaf damage in fields	5
No.580	CRISPR/Cas9を用いた <i>SUAZ2</i> 遺伝子のゲノム編集による斑葉細菌病抵抗性トマトの設計 Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of <i>SUAZ2</i>	6
No.581	中国南部での高収量・高品質日本型イネ品種の育成を目標としたインディカ型イネ由来の <i>Hd1</i> 優性アレルの利用 Using <i>Heading date 1</i> preponderant alleles from <i>indica</i> cultivars to breed high-yield, high-quality <i>japonica</i> rice varieties for cultivation in south China	8
No.582	新イネ育種法: <i>Xa13</i> に対する CRISPR/Cas9手法の適用による (外来遺伝子不在の) バクテリア葉枯れ病抵抗性イネの作出 A new rice breeding method: CRISPR/Cas9 system editing of the <i>Xa13</i> promoter to cultivate transgene-free bacterial blight-resistant rice	10
No.583	乾燥・熱・塩類に対する耐性の一斉強化による半乾燥農業地域におけるワタの繊維収量倍増戦略 Towards doubling fiber yield for cotton in the semiarid agricultural area by increasing tolerance to drought, heat and salinity simultaneously	12
No.584	原形質膜タンパク質の発現による広範囲病害虫抵抗性組換えダイズの作出 Overexpression of a plasma membrane protein generated broad-spectrum immunity in soybean	14
No.585	遺伝子組換えタバコを用いたサツマイモ <i>Agrocinopine Synthase</i> による Agrocinopine A の生産とその根圏微生物群集への影響 Production of Agrocinopine A by <i>Ipomoea batatas</i> Agrocinopine Synthase in Transgenic Tobacco and Its Effect on the Rhizosphere Microbial Community	16
No.586	ポプラのリグニン改変の圃場栽培が内圏 (endosphere) 細菌叢に与える影響 Lignin engineering in field-grown poplar trees affects the endosphere bacterial microbiome	18

Allantoin accumulation through overexpression of *ureide permease 1* improves rice growth under limited nitrogen conditions

ureide permease 1 の過剰発現によるアラントイン蓄積は、窒素制限条件におけるイネの生育を改善する

Redillas MCFR *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 1289-1301

韓国の大学研究者による原著論文である。現在農業では、窒素肥料の多用による作物増産が一般的である。禾穀類では1961年から2006年の間に窒素施肥量は約10倍となっている。しかし、作物は施肥された窒素の約半分しか吸収できず、過剰に施肥された窒素は、環境汚染の原因となっている。作物は種の特性に依拠して吸収・利用する窒素化合物が異なる。イネは、アンモニア態窒素を主体としているが、硝酸態、アミド態、アラントイン (*ureide*) 態も吸収することが知られる。

(1) アラントインの特性

アラントインはプリン代謝産物で、安定な窒素化合物の一つである。Ureide permease (UPS) は、植物の窒素吸収・貯蔵・転流に介在する酵素である。著者らは、イネの *OsUPS1* 遺伝子の過剰発現によるアラントインの生成を種々の窒素条件下で精査し、以下の結果を得た。

(2) 内生 *OsUPS1* 遺伝子の発現

- 1) 時期及び器官：幼植物の葉では生育7日未満でピークとなり、その後生育にともない減少した。器官別では、葉より、茎・根・花で発現が高かった。
- 2) 窒素誘導性：生育3週間後の水耕試験で、窒素投与に12時間以内で迅速に発現誘導が観察され、*OsUPS1* の発現は環境の窒素条件に依存することを示した。

(3) *OsUPS1* アクチベーションタギングシステム (*OsUPS1^{ox}*) の特性

OsUPS1 遺伝子の1.1 kbp 上流に4×35S エンハンサーを含むアクチベーションタグが挿入されたタギングシステム (*OsUPS1^{ox}*) が得られたので、その特性を解析が行われた。

- 1) *OsUPS1* 発現：幼植物 (生育1週間) の葉における発現量は対照より有意に高かった。成熟期 (開花2週間) の上位葉・止葉・穂における発現量は対照より有意に高かった。
- 2) アラントインの含量：成熟期 (開花2週間) では、アラントインの含量も対照より有意に高かった。
- 3) 生育 (ポット試験)：窒素量を対照区の50% に制限した栽培条件で、*OsUPS1^{ox}* システムの植物体は対照システムに対し、草丈・葉緑素含量・分けつ数・バイオマス (茎+26%、根+20%) が有意に高かった。以上から、*OsUPS1^{ox}* システムは、窒素制限に対して適応性を有することが確認された。

(4) *OsUPS1* 全身性過剰発現組換えシステム (*OsUPS1^{GOS2}*) 及び RNAi 組換えシステム (*OsUPS1^{RNAi}*) の特性

品種日本晴由来の *OsUPS1* を植物体全身で構成的発現を誘導する *GOS2* プロモーターにつないだ発現カセットを含む T-DNA をアグロバクテリウム法で品種 Dongjin (ジャポニカ型) に導入し、安定した T₃ 系統 (*OsUPS1^{GOS2}*) を得た。また、対象として *OsUPS1* 遺伝子の RNAi 組換え系統 (*OsUPS1^{RNAi}*) 同時に作出した。成熟期の *OsUPS1^{GOS2}* 系統のアラントイン含量は、穂・葉・茎・根のいずれの器官においても、対照より有意に高かった。一方、*OsUPS1^{RNAi}* 系統では、すべての器官のアラントイン含量が対照より有意に低かった。また、*OsUPS1^{GOS2}* 系統は20%水準で対照より有意に高い粒充実度を示し、低窒素条件下への高い適応性が示された。

(5) 総括

イネアクチベーションタギング系統及び組換え系統を用い、*OsUPS1* 遺伝子の発現と各種窒素条件におけるイネ体内のアラントイン含量の変化及び生育を調査した。アラントイン含量は、栄養生長期の茎葉や成熟期の穂など、窒素シンク器官として活発な組織において有意に高くなることが示された。以上から、*OsUPS1* の発現に基づくアラントインの生成により、窒素制限条件下におけるイネの生育が支持・助長されることが確認された。

(林 健一)

An actin-depolymerizing factor from the halophyte smooth cordgrass, *Spartina alterniflora* (*SaADF2*), is superior to its rice homolog (*OsADF2*) in conferring drought and salt tolerance when constitutively overexpressed in rice

イネの乾燥耐性・塩類耐性授与におけるアクチン脱重合因子の役割
—塩生植物 smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*) 由来の
*SaADF2*のイネ相同遺伝子 *OsADF2*に対する優越性—

Sengupta *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 188-205

米国の大学及び国研研究者による原著論文である。植物細胞の立体構造は細胞骨格の動態により決定されている。細胞骨格の主要部分は線維状アクチン (F アクチン) のネットワークで構成されている。アクチン結合タンパク質 (ABPs) は生育・環境対応している細胞骨格に柔軟性を与える。アクチン脱重合因子 (ADFs) は広く存在する低分子の ABPs であり、植物において一つのタンパク質ファミリーを構成している。著者らは、塩生植物 smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*; 和名ヒガタアシ) 由来の *ADF* 遺伝子 (*SaADF*) 導入による環境ストレス (乾燥・塩) 耐性向上イネの作出を試み、以下の結果を得た。

(1) *SaADF* と *OsADF* の構造の特徴

- 1) 類似点: アミノ酸配列では *SaADF* と *OsADF* は、95%以上の相同性を示した。原形質における局在状況にも差異はなかった。
- 2) 相異点: *ADF* の基本的構造 (中央の渦巻と軸系) は *SaADF* と *OsADF* との間で大差はない。N 末端の第 6 軸系は *SaADF* が *OsADF* より F 型環で約 2 倍長く外へ突出しており、弾力的に広範囲に展開することで F アクチンとの結合性を高めている。この長い F 型環構造が他の多くの特性の基本的根拠と考えられる。
- 3) 生化学的・遺伝子的優越性: *SaADF* は *OsADF* に対し、多くの特性において優越性を示している。例えば、*in vitro* 活性における広い pH 域への適応及び高機能、光合成などの一般的代謝経路における関連遺伝子の発現などである。

(2) 組換えイネの作出

ヒガタアシは、海水の 2 倍濃度の塩類集積土壤に適応している。著者らは、ヒガタアシ由来の *SaADF* 遺伝子、または、イネ由来の *OsADF* 遺伝子をアグロバクテリウム法によりイネ (品種日本晴) に導入し、自殖により安定した同型接合 F₂ 系統—*SaADF2*-OE (*Sa* 系統と略記) 及び *OsADF2*-OE (*Os* 系統と略記) —を得た。

(3) 組換えイネの乾燥耐性

乾燥処理: 生育 50 日イネ (穂ばらみ前期) に 7~14 日の乾燥処理を行った。

- 1) 生育・生長: *Sa* 系統は *Os* 系統及び対照に対し、葉の萎潤、茎及び稈長の生育低下が少

なく、また再灌水により正常生育回復も早く、乾燥耐性の向上が認められた。

- 2) 相対含水率及び気孔伝導度：乾燥処理7日後の含水率は、Os系統及び対照は41～45%に低下したが、Sa系統は65～70%を維持した。草丈・バイオマスでも同様であった。Sa系統は気孔開度を適度に維持し体内水分を適度に保つ能力が相対的に高かった。
- 3) 葉緑体・葉緑素・光合成能力：乾燥処理7日後でもSa系統の葉緑体は正常であり、また葉緑素含量及び光合成能力でも他2系統より高かった。
- 4) 農業特性（乾燥処理による各形質における低下・減少率をSa系統・Os系統・対照の順に列記）：分けつ数：28・41・45%、穂数：30・50・70%、粒数：18・26・53%、稔実粒数、11・66・88%、1株収量：31・70・76%。

以上から、Sa系統はOs系統及び対照に対し、栄養生長期・生殖生長期は勝り、有意に高い頻度で乾燥耐性を有することが示された。

(4) 組換えイネの塩類耐性

水耕栽培3週間のイネに1週間の高濃度処理（150 mM NaCl）を行った。Sa系統はOs系統及び対照に対し、葉緑素含量、光合成能力、相対的含水率、気孔伝導度などが有意に高くより高い塩類耐性を示した。

(5) 総括

塩生植物由来及び通常イネ由来の組換えイネのアクチン脱重合因子、ADFについて、比較研究が行われた。前者は後者より、乾燥及び高塩条件における光合成能力、収量などを有意に改善した。ADFに注目した本研究結果は、今後の環境ストレス耐性作物の研究に有効な情報を与えることが期待される。

(林 健一)

Neighbouring crop diversity mediates the effect of *Bt* cotton on insect community and leaf damage in fields

圃場における *Bt* ワタの害虫集団及び葉食害に与える影響に対する 隣接作物の多様性の関与

Liu Y · Luo Z

2019

Transgenic Res 28: 357-367

中国及びオーストラリアの国研研究者による原著論文である。GM作物が他の生物との農業生態系に広範囲・長期に与える影響を理解することは極めて重要である。著者らは中国北部の広範な *Bt* ワタ圃場について、周辺圃場との農業生態系における害虫及び雑草の変化の動態を調査して、以下の結果を得た。

(1) 調査計画

中国の *Bt* ワタ栽培は1997年に始まり、現在360万 ha に達している。本報告では、中国北部3省（河北省、河南省、山東省）計27ワタ圃場（*Bt*22+非 *Bt*5）計134万 ha（中国ワタ栽培面積の30.9%）を調査地域とした（2012年）。

(2) *Bt* ワタ圃場及び非 *Bt* ワタ圃場における害虫

ワタ580個体、葉 42.5×10^3 枚から、合計 15.8×10^3 害虫を確認した（ワタ1個体当たり平均42個体）。分類可能な害虫の種数は37種で、優占害虫は、*Bemisia tabaci*（和名タバコナジラミ）（42.3%）、*Aphis gossypii*（和名ワタアブラムシ）（34.0%）、以下7種、上位10種は *Bt* ワタ圃場の30%以上で確認された。*Bt* ワタ圃場は非 *Bt* ワタ圃場より害虫種数が有意に低かったが、害虫総数では有意差はなかった。両圃場間には構成種の種類に差があり、これは上位4種の差に起因していた。標的害虫 cotton bollworm（和名オオタバコガ）の蛹数/個体は *Bt* ワタ0.70、非 *Bt* が0.37で有意差はなかった。

(3) *Bt* ワタ圃場及び非 *Bt* ワタ圃場における雑草

Bt ワタ圃場では34種、 6.69×10^3 個体の雑草が確認された。優占種は、オヒシバ（28.4%）、メヒシバ（25.6%）、以下スベリヒユなど全10種である。これら10種は全圃場の19%以上で確認された。各圃場では平均5.30種、76.9雑草個体が確認された。雑草個体数、種の数、多様性については、*Bt* ワタ圃場と非 *Bt* ワタ圃場との間には有意差はなかった。

(4) *Bt* ワタ圃場及び非 *Bt* ワタ圃場の広葉雑草に対する葉食害

優占8種の広葉雑草に対する葉食害は平均値10.6%であり、草種間に有意差があった。食害葉比率は *Bt* が9.17%、非 *Bt* が15.20%で有意差があった。

(5) ワタ及び隣接作物に対する草食害

葉食害は *Bt* が10.19%、非 *Bt* が10.63%で有意差はなかった。12種類の隣接作物に対する葉食害の平均値は10.58%であった。しかし、葉の食害には作物の種類により大差があり、最大の被害はナス（29.9%）、キャベツ（21.3%）、以下ダイズ（18.5%）、サツマイモ（17.6%）、ダイコン（17.5%）と続き、最低被害はソルガム（1.39%）、トウモロコシ（1.38%）であった。また、ワタの葉への食害は、隣接作物があった方が無い孤立栽培より低かった。

(6) 総括

中国北部の広範囲調査により、*Bt* ワタの害虫、雑草、葉への葉食害を精査し、これらの要因の隣接作物への影響を解析した。*Bt* ワタは加害害虫集団の多様性を低下させ、これにより広葉雑草及び隣接作物への葉食害を低下させた。*Bt* ワタ圃場と非 *Bt* ワタ圃場との間のオオタバコガ総数における有意差の縮小は、対象害虫の抵抗性の獲得を一因とすると考えられた。以上を総合して、*Bt* ワタの広域栽培は、害虫集団、雑草、隣接作物への草食害を低下させていると結論された。同時に、*Bt* 作物の栽培に際しては、隣接作物、害虫、雑草、当該 *Bt* 作物の役割に関する総合的考慮の重要性が示された。

(林 健一)

Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of *SUAZ2*

CRISPR/Cas9を用いた *SUAZ2* 遺伝子のゲノム編集による
斑葉細菌病抵抗性トマトの設計

Ortigosa A *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 665-673

スペインの国研及びフランスの大学の研究者による原著論文である。

(1) Tomato bacterial speck disease (トマト斑葉細菌病) の発生

本細菌病は *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (*Pto*) により、中温 (15~25°C)・高湿で発生し、トマトの葉・果実に小褐斑点を多発し、収量・品質を低下させ、経済的損失を与える世界的病害である。

(2) 褐斑病抵抗性

葉の表皮組織は細菌との接触により急速に気孔を閉口し、これは植物ホルモンのサリチル酸 (SA) が介在する。これにより細菌の細胞内部への侵入を阻止している。細胞内部の抵抗性には別の植物ホルモンのジャスモン酸 (JA) が介在する。一般に SA は biotrophic (生物組織依存) 微生物 (例: 細菌病) への抵抗性を、また JA は necrotrophic (壊死組織依存) 微生物 (例: *Botrytis* 菌) への抵抗性を、それぞれ制御している。SA と JA との間には強い拮抗作用が存在し、一方が強化されれば他方は弱化する。このためバランスがとれた高度の抵抗性は達成されていない。

(3) 斑葉細菌病の新戦略

斑葉細菌病は細胞内部への侵入・増殖のための新戦略を展開した。斑葉細菌病の病原菌は感染時に、JA 類似活性を持つ毒素コロナチン (COR) を産出し、COR は SA による防御機能を抑制することで、気孔を再開口させて、病原菌の細胞内部への侵入・増殖を増進させた。この戦略は外来細菌による宿主内発的ホルモン防御網の変更を示唆している。

(4) ゲノム編集手法の適用

近年、著者らはシロイヌナズナで COR への応答機能が完全に抑制された突然変異 (*AtJAZ2jas*) を見出した。そこで本変異をゲノム編集手法によりトマト品種に導入し、気孔の再開口を行わない斑葉細菌病抵抗性システムの作出を試み、以下の結果を得た。二重 gRNA の誘導により、トマト品種 Moneymaker の目標部位に二重突然変異を誘発し、相同 2 突然変異システム (L_1 及び L_2) を得た。本操作はトマト *SUAZ2* 遺伝子に対するゲノム編集手法の適用であり、得られた突然変異は安定的に T_1 及び T_2 システムに発現し、後代に伝達されていた。

(5) ゲノム編集システム (*Sljaz2jas*) の特性

- 1) COR 応答の完全抑制: COR 応答を完全に抑制し、気孔の再開口の抑制が確認された。
- 2) 葉の蒸散作用への無影響: 植物体脱水率及び葉温の測定から植物体の蒸散には影響していないことが示された。

- 3) 斑葉細菌病抵抗性の獲得、接種試験により、褐斑の発生は対照より顕著に少なく有意に高い抵抗性が示された。
- 4) necrotrophic 菌への抵抗性には変化なし：Botrytis 菌に対する抵抗性には変化が無かった。以上からゲノム編集により与えられた抵抗性は気孔部位に局在し、他の部位・機能には影響していないことが確認された。

(6) 総括

トマト斑葉細菌病抵抗性に関与する2つの植物ホルモン（SA と JA）との間の拮抗作用を発現しない突然変異系統が、ゲノム編集手法により作出された。作出系統は本バクテリア病に対して強い抵抗性を示し、斑点の出現は対照より有意に低かった。本成果は、ゲノム編集手法による植物ホルモン間の拮抗作用の抑制効果を示すものであり、同手段の適用は有用な情報を与えることが期待される。

(林 健一)

Using *Heading date 1* preponderant alleles from *indica* cultivars to breed high-yield, high-quality *japonica* rice varieties for cultivation in south China

中国南部での高収量・高品質日本型イネ品種の育成を目標とした
インディカ型イネ由来の *Hd1* 優性アレルの利用

Leng Y *et al.*

2020

Plant Biotechnology Journal 18: 119-128

中国の国研、中国・IRRI 共同研究室の研究者による原著論文である。*Heading date 1* (*Hd1*) は、イネの出穂期を決定する重要遺伝子である。しかし、その品種間の変異が収量・品質に及ぼす影響についての網羅的研究は少ない。著者らは、1) *Hd1* の遺伝的変異、2) 変異関連特性に關与するアレル、3) 収量・品質向上育種のためのアレルの利用、について幅広い研究を行い、以下の結果を得た。

(1) 供試品種

1936~2009年の育種品種136 (インディカ型69品種、ジャポニカ型54品種) を用いた。

(2) 収量関連特性の変異 (結果は、インディカ型: ジャポニカ型の順で示す)

出穂まで日数...54~117: 66~100、分けつ数...5.6~14.2: 5.5~12.0、一株粒数...59.5~247.3: 71.4~207.4、千粒重...17.6~28.8: 19.6~38.4

(3) *Hd1* の多様性

ハプロタイプ総数19、うちジャポニカ型10 (*H4*、*H5*、*H8*~13、*H17*、*H20*)、インディカ型9 (*H2*、*H3*、*H6*、*H7*、*H14*~16、*H18*、*H19*)、最も主要なハプロタイプは、*H8* (30品種)、*H13* (9品種)、*H14* (12品種)、*H15* (26品種)、*H16* (24品種) であった。主要5種類のうち、2種類はジャポニカ型、3種類はインディカ型に属していた。また、アミノ酸配列では、*Hd1* タンパク質は17種類の多型に分類され、うち10種類は機能型、残り7種類は機能欠失型であった。

(4) *Hd1* のハプロタイプの年次的変遷

全期間をI期 (1936~1969)、II期 (1970~1993)、III期 (1993~2009) に分割して解析した。1) ジャポニカ型: 主要タイプ *H8* は、選抜頻度・発現レベルとも、3期の間に差は少なかった。2) インディカ型: I期の主要ハプロタイプは *H15*、III期は *H14* 及び *H16* であった。特にIII期における二次枝梗数の増加が顕著な育種目標であったことが示された。

(5) ジャポニカ型・インディカ型イネの交雑による *Hd1* アレルの改良

ジャポニカ型イネは中国南部 (長日区域) では出穂期が短縮して生育不十分となり減収する。そこで、インディカ型の *Hd1* アレルをジャポニカ型に導入することで出穂期を遅延させることで収量向上が期待された。このため、ジャポニカ型・インディカ型イネの交雑が実施され、以下の結果が得られた。ジャポニカ型品種の *hunjiang06* (種子親) (*Hd1* 型は *H8*) にイ

ンディカ型品種の Taichung native 1 (花粉親) (H16) を交雑し、BC₄F₅系統 (Q77系統) を選出した。Q77系統は種子親品種に対し、出穂期が一週間延長された。さらに、1 株粒数 (+29.50%)、1 株分枝数 (+2.31%)、二次枝梗数 (+3.77%)、1 株粒重 (+18.50%)、1 穂粒重 (+0.54%) の増加を示した。品質では、Q77は種子親品種に対し、アミロース含量、ゲル品質の維持、食味には差がなく、受入親の良節性が維持された。以上からインディカ型アレルの導入によりジャポニカ型の出穂期を延長し、品質を変更せずに増収するジャポニカ型イネの作出の可能性が実証された。

(6) 総括

出穂期遺伝子 *Hdl* が収量関連特性に与える影響について、1936～2009年の中国育成イネ123品種について各種の調査を行った。*Hdl* は19のハプロタイプ (H2～H20) を有し、ジャポニカ型では H8・H13、インディカ型では H14・H15・H16が主要であった。日印交雑では、良品質維持・出穂期延長・増収系統が選出された。以上から、*Hdl* のインディカ型アレルをジャポニカ型イネに導入することで、中国南部 (長日区域) におけるジャポニカ型イネの多収化の可能性が示された。

(林 健一)

A new rice breeding method: CRISPR/Cas9 system editing of the *Xa13* promoter to cultivate transgene-free bacterial blight-resistant rice

新イネ育種法：*Xa13*に対する CRISPR/Cas9手法の適用による
(外来遺伝子不在の) バクテリア葉枯れ病抵抗性イネの作出

Li C *et al.*

2020

Plant Biotechnology Journal 18: 313-315

中国の大学研究者による短報である。CRISPR/Cas9手法は、モデル植物のシロイヌナズナへの適用 (2013) 以来、多くの農業関連形質における改良に適用されている (例：葉色、粒の品質、種子稔性、草型など)。これらの殆どは遺伝子領域における単一突然変異に基づいている。イネの *Xa13* はイネ白葉枯病 (bacterial blight) の慣行的白葉枯病劣性抵抗性遺伝子であるが、多機能発現により、白葉枯病抵抗性に伴い、葯の発育・花粉の発育を阻害し、種子着生率を低下させる。このため *Xa13* の育種への全面的使用は実施されていない。著者らは、CRISPR/Cas9手法の遺伝子ではなく遺伝子プロモーターへの適用による白葉枯病抵抗性イネの作出を試み、以下の結果を得た。

(1) ゲノム編集 (CRISPR/Cas9) の適用

- 1) コード配列へのゲノム編集：*Xa13* の第 2 エキソン中の 2 か所を標的とする gRNA を用い、94bp を欠失させるゲノム編集を行った。*Xa13* のコード配列への編集は、白葉枯病抵抗性を向上させることができたが、重要な農作物形質の変化や不稔性の表現型が生じた。
- 2) プロモーターへのゲノム編集：*Xa13* 発現は病原体の感染により上昇するが、これに係わる病原体誘導性シス因子 (31 bp) が同定されている。この 31 bp を含む 149bp をゲノム編集手法により欠失させたプロモーターは、非感染時の転写活性には誘導を与えず、病原体感染時の転写活性の上昇のみを欠失させた。その結果、イネの稔実性に影響を与えることなく、白葉枯病抵抗性を向上させることができた。

(2) プロモーター欠失ゲノム編集系統の特性

病原菌 PXO99 の接種試験試験による白葉枯病抵抗性の評価が行われた。

- ① *Xa13* の相対的発現量：接種 3 日後の相対発現量は、対照の 30 以上に対し、プロモーター欠失ゲノム編集系統 (6 系統) はいずれも 4 以下と有意に低かった。
- ② 抵抗性：接種 3 日後の病変長は、対照の平均 16.8 cm に対し、プロモーター欠失ゲノム編集系統では 1.33~2.58 cm と有意に短縮された。
- ③ 農業形質：両ゲノム編集系統の出穂期、草丈、1 株穂数、穂長、種子着生率、収量は、いずれも対照との間で有意差はなかった。

(3) 遺伝子組換え手法との比較

先行研究でも、*Xa13* を標的とした RNAi 手法による抵抗性組換え体が開発されているが、抵抗性が十分でない、また、選抜マーカーを含む外来遺伝子が必ずイネに残存することが問題

とされた。一方、プロモーター欠失ゲノム編集系統では、十分な抵抗性の発現が得られ、CRISPR/Cas9コンストラクトが分離した後代では、外来遺伝子の残存が確認されなかった。

(4) 総括

劣性抵抗性遺伝子 *Xa13* プロモーターへのゲノム編集手法の適用により、農業特性への影響がない、白葉枯病抵抗性イネが作出された。本手法は標的品種に加えて、他のイネ品種にも試験的に適用され、その有効性が確認されており、今後のより広い範囲への適用が期待されている。

(林 健一)

Towards doubling fiber yield for cotton in the semiarid agricultural area by increasing tolerance to drought, heat and salinity simultaneously

乾燥・熱・塩類に対する耐性の一斉強化による半乾燥農業地域におけるワタの繊維収量倍増戦略

Esmaeili N *et al.*

2021

Plant Biotechnology Journal 19: 462-476

米国及び中国の大学・国研及びインドの大学研究者による原著論文である。ワタは世界の繊維需要の35%を占め、インド・米国・中国・ブラジル・パキスタンが主産地であるが、ブラジル以外は天水依存なためしばしば干ばつ被害を受け、米国でも近年34%の大減収があった。今後の人口増・気候変動に対応するためのワタの増産は極めて重要であり、バイオテクを含む種々の努力がなされている。最近著者らはシロイヌナズナにおいて、シロイヌナズナ由来の *AVPI*、イネの由来の *OsSIZI* の両遺伝子の同時過剰発現 (co-overexpression) によりストレス耐性が強化され、顕著な増収を得た。これに基づいて著者らは同じ手法のワタへの適用による環境ストレス耐性向上ワタの作出を試み、以下の結果を得た。

(1) *AVPI/OsSIZI*同時過剰発現組換えワタの作出

両遺伝子の発現カセット含む T-DNA ベクターは、ワタ品種 Coker312 にアグロバクテリウム法により導入され、27の T₀ 個体が作出された。その後自殖により安定した T₄~T₆ 4系統 (OA1~OA4)、別に *AVPI* を単独発現する A 系統、*OsSIZI* を単独発現する O 系統、及び対照非組換え系統 (WT) が用意された。これら OA、A、O、WT をセットとして、各種の検定がなされた。

(2) 乾燥・塩類複合ストレスにおける OA 系統の反応 (温室試験)

2か月の複合ストレス後でも OA 系統は他系統より表現型形質が良好であった。光合成率は OA 系統が対照非組換え・A・O 系統に対し、67・30・20%増であった。ストレス区/平常区の光合成比率減は対照の51%減に対し、OA 系統は17%減であった。植物体相対含水率は OA 系統では70%であり、WT・A・O に対し43%・20%・24%高かった。同様に全種子繊維収量も、79%・27%・35%高かった。また OA の根バイオマス量は対照の107% (2倍強) であった。

(3) 乾燥・熱複合ストレスにおける OA 系統の反応 (グロースチャンバー試験)

半乾燥栽培6週間後に、昼温25℃14時間・37℃2時間 (13~15時) の処理を行った。OA 系統は最良の表現型生育を示した。熱処理 (37℃) 2時間前・処理中・3時間後の OA 系統の光合成率は、対照に対し、72%、108% (2倍強)、98%高かった。OA 系統は対照の A 系統・O 系統に対し、相対含水率で55%・32%・16%：種子繊維収量で97%・53%・37%高かった。根のバイオマスは対照より78%多かった。

(5) 半乾燥 (semiarid) 地域圃場試験 (米国テキサス州、2016・2017)

天水栽培区 (430mm/年) の光合成率は、OA 系統は対照に対し、66%・88% (2016年午前・午後) 及び78% (2017年午後) 高かった。灌漑区 (15mm/週) では OA と対照との間には差がなかった。天水栽培区での種子繊維量では、OA 系統は対照に対し、143% (2016)・84% (2017)；繊維量では133% (2016年)・81% (2017年) 多かった。O 系統・A 系統は対照より、繊維量で43%・54% (2016)；24%・36% (2017) 多かった。

(6) OA 系統のストレス耐性のトランスクリプトーム解析 (天水圃場)

降雨前の解析で、OA 系統と対照非組換え系統の間で発現量が異なる遺伝子は3649遺伝子 (対照で高: 609、OA で高: 3040)。同様に降雨後の解析で発現が異なる遺伝子は5812遺伝子 (対照で高が4356、OA で高が1456)。このうち降雨前後で重複する829遺伝子のうち、発現変動が2倍以上の45遺伝子が絞り込まれた。絞り込まれた45遺伝子には、熱ショックタンパク質遺伝子や、細胞壁関連遺伝子、オーキシンのシグナル伝達関連遺伝子、ショ糖代謝関連遺伝子が含まれ、いずれも、対照非組換え系統に対し OA 系統で増加していた。

(7) 総括

シロイヌナズナ由来の *AVPI* 及びイネ由来の *OsSIZ1* を同時過剰発現する組換えワタ OA 系統が作出された。OA 系統は、乾燥・塩類及び乾燥・熱の複合環境ストレスに対して、対照非組換え系統より顕著に高い耐性を発揮し、生育量の種子繊維量などが2倍近い高い値を示した。複数のストレス耐性遺伝子の同時合同発現の顕著な増収効果を示した本研究結果は、今後の乾燥耐性作物の育種・栽培に貢献することが期待される。

(林 健一)

Overexpression of a plasma membrane protein generated broad-spectrum immunity in soybean

原形質膜タンパク質の発現による広範囲病害虫抵抗性組換えダイズの作出
Ngaki MN *et al.*

2021

Plant Biotechnology Journal 19: 502-516

米国の大学研究者による原著論文である。ダイズは世界的な重要作物であるが、多数の病害虫の被害を受け、米国での減収損失額は5千億円/年に達する。作物は病害虫に対して固有の一連の免疫性（抵抗性）を有している。著者らはダイズの固有免疫性に着目し、その効果的利用に関する研究を行い、以下の結果を得た。

- (1) ダイズ病害抵抗性遺伝子 (*Glycine max disease resistance1: GmDRI*) 発現強化組換え体の作出
ダイズとフザリウム病菌との相互作用の過程で、ごく少数のダイズ遺伝子がフザリウム病菌の標的となっていることが見出された。このうちの1種類の遺伝子は複数の病斑菌及び害虫に対し一連の抵抗性を示し、ダイズ病害抵抗性遺伝子1 (*Glycine max disease resistance1: GmDRI*) と命名された。これを3種類の infection induced promoter (P1, P2, P3) に連結し、3種類のコンストラクトが設計された。これらをアグロバクテリウム法によりダイズ品種 Williams82に導入し、組換え30個体が作出された。*GmDRI*はダイズの前形質膜 (plasma membrane) タンパク質として存在している。*GmDRI*タンパク質は pattern recognition receptor (PRR) として機能し、病害虫の molecular pattern を識別し、広範囲の抵抗性を発現すると考えられる。
- (2) 組換えダイズ系統 (*GDR1*ダイズ) の病害虫抵抗性
 - 1) フザリウム病原菌 (*Fusarium virguliforme*) : ダイズの根・茎葉・莢を加害する2番目の大病害であり、病徴としては急性枯死症 (sudden death syndrome) が顕著であり、米国では2000億円/年の損失を与えている。室内試験では、供試組換えダイズの40%が急性枯死症抵抗性を示した。根の病原菌量は対照の2.5~5.0%以下であり、根腐れの発現も1/2以下であった。圃場試験 (2015~2018) では4年間を通じて安定した急性枯死症抵抗性を示し、2016年では急性枯死症の発現は無~微であった。種子サイズ・収量への負の影響もなかった。以上から収量を落とさないで急性枯死症抵抗性が発現されることが確認された。
 - 2) アブラムシ (aphid) : アブラムシは吸汁害に加えて病原性ウイルスを媒介する大害虫である。*GDR1*ダイズの葉上アブラムシ数は対照の1/5以下であった。
 - 3) クモダニ (spider mite) : 温室試験では *GDR1*ダイズはクモダニ抵抗性を発揮し、葉への産卵数が有意に低下した。抵抗性 *GDR1*ダイズは葉緑素高含量を維持した。従来、クモダニ抵抗性作物系統では未報告であったが、本結果のクモダニ抵抗性組換えダイズの作出は意義が深いと考えられる。

4) シスト線虫 (cyst nematode) : ダイズの根を加害する寄生虫であり、ダイズ最大の病害虫である。*GDR1*ダイズの後代数系統はシスト線虫に対して中程度の抵抗性を示し、根の雌虫数は対照より有意に低かった。

(3) キチン (chitin) の役割

キチンは虫類・菌類の外殻組織として普遍的に存在する多糖類である。サリチル酸及びジャスモン酸の誘導による防御機能も発現し、*GDR1*の広範囲病害虫抵抗性の発現を支持していると考えられる。

(4) 総括

ダイズのフザリウム病抵抗性遺伝子をアグロバクテリウム法によりダイズ品種 Williams82に導入した組換えダイズ系統が作出された。同系統が保持するダイズ病害抵抗性遺伝子1 (*GDR1*) は、2病害 (フザリウム病・シスト線虫) 及び2害虫 (アブラムシ・クモダニ) に対する広範囲抵抗性を示した。同系統は種子サイズ・収量などの低下はなく、農業形質を維持したまま広範囲病害虫抵抗性を示す新しい組換えダイズ系統として注目される。

(林 健一)

Production of Agrocinopine A by *Ipomoea batatas* Agrocinopine Synthase in Transgenic Tobacco and Its Effect on the Rhizosphere Microbial Community

遺伝子組換えタバコを用いたサツマイモ *Agrocinopine Synthase* に
よる Agrocinopine A の生産とその根圏微生物群集への影響

Tanaka A *et al.*

2022

Molecular Plant-Microbe Interaction 35: 73-84

日本及び豪州の大学の研究グループによる報文。アグロバクテリウムは、腫瘍形成を引き起こす植物ホルモンとオパイン類の生合成に関与する酵素の遺伝子群を含む T-DNA を感染した植物のゲノム中に転移する。T-DNA は感染した宿主植物の次世代に引き継がれることはないが、ごくまれに生殖系列に入り遺伝的に安定する場合がある。サツマイモ栽培種では、殆どの品種で T-DNA 配列の存在が確認されている。サツマイモの T-DNA 配列には、オパインの一種であるアグロシノピン (Agrocinopine) の合成酵素遺伝子 *IbACSI* が機能を保持した状態で保存されていることが知られる。筆者らは、このようにして植物に取り込まれたアグロバクテリウム由来の遺伝子が植物 - 微生物相互作用に与える影響について、以下の報告を行った。

1) サツマイモ T-DNA 領域の解析

先行研究によりサツマイモ栽培種ゲノム中には2つの T-DNA 領域が存在する。本研究では、サツマイモ品種花らんまんの T-DNA 領域を解析し、*IbACSI* を含む6つのインタクトなコード配列が確認された。*IbACSI* は葉及び根で発現していることが確認された。

2) *IbACSI* 発現組換えタバコ

IbACSI の植物体内で生産物を同定するため、CaMV35S プロモーター制御下で *IbACSI* を発現する組換えタバコを作出した。20系統の T0植物から最終的に発現の安定した2系統を選抜した。*IbACSI* 発現組換えタバコは、トマトがアグロバクテリウム感染時に生産するアグロシノピンに類似した物質を産生し、最終的に NMR 解析によりこの物質がアグロシノピン A であることが特定された。さらに、*IbACSI* 発現組換えタバコで産生されるアグロシノピン A は、トマトがアグロバクテリウム感染時に生産するアグロシノピンと同等の活性を有することがバイオアッセイによって確認された。

3) *IbACSI* 発現が遺伝子組換えタバコの根圏域細菌叢に与える影響

MS 寒天培地で5週間、その後無菌土壌で2週間生育させた組換えタバコ及び対照非組換えタバコを、農地の土壌1割を混入した土壌で10日間栽培した。組換え体と対照の間に生育の差はなかった。根圏微生物は、根粉碎抽出液を酵母マンニトール寒天培地に塗布・培養することで得た。総好気性細菌数は組換え体で有意に多かった。さらに、16S rRNA 配列解析により、分離されたコロニーの属を推定した。その結果、組換え体から無作為に選んだ15コロニー中8コロニーが *Leifsonia* 属 (放線菌) であったのに対し、対照組換え体からは分離されなかった

(n=10)。16S rRNA のアンプリコンシーケンス解析でも、*Leifsonia* 属が組換え体で有意に多いことが確認された。他方、3つの OTU (16s-rRNA 配列により配列の類似性に基づき分類単位) は組換え体で有意に減少していた。

4) *IbACSI* 発現が組換えタバコの根圏特異的 *Leifsonia* 属の同定

組換え体タバコの根圏で増殖した *Leifsonia* sp. をさらに解析するために、LS1と名付けた分離株をゲノム配列決定に供した。LS1ゲノムは、*Leifsonia* 属の他の株と平均塩基同一性が77~87%と低く、新種とされた。

5) LS1株のアグロシノピン A 代謝

前項のゲノム解析により、LS1株は、特徴的な糖リン酸の取り込みと代謝のためのオペロンを含むことが示唆された。そこで、*IbACSI* 発現組換えタバコ抽出物中で LS1株を培養したところ、抽出物中のアグロシノピン A が大きく減少したことから、LS1株が組換えタバコで産生されるアグロシノピン A を代謝することが示唆された。

6) 総括

サツマイモゲノム上のアグロバクテリウム由来のオパイン合成酵素によって産生されるオパイン (アグロシノピン A) 生産が、この糖ホスホジエステルを利用できる根圏細菌を引き寄せていることが示された。これらの結果は、サツマイモの品種間で保存されている *IbACS* が、その根圏細菌叢を操作している可能性を示唆する。

(小口太一)

Lignin engineering in field-grown poplar trees affects the endosphere bacterial microbiome

ポプラのリグニン改変の圃場栽培が内圏 (endosphere) 細菌叢に与える影響

Beckers B *et al.*

2016

PNAS 113: 2312-2317

ベルギーの大学及び公的研究機関、スウェーデンの大学の研究グループによる原著論文。林木のリグニン改変は、リグノセルロース系バイオマスの商業的価値を向上させる有望なバイオテクノロジーの標的である。一方で、リグニン改変は、植物と微生物の相互作用関係に影響を与える可能性がある。著者らはリグニン生合成経路の中心的酵素であるシナモイル-CoA還元酵素遺伝子 (CCR) の発現を抑制した組換えポプラのほ場栽培試験を通じ、CCR 遺伝子の改変が根圏及び内圏 (endosphere) の細菌叢に与える影響を調査し、以下の内容を報告した。

1) CCR 発現抑制ポプラ

ブラックコottonウッドポプラ (*Populus trichocarpa*) の木部の cDNA から単離した全長 CCR cDNA のアンチセンス鎖を発現カセット (CaMV35S プロモーター) を導入した交雑ポプラ (*P. tremula* × *P. alba*) を植物材料とする (既報)。ベルギーのゲントの圃場に2009年5月に植栽されたポプラから、2011年10月に、根圏土壌 (サンプリングした根に付着した土壌) 及び根、茎、葉の4区画に分けて採取した (組換え体、対照非組換え体各12個体)。

2) 細菌数の非選択的比較

各区画からの抽出物を標準的な炭素源を含む培地培地で培養し、コロニー形成数を比較した。根圏土壌、根、茎、葉、いずれの区画においても、総細菌数に組換え体と非組換え体の間で有意な差はなかった。細菌数は、根圏土壌で最も多く、次に根、茎と葉で最も少なかった。

3) 細菌数の選択的比較

各区画からの抽出物をそれぞれフェルラ酸、シナピン酸、p-クマル酸を唯一の炭素源とした培地で培養し、コロニー形成数を比較した。根圏土壌では、遺伝型間で細菌数の違いはないが、内圏 (根、葉、茎) ではいずれも、組換え体が非組換え体よりも高かった。

4) フェルラ酸炭素源培地で生育する細菌の種構成

フェルラ酸炭素源培地で選択的に濃縮した細菌について16s-rRNA 配列により配列の類似性に基づき分類単位 (OUT) を決定して比較した。組換え体、非組換え体ともに、区画 (根圏、根、葉、茎) 毎にクラスターを形成され、区画ごとに菌叢が大きく異なることが示唆された。また、組換え体と非組換え体の間での類似性も見られなかった。

5) 分離菌株のフェルラ酸代謝能

各単離細菌 OUT のフェルラ酸分解能を定量化して比較した。根圏より単離された細菌叢では、組換え体と非組換え体の間で代謝能に有意な違いはない一方、内圏より単離された細菌叢では、組換え体と非組換え体の間で有意にフェルラ酸の代謝能が大きく異なり、組換え体の細菌叢で高いフェルラ酸分解能が示唆された。

6) 総括

宿主植物の遺伝型が内圏細菌叢に変調を与えることが明らかになった。したがって、植物の代謝を改変した組換え体の生物多様性影響評価では、代謝改変と内圏細菌との相互作用も考慮する必要があると考えられる。

(小口太一)

ERA プロジェクト調査報告

2022年 6 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 児島宏之

〒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)