
ERAプロジェクト調査報告

December 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

2021.12

バイオテクノロジー研究会

2021年の調査報告書第3号（通算第57号）をお届けします。

本号では、まず遺伝子組換え技術を用いて耐病性形質を付与した作物に関する報告として、キチナーゼ遺伝子の導入による紋枯病抵抗性組換えイネ（No.557）、イネ条斑細菌病菌由来のエリシター遺伝子の導入による茎疫病抵抗性組換えダイズ（No.562）、プロテオーム解析を用いた南方さび病抵抗性トウモロコシ系統の作出（No.564）について紹介しています。また、遺伝子組換え技術を用い農作物の品質を向上させた研究として、高铁・亜鉛含量組換えイネ（No.558）、*IbSnRK1* 遺伝子の導入によるデンプン品質改良組換えサツマイモ（No.560）の作出について報告しております。さらに、イネの乾燥耐性向上に関する研究（No.561）や、組換えスイッチグラスの軍用爆薬 RDX のファイトレメディエーションの有効性を確認した研究結果（No.566）についても紹介しています。

加えて、CRISPR/Cas9手法によるゲノム編集を用いたキウイフルーツの早期開花・結実性の突然変異系統の作出（No.559）、シスジェネシスを用いた増収・窒素利用効率向上オオムギ過剰発現系統の作出（No.563）、組換え台木に接ぎ木されたトマト穂木への影響を各種オミクス解析を用いて評価した研究（No.565）についても紹介しています。

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.557	ニガウリ由来の <i>McCHIT1</i> 発現組換えイネ系統における紋枯病抵抗性とキチナーゼ活性の関連 Association between sheath blight resistance and chitinase activity in transgenic rice plants expressing <i>McCHIT1</i> from bitter melon	1
No.558	高能率摂り込み・貯蔵と組合せた栄養物質の細胞内輸送の向上による穀実における鉄及び亜鉛含量増加イネ系統の作出 Targeting intracellular transport combined with efficient uptake and storage significantly increases grain iron and zinc levels in rice	2
No.559	キウイフルーツの <i>CENTRORADIALIS</i> 様遺伝子の突然変異は、幼弱性持続及び側枝開花を抑制し、コンパクトな樹形へと改変する Mutagenesis of kiwifruit <i>CENTRORADIALIS</i> -like genes transforms a climbing woody perennial with long juvenility and axillary flowering into a compact plant with rapid terminal flowering	3
No.560	SnRK1関連遺伝子 (<i>IbSnRK1</i>) 導入組換えサツマイモにおけるデンプン含有量、組成、デンプン粒サイズ、結晶性、糊化の改善 A sucrose-non-fermenting-1-related protein kinase-1 gene, <i>IbSnRK1</i> , improves starch content, composition, granule size, degree of crystallinity and gelatinization in transgenic sweet potato	4
No.561	リグニン生合成及び気孔閉鎖による乾燥耐性の向上—イネ HD-Zip 転写因子の発現— Overexpression of <i>OsTFIL</i> , a rice HD-Zip transcription factor, promotes lignin biosynthesis and stomatal closure that improves drought tolerance	5
No.562	<i>hrf2</i> 遺伝子導入による卵菌類ダイズ茎疫病菌に対する抵抗性の向上 Introduction of the harpin XooC-encoding gene <i>hrf2</i> in soybean enhances resistance against the oomycete pathogen <i>Phytophthora sojae</i>	6
No.563	細胞質局在型グルタミン合成酵素遺伝子の過剰発現 (cisgenic overexpression) による窒素利用効率向上及び高 CO ₂ 下の種子タンパク質低下阻止オオムギ系統の作出 Cisgenic overexpression of cytosolic glutamine synthetase improves nitrogen utilization efficiency in barley and prevents grain protein decline under elevated CO ₂	7
No.564	組換え体の分析と組み合わされた比較プロテオーム解析による ZmREM1.3 遺伝子を介したトウモロコシ南方さび病抵抗性の解明 Comparative Proteomics combined with analyses of transgenic plants reveal ZmREM1.3 mediates maize resistance to southern corn rust	8
No.565	オミクス解析による組換え台木に接ぎ木されたトマト穂木への影響 Effect of transgenic rootstock grafting on the omics profiles in tomato	9
No.566	XplA/XplB を発現するスイッチグラスによる軍用爆薬 RDX のファイトレメディエーションを実証するフィールド試験 Field trial demonstrating phytoremediation of the military explosive RDX by XplA/XplB-expressing switchgrass	10

Association between sheath blight resistance and chitinase activity in transgenic rice plants expressing *McCHIT1* from bitter melon

ニガウリ由来の *McCHIT1* 発現組換えイネ系統における紋枯病抵抗性とキチナーゼ活性の関連

Zhang C *et al.*

2019

Transgenic Research28: 381-390

中国の大学研究者による原著論文である。イネの紋枯病 (sheath blight) は収量・品質に大害を与える大病害であるが、薬剤防除にはコスト・環境保護で限界があり、また抵抗性遺伝子源は乏しく、紋枯病抵抗性イネの作出は緊急の大課題である。著者らは病害抵抗性のキチナーゼ遺伝子の導入による紋枯病抵抗性組換えイネ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

(1) 紋枯病抵抗性組換え系統の作出

キチナーゼ (chitinase) はキチンの加水分解反応を触媒する酵素であり、病原性真菌の細胞壁を分解する抗真菌 (antifungal) 遺伝子として知られている。著者らはニガウリ (*Momordica charantia*) より新規のキチナーゼ遺伝子 *McCHIT1* を単離し、アグロバクテリウム法によりイネ品種 Jinhui35 に導入し、自殖により T₂、T₃、T₄、T₅ 世代を作出した。

(2) T₄ 及び T₅ 世代の紋枯病抵抗性検定

T₄ 及び T₅ 世代のホモ接合の31系統に対し、紋枯病菌接種検定を行った。WT の病徴指数92% に対し、31系統は72~71% であり、20~21% の病徴の軽減を示した。特に高い抵抗性を示した15系統の病徴指数は35~77% であり、さらに抵抗性上位8系統の T₄ 及び T₅ の指数は、35~45% 及び38~45% であった。これは対応する WT 及び非組換え品種の2.0~5.5倍及び1.8~2.7倍であり、紋枯病発生中程度の地域に対する抵抗性として十分実用的価値を有すると判断された。

(3) キチナーゼ活性と紋枯病抵抗性との関係

T₄ 及び T₅ 世代で、両者の相関係数は +0.940 及び +0.858 であった。これによりキチナーゼの高い発現により紋枯病抵抗性の発現が増加し、抵抗性が強化されることが示された。

(4) 総括

イネの難病である紋枯病に対するニガウリ由来のキチナーゼ遺伝子 *McCHIT1* の導入による抵抗性組換えイネ系統が作出された。組換えイネの紋枯病病徴指数は、WT の92% に対し、代表的 T₄~T₅ 系統では35~45% 及び38~45% であり、紋枯病中程度発生地域に対する抵抗性系統として、十分実用的価値を有すると判断された。キチナーゼ活性と紋枯病抵抗性との間には高い正の相関関係が示され、また T₄~T₅ の世代間の抵抗性の伝達も安定していた。これらの成果は、今後の紋枯病抵抗性育種に有用な情報を提供すると考えられる。

(林 健一)

Targeting intracellular transport combined with efficient uptake and storage significantly increases grain iron and zinc levels in rice

高能率摂り込み・貯蔵と組合せた栄養物質の細胞内輸送の向上による 穀実における鉄及び亜鉛含量増加イネ系統の作出

Wu T-Y *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 9-20

スイスの国研研究者による原著論文である。鉄・亜鉛は、ビタミン B12、D、E などと共に不足しがちな必須栄養素である、鉄・亜鉛の不足は途上国で多いが、先進国でも稀ではなく貧血症の原因となっている。イネ穀粒の外側は栄養が多いが、精米の過程で除去され、通常食卓にのぼる米の胚乳部の鉄含量は2 $\mu\text{g/gDW}$ 程度であり、国際的摂取目標量の15 $\mu\text{g/gDW}$ よりはるかに低い。胚乳鉄含量の遺伝資源は乏しく、慣行育種に改良はあまり進んでいない。著者らはバイオテク技術による高铁・亜鉛含量組換えイネ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

(1) 組換えイネ系統の作出

従来育種では、養分の摂り込み、長距離輸送、貯蔵が重要であった。食用部分である胚乳の鉄・亜鉛含量を高めるために、液胞への一時貯蔵、細胞質への転送などの細胞質内の養分の移送が重要であり、このため従来とは異なる手法がとられた。まず、鉄・亜鉛の蓄積に関連する3遺伝子 (*AtNAS1*、*PvFER*、*AtNRAMP3*) を選定、3遺伝子全部 (NFUN 及び NFON) あるいは *AtNAS1* 以外の2種類 (FUN 及び FON) を導入した4種類のコンストラクトが作出された。*AtNAS1* 及び *PvFER* の発現は、それぞれ全身 (*CaMV35S* プロモーター) 及び胚乳特異的 (*OsGLB* プロモーター) である。*AtNRAMP3* の発現はコンストラクトにより、全身発現 (*OsUBI* プロモーター; NFUN 及び FUN) と胚乳特異的 (*OsOle18* プロモーター; NFON 及び FON) が使い分けられている。4種類のコンストラクトはそれぞれ、アグロバクテリウム法により日本型品種日本晴に導入し、鉄含量について選抜し、最終的に安定した T₃ 世代を得た。

(2) 組換え T₃ 系統の鉄及び亜鉛含量

- 1) 鉄含量 ($\mu\text{g/g} \cdot \text{DW}$): 精白米胚乳: 対照非組換え体2.12に対し、NFUN・FUNの平均は8.09~11.69、NFON・FONの平均は7.64~12.77であった。無精白米胚乳: NFUN・NFON系統はFUN・FON系統よりも高含量で、NFON系統では最高29.75であった。
- 2) 亜鉛 ($\mu\text{g/g} \cdot \text{DW}$): 精白米胚乳: 対照非組換え体19.38に対し、組換え体では29.68~45.62であった。無精白胚乳: 対照非組換え体29.54に対し、組換え体では45.96~63.04であった。
- 3) 表現型 (発芽率・穀粒形質): 組換え系統は対照と有意差を示さなかった。

(4) 組換え系統の鉄欠乏への反応

3遺伝子系統 (NFUN・NFON) は、鉄欠乏条件で茎・根への鉄蓄積量を1.4~1.6倍対照より増加し、鉄欠乏耐性を示した。

(5) 総括:

穀粒における鉄及び亜鉛の蓄積に関連する3遺伝子 (*AtNAS1*、*PvFER*、*AtNRAMP3*) の全てあるいは2種類のイネ (品種日本晴) への導入により、食用部分として重要な胚乳の鉄及び亜鉛含量が増加した組換え系 (品種日本晴) が得られた。特に、3遺伝子系統は平均値として鉄: 12.67 $\mu\text{g/gDW}$ 、亜鉛45.60 $\mu\text{g/gDW}$ を含有し、国際的目標値に達していた。同様に作出したインディカ型品種 IR64 の組換え系統も、目標値の90%に達する鉄・亜鉛の蓄積量を示した。これらの結果は、今後のイネの高铁・亜鉛育種に有用な情報を与えると考えられる。

(林 健一)

Mutagenesis of kiwifruit *CENTRORADIALIS*-like genes transforms a climbing woody perennial with long juvenility and axillary flowering into a compact plant with rapid terminal flowering

キウイフルーツの *CENTRORADIALIS* 様遺伝子の突然変異は、
幼弱性持続及び側枝開花を抑制し、コンパクトな樹形へと改変する
Varkonyi-Gasic E *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 869-880

ニュージーランドの国研及び大学の研究者による原著論文である。多年性果樹の花成早化は、育種年限の短縮において重要である。キウイフルーツ (*Actinidia chinensis*) は近年栽培化された果樹であり改良の余地が多いが、長い幼木期・多年性・成木の大型化・登攀 (とうはん) 性等が、品種改良の妨げとなっている。著者らは、CRISPR/Cas9手法によるゲノム編集の適用により、キウイフルーツの早期開花・結実性の突然変異系統の作出を試み、以下の結果を得た。

(1) *CENTRORADIALIS* (*CEN*) 様遺伝子の特定

CEN 様遺伝子は、茎の先端の分裂組織に存在し、ターミナルフラワーの形成を抑制することで、無限花序の維持に関わる因子である。キウイフルーツは、この *CEN* 様遺伝子を5つ有し、著者らはこのうちの *AcCEN4* 及び *AcCEN* の2遺伝子をゲノム編集の標的遺伝子として特定した。

(2) ゲノム編集系統の作出

2つの標的遺伝子に基づいて CRISPR/Cas9手法が適用され、2つの標的突然変異が誘発され、さらにこれらに基づいて2種類のコンストラクトが調整され、アグロバクテリウム法によりキウイフルーツ品種 Hort16A に導入され、最終的に25系統の突然変異系統が作出された。

(2) 選抜系統の特性

3系統 (系統14、17、18) はアグロバクテリウム法との共存培養8~9ヶ月後に6展開葉・活着根を有し、ターミナルフラワーを分化した。このターミナルフラワーは正常な形態・種子形成を行った。

(3) 選抜系統の花成時期の評価 (圃場生産)

系統14、17、18の3系統は、6展開葉期でターミナルフラワーを形成した。別の系統7は、生長12ヶ月、12展開葉期でターミナルフラワーを形成した。これらターミナルフラワーはすべて正常であり、授粉により100粒以上の正常発芽種子を形成した。

(4) 樹形 (Architecture) の変化

極端な花成早化は、樹形を矮化し、側枝の多発・側枝花の分化など、灌木 (bush) 形質を示した。

(5) 総括

CRISPR/Cas9手法による *CEN* 様遺伝子への標的変異導入により、キウイフルーツの花成時期及び樹形が改変され、1年以内の花成早化、コンパクトな樹形のゲノム編集系統が作出された。本系統は、育種年限の短縮により、今後のキウイフルーツの品種改良に大いに寄与することが期待される。

(林 健一)

A sucrose-non-fermenting-1-related protein kinase-1 gene, *IbSnRK1*, improves starch content, composition, granule size, degree of crystallinity and gelatinization in transgenic sweet potato

SnRK1 関連遺伝子 (*IbSnRK1*) 導入組換えサツマイモにおける
デンプン含有量、組成、デンプン粒サイズ、結晶性、糊化の改善

Ren Z *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 21-32

中国の大学の研究者による原著論文である。全ての作物において、収量及び品質の向上は基本的大課題である。SnRK1 (Sucrose non-fermenting-1-related protein kinase) は、作物のエネルギー感知レギュレーターであり、炭水化物代謝の制御において重要な役割を果たす。サツマイモでは、貯蔵根で *IbSnRK1* が高発現することが報告されているが、品質に関する報告はない。著者らは *IbSnRK1* を高発現する組換えサツマイモを作出し、品質に及ぼす影響について、以下の結果を得た。

(1) *IbSnRK1* の一般的特性

サツマイモでは貯蔵根での発現が高く、デンプン含量と正の相関を有する。葉のショ糖処理により発現が著増し、午前10時をピークとする発現変動を示す。

(2) 組換えサツマイモの作出

サツマイモ品種 Lizixing にアグロバクテリウム法により *IbSnRK1* の発現カセット (プロモーターは P35S) を導入し、最終的に組換え体18系統を得た。対照として非組換え体 (WT) 及び empty vector control (VC) を用いた。対照との形態的差異は検出されなかった。

(3) 組換えサツマイモ系統のデンプン及びアミロース含量

組換え体の *IbSnRK1* 発現は対照の2~16倍であった。貯蔵根におけるデンプン量は、対照の120 mg/gFW に対し、1.7~31.3%の増大を示した。一方、アミロース含量は対照の18%に対して16.1~17.8%へと低下した。このアミロース含量の低下は、工業的利用及び消費者の健康に対して正の効果を有するデンプン・アミロース含量に WT と VC との間には差異はなかった。

(4) デンプン粒の形態及び大きさ

高デンプン含量4系統の平均デンプン粒直径は25.4~29.4 μ mであり、対照の22.1~22.3 μ mより有意に大きかった。25 μ m以下・25~50 μ m・50 μ m以上の3分類に対して、対照は中央にピークを有する単項分布、組換え系統は両極にピークを有する2項分布を示し、特に50 μ m以上の大形粒の分布が多かった。

(5) 結晶性

X線解析の結果、組換え体におけるデンプンの結晶度は、対照の42.1・41.8%に対して44.9・49.9%へと増加した。

(6) 糊化温度

糊化温度は対照が60.2~82.4 $^{\circ}$ C、組換え系統はより低温で糊化し、糊化温度の低下を示した。

(7) デンプン生合成鍵酵素

酸性及び中性インバルターゼ、SuSy、AGPase、GBSS、スターチシンターゼ等、デンプンの代謝や合成や分解に関わる鍵酵素活性は、対照に対して1.12~12.2倍の増加を示した。

(8) 総括

IbSnRK1 遺伝子の導入により、デンプン品質改良組換えサツマイモ系統が作出された。本遺伝子によりデンプン生合成関連因子の発現が増加し、対照に対してデンプン含量増加、アミロース含量低下、デンプン粒サイズ増大、結晶性及び糊化能力の向上などを示した。本結果は今後のサツマイモ及び他作物のデンプン品質向上に有用な情報を与えると期待される。

(林 健一)

Overexpression of *OsTF1L*, a rice HD-Zip transcription factor, promotes lignin biosynthesis and stomatal closure that improves drought tolerance

リグニン生合成及び気孔閉鎖による乾燥耐性の向上 —イネ HD-Zip 転写因子の発現—

Bang SW *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 118-131

韓国の大学研究者による原著論文である。減収を伴わない乾燥耐性作物の作出はバイオテクノロジー分野の大課題である。イネの乾燥耐性の研究は多いが、乾燥耐性の機作に関する研究は少ない。著者らは耐性変動要因をバイオテクノロジー手法により研究し、以下の結果を得た。

(1) 組換えイネ系統の作出

イネの HD-Zip 型転写因子の一つである *OsTF1L* の過剰発現カセット (GOS2プロモーター) 及び RNAi カセットをアグロバクテリウム法で導入した *OsTF1LOX* 系統及び *OsTF1LRNAi* 系統を30ずつ作出し、さらにそれぞれ3系統 (#17, 23, 24) 及び (#2, 12, 13) を精選した。

(2) 組換え系統の乾燥耐性

1) 圃場試験: 生育5週間後に灌水中断3日間 (土壌湿度10%) の乾燥処理を行った。*OsTF1LRNAi* 系統は葉巻・萎凋などの症状を発生したが、*OsTF1LOX* 系統では症状が遅れた。再灌水により後者は直ちに回復したが、前者は回復しなかった。

2) ポット試験: 6週間生育イネに、12日間の灌水中断を行った。光合成機能が *OsTF1LRNAi* 系統は急落したが、*OsTF1LOX* 系統では低下しなかった。これらの結果から *OsTF1L* がイネの栄養生長期の乾燥耐性を強化していることが示された。

(3) 組換え系統の圃場収量試験

乾燥条件下では *OsTF1LOX* 系統は、稔実率・子実重などの収量指標が対照より有意に高かったが、*OsTF1LRNAi* 系統は対照より低かった。以上から *OsTF1L* が稔実期の乾燥耐性も強化して有意に高い収量指標を与えることが示された。

(4) 気孔の閉鎖機能

葉の気孔の数や大きさに系統間の差はなかったため、乾燥処理前後の気孔開度を調査した。乾燥前の開口 (%) 及び閉鎖 (%) は、NT では57.0 : 43.0、*OsTF1LOX* 及び *OsTF1LRNAi* では、68.2 : 60.9及び31.8 : 39.1であった。乾燥処理後では、NT で7.2 : 92.8、*OsTF1LOX* 及び *OsTF1LRNAi* では、3.3 : 10.7及び96.7 : 89.3であった。この結果乾燥条件下での *OsTF1LOX* 系統の気孔閉鎖度は対照及び RNAi 系統より高いことが示された。さらに葉からの水分損失も対照及び RNAi 系統より少なかった。

(5) リグニン蓄積

葉及び茎のリグニン含量は *OsTF1LOX* 系統では NT より1.8倍高かったが、根のリグニン含量は違いがなかった。RNAi 系統はいずれの組織でも NT と有意な違いは見られなかった。

(6) 総括

イネ品種 Illmi を用いて *OsTF1L* 遺伝子の過剰発現 (*OsTF1LOX*) 及び RNAi (*OsTF1LRNAi*) 組換えイネ系統が作出された。*OsTF1LOX* 系統は対照に対し、栄養生長期及び生殖生長期で優位に高い乾燥耐性を示し、収量も高かった。また気孔閉鎖及び茎葉のリグニン蓄積増加による乾燥耐性増加の生物学的要因の関連を示した。本結果は今後のバイオテクノロジー手法による乾燥耐性強化作物の研究に有用な情報を与えると考えられる。

(林 健一)

Introduction of the harpin XooC-encoding gene *hrf2* in soybean enhances resistance against the oomycete pathogen *Phytophthora sojae*

*hrf2*遺伝子導入による卵菌類ダイズ茎疫病菌に対する抵抗性の向上

Niu L *et al.*

2019

Transgenic Research 28: 257-266

中国の国研研究者による原著論文である。卵菌類ダイズ茎疫病菌によるダイズ茎疫病（PRR）は、世界中のダイズに大損害を与える大病害である。ダイズ茎疫病菌の多様性及び変異性は幅広く、効果的防除を困難にしている。著者らはイネ条斑細菌病菌由来のエリシタータンパク質をコードする遺伝子の導入による PRR 抵抗性組換えダイズの作出を試み、以下の結果を得た。

(1) 組換えダイズ系統の作出

タンパク質性細菌エリシタータンパク質は、作物に病虫害抵抗性や生育促進などの幅広いプラスの効果を与えることが知られている。著者らはイネ条斑細菌病菌 (*Xanthomonas oryzae*) から単離された harpin タンパク質エリシターをコードする *hrf2* (hyper sensitive response and pathogenicity) 遺伝子（プロモーターは P35S）をアグロバクテリウム法によりダイズ品種 Shennong 9 に導入し、最終的に安定的な 4 系統（L13、16、32、44）を精選した。

(2) 組換えダイズ系統のダイズ疫病抵抗性

生育15日の幼植物に対する接種検定（温室）を行った。接種7日後に対照（NC）は萎凋、壊死などの症状を生じた。組換え系統はこれらの症状を示さず健全であった。生存幼植物率は、対照の38.50~40.37%に対し、組換え4系統は73.35~92.86%と約2倍の高さであった。さらに T3~T5 の3世代にわたり抵抗性は安定して発現された。農業特性では、葉の形態・花色・草丈・地丈・節数・100粒重・成熟期などが調査され、対照と差異がないことが確かめられた。

(3) 組換えダイズにおける *hrf2* 遺伝子の発現様式

hrf2 遺伝子は接種後4~12時間で最高発現に達し、以後、高発現を維持した。NC は変化が少なかった。一方、抵抗性関連の他の多くの遺伝子は *hrf2* によって発現が誘導され、多型抵抗性が発現していることが示された。

(4) 総括

エリシタータンパク質をコードする *hrf2* 遺伝子の過剰発現により、疫病菌抵抗性組換えダイズ系統が作出された。同系統は接種検定において対照の2倍の幼植物生存率（73.35~92.86%）及び安定した世代間の発現を示し、なお農業形質には対照と差異がなかった。本結果は、今後のダイズ茎疫病菌抵抗性育種に有用な情報を与えると考えられる。

(林 健一)

Cisgenic overexpression of cytosolic glutamine synthetase improves nitrogen utilization efficiency in barley and prevents grain protein decline under elevated CO₂

細胞質局在型グルタミン合成酵素遺伝子の過剰発現 (cisgenic overexpression) による窒素利用効率向上及び高 CO₂ 下の種子タンパク質低下阻止オオムギ系統の作出

Gao Y *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 1209-1221

デンマークの大学研究者による原著論文である。窒素施肥を抑制しつつ、収量・品質の向上を図ることは、近代農業の大課題である。細胞質局在型グルタミン合成酵素 (cytosolic glutamine synthetase; GS1) は、植物の窒素代謝の中心的役割を果たすことが知られている。しかし、GS1導入による作物の反応については一定の成果が得られていない。一方、Cisgenesis 手法は組換え手法とは異なり、親和性のある内生遺伝子の発現に基づく手法であり、すでに疫病抵抗性バレイショ系統の作出などの成果を得ている。著者らはこの cisgenesis の適用による増収・窒素利用効率向上オオムギ過剰発現系統の作出を試み、以下の結果を得た。

(1) HvGS1-1過剰発現 (cisgenic overexpression) オオムギ系統の作出

オオムギゲノムライブラリーから内在性の GS1 遺伝子として、HvGS1-1 を特定し、プロモーター及びターミネーター領域を含む全長をクローニングした。これをアグロバクテリウム法によりオオムギ品種 Golden Promise に導入した (HvGS1-1 のゲノム中のコピー数増加による発現量増加を意図)。最終的に T2 世代で 4 系統を選出し、さらに 2 系統 (系統 2.2 及び 4.5) を精選し、各種検定に供試した。この 2 系統は農業形態において対照 (WT) と相異なかった。

(2) 異なる N 水準における組換え系統の収量・N 利用効率

- 1) N 水準：低 N (0.2 gN/L soil)・高 N (0.6 gN/L soil)・過剰 N (1.0 gN/L soil)；収穫期調査、温室試験
1) 収量・組換え 2 系統は低・高 N 水準で WT に対して種子収量は 41~71% 及び 26~42% 高かった。千粒重及びワラ重には大差なかった。過剰 N 区では Cis 系統は低 N 区より減収し、プラス効果はなかった。
- 2) N 利用効率：ワラ N 含有率には組換え系統・WT 間には差はなかった。この結果、組換え系統は WT より、N 利用効率が 35~67% 及び 33~44% 高かった。N 収穫指数も組換え系統は WT より高かった。N 含有量 (g/plant) は種子及び茎葉ともに WT より低かった。

(3) 高 CO₂ が組換え系統に及ぼす影響

- 1) 試験 1：CO₂ (900 µL/L)：N 水準成熟期：組換え系統・WT ともに標準 CO₂ 濃度 (400 µL/L) より種子収量は低下し、ワラ重は増加した。種子タンパク質含有率は、組換え系統は標準値を維持したが、WT は組換え系統より 15~20% 低かった。過剰 N 区では組換え系統は 20% 高い種子タンパク質含有率を示した。
- 2) 試験 2：CO₂ (800 µL/L)：N 中水準 (0.45 gN/L soil)：1) と同様に、組換え系統及び WT は標準 CO₂ に比べて、種子収量は低下し、ワラ重は増加した。組換え系統は種子タンパク質含有率は高 CO₂ でも低下しなかったが、WT は 7% 低下した。ワラ N 含有率は、組換え系統・WT ともに標準 CO₂ 区と差はなかった。

(4) 総括

HvGS1-1 の cisgenic overexpression による組換えオオムギ系統が作出された。同系統は WT より高い収量及び N 利用効率を示した。また高 CO₂ において、種子タンパク質の低下を阻止する特性を示した。

(林 健一)

Comparative Proteomics combined with analyses of transgenic plants reveal ZmREM1.3 mediates maize resistance to southern corn rust

組換え体の分析と組み合わされた比較プロテオーム解析による
ZmREM1.3遺伝子を介したトウモロコシ南方さび病抵抗性の解明

Wang S *et al.*

2019

Plant Biotechnology Journal 17: 2153-2168

中国の国研・大学及び米国の大学の研究者による原著論文である。トウモロコシ南方さび病 (Southern corn rust; SCR) は、病原菌 *Puccinia polysora* により米国・中国・アフリカの温暖地域のトウモロコシに大損害を与える大病害である。広範囲・急速拡散・少数遺伝資源などにより、通常の耐病性育種の効果は限定的である。プロテオーム解析は、作物と病原菌との交互作用をタンパク質レベルで解析し、有効な抵抗性関連タンパク質を特定するものである。著者らはプロテオーム解析の適用による SCR 抵抗性トウモロコシ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

(1) SCR 抵抗性品種比較試験

- 1) SCR 病原菌接種試験：SCR 抵抗性品種 P178及び羅病性品種 Lx9801に SCR 病原菌の接種試験を行った。接種 7～14日に、後者の葉には淡橙色の孢子堆が多発して壊死したが、前者には孢子堆は発生せず健全であった。
- 2) 接種により蓄積量が増加したタンパク質：2,126タンパク質中のうち接種により蓄積量が増加したタンパク質は、抵抗性品種では1,489、羅病性品種では1,035であった。

(2) 組換え系統の特性

- 1) 組換えトウモロコシ系統の作出：非抵抗性品種間交雑 (A188×B73) に、抵抗性品種 P178由来の抵抗性因子がアグロバクテリウム法での導入により T1世代 65個体を得、自殖 3世代を経て、T3世代で 4系統の固定系統を精選した。
- 2) 抵抗性遺伝子 ZmREM1.3の特定：蓄積タンパク質中の防御関連因子として remorin ファミリーの膜タンパク質をコードする ZmREM1.3遺伝子を抵抗性遺伝子として特定した。
- 3) ZmREM1.3の発現組織：ZmREM1.3遺伝子の発現は、トウモロコシの全組織 (根・茎・葉・葉鞘・穂・花粉) に分布 (花粉はやや低発現) していた。SCR 接種により、発現は抵抗性系統では誘導され、羅病性系統は抑制されており、タンパク質の蓄積パターンと一致していた。またこれらの発現は細胞膜に局在していた。
- 4) SCR 接種試験：接種 7～14日の孢子堆の発現は、組換え系統は葉の先端のみであったが、対照非組換え系統は花の全面に発現した。また羅病葉面積比率にも、有意差があった。以上から、組換え体は ZmREM1.3の高発現により SCR 抵抗性が発現していることが示された。
- 5) 光合成及びエネルギー代謝における特性：非組換え対照系統では光合成機能が低下した。組換え系統ではこれらの特性が低下することなく維持され、健全・正常な生育が維持された。
- 6) その他の特性：組換え系統では、植物ホルモンのジャスモン酸及びサリチル酸が、接種により有意に増加した。また他の防御関連遺伝子の転写機能も対照より高かった。

(3) 総括

SCR 抵抗性品種比較試験及び抵抗性組換え系統の作出により、SCR 抵抗性遺伝子 *ZmREM1.3*が特定された。同遺伝子は、SCR 接種に対し、対照より有意に高い抵抗性を発現し、また光合成・エネルギー代謝などの諸機能を維持し、組換えトウモロコシの健全・正常な生育を保持した。本結果は今後のトウモロコシ SCR 抵抗性育種に有用な情報を与えると期待される。

(林 健一)

Effect of transgenic rootstock grafting on the omics profiles in tomato

オミクス解析による組換え台木に接ぎ木されたトマト穂木への影響

Kodama H *et al.*

2021

Food safety 9: 32-47

わが国の大学（千葉大、筑波大、東京農工大、大阪府立大）の研究グループによる報文。組換え体と非組換え体の間での接ぎ木技術は、新しい植物育種技術の一つとして数えられる。例えばトマトでは、組換え体台木に非組換え体穂木を接ぎ木すれば、穂木に実る果実には外来遺伝子は含まれないが、台木の外来遺伝子の影響がある可能性がある。著者らは、組換え台木に接ぎ木された非組換え穂木のトマト果実について、各種オミクス解析を行い、将来、食品としての安全性を審査する際の評価点について検討した。

(1) 評価用試料

組換えマイクロトム（GUS 及び NPTII 発現）を台木、非組換えミニトマト品種（ステラ）を穂木とした接ぎ木トマトをモデルとし、特定網室で栽培して果実を得、以降の分析の試料に供した。非組換えマイクロトムを台木した接ぎ木トマトの果実は、対照として供試した。尚。果実の発達や新鮮重量には台木による差はなかった。

(2) トランスクリプトーム解析

トマト果実から全 RNA を抽出し、RNAseq 法によるトランスクリプトーム解析を行った。検出された約18,500遺伝子のうち、発現量の有意な変化が見られたのはわずか6 遺伝子（組換え台木で増加1、減少6）であった。既知のアレルゲンとして知られるタンパク質の遺伝子発現には差異はなかった。

(3) プロテオーム解析

検出された2442ピークの主成分分析の結果、台木による有意差はなかった。

(4) メタボローム解析

LC-ESI-MS 及び GC-EI-MS 分析で、それぞれ93及び114のピークグループが検出され、うち2倍以上の違いがあったピークグループは、わずか2つであった。変化のあった2代謝物は、同一試料の果実間でも差異があった。一方で、トマチン等、既知の有害代謝物の蓄積量は、台木による違いはなかった。

(5) 一般食品成分分析

一般食品成分（水分、タンパク質、脂質、灰分、炭水化物）は、台木による差異は見られなかった。

(6) 総括

各種オミクス解析により、台木植物の遺伝子組換えの有無は、非組換え穂木の果実の転写物、タンパク質、および代謝物プロファイルに与える影響は、非常に限定的であることが示唆された。

(小口 太一)

Field trial demonstrating phytoremediation of the military explosive RDX by XplA/XplB-expressing switchgrass

XplA/XplB を発現するスイッチグラスによる軍用爆薬 RDX のファイトレメディエーションを実証するフィールド試験

Cary TJ *et al.*

2021

Nature Biotechnology 39: 1216-1219

米国陸軍及び大学による原著論文。RDX（ヘキサヒドロ-1, 3, 5-トリニトロ-1, 3, 5-トリアジン）は爆薬の一種で、軍用爆薬として使われる。また、RDX はヒトを含むほ乳類に対して毒性があり、軍事演習により演習場等に残留した RDX による地下水汚染が問題となっているが、その除去は困難であった。筆者らは、軍事施設 3 か所での組換えスイッチグラスによるファイトレメディエーションのフィールド試験について、以下の内容を報告した。

(1) RDX 分解酵素

先行研究で、土壌細菌 *Rhodococcus rhodochrous* 11Y 株より RDX 分解酵素をコードする遺伝子 *xplA* 及び *xplB* が単離された。*xplA* 及び *xplB* は、シトクロム P450 タンパク質及びフラボドキシンレダクターゼをそれぞれコードする。先行試験で作出されたこの 2 遺伝子を発現するシロイヌナズナは RDX を分解することが実験室試験で確認されている。

(2) 組換えスイッチグラス

xplA 及び *xplB* 発現カセット（トウモロコシ又はスイッチグラスユビキチンプロモーターで発現）を含む T-DNA ベクターを用い、アグロバクテリウム法でスイッチグラス（品種 Alamo）に導入した。8 系統の形質転換体を得、うち 3 系統をフィールド試験に用いた。

(3) プロットデザイン

3 m x 3 m（深さ 0.5 m その下に 0.25 m の砂層）の RDX 非汚染区画に 0.68 kg の RDX を土壌表面に投与して灌水してしみこませることで、軍事訓練による汚染状況を模した。そこで組換え体及び非組換え体各 150 個体を植えた（実施した軍事施設の所在地は非公開）。米国農務省植物防疫所（APHIS）の許可の下、2016～2018 年の 3 年間フィールドで栽培し、RDX の除去状況は、砂層から吸い上げた水の濃度により評価した。

(4) RDX の除去

栽培初年度から、組換え体区では、非組換え体栽培区及び植物無し区と比較し、RDX 濃度が低い傾向が認められた。栽培開始から 3 年目の組換え体区の RDX 濃度は、非組換え体区及び植物無し区と比較して有意に低かった。組換え体の 3 年間の栽培による RDX 除去量は 27 kg/ha であった。

(5) 総括

フィールド試験によって、*xplA/xplB* 発現組換えスイッチグラスによる RDX のファイトレメディエーションの有効性が確認された。本手法は、他の DRX 除去方法と比較して、費用対効果が高く、軍事演習施設における DRX による地下水汚染を防ぐための実用的な方法である。

（小口 太一）

ERA プロジェクト調査報告

2021年12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)