
ERAプロジェクト調査報告

March 2023

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

2023.03

バイオテクノロジー研究会

2023年の調査報告書第1号（通算第62号）をお届けします。

本号では、ゲノム編集技術を利用した研究例として、No. 607で葉の老化遅延と全稔実粒数の増加を同時に示すイネ変異体を作成した研究、No. 609で貯蔵寿命の向上を目指しエチレン生成抑制バナナ系統を作成した研究、No.612で油糧生産に適した黄色種皮特性を持つナタネ2重突然変異系統を作成した研究、No.614で複数のsgRNAをプールして作成したダイズ多重変異集団から根粒数が有意に変化した突然変異系統を単離した研究及びNo.615でステロール代謝に関連した遺伝子のゲノム編集によりビタミンD3含量を強化したトマトを作成した研究をご紹介します。

また、遺伝子組換え技術を用いた研究例として、No.608でストレス誘導性のMAPキナーゼSIMKの発現を増強あるいは抑制した組換えアルファルファを作成した研究、No.610でrubisco含量増加トウモロコシ組換え系統の低温耐性を解析した研究、No.613で新規ストレス誘導性のプロモーターの単離とそのプロモーターを利用したストレス耐性向上組換えコムギ及び組換えオオムギを作成した研究及びNo.616でストレス応答性ガラクトキノール合成酵素遺伝子過剰発現ポプラの隔離ほ場における干ばつ耐性を解析した研究をご紹介します。

さらに、慣行遺伝育種と組換え育種を組み合わせた研究例としてNo.611で高ゼアキサンチン含有トマトを作成した研究をご紹介します。

なお、これまでに調査報告書でご紹介した文献抄訳は、以下のURLで閲覧可能です。

<http://www.ilsijapan.org/ILSIJapan/COM/Rcom-bi.php>

目次

No.607	サイトカイニン酸化酵素 / 脱水素酵素 OsCKX11によるイネのソース・シンク関係の調整 一葉の老化及び全粒数の同時調整 Cytokinin oxidase/dehydrogenase OsCKX11 coordinates source and sink relationship in rice by simultaneous regulation of leaf senescence and grain number.....	1
No.608	アルファルファSIMK 過剰発現は根毛育成・根粒群形成・地上部バイオマスの増加を引き起こす Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair grow the nodule clustering and shoot biomass production	2
No.609	CRISPR/Cas9手法による <i>MaACO1</i> のゲノム編集によるバナナ貯蔵寿命の向上 CRISPR/Cas9-mediated genome editing of <i>MaACO1</i> (<i>aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase1</i>) promotes the shelf life of banana fruit	3
No.610	Rubisco 含量増加トウモロコシにおける低温ストレスの緩和及び回復の促進 Increased rubisco content in maize mitigates chilling stress and speeds recovery	4
No.611	カロテノイド生合成の遺伝的操作による高ゼアキササンチン含量トマト果実の開発 Development of zeaxanthin-rich tomato fruit through genetic manipulations of carotenoid biosynthesis	6
No.612	<i>BnTT8</i> 相同遺伝子を標的とした突然変異導入による油糧生産に適した黄色種皮ナタネの作出 Targeted mutagenesis of <i>BnTT8</i> homologs controls yellow seed coat development for effective oil production in <i>Brassica napus</i> L.	7
No.613	ストレス誘導性 <i>HD-Zip I</i> 遺伝子プロモーターの利用による DREB/CBF のコムギ及びオオムギでの発現による植物の発達・ストレス耐性・収量への影響 DREB/CBF expression in wheat and barley using the stress-inducible prompters of <i>HD-Zip I</i> genes: impact on plant development, stress tolerance and yield	8
No.614	プールされた CRISPR-Cas9 によるダイズの多重突然変異集団の作出 Generation of a multiplex mutagenesis population via pooled CRISPR-Cas9 in soya bean	10
No.615	新たなビタミン D 供給源となるバイオ強化トマト Biofortified tomatoes provide a new route to vitamin D sufficiency.....	11
No.616	隔離ほ場におけるシロイヌナズナ由来ストレス応答性ガラクトキノール合成酵素遺伝子 (<i>AtGolS2</i>) 過剰発現ポプラの干ばつ耐性の改善 Transgenic poplar trees overexpressing <i>AtGolS2</i> , a stress-responsive galactinol synthase gene derived from <i>Arabidopsis thaliana</i> , improved drought tolerance in a confined field	12

Cytokinin oxidase/dehydrogenase OsCKX11 coordinates source and sink relationship in rice by simultaneous regulation of leaf senescence and grain number

サイトカイニン酸化酵素 / 脱水素酵素 OsCKX11によるイネのソース・シンク関係の調整—葉の老化及び全粒数の同時調整

Zhang W *et al.*

2021

Plant Biotechnology Journal 19: 335-350

中国の大学及び国研の研究者による原著論文である。葉の老化 (senescence) は葉の生活環の最終段階であり、葉緑素及び光合成器官の不可逆的崩壊による葉の黄化によって示される。老化の遅延は、光合成活性の延長、バイオマス蓄積の増大、穀粒充実の増大、収量増加をもたらす。このため、老化の遅延は収量増大の一つの可能性を示す。著者らは CRISPR/Cas9手法による老化遅延突然変異イネ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

I イネの一般的性状

(1) サイトカイニンとアブシジン酸 (ABA) との拮抗関係

両者は葉の老化に伴い拮抗的に作用する植物ホルモンである。サイトカイニンは、光合成能力の低下・老化の進行を遅延させる。ABA は反対に老化を促進させる。

(2) イネの成熟期におけるソース及びシンク

光合成産物の供給源をソース、光合成産物の蓄積部をシンクという。登熟期は、穂に蓄積される炭水化物の80% 以上は葉の光合成産物であり、葉が主要ソース、穂が主要シンクとなっている。

II CRISPR/Cas9により作出されたイネの突然変異系統

(1) サイトカイニン分解酵素突然変異体群の作出

イネには11のサイトカイニン分解酵素群 (OsCKX1~OsCKX11) が存在している。各 CKXs の役割を特定するため、CRISPR/Cas9手法より、個別にノックアウトした突然変異系統群が作出された。これらの精査の結果、ただ一つ、OsCKX11が葉の老化に関与していることが示された。

(2) OsCKX11の発現様式と存在部位

発現は若葉・成葉期よりも老化期でより強くなり、植物体の各部位：葉、根、穂、茎でも発現し、葉では中央部が最高であった。細胞中では原形質に存在していた。

(3) *osckx11*変異体における葉緑素の増加及び葉の老化の遅延

*osckx11*変異体では葉緑素は対照に対し、平均34% 増加した。粒の充実期及び完熟期の光合成能力は対照に対し、9.77% 及び29.98% 高かった。以上から OsCKX11における葉緑素含量及び光合成能力の対照に対する増加から、ソース能力の向上が確認された。

(4) *osckx11*変異体における穂実粒数及び収量の増加

*osckx11*変異体は対照に対し、分けつ数で14.83~27.07%、1次枝梗数で20.53~23.64%、1穂粒数で15.11~27.91%、1株粒数で21.62~27.29%、それぞれ増加した。一方、稔性で7.33~9.96%、千粒重で6.99~8.92%、種子幅で3.85~5.22% 低下した。しかし全収量では、11.61~16.97% の増収を示し、この増収効果は別のほ場試験でも追認された。以上から *OsCKX11*の欠損により、イネのシンク能力の向上が明示され、最終結果の穀粒収量の増加が確認された。また収穫期の遅延はなかった。

III 総括

CRISPR/Cas9システムの利用により新しいイネ突然変異系統が作出された。同系統ではサイトカイニン量が増加すると共に、葉の老化の遅延 (ソースの増加) 及び全穂実粒数の増加 (シンクの増加) の両特性を同時に発現し、最終的に11.61~16.97% の1株総収量の増加を示した。ソース及びシンクの両者の同時増加の新特性は、今後のイネ育種に有用な情報を提供することが期待される。

(林 健一)

Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, the nodule clustering and shoot biomass production

アルファルファ SIMK 過剰発現は根毛育成・根粒群形成・地上部
バイオマスの増加を引き起こす

Hrbáčková M *et al.*

2021

Plant Biotechnology Journal 19: 767-784

チェコ及びドイツの大学研究者による原著論文である。アルファルファは粗放栽培耐性が高い優れた牧草である。アルファルファ（マメ科植物）は、根粒菌との共生により空中窒素を根粒に蓄積・利用する特性を有する。この過程には、根粒菌の感染により誘起するストレス誘導性の MAP キナーゼ（SIMK）が関与している。著者らは SIMK の発現を増強あるいは抑制した組換えアルファルファを作出し、SIMK 増大系統の優れた特性を研究し、以下の結果を得た。

(1) 供試組換えアルファルファ系統の作出

栽培品種 Regen-SY を対照（RSY 系統：L1及びL2）とし、SIMK 抑制 RNAi 系統（L3及びL4）、SIMK 過剰発現系統（L5及びL6）が作出された。

(2) SIMK による根毛表現型の変化

生育15日の若株にアルファルファ根粒菌（*Sinorhizobium meliloti*）が接種され、根毛の表現型が調査された。根毛の平均長は、対照（L1・L2）の471 μm に対し、RNAi 系統の L3・L4は345・311 μm、過剰発現系統の L5・L6は527・506 μm であり、発現抑制で有意な短縮、過剰発現で有意な伸長を示した。

(3) 感染率及び根粒の形成

根粒菌接種10日後の感染率及び根粒の形成を調査した。対照系統（L1）は76%、RNAi 系統（L4）は84%と高い感染率を示したが、過剰発現系統（L5）では46%程度と低かった。接種15日後の根粒形成数でも、L1及びL4は85%が2～3であったが、L5は、67%が4以上であり、27%は6以上であった。以上から、過剰発現系統が対照及びRNAi 系統より有意に高い感染率、根粒形成することが示された。

(4) 刈取り後再生地上部バイオマス及び葉の生育

刈取り60日後の地上部再生長が調査された。過剰発現系統（L5）は、対照（L1）と比較して、顕著に健全、長大、頑丈な再生株を生成した。一方、RNAi 系統（L4）は小型・貧弱な再生であった。地上部バイオマスは、対照（L1）に対して、RNAi 系統（L4）は著減し、過剰発現系統（L5）は有意に高かった。過剰発現系統（L5）は、葉柄が低く、幅広く大型の葉を生成したが、RNAi 系統（L4）は小型・薄く・曲がった葉を生成した。

(5) 総括

根粒菌接種によるストレス誘起 MAP キナーゼ（SIMK）を発現抑制及び過剰発現した組換えアルファルファ系統が作出された。過剰発現系統は、根毛長、感染（接種）系、根粒群形成地上部バイオマスなどが対照より有意に増加し、SIMK のプラスの効果が顕著に示された一方、RNAi 系統は、すべての形質において弱小化を示した。本成果は組換え手法の導入によるアルファルファの新しい展開であり、関係分野に有用な情報を提供することが期待される。

(林 健一)

CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *MaACO1* (*aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1*) promotes the shelf life of banana fruit

CRISPR/Cas9手法による *MaACO1* のゲノム編集による バナナ貯蔵寿命の向上

Hu C *et al.*

2021

Plant Biotechnology Journal 19: 654-656

中国の国研研究者による短報である。バナナは高い栄養価と経済的価値を有し、途上国では主食となっている。バナナ果実は短時間で成熟・腐敗するため、収穫後の貯蔵・輸送・市場化は大きな制約となっている。バナナの貯蔵寿命 (shelf life) は果実のエチレン生成と密接な関係があり、エチレン生成の抑制による貯蔵寿命の延長は重要な課題となっている。著者らは CRISPR/Cas9 システムによるエチレン生合成に関わる ACC 酸化酵素遺伝子 (*MaACO1*) への変異導入によるエチレン生成抑制バナナ系統の作出を試み、以下の結果を得た。

(1) バナナのエチレン生成

ACC 酸化酵素 (ACO) は、エチレンの前駆体である 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) を酸化しエチレンを生成する酵素である。既往研究結果からバナナは ACC 酸化酵素遺伝子である *MaACO1* が特定されている。

(2) CRISPR/Cas9 システムによる突然変異系統の作出

バナナ栽培品種 Brazilian (AAA グループ) に、CRISPR/Cas9 による *MaACO1* 遺伝子のゲノム編集を試み、*MaACO1* 抑制変異体が作出された。

(3) *MaACO1* 抑制変異系統の特性

- 1) 株高は対照より僅かに低い。
- 2) 果実長は 15%、果実重は 5~14% 対照より低い。
- 3) 室温下の果実成熟期間は、対照は 21 日で果実は黄色・褐色小斑点を示したが、変異系統の成熟は遅延し、黄色・緑色で褐色小斑点は不在である。
- 4) エチレン処理に対しては、両系統とも通常の成熟を示したが、*MaACO1* 抑制変異系統は対照に対し 1~2 日成熟が遅れ、貯蔵寿命の延長が明示された。
- 5) 糖・酸濃度には差はなかったが、*MaACO1* 抑制変異系統は対照よりビタミン C が多い。
- 6) エチレン生成量は、自然条件下では対照が収穫後 18~21 日の期間に急増したが、*MaACO1* 抑制変異系統は対照に対し、常に 1/4~1/5 であった。
- 7) エチレン処理条件下では両者間に大差なく成熟したが、収穫後 3 日目に対照ではエチレンが増加したが、*MaACO1* 抑制変異系統では増加しなかった。

以上、自然条件及びエチレン処理の両条件下で *MaACO1* 抑制変異系統は対照よりエチレン生成量が低く、貯蔵寿命が延長されることが明示された。

(4) 総括

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集により *MaACO1* 抑制変異バナナが作出された。同系統は対照よりエチレン生成量が低下し、自然あるいはエチレン処理条件下で対照に対する貯蔵寿命の延長が明示された。同系統は対照に対し、僅かに株丈及び収量が低下するが、それ以外は大差なく、新遺伝資源として、成熟後のロスが減少し、経済的価値の増加が期待される。

(林 健一)

Increased rubisco content in maize mitigates chilling stress and speeds recovery

Rubisco 含量増加トウモロコシにおける低温ストレスの緩和及び回復の促進

Salesse-Smith CE *et al.*

2020

Plant Biotechnology Journal 18: 1409-1420

米国の研究所・大学及びオーストラリアの大学の研究者による原著論文である。トウモロコシは世界で最重要な作物の一つであり、熱帯原産ではあるが、60%は温帯で栽培されている。米国では、中西部を中心に3億7,000万トン（2017年）生産されているが、生育初期・末期の低温がストレスとなり、生育期間は4～5ヶ月しかない。低温耐性向上により作期の延長・栽培地域の拡大による生産の増加が期待されるため、低温耐性の向上は長年の課題であった。トウモロコシを含むC4作物は、炭酸ガスの濃縮利用機能により中～高温はC3作物より多収といわれるが、低温では生産が減退し、C3作物より低収となる。これはC4作物のrubisco（リブローズ-1, 5-2リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ）の性能がC3作物のrubiscoより60～80%低いことが原因と推測されている。そのため、トウモロコシの低温耐性向上の有力な手段として、rubisco含量の増強が考えられる。著者らは、先行研究によるrubisco含量増加トウモロコシ組換え系統を精査し、以下の結果を得た。

(1) 供試組換えトウモロコシ

Rubisco含量の増加のため、①アセンブリ因子（*RAF1: Rubisco assembly factor 1*）の過剰発現系統（RAF1）、②rubiscoの大サブユニット/小サブユニットの過剰発現系統（LSSS）、及び、③その両方の過剰発現系統（RAF1-LSSS）の3系統を供試した。

(2) 低温耐性組換え系統の低温ストレス検定

生育3週間の植物体に、14℃16時間・12℃8時間の低温ストレス処理を行い、その後1週間25℃の回復処理を行った。

i) 低温ストレス条件下の生育

RAF1-LSSS系統は草丈・地上部バイオマス・葉面積の全てにおいて、LSSS系統は草丈・地上部バイオマスにおいて、対照より大であった。

ii) 低温ストレス条件下の光合成率

非ストレス条件・通常の光強度での光合成率は、RAF1-LSSS及びLSSS系統は対照より高かった。低温ストレス下では、全系統の光合成率は非ストレス条件の50%以下に低下した。光飽和条件でのRAF1-LSSS系統の光合成率は、非ストレス条件で12%、低温ストレス下で17%、対照より高かった。

(3) 低温ストレスからの回復能力

葉緑素蛍光を用いて調査した結果、RAF1-LSSS系統の低温ストレスからの回復は対照より

有意に早いことが示された。一方、LSSS 系統の低温ストレスからの回復は有意差ではないものの対照よりわずかに遅かった。

(4) 生育初期の低温ストレス耐性

低温ストレスが最も発生しやすい生育初期（3週間幼植物）への低温ストレスが、その後の生育中～後期の各種特性に及ぼす後作用を調査した。RAF1-LSSS 系統は対照に対し、草丈・止葉面積・飽和光合成率は有意に高く、一方、開花－絹糸抽出期間は有意に（3日間）短縮した。以上から、生育初期の低温ストレスは、RAF1-LSSS 系統に対しては負の影響を与えなかったことが示された。

(5) rubisco 補強の限界

RAF1-LSSS 系統の反応から、rubisco の増強により低温ストレスの反応及び回復の向上が示された。しかし、葉緑素蛍光反応における光化学的反応における対照との差異消失から、低温ストレス下の生育低下は rubisco 含量の差が限定要因ではないことが示された。

(6) 総括

低温ストレスによる生育低下を軽減するために、rubisco の大小両サブユニット及び assembly factor の両方を補強された組換えトウモロコシ系統（RAF1-LSSS）が作出された。RAF1-LSSS 系統は飽和光合成率が対照より17%高く、各種の生育特性が対照より高かった。しかし、葉緑素蛍光反応の精査から、rubisco 含量は低温ストレス耐性の直接的限定要因ではないことが示され、rubisco 量と補完的に作用する別の因子との共同による低温耐性向上トウモロコシの作出の必要性が示された。

（林 健一）

Development of zeaxanthin-rich tomato fruit through genetic manipulations of carotenoid biosynthesis

カロテノイド合成の遺伝的操作による 高ゼアキサンチン含量トマト果実の開発

Karniel U *et al.*

2020

Plant Biotechnology Journal 18: 2292-2303

イスラエルの大学研究者による原著論文である。酸素添加カロテノイドであるゼアキサンチンは、人類の保健・栄養供給に大きな役割を果たしている。保健面では網膜の黄斑を保護し、高齢失明を防止している。栄養供給面ではゼアキサンチンに伴うカロチン供給量の増加により栄養向上に貢献している。このような多くのメリットにかかわらずゼアキサンチンの摂取量は一般的に低い。このため、安価で安定的にゼアキサンチンを供給する食料の開発が必須となった。トマトは、カロチン含量が高く、年間1億8,000万トン生産される生産量世界第2位の野菜であり、ゼアキサンチン増強の好材料と考えられた。このような情勢に基づき慣行育種及び組換え育種の2種類の手法で、高ゼアキサンチン含量トマトの開発を試み以下の結果を得た。

(1) 慣行遺伝育種

既存の4種類の突然変異系統 (*high pigment 3* (*hp3*)、*High-BETA* (B^{Sh})、*green stripe* (*gs*)、*high pigment 2* (*hp2*)) を順次交配し、多重集積突然変異系統を作出した。対照として品種M82を用いた。自殖子世代の最終系統はゼアキサンチン含量が39.0 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重、557 $\mu\text{g/g}$ 乾物重を示し、既存トマト中で最高値を示し、「Xantomato」と命名された。他の野菜のゼアキサンチン含量は10 $\mu\text{g/g}$ レベルが普通である。本系統は、 β カロチン含量も37 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重と高蓄積であった。

(2) 組換え育種

β -カロチン水酸化酵素 (BCH) を用いた高ゼアキサンチン含量トマトの作出が試みられた。柑橘 (*Citrus clementina*) 由来の *CcBCH2* 遺伝子をアグロバクテリウム法により2重突然変異系統 (*hp3/B^{Sh}*) に導入し、7組換え個体が作出された。これら7個体の zeaxanthin 濃度は10 $\mu\text{g/g}$ 以下であった。そこで、トマトの内在性色素体特異的 *BCH2* 遺伝子 (*CrtR-b2*) の変異体である *white flower* (*wf*) 突然変異系統と交配し、3重突然変異体 (*hp3/B^{Sh}/wf*) 背景で *CcBCH2* 過剰発現体を作成したところ、ゼアキサンチン含量として22.6 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重が得られた。一方、 β -カロチン及び全カロテノイド含量は大幅に低下した。

(3) 総括

ゼアキサンチン摂取量の増加による保健・栄養の向上を目的に、高ゼアキサンチン含有トマトの作出が慣行遺伝育種及び組換え遺伝子育種により試みられた。いずれの手法でも、高ゼアキサンチン含有トマトが作出されたが、慣行手法による4重変異体 (*hp3/B^{Sh}/gs/hp2*) において、 β -カロチン、総カロテノイド含量を維持した高ゼアキサンチン含有トマト系統が作出され、市場化が期待されている。

(林 健一)

Targeted mutagenesis of *BnTT8* homologs controls yellow seed coat development for effective oil production in *Brassica napus* L.

*BnTT8*相同遺伝子を標的とした突然変異導入による油糧生産に適した黄色種皮ナタネの作出

Zhai Y *et al.*

2020

Plant Biotechnology Journal 18: 1153-1168

中国の大学研究者による原著論文である。ナタネ (*Brassica napus* L., AACC, 2n=38) はダイズ・オイルパームに次ぐ世界第3位の油糧作物であり、世界の植物油の16%を生産している。人類・家畜の食料としての利用に加えて、工業的利用 (例えばバイオディーゼル) もなされている。現在のナタネ品種の殆どは種皮が黒~褐色である。既往研究によると、黄色種子は黒色種子よりも外皮・黒色素が少なく、油・タンパク質含量は高く、高品質であることが示されている。しかし、ナタネは異質四倍体 (AACC) であり、多くの遺伝子がリダンダントに存在するため、既往の交配育種による黄色種子系統の作出は成果が得られていなかった。そこで、著者らは CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集の適用を試み、以下の結果を得た。

(1) 標的遺伝子

*TT8*は、シロイヌナズナで黄色い種子となる変異体の原因遺伝子の一つとして単離された遺伝子である。

*TT8*は、フラボノイド合成経度に関わる酵素の遺伝子発現の調節に関わる basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子をコードする。

(2) CRISPR/Cas9による *BnTT8*の標的突然変異の作出

本研究では、ナタネ品種 J9707が形質転換受容体として用いられた。ナタネの *BnTT8*には、Aゲノムの *BnA09.TT8*とCゲノムの *BnC09.TT8*が存在する。CRISPR/Cas9によるゲノム編集手法により、T0世代で333個体が作出され、最終的に *BnA09.TT8*と *BnC09.TT8*の両方に変異が導入された14系統が選抜された。これら14系統は、全て黄色種皮を有することが確認された。

(3) 2重突然変異黄色種子系統の種皮における主要変化

選抜された14系統は、全て黄色種皮を有することが確認された。種子色の変化は種皮内層で発現し、ここではPA (黒色素) は完全に消失していた。種皮の厚さは対照より有意に49%薄いことを示した。これに基づく種皮色の変化 (黄色化) は開花21日後において最も顕著であった。

(4) 2重突然変異系統の油・タンパク質・脂肪酸及び収量

T0及びT1系統の油含量 (及び対対照増加率) は51.80% (+9.10%) 及び48.01% (+5.29%) であった。タンパク質も同様に16.95% 及び16.00% 増加し、栄養価の増加を示した。脂肪酸では、リノール酸・リノレン酸・パルミチン酸が増加し、ステアリン酸・オレイン酸が減少した。収量関連特性に多少の変動はあったが、種子収量には対照と有意差はなかった。以上から、脂肪酸組成の変化及び栄養価の向上を含む全油量の増加が示唆された。

(5) 総括

黄色種皮・高品質ナタネ系統を作出するために、ナタネ純生系統 J9707に CRISPR/Cas9が適用された。その結果、従来の黒~褐色種皮子の機能を完全に喪失した AC 両ゲノム *BnTT8*機能欠失2重突然変異系統が作出され、後代への黄色種皮特性の安定した遺伝も確認された。同系統は脂肪酸組成・栄養価の向上を含む全油量の増加傾向を示した。本研究は CRISPR/Cas9システムの適用による黄色・高品質ナタネ系統の作出の最初の成功例であり、今後のナタネ育種に有用な情報及び遺伝資源を提供することが期待される。

(林 健一)

DREB/CBF expression in wheat and barley using the stress-inducible promoters of *HD-Zip I* genes: impact on plant development, stress tolerance and yield

ストレス誘導性 *HD-Zip I* 遺伝子プロモーターの利用による
DREB/CBF のコムギ及びオオムギでの発現による植物の
発達・ストレス耐性・収量への影響

Yang Y *et al.*

2020

Plant Biotechnology Journal 18: 829-844

オーストラリアの大学研究者による原著論文である。干ばつと低温は2大環境ストレス要因であり、多くの作物がその生育・収量に影響を受けている。多くのストレス耐性作物が作出されているが、通常栽培では対照より低収である場合が多い。従って、通常栽培では生育・収量を維持し、なおストレス耐性が向上している作物・品種の開発が要望されている。ストレス耐性はそれを調整するプロモーターの活性により変動する。著者らは既製のコムギ及びオオムギのストレス耐性組換え品種に対し、デュラムコムギ由来の新規2種類のストレス誘導性プロモーターの制御下でストレス耐性を向上させる DREB/CBF 転写因子を発現する植物体を作成したのち、そのストレス耐性（干ばつ・低温）の変化を研究し以下の結果を得た。

(1) 新規ストレス誘導性プロモーターの単離

デュラムコムギより新規に2種類の干ばつ及び低温ストレス誘導性転写因子（HDZI-3及びHDZI-4）が単離され、これら遺伝子のプロモーターが導入遺伝子の発現をドライブするプロモーターとして使用された。

(2) ストレス耐性（干ばつ・低温）コムギ及びオオムギの作出

既報により単離されているオオムギ及びコムギの DREB/CBF（HvDREB3及び TaCBF5L）のコード遺伝子を前出の2種類のプロモーターの制御下に連結した発現カセットコンストラクトをコムギ品種 *Gladius*、オオムギ品種 *Golden Promise* に導入し、ストレス研究系統が作出された。

(4) 十分灌漑条件における組換え系統の生育・収量

- 1) 組換えコムギ系統：組換えコムギ4系統中の2系統では草丈・茎数・穂数・1株及び全種子重・バイオマスは対照と差はなかった。しかし他の2系統は対照より低い値を示した。
- 2) 組換えオオムギ系統：草丈・茎数・開花期・収量は対照と差はなかった。

(5) 各種干ばつ条件におけるコムギ系統の生育・収量

- 1) 軽度干ばつ条件：種子数・バイオマス・収量が対照より低下した。また開花期が2～3日促進された。
- 2) 超干ばつ条件：HDZI-3プロモーター区では茎数・穂数に大差はなかった。HDZI-4プロモーター区では、茎数・穂数に差はなかったが、種子数・バイオマス・収量が有意に増

加した。また開花期が3～4日促進された。

(6) 各種干ばつ条件におけるオオムギ系統の生育・収量

両プロモーターとも各種特性値の向上をもたらし、干ばつ耐性の向上が顕著に示された。

(7) 組換え系統の低温耐性

4℃の低温条件で対照区の生存率が6%以下の低温条件でも、組換えコムギ系統は対照の3～4倍高い生存率を示し、低温耐性の向上を示した。特に2系統は対照より有意に高い生存率を示した。HDZI-3プロモーター区はHDZI-4プロモーター区より明らかに高い生存率を示した。組換えオオムギ系統でも全体的にはコムギと同様であったが、低温耐性は全般的にコムギ系統より高かった。

(8) 総括

デュラムコムギ由来の新規2種類のプロモーターHDZI-3及びHDZI-4の制御下でDREB/CBF転写因子を発現させるコンストラクトが作出され、ストレス耐性組換えコムギ系統及びオオムギ系統に導入され、そのストレス耐性発現に対する変化が研究された。両プロモーターは、オオムギの干ばつ耐性及び低温耐性並びにコムギの低温耐性の向上に貢献することが明示された。本研究結果は、研究された新プロモーターと既存研究因子との組合せによるイネ科・作物のストレス耐性の向上に関する新しい情報を与えるものとして期待される。(訳者注：コムギは乾燥地育種で獲得する生来の干ばつ耐性を有している)。

(林 健一)

Generation of a multiplex mutagenesis population via pooled CRISPR-Cas9 in soya bean

プールされた CRISPR-Cas9によるダイズの多重突然変異集団の作出

Bai M *et al.*

2020

Plant Biotechnology Journal 18: 721-731

中国の大学研究者による原著論文である。ダイズは食料・飼料の油脂・タンパク質の給源作物、根粒による固定窒素の給源作物として極めて重要な作物である。また、化学物質・放射線・形質転換による突然変異誘導成果物も多い。しかし、ダイズ遺伝子の75%は重複しており、ゲノム構成は極めて複雑で、全面的な遺伝的利用を困難にしている。一方、CRISPR-Cas9システムは多くの作物で種々の成果をあげているが、重要なことは、一つのsgRNAが同時に多重突然変異を作出する能力を有することである。著者らは標的遺伝子の異なる複数のCRISPR-Cas9コンストラクトを組み合わせたダイズ多重変異集団を作出し、多重変異集団から根粒形成に特徴的な表現型を示す多重変異ダイズ系統体の特定に成功した。

(1) sgRNAの作出

ゲノム編集の標的候補として102遺伝子（根粒形成関連74、種子の機能性関連28）を選定し、これらを標的とする70種類（26は単一遺伝子、44は複数遺伝子を標的）のsgRNAが準備された。70種類のsgRNAを3～5種類ずつプールし、16種類のプールを用意した。

(2) 多重突然変異集団の作出

16種類のプールをそれぞれ、ダイズ毛状根に感染させた。T0世代407個体について、導入されたsgRNAの種類数を調べたところ、126個体は2種類のsgRNA、33個体は3種類のsgRNA、21個体は4種類のsgRNA、5個体はすべての5種類のsgRNAを含有していた。T0世代における平均変異誘発頻度は59.2%で、これには多重変異を有する35.6%の系統が含まれる。

(3) T0からT1世代への遺伝

T0世代のダイズ形質転換体はトランスジェニックキメラであるにもかかわらず、T1世代でも、平均約50%程度、変異が遺伝された。

(4) 根粒形成が増減した多重突然変異体の特定

T1世代において根粒形成に特徴的な表現型を示した2種類の多重変異体について特性解析をした。*gmric1/gmric2*の二重相同突然変異系統は、根粒数が対照より有意に増加する特性を示し、この特性は水耕栽培でも確認された。*gmrnd1-1/1-2/1-3*の三重突然変異系統は、栄養生長・バイオマス・根粒数が減少して、貧弱な生育を示した。

(5) 総括

異質四倍体のゲノムを有するダイズに対して、プール化したCRISPR-Cas9を利用した多重突然変異集団が作出された。得られた*gmric1/gmric2*の二重相同突然変異系統は対照より根粒数が有意に多い新特性を示した。これらの結果は標的的多重突然変異集団の作出による新たな育種手法に関する情報を与えることが期待される。

(林 健一)

Biofortified tomatoes provide a new route to vitamin D sufficiency

新たなビタミン D 供給源となるバイオ強化トマト

Li J *et al.*

2022

Nature Plant 8: 611-616

英国、イタリア、チリ、キューバの大学及び公的研究機関の研究グループによる報文。植物は、十分なビタミン D を含まないため、食事によるビタミン D の供給源となりえていない。筆者らは、トマトのステロール代謝系のゲノム編集により、ビタミン D の前駆体を高蓄積するトマトの作出を試み、以下の結果を得た。

1) 植物におけるビタミン D

トマトのステロール合成経路の中間産物である7-dehydrocholesterol (7-DHC) は、通常、7-dehydrocholesterol reductase (7-DR2) のはたらきによってコレステロールに代謝されるが、UVB を照射することでビタミン D₃に変換される。そこで、7-DR2をコードする遺伝子を標的としたゲノム編集 (CRISPR-Cas9利用) が試みられた。T1世代で5個体の7-DR2欠損系統を得、T2世代でそれぞれの変異がホモの系統を得た。

2) 果実の7-DHC 量

野生型トマトでは、7-DHC は未熟果実ではわずかながら検出されるが、成熟果実では検出限界以下である。変異5系統はいずれも、未熟果実で7-DHC 含量が大幅に増加した。変異体の7-DHC 含量は、成熟果実では低下する。7-DHC 含量は、緑色果実及び成熟果実で2.4及び1.3 µg/g 乾燥重量であった。葉の7-DHC 含量は果実よりもずっと高くおよそ700 µg/g 乾燥重量であった。

3) UVB 照射により生成するビタミン D₃量

変異体の緑色果実、成熟果実への UVB 照射により生成するビタミン D₃含量は、それぞれ0.3、0.2 µg/g 乾燥重量であった。中型トマトの乾燥重量は約8~10 g で、変異型成熟トマト1果実で一日推奨摂取のおよそ20%を摂取することが可能となる計算である。変異体の葉への UVB 照射で生成するビタミン D₃含量は、200 µg/g 乾燥重量であり、ビタミン D₃サプリメントの原料として利用できる可能性がある。

4) 内生ステロイド系グリコアルカロイドレベル

トマトの内生ステロイド系グリコアルカロイド (SGA) である α -トマチン及びデヒドロトマチン含量は、野生型でも成熟果実では、十分低レベルではあるが、変異体では、野生型よりもさらに低レベルとなっていた。一方、成熟果実におけるコレステロール濃度は、野生型よりも変異型で高かった。

5) 総括

トマトのステロール代謝経路の7-DHC のゲノム編集により、通常植物ではごく低濃度でしか含まれないビタミン D₃含量を強化したトマトの作出に成功した。加えて、7-DHC ゲノム編集トマトでは、反栄養成分である SGA も低減した。ビタミン D 不足に悩む人は世界で約10億人いるとされており、多くの人々の栄養改善に利用できるものと期待される。

(小口太一)

**Transgenic poplar trees overexpressing *AtGolS2*,
a stress-responsive galactinol synthase gene derived
from *Arabidopsis thaliana*, improved drought tolerance in
a confined field**

**隔離ほ場におけるシロイヌナズナ由来ストレス応答性ガラクトキノール合成
酵素遺伝子 (*AtGolS2*) 過剰発現ポプラの干ばつ耐性の改善**

Shikakura Y *et al.*

2022

Transgenic Research 31: 579-591

筑波大、奈良先端大、東大の研究グループによる原著論文。干ばつストレスは、植物の生長や生産性を制限する環境ストレスであり、干ばつ耐性を向上させた樹木の開発は、潜在的な植林地の拡大や持続可能な開発を促進することが期待される。筆者らは、シロイヌナズナ由来のストレス応答性ガラクトキノール合成酵素遺伝子 *AtGolS2* を導入した遺伝子組換えポプラを開発し、隔離ほ場試験によりその干ばつ耐性向上を評価した。

1) *AtGolS2* 遺伝子

ガラクトキノールは種子の高度な干ばつ耐性に関連するラフィノース属オリゴ糖 (RFO) の前駆体である。*AtGolS2* はシロイヌナズナにおいてストレス応答性 RFO 合成の鍵酵素とされる。先行研究で作出された CaMV35S プロモーターに *AtGolS2* を繋いだ発現カセットを含むコンストラクトをアグロバクテリウム媒介法によりポプラ実験系統 (*Populus tremula* × *P. tremuloides*, T89系統) に導入した組換えポプラ 2 系統 (G5、G14) 及び非組換え T89系統が隔離ほ場試験に供試された。

2) 隔離ほ場試験

圃場試験は、茨城県つくば市の筑波大学 T-PIRC 遺伝子実験センターの隔離ほ場で実施された。2018年11月に隔離ほ場に植栽し、2020年5～8月に灌水制限処理が行われ、詳細な観測が行われた。

3) 灌水制限

実験期間中灌水しない無処理区、及び、それに加えて株元をビニールで覆い雨水侵入を制限した灌水制限区の2つ処理区を設けた。適切な灌水を行った灌水区を対照区とした。土壌水分含量は、灌水制限区及び無処理区は、試験終了時まで20%以下に低下したのに対し、灌水区は期間を通じて概ね50%を保持した。

4) QY の変動

環境ストレス障害レベルの指標として光合成の量子収率 (QY) が測定された。灌水区では実験期間を通じて組換え 2 系統及び T89系統いずれも40%以上を維持した。一方、無処理区で、G14系統で40%以上を保持したのに対し、G5及び T89系統は20%以下に低下した。灌水制限区ではいずれの系統の QY 値も20%以下まで低下した。処理区間の比較により、組換え 2 系統が対照 T89系統よりも干ばつストレス傷害が小さい傾向が示された。

5) 環境の干ばつストレス状態の精査

干ばつストレスとストレス傷害の関係をより詳細に比較するため、機械学習手法により、環境の干ばつストレス状態を3クラスにクラスタリングした。それぞれクラスにデータを分け、再度、QYの比較を行ったところ、最もストレス強度が高いクラスにおいて、組換え 2 系統のストレス傷害が非組換え T89系統と比較し、有意な緩和が示した。他の2クラスにおいては組換え 2 系統と T89系統の間で明確な違いは示されなかった。

6) 総括

隔離ほ場試験により、*AtGolS2* 遺伝子の導入によるポプラの干ばつ耐性の強化が示された。*AtGolS2* 遺伝子による干ばつ耐性の強化は既にイネやダイズ等で実績があり、今後の適用範囲の拡張が期待される。

(小口太一)

ERA プロジェクト調査報告

2023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 児島宏之

〒135-0004東京都江東区森下3-13-5

グローバルビル5F

TEL 03-6284-0877

FAX 03-6284-0878

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