

ケーススタディ 1.

# 自殖性作物の 高効率循環選抜育種法 (TMS循環選抜)について

## TMS: Transgenic Male Sterility

農業・食品産業技術総合研究機構:

田中淳一、谷口洋二郎、石井卓朗、安倍史高、赤坂舞子

農業生物資源研究所: 田部井豊、市川裕章、阿部清美、大嶋雅夫

東京大学: 岩田洋佳、矢部志央理

# 本日の内容

---

## 1. 海外で開発が進み、議論が行われている新育種技術の例

TMS循環選抜では、開発過程で遺伝子組換え技術を使うが、最終的に利用する育成系統には、交配過程で外来遺伝子が残存しないものが選抜されるもの

## 2. TMS循環選抜の作物育種上の重要性と技術的特性

## 3. TMS循環選抜のカルタヘナ法における位置付けは？

# 1) 海外で開発が進み、 議論が行われている新育種技術 の例

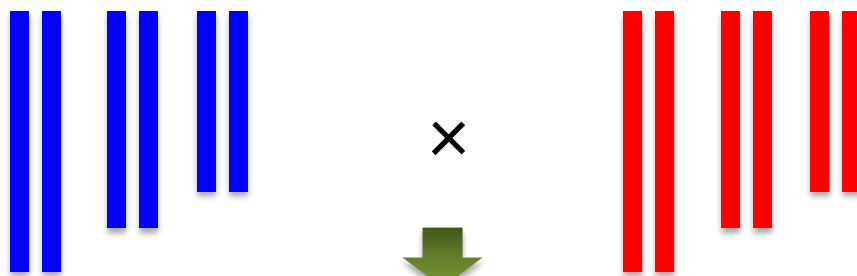
- 逆育種 (Reverse Breeding)
- SPT (Seed Production Technology)

# 逆育種 (Reverse Breeding)

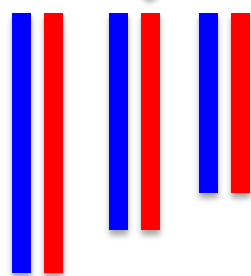
目的: 優良F1品種から親系統の復元(トウモロコシや野菜の品種)

通常は

親系統

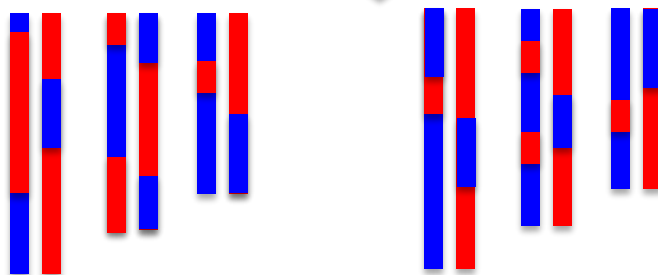


F<sub>1</sub>品種



遺伝的な組換え (Genetic Recombination)

自殖  
F<sub>2</sub>世代



F<sub>2</sub>世代以降、  
染色体が切れ切れに...

親系統には戻れない

## Review article

## Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis

Rob Dirks<sup>1</sup>, Kees van Dun<sup>1</sup>, C. Bastiaan de Snoo<sup>1</sup>, Mark van den Berg<sup>1</sup>, Cilia L. C. Lelivelt<sup>1</sup>, William Voermans<sup>1</sup>, Leo Woudenberg<sup>1</sup>, Jack P. C. de Wit<sup>1</sup>, Kees Reinink<sup>1</sup>, Johan W. Schut<sup>1</sup>, Eveline van der Zeeuw<sup>1</sup>, Aat Vogelaar<sup>1</sup>, Gerald Freyemark<sup>1</sup>, Evert W. Gutteling<sup>1</sup>, Marina N. Keppel<sup>1</sup>, Paul van Drongelen<sup>1</sup>, Matthieu Kiény<sup>1</sup>, Philippe Ellul<sup>1</sup>, Alisher Touraev<sup>2</sup>, Hong Ma<sup>3,4</sup>, Hans de Jong<sup>2</sup> and Erik Wijnker<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup>Rijk Zwaan Breeding BV, Fijnaart, The Netherlands

<sup>2</sup>Max F. Perutz Laboratories, Department of Plant Molecular Biology, Vienna University, Vienna, Austria

<sup>3</sup>Department of Biology, The Huck Institutes of the Life Sciences, The Pennsylvania State University, PA, USA

<sup>4</sup>School of Life Sciences, Institute of Plant Biology, Fudan University, Shanghai, China

<sup>5</sup>Laboratory of Genetics, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands

Received 18 May 2009;

revised 30 July 2009;

accepted 3 August 2009.

\*Correspondence (fax +31 317 483146;

e-mail erik.wijnker@wur.nl)

Re-use of this article is permitted in accordance with the Terms and Conditions set out at <http://www3.interscience.wiley.com/authorresources/onlineopen.html>

**Keywords:** plant breeding, engineered meiosis, breeding per chromosome, asynapsis, univalent segregation, spore regeneration.

**Summary**

Reverse breeding (RB) is a novel plant breeding technique designed to directly produce parental lines for any heterozygous plant, one of the most sought after goals in plant breeding. RB generates perfectly complementing homozygous parental lines through engineered meiosis. The method is based on reducing genetic recombination in the selected heterozygote by eliminating meiotic crossing over. Male or female spores obtained from such plants contain combinations of non-recombinant parental chromosomes which can be cultured *in vitro* to generate homozygous doubled haploid plants (DHs). From these DHs, complementary parents can be selected and used to reconstitute the heterozygote *in perpetuity*. Since the fixation of unknown heterozygous genotypes is impossible in traditional plant breeding, RB could fundamentally change future plant breeding. In this review, we discuss various other applications of RB, including breeding per chromosome.

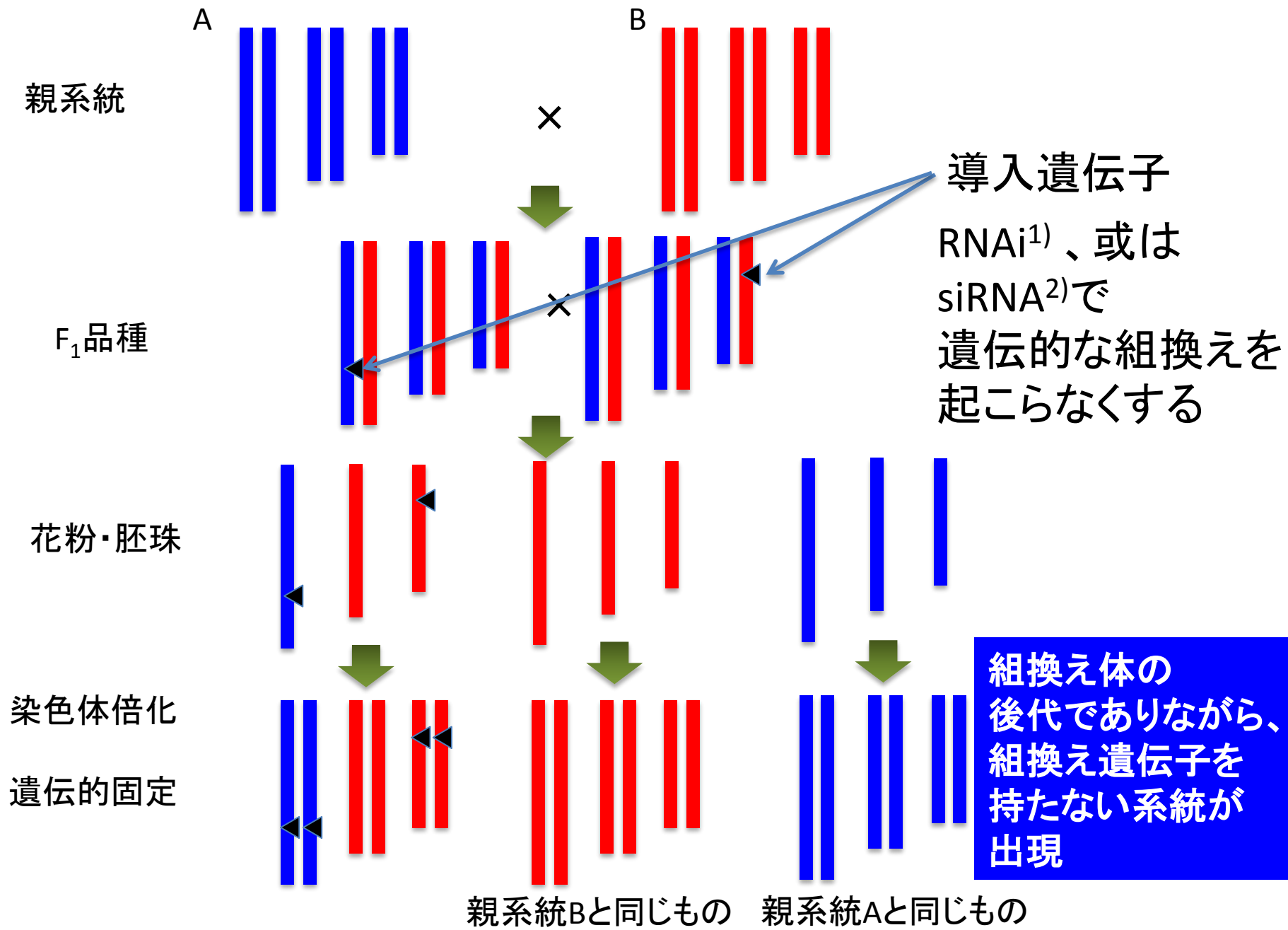
**Introduction**

One of the most important insights in plant breeding was the observation that hybrid (F1) progeny typically are superior in size, growth characteristics and yield in comparison to their homozygous parents, a phenomenon known as heterosis. Its underlying driving mechanisms may be multiple and are unfortunately poorly understood (Springer and Stupar, 2007; Stupar *et al.*, 2008; Fernandez-Silva *et al.*,

unknown alleles). The hit-or-miss nature of this approach makes it difficult to optimize the effects of heterosis. Here, we propose an alternative strategy based on the reversal of crop selection: the generation of defined populations with high levels of heterozygosity and random variation. These populations are then assessed in a variety of environmental conditions (latitude, salinity, humidity, etc.) and the best performing heterozygous germplasm is selected for further breeding.

遺传的組換えに関する  
遺伝子の働きを  
遺伝子工学的手法で  
押さえ込めば...

Dirks, R. et al. Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnol. J.* 7, 837–845 (2009).



1) 前回会議資料「参考資料2」EU NTWG 最終報告仮訳p35、2) 前回会議「資料2」p8

# SPT (Seed Production Technology)

目的: 効率的なF<sub>1</sub>採種(現在は主にトウモロコシ)

F<sub>1</sub>採種のための  
種子親(雄性不稔親)

~~稔性遺伝子~~

~~稔性遺伝子~~

劣性ホモで雄性不稔化

この種子親を維持するための組換え体

SPT Maintainer

花粉不活化遺伝子

稔性遺伝子

種子着色遺伝子

機能をカバー(稔性化)

~~稔性遺伝子~~

~~稔性遺伝子~~

花粉不活化遺伝子によって、外来遺伝子を持った花粉は不活化。  
SPT M.を交配しても花粉親からは後代に外来遺伝子が遺伝しない。

## 導入遺伝子が除去された農作物の各国での取扱いの現状

新技術の名称	米国	EU (NTWG)	豪州 & NZ (FSANZ WS)	日本
逆育種	—	導入配列残存 × 導入配列非残存 ○	導入配列非残存 を前提に議論 ○ <sup>1)</sup>	—
SPT (導入遺伝子を含まず)	○ <sup>2)</sup>	—	○	○

○:規制対象外

前回会議「資料4」より抜粋、加筆

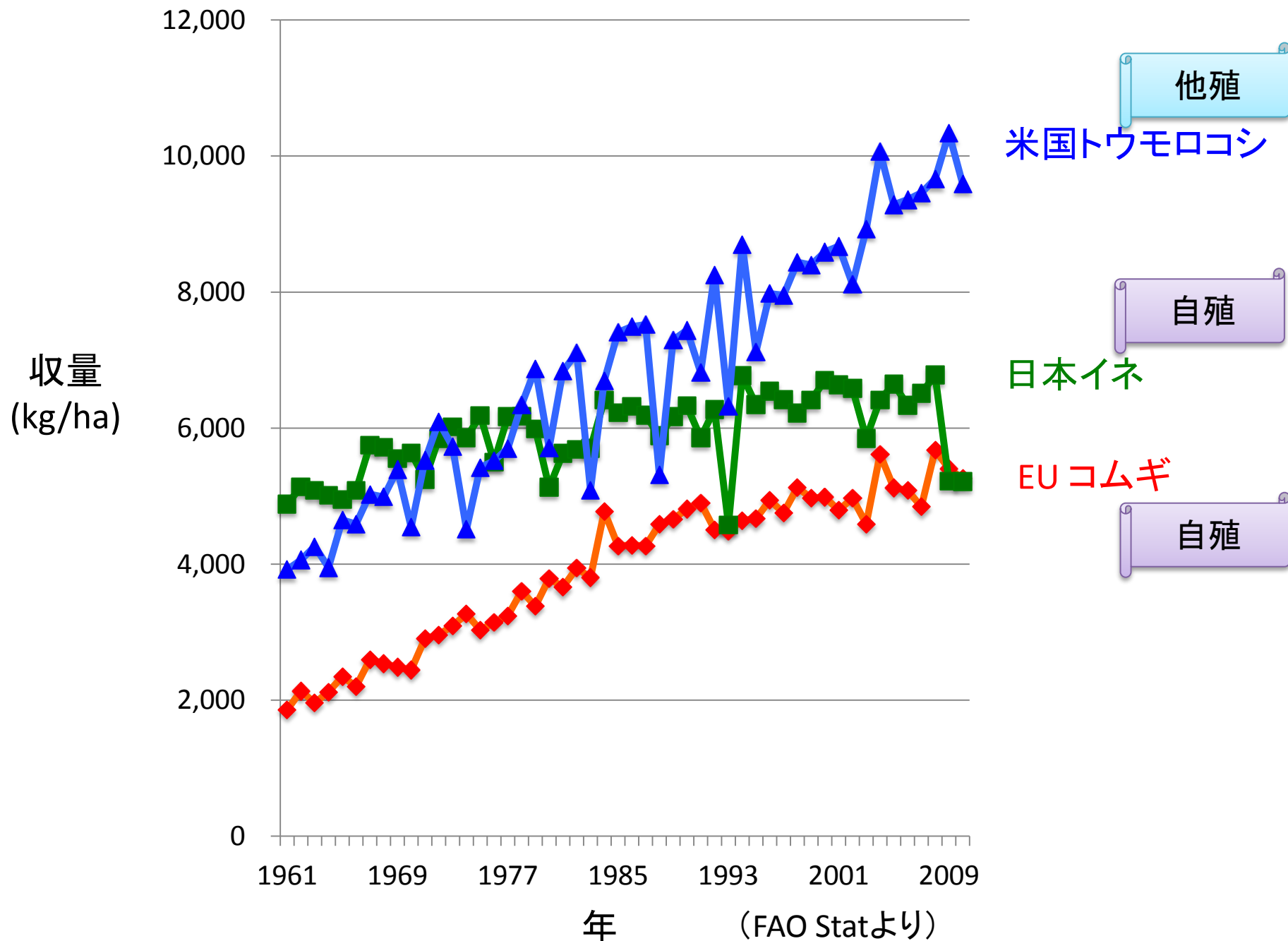
1) 前回会議資料「参考資料4」仮訳p13-17

2) *Nature Biotechnology* 30, 215-217



## 2) TMS循環選抜の作物育種上の 重要性と技術的特性

# TMS循環選抜の作物育種上の重要性



## イネ



イネは同じ花の中に  
めしべとおしべがあり  
自分の花粉で実をつける

コムギも同じ

## トウモロコシ



雄穂

花粉



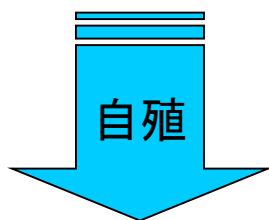
雌穂

トウモロコシは雄穂と雌穂が分かれていて  
周囲の株の花粉で実をつける

同じところに植えておくだけで他殖して  
ゲノムが混じり合う

## イネ(自殖性作物)の育種

品種A × 品種B

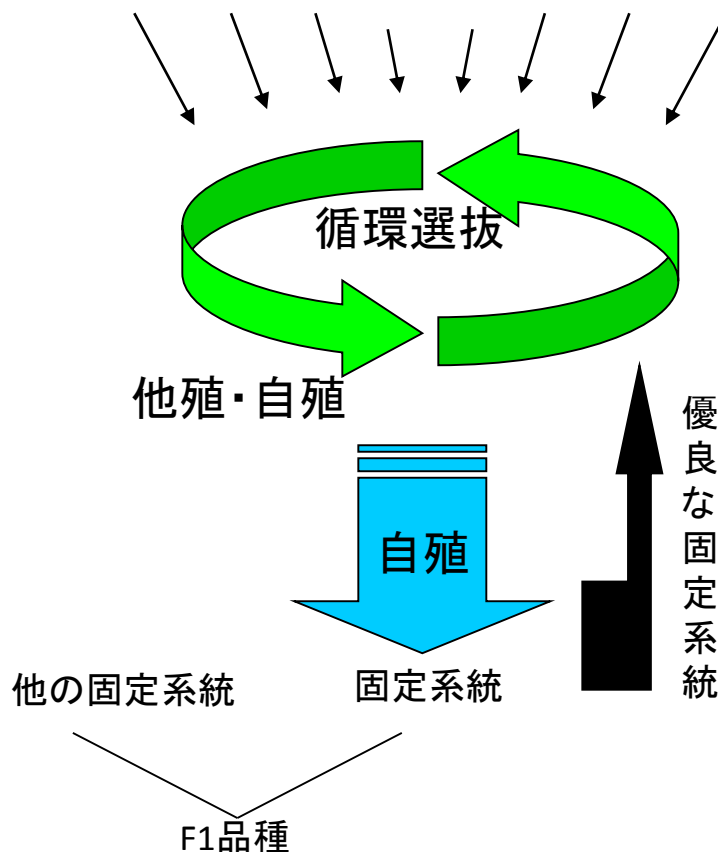


固定系統・品種

2品種かけあわせの育種

## トウモロコシ(他殖性作物)の育種

幅広い遺伝資源

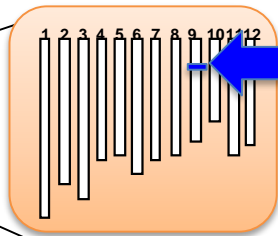
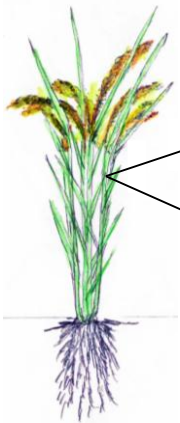


多数の遺伝資源のゲノムを混ぜ合わせる育種

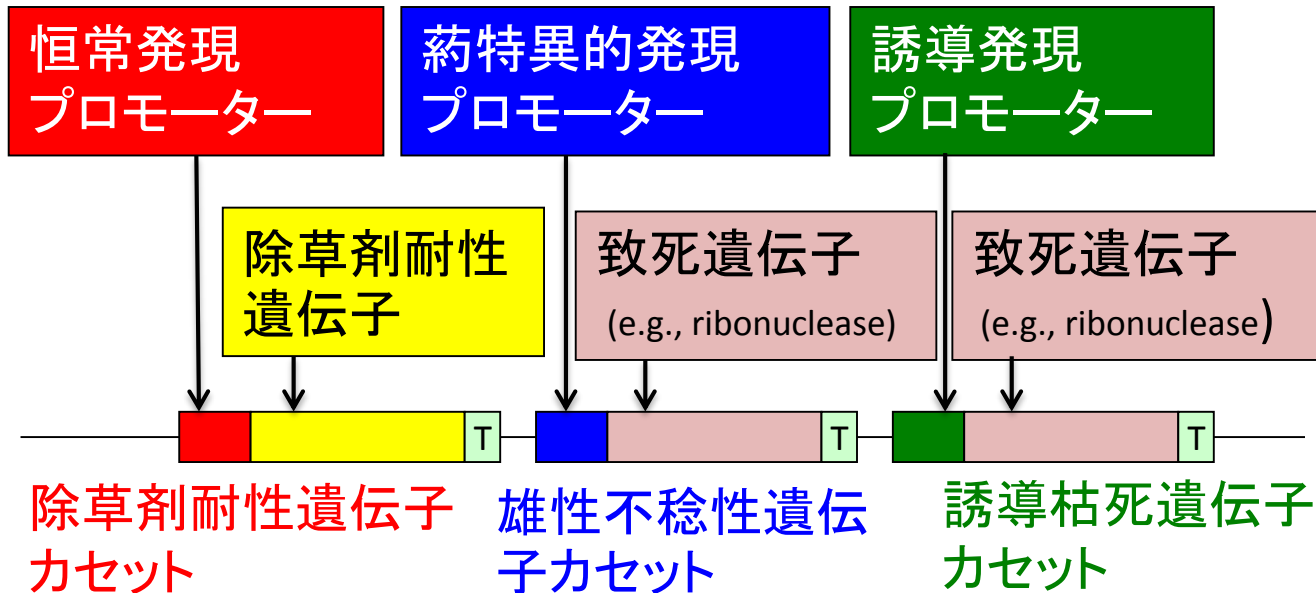
自殖性作物でも、さまざまなタイプのゲノム断片を混ぜ合わせながら集団改良を行う育種システムが是非とも必要！！

自殖性作物でも、さまざまなタイプのゲノム断片を混ぜ合わせながら集団改良を行うために...

- ・ 優性の雄性不稔性  
ゲノムを混ぜるために
- ・ 除草剤耐性 (ポジティブマーカー)  
雄性不稔個体を選抜するために
- ・ 誘導枯死性 (ネガティブマーカー)  
稔性個体を選抜するために



この3遺伝子カセットを染色体上の一ヶ所に導入



# 優性の雄性不稔によって他殖を促進する

優性の雄性不稔性を  $M_s$  とし、1箇所に導入されたとする

形質転換体  
( $M_s m_s$ )

雄性不稔遺伝子をヘテロで持つ

×  $m_s m_s$  (非組換え体; 花粉稔性有り)

青字  $M_s$ :  
導入遺伝子群

$M_s m_s$  と  $m_s m_s$  が 1:1 分離

×  $m_s m_s$

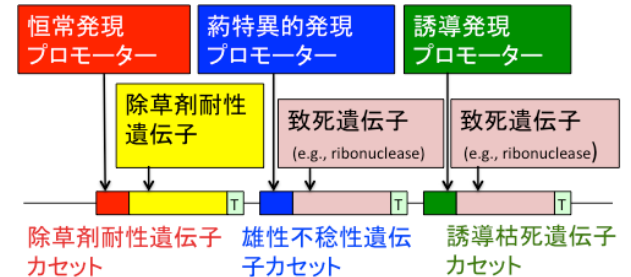
$M_s m_s$  と  $m_s m_s$  が 1:1 分離

⋮

毎世代、他殖させることが可能

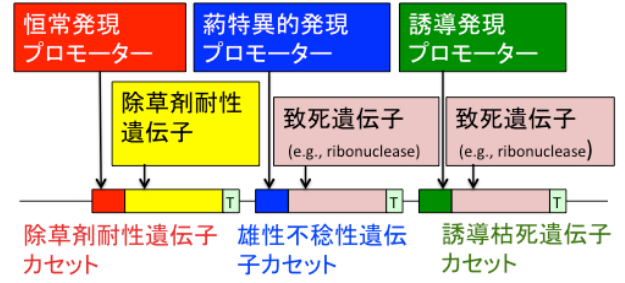
常に半数が導入遺伝子を持たない

## ゲノム上の3遺伝子カセット



# 青字Ms: 導入遺伝子群

# ゲノム上の3遺伝子カセット



他殖種子

雄性不稔個体 ( $Msms$ )と雄性不稔でない(稔性)個体 ( $msms$ ) が理論上の分離比1:1 で出現

除草剤耐性で選抜

誘導性枯死性で選抜

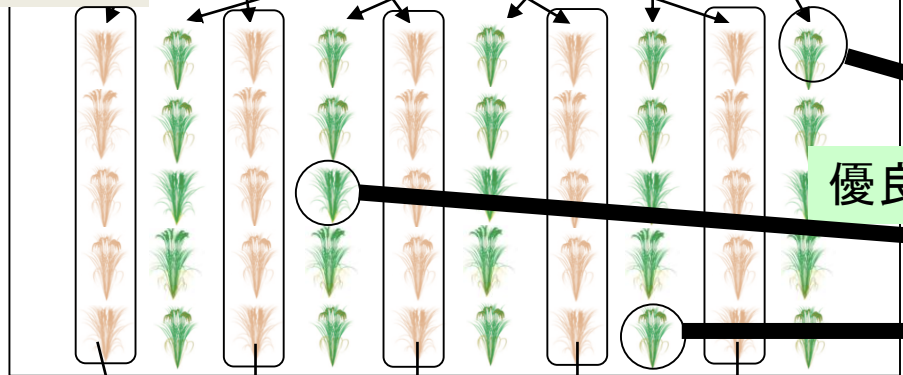
雄性不稔個体 ( $Msms$ )

稔性個体 ( $msms$ )外来遺伝子無し

・大規模で継続的な循環選抜が実現可能。

・育成される品種は対象の遺伝子セットを含まない。

隔離ほ場



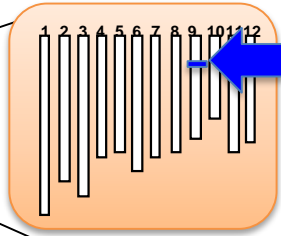
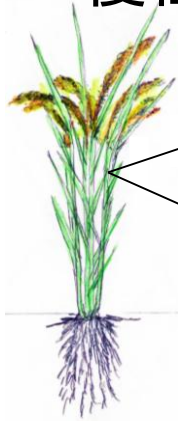
優良個体を選抜

優良個体は遺伝的固定を進めながら選抜

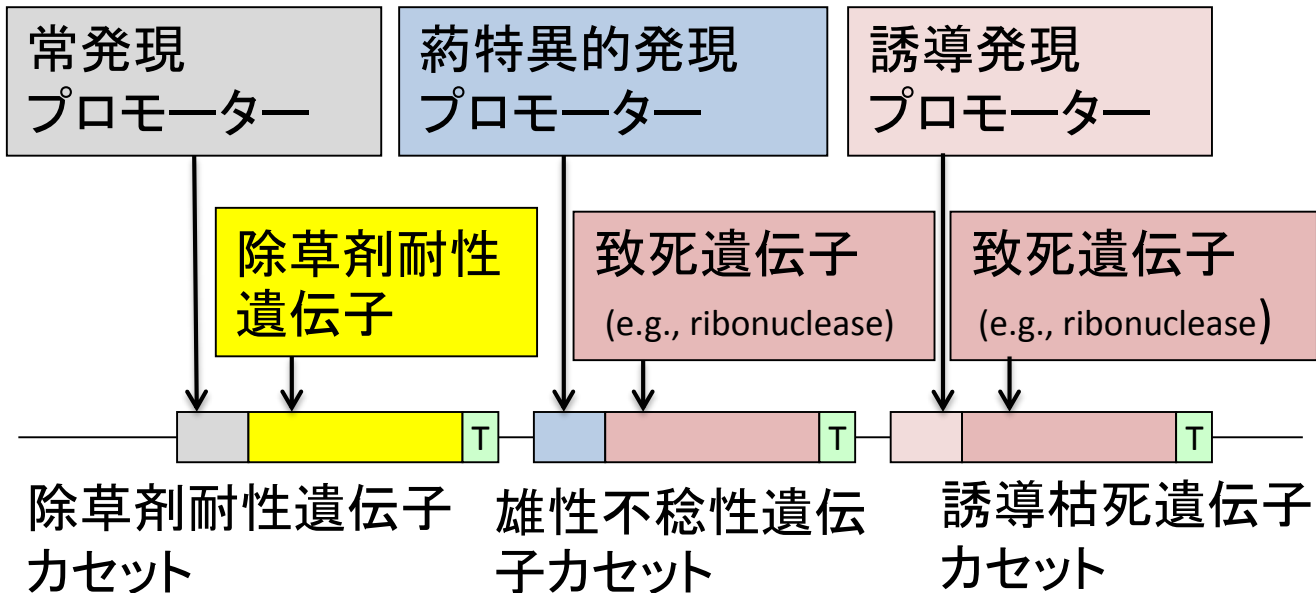
雄性不稔個体から採種・混合

固定品種

TMS循環選抜育種法では、  
組換え技術を用いてポジ／ネガ選抜可能な  
優性の雄性不稔を作出し自殖性作物のゲノムを効率的に混ぜる



この3遺伝子カセットを染色体上の一ヶ所に導入



### NBTとしての最大のポイント

最終的に育成される品種は稔性である(雄性不稔でない)ため、ゲノムを混ぜるために導入した外来遺伝子群は含まれない。



# TMS循環選抜のアイデアは日本オリジナル

---

## 論文

Tanaka (2010) Transgenic Male Sterility Permits Efficient Recurrent Selection in Autogamous Crops. *Crop Science*50. 1124-1127.

## 特許

### 【日本】

遺伝子操作手法により作出される優性の雄性不稔性を用いる自殖性植物におけるゲノムシャッフリング法および同方法に基づく循環選抜育種システム(特許4251375)

### 【米国】

Genome shuffling method for autogamous plants utilizing dominant male sterility obtained by gene engineering technique, and recurrent selection breeding system based on the genome shuffling method  
(審査終了、登録手続き中)

3) TMS循環選抜の  
カルタヘナ法における  
位置付けは？

TMS循環選抜用の組換え体はカルタヘナ法に従い、  
隔離圃場栽培 → 一般圃場栽培（研究所内限定）  
のスキームで開発を進めます。

選抜個体、選抜系統は外来遺伝子が  
残存しないものが、選抜・栽培されるので、  
一般ほ場で可能？

つまり...

青字Ms: 導入遺伝子群

他殖種子

雄性不稔個体 ( $Msms$ )と雄性不稔でない(稔性)個体 ( $msms$ ) が理論上の分離比1:1 で出現

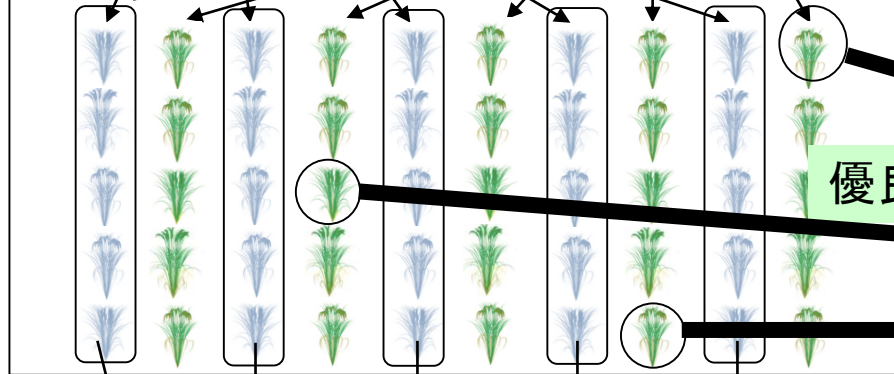
除草剤耐性で選抜

誘導性枯死性で選抜

雄性不稔個体 ( $Msms$ )

稔性個体 ( $msms$ ) 外来遺伝子無し

隔離ほ場



一般ほ場で可能?

優良個体を選抜

優良個体は  
遺伝的固定を  
進めながら選抜

雄性不稔個体から採種・混合

固定品種

# 導入遺伝子が除去された農作物の各国での取扱いの現状

新技術の名称	米国	EU (NTWG)	豪州 & NZ (FSANZ WS)	日本
逆育種	—	導入配列残存 × 導入配列非残存 ○	導入配列非残 存を前提に議論 ○ <sup>1)</sup>	—
SPT (導入遺伝子を 含まず)	○ <sup>2)</sup>	—	○	○
TMS循環選抜 (導入遺伝子を 含まず)	?	?	?	?

○: 規制対象外

前回会議「資料4」より抜粋、加筆

1) 前回会議資料「参考資料4」仮訳p13-17

2) *Nature Biotechnology* 30, 215-217

# TMS循環選抜をNBTとして見ると

---

- 組換え技術を使うが、交配過程により最終的には外来遺伝子が残存しない。
- Reverse Breeding(組換え遺伝子は残存しないもの)、SPTについては、豪州、NZ、米国、日本において最終的なアウトプットは組換え規制の対象外と判断されている事例がある。
- TMS循環選抜における組換え遺伝子が残存しない個体や系統のカルタヘナ法上の扱いは？