

委託プロジェクト研究
「ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発」
平成29年度 最終年度報告書

13406017


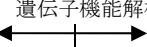

作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発

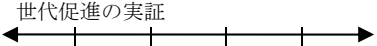
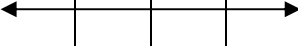
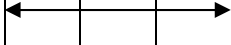


| | |
|----------------|---|
| 研究実施期間 | 平成25年度～平成29年度（5年間） |
| 代表機関 | 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 |
| 研究開発責任者 | 高木 英典 |
| 共同研究機関 | 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（次世代作物開発研究センター、果樹茶業研究部門、畜産研究部門） |
| | 岩手大学、京都大学、トヨタ自動車（株）、名古屋大学 |
| | |
| 普及・実用化支援組織 | |
| 研究開発責任者 連絡先 | TEL : 029-838-8360 FAX : 029-838-7106 E-mail : hitakagi@affrc.go.jp |

<別紙様式3. 最終年度報告書>

I-1. 年次計画

| 研究課題 | 研究年度 | | | | | 担当研究機関・研究室 | |
|---|-------------------|----|----|----|----|--|---|
| | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 機関 | 研究室 |
| 1. イネ等自殖性作物における高効率循環選抜育種法の開発 | | | | | | | |
| (1) 高い他殖性が実現できる優性の雄性不稔性遺伝子カセットの開発 | ← 雄性不稔遺伝子カセット開発 → | | | | | 作物研究所 →次世代作物開発 研究センター 生物研 →生物機能利用研 究部門 生物研 →生物機能利用研 究部門 作物研究所 →次世代作物開発 研究センター・生 物機能利用研究部 門 作物研究所 →次世代作物開発 研究センター・生 物機能利用研究部 門・東京大学 | 稲育種研究分 野 →育種法開発 ユニット 機能性作物研 究開発ユニッ ト→有用物質 生産作物開発 ユニット 機能性作物研 究開発ユニッ ト→有用物質 生産作物開発 ユニット 稲育種研究分 野 →組換え作物 技術開発ユニ ット 稲育種研究分 野 →育種法開発 ユニット・組換 え作物技術開 発ユニット・農 学部 |
| (2) 高精度で実用性の高いネガティブ選抜マーカー遺伝子カセットの開発 | ← ネガティブ選抜マーカー開発 → | | | | | | |
| (3) ネガティブ選抜マーカー遺伝子カセットの改良 | ← ネガティブ選抜マーカー改良 → | | | | | | |
| (4) ポジティブ/ネガティブ選抜が可能な優性の雄性不稔組換えイネの作出と高機能・高精度化 | ← 雄性不稔イネの作出と改良 → | | | | | | |
| (5) 他殖性の評価と育種システムの開発 | ← 他殖性評価法・育種法の開発 → | | | | | | |

| 研究課題 | 研究年度 | | | | | 担当研究機関・研究室 | |
|---|------|----|----|----|----|------------|----------|
| | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 機関 | 研究室 |
| 2. 植物潜在性ウイルスの機能を活用したカンキツ類の遺伝子機能解析技術および開花促進技術の開発 (1) カンキツ実生苗での効率的接種条件の確立 (2) VIGS によるカンキツ類の遺伝子機能解析系の確立 (3) 開花関連遺伝子の発現あるいは抑制によるカンキツ類の開花促進効果の解析 | | | | | | 岩手大学・農学部 | 植物病理学研究室 |
| 実生苗への接種実験  | | | | | | | |
| 遺伝子機能解析方法の開発  | | | | | | | |
| 開花促進効果の実証  | | | | | | 岩手大学・農学部 | 植物病理学研究室 |

| 研究課題 | 研究年度 | | | | | 担当研究機関・研究室 | |
|--|------|----|----|----|----|---------------|-------------|
| | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 機関 | 研究室 |
| 3. 開花促進遺伝子を利用したカンキツ育種期間の短縮技術開発 (1) <i>CiFT</i> 利用による世代促進 (2) 組換え遺伝子離脱の評価 ①野生型カラタチの全ゲノム解析 ②遺伝子導入カラタチと後代個体のゲノム解析 (3) 台木による穂木の開花促進 ①タグ配列付き <i>CiFT</i> 導入カラタチの作成と繁殖 ②遺伝子導入台木の効果の検討 | | | | | | 農研機構・果樹茶業研究部門 | カンキツゲノムユニット |
| 世代促進の実証  | | | | | | | |
| カラタチのゲノム解析  | | | | | | 農研機構・果樹茶業研究部門 | カンキツゲノムユニット |
| 遺伝子導入カラタチと後代個体のゲノム解析  | | | | | | | |
| 接ぎ木による開花促進実験  | | | | | | 農研機構・果樹茶業研究部門 | カンキツゲノムユニット |
| 遺伝子導入台木の効果の検討  | | | | | | | |

| 研究課題 | 研究年度 | | | | | 担当研究機関・研究室 | |
|---|------------------|----|----|----|----|--|----------------------------------|
| | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 機関 | 研究室 |
| 4. 植物のC4光合成のメカニズムの解明と遺伝子導入による機能検証 (1) C4化の鍵転写因子の解析、改変 (2) ATP 供給系の強化 (3) 細胞特異的遺伝子発現技術の開発 | | | | | | 生物研・植物科学研究領域 京都大学・理学研究科 京都大学・理学研究科 | 植物生産生理機能研究ユニット 植物学教室 植物学教室 |
| | C4鍵因子の調査 | | | | | | |
| | ATP 供給強化法の開発 | | | | | | |
| | 細胞特異的発現系の開発 | | | | | | |

| 研究課題 | 研究年度 | | | | | 担当研究機関・研究室 | |
|---|--------------------------|----|----|----|----|--|--|
| | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 機関 | 研究室 |
| 5. C/Nバランス改変による高バイオマス作物の作出 (1) イネ（日本晴）における <i>Osppc4</i> 過剰発現の効果の解析 (2) 改良型 <i>Osppc4</i> 遺伝子の作出とイネ（日本晴）への導入 (3) オオムギ等への <i>Osppc4</i> 遺伝子の導入と評価 | | | | | | 生物研・植物科学研究領域 生物研・植物科学研究領域 生物研・植物科学研究領域 | 植物生産生理機能研究ユニット 植物生産生理機能研究ユニット 植物生産生理機能研究ユニット |
| | <i>Osppc4</i> 過剰発現実験 | | | | | | |
| | 改良イネの作出 | | | | | | |
| | オオムギ等での評価 | | | | | | |

| 研究課題 | 研究年度 | | | | | 担当研究機関・研究室 | | |
|--|------|----|----|----|----|-----------------|-------------|--------------------|
| | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 機関 | 研究室 | |
| 8. イネの病害抵抗性遺伝子の他作物における機能検証 (1) 研究全般 高発現コムギでの抵抗性評価・高発現サトウキビの抵抗性評価・BSR1高発現ダイズの作出と抵抗性評価・高発現イネでの籾枯細菌病抵抗性評価・改変型プロモーターで発現させたイネの抵抗性及び生育評価・イネでの抵抗性機構の解析・他の農業形質評価 | | | | | | 農研機構・生物機能利用研究部門 | 植物機能制御ユニット | |
| 病害抵抗性作物や調査法の開発 | | | | | | | | |
| (2) イネの病害抵抗性遺伝子のコムギへの導入 高発現コムギの作出 | | | | | | | | 農研機構・次世代作物開発研究センター |
| コムギでの調査 | | | | | | | | |
| (3) イネの病害抵抗性遺伝子のサトウキビへの導入 高発現サトウキビの作出 | | | | | | 農研機構・畜産研究部門 | 飼料作物ゲノムユニット | |
| サトウキビでの調査 | | | | | | | | |

| 研究課題 | 研究年度 | | | | | 担当研究機関・研究室 | |
|---|------------------------------|----|----|----|----|------------------|---------------|
| | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 機関 | 研究室 |
| <p>9. 誘導抵抗性機構の改変による高度病害抵抗性導入技術の開発</p> <p>(1) 環境因子が <i>WRKY45</i> 過剰発現体イネにもたらす変化の解析および <i>WRKY45</i> アミノ酸置換による改良</p> <p>(2) 誘導抵抗性に影響する抑制因子の探索と解析</p> <p>(3) 誘導抵抗性に影響する因子を用いた複合病害抵抗性の改良</p> | | | | | | 生物研・遺伝子組換え研究センター | 耐病性作物研究開発ユニット |
| | ← <i>WRKY45</i> 発現イネの解析と改良 → | | | | | | |
| | ← 抑制因子の調査 → | | | | | | |
| | ← 複合病害抵抗性の改良 → | | | | | | |

| 研究課題 | 研究年度 | | | | | 担当研究機関・研究室 | |
|---|------------|----|----|----|----|--------------|--------------|
| | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 機関 | 研究室 |
| <p>10. マメ科植物における共生窒素固定に関わる根粒菌応答ネットワークの解明と他作物における遺伝子機能の検証</p> <p>(1) 根粒菌の認識および皮層細胞分裂に関わるマメ科遺伝子の探索と機能解析</p> <p>(2) マメ科共生遺伝子を導入したイネの作出</p> | | | | | | 生物研・植物科学研究領域 | 植物共生機構研究ユニット |
| | ← 遺伝子の探索 → | | | | | | |
| | ← イネでの調査 → | | | | | | |

I-2. 実施体制

| 課題 番号 | 研究項目 | 担当研究機関・研究室 | | | 研究担当者 |
|-------------|--|--------------------|--------------|----------------|----------------------|
| | | 機関 | | 研究室 | |
| GMO 1001 | イネ等自殖性作物における高効率循環選抜育種法の開発 | 農研機構 生物機能利用研究部門 | 新産業開拓研究領域 | 有用物質生産作物開発ユニット | ◎ 高木 英典 |
| | | 作物研究所 | 稲研究領域 | 稲育種研究分野 | ○ 田中 淳一 (H25~H27) |
| | | 農研機構 次世代作物開発研究センター | 基盤研究領域 | 育種法開発ユニット | ○ 米丸 淳一 (H28) |
| | | 農研機構 生物機能利用研究部門 | 遺伝子利用基盤研究領域 | 組換え作物技術開発ユニット | ○ 谷口 洋二郎 (H29) |
| | | 農業生物資源研究所 | 遺伝子組換え研究センター | 遺伝子組換え研究推進室 | 田部井 豊 (H25~H27) |
| | | 農業生物資源研究所 | 植物科学研究領域 | 植物生産生理機能研究ユニット | 市川 裕章 (H25~H27) |
| | | 農研機構 次世代作物開発研究センター | 稲研究領域 | 稲育種ユニット | 石井 卓朗 (H25~H29) |
| | | 農研機構 次世代作物開発研究センター | 基盤研究領域 | 育種法開発ユニット | 米丸 淳一 (H29) |
| | | 農研機構 次世代作物開発研究センター | 麦研究領域 | 麦類形質評価ユニット | 安倍 史高 (H25~H29) |
| | | 農研機構 生物機能利用研究部門 | 遺伝子利用基盤研究領域 | 組換え作物技術開発ユニット | 谷口 洋二郎 (H25~H28) |
| | | 農研機構 生物機能利用研究部門 | 新産業開拓研究領域 | 有用物質生産作物開発ユニット | 高木 英典 (H27~H29) |
| GMO 1002 | 植物潜在性ウイルスの機能を活用したカンキツ類の遺伝子機能解析技術および開花促進技術の開発 | 農研機構 生物機能利用研究部門 | 新産業開拓研究領域 | 有用物質生産作物開発ユニット | 若佐 雄也 (H27~H29) |
| | | 岩手大学 | 農学部 | 植物病理学研究室 | ○ 吉川 信幸 (H25~H26) |

| | | | | | |
|--------------|--------------------------------|---------------|----------|----------------|--------------------------|
| GMO 1003 | 開花促進遺伝子を利用したカンキツ育種期間の短縮技術開発 | 農研機構 果樹茶業研究部門 | カンキツ研究領域 | カンキツゲノムユニット | ○ 遠藤 朋子 (H25~H29) |
| | | 農研機構 果樹茶業研究部門 | カンキツ研究領域 | カンキツゲノムユニット | 島田 武彦 (H25~H29) |
| | | 農研機構 果樹茶業研究部門 | カンキツ研究領域 | カンキツゲノムユニット | 藤井 浩 (H25~H29) |
| GMO 1004a | 植物のC4光合成のメカニズムの解明と遺伝子導入による機能検証 | 京都大学 | 理学研究科 | 植物学教室 | ○ 鹿内 利治 (H25~H26) |
| | | 農業生物資源研究所 | 植物科学研究領域 | 植物生産生理機能研究ユニット | 井澤 毅 (H25~H26) |
| | | 農業生物資源研究所 | 植物科学研究領域 | 植物生産生理機能研究ユニット | 千徳 直樹 (H25) |
| | | 農業生物資源研究所 | 植物科学研究領域 | 植物生産生理機能研究ユニット | 村松 昌幸 (H25) |
| GMO 1004b | C/Nバランス変化による高バイオマス作物の作出 | 農業生物資源研究所 | 植物科学研究領域 | 植物生産生理機能研究ユニット | ○ 徳富 光恵 (宮尾光恵) (H25~H26) |
| | | 農業生物資源研究所 | 植物科学研究領域 | 植物生産生理機能研究ユニット | 村松 昌幸 (H25~H26) |
| GMO 1005a | イネ科作物における開花期の人為的制御技術の開発 | 農業生物資源研究所 | 植物科学研究領域 | 植物生産生理機能研究ユニット | ○ 井澤 毅 (H25~H26) |
| | | 畜産草地研究所 | 飼料作物研究領域 | | ○ 高溝 正 (H27) |
| | | トヨタ自動車(株) | FP部バイオラボ | | 西村 哲 (H25~H26) |
| | | トヨタ自動車(株) | FP部バイオラボ | | 都築 祥子 (H25~H26) |
| | | 畜産草地研究所 | 飼料作物研究領域 | | 高溝 正 (H25~H26) |
| | | 農業生物資源研究所 | 植物科学研究領域 | 植物生産生理機能研究ユニット | 馬場 晶子 (H25) |

| | | | | | |
|--------------|---|-------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|
| GMO 1005b | イネの耐湿性メカニ ズムの解明と他作物 における遺伝子機能 の検証 | 名古屋大学 | 大学院生命農 学研究科 | 植物遺伝育種 学研究室 | ○ 中園 幹生 (H25～H26) |
| | | 作物研究所 | 麦研究領域 | | 安倍 史高 (H25～H26) |
| GMO 1006a | イネの病害抵抗性遺 伝子の他作物におけ る機能検証 | 農研機構 生 物機能利用研 究部門 | 植物・微生物 機能利用研究 領域 | 植物機能制御 ユニット | ○ 森 昌樹 (H25～H29) |
| | | 畜産草地研究 所 | 飼料作物研究 領域 | | 高橋 亘 (H25～H27) |
| | | 農業生物資源 研究所 | 遺伝子組換え 研究センター | 耐病性作物研 究開発ユニッ ト | 南 栄一 (H25～H26) |
| | | 農業生物資源 研究所 | 遺伝子組換え 研究センター | 耐病性作物研 究開発ユニッ ト | 菅野 正治 (H25～H26) |
| | | 農業生物資源 研究所 | 農業生物先端 ゲノム研究セ ンター | ダイズゲノム 育種研究ユニ ット | 石本 政男 (H25～H26) |
| | | 農業生物資源 研究所 | 農業生物先端 ゲノム研究セ ンター | 作物ゲノム研 究ユニット | 半田 裕一 (H25～H27) |
| | | 農研機構 生 物機能利用研 究部門 | 企画管理部 | 遺伝子組換え 研究推進室 | 山崎 宗郎 (H27～H28) |
| GMO 1006b | 誘導抵抗性機構の改 変による高度病害抵 抗性導入技術の開発 | 農業生物資源 研究所 | 遺伝子組換え 研究センター | 耐病性作物研 究開発ユニッ ト | ○ 高辻 博志 (H25～H26) |
| | | 農業生物資源 研究所 | 遺伝子組換え 研究センター | 耐病性作物研 究開発ユニッ ト | 山崎 宗郎 (H25～H26) |
| GMO 1006c | マメ科植物における 共生窒素固定に関わ る根粒菌応答ネッ トワークの解明と他作 物における遺伝子機 能の検証 | 農業生物資源 研究所 | 植物科学研究 領域 | 植物共生機構 研究ユニット | ○ 下田 宜司 (H25～H26) |
| | | 農業生物資源 研究所 | 植物科学研究 領域 | 植物共生機構 研究ユニット | 林 誠 (H25～H26) |

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

| | | | |
|---------------|-----------------------------------|------|-----------|
| 中課題番号 | 13406017 | 研究期間 | 平成25～29年度 |
| 大課題名 | ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発 | | |
| 中課題名 | 作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発 | | |
| 代表機関・研究開発責任者名 | 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 ・高木英典 | | |

I-1. 研究目的

様々な作物のゲノムが解読され、マーカー育種が急速に発展し、優良形質をピンポイントで特定品種に集積することが可能になった。しかし、この手法による遺伝子導入は交配が可能な種間に限定されている。一方、遺伝子組換え技術は、交配育種では不可能な形質付与が可能である。これまでに開発された遺伝子組換え技術は、耐病虫害性や耐環境ストレス性など栽培特性に係るものが主流であり、交配育種技術の改良に資する研究例は少ない。そこで本研究課題では、特定の作物で開発された育種法の適用拡大や育種年限の大幅な短縮といった育種技術の改良を目指すとともに、農業形質の改良に関わる遺伝子組換え技術の研究を深化させ、遺伝子の機能発現に重要な分子機構の理解を通じて体系的な知財戦略を推進する。

このため、本研究では、

1. イネ等自殖性作物における高効率循環選抜育種法の開発
2. 植物潜在性ウイルスの機能を活用したカンキツ類の遺伝子機能解析技術及び開花促進技術の開発「H26年度に終了」
3. 開花促進遺伝子を利用したカンキツ育種期間の短縮技術開発
4. 植物のC4光合成のメカニズムの解明と遺伝子導入による機能検証「H26年度に終了」
5. C/Nバランス改変による高バイオマス作物の作出「H26年度に終了」
6. イネ科作物における開花期の人為的制御技術の開発「H27年度に終了」
7. イネの耐湿性メカニズムの解明と他作物における遺伝子機能の検証「H26年度に終了」
8. イネの病害抵抗性遺伝子の他作物における機能検証
9. 誘導抵抗性機構の改良による高度病害抵抗性導入技術の開発「H26年度に終了」
10. マメ科植物における共生窒素固定に関わる根粒菌応答ネットワークの解明と他作物における遺伝子機能の検証「H26年度に終了」

により、作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発を目標とする。

その結果、

1. 未利用資源の活用等によるイネ・果樹の新品種開発の活性化や、品種開発に参画する研究機関・企業の増加による育種事業規模の拡大
2. 有用遺伝子の導入・活用により、マーカー育種では達成できない、有益農業形質を付与した農作物の開発、などが期待される。

I - 2. 研究結果

1. 交配育種技術の改良：

イネで効率的な循環選抜を可能にするために優性の高精度雄性不稔イネを作出した。また、開花遺伝子および開花抑制遺伝子を利用して開花までの期間が大幅に短縮されたカンキツを開発した。

2. 高バイオマス作物作出のための基盤技術の開発：

トウモロコシやソルガムでC4光合成機能に必須の葉緑体発達過程およびその機能分化を制御する遺伝子群を同定し、その機能をイネ等で検証した。また、窒素と炭素の同化のバランスに関わる代謝系遺伝子の機能を改変して、それらの機能をイネ等で検証した。

3. 作物の環境適応技術の解明と応用技術の開発：

水田環境下におけるイネ根の耐湿性の鍵となる遺伝子の機能をイネで解析し、コムギ等耐湿性付与が望まれる作物で検証した。また、イネの開花調節機能に必要なイネ遺伝子の機能を解析し、そこで開発した遺伝子システムの有用性をイネ科作物で検証した。

4. 作物と微生物の相互作用機構の高度な利用に関わるゲノム育種技術の開発：

複数の病害に抵抗性を付与するイネ遺伝子の作用機構を解析し、その機能を他作物で検証した。また、誘導抵抗性反応の鍵遺伝子の活性調節機構の解析により、非生物的環境要因に影響されない安定した病害抵抗性を発現する技術を開発した。さらに、根粒構造形成に関わるマメ科特有の遺伝子の機能発現に必要な因子を明らかにし、比較ゲノム学的手法を援用してイネに根粒様構造の形成をめざす研究に取り組んだ。

I - 3. 今後の課題

本中課題では、作物に画期的な形質を付与する新しい育種技術の開発や、有用な特性・農業形質を付与した農産物の開発に向けて、遺伝子組換え技術やゲノム編集技術を活用しており、本中課題の研究成果を近年中に普及・実用化に移すことは困難な状況にある。しかし、10年後、20年後の社会実装に向け、今後の課題として、国内外の研究機関や企業に対する技術供与や特許権の許諾などを積極的に行うなど、研究成果・知財の確保と適切な管理・運用に係る取組みが重要である。

「作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13406017

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発 (GMO)

小課題番号: GMO1001

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: イネ等自殖性作物における高効率循環選抜育種法の開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 生物機能利用研究部門・遺伝子利用基盤研究領域・組換え作物技術開発ユニット・谷口洋二郎

1) 研究目的

世界の三大作物のうち、イネ、コムギの単収は 1960 年代 ~ 1990 年代前半頃まで飛躍的な向上を見せたが、近年、収量増加速度の鈍化が顕著となっている。その一方、トウモロコシは、その他殖性を活かし、循環選抜と呼ばれるタイプの異なる複数のゲノム断片を“混ぜ合わせる”育種により、持続的に収量を増加させている。トウモロコシ育種のような循環選抜を自殖性のイネ、コムギ等でも実現するために、「幼苗段階でポジティブ/ネガティブ選抜可能な優性の雄性不稔イネ系統」を作出することで、イネ等自殖性作物の高効率な循環選抜育種法を開発する。(なお、当該育種法で育成される固定品種は稔性を有する必要があるため、導入遺伝子を含まない。)

2) 研究成果

- 1) イネの発現プロファイル (RiceXPro) を利用し、40 の薬特異的発現プロモーター候補配列を抽出、クローニングし、*barnase* (細菌の RNA 分解酵素遺伝子) と *barstar* (*barnase* の特異的活性阻害タンパク遺伝子) による不稔化効果を検証し、一部の配列が不稔化を引き起こすことを確認した。
- 2) 作出した組換え体を種子親に、元品種の「日本晴」を花粉親にして交配実験を行い、不稔個体の雌性稔性に障害がないことを確認した。
- 3) 上記雄性不稔カセットとマーカー形質等を実現するための遺伝子カセットを 1 つのベクター上にタンデムに繋いだコンストラクト (図 1) を構築しイネに導入することで、効率的な循環選抜の基礎的ツールとなる「ネガティブおよびポジティブ選抜可能な優性の雄性不稔イネ (“ Genome Mixer ”)」を開発した (図 2)。

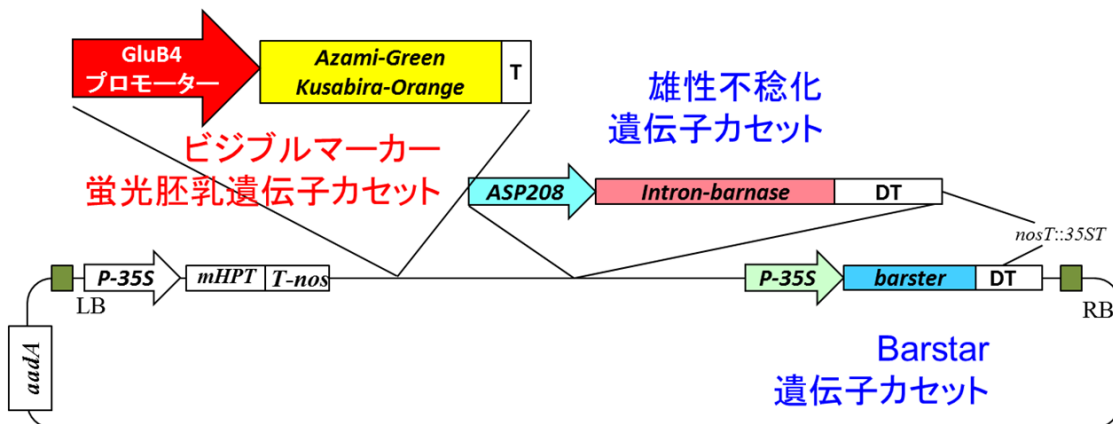


図 1. “Genome Mixer”ベクターの構成

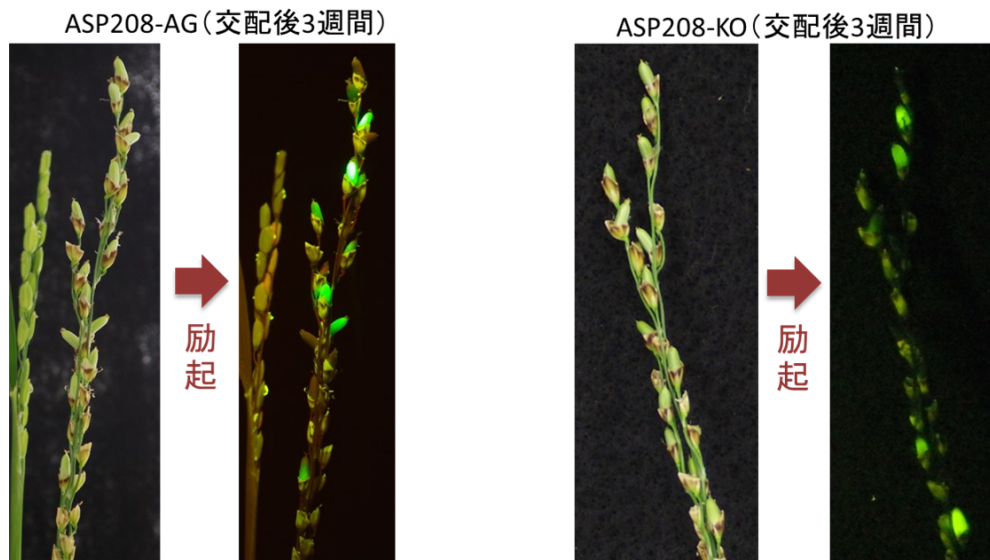


図2. 組換え体の穂における蛍光タンパクによる蛍光（交配3週間後）

- 4) ネガティブ選抜用カセットとして、葉鞘においてアントシアニンを蓄積させることで着色し組換えイネを判別するシステムの構築を進めた。イネのアントシアニン合成に関わる酵素 *DFR*、転写因子である *bHLH(B)* と *MYB(C)* の3遺伝子を利用し、*35SP-OsDFR*、*35SP-ZmC1* に新規葉鞘特異的プロモーター *LSSP03-OsB2* 遺伝子をタンデムつないだコンストラクトを開発し、「日本晴」を始めとする様々なイネ品種（たちすがた、タチアオバ、クサホナミ、Kasalath、モミロマン、コシヒカリの計7品種）に導入したところ、全ての品種において葉鞘特異的なアントシアニン蓄積効果を確認した。当カセットを導入した組換えイネ系統では、その芽生え段階の葉鞘における着色により、導入遺伝子の有無が明瞭に識別可能であった（図3）。



図3. アントシアニン色素蓄積個体品種「日本晴」背景。
 A. PCRによる導入遺伝子（ハイグロマイシン耐性）の確認。M：1kbラダーマーカー、Vector：ベクターコントロール、WT：日本晴
 B. 後代（T1）の分離個体の様子。左：アントシアニン蓄積個体、右：非着色個体

- 5) 「日本晴」背景の Genome Mixer から生育特性や雄性不稔の完全性等によって選抜し、高速世代促進技術 (sBBS, simplified Biotoron Breeding System (Tanaka *et al.* 2016)) 環境下で「タチアオバ」を花粉親に、雄性不稔を利用して (温湯除雄なしで) 他殖試験を実施し、年4世代の連続他殖を遂行することが出来た (図4)。

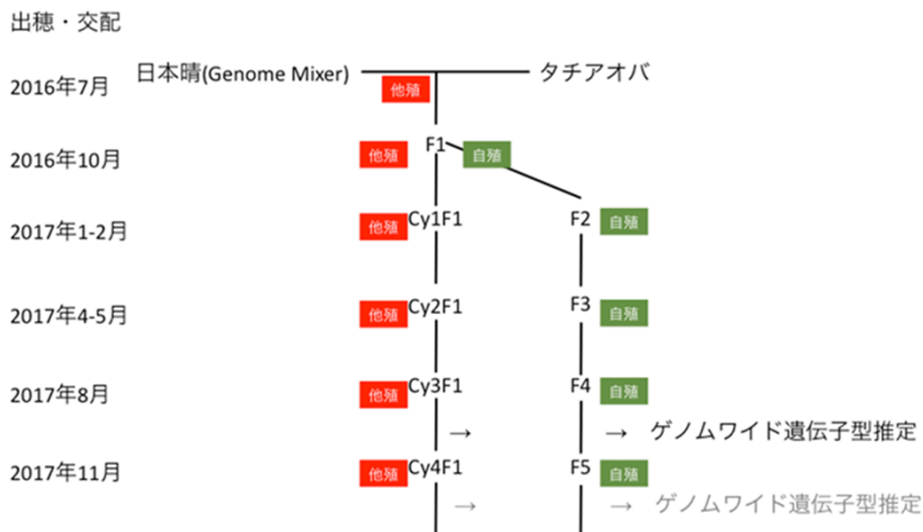


図4. Genome Mixerによる「日本晴」と「タチアオバ」間の連続高速他殖試験の概要

- 6) 他殖4回目 (Cy3F1) について、同じ世代の自殖系統 (RIL) と同時にゲノムワイド Genotyping を実施したところ、RIL では組換え回数が3~7回であったのに対し、Cy3F1 では計14回の組換えが想定される個体が検出されるなど、Genome Mixer によって他殖回数を増加させることにより、染色体の組換え回数が増加することが示唆された (図5)。

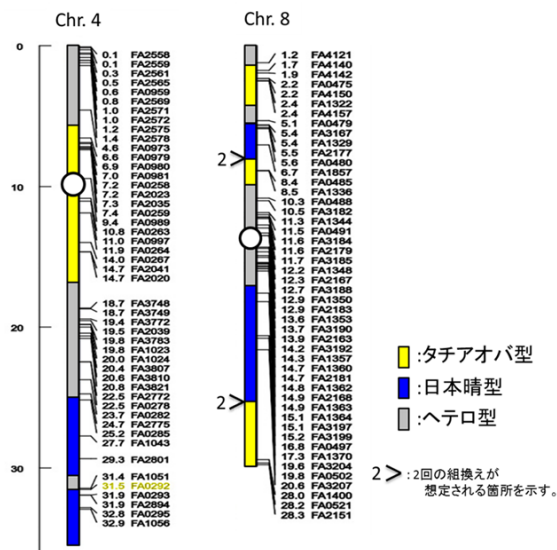


図5. 日本晴・タチアオバ連続他殖集団中の高頻度組換え個体の例「Cy3F1_26-1」の第4、第8染色体の遺伝子型

- 7) 日本晴背景の Genome Mixer と同じカセットを「コシヒカリ」へ導入し、「コシヒカリ」背景の Genome Mixer を作出した。これに多収のインド型イネ品種「タカナリ」のゲノムを混ぜるための、「タカナリ」背景に「コシヒカリ」由来の日長感性や稔実改善に効果が期待できる領域を導入した IL 系統の育成も進めた。

3) 成果活用における留意点

- 1) 本システムにおいては、従来のイネの交配作業と比較して大幅な効率化を果たしているが、より多数の交配種子を得るためには、開花期における種子親の切穎作業が必要となる。また花粉親との出穂期の同調性が前提となる。
- 2) 本システムの有効な活用のためには、温度管理、CO₂ 濃度制御、日長管理が可能なグロースチャンバーが必要である。

4) 今後の課題

- 1) 開発した Genome Mixer に柱頭露出、開穎形質等の形質を付与することにより、切穎作業をせずとも多数の交配種子が得られる Genome Mixer の開発が期待される。
- 2) 幅広い遺伝的多様性を含む他殖集団の養成には、開発した Genome Mixer を活用し、多様な遺伝背景を持ったイネを他殖集団に導入する必要がある。
- 3) 上記集団において 連続的に他殖と選抜を繰り返す ことにより、イネの形質が 持続的に改善 できることを実例で示す必要がある。
- 4) 本システムを活用して作出される系統は、導入遺伝子を持たない個体 (Null-segregant) であっても現時点では組換え体と同等の取り扱いが求められるが、組換え体としての安全性審査を経る等して圃場で特性を評価することが出来れば、それらの特性評価値をベースにした予測モデルにより、sBBS で高速に他殖世代を繰り返す集団に対し Genomic Selection を実施することを特長とする、高い育種効果が期待できる新たな育種システムの構築が想定 される。

「作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13406017

研究期間：平成25～29年度

中課題名：作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発(GMO)

小課題番号：GMO1002

研究期間：平成25～26年度

小課題名：植物潜在性ウイルスの機能を活用したカンキツ類の遺伝子機能解析技術および開花促進技術の開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：岩手大学・農学部・植物病理学研究室・吉川信幸

1) 研究目的

リンゴ小球形潜在ウイルス(Apple latent spherical virus、ALSV)は、ほとんどの宿主植物種に病気を起こさない無害(潜在性)のウイルスで、自然感染宿主はリンゴのみであるが、実験的には宿主域が広く、バラ科の果樹類、ナス科、マメ科、ウリ科植物など各種農作物に感染する。また感染植物の茎頂分裂組織にすみやかに侵入することから、ALSVベクターを用いることで目的遺伝子の茎頂での一過的発現やRNAサイレングを効率良く誘導できる。本課題担当者らは最近、ALSVベクターが各種カンキツ類に全身感染することを明らかにした。そこで、本課題ではALSVベクターを用いて、カンキツ類のVIGSを利用した簡便な遺伝子機能解析技術を確立すると共に、ALSVベクターを用いて開花関連遺伝子を制御することにより、カンキツ類の早期開花技術を開発することを目標とした。

2) 研究成果

研究方法

(ア) ミカン科果樹(ミカン属、キンカン属、カラタチ属)を供試して、カンキツ実生苗へのALSVの効率的接種条件を確立する。各種カンキツ類の種子胚および実生苗にALSV-RNAをパーティクルガン接種し、感染効率を調査した。

(イ) VIGSによるカンキツ類の遺伝子機能解析系の確立

カンキツの内在性遺伝子の一部を導入したALSVベクターを構築し、これらをカンキツ種子胚に感染させ、VIGS誘導による表現型を調査した。定量RT-PCRにより各遺伝子mRNAを定量し、ALSVベクターによるカンキツ類でのVIGSシステムの有効性を実証する。

(ウ) シロイヌナズナ、カンキツおよびリンゴのFTを導入したALSVベクター(ALSV-AtFT、ALSV-CiFT、ALSV-GtFT)を構築した。ALSV-AtFT、ALSV-CiFTあるいはALSV-GtFTに感染したChenopodium quinoa葉から濃縮ウイルス試料を調製後、ウイルスRNAを抽出し、これらのRNAをカンキツ類(レモンなど)の種子胚にパーティクルガン接種し、実生苗での開花促進効果を調査した。

研究結果

(ア) ALSVがカンキツ類に感染するかどうかを調べる目的で、部分精製したALSV試料からALSV-RNAsを抽出した。これを発根直後の各種カンキツ種子胚(子葉)にパーティクルガン法で接種し、接種後10日にウイルス感染の有無をRT-PCRで検定したところ、ミカン属、キンカン属、およびカラタチ属の7種類で全身感染が確認された¹⁾。一方、本葉への接種では、ほとんどの植物で全身感染は起こらなかった。いずれのカンキツ類でもALSV感染による明瞭な病徴は認められなかった¹⁾。以上から、カンキツ類へのALSVの接種には発根直後の種子胚(子葉)が適していると結論された。また、接種後90日経過したユズ(11葉期)での

ウイルスの分布をドット・プロット・ハイブリダイゼーションで調べたところ、ALSVは全身に均一に分布していることが明らかになった（図1）。

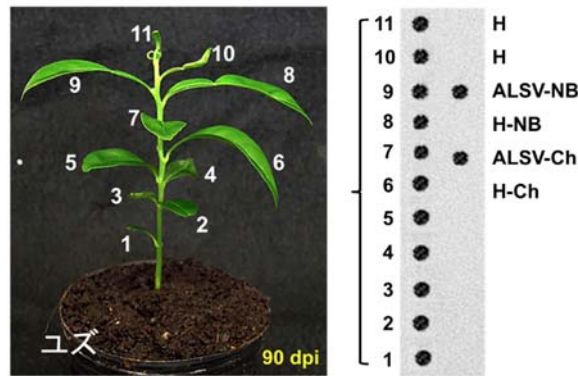


図1 ALSVベクターを接種したユズ個体のドットプロットハイブリダイゼーションによるALSVの検出。数字は葉位を示す。

(イ) ALSVが各種のカンキツ類に感染することが明らかになったことから、ALSVベクターがカンキツにおいて遺伝子発現用ベクターおよびウイルス誘導遺伝サイレンシング(VIGS)による遺伝子機能解析用ベクターとして利用できるかどうかを調べた²⁾。先ずYFPを発現するALSV(ALSV-YFP)をレモン種子胚に接種し、蛍光顕微鏡で発現の様子を観察した。その結果、接種したレモンの本葉においてYFP蛍光が観察された。続いて、ブンタン(*Citrus maxima*)のPDS遺伝子、*rbcS*遺伝子、およびEF-1 α 遺伝子などの一部を導入したALSVベクターを構築し、レモンの種子胚に接種した結果、それぞれの内在性遺伝子のサイレンシングのよると思われる症状が上位葉で観察された(図2)。症状が観察された上位葉から全RNAを抽出し、semi-quantitative RT-PCR法によって各mRNAを解析したところ、mRNAの量は大幅に減少していた。

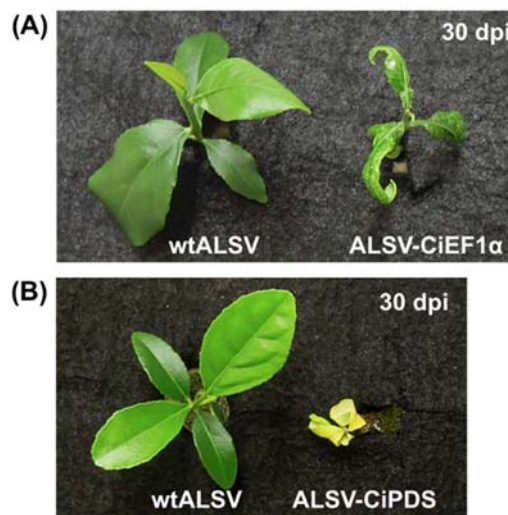


図2 カンキツの内在性遺伝子Elongation factor- 1 α (CiEF1 α) (A) と Phytoene desaturase (CiPDS) (B) の一部を導入したALSVベクター感染によるウイルス誘導遺伝サイレンシング

(ウ) ALSV-AtFT、ALSV-CiFT、あるいはALSV-GtFTに感染した*Chenopodium quinoa*葉から

濃縮ウイルス試料を調製後、ウイルスRNAを抽出した。このRNAをレモンの種子胚にパーティクルガン接種したところ、ALSV-GtFTに感染した個体の25% (3/12)で接種後2～4ヶ月に早期開花が認められた。開花個体はその後数カ月に渡って連続開花した(図3)。一方、野生型ALSV、ALSV-AtFT、およびALSV-CiFTに感染した個体では、早期開花は観察されなかった。



図3 ALSV-GtFTに感染レモン実生個体の早期開花(接種後約5ヵ月)

3) 成果活用における留意点

一般にカンキツ類を含む果樹個体にウイルスを接種することは非常に困難であるが、発芽直後の種子胚にパーティクルガン接種することで、レモンやユズではほぼ100%の感染率で感染させることが可能である。一方、本葉期まで成長した個体ではほとんど全身感染する個体はなく、生育ステージによってウイルス感染に対する感受性が大きく異なる。

4) 今後の課題

(ア) カンキツ類の生育ステージによってウイルス感染に対する感受性が大きく異なることが明らかになったが、その要因の解明については今後の課題である。

(イ) ALSVベクターによるカンキツ類の早期開花技術の確立と共に、果実および次世代種子の形成までを含む世代促進技術の確立が今後の課題である。

「作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13406017

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発 (GMO)

小課題番号: GMO1003

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: 開花促進遺伝子を利用したカンキツ育種期間の短縮技術開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 果樹茶業研究部門・カンキツ研究領域・カンキツゲノムユニット・遠藤朋子

1) 研究目的

カンキツ等果樹の交雑育種では、交雑から開花・結実までの年数が長いため、新品種育成に多大な時間と労力を要する。そこで本研究では、これまで研究を進めてきた早期開花性の遺伝子導入カラタチを利用し、迅速で効率的な育種を実現する新規育種法を開発することを目的とする。具体的には、開花促進遺伝子導入カラタチとカンキツ品種を繰り返し交雑することにより、カラタチがもつカンキツトリステザウイルス (CTV) 抵抗性遺伝子を、育種年限を大幅に短縮してカンキツ品種へ取り込むことを目的とした世代促進育種法を開発する。この方法により、カラタチ由来の CTV 抵抗性遺伝子 (CTV^r) は受け継ぐが、カラタチに導入されたカンキツ由来の開花促進遺伝子 (組換え *CiFT*) は受け継がない品種や育種素材を、短期間に作成可能であることを実証する。さらに、早期開花性の遺伝子導入カラタチを台木として、穂木の開花を誘導する技術を試みる。これらのアプローチのいずれも、最終的に組換え遺伝子をもたない系統を選抜できる。

2) 研究成果

a) 早期開花性組換え体を利用したカラタチ・カンキツ雑種の世代促進

開花促進遺伝子の導入により早期開花性となったカラタチを、カンキツ品種と交雑して世代を促進するため、*CiFT* が導入されたカラタチとカンキツ品種「ヒュウガナツ」を 2 回交雑して得られた雑種 BC₁ 世代個体を、本課題における供試材料とした。BC₁ 世代において、組換え *CiFT* および CTV^r の両方を有し早期開花性を示す選抜個体を花粉親とし、カンキツ品種「クレメンティン」を種子親とした。種子親の開花時季に合わせて交雑を行うため、BC₁ 世代選抜個体の開花時に採取した花粉は一旦凍結保存し、保存花粉を使用して春季に交雑を行った。今回、花粉の採取方法を変更することで結実率が向上し、雑種種子の獲得効率・獲得数が大幅に改善された。

獲得された BC₂ 世代の雑種実生の中には、発芽直後に花蕾形成するものが認められ、このうちの数個体から花粉が獲得された。このうち DNA マーカーで選抜した 1 個体を、翌春「クレメンティン」と交雑した結果、BC₂ 世代種子の獲得から約 1 年で次世代の BC₃ 世代種子が獲得された (図 1)。

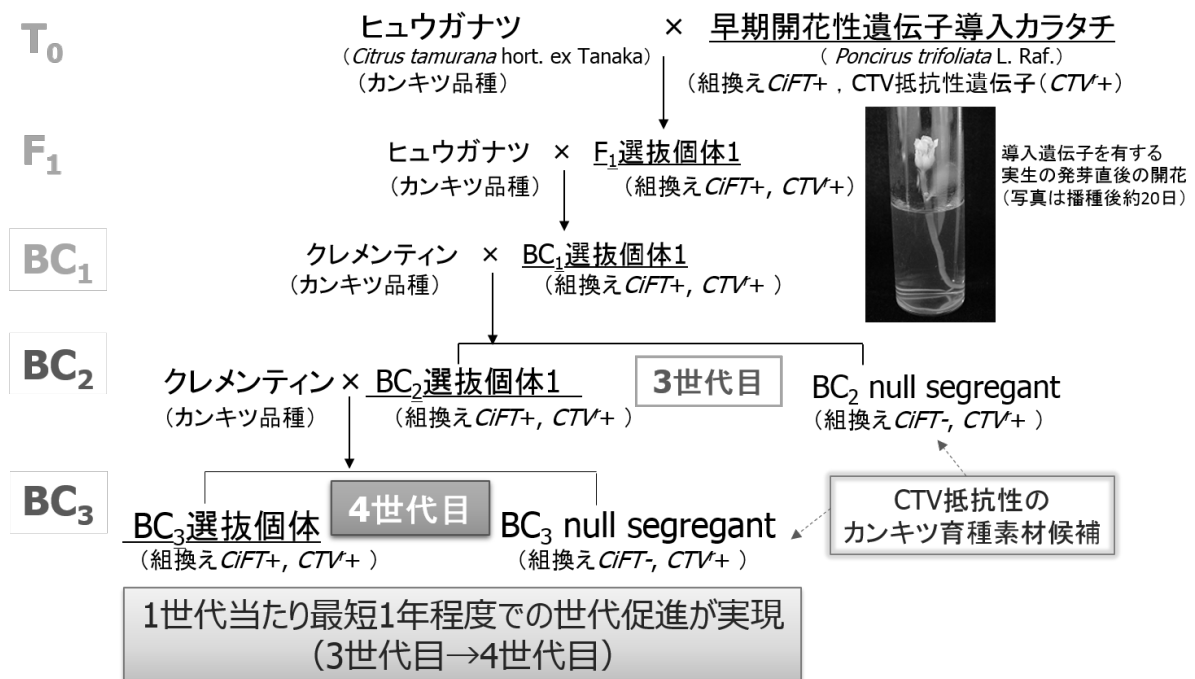


図1. 開花促進遺伝子を利用した世代促進による戻し交雑期間の短縮

組換え*CiFT*およびCTV抵抗性遺伝子(CTV^r)を有するBC₁世代選抜個体を供試材料とし、実用カンキツ品種‘クレメンティン’との交雑により獲得された雑種BC₂世代選抜個体を、もう一度‘クレメンティン’と交雑して、カラタチから4世代目となるBC₃世代個体を獲得した。BC₂選抜個体の獲得から、BC₃世代個体が得られるまでの期間が最短で約1年であったため、1世代に要する期間を大幅に短縮できることが実証された。

これらのBC₂およびBC₃世代個体について、カラタチ属由来とカンキツ属由来の遺伝子型を判別するDNAマーカーを用いて評価したところ、CTV^rを有しつつカンキツ由来遺伝子型への置換が進んだ個体が確認された。これらのうち、組換え*CiFT*を受け継がない雑種後代個体(null segregant)は、CTV抵抗性のカンキツ育種素材候補となり得る。

これらのことから、カンキツの1世代に要する期間を最短1年程度とする世代促進が実現し、カラタチから4世代進んだ育種素材候補個体が獲得された。

b) 組換え遺伝子離脱の評価

Null segregantを塩基配列レベルで解析するための基盤として、野生型カラタチの全ゲノム解読を実施した。ショートリードとロングリードの塩基配列データ、合わせて予想ゲノムサイズの約250倍を取得し、ゲノムのヘテロ接合性を考慮するなど複数のアセンブルソフトウェアを組合せた手法により*de novo*アセンブル解析を実施した。その結果、約1,500のスキヤフォールドに集約化された全ゲノム配列が獲得された。

また、雑種後代個体のゲノムDNAにおいて遺伝子導入ベクター中の配列を検出するため、ベクターの塩基配列を配置したタイリングアレイ解析を実施した。その結果、カラタチから3世代および4世代目のBC₂およびBC₃世代のnull segregantでは、組換え遺伝子が検出されないことが確認された。

これらのことから、本世代促進法により作成される最終的な品種や育種素材において、組換え遺伝子の離脱を評価するためのゲノム解析基盤が作成された。

c) 組換え台木を利用した穂木における開花促進の検討

穂木における開花促進を狙いとする台木を作成するため、早期開花性を誘導する*CiFT*にアミノ酸

タグ配列を付加して導入遺伝子由来タンパク質の検出を容易にするコンストラクトを構築し、カンキツ栽培の台木として一般的なカラタチに導入した。その結果、独立な 10 系統が獲得された。

この早期開花性組換え体から得られた実生を台木とし、非組換え体のオレンジを穂木とする接ぎ木苗を育成した。その結果、これまでに穂木における開花は認められていないものの、非組換え体の穂木の葉において導入遺伝子由来のタンパク質シグナルが検出された。これらことから、遺伝子導入台木から非組換え体の穂木へ、CiFT タンパク質が伝搬する可能性が示された。

3) 成果活用における留意点

・本課題では、開花促進遺伝子による早期開花性の誘導に加えて、DNA マーカーによる CTV 抵抗性個体の早期選抜により迅速な交雑親の決定が可能となり、1 世代最短 1 年程度の世代期間短縮が実現した。このため、カラタチ以外の遺伝資源等を利用して病害抵抗性等の目的形質の取り込みを図るためには、その形質を選抜する DNA マーカーを別途作成することが必要と考えられる。

・本課題における世代促進過程は、遺伝子導入植物を取り扱うためカルタヘナ法に基づく規制条件下で実施した。現在、Null segregant も遺伝子導入植物と同様の取り扱いを行っている。

・Null segregant を品種や育種素材として利用するには、果実形質や栽培性等の形質評価を圃場レベルで実施することが必要と考えられる。

4) 今後の課題

・Null segregant を圃場栽培するために必要な安全性評価等の条件を検討すると共に、整備に取り組む必要がある。

・本課題で実施した世代促進育種法は、カラタチ以外の遺伝資源を交雑育種に利用する際の期間短縮にも利用可能と考えられるため、そのための DNA マーカー作成等、条件を検討し、整備する。

・組換え台木を利用した接ぎ木における穂木の開花促進については、引き続き検討する。

「作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13406017

研究期間: 平成25～29年度

中課題名: 作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発(GMO)

小課題番号: GMO1004a

研究期間: 平成25～26年度

小課題名: 植物のC4光合成のメカニズムの解明と遺伝子導入による機能検証

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 京都大学・理学研究科・植物学教室・鹿内利治

1) 研究目的

C4光合成は維管束鞘細胞にCO₂を濃縮することで、光呼吸を回避するメカニズムであり、陸上植物が果たした画期的な進化である。現在の気候環境では、C4光合成はC3光合成を凌ぎ、イネなどのC3植物のC4化は人類の長年の夢である。近年の研究で、C4化は、進化の過程で独立に何度も起きており、少数の鍵遺伝子の改変で、植物の光合成が大きく変化する可能性が考えられている。しかしながら、実際に作物として使える植物を育種するには、メインスイッチの切り替え後も、多くの最適化の作業が必要である。イネのC4化は、世界的なプロジェクトとなっているが、現実的な育種には、手のつけられていない重要課題が多く残されている。そこで本研究では、C4回路の駆動において鍵となる機能を果たす維管束鞘細胞に注目し、1) C4化の鍵転写因子の解析、2) 細胞特異的葉緑体遺伝子発現技術の開発、3) C4回路へのATP供給系の強化、を目指して研究を行う。

2) 研究成果

研究方法

(ア) C4化の鍵転写因子の解析

イネの*GLK*遺伝子を比較解析し、その情報に基づき二重変異体を作成、変異体の表現型解析を行った。*OsGLK*遺伝子の発現場所を同定し、ソルガム*SbGLK*遺伝子のゲノム断片を単離し、イネへの形質転換用コンストラクト作成、変異体への遺伝子導入後、系統化と表現型解析を行った。

(イ) 細胞特異的葉緑体遺伝子発現技術の開発

トウモロコシの葉から葉肉細胞と維管束鞘細胞を分画し、RNAを抽出した。RNAからrRNAを除去し、次世代シーケンサーでRNA配列を決定した。また同時にshort RNAを精製し、同様に配列を決定した。

(ウ) C4回路へのATP供給系の強化

トウモロコシの葉から2種類のフェレドキシンをコードする*ZmFd1*と*ZmFd2*遺伝子をクローン化し、シロイヌナズナの*petC*プロモーターの下流に繋ぎ、シロイヌナズナ野生株およびサイクリック電子伝達を欠損する*pgr5*、*crr2-2*変異株に導入した。

研究結果

(ア) C4化の鍵転写因子の解析

トウモロコシの*Golden plant 2* 遺伝子は、維管束鞘細胞での葉緑体分化を制御する遺伝子であり、その変異体は幼苗致死となる。この遺伝子は、*GLK*遺伝子群に属するが、ゲノム配列を比較し、分子進化系統樹を作成すると、イネ科作物の起源の植物では、2個の遺伝子、*GLK1*と*GLK2*が存在し、機能分化をしながら、現在においても葉緑体分化因子として機能していると考えられる。C3植物であるイネでは、維管束鞘細胞に活発な光合成機能を有する

葉緑体が分化することはない。そこで、イネの*OsGLK1*と*OsGLK2*遺伝子をノックアウトし、C4植物ソルガムの*SbGLK1*と*SbGLK2*遺伝子と置き換えることを試みた。

SALADデータベースを利用して解析したところ、Os06t0348800が*OsGLK1*にOs01t0239000が*OsGLK2*に相当することが分かった。そこで韓国から両遺伝子の変異株を入手した。単独変異のホモ個体では、一部白い縞模様が入る個体が見られたが、概ね正常に生育した。そこで、二重変異体を作成したところ、幼苗致死の表現型を示した(図1)。

Osglk1/Osglk1 OsGLK2/Osglk2 の自殖後代のイネ幼苗



Osglk1/Osglk1 OsGLK2/Osglk2
幼苗致死

図1 イネ*g1k1 g1k2*二重変異株は幼苗致死である。

さらにその二重変異体に、ソルガムから単離した*SbGLK1*と*SbGLK2*遺伝子を導入し、葉緑体分化機能の相補を確認した(図2)。*SbGLK2*遺伝子は、ソルガムの維管束鞘細胞において葉緑体分化の鍵を握ると考えられ、形質転換イネの葉緑体分化の詳細な解析に向けて材料が整った。



図2 ソルガム*SbGLK1*、*SbGLK2*遺伝子はイネ*glk1 glk2*二重変異株を相補する

(イ) 細胞特異的葉緑体遺伝子発現技術の開発

核コードの遺伝子の細胞特異的な発現は、転写レベルで制御を受ける場合が多い。しかし、葉緑体での転写制御は緻密ではなく、遺伝子発現は、転写後のRNAの安定化や翻訳の段階で主に制御を受ける。光合成装置の主だったものは葉緑体ゲノムにコードされており、C4光合成を実現する葉緑体の機能分化のためには、葉緑体遺伝子の組織特異的発現が必要である。その分子メカニズムは、葉緑体分子生物学の固有の問題であり、特にC4光合成の生理に結びつけた研究は非常に遅れている。イネなどC3植物のC4化を考えるのであれば、葉緑体遺伝子を細胞特異的に発現させる技術の開発は避けて通れない課題である。

葉緑体の遺伝子発現は、RNAの安定性や、翻訳の段階で重要な制御を受ける。近年の研究から、PPRタンパク質と呼ばれる配列特異的RNA結合タンパク質が、mRNAの5'あるいは3' UTRに結合し、RNAをエクソヌクラーゼから保護するとともに、RNAの二次構造を変更し、翻訳装置を呼び込むことが明らかになっている(図3)。PPRタンパク質により結合を受ける配列は、RNaseから保護され、短いフットプリントRNAを残す。したがって、このフットプリントRNAを検出することで、細胞特異的なRNAの安定化因子、翻訳活性化因子の発現をモニターすることが可能であると考えられる。

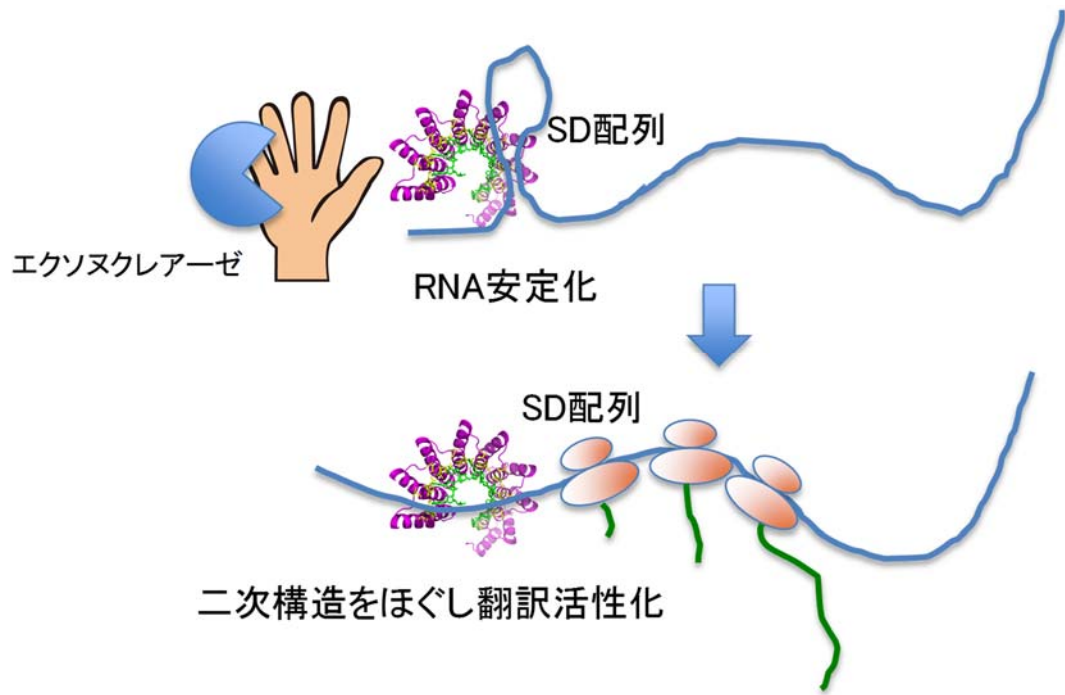


図3 PPRタンパク質によるRNA安定化と翻訳の制御

我々は、トウモロコシの維管束鞘細胞と葉肉細胞に特異的な葉緑体遺伝子の発現のメカニズムを調べる目的で、葉緑体トランスクリプトームの次世代シーケンサーによる網羅的解析を行った。通常のRNAの蓄積を調べる一方で、フットプリントRNAの蓄積を調べる目的で、短いRNAを抽出し、配列を決定した。

葉緑体NDH複合体は、C4回路の駆動に必要なATPを供給するため、維管束鞘細胞に高蓄積する。このことを反映して、11の*ndh*遺伝子の蓄積は、維管束鞘細胞で高かった。*ndhB*遺伝子の例を図4に示す。*ndhB*遺伝子と上流の*rps7*遺伝子の間には、明瞭なフットプリントRNAが検出された。我々は、シロイヌナズナでこの領域に結合するPPRタンパク質CRR2を報告している。CRR2は、*ndhB*の翻訳に必須であるが、CRR2はRNAの安定化ではなく、RNAの切断に関与する可能性が考えられており、トウモロコシで見られたフットプリントRNAがCRR2に由来するものかは、検討が必要である。予想外なことに、このフットプリントは、葉肉細胞で、維管束鞘細胞より多く検出された。これは一例であるが、多くのフットプリントRNAの蓄積量は、フットプリントが由来するもとのRNAの蓄積量を反映しないことが明らかになった(図5)。

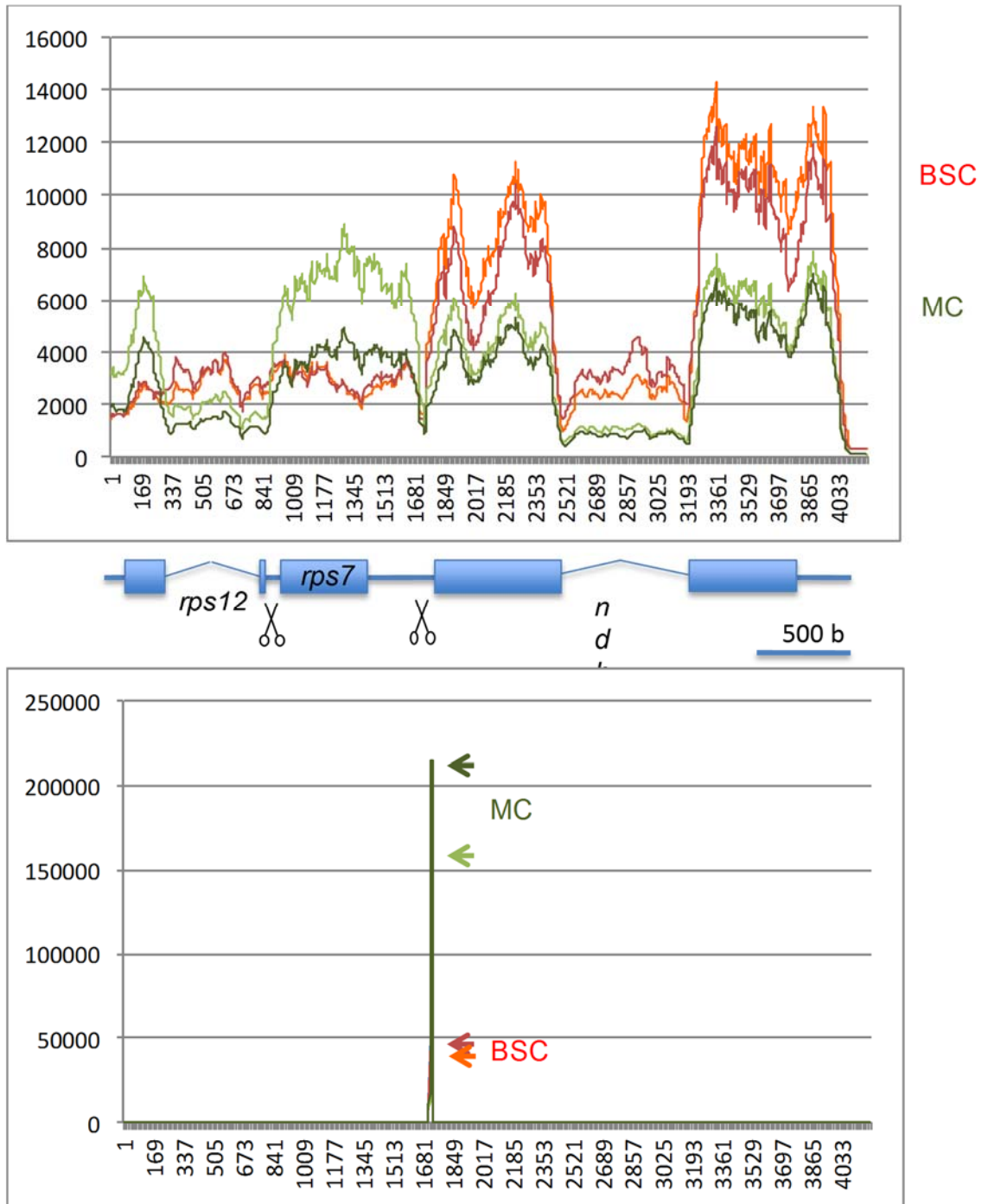


図4 *rps7-ndhB*の転写産物蓄積パターン

上段はRNAの蓄積パターン。下段は、フットプリントRNAの蓄積パターン。維管束鞘細胞 (BSC) と葉肉細胞 (MC) それぞれ独立の2サンプルからRNAを抽出した。はさみは、遺伝子間のRNAの切断部位を示す。

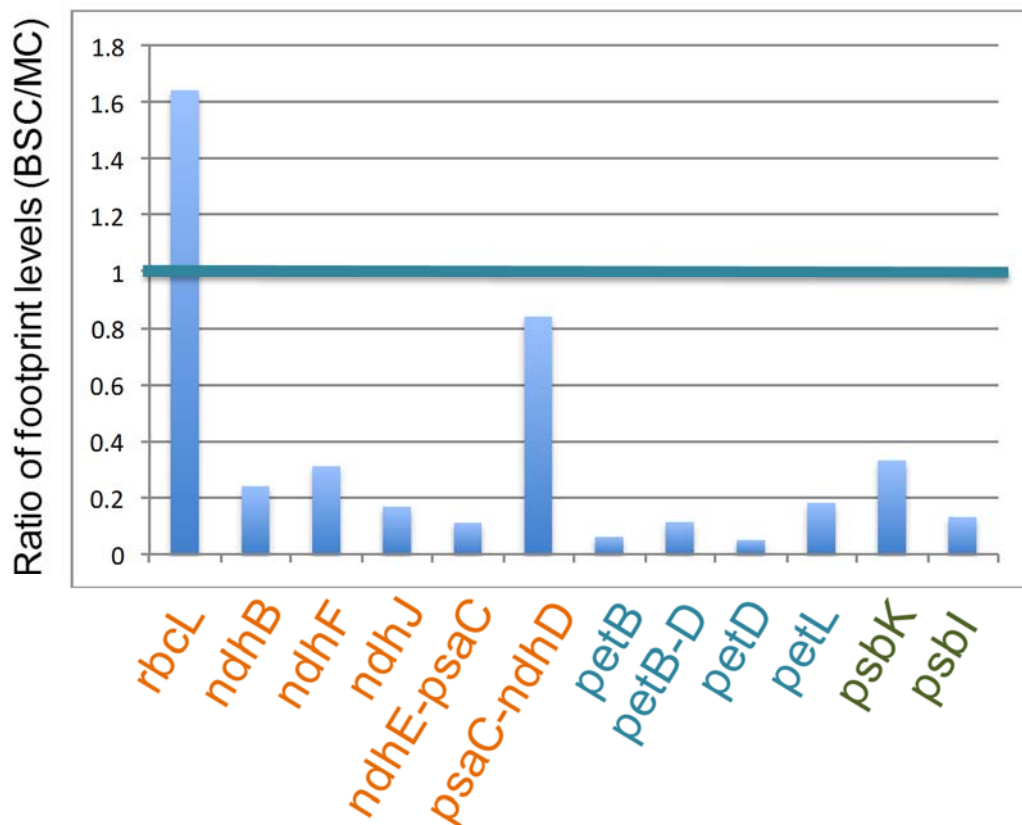


図5 葉肉細胞と維管束鞘細胞でのフットプリントRNAの蓄積比

各遺伝子に検出された、フットプリントRNAの維管束鞘細胞（BSC）と葉肉細胞（MC）での存在比。オレンジは維管束鞘細胞で高蓄積するRNA、緑は葉肉細胞で高蓄積するRNA、青は両者で同定度に蓄積するRNAに由来するフットプリントを示す。

フットプリントRNAを調べることで、細胞特異的な葉緑体遺伝子発現を分子機構を明らかにすることは容易ではないかもしれない。そこで、トランスクリプトームのデータを詳細に調べ直し、*rps15*から始まるオペロンに注目するに至った。このオペロンは、*rps15*以下、*ndhH*、*ndhA*、*ndhI*、*ndhG*、*ndhE*、*psaC*、*ndhD*を含む（図6）。前述のように*ndh*遺伝子は、維管束鞘細胞で特異的に発現する必要がある。実際、葉肉細胞より維管束鞘細胞で高いRNAレベルが確認できた。*rps15*と*psaC*はそれぞれ、リボソームと光化学系Iのサブユニットをコードする。両者をコードする他のサブユニット遺伝子のRNAは維管束鞘細胞より葉肉細胞でやや多く蓄積するが、*rps15*と*psaC*は維管束鞘細胞に多く蓄積する。このことは、このオペロンに由来するRNAの蓄積量は、*rps15*の上流から転写される長い前駆体RNAのレベルで制御されていることを示唆している。この分子機構を調べる目的で、まず*rps15*の上流に、転写開始点とプロセッシングに由来する成熟化RNAの末端を決定した。

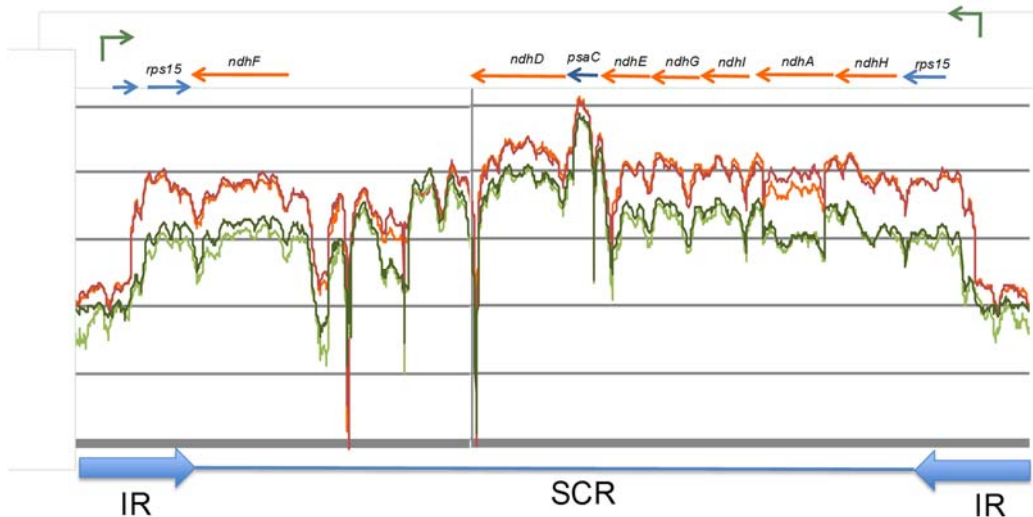


図6 トウモロコシシングルコピー領域（SCR）の遺伝子構造と転写産物解析

維管束鞘細胞（赤系統）と葉肉細胞（緑系統）それぞれ独立の2サンプルからRNAを抽出した。*rps15*は、逆位反復配列（IR）中に存在する。

（ウ） C4回路へのATP供給系の強化

C4回路は、CO₂の濃縮に余分なATPを必要とし、それはサイクリック電子伝達によって補われている。トウモロコシの維管束鞘細胞でNDH複合体が高蓄積するのは、そのためである。NDH複合体を経由するサイクリック電子伝達は、リニア電子伝達とフェレドキシンの酸化で競合する。C3植物では、リニア電子伝達に流れる電子が多く、電子の流れを制御してやらないと、ATP合成系は強化されない。トウモロコシでは、Fd1とFd2の二種類のフェレドキシンが存在し、Fd2は維管束鞘細胞に特異的に存在する。トウモロコシ*Fd2*遺伝子をシアノバクテリアで発現させるとサイクリック電子伝達を強化することが知られている。そこで、トウモロコシ*Fd2*遺伝子をシロイヌナズナ野生株と、サイクリック電子伝達の二つの経路をそれぞれ欠損する*pgr5*変異株と*crr2-2*変異株に導入した。シロイヌナズナにおいてサイクリック電子伝達を強化する可能性と、その場合は、Fd2がサイクリック電子伝達のどちらの経路に電子を与えるかを調べる目的である。

野生株、*pgr5*変異株と*crr2-2*変異株背景でそれぞれ20ライン程度の形質転換体を解析し、組換え遺伝子を単一遺伝子座にホモに持つラインを各5ライン確立した。トウモロコシのFd2に対する抗体を用いてウェスタン解析を行い、Fd2の蓄積を調べた（図7）。シロイヌナズナ非形質転換体においても複数のシグナルが検出され、判断が難しいが、野生株に見られないシグナルや野生株より強いシグナルが検出され、導入遺伝子の発現によるものと考えられる。多くのラインにおいて電子伝達に変化は見られなかった。しかしながら、*pgr5*背景のラインにおいて、生育の遅延と電子伝達速の低下が見られた。今後、ZmFd2の蓄積との相関を正確に評価する必要がある。

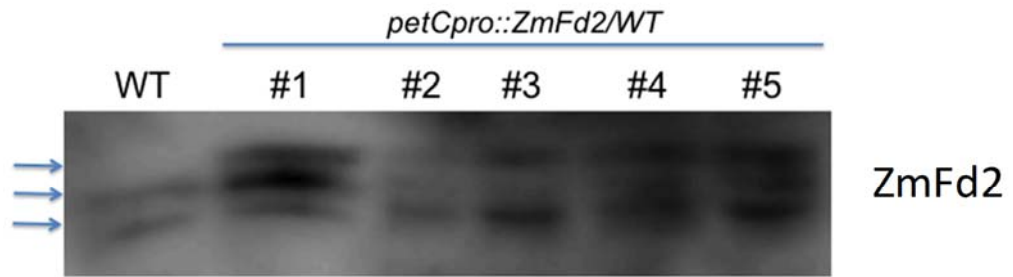


図7 シロイヌナズナ野生株背景にZmFd2を高発現させたラインのウェスタン解析

抗ZmFd2抗体を用いて検出した。矢印は、シロイヌナズナFd2あるいはZmFd2に対応すると思われるシグナルを示す。

3) 成果活用における留意点

C4化に関する知見・技術などについては、知的財産化することにより、研究成果の管理・活用を準備している。

4) 今後の課題

(ア) C4化の鍵転写因子の解析

in situ 発現解析により、特に*SbGLK2*の導入により、イネ形質転換体が、C4植物に近い細胞特異的な遺伝子発現を示すかを検討する。

(イ) 細胞特異的葉緑体遺伝子発現技術の開発

*rps15*の5' UTRについて、DNA鎖特異的なRNAの蓄積情報を得る。維管束鞘細胞と葉肉細胞で転写速度を比較する。RNAの安定化の違いが確認できれば、成熟化RNAの5'末端付近をプローブに安定化因子の精製を行う。

(ウ) C4回路へのATP供給系の強化

トウモロコシFd2の定量的評価系を確立し、電子伝達の低下との因果関係を調べる。さらに各系統で、ライン数を増やし、サイクリック電子伝達活性が上昇していないかを調べる。

「作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13406017

研究期間：平成25～29年度

中課題名：作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発(GMO)

小課題番号：GMO1004b

研究期間：平成25～26年度

小課題名：C/Nバランス改変による高バイオマス作物の作出

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農業生物資源研究所・植物科学研究領域・植物生産生理機能研究ユニット・徳富光恵(宮尾光恵)

1) 研究目的

作物の生産性は長らく、光合成能、すなわち炭素 (C) 同化能で決定されると考えられてきた。近年になって、バイオマスと収量はともに土壌中の窒素 (N) の吸収・同化量に依存することがわかってきた。また、C同化、N同化のいずれか一方を促進させても、必ずしも成長は促進されない。これらの現象はC/N相互作用と呼ばれ、C同化とN同化のバランスが適正でないとき余剰な同化物は成長に利用されない。本研究では、C/Nバランスを人為的に改変し同化物の有効利用を図ることにより、バイオマス生産に優れた作物を作出する。

イネでは、葉緑体型PEPC (ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ ; *Ospc4*) がC同化とN同化を結ぶ鍵酵素であること、アンモニアを主要窒素源とする水田のような環境で本酵素が無機窒素の有効利用に重要な役割を担うことがわかっている。本研究ではまず、イネを用いて*Ospc4*を利用したバイオマス増産戦略を開発する。また、窒素利用効率改良の方策を検討する。得られた知見に基づき、やはり葉緑体型PEPC様遺伝子をもち、畑作物の中では比較的アンモニア利用能の高いオオムギ等のバイオマス増産をめざす。

2) 研究成果

研究方法

(ア) 材料

イネ品種、日本晴を用いた。イネ・アクチンプロモーターあるいはイネ*Cab*プロモーターに*Ospc4* cDNAを連結したキメラ遺伝子を導入し、*Ospc4*を過剰発現させた。葉身の*Ospc4*タンパク質発現量 (ウェスタンブロットのバンド強度) よりホモ系統を選抜した。

(イ) 土耕栽培

無肥料培土に元肥として化成肥料を添加した。生育調査に当たっては、主要栄養素の量を固定し (N : P205 : K20 = 1 : 2 : 1)、3種類の窒素施肥区を設けた [1個体当たり 0.1、0.3、0.6 g N ; それぞれ、Low, Middle, High N (通常施肥量は 0.3 g N)]。播種後8日目の苗 (葉齢3.5-3.8) を1/5000aワグネルポットに移植し (1ポット当たり3あるいは4個体)、湛水条件で、ガラス温室あるいはグロースチャンバー (栽培室寸法1294 mm W×900 mm D×1800 mm H) で育成した。

(ウ) PEPC活性測定

NADH-リンゴ酸脱水素酵素を用いた酵素カップル法で、NADHの吸光度変化からPEPC活性を決定した。葉身の全PEPC活性測定に当たっては、活性化剤であるグルコース 6-リン酸存在下、pH 8.0で測定を行った。

(エ) 改変リコンビナント*Ospc4*タンパク質の作出

PCR Mutagenesis Kit (東洋紡) を用い、*Ospc4*発現用プラスミド (pET28a) に変異を導入した。得られたプラスミドを大腸菌内で発現させ、リコンビナントタンパク質を抽出、

精製し、酵素特性を解析した。

研究結果

イネは、解糖系に加え、*Osppc4*が関与する独自の有機酸合成系をもつこと（図1）、この経路がアンモニアを主要窒素源とする生育環境で、窒素同化・アミノ酸合成のための主要な炭素骨格（有機酸）供給系として機能することがわかっている。図1では緑葉・葉肉細胞での一次代謝経路を模式的に示したが、*Osppc4*は根でも発現しており、アンモニア添加で根での発現が誘導されることから、根においても窒素同化・アミノ酸合成に必要な有機酸の供給に関与する可能性が示されている。

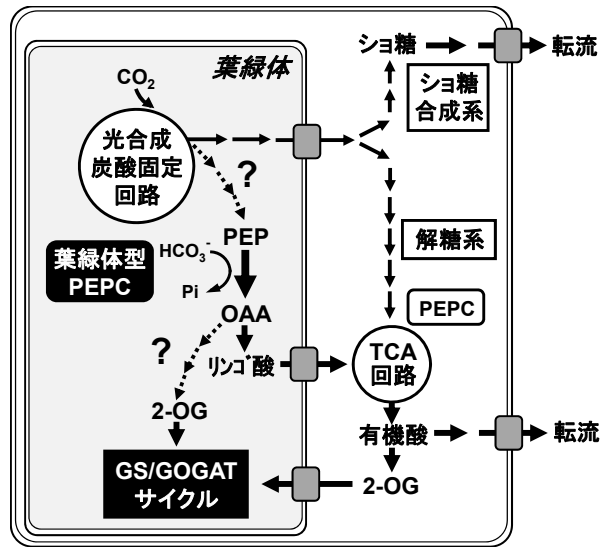


図1 イネ緑葉・葉肉細胞の一次代謝経路

一般的に、窒素同化・アミノ酸合成の炭素骨格として使われる有機酸は、光合成炭酸固定産物から、解糖系、TCA回路を経由して合成される。イネは葉緑体型PEPC (*Osppc4*) を経由する独自の有機酸合成系をもち、少なくともアンモニアを主要窒素源とする生育環境では、この経路が窒素同化・アミノ酸合成のための主要な有機酸供給系として働いている。GS/GOGATサイクル、窒素（アンモニア）同化系；OAA、オキサロ酢酸；2-OG、2-オキシグルタル酸；PEP、ホスホエノールピルビン酸；Pi、リン酸。

(ア) イネにおける*Osppc4*過剰発現の効果の解析

2種類のプロモーター、すなわち、すべての器官・組織で構成的発現を促すイネ・アクチンプロモーター、緑色組織特異的に高発現を促すイネ*Cab*プロモーター制御下で*Osppc4*を過剰発現する形質転換イネを作出した（それぞれ、アクチン系統、*Cab*系統）。形質転換イネ当代（T0世代）葉身の*Osppc4*含量を調べ、*Osppc4*発現量の異なる系統を選抜した（低発現～高発現）。T1世代のハイグロマイシン抵抗性の分離比より導入遺伝子が1遺伝子座に挿入されている系統を選び、葉身*Osppc4*含量よりホモ系統を選抜した（表1）。選抜したホモ系統の*Osppc4*増大率は最大で53倍に達した。また、T1世代（ホモ個体＋ヘテロ個体）を用いた解析で、*Osppc4*を過剰発現させると高窒素条件でイネの生育が促進されることがわかった。

| 系統 | Hm抵抗性 | 使用世代 | 全PEPC活性(葉身) | | Osppc4増大率 | Osppc4増大率から判定した発現程度 |
|---------------------------|-----------|------|-------------|------|-----------|---------------------|
| | (抵抗性/感受性) | | 測定値 | 増大率 | | |
| アクチン系統(2013年度までにホモ系統選抜済み) | | | | | | |
| NT | | - | 0.15 | 1 | 1 | |
| A30 | | T2 | 0.22 | 1.5 | 5 | 低発現 |
| A60 | | T2 | 1.37 | 9.1 | 27 | 高発現 |
| A43 | | T2 | 1.75 | 11.7 | 35 | 超高発現 |
| Cab系統 | | | | | | |
| 2013年度に選抜したホモ系統 | | | | | | |
| NT | - | - | 0.08 | 1 | 1 | |
| C5 | 3.5 | T2 | 0.82 | 9.8 | 29 | 高発現 |
| C7 | 3.4 | T2 | 1.50 | 17.8 | 53 | 超高発現 |
| 2014年度に選抜したホモ系統 | | | | | | |
| NT | - | - | 0.07 | 1 | 1 | |
| C8 | 3 | T1 | 0.90 | 13.6 | 41 | 超高発現 |
| C18 | 3.6 | T1 | 0.52 | 7.9 | 24 | 高発現 |
| NT | - | - | 0.10 | 1 | 1 | |
| C21 | 3 | T1 | 1.03 | 10.8 | 33 | 超高発現 |

表1 選抜したOsppc4過剰発現イネ・ホモ系統のPEPC活性

Hm抵抗性は、T1世代のハイグロマイシンに対する抵抗性、感受性の分離比を示す。全PEPC活性の単位は $\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ 。Osppc4増大率は、全PEPC活性増大率の3倍（非形質転換イネ葉身のOsppc4活性は全PEPC活性の約1/3であるため1）。NT、非形質転換イネ。

a アクチン系統の解析

本研究開始までにOsppc4の発現レベルの異なるホモ系統が3系統得られていた（表1）。これらホモ系統のT2世代を用い、Osppc4の過剰発現で生育が改良されるか検討した。

3種類の窒素条件（Low, Middle, High N）でイネを育成し、葉齢、分けつ数、草丈、SPAD値（葉緑素計で測定した相対クロロフィル含量）を経時的に調べ、栄養成長期の地上部乾物重を測定した。まず、ガラス温室（自然光条件下）で育成し、生育を比較した。T1世代での結果と異なり、Middle N条件で生育促進（地上部乾物重と分けつ数の増加）が見られたが、High N条件では生育は変わらないかむしろ抑制されるという結果が得られた。その後の解析で、High N条件での生育は日照の影響を受けやすいことがわかったため、以降の実験はグロースチャンバー内で行った（28°C/23°C、日長14時間、光強度約1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ）。使用したグロースチャンバーの栽培面積が小さいため、3回に分けて実験を行った。

低発現のA30系統、高発現のA60系統では、窒素条件にかかわらず、移植後18日目（第9葉展開中）の地上部乾物重が有意に増大することがわかった（図2左）。A60については、3種類の窒素条件すべてで地上部乾物重が有意に増大することを確認した（図2右）一方、Osppc4の発現が非常に高い超高発現系統（A43）では、窒素条件によらず、生育が阻害されることがわかった。

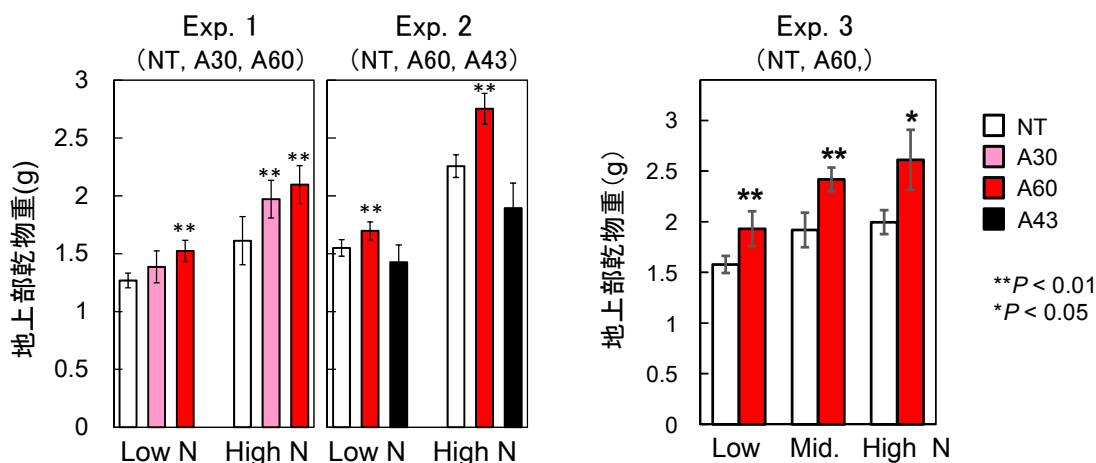


図2 アクチン系統の生育（地上部乾物重）

アクチン・ホモ系統（T2世代）を2種類（左）あるいは3種類（右）の窒素条件下、グローブスチャンバー内で育成した。Exp. 1、移植後18日目（葉齢8.5~8.8）、 $n = 5 \sim 8$ 。Exp. 2、移植後18日目（葉齢8.5~9.3）、 $n = 4 \sim 5$ 。Exp. 3、移植後19日目（葉齢約9.5）、 $n = 4 \sim 8$ 。NT、非形質転換イネ。Mean \pm SD。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (t -test)。

b 低発現*Cab*系統の選抜

合計16系統の*Cab*系統をスクリーニングした。そのうち導入遺伝子が1遺伝子座に挿入されていたのは9系統で、そのすべてが高発現あるいは超高発現系統だった（表1；もっとも発現が低いC18で非形質転換イネの24倍）。*Cab*プロモーターは緑色組織特異的に高発現を促すプロモーターであり、本研究の目的には不適當だったかもしれない。

高発現系統（C5）をグローブスチャンバー内で標準窒素条件下で育成したが、生育促進は認められなかった。

(イ) 高効率型0*spcc4*過剰発現イネの作出

イネのもつ5種類の植物型PEPC（他の4種類は細胞質型）のうち、葉緑体型の0*spcc4*は、阻害剤に対する感受性は低い（阻害されにくい）が、基質であるホスホエノールピルビン酸（PEP）に対する親和性が低いという特徴をもつ（PEPに対する $S_{0.5}$ 値が典型的な細胞質型酵素0*spcc2a*の約4倍；図3）。これは0*spcc4*のPEP利用効率が低いことを示しており、PEPの利用効率を高めることで、低い発現量でイネの生育を促進できると期待される。そこでまず、リコンビナントタンパク質に変異を導入し、PEPに対する親和性を高められるか調べた。

a 変異導入による高効率型0*spcc4*の作出

PEPCタンパク質の三次元構造シミュレーションから触媒反応に影響を与えると予想される領域を特定し、アミノ酸配列を比較したところ、1) N末端近傍の変換ループのN端アミノ酸残基が、細胞質型PEPCでは塩基性のリジン（K）であるのに対し、0*spcc4*では酸性アミノ酸であるグルタミン酸（E）とアラニン（A）に置換されていること（E121A122）、2) 細胞質型0*spcc2a*のK119を0*spcc4*の配列であるEAに置換すると、阻害剤に対する感受性はほとんど変化せず、PEPに対する親和性のみが0*spcc4*と同程度まで低下することがわかっている（図3）。そこで、逆に、0*spcc4*のE121A122をKに置換することによって、0*spcc4*の基質親和性を高められるか検討した。

Ospcc4にアミノ酸置換を施すと、最大活性 V_{max} が22%増大し、 $S_{0.5}$ 値が約2/3に低下した(図3A、3B)。この結果は、アミノ酸置換でOspcc4がPEPに対して高効率型に改変されたことを示している。しかしながら、当初の予想と異なり、PEPに対する親和性をOspcc2aのレベルまで高めることはできなかった。また、アミノ酸置換でアロステリック阻害剤に対する感受性が增大する(阻害されやすくなる)ことがわかった(図3C)。これは、アミノ酸置換でOspcc4の高次構造が変化したためと考えられる。

阻害剤であるグルタミン酸(Glu)とアスパラギン酸(Asp)はそれぞれ、窒素同化、アミノ酸合成の初期産物である。これら阻害剤に対するOspcc4の高い抵抗性は、葉緑体や根のプラスチド等、窒素同化・アミノ酸合成が活発に行われる環境で機能するために必要な特性と考えられる。しかし一方で、図2に示したように、アクチン系統ではOspcc4高発現系統A60でも生育が促進されている。また、Glu、Aspに対する改変型Ospcc4の I_{50} 値は、Ospcc2aに比べて一桁高く、根の主要PEPCであるOspcc1に比べても充分高い(それぞれ4倍、10倍)。改変型Ospcc4の導入で、外来Ospcc4への窒素投資を削減する効果が期待される。

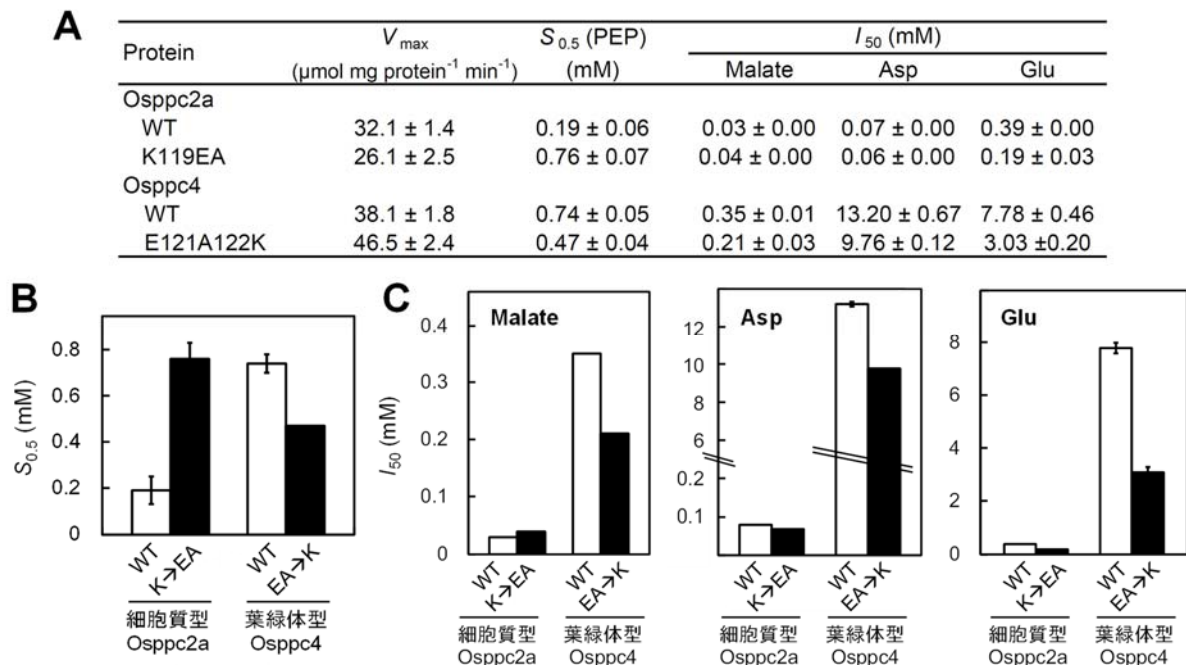


図3 PEPCの酵素反応特性に対するアミノ酸残基改変の効果

N末端近傍可変ループN端のK(細胞質型Ospcc2a)とEA(葉緑体型Ospcc4)を入れ替えたリコンビナントタンパク質を作製し、酵素特性を比較した[Ospcc2a, K119 → EA; Ospcc4, E121A122 → K; WT、野生型(非改変)酵素]。A、酵素キネティックパラメーター。B、基質(PEP)親和性。 $S_{0.5}$ 値が低いほどPEPに対する親和性が高い。C、アロステリック阻害剤に対する感受性。活性を50%に低下させる阻害剤濃度(I_{50})を示す。 I_{50} 値が高いほど阻害剤に対する感受性が低い(阻害されにくい)。Malate、リンゴ酸; Asp、アスパラギン酸; Glu、グルタミン酸。Mean ± SD (3回の反復実験; 改変Ospcc4のみ2回の反復実験)。

b 高効率型Ospcc4過剰発現イネの作出

アミノ酸置換(E121A122→K)で作出した高効率型Ospcc4をイネに導入した。野生型Ospcc4の過剰発現で生育促進が確認されているのはアクチン系統のみなので、アクチンプロモーター制御下で高効率型Ospcc4を過剰発現する形質転換イネ(日本晴)を作出し、T1種子を

取得した。再分化個体 (T0) 52系統のうち少なくとも28系統で高効率型0sppc4が過剰発現していることを確認した (葉身の0sppc4含量は非形質転換イネの5-10倍まで増大)。T0世代では高効率型0sppc4過剰発現による顕著な生育阻害は認められなかった。

(ウ) オオムギ葉緑体型PEPC様遺伝子の解析

本研究では、葉緑体型PEPC様遺伝子をもち、畑作物の中では比較的アンモニア利用能の高いオオムギにイネ0sppc4遺伝子を導入する予定であった。そこで、オオムギの葉緑体型PEPC様遺伝子が機能を保持しているのか調べた。その結果、オオムギの葉緑体型PEPC様遺伝子は酵素活性を有するPEPCをコードすることがわかった。

3) 成果活用における留意点

0sppc4の高発現には成功したものの、高発現させすぎると生育が抑制されることから、適正レベルで0sppc4を発現させるプロモーターの検討が必要。また、0sppc4i過剰発現による生育促進は、育成環境の光強度と光照射時間に依存するため、より良好な日照条件での調査が重要。

4) 今後の課題

(ア) 0sppc4i過剰発現によるイネの生育促進

アクチンプロモーター制御下で0sppc4を過剰発現させると、栄養生長期のイネの生育が促進されることがわかったが、そのメカニズムは未解決である。また、0sppc4過剰発現で窒素利用効率を改良できるのか、今後検討する必要がある。

(イ) 高効率型0sppc4i過剰発現イネの作出

高効率型0sppc4の導入で、野生型同様あるいはそれ以上にイネの生育を促進できるのか、今後検討する必要がある。

(ウ) オオムギ葉緑体型PEPC様遺伝子の解析

オオムギの葉緑体型PEPC様遺伝子は酵素活性を有するPEPCをコードすることは確認できたが、このPEPCが葉緑体に局在するのか、今後検討する必要がある。

「作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13406017

研究期間：平成25～29年度

中課題名：作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発(GMO)

小課題番号：GMO1005a

研究期間：平成25～27年度

小課題名：イネ科作物における開花期の人為的制御技術の開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：畜産草地研究所・飼料作物研究領域・高溝正

1) 研究目的

これまでに、新農業展開ゲノムプロジェクトのイネ出穂期制御遺伝子ネットワークの解明（GPN0001）の成果として、イネ花芽形成抑制遺伝子 *Ghd7* を過剰発現させ、完全に咲かない遺伝子組換えイネを作製し、その上で、市販されている病害抵抗性誘導剤（プラントアクチベーター；オリゼメート（明治製菓社）など）で転写誘導のかかる遺伝子プロモーターを用いてイネフロリゲン遺伝子 *Hd3a* を発現誘導させることで、開花を人為的に誘導できる遺伝子組換えイネを開発し、特許出願（基礎出願；特願 2013-042009）をしている。

この技術は、原理的には、どんな遺伝背景のイネ品種であっても、目的の栽培地域において最適な時期に花を咲かせることができ、最高のバイオマスを提供できる栽培を可能にする応用価値の高い技術になると期待できる。例えば、北海道で育成された早生の飼料イネ品種は、単位面積当たりのバイオマス生産性が高く、収量性も高いが、本州で栽培すると、ごく早生となり、個体サイズが充分大きくなる前に出穂し、その生産能力を発揮することができない。この背景で、出穂期を制御できれば、日本のいろいろな栽培地域で、高バイオマス生産性・高収量性の期待できるイネ品種が育成できるはずである。この例のように、作物の開花期を人為的に制御できることのメリットは非常に大きいと考えられる。

本研究課題では、イネ以外の重要イネ科作物であるトウモロコシとサトウキビにおいて、同様のメカニズムで人為的に開花期を調整できる系統を開発することを目的とする。また、イネに関しては、これまでの知見が屋内環境内での実験結果によることから、隔離ほ場における野外栽培試験を行い、薬剤による開花誘導の確認と開花期を制御した時の収量性への影響を評価する。

2) 研究成果

○ トウモロコシを使った導入実験

形質転換は、国産自殖系統Mi29の未熟胚へのアグロバクテリウム法により行った。導入に用いたコンストラクトは *Hda3* と *Ghd7* の両方を持つもので、前者はイネまたはトウモロコシ由来の誘導プロモーターに、後者はトウモロコシのエピキチンプロモーターに連結している。

○ 後代での開花誘導試験

Hd3a と *Ghd7* を導入した形質転換体とMi29との交配で得られた後代個体において、両遺伝子を有する導入個体8個体と分離した非導入個体8個体をそれぞれ4個体ずつに分けて、薬剤の処理個体と無処理個体として誘導試験を行った。

その出穂調査を行った結果を図1に示す。

非導入個体では、雄花出穂日に薬剤処理による明確な影響は観察されなかったが、薬剤処理された導入個体では、一個体で、14日程度の早咲きの個体が確認された（図1）。



また無処理の場合は、導入個体は非導入個体と比べて10日以上の開花遅延を示すとともに、これらの個体は巨大化（個体サイズや茎の長さの増大）を示した（図2）。

コンストラクトを導入した全ての形質転換系統が巨大化を示したわけではなく、表現型と *Hd3a*や *Ghd7*の発現との対応の確認や誘導の再現性の確認が必要であるが、巨大化がみられると同時に、開花誘導がみられる系統を得られつつあると考えている。

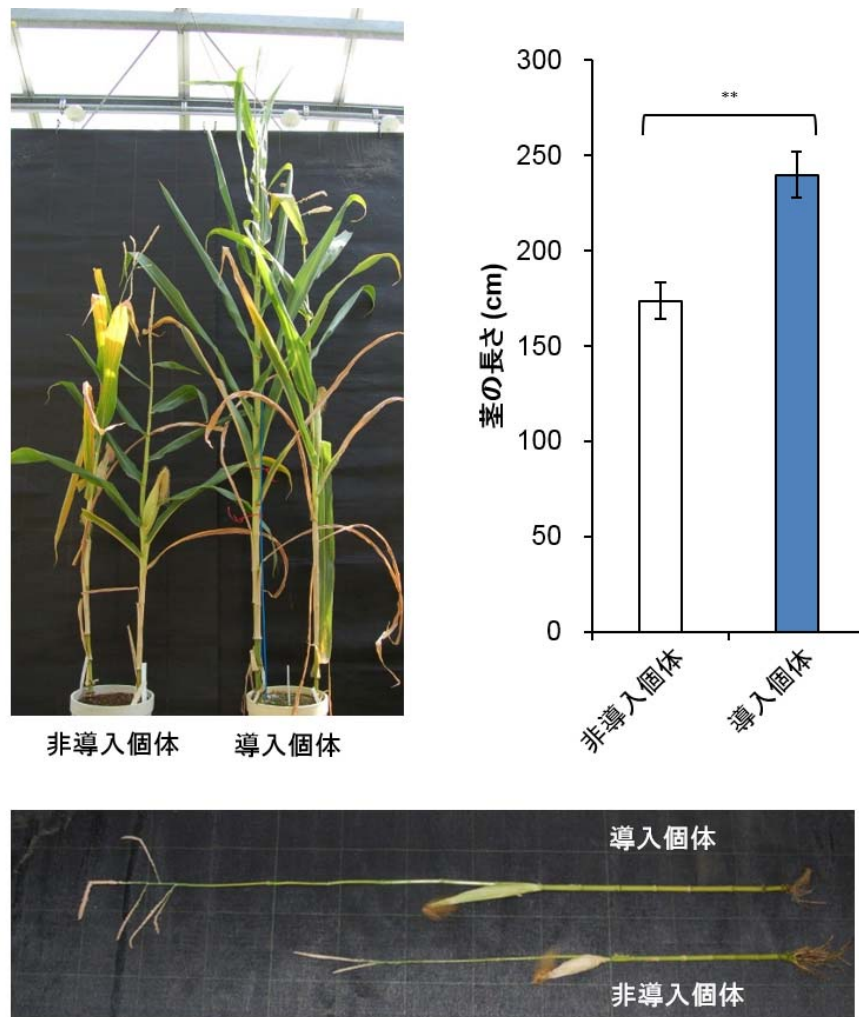


図2 *Ghd7*の導入により巨大化を示した形質転換体後代

(左上)晩生化導入個体と非導入個体の比較写真

(右上)導入個体における茎の長さの増大、**, $P < 0.01$ (スチューデントt検定)、個体数 $n = 4, 4$

(下)導入個体と非導入個体の茎の長さの比較写真

このように、トウモロコシにおいて開発したコンストラクトの導入による晩生化やバイオマス形質の増大を確認した。この結果は、トウモロコシにおいてもイネ晩生化遺伝子 *Ghd7* が、バイオマス向上に利用可能で、ホールクロップサイレージなどへ供する飼料品種の開発やバイオエタノール生産用品種の育成に利用できる可能性を示している。なお、飼料用トウモロコシにおいては茎葉の消化性も大きな改良形質であり、コンストラクトの導入により本形質が改善されているか否かも確認する必要がある。

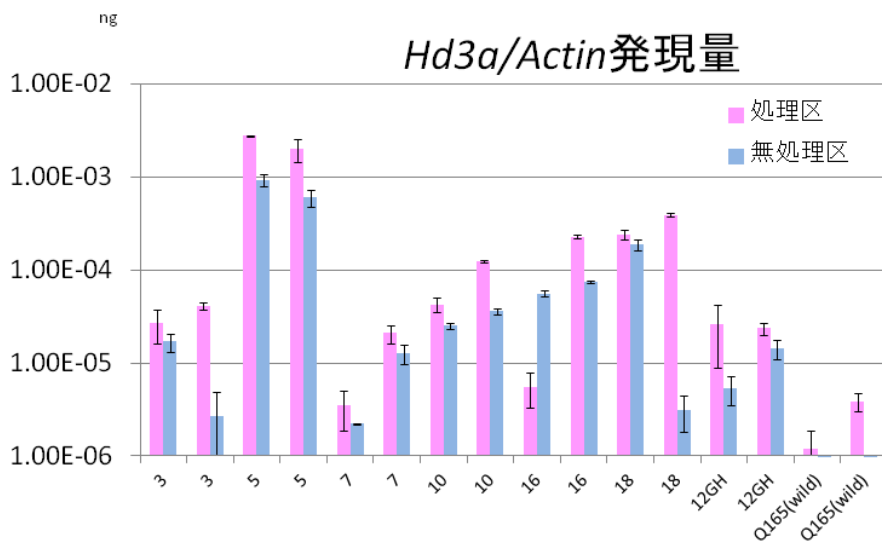
一方で、これまでのところ、イネの場合のように、全く咲かない形質転換系統が得られていない。解析系統数が少ないことが要因として考えられるので、より多数の形質転換体の作製とその後代種子の生産を行い、開花誘導性の検証と合わせて、*Ghd7* の花芽形成抑制能を評価する必要がある。

本プロジェクトでは、全期間目標に記載の通り、開花誘導のかかるトウモロコシ系統を選抜することを目標としてきた。その一方で、コンストラクトの導入による植物体全体のバイオマス増大効果は、ホールクロップサイレージ用トウモロコシとしての有用性が大きい。

○ サトウキビを使った導入実験

イネと同じコンストラクトをサトウキビに形質転換し、下記の図にあるように、農薬散布でのHd3aの誘導を確認できた。課題が終了し、成果はここまでとなったが、特許出願時のデータとしてこの成果をしている。

サトウキビ植物体での外来Hd3aの誘導確認



数倍から数十倍の誘導を示す個体が多い

○ イネ系統を用いた隔離圃場における野外栽培実験

以下のように、H25~H27年度に生物研の隔離圃場で第一種栽培実験として、野外栽培実験を行った。

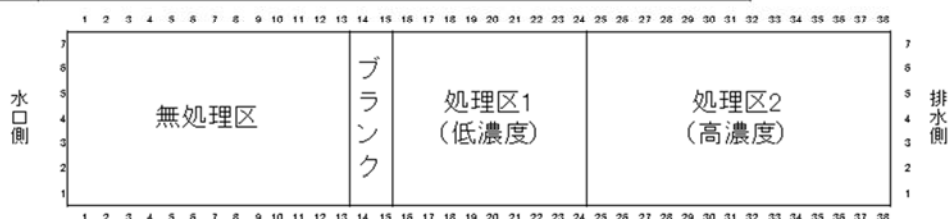
H25年度 隔離圃場における第一種栽培

田植えから収穫までの日程

| 日付 | 内容 |
|-------------|--|
| 2013/6/6~10 | アグリポットへ無菌播種 |
| 2013/6/17 | 馴化 |
| 2013/6/21 | 人工気象室で育苗 (長日条件: 15時間明期:9時間暗期、昼温22℃:夜温18℃) |
| 2013/7/10 | 田植え |
| 2013/8/7 | プラントアクチベーター散布処理開始 (初回含め5日毎に計3回) |
| 2013/8/19 | モニタリング開始 (モチ米品種モチミノリの設置) |
| 2013/11/25 | 収穫 |



薬剤処理時写真
梓水田全体
*8/8撮影

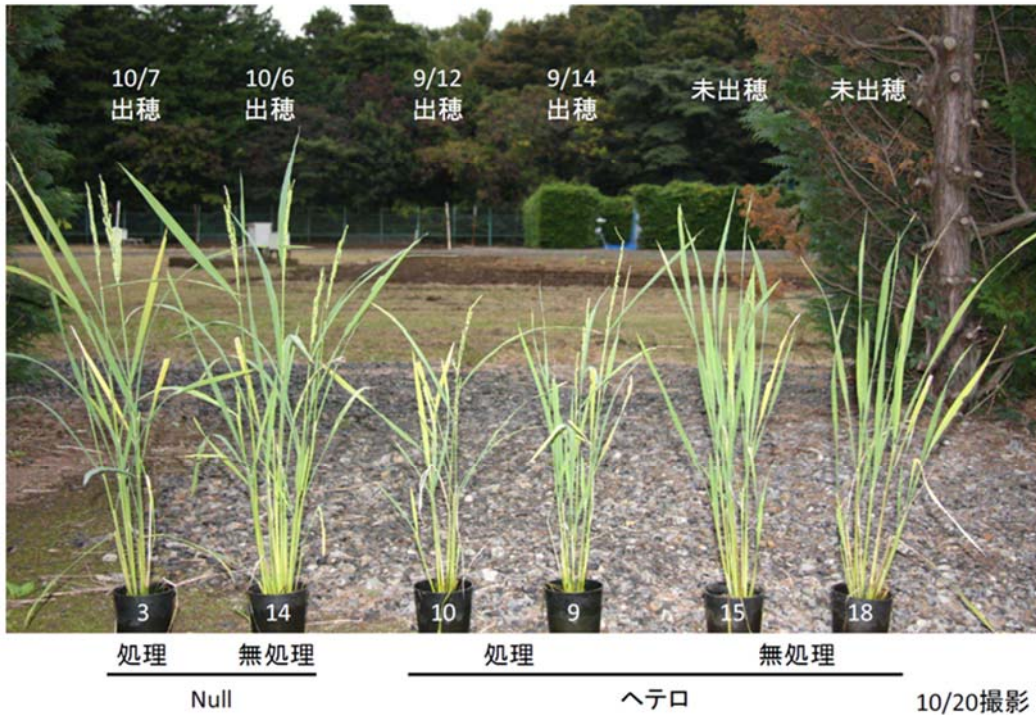


移植配置図

* 5系統 (日本晴、開花期制御イネ4系統) を農環研隔離ほ場の梓水田に移植

H25年度は、上図にあるように、申請書許可の遅れにより、移植日が7月にずれ込んで、開花誘導実験ができなかった。H26年度は、H25年度に巻いた農薬が圃場で残存していたせいか、対象形質転換系統の植物体が想定外に早期開花を示し、誘導実験ができなかった。同じ種子を改めて実験室で栽培したところ誘導はかかったので、野外の栽培条件で想定外の誘導がかかったことは事実である。そこで、ポット栽培ではあるが、野外の栽培をおこない、誘導実験を行ったところ、図にあるように誘導がかかった。H27年度の栽培実験では、農薬散布により、遺伝子発現レベルでの外来Hd3a_cDNAの誘導は確認できたものの、開花期誘導までは確認できなかった。花芽形成を誘導するのに閾値が存在し、H27年の農薬散布では、その閾値までHd3aの誘導が起きなかったと推察される。H28年度以降の実験に期待していたが、予算が続かず、一定の成果が出たということで課題終了という判断になった。ここまでのイネの研究成果は、2017年3月にOkada et al.として、Nature Plants誌に掲載された。

野外でのポット栽培：2-30-1系統の後代



H26年度、第一種栽培実験スケジュール

平成26年

- 5/4~13 種子のアグリポットへの無菌播種 (P1P実験室)
- 5/15~ 馴化 (P1P実験室)
- 5/19~ 人工気象器で育苗開始 (P1P実験室)
- 5/下旬 防鳥網の設置
- 5/30 隔離ほ場への苗の移植 (田植え)
- 6/24 花粉飛散による交雑モニタリングのために指標作物モチミノリの配置
- 7/4 花粉飛散による交雑モニタリングのために指標作物モチミノリの配置
- 7/6~ キタアオバ (宿主品種) 出穂
- 7/20 花粉飛散による交雑モニタリングのために指標作物モチミノリの配置
- 7/24 花粉飛散による交雑モニタリングのために指標作物モチミノリの配置
- 8/8~ 日本晴 (宿主品種) 出穂

| | |
|------------|----------------------|
| 9/30 | モニタリング用の指標作物モチミノリの回収 |
| 10/8~11/14 | 収穫および乾燥等 |
| 11/18 | モニタリング用の指標作物モチミノリの回収 |
| 11/18, 19 | 防鳥網撤去（収穫作業後に撤去） |
| 平成27年 | |
| 1/27 | 枯死を確認・越冬性調査終了 |

H27年度、第一種栽培実験スケジュール

平成27年

| | |
|----------|---|
| 4/25~5/7 | 種子のアグリポットへの無菌播種（P1P実験室） |
| 5/4~5/15 | 人工気象器で育苗開始（P1P実験室） |
| 5/22 | 防鳥網設置、代掻き |
| 5/28 | 隔離ほ場への苗の移植（田植え） |
| 7/2 | 花粉飛散による交雑モニタリングのために指標作物モチミノリの配置 |
| 7/12~ | キタアオバ（宿主品種）出穂 |
| 8/6 | 花粉飛散による交雑モニタリングのために指標作物モチミノリの配置 |
| 8/7~ | 日本晴（宿主品種）出穂 |
| 8/24 | 花粉飛散による交雑モニタリングのために指標作物モチミノリの配置 |
| 9/14 | キタアオバ（宿主品種、一部）収穫 |
| 9/29 | モニタリング用の指標作物モチミノリ隔離ほ場内に回収 |
| 11/11 | キタアオバ（宿主品種、一部）および日本晴（宿主品種）収穫、 防鳥網撤去（収穫作業後に撤去） モニタリング用の指標作物モチミノリを隔離ほ場内ハウスに回収 |

平成28年

| | |
|------|---------------|
| 1/8 | 枯死を確認・越冬性調査終了 |
| 1/20 | 残渣について鋤き込み処理 |

3) 成果活用における留意点

閉鎖系組換え温室の空間的スペースが限られるため、作出した遺伝子組換え作物の多数系統の栽培試験が困難である。また、我が国における遺伝子組換え作物の実用化の見通しが不透明な現状、海外での許諾・利用がより重要であると考えている。

4) 今後の課題

Mi29 は F1 ハイブリッド品種の自殖親であり、将来的には F1 背景での評価を考えているが、トウモロコシの背丈は自殖系統でも 2 メートル以上に達し、閉鎖系組換え温室では、天井の高さなど空間的な制限を受けるため、F1 品種の栽培に向かない。これには、ほ場での第 1 種使用栽培評価が必要と考えている。

「作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13406017

研究期間: 平成25～29年度

中課題名: 作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発(GMO)

小課題番号: GMO1005b

研究期間: 平成25～26年度

小課題名: イネの耐湿性メカニズムの解明と他作物における遺伝子機能の検証

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 名古屋大学大学院・生命農学研究科・植物遺伝育種学研究室・中園幹生

1) 研究目的

作物の耐湿性を向上させるためには、酸素漏出バリア形成や通気組織形成などの根端への効率的な酸素供給能の向上が重要であると考えられる。酸素漏出バリア形成の形質を持つイネは高い耐湿性を示すが、一般的にこの形質を持たないコムギなどの畑作物は耐湿性が低いため、畑作物に酸素漏出バリアを形成させることができれば、耐湿性の向上が可能になると期待される。まず、イネの酸素漏出バリアの形成制御に関与すると考えられる転写因子遺伝子について機能解析を進める。そして、コムギへ複数のイネ由来の候補遺伝子を形質転換し、作出されたコムギの根に酸素漏出バリア形成能が獲得されたかどうかを検証する。以上のことにより、イネの耐湿性メカニズムを解明し、他作物で活用するために必要な知見の獲得と、他作物での遺伝子機能を検証することが本研究の目的である。

2) 研究成果

研究方法

(ア) イネ転写因子遺伝子の形質転換体を用いたスベリン生合成遺伝子の発現とスベリン蓄積への影響評価

酸素漏出バリア形成過程で発現誘導するイネ転写因子遺伝子として、*OsWRKY23*、*OsNAC92*、*OsNAC34*を同定した。これらの遺伝子の機能解析を行うために、CRES-T法によるキメラリプレッサー発現 (SRDX) 系統の作出を行った。作出が先行していた*OsWRKY23*-SRDX系統については、嫌気還元条件で生育させた植物体の根のスベリンを蛍光色素 (Fluoro1 Yellow 088) により染色し、スベリンの蓄積を野生型と比較した。また、酸素漏出バリア形成部位との関連性を明らかにするために*OsWRKY23*遺伝子プロモーター領域の下流にGUS遺伝子を連結した形質転換体を用いて、*OsWRKY23*の発現部位の特定を行った。さらに、*OsWRKY23*-SRDX系統に加え、作出できていた*OsNAC92*-SRDX系統を用いてスベリン生合成遺伝子の発現解析を行うことで、*OsWRKY23*および*OsNAC92*のスベリン生合成への関与を検証した。

(イ) イネ転写因子遺伝子を導入したコムギ形質転換体の作出

イネのアクチンプロモーターの下流に*OsNAC34*、*OsNAC92*、*OsWRKY23*の転写因子遺伝子のcDNAを接続したコンストラクトについて、コムギ品種「Fielder」へアグロバクテリウム法を用いて遺伝子導入を行った。ハイグロマイシンで選抜培養を行って得られた再分化個体について、葉からゲノムDNAを抽出して、選抜マーカー遺伝子 (*hpt*) の有無をPCR分析により確認した。遺伝子導入の確認された個体については、葉からtotal RNAを抽出し、目的とする導入したイネ転写因子遺伝子の発現をRT-PCR法により確認した。その導入遺伝子の発現が確認された個体のみを育成し、交配袋を掛けて自殖させた。導入遺伝子のホモ固定系統の選抜においては、世代促進と分離解析を迅速に進めるために、未熟胚を培地上で発芽

させる方法を用いた。T1とT2の各世代について、*hpt*の有無をPCR分析により確認して分離解析を行った。

研究結果

(ア) イネ転写因子遺伝子の形質転換体を用いたスベリン生合成遺伝子の発現とスベリン蓄積への影響評価

*OsWRKY23*はイネの酸素漏出バリア形成時に部位特異的に発現することから、同じ部位で見られるスベリンの生合成に関連する転写因子だと考えられる。*OsWRKY23*-SRDX系統の根を用いて蛍光色素によるスベリン染色を行い、嫌気還元条件下で生育した植物体の冠根のスベリン蓄積量を野生型と比較した結果、根端から25-35mmの部位で、外皮細胞壁におけるスベリンの蓄積が少ないことが示唆された。また、UV照射によって観察される厚壁細胞壁の自家蛍光も野生型に比べ弱くなっており、細胞壁中の芳香族成分が減少していることも示唆された(図1)。

酸素漏出バリア形成される嫌気還元条件下で生育させた*OsWRKY23*プロモーターGUSのイネ系統の根を用いて、GUS染色を行ったところ、*OsWRKY23*は嫌気還元条件下のイネの根の外皮特異的に発現することが明らかとなった(図2)。さらにレーザーマイクロダイセクションによって、根の外層、皮層、中心柱を単離してqRT-PCRによって発現の組織特異性を確認した結果、嫌気還元条件下で根の外層特異的に発現が誘導されることが明らかになった(図2)。

さらに、*OsWRKY23*-SRDX系統および*OsNAC92*-SRDX系統を用いて、嫌気還元条件下のイネの根におけるスベリン生合成に関与すると考えられる複数の遺伝子の発現解析を行った。その結果、*OsWRKY23*-SRDX系統、*OsNAC92*-SRDX系統ともに、脂肪酸の伸長に関わるbeta-ketoacyl-CoA synthase をコードする*CUT1*遺伝子、長鎖脂肪酸の炭素鎖の修飾に関与する遺伝子(*Cytochrome P450 monooxygenase 86: CYP86*)などの発現が抑制されていることが明らかとなった(図3)。この結果より、*OsWRKY23*、*OsNAC92*は、スベリン生合成遺伝子の発現を制御する転写因子であることが示唆された。

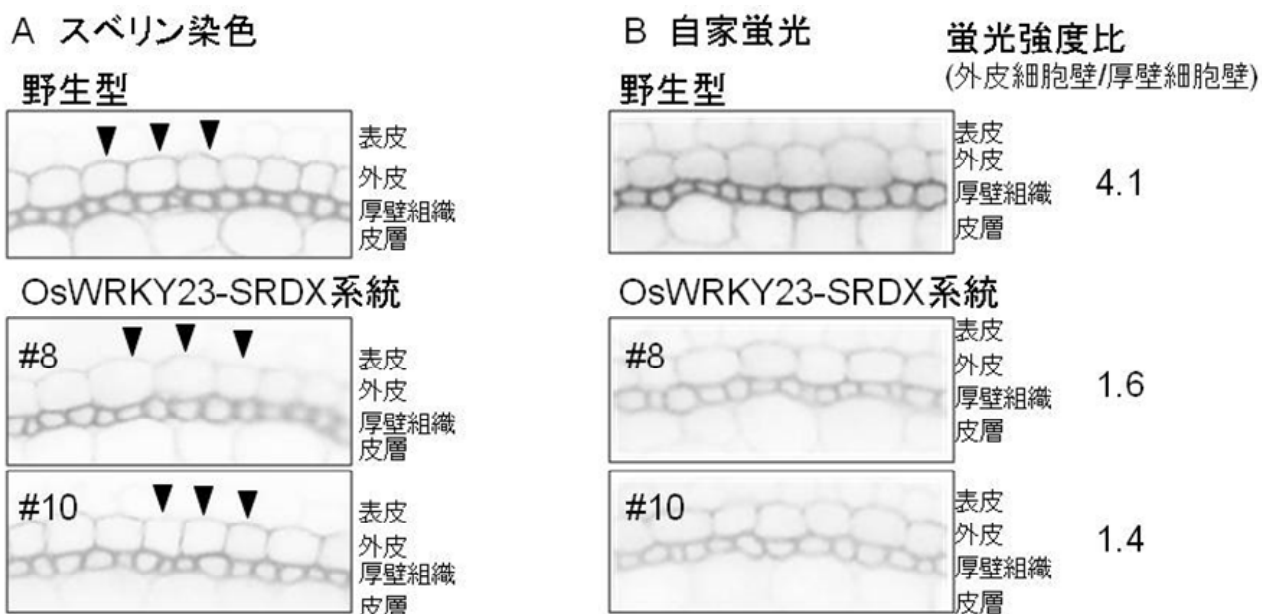


図1 *OsWRKY23*-SRDX系統の形質調査

好気条件下で9日間栽培後、14日間嫌気還元条件下で栽培したイネの野生型と *OsWRKY23*-SRDX系統 (#8、#10) の冠根をサンプリングし、60 μ m厚の横断切片を作製した。

A. イネ冠根の根端から30mm の部位の横断切片を、スベリン染色用の蛍光色素 (Fluoro1 Yellow 088) を用いて染色した。矢じりが示している外皮細胞壁にスベリンが蓄積している。

B. イネ冠根の根端から10mm の部位の横断切片を用いて、UV照射下での自家蛍光像をUV強度を揃えて取得した。自家蛍光像を元にImageJ を用いて蛍光強度を定量化した。外皮細胞壁を基準 (1.0) として厚壁細胞壁の蛍光強度を評価した。

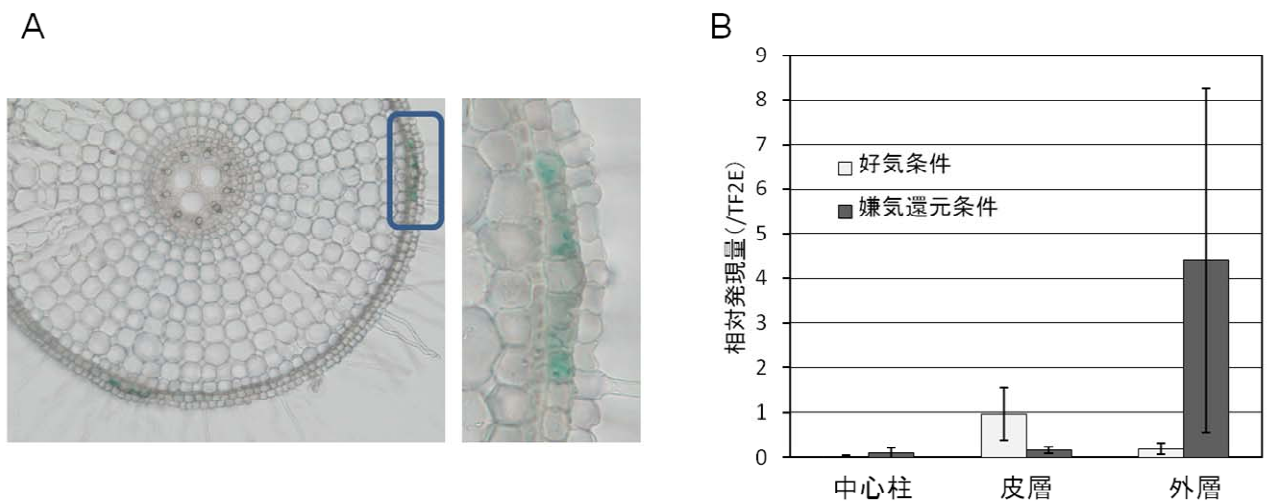


図2 *OsWRKY23*遺伝子の発現の組織特異性

A. *OsWRKY23*プロモーター-GUSを導入したイネ系統を嫌気還元条件下で生育させて、根のGUS染色を行った。根の外皮特異的にGUS染色が観察された。 B. 好気条件下もしくは嫌気還元条件下で生育させたイネ (非形質転換体) の根より、レーザーマイクロダイセクションによって、中心柱、皮層、外層を単離して、*OsWRKY23*遺伝子の組織特異的な発現解析を行った。嫌気還元条件下での外層特異的に*OsWRKY23*遺伝子の発現誘導が観察された。リファレンス遺伝子として、*TF2E*を用い、遺伝子の発現量を相対値で示してある。(平均値 \pm SD (n=3))。

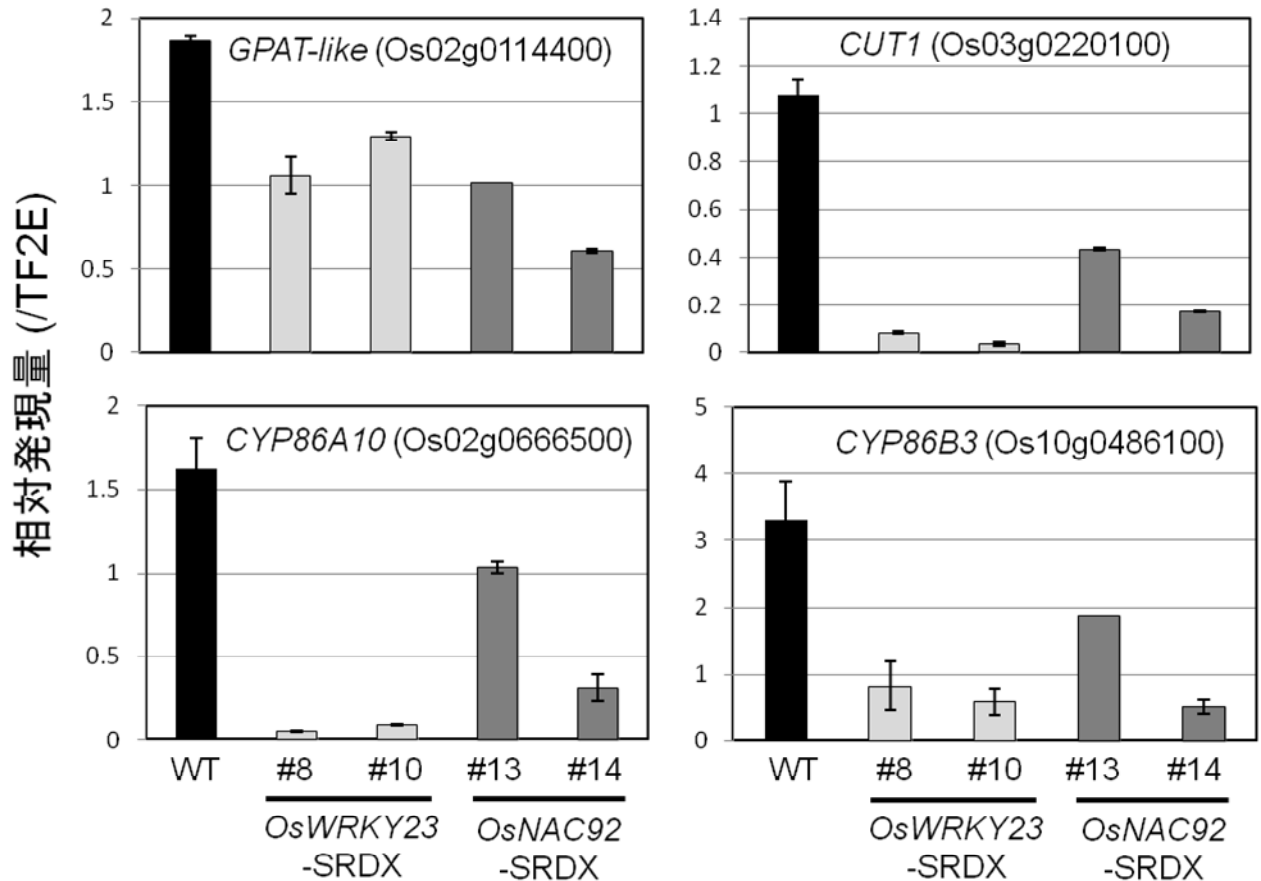


図3 *OsWRKY23*-SRDX、*OsNAC92*-SRDX系統におけるスベリン生合成遺伝子の発現解析

好気条件下で9日間栽培後、14日間嫌気還元条件下で生育させた野生型 (WT) と *OsWRKY23*-SRDX系統 (#8, #10)、*OsNAC92*-SRDX系統 (#13, #14) の不定根をサンプリングし、根端から25-35 mmの部位からRNAを抽出、定量RT-PCRに供して、スベリン生合成遺伝子の発現を評価した。その結果、*OsWRKY23*-SRDX、*OsNAC92*-SRDX系統ではスベリン生合成遺伝子の発現が抑制されていることが明らかになった。リファレンス遺伝子として、*TF2E*を用い、各対象遺伝子の発現量を相対値で示してある。(平均値±SD (n=3))。

(イ) イネ転写因子遺伝子を導入したコムギ形質転換体の作出

OsNAC34、*OsNAC92*、*OsWRKY23*を過剰発現させるコンストラクトについて、アグロバクテリウム感染を行った。*OsNAC34*、*OsWRKY23*、*OsNAC92*について、それぞれ8個体、10個体、10個体の遺伝子導入個体が得られた。得られたT0植物体では、全ての個体で葉での導入遺伝子の発現が確認された。そこで、袋がけをして自殖させた開花約19日後のT1未熟胚を無菌的に16個取り出し培地上で発芽させた後、導入遺伝子 (*hpt*) の分離を調べたところ、*OsNAC34*では8個体中5個体が、*OsWRKY23*では10個体中4個体が、*OsNAC92*では10個体中6個体が、一遺伝子座に導入されたと期待される分離を示す系統 (導入遺伝子保持する個体: 導入遺伝子が抜け落ちた個体=3:1) であった。これらの系統について、導入遺伝子を保持している7個体と抜け落ちた1個体を育成し、このT2世代7個体についてもT1世代と同様に分離を調べた。その結果 *OsNAC34*では3系統調べたうちの2系統から、*OsWRKY23*では4系統中3系統から、*OsNAC92*では6系統中2系統から導入遺伝子がホモで固定された系統が得られた。選ばれた

ホモ固定系統あたり2個体と遺伝子が抜け落ちた2個体について、形質評価に供するためにT3種子をできるだけ多く採取できるよう大きなポットで育成して採種を進めている。これまでに、*OsNAC34*で1系統、*OsWRKY23*で2系統において各系統1,000~1,500粒ずつ採種できた。この中の、早期にホモ固定系統が得られた*OsNAC34*と*OsWRKY23*の1系統ずつを同時に播種して交配を行っており、現在交配種子が実ってきている（図4）。



図4 形質転換コムギの作出状況

これまでに得られている形質転換コムギ*OsAct1pro::OsNAC34*と *OsAct1pro::OsWRKY23*の各ホモ固定系統を交配して種子が得られた。

3) 成果活用における留意点

イネのプロモーターがコムギの根において機能しない可能性もあるため、嫌気ストレス下の根の外皮において高発現する遺伝子を探索することも検討する。

4) 今後の課題

(ア) イネ転写因子遺伝子の形質転換コムギを用いたスベリン生合成遺伝子の発現とスベリン蓄積への影響評価

OsWRKY23、*OsNAC92*および*OsNAC34*の機能解析を進めるとともに、これらの複数の転写因子遺伝子の発現を同時に抑制させたイネ系統も作出して、スベリン生合成および酸素漏出バリア形成への影響を評価する必要がある。

(イ) イネ転写因子遺伝子を導入したコムギ形質転換体の作出

OsNAC34、*OsNAC92*の過剰発現させるコンストラクトについては、残っている形質転換体の作出とホモ固定系統の選抜を進める。図4のように*OsNAC34*と*OsWRKY23*の交配種子が得られてきており、両遺伝子のホモ固定のための展開・選抜を進める。*OsNAC92*のホモ固定されたT3種子が得られ次第、*OsNAC34*もしくは*OsWRKY23*系統との交配を行う。

さらに、*OsNAC34*、*OsNAC92*、*OsWRKY23*のコムギにおける過剰発現系統のT1の世代の種子を用いて、発現量の多い高い系統を選抜する。発現量の多い系統の根におけるスベリンの

蓄積を観察するとともに、溶質透過性試験や根からの酸素漏出量を測定し、コムギ過剰発現系統における酸素漏出バリア形成能を評価する必要がある。

「作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13406017

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発 (GMO)

小課題番号: GMO1006a

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: イネの病害抵抗性遺伝子の他作物における機能検証

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 生物機能利用研究部門・植物・微生物機能利用研究領域・植物機能制御ユニット・森昌樹

1) 研究目的

イネ、トマト、アラビドプシス等で広範囲の病害に強い抵抗性を付与することが明らかになっているイネの遺伝子 BSR1、BSR2 を導入することで、コムギ赤かび病、サトウキビ黒穂病、ダイズ茎疫病、イネ籾枯細菌病等、マーカー育種では抵抗性付与が難しい病害の抵抗性付与をめざす。

2) 研究成果

(1) コムギ: 品種 Bobwhite の未熟胚にパーティクルガン法で遺伝子導入し、薬剤耐性を示すカルスを再分化させることにより形質転換植物体を得た。赤かび病抵抗性評価法は、赤かび病菌 (*Fusarium graminearum*) の菌液を切穂に接種する方法で抵抗性を評価した。

トウモロコシユビキチンプロモーター (*ZmUbi*) で BSR1 を高発現させたコムギにおいては罹病粒数が少なく、赤かび病抵抗性の傾向が認められた。この傾向は 3 回の実験で再現した。一方 BSR2 高発現コムギでは抵抗性の傾向は認められなかった。

(2) サトウキビ: 飼料用サトウキビ品種 KRf093-1 の生長点由来のカルスにパーティクルガン法で遺伝子導入し、薬剤耐性を示すカルスを再分化させることにより形質転換植物体を得た。黒穂病菌 (*Ustilago scitaminea*) の胞子は沖縄県農業研究センターより入手し、抵抗性評価は黒穂病菌の胞子を刺針法で接種後、黒い鞭状物が出現する株を罹病株とし、罹病率を指標に行った。

BSR1 高発現サトウキビ (35S-BSR1) について、黒穂病抵抗性を評価したところ、発現レベルの高い #35 系統、発現レベルが中程度の #30 系統において抵抗性になった (図 1)。また、#35 系統においては生育抑制が認められたが、#30 系統では、サトウキビで重要な茎の生育への悪影響は、現段階でほとんど認められていない。一方、BSR2 高発現サトウキビ系統では顕著な抵抗性は認められなかった。

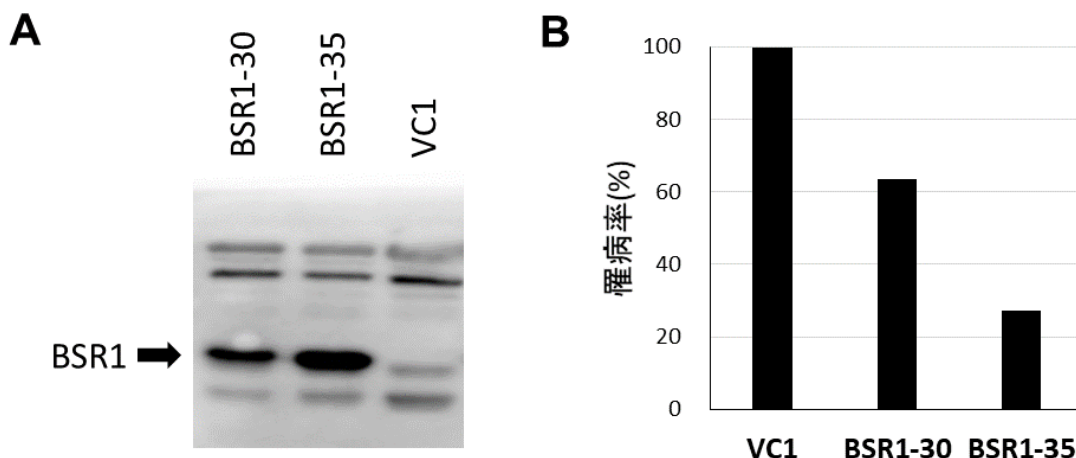


図 1 BSR1 高発現サトウキビにおける BSR1 タンパク質の発現レベル (A) と黒穂病抵抗性 (B)

VC1 はベクターコントロール。

(3) **ダイズ**: 品種 Jack の未熟子葉から誘導した不定胚にパーティクルガン法で遺伝子導入し、薬剤選抜後、蛍光が認められた不定胚を再分化させることにより形質転換植物体を得た。

ウエスタン解析により BSR1 の発現が確認された高発現ダイズ (35S-BSR1) 2 系統について、後代での発現を調べたところ、サイレンシングが起こったのか、安定して BSR1 を発現する系統が得られなかった。そのためダイズについては詳細な抵抗性検定は実施しなかった。

(4) **イネ**: 品種日本晴にアグロバクテリウム法 (迅速形質転換法) により遺伝子を導入し形質転換植物体を得た。籾枯れ細菌病菌 (*Burkholderia glumae*) の接種は催芽種子を菌液に浸漬・吸引することにより行い、枯死を指標とする生存率で抵抗性を評価した。白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) の接種は改良型クリップ法で接種し、2 週間後の病斑長を測定することにより抵抗性を評価した。いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*)、ごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*) の接種はスプレー接種により行い、接種後の病斑数を計測することで抵抗性を評価した。紋枯病菌 (*Rhizoctonia solani*, AG1) 及び褐色紋枯病菌 (*R. solani*, AG2-2) の接種は、切葉にドロップ接種することにより行い、接種後の病斑長を測定すること或いは接種葉における病原菌の DNA 量を定量 PCR で定量することにより抵抗性を評価した。

ZmUbi プロモーターで BSR1 を高発現したイネにおいて、既に白葉枯病、いもち病に抵抗性になることを示していたが、籾枯れ細菌病およびごま葉枯病にも抵抗性になることを明らかにした (図 2)。すなわち BSR1 高発現イネは少なくとも上記 4 種類の重要病害に抵抗性を示す。よって「広範な病害抵抗性を付与するイネ遺伝子」として国内 (第 5591703 号) 及び米国 (9127290 号) で特許を取得した。

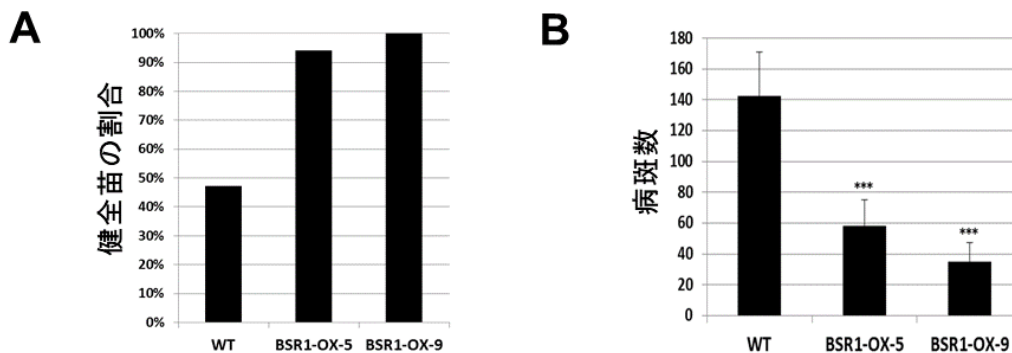


図2 BSR1 高発現イネにおける籾枯細菌病抵抗性(A)及びごま葉枯病抵抗性(B)

*** : WTと比較して0.1%水準で有意差あり

一方高発現イネでは発芽率の低下等、好ましくない影響も認められたため、その最小化を図るために、発現レベルがやや低めの構成的プロモーター (35S, OsUbi7) 感染誘導的プロモーター (GST, PR1b) 下に BSR1 を発現させる形質転換イネを作出した。OsUbi7 プロモーター、PR1b プロモーターで BSR1 を発現させたイネにおいて、発芽率などに不具合がなく、上記 4 種類の病害に抵抗性を示す系統の取得に成功した。

抵抗性機構関連では、まず BSR1 高発現イネの病害抵抗性に、サリチル酸 (SA) 下流の WRKY45 や NPR1 遺伝子が関与しているかどうか調べるために、高発現イネと WRKY45-発現抑制イネ、NPR1-発現抑制イネをそれぞれ交配し得ていた交配種子を用いて、いもち病抵抗性検定を行った。いずれの交

配種子でも BSR1 高発現系統同等の抵抗性が認められたので、BSR1 の抵抗性に SA 下流の WRKY45 や NPR1 遺伝子は関与していないことが示された。つぎに BSR1 が受容体様細胞内リン酸化酵素をコードしていることに着目して、BSR1 ノックアウト (KO) イネを CRISPR/Cas9 法により作出し、糸状菌由来成分であるキチンに対する応答性を解析した。その結果、キチン添加後、活性酸素生成、防御関連遺伝子の発現誘導が共に WT に比べ低下していることが示された (図 3)。細菌由来成分であるリポ多糖に対しても応答性は同様であった。これらの結果から、キチン及びリポ多糖の認識・受容後のシグナルを伝達することが、BSR1 の本来の役割であることが明らかになった (図 4)。

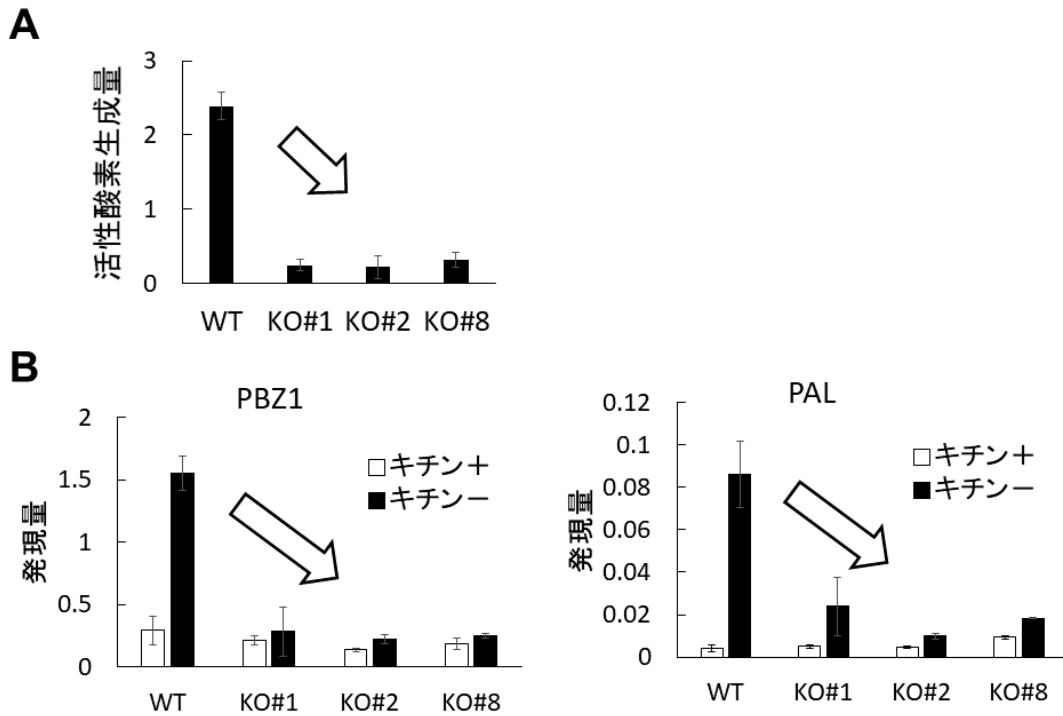


図3 BSR1ノックアウトイネ3系統におけるキチンエリシター応答性の低下 (A)活性酸素生成量 (B)防御マーカー遺伝子の発現レベル

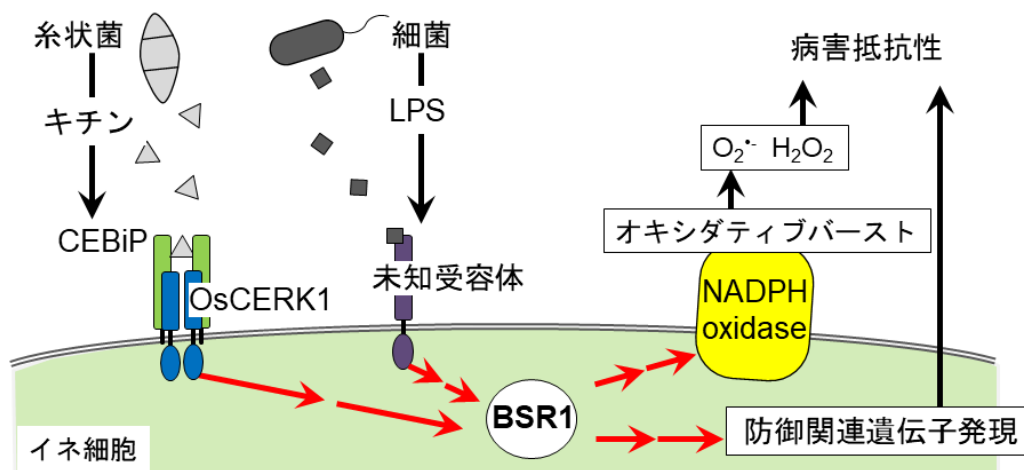


図4 BSR1の抵抗性機構 複数の受容体(キチンとリポ多糖(LPS))の下流のシグナル伝達にBSR1が寄与

BSR2をZmUbiプロモーターで高発現したイネにおいて、紋枯病に抵抗性になることを示した(図5)。同様にBSR2高発現イネは褐色紋枯病に対しても抵抗性を示した。よってBSR2については「リゾクトニア菌抵抗性遺伝子」(特許第6210603号)という特許を取得した。

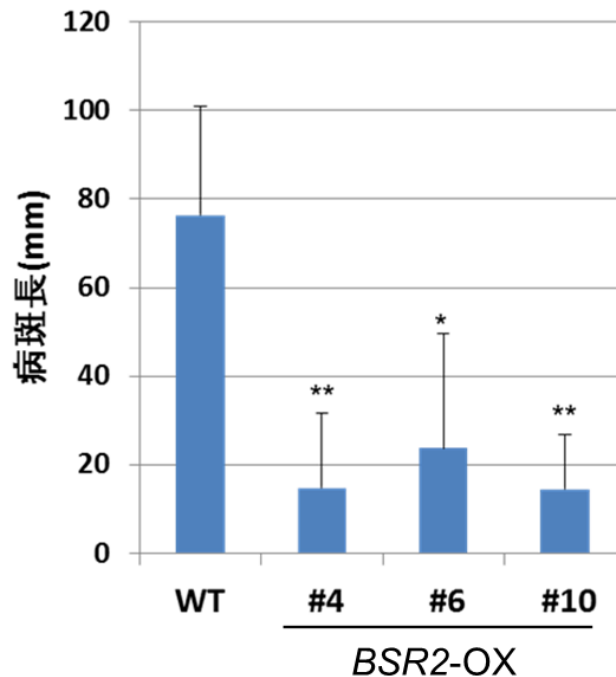


図5 BSR2高発現イネにおける紋枯病抵抗性
*, **: WTと比較してそれぞれ5%, 1%水準で有意差あり

3) 成果活用における留意点

BSR1高発現コムギについては現段階で生育への影響は認められないが、実用化に際してはもっと詳細に調査する必要がある。BSR1導入サトウキビについても、発現レベルが中程度の系統では現段階で生育への影響は認められないが、実用化に際してはもっと詳細に調査する必要がある。BSR1発現イネを実用的に使用する場合は、培養変異に由来する劣性形質出現の可能性を最小化するために、戻し交配を行うことが望ましい。ZmUbiプロモーターでBSR2を高発現したイネは稔性が低下するので、実用化の際はプロモーターを改良する必要がある。

本プロジェクト外の成果として、BSR2高発現トマトが斑葉細菌病、青枯病、リゾクトニア病に抵抗性を示すこと、BSR2高発現トレンシアが灰色かび病抵抗性を示すこと、を最近明らかにしている。BSR2の利用に際しては、現段階では花卉や果樹など稔性低下があまり問題にならない作物への導入が最も現実的だと考えられる。

4) 今後の課題

BSR1やBSR2の高発現が、今回明らかにした作物-病気の組合せ以外の作物-病気でも抵抗性を付与できるかどうか興味深い。BSR1の抵抗性機構については、上流のキチン受容体と相互作用するのか、下流のどのタンパク質をリン酸化するのかなどについて解明する必要がある。BSR2の抵抗性機構については未知なので、明らかにする必要がある。

「作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13406017

研究期間：平成25～29年度

中課題名：作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発(GMO)

小課題番号：GMO1006b

研究期間：平成25～26年度

小課題名：誘導抵抗性機構の改変による高度病害抵抗性導入技術の開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農業生物資源研究所・遺伝子組換え研究センター・耐病性作物研究開発ユニット・高辻博志

1) 研究目的

低温によってイネの病害抵抗性が弱まることが知られている。この現象がWRKY45を介した誘導抵抗性の抑制によることを証明し、その分子機構を明らかにするとともに、冷害などに伴うイネの生育期間中の低温によっていもち病などのイネの病害による被害が拡大するのを防ぐ手段の開発を図る。

2) 研究成果

研究方法

(ア) 低温が誘導抵抗性を低下させる分子機構の解明とその対策の開発

a WRKY45をリン酸化するMAPキナーゼカスケードを同定するには、*in vitro*においてイネのMAPキナーゼとMAPキナーゼキナーゼの組み合わせを変えてWRKY45をリン酸化する活性を解析した。

b WRKY45の翻訳後修飾がWRKY45の活性に及ぼす影響を解析するため、*in vitro*リン酸化反応によってWRKY45のリン酸化部位を特定するとともに、リン酸化部位のアミノ酸変異を導入した形質転換イネを作製し、解析した。

c 脱リン酸化によりMAPキナーゼを不活性化する酵素を同定するには、イネのゲノムにコードされている二つのタンパク質チロシン脱リン酸化酵素 (OsPTP) の遺伝子に着目し、RNAi法によるOsPTP 1 および 2 の二重ノックダウンイネの作製および大腸菌で発現させたリコンビナントOsPTPを用いて*in vitro*脱リン酸化反応を行った。

d OsPTP1/2ノックダウンイネにおいて、低温や高塩濃度がベンゾチアジアゾールによる誘導抵抗性におよぼす影響を調査した。

研究結果

(ア) *in vitro*リン酸化反応により、WRKY45のリン酸化はOsMKK10-2およびOsMPK6を含むMAPキナーゼカスケードによって行われることを明らかにした。

(イ) OsMKK10-2-OsMPK6によるリン酸化部位はアミノ酸266-326位の間が存在していた。この範囲中の5カ所のリン酸化候補部位 (T266、T269、S294、S295、S299) をそれぞれアラニンに置換し、リン酸化実験を行った結果、T266、S294、S299の3カ所がOsMKK10-2-OsMPK6によるリン酸化部位であることがわかった (図1)。

(ウ) リン酸化によってWRKY45の活性がどのように変化するかを調べるため、野生型または変異型WRKY45のMBP融合タンパクを用いてイネ葉鞘でのレポーター実験を行った結果、3アミノ酸ともアスパラギン (N) に置換したNNN型は野生型より低い転写活性を示し、疑似リン酸化であるアスパラギン酸 (D) に置換したDDD型は野生型より高い転写活性を示した。このことから、WRKY45はリン酸化によって転写活性が高まることが示された (図2A)。さ

らに、S294およびS299のみをD置換した変異体は野生型より高い活性を示したが、T266をD置換した変異体は野生型よりむしろ弱い活性を示した（図2B）。

（エ） 各アミノ酸をNまたはDに置換した変異WRKY45を過剰発現した形質転換イネの作製を試みたところ、S294またはS299をDに置換した場合、形質転換体が得られなかった。一方、これら2つのアミノ酸をNに置換した場合は、いもち病抵抗性が野生型WRKY45を過剰発現した場合より弱く、ベクターコントロールと同等であった（図3）。このことはS294またはS299、またはその両者のリン酸化によってWRKY45が恒常的に活性化し、それがイネの致死をもたらすことを示唆している。

（オ） 野生型イネに抵抗性誘導剤（BTH）処理すると、接種したいもち病菌の増殖が無処理の場合の1/100程度に低減する。しかし、アブシジン酸（ABA）を前処理した後にBTH処理してもいもち病菌の増殖はほとんど低減しなかった（図4）。また、ABA処理の代わりに低温（15℃）や高塩濃度（250 mM NaCl）処理しても同様にいもち病菌の増殖は低減しなかった（図4）。これらの結果は、低温や高塩濃度により、ABAシグナル伝達を介してBTHによる誘導抵抗性が抑制されていることを示唆している。一方、OsPTPノックダウンイネにおいては、ABA、低温、高塩濃度いずれの場合にも、BTH処理によっていもち病菌の増殖が顕著に低減した（図4）。

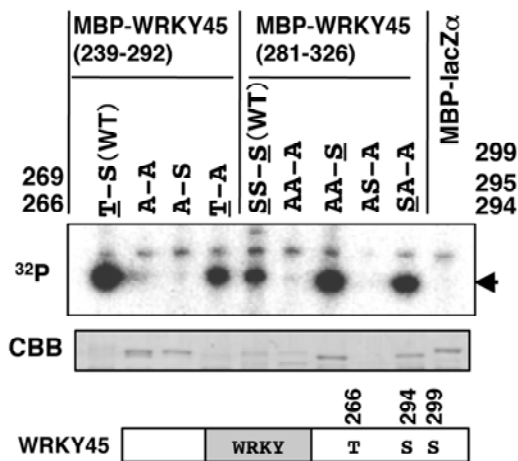
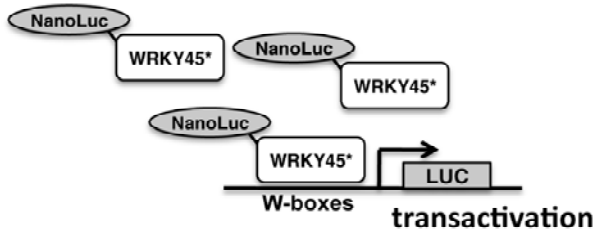
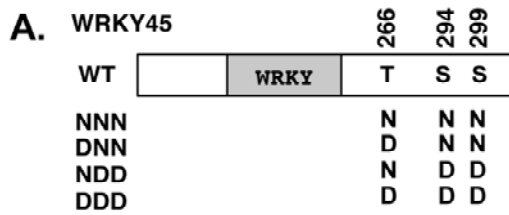


図1. OsMPK6によるWRKY45中のリン酸化部位の決定。リン酸化候補領域を2つのペプチド領域(239-292および281-326)に分け、それぞれに変異を導入した。これらをOsMKK10-2および $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とともにインキュベートし(詳細は本文)、 ^{32}P の取り込みを調べてリン酸化部位(T266、T294、T299)を決定した。



WRKY45*: WRKY45 WT or mutants
 Specific activity= LUC /NanoLuc activities

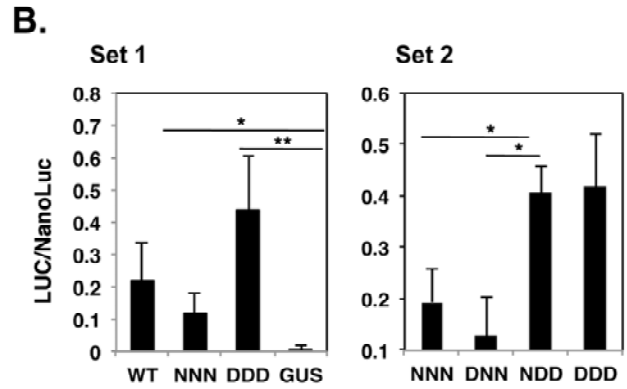


図2. WRKY45はリン酸化により活性化される。

A. WRKY45のリン酸化部位およびそれらの変異体(上)。レポーターアッセイの模式図(下)。

B. 野生型(WT)または変異型のWRKY45-Nanolucエフェクター遺伝子をW-box-LUCレポーター遺伝子とともにイネ葉身に導入し、インキュベーション後、trans-activationによるルシフェラーゼ活性を測定した。

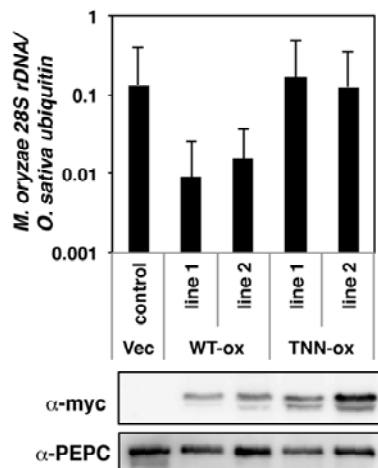


図3. WRKY45リン酸化部位変異によるいもち病抵抗性の低下
 唯一個体が得られたWRKY45変異体の過剰発現イネ(TNN-ox)と野生型WRKY45の過剰発現イネ(WT-ox)についていもち病抵抗性検定を行った。
 下二つのパネルは、ウエスタンブロットによる各タンパク質の発現量。

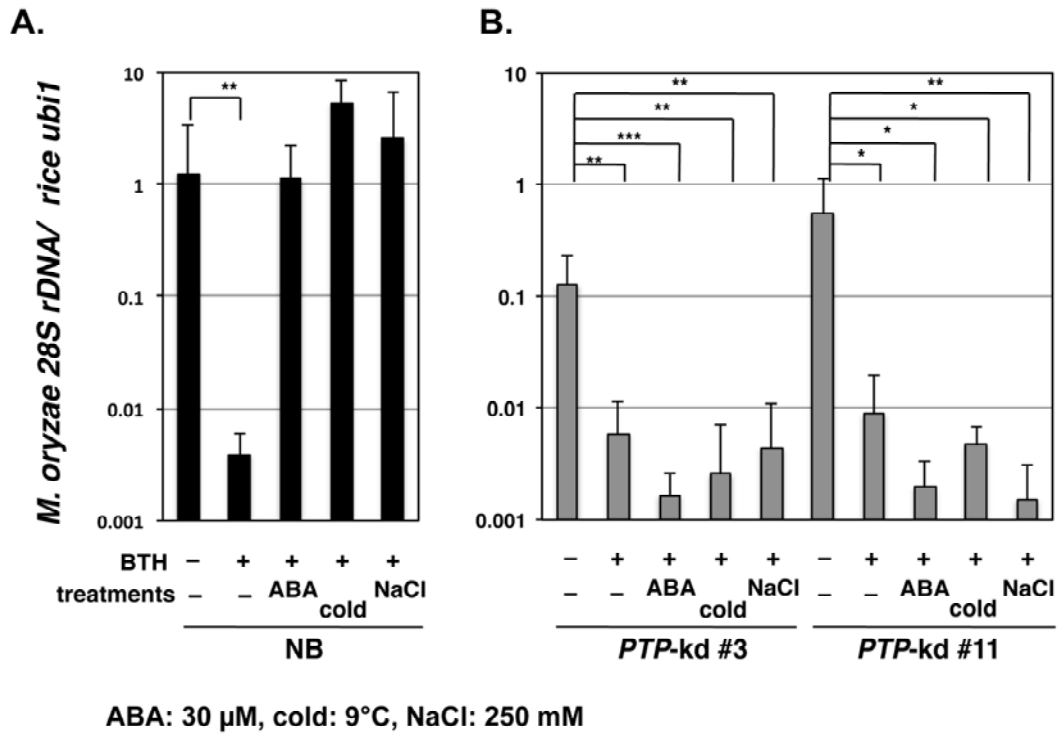


図4. 高塩濃度によるBTH作用の抑制とそれを制御するPTPの役割
 A. 日本晴(NB)イネにBTH処理した後、ABA、低温、高塩濃度(250 mM)処理を行い、いもち病抵抗性検定を行った。
 B. 2系統の*OsPTP*ノックダウン(*PTP-kd*)イネにA.と同様の処理を行った後、いもち病抵抗性検定を行った。

得られた結果から、以下のようなモデルが成り立つ。抵抗性誘導剤により、0sMKK10-2-0sMPK6カスケードを介したWRKY45のリン酸化によってWRKY45が活性化していもち病抵抗性になる(図5A)。低温および高塩濃度は、ABAシグナル伝達を介して0sPTP1/2を活性化し、0sMPK6をチロシン脱リン酸化して不活性化する(図5B)。0sPTP1/2ノックダウンイネでは、ABA処理や低温、高塩濃度条件下でもBTH処理により強いいもち病抵抗性が誘導される(図5C)。

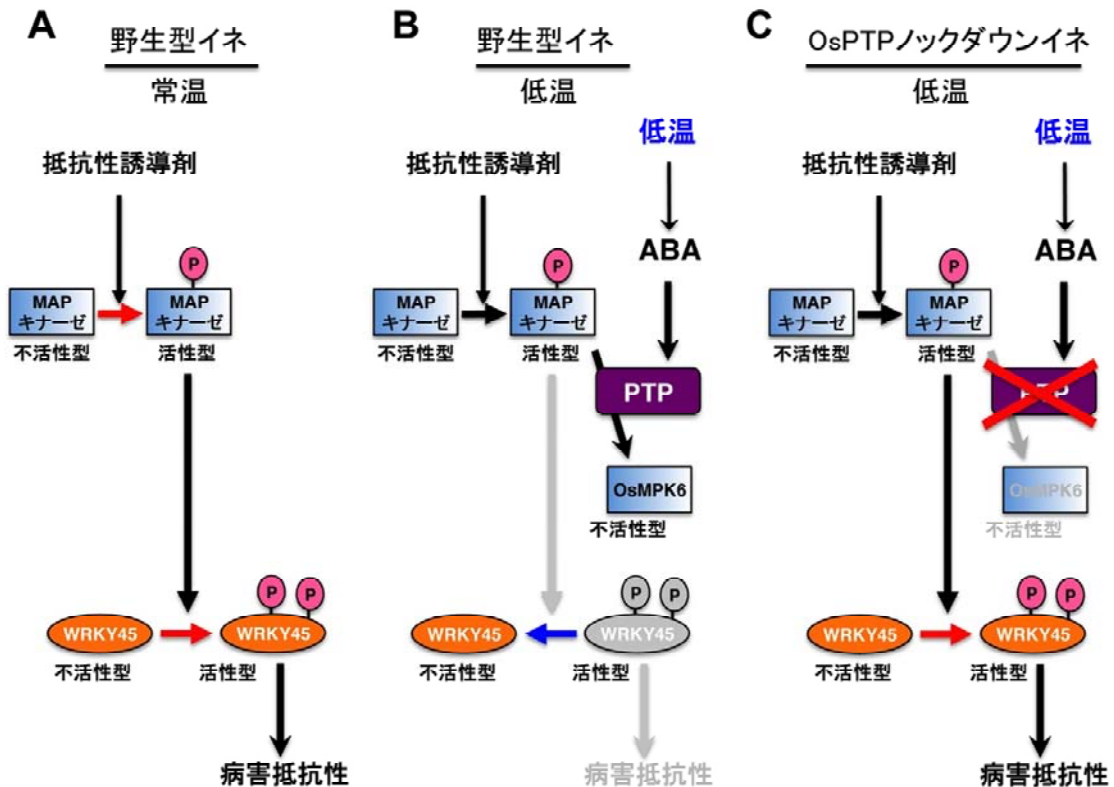


図5. 低温による(誘導)病害抵抗性の低下とPTPノックダウンによるその防止

- 常温の普通のイネでは、抵抗性誘導剤によってMAPキナーゼがリン酸化されて活性化し、活性型のMAPキナーゼによってWRKY45がリン酸化されて活性型になって病害抵抗性になる。
- 低温の普通のイネでは、MAPキナーゼがPTPによって脱リン酸化されて不活性化し、結果、WRKY45が活性型にならないので病害抵抗性にならない。
- PTPノックダウンイネでは、低温でもMAPキナーゼが脱リン酸化されず、活性型のMAPキナーゼによってWRKY45がリン酸化されて活性型になって病害抵抗性になる。

3) 成果活用における留意点

OsPTP1/2を抑制することにより、冷害時の低温条件などでも抵抗性誘導剤が強いもち病抵抗性を発揮し、冷害時のもち病被害の拡大を予防できることが期待される。本研究で得られた成果については、知的財産化することにより、研究成果を管理・活用する。

4) 今後の課題

CRISPR/CAS9などのゲノム編集により、OsPTP1または2、またはその両者を破壊したイネ系統を作成し、低温下でも強いもち病抵抗性が誘導できるかを検証する。

「作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13406017

研究期間：平成25～29年度

中課題名：作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発(GMO)

小課題番号：GMO1006c

研究期間：平成25～26年度

小課題名：マメ科植物における共生窒素固定に関わる根粒菌応答ネットワークの解明と他作物における遺伝子機能の検証

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農業生物資源研究所・植物科学研究領域・植物共生機構研究ユニット・下田宜司

1) 研究目的

イネ等主要作物における窒素施肥を低減するために、マメ科植物において進化的に獲得された根粒菌による共生的窒素固定を、イネ等の非マメ科植物で実現する手法の確立を目指す。本研究課題ではその端緒として、根粒菌の認識と共生器官である根粒の形成につながる皮層細胞分裂を誘導するために必要なマメ科遺伝子を同定し、その機能解析を行う。同定したマメ科遺伝子については、イネ等の作物に導入し、形質を評価することによって共生遺伝子の機能性を検証する

2) 研究成果

研究方法

(ア) 根粒菌が分泌する共生シグナル (Nodファクター) の受容とその後のシグナル伝達に関わる遺伝子を同定するため、ミヤコグサにおいてNodファクター受容体NFR1と相互作用する因子を酵母ツーハイブリッド法により探索した。

(イ) 根粒形成に関わる遺伝子をミヤコグサにおいて同定するため、皮層細胞分裂を制御する転写因子NINによって発現誘導を受ける遺伝子の探索を行った。

(ウ) 非マメ科植物における共生応答誘導の有無を評価する指標を確立するため、マメ科植物の遺伝子発現データを利用し、共生応答のマーカー遺伝子の探索を行った。

(エ) マメ科共生遺伝子の非マメ科植物における機能性を評価するため、ミヤコグサのNFR1およびNIN遺伝子を導入したイネを作出し、遺伝子発現に基づく評価を行った。

研究結果

(ア) 根粒菌の感染シグナル受容体NFR1の相互作用因子の同定と機能解析

ミヤコグサNFR1の細胞内キナーゼドメインをベイトにした酵母ツーハイブリッドライブラリースクリーニングにより、NFR1と相互作用する因子としてTriacylglycerol lipase (LjTGL)とAvr/Cf-9 rapidly elicited protein 76 (LjACRE76)を同定した(図1)。これらの因子について、RNAiによるノックダウンを行い、根粒共生への影響を調査したところ、LjTGLおよびLjACRE76のノックダウン根において着生根粒数が有意に減少することが分かった(図1)。一方、菌根菌の感染については、LjTGLおよびLjACRE76のノックダウンによる感染率の低下は認められなかった。またLjACRE76の細胞内局在をタバコの葉およびミヤコグサの根で解析したところ、いずれもNFR1同様、細胞膜での局在が見られた。さらに植物内でのNFR1との相互作用を確認するために、BiFCによる解析を行った。その結果、LjTGL、LjACRE76のいずれもタバコの葉の細胞膜においてNFR1との相互作用が見られた。

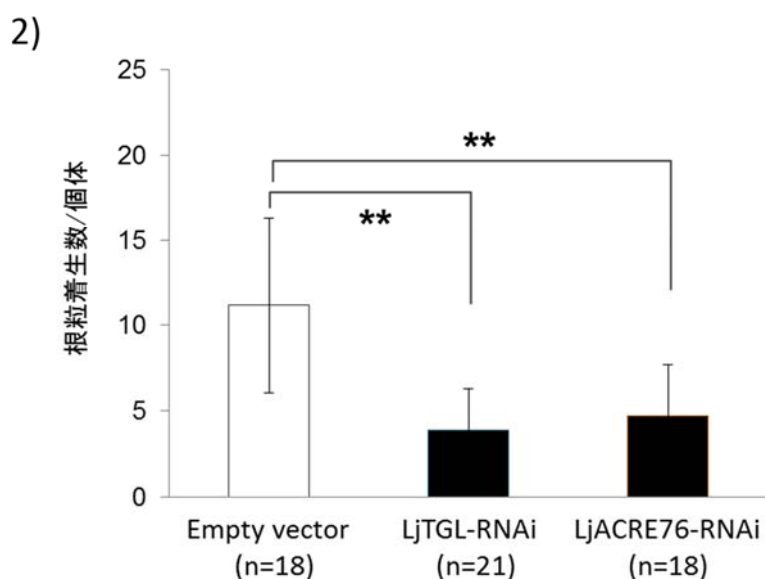
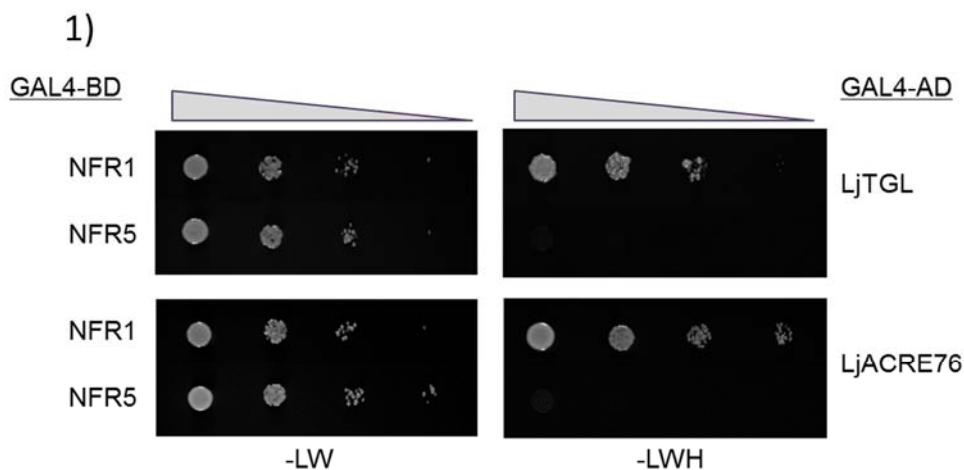


図1 NFR1相互作用因子の根粒着生への影響

1) LjACRE76およびLjTGLとNFR1の相互作用

-LWは非選択培地、-LWHは選択培地。

2) LjACRE76およびLjTGLノックダウン根における根粒着生数

nは解析個体数を表す。**P<0.0001。

(イ) 根粒特異的転写因子NINの下流で機能する遺伝子の同定および機能解析

a NINの下流で機能する遺伝子の網羅的同定

NINの下流で機能する遺伝子を網羅的に同定するため、DEX処理によるNINの人為的発現誘導系を構築し、NIN依存的に発現誘導される遺伝子をミヤコグサのオリゴアレイを用いて探索した。その結果、NINの直接のターゲットと考えられる34の候補遺伝子を比定した。比定した候補遺伝子には既知の下流因子 (NF-YA1) 1)や根粒菌感染に応答して発現が誘導されるノジュリン遺伝子等が含まれていた。またNINの下流因子として比定した候補遺伝子について、ノックアウトタグラインを用いて根粒共生表現型を解析した。その結果、MtN24-like proteinのタグラインにおいて根粒形成数の減少が認められた(図2)

b NINの下流で機能するNF-YA1の機能解析

NINの下流で機能する因子として、細胞分裂の制御に関わる転写因子であるNF-YA1およびNF-YB1を同定している。そこでNF-YA1の根粒形成への関与をより明確にするため、NF-YA1のノックアウトタグラインを用いて、根粒形成表現型を確認した。その結果、エクソンに挿入が見られる3つのタグラインはいずれも成熟根粒が形成されなかった。さらにNF-YA1が根粒形成のどの過程に関与するかを明らかにするために、NF-YA1のタグラインにおいて、根粒菌接種後の表現型を経時的に解析した。その結果、感染糸の形成はいずれのタグラインも野生型とほぼ同等であった。一方、根粒の発達については、いずれのタグラインも、多数の根粒原基が形成されるものの、成熟根粒への発達が野生型に比べて顕著に低下することが分かった(図3)。以上のことからNF-YA1は根粒原基から成熟根粒への発達の段階に関与する事が分かった。

c NF-Yサブユニットの同定

NF-Yは、A、B、Cの3つのサブユニットが複合体を形成し機能する²⁾。これまでミヤコグサにおいてNINの下流で機能するNF-YA1およびNF-YB1については同定されていたが、それらと複合体を形成するNF-YCについては未同定であった。そこで根粒形成過程で機能すると考えられるインゲンのNF-YC3)の情報をもとに、ゲノムのシンテニーを利用して該当するミヤコグサのNF-YC1を特定した。特定したNF-YC1について、NF-YA1、NF-YB1との植物体内での相互作用をBiFC法により確認した結果、今回特定したNF-YC1はNF-YA1およびNF-YB1と核において相互作用することが分かった(図4)。さらにNF-YC遺伝子の発現をプロモーター-GUSより解析したところ、NF-YA1、NF-YB1と同様、NF-YC1も根粒原基での発現が認められた(図4)。今回NF-YC1を同定したことにより、NINの下流で機能するNF-Y複合体の全サブユニットを明らかにできたと考えられる。

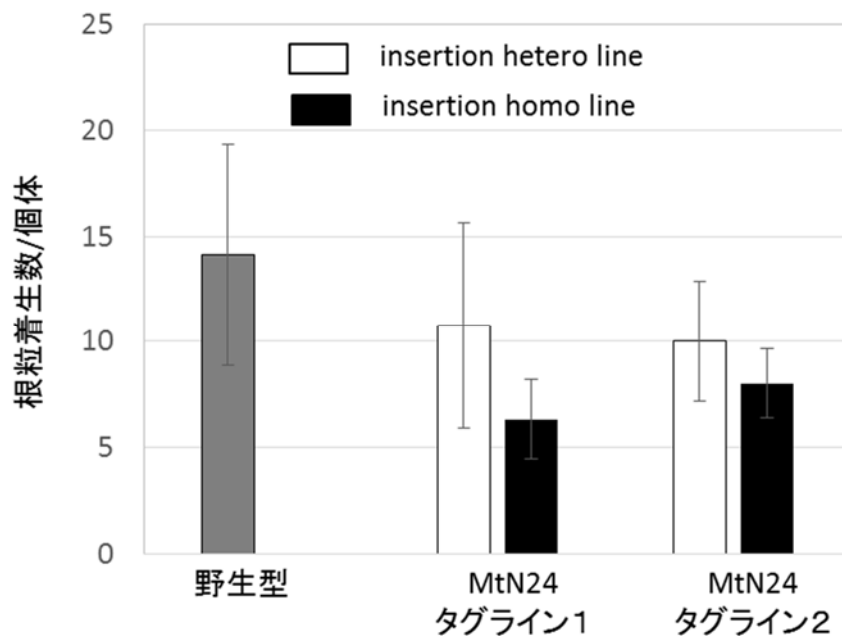
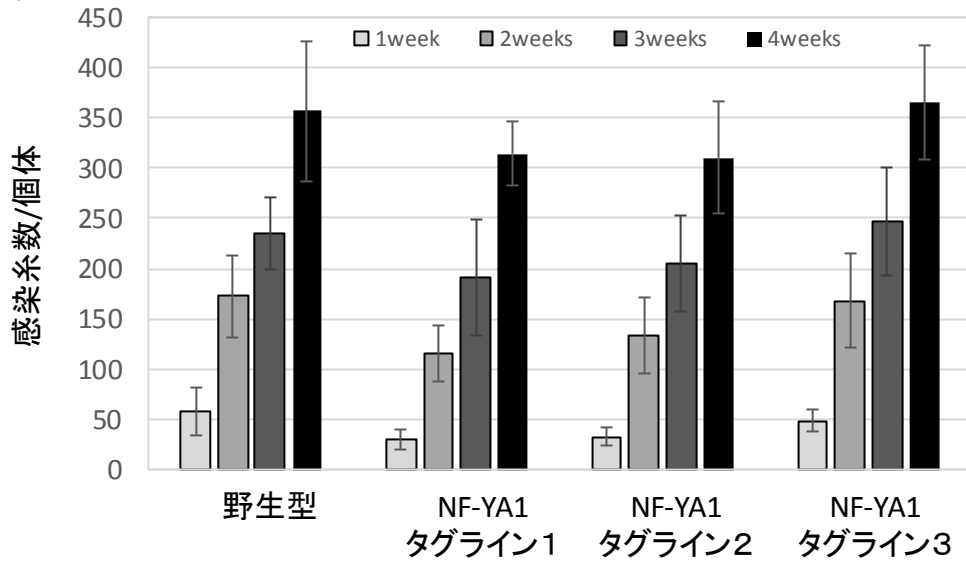


図2 MtN24-like proteinのタグラインにおける根粒着生数

1)



2)

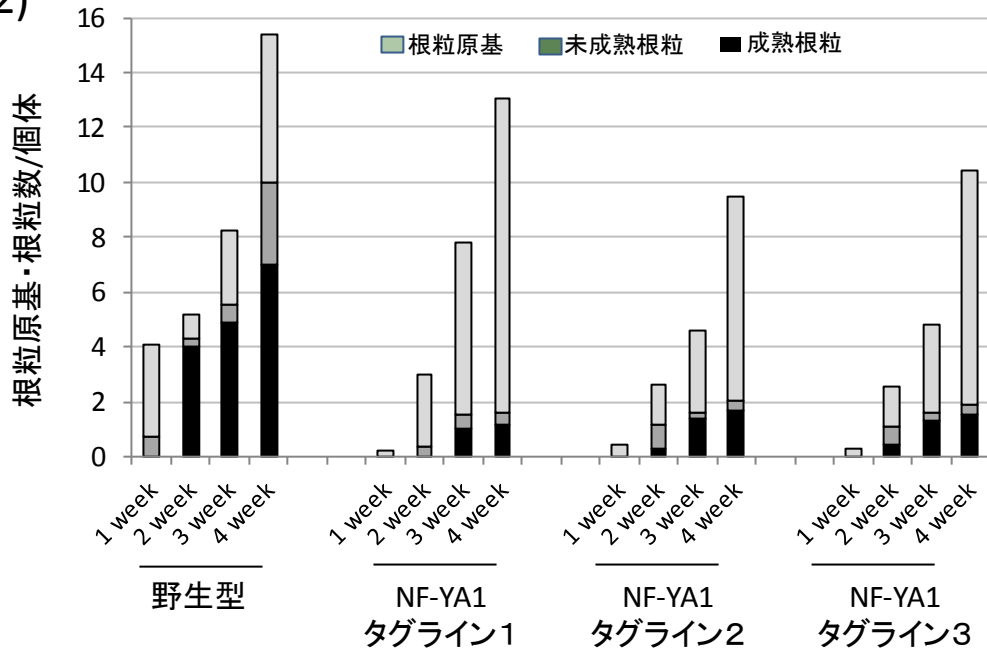


図3 NF-YA1ノックアウトタグラインの根粒共生表現型

- 1) NF-YA1タグラインにおける感染糸形成数
- 2) NF-YA1タグラインにおける根粒形成数

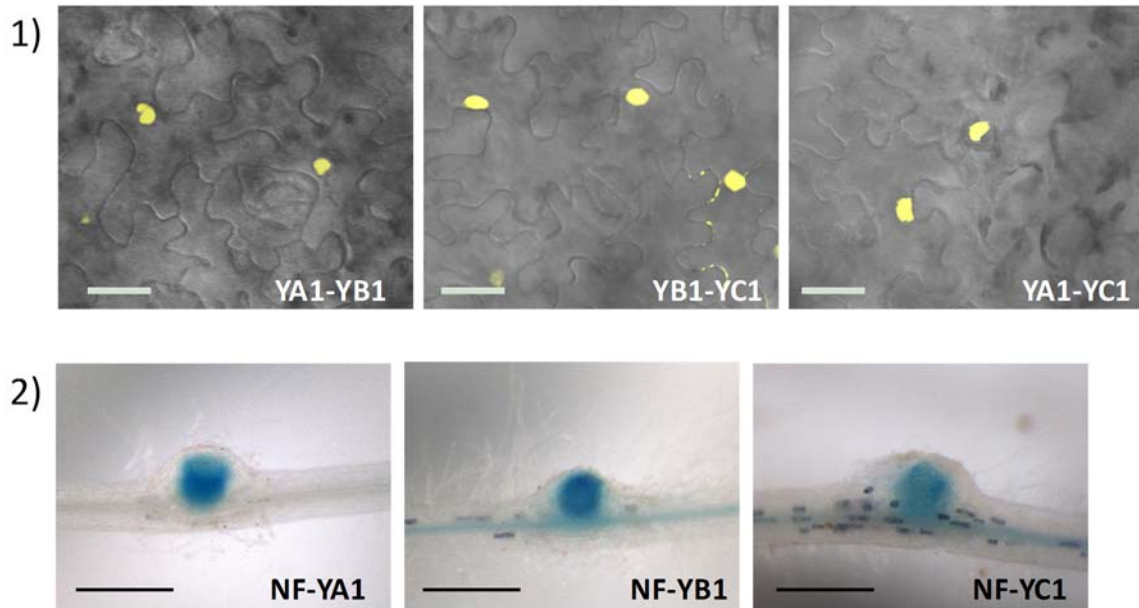


図4 NF-Yサブユニットの相互作用および遺伝子発現

- 1) BiFCによるNF-Yサブユニット間の相互作用
- 2) プロモーター-GUSによるNF-Yサブユニットの根粒原基での発現

(ウ) 根粒共生応答の指標となるマーカー遺伝子の探索

共生応答のマーカーとなる遺伝子を探索するため、ミヤコグサの遺伝子発現データベースの情報を利用し、根粒菌の感染シグナル(Nodファクター)に反応し、根粒および菌根共生の変異体(ccamk変異体)では発現が誘導されないものを選抜した結果、12のマーカー遺伝子候補を得た。そのうち、ML0(chr1.CM0113.1360.r2.d)とO-methyltransferase(LjT36E16.130.r2.d)の2つにおいてリアルタイムPCRによる発現の再現性が確認できた(図5)。さらに遺伝子発現データベースの情報をもとに、ミヤコグサおよびタルウマゴヤシの両植物においてNodファクター処理により共通して誘導される105の遺伝子を比定した。最終的にML0とO-methyltransferaseを含む107遺伝子を共生応答のマーカー遺伝子候補とした。

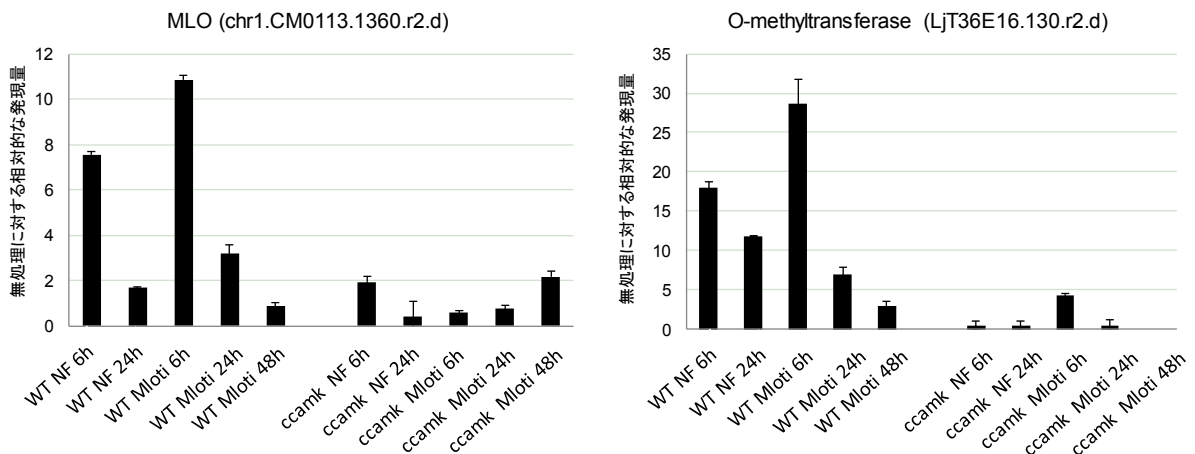


図5 共生応答マーカー遺伝子の発現

Nodファクター処理 (NF) および根粒菌接種 (Mloti) によるML0とO-methyltransferaseの遺伝子発現。WTは野生型、ccamkは共生変異体。

(エ) マメ科共生遺伝子のイネにおける機能性評価

a ミヤコグサNFR受容体のイネにおける機能性評価

Nodファクター受容体NFRのイネにおける機能性を評価するため、ミヤコグサのNFR1およびNFR5を導入した形質転換イネを作成し、Nodファクター処理後の遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。上記の(ウ)で選抜した107の共生応答のマーカー遺伝子のうち、97遺伝子についてイネにオルソログが見いだされ、そのうち7遺伝子がNodファクター処理により発現が誘導されることが分かった。

b ミヤコグサNIN遺伝子のイネにおける機能性評価

根粒形成を制御する転写因子であるミヤコグサのNIN遺伝子のイネにおける機能性を評価するため、NINを過剰発現するイネを作出し、根における遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。アレイ解析にはNINの発現量が異なる4系統を用いた。その結果、窒素の代謝に関わると考えられる遺伝子 (NIR1、NRT2. 1、NRT2. 2、NIA1, 2) の発現が顕著に上昇している事が分かった。しかしながら、根粒共生においてNINにより誘導されるミヤコグサ遺伝子のイネオルソログは発現誘導されていなかった(表1)。

| Annoation | Lotus gene ID | Rice gene ID | Rice NIN形質転換体での発現 | | | |
|---|-----------------------|--------------|-------------------|------|------|-------|
| | | | H21 | O59 | O64 | H16 |
| Nitrite reductase (NIR1) | chr4.CM0227.280.r2.d | Os01g0357100 | 2.09 | 2.30 | 1.53 | 9.45 |
| | | Os02g0765900 | 2.14 | 2.23 | 1.40 | 9.52 |
| Nitrate transporter (NRT2.1) | chr3.CM0649.40.r2.d | Os02g0112100 | 0.26 | 2.25 | 3.06 | 59.48 |
| Nitrate transporter (NRT2.2) | chr3.CM0649.30.r2.d | Os02g0112600 | 0.76 | 1.68 | 1.59 | 32.57 |
| Nitrate reductase (NIA1, NIA2) | LjT01E03.110.r2.m | Os01g0357100 | 2.09 | 2.30 | 1.53 | 9.45 |
| | | Os02g0765900 | 2.14 | 2.23 | 1.40 | 9.52 |
| | | Os08g0468100 | 1.05 | 1.44 | 1.03 | 8.21 |
| | | Os08g0468700 | 1.25 | 1.40 | 1.10 | 10.07 |
| | | Os02g0770800 | 1.83 | 1.13 | 1.10 | 78.20 |
| O-methyltransferase | chr1.LjT11G20.60.r2.d | Os04g0175900 | 1.47 | 0.17 | 0.79 | 0.03 |
| | | Os08g0157500 | 0.55 | 0.70 | 0.86 | 0.96 |
| NF-YA1 | chr5.CM0571.340.r2.m | Os12g0618600 | 0.92 | 0.74 | 0.51 | 1.28 |
| | | Os03g0696300 | 0.77 | 0.68 | 0.66 | 1.08 |
| | | Os02g0776400 | 0.65 | 0.92 | 0.51 | 6.21 |
| Protease inhibitor serpin family protein | chr4.CM0333.220.r2.m | Os03g0610800 | 2.03 | 1.10 | 0.81 | 0.65 |
| | | Os11g0222200 | 1.60 | 1.67 | 1.55 | 0.75 |
| | | Os01g0765400 | 0.89 | 1.17 | 0.85 | 4.83 |
| Unknown Protein (Cys-rich protein) | chr1.CM0192.400.r2.d | Os02g0579800 | 1.35 | 0.88 | 0.72 | 0.76 |
| | | Os03g0830400 | 3.23 | 1.51 | 0.62 | 1.82 |
| | | Os04g0461600 | 0.66 | 0.40 | 0.67 | 1.04 |
| 4-coumarate-coa ligase/AMP dependent CoA ligase | chr2.CM0020.270.r2.m | Os03g0132000 | 0.93 | 1.04 | 1.23 | 0.62 |
| | | Os01g0901600 | 0.81 | 0.66 | 0.74 | 1.20 |
| MYB transcription factor MYB94/ATMYB4-like | chr5.CM0148.610.r2.a | Os04g0532800 | 0.62 | 0.72 | 0.95 | 0.46 |
| Inorganic pyrophosphatase | chr3.CM0208.500.r2.m | Os04g0687100 | 0.89 | 1.05 | 1.04 | 0.85 |

表1 ミヤコグサNINを導入したイネにおける遺伝子発現

NINによって発現誘導されるミヤコグサ遺伝子のイネオルソログの遺伝子発現。グレーは2倍以上の発現上昇をしたものを示す。

3) 成果活用における留意点

ミヤコグサ共生遺伝子をイネに導入する際に、導入遺伝子によっては形質転換体が得

られない、あるいは得られても生育阻害や不稔になる場合がある。導入する遺伝子や機能性（変異導入の有無や領域など）、および使用するプロモーターをその都度検討する必要がある、時間を要する。

4) 今後の課題

(ア) ミヤコグサ共生遺伝子をイネで過剰発現すると、形質転換カサの再分化や植物体の生育および種子の発芽率が悪くなる傾向があるため、形質転換に用いるプロモーターを検討する必要がある。

(イ) 共生遺伝子の機能性を評価する上で、マメ科遺伝子と非マメ科遺伝子の間でのオルソログの明確な対応づけができる手法を確立する必要がある。

| 課題番号 | 学術論文 | | 学会等発表(口頭またはポスター) | | 出版図書 | 国内特許権等 | | 国際特許権等 | | 報道件数 | 普及しうる成果 | 発表会の主催(シンポジウム・セミナー) | アウトリーチ活動 |
|----------|------|----|------------------|----|------|--------|----|--------|----|------|---------|---------------------|----------|
| | 和文 | 欧文 | 国内 | 国際 | | 出願 | 取得 | 出願 | 取得 | | | | |
| 13406017 | 1 | 25 | 32 | 15 | 1 | 3 | 2 | 3 | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 |

(1)学術論文

区分: ①原著論文、②その他論文

| 整理番号 | 区分 | 機関名 | タイトル | 著者 | 掲載誌 | 巻(号) | 掲載ページ | 発行年 | 発行月 |
|------|----|-----------|---|--|--------------------------|-----------|-----------|------|-----|
| 1 | ② | 農業生物資源研究所 | The coincidence of critical day length recognition for florigen gene expression and floral transition under long-day conditions in rice | H. Itoh, T. Izawa | Mol Plant | 6(3) | 635-649 | 2013 | 5 |
| 2 | ① | 農業生物資源研究所 | Blast resistance of CC-NB-LRR protein Pb1 is mediated by WRKY45 through protein-protein interaction | H. Inoue, N. Hayashi, A. Matsushita, L. Xinqiong, A. Nakayama, S. Sugano, C. J. Jiang, H. Takatsuji | Proc Natl Acad Sci U S A | 110(23) | 9577-9582 | 2013 | 6 |
| 3 | ① | 農業生物資源研究所 | MAP kinases phosphorylate rice WRKY45 | Y. Ueno, R. Yoshida, M. Kishi-Kaboshi, A. Matsushita, C. J. Jiang, S. Goto, A. Takahashi, H. Hirochika, H. Takatsuji | Plant Signal Behav | 8(6) | e24510 | 2013 | 6 |
| 4 | ① | 農業生物資源研究所 | Genome-wide identification of WRKY45-regulated genes that mediate benzothiadiazole-induced defense responses in rice | A. Nakayama, S. Fukushima, S. Goto, A. Matsushita, M. Shimono, S. Sugano, C. J. Jiang, A. Akagi, M. Yamazaki, H. Inoue, H. Takatsuji | BMC Plant Biol | 13 | 150 | 2013 | 10 |
| 5 | ② | 農業生物資源研究所 | High-throughput analysis of rice genes by means of the heterologous full-length cDNA overexpressor (FOX)-hunting system | M. Higuchi-Takeuchi, M. Mori, M. Matsui | Int J Dev Biol | 57(6-7-8) | 517-523 | 2013 | 10 |

| | | | | | | | | | |
|----|---|--------------|--|---|--|---------|-------------|------|----|
| 6 | ① | 農業生物資源研究所 | WRKY76 is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance | N. Yokotani, Y. Sato, S. Tanabe, T. Chujo, T. Shimizu, K. Okada, H. Yamane, M. Shimono, S. Sugano, H. Takatsuji, H. Kaku, E. Minami, Y. Nishizawa | J Exp Bot | 64(16) | 5085-5097 | 2013 | 11 |
| 7 | ① | 京都大学 | In Planta Mutagenesis of Src Homology 3 Domain-like Fold of NdhS, a Ferredoxin-binding Subunit of the Chloroplast NADH Dehydrogenase-like Complex in Arabidopsis: A Conserved Arg193 Plays a Critical Role in Ferredoxin Binding | H. Yamamoto, T. Shikanai | J Biol Chem | 288(51) | 36328-36337 | 2013 | 12 |
| 8 | ② | 農業生物資源研究所 | Critical gates in day-length recognition to control the photoperiodic flowering | Osugi A, Izawa T | Adv Bot Res | 72(4) | 103-130 | 2014 | 1 |
| 9 | ① | 農業生物資源研究所 | Sites of action of elevated CO ₂ on leaf development in rice: discrimination between the effects of elevated CO ₂ and nitrogen deficiency | K. Tsutsumi, M. Konno, S. Miyazawa, M. Miyao | Plant Cell Physiol | 55(2) | 258-268 | 2014 | 2 |
| 10 | ② | 農業生物資源研究所 | Plant hormone crosstalks under biotic stresses. | Takatsuji H, Jiang C-J. | Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological applications | | 323-350 | 2014 | 3 |
| 11 | ① | 作物研究所, 名古屋大学 | Adventitious roots of wheat seedlings that emerge in oxygen-deficient conditions have increased root diameters with highly developed lysigenous aerenchyma | T. Yamauchi, F. Abe, K. Kawaguchi, A. Oyanagi, M. Nakazono | Plant Signal Behav | 9(3) | e28506 | 2014 | 4 |
| 12 | ① | 農業生物資源研究所 | Nocturnal phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in the leaves of hygrophytic C ₃ monocots | H. Fukayama, N. Fujiwara, T. Hatanaka, S. Misoo, M. Miyao | Biosci Biotechnol Biochem | 78(4) | 609-613 | 2014 | 4 |
| 13 | ② | 農業生物資源研究所 | 絶対的光周性花成と条件的光周性花成：短日植物イネを例に | 井澤毅 | 植物の生長調節 | 49(1) | 41-48 | 2014 | 5 |
| 14 | ① | 農業生物資源研究所 | Elevated CO ₂ decreases the Photorespiratory NH ₃ production but does not decrease the NH ₃ compensation point in rice leaves | S. Miyazawa, K. Hayashi, H. Nakamura, T. Hasegawa, M. Miyao | Plant Cell Physiol | 55(9) | 1582-1591 | 2014 | 9 |

| | | | | | | | | | |
|----|---|-----------|--|--|---------------------------|---------|-----------|------|----|
| 15 | ① | 農業生物資源研究所 | WRKY45-dependent priming of diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and the role of cytokinin in triggering the reaction | A. Akagi, S. Fukushima, K. Okada, C. J. Jiang, R. Yoshida, A. Nakayama, M. Shimono, S. Sugano, H. Yamane, H. Takatsuji | Plant Mol Biol | 86(1-2) | 171-183 | 2014 | 9 |
| 16 | | 名古屋大学, 他 | Microarray analysis of laser-microdissected tissues indicates the biosynthesis of suberin in the outer part of roots during formation of a barrier to radial oxygen loss in rice (<i>Oryza sativa</i>) | K. Shiono, T. Yamauchi, S. Yamazaki, B. Mohanty, A. I. Malik, Y. Nagamura, N. K. Nishizawa, N. Tsutsumi, T. D. Colmer, M. Nakazono | J Exp Bot | 65(17) | 4795-4806 | 2014 | 9 |
| 17 | ① | 名古屋大学 | Biochemical and molecular characterization of rice (<i>Oryza sativa</i> L.) roots forming a barrier to radial oxygen loss | K. Kulichikhin, T. Yamauchi, K. Watanabe, M. Nakazono | Plant Cell Environ | 37(10) | 2406-2420 | 2014 | 10 |
| 18 | ① | 名古屋大学, 他 | RCN1/OsABCG5, an ATP-binding cassette (ABC) transporter, is required for hypodermal suberization of roots in rice (<i>Oryza sativa</i>) | K. Shiono, M. Ando, S. Nishiuchi, H. Takahashi, K. Watanabe, M. Nakamura, Y. Matsuo, N. Yasuno, U. Yamanouchi, M. Fujimoto, H. Takanashi, K. Ranathunge, R. B. Franke, N. Shitan, N. K. Nishizawa, I. Takamura, M. Yano, N. Tsutsumi, L. Schreiber, K. Yazaki, | Plant J | 80(1) | 40-51 | 2014 | 10 |
| 19 | ① | 農業生物資源研究所 | Characterization and expression analyses of two plastidic enolase genes in rice | H. Fukayama, C. Masumoto, Y. Taniguchi, A. Baba-Kasai, Y. Katoh, H. Ohkawa, M. Miyao | Biosci Biotechnol Biochem | | 1-8 | 2014 | 11 |
| 20 | ② | 農業生物資源研究所 | Development of disease-resistant rice using regulatory components of induced disease resistance | H. Takatsuji | Front Plant Sci | 5 | 630 | 2014 | 11 |
| 21 | ① | 果樹研究所 | Construction of genetic linkage map and graphical genotyping of pseudo-backcrossed F2 (BC ' 2) progeny to introduce a CTV resistance from <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. into Citrus by introgression breeding | S. Ohta, T. Endo, T. Shimada, H. Fujii, T. Shimizu, M. Kita, T. Kuniga, T. Yoshioka, H. Nesumi, T. Yoshida, M. | Tree Genetics & Genomes | 11(1) | 797 | 2015 | 2 |
| 22 | ① | 農業生物資源研究所 | Comparison of Plant-Type Phosphoenolpyruvate Carboxylases from Rice: Identification of Two Plant-Specific Regulatory Regions of the Allosteric Enzyme | M. Muramatsu, R. Suzuki, T. Yamazaki, M. Miyao | Plant Cell Physiol | 56(3) | 468-480 | 2015 | 3 |

| | | | | | | | | | |
|----|---|-----------------|---|--|---|---------|-----------|------|---|
| 23 | ① | 農業生物資源研究所 | Development of disease-resistant rice by optimized expression of WRKY45 | S. Goto, F. Sasakura-Shimoda, M. Suetsugu, M. G. Selvaraj, N. Hayashi, M. Yamazaki, M. Ishitani, M. Shimono, S. Sugano, A. Matsushita, T. Tanabata, H. Takatsuji | Plant Biotechnol J | 13(6) | 753-765 | 2015 | 8 |
| 24 | ① | 京都大学 | Role of cyclic electron transport around photosystem I in regulating proton motive force | C. Wang, H. Yamamoto, T. Shikanai | Biochim Biophys Acta | 1847(9) | 931-938 | 2015 | 9 |
| 25 | ① | 農研機構 | Overexpression of BSR1 confers broad-spectrum resistance against two bacterial diseases and two major fungal diseases in rice | Maeda S, Hayashi N, Sasaya T, Mori M | Breed. Sci. | 66(3) | 396-406 | 2016 | 6 |
| 26 | ① | 農研機構・生物機能利用研究部門 | The receptor-like cytoplasmic kinase BSR1 mediates chitin-induced defense signaling in rice cells | Yasukazu Kanda, Naoki Yokotani, Satoru Maeda, Yoko Nishizawa, Takashi Kamakura & Masaki Mori | Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry | 81(8) | 1497-1502 | #### | 8 |

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

| 整理番号 | タイトル | 発表者名 | 機関名 | 学会等名 | 発行年 | 発行月 |
|------|---|---|-----------|---|------|-----|
| 1 | A cytoplasmic kinase gene provides resistance against major bacterial and fungal pathogens in Arabidopsis and rice | Maeda S, Sugano S, Dubouzet J.G, Yokotani N, Jiang C.J, Oda K, Matsui M, Hirochika H, Takatsuji H, Mori M | 農業生物資源研究所 | 10th International Congress of Plant Pathology, Book of Abstracts | 2013 | 8 |
| 2 | Comparison of five plant-type phosphoenolpyruvate carboxylases from rice and identification of amino acid residues involved in the substrate affinity | Muramatsu M, Suzuki R, Yamazaki T, Miyao M | 農業生物資源研究所 | The 16th International Congress on Photosynthesis Research | 2013 | 8 |

| | | | | | | |
|---|--|--|-----------|---|------|----|
| 3 | Searching for and analysis of candidate genes involved in suberin biosynthesis in rice. | S Nishiuchi, K Watanabe, K Shiono, Tsuchida-Mayama T, N Mitsuda, M Ohme-Takagi, H. Ichikawa, M. Nakazono | 名古屋大学 | International Symposium on Plant Apoplastic Diffusion Barriers: Biosynthesis and Functions, Book of Abstracts | 2013 | 9 |
| 4 | ミヤコグサの根粒着生に関するNod factor受容体の新規相互作用因子の同定 | 山崎 明広, 下田 宜司, 林 誠 | 農業生物資源研究所 | 第23回植物微生物研究会研究 交流会要旨集 | 2013 | 9 |
| 5 | A novel interactor of nod factor receptor affects the nodulation phenotype of Lotus japonicus | 山崎 明広, 下田 宜司, 林 誠 | 農業生物資源研究所 | 18th International Congress on Nitrogen Fixation, Book of Abstract | 2013 | 10 |
| 6 | Development of disease resistant rice using WRKY45, a key transcription factor of rice defense mechanism | Takatsuji H | 農業生物資源研究所 | MARCO-FFTC Joint International Workshop 2013 on Benefits and Risks of Genetically Modified Food Crops in Asia | 2013 | 10 |
| 7 | Expression analysis of genes involved in suberin biosynthesis in rice root under stagnant deoxygenated conditions. | K Watanabe, S. Nishiuchi, M. Nakazono | 名古屋大学 | 11th Conference of International Society for Plant Anaerobiosis, Book of Abstracts | 2013 | 10 |
| 8 | Role of the NAC transcriptional factor OsNAC34 in formation of a barrier to radial oxygen loss in rice. | S Nishiuchi, K Watanabe, K Shiono, Tsuchida-Mayama T, N Mitsuda, M Ohme-Takagi, H. Ichikawa, M. Nakazono | 名古屋大学 | 11th Conference of International Society for Plant Anaerobiosis, Book of Abstracts | 2013 | 10 |

| | | | | | | |
|----|---|---|------------------|---|------|----|
| 9 | Transcriptional regulation by NIN for nodulation in legume | 林 誠, 征矢野 敬 | 農業生物資源研究所 | 18th International Congress on Nitrogen Fixation, Book of Abstract | 2013 | 10 |
| 10 | イネの複合病害抵抗性遺伝子BSR1による非常に広範な病害に対する抵抗性の付与 | 前田哲, 林長生, 森昌樹 | 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第124回講演会 講演要旨集 育種学研究 | 2013 | 10 |
| 11 | タペート組織特異的なbarnase発現による優性の雄性不稔イネ後代の解析 | 大嶋雅夫, 阿部清美, 奥崎文子, 田中淳一, 谷口洋二郎, 廣瀬文昭, 津田麻衣, 田部井豊 | 作物研究所, 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第124回講演会 講演要旨集 育種学研究 | 2013 | 10 |
| 12 | 複合病害抵抗性遺伝子組換えイネの開発 I.隔離ほ場栽培のための承認手続他 | 山崎宗郎, 後藤新悟, 高辻博志 | 農業生物資源研究所, 果樹研究所 | 育種学研究 | 2013 | 10 |
| 13 | Ammonium assimilation in the root of rice plants: comparison between water and soil cultures | Miyazawa S-I, Konno M, Muramatsu M, Miyao M | 農業生物資源研究所 | Second International Symposium on the Nitrogen Nutrition of | 2013 | 11 |
| 14 | Broad-spectrum disease resistance by overexpression of rice BSR1 and its application to crop improvement | Mori M, Maeda S, Sugano S, Naoki Y, Hayashi N, Goto S, Jiang C-J, Oda K, Hirochika H, Takatsuji H | 農業生物資源研究所 | 11th International Symposium on Rice Functional Genomics, Book of Abstracts | 2013 | 11 |
| 15 | Induced disease resistance in rice through salicylic pathway and its modification by genetic engineering. | Takatsuji H, Goto S, Shimoda FS, Suetsugu M, Ueno Y, Yoshida R | 農業生物資源研究所 | 11th International Symposium on Rice Functional Genomics | 2013 | 11 |

| | | | | | | |
|----|--|---|------------------|----------------------------|------|----|
| 16 | リンゴ小球形潜在ウイルスベクターを用いたカンキツ植物での外来遺伝子の発現と内在性遺伝子の抑制 | 八木皓平, 山岸紀子, 吉川信幸 | 岩手大学 | 日本植物病理学会 会東北部会 | 2013 | 10 |
| 17 | Tyrosine dephosphorylation of OsMPK6 is a node of abscisic-acid-mediated suppression of salicylic-acid defense signaling in rice | Ueno Y, Yoshida R, Kishi-Kaboshi M, Jiang C-J, Goto S, Hirochika H, Takatsuji H | 農業生物資源研究所 | 第55回日本植物生理学会年会 | 2014 | 3 |
| 18 | イネFOXナズナ系統を用いたR.solani抵抗性遺伝子の単離 | 前田哲, Dubouzet J.G, 近藤陽一, 市川尚斉, 小田賢司, 松井南, 廣近洋彦, 森昌樹 | 農業生物資源研究所 | 第55回日本植物生理学会年会講演要旨集 | 2014 | 3 |
| 19 | 恒常的および感染応答性プロモーターを用いたBSR1発現病害抵抗性イネの改良 | 前田哲, 後藤新悟, 下田(笹倉)芙裕子, 高辻博志, 森昌樹 | 果樹研究所, 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第125回講演会 講演要旨集 育種学研究 | 2014 | 3 |
| 20 | 自殖性作物の高速・高出力育種法RRGS(Rapid-cycle Recurrent Genomic Selection)の提案 | 田中淳一, 矢部志央理, 田部井豊, 谷口洋二郎, 赤坂舞子, 大嶋雅夫, 阿部清美, 石井卓朗, 岩田洋佳 | 作物研究所, 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第125回講演会 | 2014 | 3 |

| | | | | | | |
|----|---|--|------------------|--|------|---|
| 21 | 転写因子WRKY45およびWRKY62はジテルペン型ファイトアレキシン合成遺伝子を制御するイネ転写因子DPFの遺伝子を協調的に制御する | 福島説子, 赤城文, 森昌樹, 菅野正治, 中山明, 高辻博志 | 農業生物資源研究所 | 第55回日本植物生理学会年会 | 2014 | 3 |
| 22 | 葯特異的に発現するイネ遺伝子のプロモーターを利用した遺伝子組換え雄性不稔イネ系統の作出 | 赤坂舞子, 谷口洋二郎, 大嶋雅夫, 阿部清美, 田部井豊, 田中淳一 | 作物研究所, 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第125回講演会 | 2014 | 3 |
| 23 | IDENTIFICATION of a NOVEL GENE CONFERRING RESISTANCE to RHIZOCTONIA SOLANI in ARABIDOPSIS and RICE by FOX-HUNTING | Satoru Maeda, Joseph G. Dubouzet, Youichi Kondou, Takanari Ichikawa, Kenji Oda, Minami Matsui, Hirohiko Hirochika, Masaki Mori | 農業生物資源研究所 | 16th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Book of Abstracts | 2014 | 7 |
| 24 | TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR NIN CONTROLS NODULE ORGANOGENESIS | Makoto Hayashi | 農業生物資源研究所 | XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (XVI IS-MPMI) | 2014 | 7 |

| | | | | | | |
|----|--|---|------------------|--|------|---|
| 25 | Tyrosine dephosphorylation of OsMPK6 is a node of abscisic-acid-mediated suppression of salicylic-acid defense signaling in rice | Ueno Y, Yoshida R, Kishi-Kaboshi M, Jiang C-J, Goto S, Hirochika H, Takatsuji H | 農業生物資源研究所 | XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions | 2014 | 7 |
| 26 | イネFOXシロイヌナズナ系統を用いたR.solani抵抗性遺伝子OsPSR1の同定 | 前田哲, Dubouzet J.G, 近藤陽一, 小田賢司, 松井南, 廣近洋彦, 森昌樹 | 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第126回講演会 講演要旨集 育種学研究 | 2014 | 9 |
| 27 | イネの葯特異的発現遺伝子のプロモーターを利用した遺伝子組換え雄性不稔イネの雄性不稔性および雌性稔性の検証 | 赤坂舞子, 谷口洋二郎, 大嶋雅夫, 阿部清美, 田部井豊, 田中淳一 | 作物研究所, 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第126回講演会 | 2014 | 9 |
| 28 | イネレトロトランスポゾンTos17による劣性の雄性不稔を用いた他殖集団養成に向けた取組み | 田中淳一, 赤坂舞子, 大嶋雅夫, 阿部清美, 谷口洋二郎, 石井卓朗, 田部井豊 | 作物研究所, 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第126回講演会 | 2014 | 9 |
| 29 | タペート組織特異的barnase発現による優性の雄性不稔イネ後代における開花特性と種子生産性 | 阿部清美, 大嶋雅夫, 田中淳一, 赤坂舞子, 谷口洋二郎, 廣瀬文昭, 市川裕章, 田部井豊 | 農業生物資源研究所, 作物研究所 | 日本育種学会第126回講演会 | 2014 | 9 |
| 30 | 4種の異なる病原菌に抵抗性を示すBSR1高発現イネの抵抗性機構の解析 | 前田哲, 菅野正治, 姜昌杰, 高辻博志, 森昌樹 | 農業生物資源研究所 | 日本植物病理学会平成27年度大会 | 2015 | 3 |

| | | | | | | |
|----|---|--|------------------|------------------------------|------|---|
| 31 | 恒常性および感染応答性プロモーターを用いたBSR1発現病害抵抗性イネの改良 2. 籾枯細菌病抵抗性について | 前田哲, 後藤新悟, 下田(笹倉)芙裕子, 高辻博志, 森昌樹 | 果樹研究所, 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第127回講演会 講演要旨集 育種学研究 | 2015 | 3 |
| 32 | イネのTMS循環選抜のための胚乳への蛍光タンパク蓄積をビジブルマーカーとしたプロトタイプの実作 | 田中淳一, 赤坂舞子, 谷口洋二郎, 大嶋雅夫, 田部井豊 | 作物研究所, 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第128回講演会、育種学研究 | 2015 | 9 |
| 33 | 遺伝子組換え技術により作出した優性の雄性不稔イネの開花特性 | 赤坂舞子, 谷口洋二郎, 大嶋雅夫, 田部井豊, 田中淳一 | 作物研究所, 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第128回講演会、育種学研究 | 2015 | 9 |
| 34 | A powerful tool for efficient recurrent selection: positively and negatively selectable male-sterile rice | J. Tanaka, M. Akasaka, Y. Taniguchi, M. Oshima, K. Abe, Y. Tabei | 作物研究所, 農業生物資源研究所 | Plant and Animal Genome XXIV | 2016 | 1 |
| 35 | BSR2高発現トマトの細菌病及び糸状菌病に対する複合病害抵抗性 | 前田哲, 横谷尚起, 小田賢司, 瀬尾茂美, 廣近洋彦, 森昌樹 | 生物研 | 日本育種学会第129回講演会 講演要旨集 育種学研究 | 2016 | 3 |
| 36 | CRISPR/Cas9システムによる複合病害抵抗性遺伝子BSR1のノックアウトイネ系統の実作 | 神田恭和, 前田哲, 鎌倉高志, 森昌樹 | 生物研 | 日本農芸化学会2016年度大会 | 2016 | 3 |

| | | | | | | |
|----|--|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|------|---|
| 37 | イネ科作物における人為的開花制御技術の開発 | 岡田龍, 遠藤(東)直邦, 根本泰江, 高溝正, 井澤毅 | 畜産草地研究所, 農業生物資源研究所 | 日本育種学会第129回講演会 | 2016 | 3 |
| 38 | 光る種子: イネ種子において導入遺伝子の有無を効率的に選抜するためのビジブルマーカー | 赤坂舞子ら | (国研)農研機構・次世代作物開発研究センターほか | 一般社団法人日本育種学会第129回講演会 講演会要旨集 育種学研究 | 2016 | 3 |
| 39 | 高速循環ゲノミックセレクション(RRGS)を用いたイネの遺伝的能力の改良: シミュレーション研究 | 岩田洋佳ら | 東京大学ほか | 一般社団法人日本育種学会第129回講演会 講演会要旨集 育種学研究 | 2016 | 3 |
| 40 | イネの育種過程のみ他殖化させるツールGenome Mixerの開発と今後の展開. | 田中淳一ら | (国研)農研機構・次世代作物開発研究センターほか | 一般社団法人日本育種学会第130回講演会 講演会要旨集 育種学研究 | 2016 | 9 |
| 41 | 環境追従型閉鎖系温室における雄性不稔組換えイネの他殖試験 | 赤坂舞子ら | (国研)農研機構・次世代作物開発研究センターほか | 一般社団法人日本育種学会第130回講演会 講演会要旨集 育種学研究 | 2016 | 9 |
| 42 | 多様なイネへの適用が期待できるアントシアニン蓄積コンストラクトの開発 | 谷口洋二郎ら | (国研)農研機構・生物機能利用研究部門ほか | 一般社団法人日本育種学会第131回講演会(予定) | 2017 | 3 |
| 43 | BSR1はキチン応答性のオキシダティブーストに関与している | 神田 恭和, 横谷尚起, 前田 哲, 西澤 洋子, 鎌倉 高志, 森 昌樹 | 農研機構 | 日本植物生理学会大会 | 2017 | 3 |

| | | | | | | |
|----|---|---------------------------------------|-----------------|----------------------------|------|----|
| 44 | 恒常性および感染応答性プロモーターを用いたBSR1発現病害抵抗性イネの改良 3.いもち病およびごま葉枯病抵抗性について | 前田哲・後藤新悟・高辻博志・森昌樹 | 農研機構 | 日本育種学会第131回講演会 講演要旨集 育種学研究 | 2017 | 3 |
| 45 | イネ受容体様細胞質キナーゼBSR1はキチンオリゴマーとLPSに対する防御応答の誘導に関与する | 神田 恭和, 横谷尚起, 前田 哲, 西澤 洋子, 鎌倉 高志, 森 昌樹 | 農研機構 | 日本農芸化学会関東支部大会 講演要旨集 | 2017 | 9 |
| 46 | 遺伝子組換えイネを判別するための組織(葉鞘)特異的アントシアニン蓄積性形質マーカーの開発 | 大嶋雅夫、谷口洋二郎、田中淳一、市川裕章、赤坂舞子、田部井豊 | 農研機構・生物機能研究利用部門 | 日本育種学会第132回講演会 講演要旨集 育種学研究 | 2017 | 10 |
| 47 | イネの広範な病害抵抗性遺伝子BSR1を高発現したサトウキビの黒穂病抵抗性の付与 | 前田哲・高橋亘・森昌樹 | 農研機構 | 日本育種学会第132回講演会 講演要旨集 育種学研究 | 2017 | 10 |

(3) 出版図書

区分：①出版著書、②雑誌(注)(1)学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

| 整理番号 | 区分 | 著書名(タイトル) | 著者名 | 機関名 | 出版社 | 発行年 | 発行月 |
|------|----|--|------------|------------------|-----|------|-----|
| 1 | ② | 生物の科学 遺伝子(NBTによる生殖制御によって育種効率を高めようとする取り組み—SPT(seed production technology)プロセス, リバースブリーディング, 果樹の早期開花, 自殖性作物のTMS循環選抜) | 田中淳一, 田部井豊 | 作物研究所, 農業生物資源研究所 | | 2014 | 3 |

(4) 国内特許権等

| 整理番号 | 特許権等の名称 | 発明者 | 権利者(出願人等) | 機関名 | 特許権等の種類 | 番号 | 出願年月日 | 取得年月日 |
|------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|---------|---------------|------------|------------|
| 1 | 転写因子遺伝子の導入による植物の病害抵抗性の改良 | 高辻博志, 霜野真幸, 菅野正治, 姜昌杰, 加来久敏 | 農業生物資源研究所 | 農業生物資源研究所 | 特許権 | 特許第4997376号 | 2005年5月26日 | 2012年5月25日 |
| 2 | 開花期を制御することが可能なイネ科植物体 | 井澤 毅, 根本 泰江, 遠藤 直邦, 岡田 龍 | 生物研 | 生物研 | 特許権 | 2013-042009 | 2013年3月4日 | |
| 3 | 病害抵抗性を有する植物及びその生産方法 | 高辻博志, 上野宜久, 吉田理一郎, 姜昌杰 | 生物研のみ | 生物研のみ | 特許権 | 特願2013-253167 | 2013年12月6日 | |
| 4 | 薬特異的にプロモーター活性を有するDNA、及びその利用 | 田中淳一, 谷口洋二郎, 赤坂舞子, 田部井豊, 阿部清美, 大嶋雅夫 | 農業・食品産業技術総合研究機構 | 農業・食品産業技術総合研究機構 | 特許権 | 特願2015-063020 | 2015年3月25日 | |
| | 4に係る共同出願 | 同上 | 農業生物資源研究所 | 農業生物資源研究所 | 同上 | 同上 | 同上 | |
| 5 | リゾクトニア菌抵抗性遺伝子 | 森昌樹, 前田哲, 横谷尚起, 小田賢司, 近藤陽一, 松井南 | 農研機構 | 農研機構 | 特許権 | 特許第6210603号 | | 2017/9/22 |

(5) 国際特許権等

| 整理番号 | 特許権等の名称 | 発明者 | 権利者 (出願人等) | 機関名 | 特許権 等の種 類 | 番号 | 出願年月日 | 取得年月 日 | 出願国 |
|------|---|--|----------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------|------------|-----------|-----|
| 1 | 開花期を制御することが可能なイネ科植物体 | 井澤毅, 岡田龍, 遠藤直邦, 根本泰江, 高溝正 | (国)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 | (国)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 | 特許権 | 14/772838 | 2014年3月4日 | | 米国 |
| 2 | 開花期を制御することが可能なイネ科植物体 | 井澤毅, 根本泰江, 遠藤直邦, 岡田龍 | 生物研 | 生物研 | 特許権 | PCT/JP2014/055507 | 2014年3月4日 | | 米国 |
| | 2に係る共同出願 | 同上 | 畜草研 | 畜草研 | 同上 | 同上 | 同上 | | 同上 |
| 3 | 広範な病害抵抗性を付与する遺伝子(米国特許取得) | 森昌樹, 林長生, 菅野正治, 高辻博志, 廣近洋彦, 小田賢司, 松井南 | 生物研 | 生物研 | 特許権 | 9127290 | 2009年3月4日 | 2015年9月8日 | 米国 |
| | 3に係る共同出願 | 同上 | 理研 | 理研 | 同上 | 同上 | 同上 | 同上 | 同上 |
| 4 | DNA having anther-specific promoter activity, and utilization thereof | J. Tanaka, Y. Taniguchi, M. Akasaka, Y. Tabei, K. Abe, M. Oshima | 農業・食品産業技術総合研究機構 | 農業・食品産業技術総合研究機構 | 特許権 | 3058/DEL/2015 | 2015年9月26日 | | インド |
| | 4に係る共同出願 | 同上 | 農業生物資源研究所 | 農業生物資源研究所 | 同上 | 同上 | 同上 | | 同上 |

(6) 報道等

区分: ①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

| 区分 | 記事等の名称 | 掲載紙・放送社名等 | 掲載年 | 掲載月 | 掲載日 | 機関名 | 備考 |
|----|---|---------------|------|-----|-----|-----------|----|
| ② | イネの病害抵抗性の仕組みを解明- 安定して病気に強いイネの開発へ前進 - | 日本農業新聞、化学工業日報 | 2013 | 6 | 14 | 農業生物資源研究所 | |
| ① | 農薬に頼らず、イネを複数の病気に対して強くする技術を開発- 農作物の安定生産への貢献に期待 - | | 2015 | 2 | 12 | 農業生物資源研究所 | |
| ① | 「いもち病」に対する抵抗性誘導剤の効果が低温で発揮できない原因を解明- 低温でもいもち病にかかりにくいイネの開発へ - | | 2015 | 11 | 17 | 農業生物資源研究所 | |

(7) 普及に移しうる成果

区分: ①普及に移されたもの、製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

| 区分 | 成果の名称 | 機関名 | 普及(製品化) 年月 | | 主な利用場面 | 普及状況 |
|----|--|-----------|---------------|---|--------|------|
| ③ | 文部科学大臣表彰 科学技術賞(光信号伝達系と概日時計による光周性花芽形成の分子機構研究) | 農業生物資源研究所 | 2013 | 4 | | |

(8) 発表会の主催の状況

(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

| 整理番号 | 発表会の名称 | 年月日 | | | 開催場所 | 参加者数 | 機関名 | 備考 |
|------|--------|-----|--|--|------|------|-----|----|
| 1 | 「該当無し」 | | | | | | | |

(9) アウトリーチ活動の状況

当事業の研究課題におけるアウトリーチ活動の内容は以下のとおり。

区分: ①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、

③その他(子供向け出前授業等)

| 整理番号 | 区分 | アウトリーチ活動 | 年月日 | | | 開催場所 | 参加者数 | 主な参加者 | 機関名 | 備考 |
|------|----|--------------------------------------|------|---|----|------|------|-------|-----------|----|
| 1 | ① | ミクロナ戦略を知って病気に強いイネを作る! ~食糧の安定供給を目指して~ | 2014 | 5 | 23 | | | | 農業生物資源研究所 | |