

委託プロジェクト研究
「農林水産分野における気候変動対応のための研究開発」
平成29年度 最終年度報告書

途上国における乾燥耐性品種の開発

研究実施期間	平成25～29年度
代表機関	国立研究開発法人国際農林水産業研究センター
研究開発責任者	生物資源・利用領域長 浦尾 剛
共同研究機関	国際稲研究所 (IRRI)
	国際熱帯農業センター (CIAT)
	国際とうもろこし・小麦改良センター (CIMMYT)
普及・実用化支援組織	
研究開発責任者連絡先	TEL: 029-838-6305 E-mail: turao@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. 環境ストレス耐性遺伝子を導入した水稻の乾燥耐性評価と優良系統の選抜 (1) 有望系統の評価と乾燥耐性系統の選抜 (2) 遺伝的背景の清浄化 (3) 耐性遺伝子の集積	←→					国際稲研究所 (IRRI)	作物環境研究部
	←→						
	←→						
2. 環境ストレス耐性遺伝子を導入した陸稲の乾燥耐性評価と優良系統の選抜 (1) 有望系統の評価と乾燥耐性系統の選抜 (2) 耐性遺伝子の集積	←→					国際熱帯農業センター (CIAT)	農業生物多様性研究部
			←→				
3. 環境ストレス耐性遺伝子を導入した小麦の乾燥耐性評価と優良系統の選抜 (1) 有望系統の評価と乾燥耐性系統の選抜 (2) 実用品種への遺伝的背景の置換と系統評価	←→					国際とうもろこし・小麦改良センター (CIMMYT)	小麦プログラム
		←→					
4. 環境ストレス耐性遺伝子を導入した作物の分子生物学的解析評価 (1) 有望系統の導入遺伝子の遺伝子発現 (2) 有望系統の導入遺伝子の挿入部位の解析 (3) 品種開発に向けた情報の収集 (FT0調査)	←→					国際農林水産業研究センター (JIRCAS)	生物資源・利用領域、熱帯・島嶼研究拠点
	←→						
	←→						

I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	国際農林水産業研究センター (JIRCAS)	生物資源・利用領域	◎浦尾 剛 (H27～)、末永一博 (～H26)
1. 環境ストレス耐性遺伝子を導入した水稲の乾燥耐性評価と優良系統の選抜	国際稲研究所 (IRRI)	作物環境研究部 研究員 (乾燥生理学)	○Amelia Henry
2. 環境ストレス耐性遺伝子を導入した陸稲の乾燥耐性評価と優良系統の選抜	国際熱帯農業センター (CIAT)	農業生物多様性研究部	○石谷学 Michael Gomez Selvaraj Edgar Alonso Torres
3. 環境ストレス耐性遺伝子を導入した小麦の乾燥耐性評価と優良系統の選抜	国際とうもろこし・小麦改良センター (CIMMYT)	小麦プログラム	○Carolina Saint Pierre Matthew Reynolds
4. 環境ストレス耐性遺伝子を導入した作物の分子生物学的解析評価	国際農林水産業研究センター (JIRCAS)	生物資源・利用領域 熱帯・島嶼研究拠点	○中島一雄 (～H27) ○藤田泰成 小賀田拓也 圓山恭之進 石崎 琢磨

(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(e-Radシステム課題 ID8桁)	13406264	研究期間	平成25～29年度
大課題名	農林水産分野における気候変動対応のための研究開発		
中課題名	途上国における乾燥耐性品種の開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立研究開発法人国際農林水産業研究センター 生物資源・利用領域長 浦尾 剛		

I-1. 研究目的

水稻1品種、陸稲1品種、NERICA2品種、及び小麦1品種に乾燥ストレス耐性遺伝子を導入し、乾燥ストレス下での子実収量を指標に選抜した約50の有望系統について、隔離圃場での乾燥耐性評価を継続し、乾燥耐性を検証する。試験の規模を拡大し、乾燥耐性品種や普及品種を対照品種とすることで、信頼性の高い実用的な評価を行う。一方、乾燥ストレス下での、導入遺伝子及び下流遺伝子の発現を解析し、圃場で評価された乾燥耐性を分子生物学的に解析し、導入遺伝子の効果を検証する。これらの結果に基づき、品種毎に、最も乾燥耐性の優れた2～3の優良系統に絞り込む。

絞り込みに並行し、水稻ではそれぞれの親品種を、小麦は実用品種を反復親にして3回の連続戻し交雑を行い、遺伝的背景を清浄化した優良系統を作出し、乾燥耐性の評価を行う。また、異なる乾燥耐性遺伝子の集積効果を評価する。

また、導入遺伝子挿入部位の配列や代謝産物の解析等の品種開発に向けた情報を獲得する。遺伝子組換えに関する法整備や受入れ環境等に基づき、選抜した優良系統を提供できる対象国を下記の3つのCGセンター毎に1、2か国選定する。

I-2. 研究結果

(1) 環境ストレス耐性遺伝子を導入した水稻の乾燥耐性評価と優良系統の選抜 (IRRI)

有望系統の評価と乾燥耐性系統の選抜については、乾燥ストレス条件下では、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統の登熟期間の茎の炭水化物含量はIR64よりも減少しており、このことから茎の炭水化物が登熟のために種子へ分配されたことが示唆された。

遺伝子背景の清浄化については、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統と親品種IR64とのBC3F2を作出した。これらの系統のSNP解析の結果から、遺伝的背景はIR64に大部分置換されていると考えられた。

耐性遺伝子の集積については、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子と既知の乾燥耐性QTLを集積させたBC2F4を作出した。これらの系統のSNP解析の結果から、遺伝的背景は既知の乾燥耐性QTL系統に大部分置換されていると考えられた。スクリーンハウスでの乾燥耐性評価試験を行った結果、1つの系統が乾燥ストレス条件でIR64よりも高い収量を示したが有意差はなかった。

(2) 環境ストレス耐性遺伝子を導入した陸稲の乾燥耐性評価と優良系統の選抜 (CIAT)

有望系統の評価と乾燥耐性系統の選抜については、Curinga組換え系統では、CCCH-Type Zinc

Finger遺伝子導入系統とオリゴ糖合成遺伝子導入系統は、乾燥ストレス条件下で非形質転換Curingaよりも収量が高かった。ポット栽培により根の形状等を調査した結果、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統は、根の最大長、深根の数、根の総数、根の乾燥重がCuringaよりも優れていた。一方、NERICA4組換え系統では、オリゴ糖合成遺伝子導入系統は、乾燥ストレス条件下で非形質転換NERICA4よりも収量が高かった。これらの系統は年度の違いや乾燥ストレスの程度の違いによる影響を受けずに安定して良好な結果が得られた。また、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統が高い収量を示した。さらに、IR64組換え系統では、オリゴ糖合成遺伝子、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子、アブシジン酸応答転写因子群の各系統は、乾燥ストレス条件下でnull系統よりも収量が高かった。

耐性遺伝子の集積については、オリゴ糖合成遺伝子とCCCH-Type Zinc Finger遺伝子を集積させたF4を作出した。これらの集積系統の湛水条件下（非ストレス）で栽培試験を実施した結果、非形質転換Curingaと比較して、収量や形態的な形質にネガティブな影響は見られなかった。

その他の成果として、平成29年4月、オリゴ糖合成遺伝子導入系統の複数年にわたる圃場試験の結果をPlant Biotechnology Journal誌に発表した。同時にJIRCASとCIATでプレスリリースを行ったところ、NHKのニュース番組で取り上げられた。

（3）環境ストレス耐性遺伝子を導入した小麦の乾燥耐性評価と優良系統の選抜（CIMMYT）

有望系統の評価と乾燥耐性系統の選抜については、オリゴ糖合成遺伝子、乾燥ストレス応答転写因子、タンパク質リン酸化酵素遺伝子をFielderに導入した系統は、乾燥ストレス条件下で、非形質転換Fielderよりも収量が高かった。特に、オリゴ糖合成遺伝子導入系統は収量が多かった。これらの有望系統では、NDVI値や草丈と収量には正の相関が見られた。一方、出穂期や葉の表面温度と収量には負の相関があり、これらの系統の高い光合成活性が示唆された。

実用品種への遺伝的背景の置換と系統評価については、活性化型乾燥ストレス応答転写因子導入系統及びオリゴ糖合成遺伝子導入系統を導入した有望系統と実用品種Reedlingとの戻し交配を進め、BC3F2まで育成した。これらの系統について、非ストレス条件下で評価試験を行ったところ、活性化型乾燥ストレス応答転写因子導入系統とオリゴ糖合成遺伝子導入系統は非形質転換Reedlingと比較して生育上のネガティブな影響は見られなかった。

（4）環境ストレス耐性遺伝子を導入した作物の分子生物学的解析評価（JIRCAS）

有望系統の導入遺伝子の発現解析については、IRRIで開発したCCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統、及びCCCH-Type Zinc Finger遺伝子と乾燥耐性QTLの集積系統で導入遺伝子の過剰発現を確認された。CIATで開発した陸稲Curinga組換え系統では、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統、オリゴ糖合成遺伝子導入系統等で各導入遺伝子の高発現を確認された。また、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統とオリゴ糖合成遺伝子導入系統の集積系統でも、各導入遺伝子の過剰発現を確認した。CIMMYTで開発したコムギFielder組換え系統では、乾燥ストレス応答転写因子、オリゴ糖合成遺伝子等を導入した12系統全てにおいて導入遺伝子の高発現を確認された。また、活性化型乾燥ストレス応答転写因子導入系統及びオリゴ糖合成遺伝子導入系統とReedlingとの戻し交配系統についても、各導入遺伝子の過剰発現を確認した。

有望系統の導入遺伝子の挿入部位の解析については、IRRIで開発したCCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統のT-DNA挿入部位を明らかにした。CIATで開発したCCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統のT-DNA挿入部位を明らかにするとともに、T-DNA挿入部位の遺伝子の発現が抑制されて

いることを確認した。また、オリゴ糖合成遺伝子導入系統のT-DNA挿入部位を明らかにした。このうち1つの系統ではT-DNA挿入部位の遺伝子の発現は見られなかったが、別の系統では影響はなかった。CIMMYTで開発した乾燥ストレス応答転写因子を導入した系統、活性化型乾燥ストレス応答転写因子を導入した系統について、T-DNAの挿入部位の周辺配列を同定した。

品種開発に向けた情報の収集（FTO調査）については、プロジェクトで作出した組換え系統で使用している主なプロモーター、導入遺伝子、ベクター内遺伝子、形質転換法の日本、米国、EUにおける特許出願状況について特許事務所の協力を得て特許調査を行った結果、特に特許侵害に当たる内容は認められなかった。

代謝産物の解析については、CIATが開発したオリゴ糖合成遺伝子導入をCuringaに導入した系統、NERICA1に導入した系統、NERICA4に導入した系統では、非形質転換体よりもガラクトキノールやラフィノースの高い蓄積が認められた。

その他の成果として、平成29年11月29日（水）、つくば国際会議場（エポカルつくば）に於いて国際ワークショップ「途上国における乾燥耐性品種の開発と今後の展開」を開催した。セッション1では5年間の研究成果を発表し、セッション2ではNEWESTプロジェクトの概要や遺伝子組換え作物の普及の現状等を紹介した。総合討論ではプロジェクトの研究成果の社会実装に向けた課題等について意見交換を行った。

I-3. 今後の課題

現在、遺伝子組換え植物の規制は世界的に厳しい状況であるが、アフリカ地域においては遺伝子組換えトウモロコシ（食用）が4ヵ国（タンザニア、ケニア、南アフリカ、ウガンダ）で栽培され、販売にまで至っている。また、ナイジェリアでは遺伝子組換えササゲを今後2、3年後に商業ベースで売れるよう国立バイオテクノロジー機構が働きかけを行っている。こうした状況を踏まえ、アフリカ地域への導入を目指し、関係者との調整を図ることによりアウトカム目標の達成が可能となると考えている。しかし、現状ではイネの有望系統がアフリカ地域の圃場レベルにおいても安定的に乾燥ストレス耐性を示すかを確認する必要がある、アウトカム目標達成に向けた取組は行われていない。この点については、最終年度において、アフリカ地域へのGMイネ導入に向けたワークショップを国内で開催し、現在アフリカで遺伝子組換えイネの実証試験

（NEWESTプロジェクト）を展開しているアフリカ農業技術財団（AATF）、アルカディバイオサイエンス社、ウガンダ作物資源研究所の担当者と、プロジェクトの概要や遺伝子組換え作物の普及の現状等やプロジェクトの研究成果の社会実装に向けた課題等について意見交換を行ったので、今後これらの機関と連携を深めていくこととしている。

中課題番号	13406264	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	1	研究期間	平成25～29年度
中課題名	途上国における乾燥耐性品種の開発		
小課題名	環境ストレス耐性遺伝子を導入した水稻の乾燥耐性評価と優良系統の選抜		
小課題責任者名・研究機関	国際稲研究所 (IRRI) 作物環境研究部 研究員 (乾燥生理学) Amelia Henry		

1) 研究目的

水稻品種IR64由来の形質転換系統から、開発途上国向けに乾燥耐性に優れた2～3系統を選抜する。また、これらの優良系統について、遺伝的背景を親品種置換した系統、並びに異なる乾燥耐性遺伝子を集積した系統を作出する。

具体的には、環境ストレス耐性遺伝子を導入し、これまでに乾燥耐性について有望と認められたIR64組換え系統について、乾燥ストレス下での子実収量とともに、生理的な乾燥耐性機構の解析やJIRCASの協力のもとで実施する導入遺伝子の発現解析を通じて乾燥耐性を検証し、有望系統数を絞り込む。優良系統候補については、親品種のIR64に遺伝的背景を置換することで、遺伝的清背景を清浄化する。また、乾燥耐性に大きな効果を持つQTLを優良系統に集積することで、より高い乾燥耐性系統の作出を図る。

2) 研究成果

(1) 遺伝子背景の清浄化

CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統(13A、24A、72A)と親品種IR64との交配を開始し、BC3F2を作出した。これらの系統のSNP解析の結果、系統72AとIR64との多型は低く、これらに由来する交配後代の遺伝的背景はIR64に大部分置換されていると考えられた。

(2) 耐性遺伝子を集積

CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統72Aと既知の乾燥耐性QTL (*qDTY2.2*と*qDTY4.1*)を集積させたBC2F4を作出した。これらの系統のSNP解析の結果、系統72Aと既知の乾燥耐性QTL系統(IR87707-455-B-B-B)との多型は低く、これらに由来する交配後代の遺伝的背景は親系統に大部分置換されていると考えられた。スクリーンハウスでの乾燥耐性評価試験を行った結果、1つの系統が乾燥ストレス条件でIR64よりも高い収量を示したが有意差はなかった。これは、開花～登熟期に地下30cmの水分ポテンシャルが約-80kPaまで低下し、極度の小雨と高温だったため、強い乾燥ストレス条件になったためと考えられた。

(3) 有望系統の評価と乾燥耐性系統の選抜

スクリーンハウスで実施した耐性評価試験では、乾燥ストレス条件下では、登熟期間の茎の炭水化物含量は、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統24Aと72AはIR64よりも減少しており、このことから茎の炭水化物が登熟のために種子へ分配されたことが示唆された。また、

収穫指数については、乾燥ストレス条件下では3系統（13A、24A、72A）はIR64よりも高い値を示したが、有意差は無かった。

3) 成果活用における留意点

CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統の3系統（13A、24A、72A）とIR64と戻し交配を行った遺伝的背景の清浄化系統の乾燥耐性を確認する必要がある。また、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統72Aと乾燥耐性QTL（*qDTY2.2*と*qDTY4.1*）の集積系統について、中程度の乾燥ストレス条件下で乾燥耐性評価試験を行う必要がある。

4) 今後の課題

CCCH-Type Zinc Finger遺伝子をIR64に導入した有望系統に関する研究成果の論文を发表する。

中課題番号	13406264	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	2	研究期間	平成25～29年度
中課題名	途上国における乾燥耐性品種の開発		
小課題名	環境ストレス耐性遺伝子を導入した陸稲の乾燥耐性評価と優良系統の選抜		
小課題責任者名・研究機関	国際熱帯農業センター (CIAT)、農業生物多様性研究部 主任研究員 石谷学、同 研究員 Michael Gomez Selvaraj、同 稲プログラムリーダー Edgar Alonso Torres		

1) 研究目的

陸稲品種Curinga及びNERICA品種から、開発途上国向けに乾燥耐性に優れた5系統を開発する。また、これらの優良系統について、異なる乾燥耐性遺伝子を集積した系統を作出する。

具体的には、陸稲品種Curingaに環境ストレス耐性遺伝子を導入し、これまでの評価に基づいて選抜した有望系統を中心に圃場評価を継続する。乾燥ストレス条件下での子実収量を主な指標として優良な系統を絞り込む。一方、JIRCASと協力して導入遺伝子の発現解析を行い、導入遺伝子の乾燥耐性向上への効果を検証する。優良系統候補については、異なる遺伝子を導入した優良系統候補同士の交配により乾燥耐性遺伝子を集積を図る。ネリカ品種NERICA1及びNERICA4についても同様に評価・選抜を行い、最終的にCuringaを含めて優良系統を合計5系統選抜する。

2) 研究成果

(1) 有望系統の評価と乾燥耐性系統の選抜

陸稲Curinga組換え系統については、Santa Rosaの隔離圃場試験の結果、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統(3474、3480)、オリゴ糖合成遺伝子導入系統(580、590)、NAC遺伝子導入系統(1085、967)は、乾燥ストレス条件下で非形質転換Curingaよりも収量が高かった。これらの耐性系統は、相対水分含量やクロロフィル蛍光強度がCuringaに比べて高く、穂数の増加や長い草丈が見られ、これらの特性が収量増加の要因と考えられた。ポット栽培により根の形状等を調査した結果、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統(3474と3507)は、根の最大長、深根の数、根の総数、根の乾燥重がCuringaよりも優れていた。

陸稲NERICA組換え系統については、Santa Rosaの隔離圃場試験の結果、オリゴ糖合成遺伝子導入(NERICA4)系統については、2361系統と7139系統が乾燥ストレス条件下でも非形質転換NERICA4よりも収量が高かった。この2つの系統は年度の違いや乾燥ストレスの程度の違いによる影響を受けずに安定して良好な結果が得られた。CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入(NERICA4)系統については、4890系統と4926系統が高い収量を示した。この結果は、Palmira ROS付き圃場の試験結果と一致しており、この系統は異なる乾燥ストレス条件下でも安定した成績が得られる系統と言える。

IR64組換え系統については、Santa Rosaの隔離圃場試験の結果、オリゴ糖合成遺伝子、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子、アブシジン酸応答転写因子群の各系統は、乾燥ストレス条件下でnull系統よりも収量が高かった。

(2) 耐性遺伝子の集積

オリゴ糖合成遺伝子導入系統 (590と580) とCCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統 (3474、3480) を集積させたF4世代を作出し、両方の遺伝子を持つホモ系統を得た。これらの集積系統の湛水条件下 (非ストレス) で栽培試験を実施した結果、非組換えCuringaと比較して、収量や形態的な形質にネガティブな影響は見られなかった。

(3) その他

平成29年4月4日、オリゴ糖合成遺伝子導入系統の複数年にわたる圃場試験の結果、様々な干ばつ条件下で原品種より高い収量を示すことをPlant Biotechnology Journal誌 (IF=7.4) に発表した。同時にJIRCASとCIATでプレスリリースを行ったところ、NHKのニュースチェック11で取り上げられ、視聴者からも多くの応援や期待のメッセージが寄せられた。他にも化学工業日報、全国農業新聞等で成果が紹介された。

3) 成果活用における留意点

CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統 (3480と3474) とオリゴ糖合成遺伝子導入系統 (590と580) の集積系統について、現在、乾燥耐性評価試験を実施している。

4) 今後の課題

CCCH-Type Zinc Finger遺伝子をCuringaやNRERICAに導入した有望系統に関する研究成果の論文を発表する。

中課題番号	13406264	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	3	研究期間	平成25～29年度
中課題名	途上国における乾燥耐性品種の開発		
小課題名	環境ストレス耐性遺伝子を導入した小麦の乾燥耐性評価と優良系統の選抜		
小課題責任者名・研究機関	国際とうもろこし・小麦改良センター (CIMMYT) 小麦プログラム 研究員 Carolina Saint Pierre、同上席研究員 生理研究主任 Matthew Reynolds		

1) 研究目的

開発途上国向けに乾燥耐性に優れた実用的な小麦2～3系統を開発する。また、これらの優良系統について、遺伝的背景を実用品種に置換した系統を作出する。

具体的には、小麦品種Fielderに環境ストレス耐性遺伝子を導入し、これまでに乾燥耐性について選抜した有望系統について隔離圃場での評価を継続する。乾燥ストレス条件下での子実収量を主な指標に、その他の生理的な形質の評価を基に、優良系統を絞り込む。また、JIRCASの協力で実施する導入遺伝子の発現解析を通じて、導入遺伝子の乾燥耐性向上への効果を検証する。最終的に2～3の優良系統を選抜する。一方、遺伝的背景の清浄化を兼ね、乾燥耐性が優良系統候補の遺伝的背景を、戻し交雑により実用品種に置き換え、その乾燥耐性を評価する。

2) 研究成果

(1) 有望系統の評価と乾燥耐性系統の選抜

Tlaltizapán試験地の隔離圃場試験の結果、オリゴ糖合成遺伝子、乾燥ストレス応答転写因子、タンパク質リン酸化酵素遺伝子をFielderに導入した系統は、乾燥ストレス条件下で、Fielderよりも収量が高かった。特に、オリゴ糖合成遺伝子導入系統はFielder (WT)よりも収量が多かった。有望系統においてNDVI (正規化植生指数) 値や草丈と収量には正の相関が見られた。草丈が大きいと収量が高い理由は、バイオマスが多いためと考えられた。一方、出穂期や葉の表面温度と収量には負の相関があった。葉の表面温度が低いことは、蒸散が活発であることを意味しており、このことから表面温度が低い葉は光合成活性が高いことが示唆された。

(2) 実用品種への遺伝的背景の置換と系統評価

実用品種への遺伝的背景の置換と系統評価については、活性化型乾燥ストレス応答転写因子導入系統 (JCLD2A07) 及びオリゴ糖合成遺伝子導入系統 (RCUA07) を導入した有望系統と実用品種Reedlingとの戻し交配を進め、BC3F2まで育成した。これらの系統について、非ストレス (湛水) 条件下で評価試験を行ったところ、活性化型乾燥ストレス応答転写因子導入系統 (JCLLD2A07) とオリゴ糖合成遺伝子導入系統 (RCUA07) は コントロール系統と比較してネガティブな影響 (開花期、成熟期、バイオマス量、個体収量) は見られなかった。

3) 成果活用における留意点

活性化型乾燥ストレス応答転写因子導入系統とオリゴ糖合成遺伝子導入系統について、現在、ストレス条件（乾燥条件）下で乾燥耐性評価試験を行っている。

4) 今後の課題

特になし。

中課題番号	13406264	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	4	研究期間	平成25～29年度
中課題名	途上国における乾燥耐性品種の開発		
小課題名	環境ストレス耐性遺伝子を導入した作物の分子生物学的解析評価		
小課題責任者名・研究機関	国際農林水産業研究センター 生物資源・利用領域 中島一雄・藤田泰成・小賀田拓也・圓山恭之進、同センター・熱帯・島嶼研究拠点・石崎 琢磨		

1) 研究目的

前身のDREBプロジェクトにおいて各CGセンターが選抜した有望系統について、導入遺伝子等の発現を解析し、圃場等で評価した乾燥耐性と遺伝子発現との関係を検証する。形質転換系統と親品種等との交雑により育成した系統における発現も調べ、発現の安定性も評価する。さらに、優良系統における導入遺伝子挿入部位の解析、また、組換え体における代謝産物の解析等、品種開発に向けた情報を獲得する。これらの研究を通じて、各CGセンターが推進する優良系統の選定について、分子生物学的に検証する。

(1) 有望系統の導入遺伝子の発現解析

各CGセンターが選抜したイネ（水稻、陸稻）及び小麦の優良系統候補について、導入遺伝子の発現をノーザン法等により解析する。酵素等の遺伝子を導入した優良系統については代謝物の分析を行う。さらに、形質転換系統と親品種等との交雑により育成した系統について、遺伝子発現や代謝の遺伝的安定性を調べる。ネリカの形質転換系統については、温室において生理学的な特性調査等に基づいて耐性の評価を行う。

(2) 有望系統の導入遺伝子の挿入部位の解析

各CGセンターで絞り込んだ優良系統については、遺伝子導入部位の解析を行う。

(3) 品種開発に向けた情報の収集（FTO調査）

マイクロアレイ、代謝物解析結果等をもとに、既知のタンパク質データベース等との比較分析により、アレルギー性等を予測するとともに、導入遺伝子等の特許権に関する調査を実施し、品種開発に向けた情報を獲得する。

2) 研究成果

(1) 有望系統の導入遺伝子の発現解析

IRRIで開発したCCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統（13A、24A、72A）について、導入遺伝子の乾燥応答性発現が確認された。また、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統72Aと乾燥耐性QTL（*qDTY2.2*と*qDTY4.1*）の集積系統についても、導入遺伝子の過剰発現を確認した。

CIATで開発した陸稻Curinga組換え系統については、アブシジン酸応答転写因子導入系統、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統、オリゴ糖合成遺伝子導入導入系統について、

各導入遺伝子の高発現が確認された。特に、オリゴ糖合成遺伝子導入をCuringaに導入した系統1025と系統1214、オリゴ糖合成遺伝子をNERICA1に導入した系統1953、オリゴ糖合成遺伝子をNERICA4に導入した系統1577と系統2343が高い発現を示した。また、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統（3480と3474）とオリゴ糖合成遺伝子導入系統（590と580）の集積系統（Curinga）についても、オリゴ糖合成遺伝子とCCCH-Type Zinc Finger遺伝子の過剰発現を確認した。

CIMMYTで開発した小麦Fielder組換え系統については、乾燥ストレス応答転写因子、オリゴ糖合成遺伝子、タンパク質リン酸化酵素遺伝子及び乾燥ストレス応答転写因子を導入した12系統全てにおいて導入遺伝子の高発現が確認された。また、活性化型乾燥ストレス応答転写因子導入系統及びオリゴ糖合成遺伝子導入系統とReedlingとの戻し交配系統についても、活性化型乾燥ストレス応答転写因子およびオリゴ糖合成遺伝子の過剰発現を確認した。

さらに、導入遺伝子の種子での発現を調べた結果、IRRIで開発したCCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統、CIATで開発したCCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入（Curinga）とオリゴ糖合成遺伝子導入系統（Curinga）とオリゴ糖合成遺伝子導入系統（NERICA4）、CIMMYTで開発した乾燥ストレス応答転写因子導入系統とオリゴ糖合成遺伝子導入系統では、どの系統でも種子での発現が見られた。

（2）有望系統の導入遺伝子の挿入部位の解析

IRRIで開発したCCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統（13A、24A、72A）について、T-DNA挿入部位を解析した結果、系統72Aでは、3番染色体の遺伝子の1箇所にT-DNAがタンデム逆向きに挿入されていた。系統13Aでは10番染色体の遺伝子の2箇所にT-DNAがタンデム逆向きに挿入されていた。系統24Aでは7番染色体の遺伝子の1箇所にT-DNAが1コピー挿入されていた。

CIATで開発したCCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統については、系統5480では、第6染色体の遺伝子の第1イントロンの挿入されていることが分かった。系統5480では、この遺伝子の発現は抑制されていた。CCCH-Type Zinc Finger遺伝子導入系統の系統5474については、第3染色体の遺伝子の5' UTR領域に挿入されていることが分かった。系統5474では、この遺伝子の発現が抑制されていた。

CIATで開発したオリゴ糖合成遺伝子導入系統の系統2580については、第5染色体の遺伝子の第2イントロンに挿入されていた。系統2580では、この遺伝子の発現は見られなかった。また、系統2590については、第10染色体の遺伝子の0.4kb上流域に1.8kbの欠失があった。なお、系統2590では、この遺伝子の発現に影響はなかった。

CIMMYTで開発した乾燥ストレス応答転写因子を導入したの2系統（JCLD07、JCLD09）、活性化型乾燥ストレス応答転写因子を導入した1系統（JCLD1A04）について、T-DNAの挿入部位の周辺配列を同定した。

（3）品種開発に向けた情報の収集（FTO調査）

知財リスクの発見・事業遂行の自由度確保のために、プロジェクトで作出した組換え系統で使用している主なプロモーター、導入遺伝子、ベクター内遺伝子、形質転換法の日本、米国、EUにおける特許出願状況について特許事務所の協力を得て特許調査（FTOサーベイ）を行った。その結果、CIMMYT法務部門がコムギに関してシークエンスデータ等を利用した詳細な評価を行った結果、特に特許侵害に当たる内容は認められなかった。

（4）代謝産物の解析

CIATが開発したオリゴ糖合成遺伝子導入をCuringaに導入した系統1025と系統1214、

NERICA1導入した系統1953、NERICA4に導入した系統1577と系統2343では、通常条件下で非形質転換体よりもガラクチノールやラフィノースの高い蓄積が認められた。

(5) 温室における形質転換NERICA1系統の生理学的評価

オリゴ糖合成遺伝子をNERICA1に導入した系統は、非形質転換体よりも高い生存率を示す傾向にあった。また、NAC遺伝子を導入した系統、アブシジン酸合成遺伝子を導入した系統、CCCH-Type Zinc Finger遺伝子を導入した系統、活性化型乾燥ストレス応答転写因子を導入した系統の各一部では、乾燥条件下で非形質転換体よりも乾物重が多かった。特に、NAC遺伝子を導入した系統のうち乾燥条件下における乾物重が多かった5系統のうち4系統は乾燥条件下において高い収量性を示した。

(5) その他

平成29年11月29日（水）、つくば国際会議場（エポカルつくば）に於いて国際ワークショップ「途上国における乾燥耐性品種の開発と今後の展開」を開催した。セッション1では5年間の研究成果を発表、セッション2ではNEWESTプロジェクトの概要や遺伝子組換え作物の普及の現状等を紹介した。総合討論ではプロジェクトの研究成果の社会実装に向けた課題等について意見交換を行った。

3) 成果活用における留意点

特になし。

4) 今後の課題

有望系統の導入遺伝子の発現解析と導入遺伝子の挿入部位の解析のデータをIRRI、CIAT、CIMMYTに提供し、各機関の論文の内容に反映させる。