

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19109

研究課題名（和文）作物栽培モニタリングに利用可能な情報ディスプレイ化した葉を持つ新規GM植物の開発

研究課題名（英文）Development of novel genetically modified plants with information-displayed leaves that can be used for crop cultivation monitoring

研究代表者

鈴木 栄（suzuki, sakae）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80397017

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、病害虫被害や生理障害に対する超早期防除対策が可能になる、情報表示ディスプレイ化した葉を有するGMバイオセンサー植物の開発を目的とした。研究の結果、モデル植物のタバコ遺伝子組換え個体において、UV、葉への過剰水分、葉の切断、コナジラミ(害虫)の接触などのストレス処理後に、アントシアニン色素により葉が赤色化する遺伝子の組み合わせを見出した。すなわち、シロイヌナズナ由来 AtDJ-1遺伝子(抗酸化タンパク質)のプロモーター用い、転写活性化因子VP16およびアントシアニン生合成経路の転写促進遺伝子(Atpap1)を制御した場合に、葉の赤色化が誘導された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本技術のGM植物は収穫対象ではなく、各種センサ機器と同等な生物センサとして、生産地に一定間隔で栽培することを想定しており、収穫対象作物の遺伝子発現情報を画像データとして活用し、直接サンプリングせずに遺伝子レベルの詳細なモニタリングが可能となる。将来的に本技術は、AI技術と融合させ様々な分野で利用できる「葉のディスプレイ化技術」へも発展可能である。また、消費者にも新たな価値を提供できる可能性がある。すなわち、購入者が温度や光などの栽培環境を変えることに反応し、花や葉の色や模様が変化するという新奇な観賞作物の作出につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we tried to develop a novel GM-plants with information-displayed leaves that can be used for crop cultivation monitoring. As a result of our research, in tobacco GM-plants, we found a combination of genes that causes leaves to turn red due to anthocyanin pigments after stress treatments such as UV exposure, excess water on the leaves, leaf cutting, and contact with whiteflies (pests). When the promoter of the AtDJ-1 gene (antioxidant protein) from Arabidopsis thaliana was used to control the transcriptional activator VP16 and the transcriptional promoter gene (Atpap1) of the anthocyanin biosynthetic pathway, leaf redness was induced.

研究分野：園芸学

キーワード：画像データ フラボノイド色素 プロモーター モニタリング センサ ストレス処理

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ICT, IoT, AI 等を活用したスマート農業の研究や実用化が国内でも進んでいる。多くのスマート農業では、生産地の環境(気温, 湿度, 日照量, 土壌など)の各種センサ情報や作物の生育状態の画像情報などが取得される。それらの情報は、その後の生育管理・収穫時期等の最適化の検証に利用され、生産現場へフィードバックされる。例として、作物の病虫害被害の防除や生育障害の防止を行う場合、まず、被害が発生した作物の画像情報を取得する必要がある。これらの情報が障害であると認識されたのち、実際に生産地での農薬散布, 施肥, 灌水などの具体的な対策がとられる。この一連の過程では、農地の全体または一部において、すでに目視(カメラで認識可能)できる障害が発生したあとの画像データを活用している。したがって、対策の遅延によるさらなる被害拡大があり得る(図1左)。

一般的に、植物における病虫害, 肥料不足, 環境ストレスなどに起因する病徴, 欠乏症状, 生理障害などは、これらの症状が表面化する前に、細胞・遺伝子レベルでの応答機構が存在する。したがって、被害が表面化する前にこれらの内部応答の情報を、カメラで認識可能なシグナルに変換し画像情報として取得できれば、被害に対する超早期予測・防除対策が可能になると考えられる。すなわち、広い生産地の作物における遺伝子レベルの変化を、迅速かつ容易にモニタリングできる新規システムを構築できる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、病虫害被害や生理障害に対する超早期防除対策が可能になる、情報表示ディスプレイ化した葉を有する「GM バイオセンサー植物」の開発を目的とする(図1右)。これらの GM 植物は、収穫対象ではなく、各種センサ機器と同等な生物センサとして、生産地に一定間隔で栽培し画像データを提供することを想定している。また、収穫対象作物と同じ品種の GM バイオセンサー植物(同時に不稔形質を導入)を用いることが好ましい。このシステムにより、収穫対象作物の遺伝子発現情報を画像データとして活用でき、直接サンプリングせずに遺伝子レベルの詳細なモニタリングが可能となる。

3. 研究の方法

(1) 「センサプロモーター」として利用する候補配列の探索： 現在、植物のストレス応答に関する細胞内シグナル伝達の初期に発現する遺伝子と、そのプロモーター配列が解明されつつある。本研究では、そのようなプロモーターを、症状が表面化する前の初期センサ(センサプロモーター)として利用した(図2中)。その候補として、シロイヌナズナ由来の遺伝子 *AtDJ-1*, *AtMPK2*, *AtNGA3* などのプロモーター配列を約 2Kbp 単離しセンサプロモーターとした。*DJ-1* 遺伝子は、動物や昆虫にも存在し、ヒトのパーキンソン病の原因タンパク質 PARK7 と同源性が高く抗酸化タンパク質として知られている。*AtMPK2* 遺伝子は、アブシジン酸応答や病害性ストレス応答のシグナル伝達経路(MAP カスケード)の関連因子として知られている。*AtNGA3* 遺伝子は、アブシジン酸生合成関連遺伝子である *NCED3* の転写活性化因子をコードする遺伝子の一つであり、維管束組織, シュート分裂組織, 根とシュートの接合部, 側根, 葉の全体において、乾燥ストレス条件下で一過的に発現が誘導される。

(2) センサプロモーターと植物色素を利用した緑色葉から赤色葉への変換： 植物のフラボノイド色素は、多くの作物の葉で生合成されやすく、ストレス反応のひとつとして合成されることも多い。フラボノイド色素の一種であるアントシアニン(シアニジンなど)は、緑色の葉で合成されると赤色になり認識されやすく、目視やカメラによる画像情報の取得などが容易になる。本研究では、活性化されたセンサプロモーターが、遺伝子応答の情報を葉にディスプレイ表示(赤色化)する仕組みの構築を目指した(図2)。また、フラボノイド色素は、多くの植物において構造解析や生合成経路関連遺伝子の単離が報告されているため、本技術は複数の作物に適用可能な汎用性の高いシステムと言える。本研究では、シロイヌナズナ由来のアントシアニン生合成経路の転写促進遺伝子(*Atpap1*)を、センサプロモーターで制御する(図2)。*Atpap1* 遺伝子は、単独で複数のアントシアニン生合成遺伝子の発現を促進し葉を赤色化できる。一方、前述のセンサプロモーターは、細胞内での活性が比較的低いことも知られており、単独

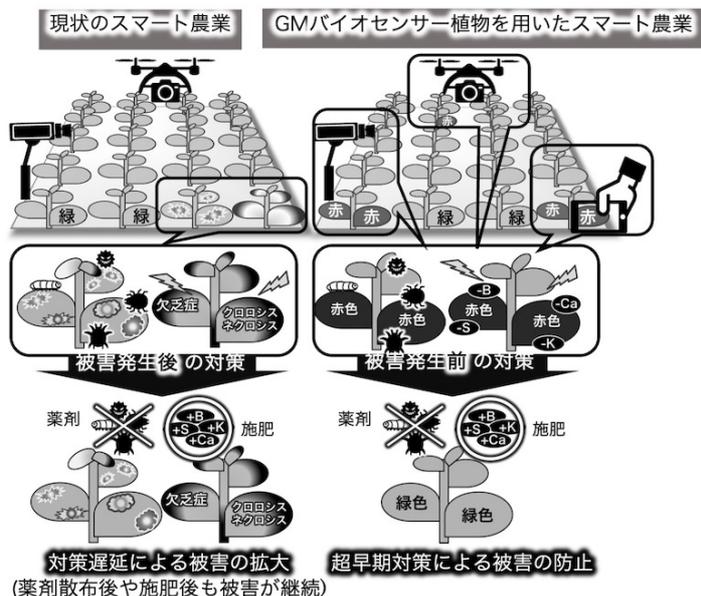


図1 画像情報を用いたスマート農業における現状(左)と本研究(右)の違い

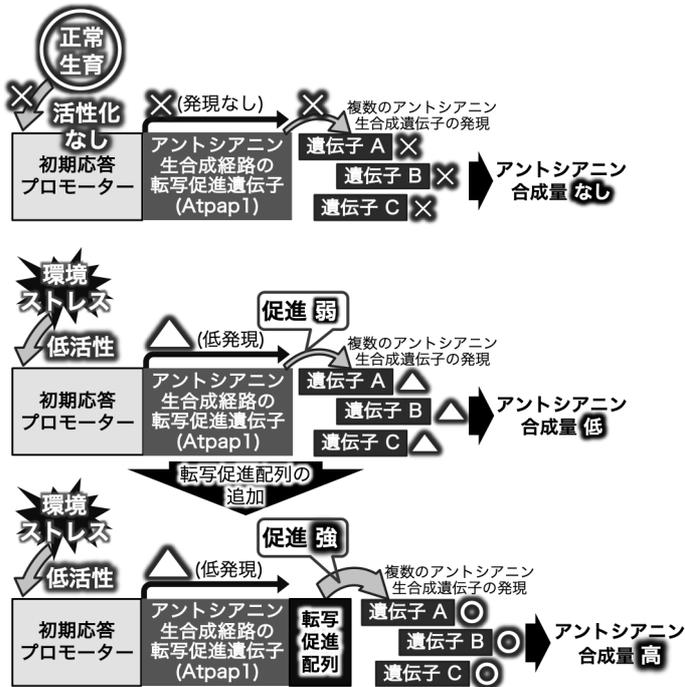


図2 センサプロモーターを介した各種ストレスによる色素合成遺伝子の発現制御：上)ストレスなし，中)ストレスあり，下)転写促進配列の追加による転写促進の強化

AtDJ-1 プロモーターを用いた場合は，高温（45°C・3時間/日；図3a），UV（254nm・10分/日；図3b），コナジラミの感染（成虫による吸汁がある状態；図3c），傷処理（メス等で葉を切断した断面）において，葉に多くの赤色が確認された．赤色が確認できるまでの平均日数は，UV（2日），高温（3日），傷（4日），コナジラミ（5日）の順番で，試験個体によってはそれぞれ1～2日の差があった．また，形質転換体の当代と自殖後代の実生個体においても，同様の結果となった．AtDJ-1 遺伝子は生体内の活性酸素種の発生と密接に関連しているため，そのプロモーター配列は各種ストレス処理後に活性化されやすいと考えられる．AtMPK2 プロモーターを用いた場合は，形質転換体の当代と自殖後代の実生個体において，各種ストレス処理を行っても着色変化はほとんど観察できなかった．AtNGA3 プロモーターを用いた場合は，遺伝子導入を行う際の葉片からの再分化時から不定芽の赤色がみられ，植物体への再分化も困難であった（図3d）．AtNGA3 遺伝子は，オーキシンの合成・輸送にも関連するため，プロモーターが培地中のオーキシン（NAA）に反応して活性が上昇している可能性が考えられる．

AtDJ-1 プロモーターを用いた個体において，リアルタイムPCR解析でAtpap1遺伝子の発現量を調査した結果，各種ストレス処理の開始直後からの発現量の上昇および低下に差がみられた．UVや高温処理は処理開始1～2日後に発現量のピークがあり，傷処理は2～3日後にピークがあった．AtDJ-1 遺伝子のプロモーター配列と，各種ストレス処理時の活性酸素種の生成タイミングや量などの間には関連性があると予想される．今後は，各種ストレスと生体内の一連の反応

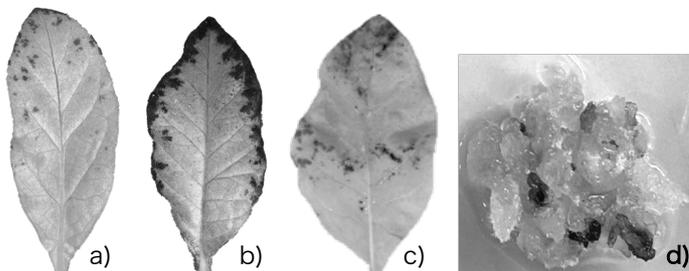


図3 各種ストレス処理後のタバコの葉の着色および再分化中の不定芽 a), b), c) : AtDJ-1p::Atpap1 導入個体, d) : AtNGA3p::Atpap1 導入個体 a) 高温処理, b) UV 処理, c) コナジラミの感染, d) 再分化中の不定芽

本技術はまだ開発の初期段階であり，実用化に向けて多くの課題が存在する．本技術と同様に，ビッグデータ解析やAI技術は，病害虫被害や生育障害などの農業現象の超早期予測が可能で，被害発生を未然に防止できると予想されている．しかし，近年の気象環境の大きな変動幅や多品目栽培への適用などの理由から，正確な予測が困難になりつつある．本技術はAI等の新技術との競合ではなく，むしろ融合させることで，農業現象の予測精度を飛躍的に向上させる可能性を持つと考えられる．広い生産地において，工学的なセンサ機器のみでは，遺伝子レベルの情報を

ではAtpap1遺伝子の発現量と色素合成量が低い可能性がある（図2中）．そこで本研究では，転写活性化因子VP16またはVP64の利用を試みる．VP16とVP64は，ヒトに感染する単純ヘルペスウイルス由来のタンパク質で，遺伝子発現の転写を活性化することが知られている．これらの配列をAtpap1遺伝子の3'末端側に結合させることにより（図2下），活性の低いセンサプロモーターでも色素合成量を高めることができ，カメラ等で認識しやすくなると予想される．

#### 4. 研究成果

全身過剰発現（CaMV35Sp）または各センサプロモーターを持つベクターを作成し，モデル植物のタバコ（*N. tabacum*, SR-1）の形質転換体を作成した．形質転換体の当代と自殖後代において，温度，光，湿度，UV，過酸化酸素，パラコート，アブシジン酸，害虫（コナジラミ），傷処理などの，各種ストレスを与え栽培を行った．なお，野生型のタバコにおいてこれらの各種ストレス処理を行っても，目視や実体顕微鏡で判別できる葉の赤色化は確認できない．

（活性酸素種の発生，プロモーター配列の活性化，Atpap1遺伝子の発現，アントシアニン合成など）を解析することで，ストレスから色素合成までの時間をさらに短縮できる可能性がある．また，センサプロモーターとして最適な候補配列の探索や，アントシアニン合成以外の視覚的な指標の探索を継続することで，最終目標に近づくと考えられる．

リアルタイムかつ正確に取得することは困難である。また、本技術は、センサ機器が作物の遺伝子発現情報に直接接続された状態を擬似的に作り出しており、工学と生物学の境界を超えた農業工学技術を構築できる可能性を持つ。一方、生体内の遺伝子発現をモニタリングする方法として、GFP(緑色蛍光)や LUC(発光)などのレポーター遺伝子が存在する。しかし、情報取得には特殊な励起波長光源や高感度カメラを使用するため、生産現場での利用は容易ではない。本技術開発は、一般的なカメラでも認識可能な葉色を遺伝子発現情報として取得できるため、生産地での容易・低コストなモニタリングにつながる可能性がある。

最後に、本技術は GM 作物を利用した技術開発である。GM 作物は農業分野において潜在的な高い可能性を持つが、欧州や日本において消費者からの不信感を払拭できていない。実用化の理想としては、収穫対象作物と同じ作物種の GM バイオセンサー植物を作出し、生産地で同時に栽培することである。従来のほとんどの GM 作物は、収穫対象作物として栽培されているが、本技術の GM 植物は収穫せずにセンサとして生産地で活用する。その一方で、GM 作物には「意図しない拡散と生態系への影響」が指摘されている。GM 作物の拡散防止技術のひとつとして、花粉が形成されない(または受精能力のない)不稔形質を利用する手法がある。しかし、花卉等の観賞用作物では問題ないが、受粉後の果実や種子を商業生産する作物(トウモロコシやナタネなど)には適用は困難である。そこで我々は、「DNA メチル化制御機構を用いた自発的な枯死誘導による GM 作物拡散防止技術」についても検討を行なっている(国立大学法人東京農工大学, 鈴木栄, 室井達哉(2023): 形質転換植物及びその作出法, 特許第 7208614 号)。この技術は、一定栽培期間を経過した後に、自発的に枯死するシステムをあらかじめ GM 作物に導入しておき、GM 作物の意図しない拡散を防止するものである。また、この技術は、不稔形質を利用しないため果実・種子生産に影響せず、品種の無断増殖の防止、外来植物や雑草の駆除、他の生物種への応用、植物と昆虫を含めた生態系・生物多様性の維持などに貢献できる可能性を有する。将来的には、このような技術と GM バイオセンサー植物を組み合わせることで、GM 作物を有効活用した新たなスマート農業システムを構築できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakae Suzuki, Mari Kimura, Rei Yasuda, Naoya Wasano, Yutaka Sasamoto, Yoshiharu Fujii, Hamako Sasamoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Strong Allelopathic Activities of Leaves and Cultured Cells of <i>Spiraea thunbergii</i> Assayed by the Protoplast Co-Culture Method with Digital Image Analysis: Evaluation of Cis- and Trans-Cinnamic Acid as Allelochemicals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 1673-1687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/ajps.2021.1211117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakae Suzuki, Waki Nakagawa, Yutaka Sasamoto, Hamako Sasamoto	4. 巻 Vol. 12, No. 1
2. 論文標題 Strong Allelopathic Activity in Purple Leaves of Transgenic <i>Spiraea cantoniensis</i> Containing Cyanidin 3-Glucoside Assayed by the Protoplast Co-culture Method with Digital Image Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Plant Studies, accepted at June 3, 2023	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井原僚介・室井達哉・鈴木栄
2. 発表標題 RdDMによるGM作物拡散防止技術の開発を目的としたタバコにおけるDNAメチル化阻害剤の利用およびPnZlPpで制御された新規メチル化標的遺伝子の導入
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口恵実・伊藤莉沙・鈴木栄
2. 発表標題 葉脈葉縁特異的プロモーターとトレニア由来 TfMYB1 遺伝子によるタバコおよびトレニアの葉色改変
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木智之・中野優・中塚貴司・大谷真広・市橋彰歌・小嶋紗英香・鈴木栄
2. 発表標題 花色改変を目的としたホトトギス属植物へのベタレイン生合成遺伝子の導入
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本淳之助・吉岡直也・中塚貴司・高橋さくら・鈴木栄
2. 発表標題 キュウリ果実での機能性色素の蓄積を目的とした各種生合成遺伝子の導入
3. 学会等名 園芸学会令和5年度春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田洋太郎・酒井亜美・村松高広・高橋さくら・鈴木栄
2. 発表標題 ニンジン培養細胞におけるクリプトキサンチンの蓄積を目的としたカロテン水酸化酵素遺伝子の発現抑制
3. 学会等名 園芸学会令和5年度春季大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 作物栽培モニタリングに利用可能な情報ディスプレイ化した葉を持つ新規遺伝子組換え植物の開発	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北陸館	5. 総ページ数 6
3. 書名 アグリバイオ	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 形質転換植物及びその作出法	発明者 鈴木栄，室井達哉	権利者 国立大学法人東京農工大学
産業財産権の種類、番号 特許、7208614	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西尾 直之  (Nishio Naoyuki)		
研究協力者	井原 僚介  (Ihara Ryosuke)		
研究協力者	山口 恵実  (Yamaguchi Emi)		
研究協力者	鈴木 智之  (Suzuki Tomoyuki)		
研究協力者	山本 淳之助  (Yamamoto Zyun-nosuke)		
研究協力者	原田 洋太郎  (Harada Yotarou)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------