

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19205

研究課題名(和文) 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作物拡散防止技術の開発

研究課題名(英文) Development of technology for preventing GM crops-contamination by induction of autonomous lethal using control of DNA methylation system

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子組換え(GM)作物の意図しない拡散と生態系への影響を防止するための、新たな技術の開発を目的とした。この新技術は、一定の商業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、拡散を防止しようとするものである。研究の結果、モデル植物のタバコにおいて、DNAのメチル化誘導による遺伝子発現抑制機構を利用し、自発的に枯死する形質の「一時的な抑制」に成功した。一方、その一時的な抑制を「解除」し、自発的に枯死を誘導するタイミングについては、今後さらに検証する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、花粉の形成阻害や飛散防止などの従来技術と異なり、栽培期間中に花粉、果実、種子形成等を阻害しない、新たなGM作物の拡散防止技術の確立につながると予想される。また、本技術は、GM作物が種子形成や野生種との雑種形成を行った場合も、その次世代や雑種に対して自発的に枯死を誘導できる。本研究をさらに進展させることにより、GM作物の拡散防止技術の開発だけでなく、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が可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we tried to develop a technology for preventing GM crops-contamination by induction of autonomous lethal using control of DNA methylation system. In tobacco plants, two type of vector, target and silencer vector were introduced by co-inoculation with Agrobacterium method. The target vector has NtPDS-RNAi (inverted repeats sequence) gene controlled by PnZIP promoter (green tissue specific expression), the silencer vector has PnZIPp-RNAi (inverted repeats sequence) gene controlled by LjJUB1p (strong-systemic expression). The leaf of T0 and T1 transgenic plants showed white, green or green-white mixed color. DNA methylation analysis by bisulfite sequencing indicated that, the green leaf and green-white mixed leaf plants had the target gene with DNA methylated PnZIPp sequence, and the white leaf plants had the target gene with no-methylated PnZIPp sequence. Furthermore, DNA methylation rate of cytosine in PnZIPp target sequence was more than 80%.

研究分野：園芸学

キーワード：遺伝子組み換え作物 GM作物 拡散防止 メチル化 脱メチル化 RNAi カロテノイド エピゲノム編集

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在主流の遺伝子組み換え(GM; Genetically Modified)作物は、生産性の向上を目的とした、除草剤耐性や病害虫耐性形質を導入した食用・飼料用作物である。複数の国々でその栽培面積が毎年増加していることから、GM作物が農業上重要な農作物に位置づけられていることがわかる。GM作物は、あらゆる形質の導入を可能にする潜在的能力を持ち、将来的にも農業以外の様々な産業構造や社会を一変させる可能性を秘めていると考えられる。一方、GM作物栽培の問題点として、以前より「GM作物の意図しない拡散と生態系への影響」が指摘されている。GM作物のような高い潜在能力を持つ新技術を社会に実装する場合は、様々なリスク管理に対しても最大限の技術を用い、そのリスクを除去することが望ましい。これまでのGM作物のリスク管理・対策は、食品安全性の評価に重点が置かれ、生態系への影響に対しては不十分であると言える。GM作物のこのようなリスクを最小限にするためには、GM作物自体またはGM作物の花粉や種子の拡散を確実に防止する、これまでにない技術が必要であると考えられる。現在、GM作物の拡散防止の技術として、不稔形質(花粉が形成されないまたは受精能力がない)や単為結果品種を利用する手法がある。しかし、花き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)には適用できない。

2. 研究の目的

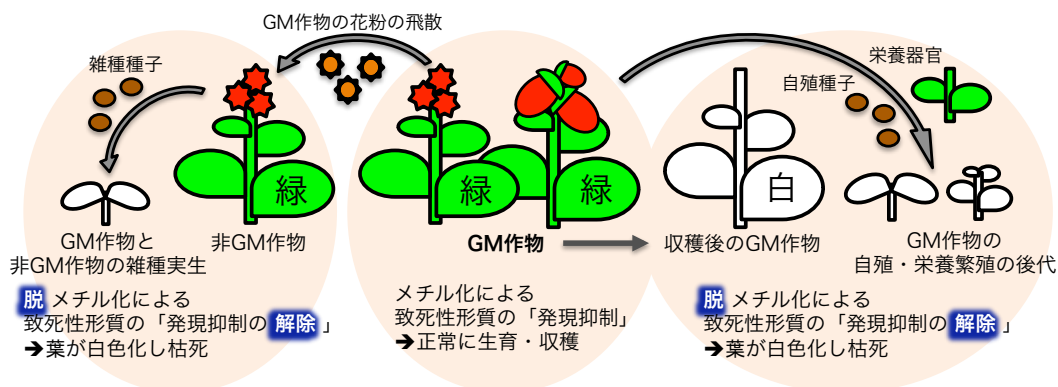
そこで本研究では、一定の商業栽培期間を経過した後に、自発的に枯死するシステムをGM作物に導入することにより拡散を防止する、これまでにない新たな技術の開発を目的とした。本技術は、新品種を作る際にあらかじめ枯死するプログラムを同時に導入するシステムで、農学分野でも前例のない新奇な技術となる。また、本研究の自発的な枯死誘導は、花粉形成を阻害しないため、ほとんどの作物に適用可能な新たなGM作物拡散防止技術となる。

3. 研究の方法

(1) 概略

1. 枯死を誘導する手法として、外来性RNAi (PTGS; 転写後抑制型ジーンサイレンシング)を用いた内生カロテノイド合成遺伝子の発現抑制を利用した:最適な時期にこの致死性形質が植物体の葉のみで機能することにより、葉が白色化しGM作物は枯死する。本研究では、光合成器官の葉だけでこれらの発現制御を行うことで、収穫される果実や種子への影響を最小限に抑えることを試みた。この致死性形質の発現時期を後述する手法2)で制御し、GM作物の拡散を防除する。致死性形質の誘導時期としては、果実や種子の収穫直後(栽培期間の終了後)、種子繁殖の次世代から数世代後、栄養繁殖の1年から数年後などが考えられる(図1右)。また、この致死性形質を導入したGM作物の花粉は、優性形質として通常の遺伝法則に従う。そのため、この花粉の飛散により周辺の非GM作物との雑種種子が形成される場合でも、その種子は発芽後に白色化し自発的に枯死する(図1左)。したがって、GM作物のDNA分子は多くて数世代までしか伝達されず、GM作物当代だけでなく雑種後代への拡散も、確実に防止することができると考えられる。

2. 枯死誘導を制御する手法として、DNAのメチル化・脱メチル化機構を利用した:致死性形質を誘導するプロモーター領域をメチル化の標的(外来性ヘアピン構造を用いたTGS; 転写抑制型ジーンサイレンシング)とすることで、一定期間のみGM作物の致死性形質の発現を抑制できる(一部検証済み; 図1中央)。その後、メチル化領域の脱メチル化現象を利用し、「致死性形質の発現抑制」を「解除」させ自発的な枯死を誘導する(図1右左)。



(2) 具体的な方法：本研究はモデル植物のタバコ (SR-1) を用い、以下のように行った。

1. 緑色組織特異的プロモーターを用いた内生カロテノイド生成遺伝子の PTGS による白色化と枯死の確認：タバコのカロテノイド生成遺伝子 (フィトエン不飽和化酵素；NtPDS) を標的として、部分配列の逆向き繰り返し構造 (ヘアピン構造) を作成し、アサガオ由来クロロフィル生成関連遺伝子プロモーター (PnZIPp) で制御した。

2. プロモーター領域の DNA メチル化の誘導、および解析用の各形質転換体の作出：致死性形質を制御する PnZIPp 領域を標的 (ターゲット) として、部分配列のヘアピン構造を作成 (サイレンサー) し、全身高発現性のミヤコグサ由来ポリユビキチン遺伝子プロモーター (LjUbi) で制御した (図 2-B1)。この外来性 NtPDS ヘアピン構造ベクターにより PnZIPp のターゲット配列のメチル化が誘導され、続いて TGS (転写抑制型ジーンサイレンシング) による致死性形質の発現抑制が起こる (図 2-B2)。

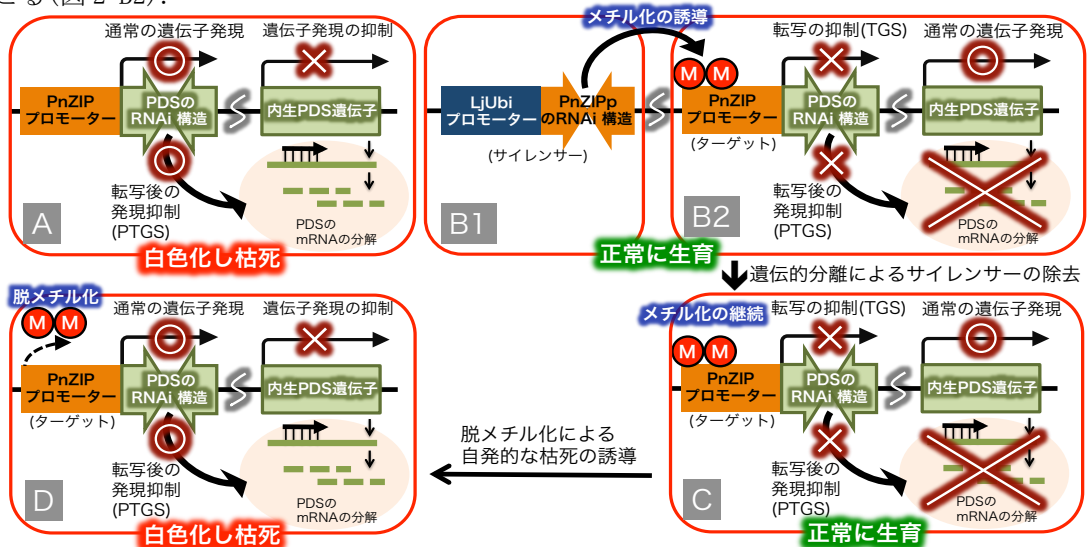


図2 標的プロモーター配列のメチル化・脱メチル化による内生 PDS 遺伝子の発現制御

4. 研究成果

(1) CaMV35S および PnZIP プロモーターによる葉の白色化：まず、両プロモーターで制御した NtPDS ヘアピン構造 (致死性形質) が、葉の白色化と枯死を誘導するかについて検証した。その結果、形質転換当代 T0 では、両プロモーターにおいて、完全に葉の白色化した個体が約 50% 以上出現し、それらの個体は土に移植しても数日以内に枯死した (図 3-1)。緑色と白色の混色模様の葉を持つ個体は、移植後もある程度生育するが、成長速度が遅く開花する前に枯死する割合が高かった (図 3-2)。したがって、両プロモーターで制御した NtPDS ヘアピン構造は、致死性形質として十分利用できる、図 2 のターゲット配列としても利用できることがわかった。以降の実験には、ターゲット配列として、PnZIPp を用いた。

(2) ターゲットおよびサイレンサー配列を持つ系統の作出とメチル化されたターゲット配列のみを持つ系統の選抜：緑色の再分化個体のうち、両配列が導入された系統を PCR 分析で選抜した (図 4-1)。このような緑色個体は、ターゲットのメチル化により致死性形質が抑制されている可能性が高い。非形質転換体との交配を行い、遺伝的な分離を利用してターゲットのみ導入された後代 (T1 世代) を選抜するため、サイレンサー配列が 1 コピーの系統 (多コピーの場合は後代で除去が困難) をサザン分析により選抜した。選抜した 4 系統について、メチル化感受性制限酵素解析およびバイサルファイトシーケンスを行った結果、これらの系統のターゲット配列では、ほぼ全てのシトシンがメチル化されている (平均 80% 以上) ことが示された (図 4-2)。

(3) 非形質転換体との交配で得られた T1 世代での解析：選抜した 4 系統をもとに、非形質転換体との交配により、サイレンサー配列が除去されターゲットのみ導入された T1 系統を選抜した。T1 系統の表現型は、緑色系統、および緑色と白色の混色系統が存在した (図 5-1)。T1 系統について、メチル化解析を行った結果、全ての系統において、ほぼ全てのシトシン (C) がメチル化されており (平均 80% 以上)、T0 系統 (サイレンサー配列含む) と同様の傾向であった (図 5-2)。この結果より、サイレンサー配列が除去されターゲット (致死性形質) のみ導入された T1 系統でも、メチル化が高度に維持されていることがわかった。また、そのメチル化維持が致死性形質を抑制することで、緑色または混色模様系統が出現することが明らかになった。さらに、混色系統の白色葉は、メチル化レベルが低下していると予想されるため、この部分のみでメチル化解析を行った。その結果、対称配列である CG、CHG 配列のメチル化レベルは維持され、非対称配列の CHH 配列のメチル化レベルが有意な低下が確認された (図 5-3)。したがって、CHH 配列のシトシンのメチル化がターゲット配列のサイレンシングに重要であることが示唆された。

(4) まとめと今後の展望：

本研究において、「DNA のメチル化・脱メチル化による自発的な枯死誘導」のうち、人為的なメチル化による「致死性形質 (自発的な枯死) の抑制」については、目標とした成果が得られた。一方、「致死性形質の抑制」の「解除」に相当する脱メチル化については、解析が不十分であると

言える。現段階では、後代においても、ターゲット配列のメチル化が高度に維持されていることから、今後は、脱メチル化の効果的な誘導方法や、T1以降の世代でのメチル化解析などを進める必要がある。また、本研究をさらに進展させることにより、GM作物の拡散防止技術の開発だけでなく、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が可能であると考えられる。



図 3-1 PnZIPp+NtPDSヘアピン構造を導入した白色タバコ



図 3-2 PnZIPp+NtPDSヘアピン構造を導入した混色模様のタバコ



図 4-1 ターゲットおよびサイレンサー配列を持つ緑色系統

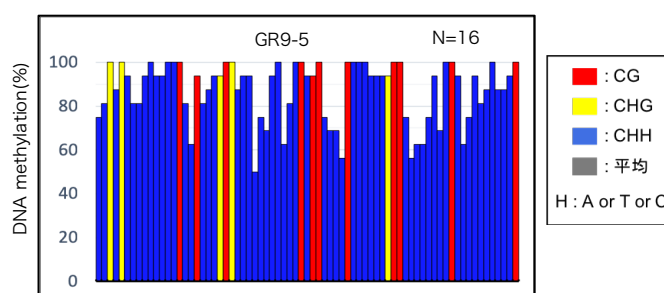


図 4-2 T0世代のターゲット配列におけるメチル化率



図 5-1 ターゲット配列のみ導入されたT1系統

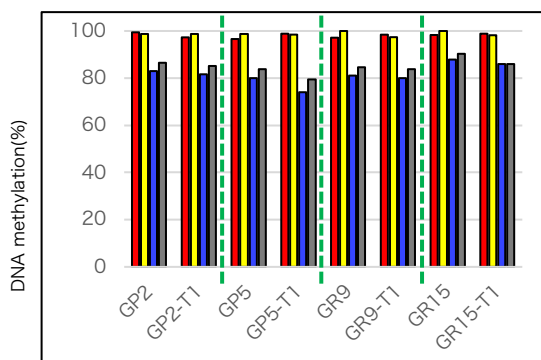


図 5-2 T0およびT1世代のターゲット配列におけるメチル化率の比較

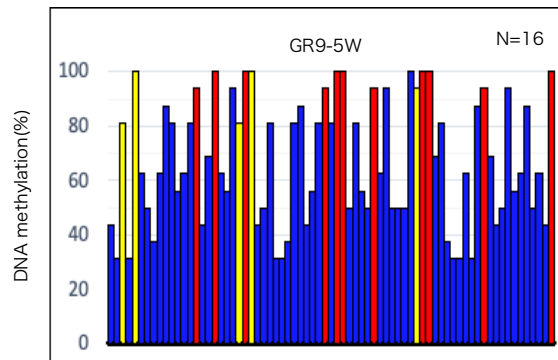


図 5-3 T1世代の白色葉のターゲット配列におけるメチル化率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bodin Phadungsawat, Keiichi Watanabe, Shinji Mizuno, Motoki Kanekatsu, Sakae Suzuki	4. 巻 261(5)
2. 論文標題 Expression of CCD4 gene involved in carotenoid degradation in yellow-flowered Petunia × hybrida	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108916	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 室井達哉, 鈴木栄
2. 発表標題 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RNA依存型DNAメチル化の誘導
3. 学会等名 園芸学会平成30年度秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 孫暢, 鈴木栄
2. 発表標題 タバコにおけるAtDJ1プロモーターを用いた環境ストレス応答の視覚化
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市橋彰歌, 鈴木栄, 中野優, 大谷真広, 三沢典彦
2. 発表標題 カロテノイド色素合成関連遺伝子によるホトトギスの花色葉色改変および形態への影響
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Bodin Phadungsawat, 金勝一樹, 渡辺慶一, 水野真二, 鈴木栄
2. 発表標題 Flower color alteration by introduction of crtW gene in Petunia × hybrida
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 形質転換植物及びその作出方法	発明者 鈴木栄, 室井達哉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-178097	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

講演： 東京農工大学 新技術説明会「自発的な枯死誘導システムを利用したGM作物の拡散防止技術」 https://shingi.jst.go.jp/kobetsu/tuat/2019_tuat/tech_property.html
新聞記事： 日経産業新聞「Next tech2030」, 2019年8月9日, p6, 「収穫後結れる組み換え作物に」

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	室井 達哉 (muroi tatsuya)		
研究協力者	井原 僚介 (ihara ryousuke)		

6. 研究組織(つづき)

	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	市橋 彰歌 (ichihashi ayake)		
研究協力者	孫 暢 (son cho)		
研究協力者	パデュンサワット ボディン (Phadungsawat Bodin)		