

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2023

課題番号：19KK0390

研究課題名（和文）形質転換効率の品種間差の解消に関する研究

研究課題名（英文）Research on eliminating varietal differences in transformation efficiency

研究代表者

野中 聡子（Nonaka, Satoko）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50580825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：形質転換効率が安定しているメロン品種 'Vedrantais' (VD) と形質転換体がほとんど取れない 'Piel de Sapo' (PS) を材料にし、形質転換効率の品種間差に関連する遺伝的因子の探索に取り組んだ。2つの品種の再分化効率と形質転換効率を求めた。次に、'Piel de Sapo' の一部が 'VD' で置き換わった染色体置換系統を用いて形質転換できる・できないを調査した。'PS' の形質転換効率は、0.1%以下であるのに対し 'VD' は2%程度であった。4番、5番、8番染色体が 'VD' に置き換わった 'PS' では、形質転換が可能であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに形質転換系の構築は、ともかくやってみながらホルモンの濃度を変えるなど微調整をするしかないという経験則によるのだった。本研究は形質転換効率の品種間差に関連する遺伝因子を明らかにするものであり、形質転換系の構築の際に遺伝的知見を活用することができるため、誰もが容易に色々な植物種で形質転換系を構築することができるようになる。その結果、ゲノム編集技術や形質転換技術が利用できる作物種が多くなる。このため、育種分野へ貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：Using the melon cultivar 'Vedrantais' (VD), which has a stable transformation efficiency, and 'Piel de Sapo' (PS), which hardly produces transformants, we attempted to identify genetic factors related to the varietal difference in transformation efficiency. We determined the regeneration and transformation efficiencies of the two cultivars. Next, we investigated whether transformation was possible or not using a chromosome substitution line in which part of 'Piel de Sapo' was replaced with 'VD'. The transformation efficiency of PS was less than 0.1%, while that of 'VD' was about 2%. We found that transformation was possible with 'PS', in which chromosomes 4, 5, and 8 were replaced with 'VD'.

研究分野：遺伝育種

キーワード：形質転換効率 品種間差 アグロバクテリウム 再分化

1. 研究開始当初の背景

**基課題で開発した次世代型スーパーアグロバクテリウムの形質転換能力の評価とその改良**

この目的のために以下の2課題を設定した。

**課題1：複数のメロン品種を用いたスーパーアグロバクテリウムの形質転換能力の評価**

**課題2：メロン品種間の形質転換効率の差の原因遺伝子探索のための F<sub>2</sub> 集団の作成とその解析**

基課題にて開発した次世代型スーパーアグロバクテリウム(Ver.6)の形質転換能力の評価には、遺伝的背景が多様で様々な形質を持つ作物種を用いるのが適している。メロンは、多種多様な形態を持つ品種や系統が存在する。また、メロンの形質転換効率は品種によりさまざまであり、形質転換が可能な品種から形質転換の効率が極めて低く成功例のないものまで多数存在している(表1)。Garcia-Mas 博士は、様々なメロンの品種を有しており、Hernánd 博士は、一部のメロン品種において、形質転換系を確立している。そこで、Garcia-Mas 博士が保有する多種多様なメロン品種と Hernánd 博士の確立した形質転換系を用いて基課題で作出した次世代型スーパーアグロバクテリウムの能力を評価する。

一方で、Hernánd 博士はこれまでに、メロンの変種ごとに形質転換効率は様々あることを見出している。また、メロンの変種間において、生殖的隔離がなく、容易に交雑系統を作出することができる。このため、形質転換効率の高いメロンの変種と低いメロン変種を交雑し、F<sub>2</sub> 集団の作出とその遺伝学的に解析により形質転換効率のメロン品種間差の原因遺伝子を同定することができる。形質転換効率の品種間差因子の同定は、広い植物種で形質転換効率を向上する次世代型スーパーアグロバクテリウムのさらなる改良に大きく貢献し、基課題を大きく推進できる。

表1 メロンの主な変種と品種および形質転換効率

変種(var.)	品種(cv.)	形質転換効率
<i>Cantalupensis</i>	 Charentais	成功例なし
	Vedrantais	2-3%
	Cantaloupe	成功例なし
<i>Reticulatus</i>	 Earl's Favorite	成功例なし
	Galia	4%
	Delce	成功例なし
<i>Chinensis</i>	 PI161375	成功例なし
<i>Inodorus</i>	 Honeydew	成功例なし
	Piel de sapo	成功例なし
<i>Conomon</i>	 Makuwa	成功例なし
	Shirouri	成功例なし

これまでに、Garcia-Mas 博士は、メロンの QTL 解析において目覚ましい業績を上げており、メロンの重要形質を担う様々な遺伝子を多数見出している。

2. 研究の目的

Garcia-Mas 博士の研究室に滞在しメロン変種の形質転換効率の差について QTL 解析のための集団系統の作出とその解析に取り組む。

3. 研究の方法

ウリ科作物は、世界中の中緯度温帯地域で広く栽培され、メロンをはじめとする重要作物群を含む。また、品種改良も盛んに行われており、そのためのマーカーの構築、遺伝子機能解析などが世界中で精力的に推進されている。実際に、ウリ科国際コンソーシアム(International Cucurbit Genomics Initiative, ICuGI)が結成され、国際的なプロジェク

トとして、ゲノム配列の解読、変異体集団の整備などが進みつつある。形質転換技術もウリ科作物は全般的に形質転換が難しく、また品種間差も大きいことが知られており、遺伝子機能解析や分子育種における律速となっている。この解消は国際コンソーシアム全体において重要な課題であり、その解消が求められている。ウリ科研究の国際コンソーシアム ICuGI の中心メンバーの一人である Garcia-Mas 博士 (Centre for Research in Agricultural Genomics、スペイン) は、西洋品種から東洋品種まで幅広く多種多様な遺伝的背景を持つメロンの系統を有しており、これらを利用したメロンの QTL 解析において目覚ましい業績を上げている。また、同じくスペインの Hernánd 博士 (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) は、メロン品種において、形質転換系の確立に取り組んでいる。これまでにごく限られた品種においてメロンの形質転換は成功しているが、より多くの様々な品種での形質転換系の確立に取り組んでおり、形質転換が極めて低い品種もいくつか見出されている。形質転換効率が極めて低い品種について、申請者がこれまでに開発してきた形質転換効率を向上させるスーパーアグロバクテリウム (Nonaka et al., 2008 AEM, Nonaka et al., 2017 Scie Rep) および基課題で開発する次世代型スーパーアグロバクテリウムの利用が期待されている。

以上のような国内外の研究動向を踏まえ、本研究課題では以下の 2 課題に取り組む。

### **課題 1：多種多様なメロン系統を利用し、基課題で作出した次世代型スーパーアグロバクテリウムの能力を評価し、品種間差解消に利用する。**

申請者は、これまでにアグロバクテリウムの感染時、植物から発生し、形質転換を阻害する植物ホルモンのエチレンや低分子アミノ酸の  $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)に着目し、その除去能力をアグロバクテリウムへ付与し、スーパーアグロバクテリウム(Ver. 1～Ver. 3)を構築した (Nonaka et al., 2008 AEM, Someya and Nonaka et al., 2013 Microbiologyopen, Nonaka et al., 2017 Scie Rep)。その結果、いくつかの難形質転換植物で高効率な形質転換が可能になった。基課題においては、広い植物種に共通する形質転換阻害機構に着目し、次世代型スーパーアグロバクテリウム(ver.4)を作成し、より多くの植物品種への高効率形質転換系の付与と形質転換効率の品種間差の解消を目指す。これらのスーパーアグロバクテリウム(ver.1-ver.4)について、Garcia-Mas 博士の保有する多種多様なメロン品種と Hernánd 博士の持つ形質転換系の提供を受けて形質転換能力を評価する。さらには、形質転換におけるメロン品種間差の解消に役立てる。

### **課題 2：メロン品種における形質転換効率の差の遺伝的要因を明らかにするために F<sub>2</sub> 集団系統の作出とその解析**

形質転換効率の品種間差の解消を目指す場合、植物側のどのような因子がアグロバクテリウムによる形質転換に関与するかを明らかにする必要がある。現在までに申請者は、エチレンや低分子アミノ酸の  $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)がアグロバクテリウムの感染時、植物から発生し、形質転換を阻害することを見出し、その除去能力を付与したアグロバクテリウムを作出している。その結果、いくつかの難形質転換植物で高効率な形質転換を可能にした (Nonaka et al., 2008 AEM, Nonaka et al., 2017 Scie Rep)。しかしながら、エチレンや GABA の発生量は植物種、作物種、品種・系統により多様であり、十分な効果が得られない場合があった。そこで、基課題では、作物を含むさらに広範囲な植物種への高効率な形質転換を可能にするためには、広い植物種に共通する形質転換阻害機構に着目してアグロバクテリウムを改良することとした。しかしながら、アグロバ

クテリウムに強力な病原性を付与するものであり、植物そのものにダメージを与える可能性もある。形質転換効率の品種間差解消のために、植物側の新規の形質転換抑制・促進因子を見出し別のアプローチを見いだすことが、さらなるアグロバクテリウムの改良において重要だと考えている。そのために Garcia-Mas 博士の保有する多種多様なメロン品種のうち、Hernánd 博士が見出した形質転換効率の高い品種と低い品種を交雑し F<sub>2</sub>集団を作出する。Garcia-Mas 博士とともに QTL 解析、次世代シーケンサーによる解析、RNA-seq による解析を実施し、新規の形質転換抑制・促進因子を見出す。

以上のように、本申請課題の遂行においては、Garcia-Mas 博士と Hernánd 博士との共同研究が不可欠である。そこで、本国際共同研究の支援を受けて、申請者がスペインにて Jordi Garcia-Mas 教授とともに基課題で作出した次世代型スーパーアグロバクテリウムの能力を評価、メロン品種における形質転換効率の差の遺伝的要因を明らかにするために F<sub>2</sub>集団系統の作出とその解析に取り組む。

#### 4. 研究成果

##### **課題 1：多種多様なメロン系統を利用し、基課題で作出した次世代型スーパーアグロバクテリウムの能力を評価し、品種間差解消に利用する。**

これまでに、植物ホルモンのエチレンや低分子アミノ酸のγアミノ酪酸(GABA)がアグロバクテリウムによる植物遺伝子導入を阻害することが知られていた。申請者は、これらを抑制するアグロバクテリウムを作出していた。これらのアグロバクテリウムは、トマトやリンドウなどで効果が示されていた。本研究では、形質転換が難しいとされるメロンの形質転換に用いて効果を調査した。メロンの形質転換法には、液体培地を用いる不定胚誘導法と固形培地を用いる不定芽誘導法がある。まずは、不定胚誘導法は、再分化効率が良いと報告がされていたため、まずはこの手法を用いて効果を試みた。4000 以上のメロン外植片に対し形質転換を試みたが、エチレン発生抑制および GABA 分解能を付与したアグロバクテリウムを用いても形質転換体を得ることができなかった。次に、固形培地を用いて不定芽誘導法を用いて形質転換を試みたところ、開発済みのアグロバクテリウムを用いずとも、形質転換体を得ることができた。その効率は 100 メロン外植片から 1 から 2 の形質転換体を得られるほどであった。以上のことから、アグロバクテリウムによる遺伝子導入は形質転換のうちの重要なステップの一つであるが、再分化系の最適化がより重要である可能性が高い。

##### **課題 2：メロン品種における形質転換効率の差の遺伝的要因を明らかにするために F<sub>2</sub> 集団系統の作出とその解析**

イボメロン'Védrantais'は、100 枚の子葉外植片をアグロバクテリウムに感染させると 1-2 個体の形質転換体を作成できるのに対し、フユメロン'Piel de Sapo'は 1000 枚の子葉外植片処理して 1 個体得られるといった程度のものである。10 回の形質転換操作で 1 個体得られるかどうかであり、極めて低かった。また、アグロバクテリウムを感染させずに再分化の様子を観察したところ、'Védrantais'は Shoot bud が 70%程度の割合で出現するのに対し、'Piel de Sapo'の場合はほとんどが白いフワフワしたカルスになり Shoot buds の出現効率は 20%程度であった。'Piel de Sapo'の形質転換効率が低い要因の一つには再分化能力が極めて低いことが予測できた。

Jordi Garcia-Mas 博士の研究室では、メロンの果実成熟に関する遺伝的解析が行われてお

り、クライマクテリック型果実をつけるイボメロン‘Védrantais’とノンクライマクテリック型果実をつけるフユメロン ‘Piel de Sapo’の染色体置換系統が作出されていた。当初予定では F<sub>2</sub> 集団を作成し、遺伝的解析を行う予定であったが、染色体置換系統を利用して形質転換効率に関連する遺伝的因子の探索を行うこととした。‘Piel de Sapo’の染色体の一部が‘Védrantais’で置き換わった系統群に対して形質転換効率を調査した。1 から 12 番の各染色体の大部分が‘Védrantais’に置き換わった 12 系統について調査した。各系統について 120 枚の子葉外植片準備し、アグロバクテリウム AGL0 を感染させて形質転換を実施した。‘Piel de Sapo’の染色体のうち、4 番、5 番、8 番染色体が‘Védrantais’に置き換わった系統では、形質転換が得られたが、そのほかの系統については形質転換体を得られなかった。8 番染色体置換系統(Véd\_8.2)については追試研を 3 回実施し確かに形質転換体を得られることがわかった。その効率は 0.5%程度であり、形質転換効率の品種間差に関わる因子は単一因子ではないと予測している。8 番染色体に形質転換効率に関わる遺伝因子が存在するのであれば、‘Védrantais’の 8 番染色体が‘Piel de Sapo’へ置換された系統(PS\_8.2)は形質転換効率が著しく低下するのではないかと考え、これに取り組んだ。現在までに 120 枚の子葉外植へんに 1 回形質転換を実施し、形質転換体を得られていない。

今後、‘Piel de Sapo’の 4 番、5 番染色体が ‘Védrantais’に置き換わった系統(Ved\_4.2、Ved\_5.2)について再現性の確認と形質転換効率を求める。また PS\_4.2, PS\_5.2 および PS\_8.2 についても形質転換効率を算出する予定にしている。

Véd\_8.2 については、ファインマッピングのために、F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 系統を作成する。今後は、F<sub>1</sub> について形質転換効率を調査する。なお、Véd\_8.2 には、果実成熟に関連する遺伝子が座上していることが Jordi Garcia-Mas 教授の研究により明らかにされており、それとの関連性についても調査する。

現在までに形質転換系の構築は、ともかくやってみながらホルモンの濃度を変えるなど微調整をするしかないという経験則によるのだった。本研究は形質転換効率の品種間差に関連する遺伝因子を明らかにするものであり、形質転換系の構築の際に遺伝的知見を活用することができるため、誰もが容易に色々な植物種で形質転換系を構築することができるようになる。その結果、ゲノム編集技術や形質転換技術が利用できる作物種が多くなる。このため、育種分野へ貢献することができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ガルシアーマス ジョルディ  (Garcia-Mas Jordi)	農業ゲノム研究センター・作物遺伝学・副センター長	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	マーチン ヘルナンデス アナ モンセラート  (Martin Hernandez Ana Montserrat)	農業ゲノム研究センター・作物遺伝学・研究員	

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		
スペイン	IRTA	CRAG	