

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870453

研究課題名(和文) 遺伝子組換えルジグラスの短期固定化技術による育種プロセスイノベーション

研究課題名(英文) Breeding process innovation by short-period-gene-stocking techniques in transgenic plant of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*).

研究代表者

石垣 元気 (Ishigaki, Genki)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：80584573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：環境ストレス応答性遺伝子であるシロイヌナズナ由来DREB1A遺伝子を導入した遺伝子組換えルジグラス後代の乾燥または非乾燥ストレス条件下における形態的特性を明らかにした。乾燥ストレス条件下では、組換え体のみにおいてDREB1A遺伝子の発現が確認され、非組換え体よりも電気伝導度、葉身の相対水分含有率および葉緑素含量値が高い値を示したことから耐乾燥性が向上したと考えられる。さらに、4倍体組換え体と*Brachiaria*属4倍体アポミクシス草種*B. decumbens*および*B. brizantha*との種間交雑を行い、DREB1A遺伝子およびアポミクシス関連遺伝子の両方が遺伝した雑種個体を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The dehydration-responsive element-binding proteins 1 (DREB1s)/C-repeat binding factors (CBFs) are transcription factors that regulate the expression of abiotic stress-responsive genes in an ABA-independent manner. Ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) is an important forage grass, however, it doesn't perform well under drought conditions. To address this problem, we transformed a sexual tetraploid ruzigrass line with a construct carrying the Arabidopsis DREB1A gene driven by the promoter of the rice stress-inducible gene Lip9. The DREB1A gene was detected by PCR and stable integration of multiple copies of DREB1A was confirmed by DNA gel blot analysis in five independent lines. Reverse transcription PCR revealed expression of DREB1A in the transgenic lines only under drought stress conditions. These results demonstrate that stress-inducible overexpression of DREB1A has the potential to enhance abiotic stress tolerance in ruzigrass.

研究分野：草類遺伝資源利用学

キーワード：DREB1A *Brachiaria ruziziensis* drought tolerance Apomixis

1. 研究開始当初の背景

Brachiaria 属はアフリカを原産とする暖地型イネ科牧草であり、熱帯・亜熱帯地域において主に放牧用草種として利用されている。その一方で、乾季の低雨量による乾物収量の低下が問題となっており、育種現場では環境ストレス耐性を付与した品種の育成が求められている。*Brachiaria* 属草種は約 100 種が確認されており、その中でも *B. ruziziensis* (ルジグラス)、*B. decumbens* (シグナルグラス) および *B. brizantha* (パリセードグラス) は、様々な土壌環境に適応し、収量性、飼料品質に優れ、種子繁殖を行うなどの点から優良草種として利用されている。しかしながら、*Brachiaria* 属草種の多くがアポミクシス性や高次倍数性などの育種障害を有していることから、これらの優良草種を用いた草種間での交雑育種法による改良は困難である。これまでに、2 倍体ルジグラスの多芽体へのコルヒチン処理により 4 倍体ルジグラスを作出した (Ishigaki ら 2009a)。さらに、得られた 4 倍体ルジグラスに環境ストレス応答性遺伝子であるシロイヌナズナ由来 *DREB1A* 遺伝子を導入した 4 倍体遺伝子組換えルジグラス (以下組換え体と記す) を作出した。本研究では、*DREB1A* 遺伝子を導入した組換え体における形態的特性および耐乾燥性を評価し、これらの形質において優れた系統を選抜し、さらに、組換え体と 4 倍体アポミクシス草種 (シグナルグラスおよびパリセードグラス) との種間交雑を行い、他草種への *DREB1A* 遺伝子の導入を試みた。以下にその概要を記す。

2. 研究の目的

本研究では、マルチストレス耐性(耐乾性、耐塩性、耐寒性)を付与した遺伝子組換え牧草の作出ならびにその導入遺伝子の短期間での固定化を目的とし、その第一段階として、4 倍体ルジグラス (*B. ruziziensis*) にシロイヌナズナ由来 *DREB1A* 遺伝子(環境ストレス応答性因子)を導入した遺伝子組換え体を作成する。さらに、得られた 4 倍体遺伝子組換え体を種子親として、4 倍体アポミクシス草種 (*B. brizantha*, *B. decumbens*) を花粉親として種間交雑し、得られた雑種個体から導入遺伝子が遺伝し、かつアポミクシス性を示す個体を選抜し、一世代のみのサイクルによる導入遺伝子の固定化を図り、これまでの植物育種にはない、画期的な育種法を開発する。

3. 研究の方法

(1) *DREB1A* 遺伝子を導入した遺伝子組換え体の作出
遺伝子導入は、パーティクルガン法

(Ishigaki ら 2012) によりベクター pLip-DREB1A をルジグラスへ導入した。本組換えルジグラスの作出に用いたプラスミドベクターは pLip-DREB (図 1) である。本ベクターは、pUC 系プラスミドである。目的遺伝子である *DREB1A* 遺伝子は、乾燥応答性エレメント (DRE) に結合し DRE 下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有する転写因子をコードする遺伝子であり、本遺伝子の発現により乾燥、塩、高温および低温等の多様な環境ストレスに耐性を付与する。*DREB1A* 遺伝子は、*Lip 9* プロモーターの働きにより、乾燥条件下で発現が誘導され、Nos ターミネーターにより転写を終了させる。*bar* 遺伝子は、選抜マーカー遺伝子であり、PAT 蛋白質をコードする遺伝子である。PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートをアセチル化し無毒なアセチルグルホシネートに変えることで植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する。*bar* 遺伝子はイネ *actin1* プロモーターにより、植物全体で恒常的に発現し、Nos ターミネーターにより転写を終了させる。ルジグラスの 4 倍体系統の完熟種子から誘導したカルスを用いてパーティクルガン法によりプラスミドベクターを導入し、10mg/L ピアラホスを含む選抜培地で耐性遺伝子が導入されたカルスを選抜し、植物体を再生させた。その後、サザン分析により遺伝子組換え体の導入遺伝子の確認を行った。

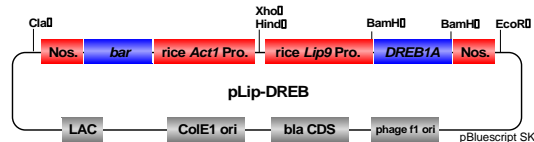


図 1. 本研究に用いたプラスミドベクター pLip-DREB1A.

(2) 組換え体の耐乾燥性の評価

組換え体 13 系統に 14 日間の無灌水処理を行い、*DREB1A* 遺伝子の発現、生存茎率、電気伝導度 (EC)、葉身の相対水分含有率 (RWC) および葉身の葉緑素含量値 (SPAD) を測定した。また、無灌水処理後に 14 日間の再灌水処理を行い、組換え体の緑部割合を調査した。

(3) 組換え体の形態的特性評価

非乾燥ストレス条件下で生育させた組換え体について形態的特性 (草丈、穂長、葉幅、葉身長) を調査した。

(4) 有害物質の産生性

作出された組換えルジグラスとアポミクシス品種との交雑を行う前に、組換え体における有害物質の産生性について調査を行った。本研究では、本組換えルジグラス及び非組換え体の産生する物質が他

の植物に与える影響を比較するため、検定植物としてダイコンを用いて鋤込み試験を行った。遺伝子組換え体を 70 48 時間の条件で乾燥させ、ポット内に充填した土壤中に鋤込んだ。ポット内にダイコン種子を播種し、その発芽率および 30 日後における新鮮重および乾物重を調査した。

(5) 組換え体とアポミクシス草種との種間交雑

4 倍体に導入された *DREB1A* 遺伝子をアポミクシス草種へ導入するため、組換え体を種子親、4 倍体アポミクシス草種シグナルグラスおよびパリセードグラスを花粉親とした種間交雑を行った。さらに得られた交雑種子を発芽させ、PCR 解析により *DREB1A* 遺伝子およびアポミクシス関連遺伝子の両方が遺伝した雑種個体を選抜した。

4. 研究成果

(1) *DREB1A* 遺伝子を導入した遺伝子組換え体の作出

ルジグラスの 4 倍体系統のエンブリオジェニックカルス (Ishigaki ら 2009b) を用いてパーティクルガン法によりプラスミドベクターを導入し、遺伝子組換え体 (T_0 世代) を 4 系統獲得した。その後、サザン分析により遺伝子組換え体の導入遺伝子の確認を行った後、特定網室にて育成し、自殖種子 (T_1 世代) を得た。

(2) 組換え体の耐乾燥性の評価

無灌水处理 3 日目では、全ての組換え体において *DREB1A* 遺伝子の発現が RT-PCR 解析により確認された。図 2 は、遺伝子組換え体 4 系統の T_1 世代における乾燥処理後の RT-PCR の結果を示したものである。*DREB1A* 遺伝子の発現は、乾燥処理 0 日目では認められず、乾燥処理 7 日目において確認された。このことは、*DREB1A* 遺伝子がストレス誘導性の *Lip9* プロモーターにより制御されていることに起因しており、乾燥などのストレス条件下で *DREB1A* 遺伝子が安定的に発現することを確認できた。

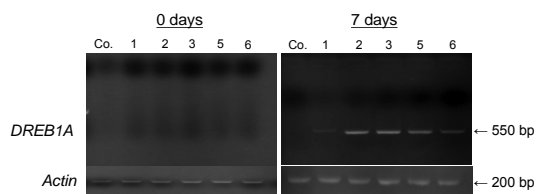


図 2. 乾燥処理 0 日目および 7 日目における遺伝子組換え体の *DREB1A* 遺伝子の発現。

無灌水处理 14 日目では、組換え体の一部は全ての耐乾燥性に関する調査項目において非組換え体よりも優れた値を示し、

再灌水处理後においても高い緑部割合が認められた。さらに、組換え体の生存率は、非組換え体に比べ、高い傾向を示し、*DREB1A* 遺伝子が導入された組換えルジグラスは、非組換え体に比べ、乾燥ストレスに対する適応性が高いことが示唆された。

(3) 組換え体の形態的特性評価

非乾燥ストレス条件下で生育させた組換え体について形態的特性 (草丈、穂長、葉幅、葉身長) を調査したところ、形態的特性のうち、草丈および穂長では有意差 ($P < 0.05$) が認められたが、葉幅および葉身長では有意差は認められなかった。

(4) 有害物質の産生性

鋤込み試験では、組換え体が混合された土壌におけるダイコンの草丈、新鮮重および乾燥重は、非組換え体の土壌に比べ、有意差が認められず、同様の生育であった。

(5) 組換え体とアポミクシス草種との種間交雑

シグナルグラスを花粉親とした種間交雑では 1 個体、パリセードグラスを花粉親とした種間交雑では 3 個体の計 4 個体の雑種個体が得られた。

これまで *Brachiaria* 属草種を用いた交雑育種では、4 倍体ルジグラスと 4 倍体パリセードグラスとの種間交雑により Mulato が、また 4 倍体ルジグラスとシグナルグラスとの種間交雑により得られた後代集団から選抜された有性生殖系統にパリセードグラスを交雑して得られた Mulato が作出されており、種間交雑によってある一定の品種育成が行われている。しかしながら、このような従来の交雑育種法による品種改良では、育種目標とする有用形質を導入した優良系統を作出するまでには、多くの労力と時間を要する。本研究では、パーティクルガン法により環境ストレス応答性 *DREB1A* 遺伝子を導入された遺伝子組換えルジグラスを作出することで、従来の交雑育種法よりも短期間で、耐乾燥性が付与された優良系統を選抜することができている。さらに、得られた組換え体と 4 倍体アポミクシス草種 (シグナルグラスおよびパリセードグラス) との種間交雑によって、これらの優良草種に *DREB1A* 遺伝子を導入することができた。今後これらの雑種個体について、耐乾燥性を評価するとともに、4 倍体アポミクシス草種由来の耐虫性および高収量などの有用形質が付与されている個体を選抜、育成すること

により、新たな育種素材としての活用が期待できる。

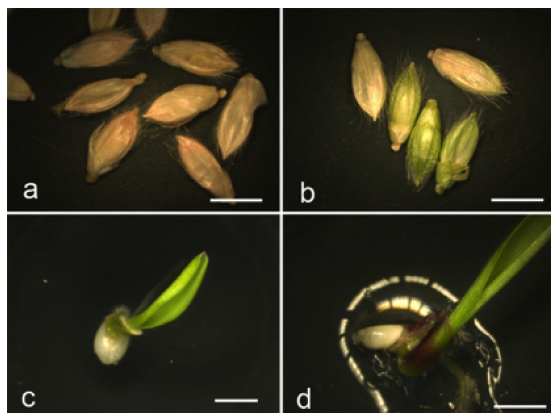


図 3. シグナルグラスを花粉親とした交雑種子（写真 3a）と発芽個体（写真 3c）およびパリセードグラスを花粉親とした交雑種子（写真 3b）と発芽個体（写真 3d）

引用文献

Ishigaki G, Gondo T, Suenaga K, Akashi R, Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicines treatment of in vitro multiple-shoot clumps and seedlings. *Grassland Science*, 55, 2009a, 164–170.

Ishigaki G, Gondo T, Suenaga K, Akashi R, Multiple shoot formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). *Grassland Science* 55, 2009b, 46–51.

Ishigaki G, Gondo T, Suenaga K, Akashi R, Fertile transgenic *Brachiaria ruziziensis* (*ruzigrass*) plants by particle bombardment of tetraploidized callus. *Journal of Plant Physiology* 10, 2012, 1016.

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Genki Ishigaki, Kazuhiro Suenaga, Takahiro Gondo, Nafiatul Umami, Ryo Akashi. Studies on establishment of transformation system and its utilization for breeding in ruzigrass.

Asian-Australian Association of Animal Production Societies. November 10 2014. Indonesia.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石垣元気 (ISHIGAKI, Genki)

宮崎大学・農学部・特任助教

研究者番号：80584573