

ジャガイモのプロテアーゼインヒビター II 遺伝子を発現する遺伝子組換え白菜の開発とバイオアッセイ

Junjie Zhang^{1,2)} · Fan Liu¹⁾ · Lei Yao¹⁾ · Chen Luo⁴⁾ · Yue Yin¹⁾ · Guixiang Wang¹⁾ · Yubi Huang³⁾

¹⁾ Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, China, ²⁾ College of Life Science, Sichuan Agriculture University, China, ³⁾ College of Agronomy, Sichuan Agriculture University, China, ⁴⁾ Plant Protection and Environment Protection Institute, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, China)

鱗翅目の幼虫は白菜生産における最も重要な害虫である。我々はジャガイモのプロテアーゼインヒビター II 遺伝子 (*pinII*) を発現する遺伝子組換え白菜の開発を試み、これらの組換え植物の害虫駆除能力のバイオアッセイを行った。無菌状態の実生からの葉柄のついた子葉をアグロバクテリウム法による *in vitro* の形質転換の外植片として用いた。 *Agrobacterium tumefaciens* C58 系統は *pinII* および *bar* 遺伝子から成るバイナリーベクター pBBBasta-*pinII*-*bar* を含む。強い PPT 抵抗性を示す植物が PPT 抵抗性の段階的濃度選抜と、想定されるキメラから切り出された葉の外植片からの再分化により得られた。遺伝子組換え植物は PCR および *bar* と *pinII* 遺伝子がゲノムに組み込まれていること

を示すサザンブロットィングにより確認した。倍加半数体ホモ接合の形質転換植物は小孢子の培養により得られた。 *pinII* 遺伝子の発現は定量的 PCR (qRT-PCR) および遺伝子組換えホモ接合系統での PINII タンパク質含量の測定により検出した。モンシロチョウ (*Pieris rapae*) の幼虫およびコナガ (*Plutella xylostella*) の幼虫を用いた昆虫給餌試験では、大部分の組換え系統において、非形質転換野生型系統の値と比較し、より高い幼虫の死亡率、幼虫の成育阻害とさなぎ重量および蛹化率と羽化率の低下が示された。

Breeding Science 62: 105–112 (2012)

Begonia semperflorens (section *Begonia*) と *B.* ‘Orange Rubra’ (section *Gaerdita* × section *Pritzelia*) の相反交雑による節間雑種の作出

陳彦銘・三位正洋

(千葉大学大学院・園芸学研究科)

Begonia semperflorens の 11 品種 (2 倍体 6 品種, 4 倍体 5 品種) (SS と SSSS ゲノム) とオレンジ色の花色を持つ木立性ベゴニア *B.* ‘Orange Rubra’ (RR ゲノム) の間で相反交雑を行い、完熟または未熟種子を 0.1 mg l⁻¹ NAA, 0.1 mg l⁻¹ BA, 10 mg l⁻¹ GA₃, 30 g l⁻¹ sucrose, 2.5 g l⁻¹ gellan gum を含む MS 培地で培養することにより節間雑種を作出することができた。大部分の交配では受粉後 12–16 日目の未熟種子を子房培養した場合に、受粉後 30 日目の完熟種子を培養するよりも植物体の形成率は高かったが、一部の交配ではその逆の結果となった。フローサイトメトリー分析による核 DNA 含量の測定結果から、得られた植物は両親

ゲノムの多様な組合せ (RS, RR, RSS, RRS, RRSS, そして RRRRSS) を持つことが推測された。これらの個体を RAPD 分析した結果、RR ゲノムを持つ個体も含めて雑種であることが確認された。以上の結果から、両種間の交配では、非還元配偶子の形成と自然倍加が、様々な倍数性とゲノム構成を持つ雑種の出現に関与しているものと考えられた。得られた雑種は両親のゲノム構成に応じて様々な中間的形質を示し、そのいくつかは両親の長所を兼ね備えていた。

Breeding Science 62: 113–123 (2012)

superwoman1-cleistogamy 変異をもつ閉花受粉性イネの農業形質と交雑抑制能力

大森伸之介¹⁾・田淵宏朗¹⁾・矢頭 治¹⁾・吉田 均²⁾

(¹⁾農研機構・中央農業総合研究センター北陸研究センター, ²⁾農研機構・作物研究所)

導入遺伝子の予期せぬ拡散を防ぐため、GM イネの栽培時には開花時の花粉飛散による一般品種との交雑を抑制することが必要となる。花粉飛散による交雑を抑制するためには、開花期に開花せずに受粉する閉花受粉性が有効である。これまでに我々は、閉花受粉性イネ突然変異体 *superwoman1-cleistogamy* (*spw1-clc*) を同定し、閉花受粉性の分子遺伝学的メカニズムを明らかにした。本研究では dCAPS マーカーを使用して同変異を飼料イネ品種「夢あおば」に導入した戻し交配系統(夢あおば *cls*) を作成し、*spw1-clc* とともに水田にて複数年栽培して閉花受粉性が農業形質に与える影響を評価した。また、水田での自然交雑試験を行い、*spw1-clc* の閉花受粉性が持つ交雑抑制能力を調査した。その結果、*spw1-clc* の農業形質は原品種である「台中 65

号」に対して同等かやや劣ったが、その差は大きくなかった。夢あおば *cls* の農業形質も反復親である「夢あおば」に比べて同等かやや劣っていたが、その差は *spw1-clc* と「台中 65 号」のものより小さかった。いずれの閉花受粉性系統も、その農業形質は実用に足る水準にあった。2 年間行った自然交雑試験では、「台中 65 号」を花粉親として使用した対照区において毎回自然交雑が起こったのに対して、*spw1-clc* を花粉親とした区では自然交雑が全く起きなかった。以上のことから、*spw1-clc* 変異による閉花受粉性は農業形質に大きな影響を与えることなく既存の栽培品種に導入可能であり、効果的に自然交雑を抑制できることを明らかにした。

Breeding Science 62: 124–132 (2012)

非典型的 bHLH タンパク質 POSITIVE REGULATOR OF GRAIN LENGTH 2 は典型的 bHLH タンパク質 APG との相互作用を通じてイネ穀粒長と粒重の制御に参与する

Heang Dany・佐々英徳

(千葉大学大学院・園芸学研究科)

イネの穀粒の大きさは重要な収量構成要素の一つであるが、その制御に関わる遺伝子についての知見は十分ではない。先に我々は、拮抗的に働く 2 つの basic helix-loop-helix (bHLH) タンパク質 POSITIVE REGULATOR OF GRAIN LENGTH 1 (PGL1) と ANTAGONIST OF PGL1 (APG) がイネの穀粒長制御に関与することを見出した。本研究では、別の機能未知の非典型的 bHLH 遺伝子が同様にイネ穀粒長に関わることを見出し、POSITIVE REGULATOR OF GRAIN LENGTH 2 (PGL2) と命名した。PGL2 の内穎・外穎での過剰発現は、穀粒長と穀粒重の増加を引き起こした。穀粒長の増加は、細胞長の伸長によるものであった。PGL2 タンパク質は、穀粒長・穀粒重の負の制御因

子である典型的 bHLH タンパク質 APG と *in vitro* および *in vivo* で相互作用することが示された。PGL2 に最も相同性の高いタンパク質は BRASSINOSTEROID UPREGULATED 1 (BU1) であり、その過剰発現は穀粒サイズの増大を引き起こすことが知られているが、プルダウンアッセイの結果、BU1 と APG は相互作用が認められなかった。PGL2 と PGL1 は共に、APG との相互作用を通じてその機能を阻害することでイネ穀粒長を正に制御しているが、その経路は PGL2 に最も相同性の高い bHLH タンパク質である BU1 が関わる経路とは異なることが示唆された。

Breeding Science 62: 133–141 (2012)

ジャガイモシストセンチュウの国内未発生パソタイプへの抵抗性遺伝子に連鎖する DNA マーカーによるバレイショ 遺伝資源の評価

浅野賢治¹⁾・小林 晃^{1,2)}・津田昌吾¹⁾・西中未央¹⁾・田宮誠司¹⁾

(¹⁾農研機構・北海道農業研究センター, ²⁾現：農研機構・九州沖縄農業研究センター)

バレイショ栽培における最重要害虫の一つであるジャガイモシストセンチュウは、2 種 8 通りの寄生型(パソタイプ)に分類される (*Globodera rostochiensis*, Ro1–Ro5 および *G. pallida*, Pa1–Pa3)。現在日本国内では Ro1 のみの発生が確認されている。

抵抗性遺伝子 *H1* は、Ro1 および Ro4 に対して抵抗性を示すため、我が国の抵抗性品種の育成には専ら *H1* が利用されている。本研究では国内未発生のパソタイプへの対応として、それらに対する抵抗性遺伝子の DNA マーカーを用いて日本国内のバレイ

イシヨ遺伝資源を評価し、*H1* 以外の抵抗性遺伝子の探索を行った。評価の結果、複数の品種・系統が *H1* に加えて *Gpa2* のマーカーでも増幅が見られることが明らかになった。一方、評価した遺伝資源には *Grol-4* のマーカーが増幅する品種・系統は含まれていなかったため、*Grol-4* を持つ品種を導入し、それを利用

した抵抗性品種育成を進めることの重要性が明らかとなった。またパレイシヨ育種において国内未発生の病害虫に対する育種的対策として、DNA マーカーを用いた抵抗性遺伝子の探索が有効であることが示唆された。

Breeding Science 62: 142–150 (2012)

ソルガムの開花期の QTL マッピング

Yousra El Mannai · Tariq Shehzad · 奥野員敏

(筑波大学大学院・生命環境科学研究科)

作物収量の重要性からみて、日長に制御される開花期はソルガム育種における重要な形質である。本研究では、日本産の晩生品種（菊池在来）とエチオピア産の早生品種（SC112）の F_2 集団を用いてソルガムの開花期を制御する QTL を検出した。 F_2 集団とその両親品種を自然日長と 12 時間日長で生育させた。それぞれの集団について、213 の SSR マーカーからなる連鎖地図

を作成した。自然日長下では 9 個の QTL を、12 時間日長下では 7 個の開花期に関する QTL を検出した。それらの QTL のうち、5 個の QTL は自然日長と短日日長の 2 つの条件下で共通に開花期を制御することが明らかとなった。

Breeding Science 62: 151–159 (2012)

ニラ両性生殖性二倍体とアポミクシス性二倍体との戻し交雑集団を用いた複相大孢子形成性および単為発生性の遺伝様式の解明

山下謙一郎¹⁾・中澤佳子²⁾・生井 潔²⁾・天谷正行²⁾・塚崎 光¹⁾・若生忠幸¹⁾・小島昭夫¹⁾

(¹⁾野菜茶業研究所, ²⁾栃木県農業試験場)

ニラにおけるアポミクシス性の遺伝様式を解明するため、両性生殖性二倍体 ($2n=16, 2x$) とアポミクシス性二倍体 ($2n=16, 2x$) との F_1 および BC_1 を用いて、複相大孢子形成性および単為発生性を評価した。両性生殖性二倍体 3 系統 (94Mo13, 94Mo49, 94Mo50) とアポミクシス性二倍体 (KaD2) との交配により作出した F_1 (883 個体) のうち、110 個体が二倍体、773 個体が三倍体であった。二倍体 F_1 は減数性大孢子を形成し、かつ非単為発生性であった。それに対して、三倍体 F_1 はいずれも高頻度の複相大孢子形成および単為発生を示した。つまり、KaD2 に由来するアポミクシス性は、一倍性花粉からは伝達されなかった。次に、 F_1 で得られたアポミクシス性三倍体を花粉親として、両

性生殖性二倍体 (94Mo49) に戻し交雑することにより、半数体、二倍体、三倍体、四倍体および異数体からなる BC_1 を作出した。 BC_1 集団において、複相大孢子形成性と単為発生性との間で分離が観察された。同集団を用いたアポミクシス性評価の結果から、複相大孢子形成性と単為発生性がそれぞれ異なる単一の優性遺伝子 (*D* および *P*) により制御されると考えられた。しかし、単為発生を示した個体はすべて複相大孢子形成を示し、単為発生と減数性大孢子形成を示す個体が出現しなかったことから、単為発生遺伝子の発現には、その前提として複相大孢子形成遺伝子が必要であることが明らかになった。

Breeding Science 62: 160–169 (2012)

シロイヌナズナ第 4 染色体病害抵抗性遺伝子クラスターの *Brassica rapa* 同祖ゲノム領域の構造

諏訪部圭太^{1,2)}・鈴木 剛³⁾・布目 司²⁾・畠山勝徳²⁾・向井康比己³⁾・福岡浩之²⁾・松元 哲²⁾

(¹⁾三重大学大学院・生物資源学研究所, ²⁾野菜茶業研究所, ³⁾大阪教育大学・教養学科)

生物は未だ進化の途上にあり、それに伴うゲノム進化・再編成は種内あるいは種間で継続して起きている。シロイヌナズナの全ゲノム配列が解読されたことにより、比較遺伝学や比較ゲ

ノム学は植物科学に新たな進展をもたらした。特に *Brassica* 属植物の有する属内あるいは科内の類縁関係は、シンテニー解析によるゲノム進化の検証に適している。我々は、*Brassica rapa*

根こぶ病抵抗性の遺伝解析を通して、シロイヌナズナ第4染色体に存在する病害抵抗性遺伝子クラスターと高い相同性のある *B. rapa* ゲノム領域を発見した。1920 個体の F₂ 集団を用いた詳細遺伝マッピングと BAC 物理地図によるマイクロシンテニー解析により、*B. rapa* ゲノムにおいては逆位や挿入等のゲノム再編成はあるものの、本領域は両種間で高い相同性が未だに維持さ

れていることを明らかにした。これらの結果は、2000 万年前に分岐しそれぞれ進化してきた *Brassica* 属と *Arabidopsis* 属において、本ゲノム領域が高度に保存されていることを示すとともに、*Brassica* ゲノムにおける病害抵抗性遺伝子クラスターの潜在性を示している。

Breeding Science 62: 170–177 (2012)

初期栄養成長期における浮イネ節間伸長を制御する 2 つの新規 QTL

永井啓祐¹⁾・黒羽 剛¹⁾・綾野まどか¹⁾・黒川裕介¹⁾・Rosalyn B. Angeles-Shim¹⁾・Jung-Hyun Shim¹⁾・安井 秀²⁾・吉村 淳²⁾・芦荻基行¹⁾

(¹⁾名古屋大学・生物機能開発利用研究センター、²⁾九州大学大学院・農学研究院)

浮イネは深水条件下で節間伸長をすることによって溺死することを回避している。これまでの研究で第 1, 3 および第 12 染色体上に浮イネの節間伸長を制御する 3 つの QTL が検出されていた。しかし、これらの QTL を保持した個体は深水条件下で 7 葉齢から節間伸長を開始し、それ以前の初期栄養成長期では節間伸長をすることができなかった。本研究では、これまでに検出された 3 つの QTL を保持した準同質遺伝子系統 NIL1-3-12 とインド型浮イネ品種 C9285 を交配して得られた F₂ 集団を用いて、初期栄養成長期における節間伸長に関する QTL 解析を行い、新規な 2 つの QTL, *qTIL2* および *qTIL4* を検出した。C9285 と NIL1-3-12 を交配した BC₂F₂ 集団および日本型栽培品種 T65

とインド型浮イネ品種 Bhadua を交配して得られた組換え自殖系統を用いて QTL の効果を評価したところ、今回検出した 2 つの QTL に加え、これまでに検出された 3 つの QTL を保持した個体は初期栄養成長期において節間伸長を誘導した。これらの結果は、*qTIL2* および *qTIL4* は深水条件下において早期節間伸長を制御しており、これまでに検出された 3 つの QTL と協調して機能することで節間伸長を誘導していることを示している。この結果は、イネの深水応答機構の解明だけでなく、洪水地帯における様々な水深に適応した深水耐性イネの育種にも貢献できると考える。

Breeding Science 62: 178–185 (2012)

チャ (*Camellia sinensis*) の器官特異的 cDNA ライブラリーに由来した発現遺伝子配列タグ EST-SSR の *Camellia* 属における多型と汎用性

谷口郁也^{1,2)}・福岡浩之³⁾・田中淳一^{1,2,4)}

(¹⁾ 農研機構・野菜茶業研究所枕崎茶業研究拠点、²⁾ 筑波大学大学院・生命環境科学研究科、³⁾ 農研機構・野菜茶業研究所、⁴⁾ 現：農研機構・作物研究所)

茶は世界で最も人気がある飲料のひとつであり、チャ (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) は、多くの国で重要作物である。チャで利用可能なゲノム情報を増やすために、様々な器官から 7 つの cDNA ライブラリーを作製し、発現遺伝子配列タグ (ESTs) を得た。合計で 17,458 個の ESTs が得られ、5,262 個の unigenes にアッセンブルされた。約 50% の unigenes は Gene Ontology によりアノテーションが割り当てられた。いくつかの unigenes は、窒素同化、アルミニウム応答、カフェインやカテキンの生合成といった重要な生物学的プロセスに関する遺伝子と相同性を示した。デジタルノーザン解析により 67 の unigenes が 7 つ器官

で異なる発現パターンを示すことが明らかになった。unigenes より単純反復配列 (SSR) を検索したところ 6 回以上の反復からなる SSR を持つ unigenes が 1,835 個 (34.9%) 見つかった。100 組の EST-SSR のプライマーセットを用いて 16 のチャ品種・系統について増幅と多型を調査した。71 組のプライマーセットで増幅が認められ、70 で多型が見られた。さらに、これら 70 の EST-SSR マーカーは、他の *Camellia* 属 14 種でも利用可能であった。ESTs と EST-SSR マーカーはチャと *Camellia* 属近縁種において重要形質や分子遺伝学に関する研究を促進するだろう。

Breeding Science 62: 186–195 (2012)

イネの耐冷性準同質遺伝子系統の特性と同定

Lei Zhou^{1,3)} · Yawen Zeng²⁾ · Guanglong Hu^{1,4)} · Yinghua Pan¹⁾ · Shuming Yang²⁾ · Aiqing You³⁾ · Hongliang Zhang¹⁾ · Jinjie Li¹⁾ · Zichao Li¹⁾

¹⁾ Key Laboratory of Crop Heterosis and Utilization (MOE) and Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, China Agricultural University, China, ²⁾ Biotechnology and Genetic Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, China, ³⁾ Hubei Key Laboratory of Food Crop Germplasm and Genetic Improvement, Food Crops Institute, Hubei Academy of Agricultural Sciences, China, ⁴⁾ Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, China)

イネの耐冷性遺伝機構を解明するため、最強の穂ばらみ期耐冷性を持つことが知られている昆明小白谷を耐冷性供与親に用い、感受性の日本品種トワダを反復親とする戻し交配により、耐冷性準同質遺伝子系統を作出した。準同質遺伝子系統(BC₆F₃) 5系統と反復親のトワダを穂ばらみ期に低温と常温で処理し耐冷性関連形質を調べた。準同質遺伝子系統とトワダの間では種子稔性に関連する形質だけに有意差が認められた。発芽期、幼苗期および穂ばらみ期における耐冷性を準同質遺伝子系統間で比較したところ、時期別の耐冷性程度とその系統間差は相関し

ていた。系統1913-4と系統1916-1は、すべての時期で最強で安定した耐冷性を示した。DNAマーカーを用いた遺伝子型解析の結果、遺伝的背景の98%以上は反復親トワダの遺伝子型を示した。2系統の準同質遺伝子系統では、17のマーカー座領域は昆明小白谷から導入され、これらの領域に耐冷性遺伝子が存在する可能性がある。準同質遺伝子系統はイネ育種や耐冷性QTLのマッピングスクローニングのための優れた研究材料である。

Breeding Science 62: 196–201 (2012)

トマト日持ち性の分子育種における TILLING を併用したマイクロトム変異体ライブラリーの有効性

岡部佳弘¹⁾ · 浅水恵理香¹⁾ · 有泉 亨¹⁾ · 白澤健太²⁾ · 田畑哲之²⁾ · 江面 浩¹⁾

¹⁾筑波大学大学院・生命環境科学研究科, ²⁾かずさDNA研究所

トマトエチレン受容体 *Solanum lycopersicum* ETHYLENE RESPONSE1 (SIETR1) 遺伝子の新規変異アリル *Sletr1-1* と *Sletr1-2* をマイクロトム変異体ライブラリーから TILLING 法により単離できたことが先行研究において報告されている。それらの変異アリルは、異なるレベルの果実成熟抑制を示すことから、トマト果実の日持ち性改良の有用な育種素材になることが期待される。トマト育種への *Sletr1* 変異アリルの利用を進めていく上では、各変異遺伝子の相補性試験を行い機能を確認することが必要である。本研究では、*Sletr1-1* および *Sletr1-2* を過剰発現する形質転換系統を作出し、特性を解析した。形質転換系統はエチレン非感受性および果実成熟抑制を示したことから、*Sletr1-1*

と *Sletr1-2* が変異体の表現形質を制御していることが確認された。実生におけるエチレン感受性レベルは *Sletr1-1* と *Sletr1-2* の形質転換系統間で変異体と同様の傾向が見られたが、果実成熟抑制については明確な差は確認されなかった。これらの結果は、効果が弱いアリル (*Sletr1-2*) を用いたとしても形質転換の手法により果実成熟の程度を微調整することが難しいことを示している。本研究および先行研究は、TILLING を併用したマイクロトム変異体ライブラリーがトマト重要形質の遺伝的変異を探索する有効な手法となることを示すものである。

Breeding Science 62: 202–208 (2012)