



Title	Evaluation of transgenic tall fescue (<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.) improved for important forage and turf traits [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐藤, 広子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	乙第7065号
Issue Date	2018-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72386
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroko_Sato_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士（環境科学）

氏 名 佐 藤 広 子

学 位 論 文 題 名

Evaluation of transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) improved for important forage and turf traits

(牧草および芝草の重要形質を改良したトールフェスク形質転換体の評価)

トールフェスク (*Festuca arundinacea* Schreb.) は、牧草および芝草として世界的に広く利用されている寒地型イネ科植物であり、環境適応性と持続性に優れる。交配育種による品種育成は、自家不和合性による他殖性や異質6倍体という複雑な遺伝様式を有することから長い年月を要し、その遺伝改良量は他の作物と比べて低い。形質転換技術は植物へ有用遺伝子の直接導入や内在遺伝子の発現量を調節することで、新規形質の導入や遺伝的変異を拡大できる。交配育種の補完かつ加速させる技術として、トールフェスクにおいても遺伝子導入法が確立され、これまでに飼料品質、環境ストレス耐性および耐病性等が向上した形質転換体の作出が報告されている。トールフェスクは他の寒地型イネ科植物と比べて消化性と家畜の嗜好性が劣るため、品質の改良が重要な育種目標となっている。牧草の消化性とリグニン含量は負の相関があり、リグニン生合成経路上の酵素遺伝子が抑制された変異体や形質転換体では、消化性の向上が確認されている。また、トールフェスクは芝草と道路の法面に多く利用されており、除草剤耐性は雑草管理労力の軽減に有効である。これまでにグリホサート耐性を付与したクリーピングベントグラスやケンタッキブルーグラスが育成され、その実用化が検討されている。一方で、トールフェスクは風媒花で大量の花粉を生産するため、花粉症の原因植物でもある。また、形質転換体の利用には外来遺伝子の拡散による環境や生態系に与える影響への懸念が存在する。本研究では、牧草および芝草利用において重要形質である消化性の向上、除草剤耐性の付与および花粉飛散を抑制する雄性不稔の誘導を目的に、トールフェスク形質転換体の作出およびその特性を評価した。

リグニンはセルロースとともに植物の生育が進むにつれ、繊維細胞や導管等の二次細胞壁に蓄積し、牧草の消化性を著しく低下させる。繊維細胞は導管と比べて生育に影響を及ぼしにくいと想定されることから、形質転換技術により消化性を向上させるための重要なターゲットと考えられる。イネではSECONDARY CELL WALL NAC DOMAIN PROTEINs (OsSWNs) を抑制すると、繊維細胞の二次細胞壁が減少することが明らかになっている。そこで、*OsSWN1* プロモーターにより繊維細胞等で発現を誘導する*OsSWN2* キメラリプレッサー (*OsSWN2-SRDX*) をトールフェスクに導入した。*OsSWN2-SRDX* 23系統のうち、9系統は手で簡単に折れる脆い茎に変化していた。一部の系統では茎葉数の減少や矮化等の生育阻害が観察された。*OsSWN1* プロモーターは導管においても弱い発現を誘導するため、その影響によるものと考えられた。脆い茎を有する系統は野生型と比較して、電子顕微鏡で茎の維管束間繊維細胞と葉の表皮細胞と維管束の間にある繊維細胞の二次細胞壁が薄いことが観察された。器官別の乾物分解率は、出穂茎で11.8%、葉では6.8%消化性が向上した。そして、セルロースとリグニンが含まれる酸性デタージェント繊維は、出穂茎で野生型の25.2%、葉では21.6%減少し

た。一部の系統では酸不溶性リグニンが減少しており、リグニンを特異的に検出するフロログルシノールによる染色では、維管束間繊維細胞および葉の繊維細胞が野生型と比べて薄い染色を示した。以上の結果から、繊維細胞における二次細胞壁を減少させることにより、牧草の消化性を大幅に向上できた。

ピリミジニルカルボキシ (PC) 系除草剤は、アミノ酸合成経路上のアセト乳酸合成酵素 (ALS) を阻害して植物を枯死させる。ALSは哺乳類に存在しないため、安全性の高い除草剤として知られている。除草剤耐性芝草作出のため、PC系除草剤ピリミノバック (PM) に強い耐性を付与するイネ1点変異型ALS遺伝子[OsALS(sm)]をトールフェスクに導入した。非形質転換カルのDose response試験により、PMに強い感受性を示したことから、選抜マーカー遺伝子としてもOsALS(sm)遺伝子を用いて形質転換体を選抜し、サザン解析により再分化植物10系統でOsALS(sm)遺伝子の導入を確認した。PM除草剤散布試験では、野生型では散布直後から生育が停止し、その後は個体の一部分が枯死し、再生は見られなかった。一方、OsALS(sm)系統は除草剤の影響を受けずに生育を続けた。除草剤を処理した形質転換体における葉のALS活性は、除草剤処理をしていない野生型よりも低かったが、除草剤を処理した野生型より高かった。また、OsALS(sm)系統と野生型の交配後代においても、OsALS(sm)遺伝子を伝搬したT₁系統は除草剤を散布しても枯死しなかった。以上より、安定した除草剤耐性を確認することができた。

目的遺伝子と雄性不稔を誘導する遺伝子を一緒に導入することにより、目的形質の改変と同時に雄性不稔を付与することができる。イネSUPERWOMAN1 (SPW1) とOsMADS58は雄ずい形成に関わる転写因子で、これらの変異体や機能抑制した形質転換体は雄ずい形成が阻害され、花粉を形成しない。そこで、SPW1およびOsMADS58のキメラリプラッサー (SPW1-SRDXおよびOsMADS58-SRDX) を導入し、雄性不稔の誘導を試みた。両系統の雄ずいは形成されたが、花粉を形成しないもしくは未熟花粉の形成により、葯の裂開は見られなかった。また、SPW1-SRDX 2系統の小花は葯を抽出しない閉花性を示した。その鱗被は平らで細長い器官に変化しており、鱗被が膨らまずに開花しなかったと考えられた。閉花性は自家受粉植物では有効だが、他家受粉を行うトールフェスクでは種子の生産ができないためその利用は難しい。OsMADS58-SRDX 5系統も閉花性を示し、その鱗被は穎様器官に変化していた。この表現型はイネOsMADS58-SRDX系統の表現型とは異なり、イネとトールフェスクの転写因子機能分化の違い等によるものと示唆された。OsMADS58-SRDX 2系統は正常に開花し雄性不稔のみを示した。これら系統は有望と考えられるが、その利用には後代において形質の安定性を確認する必要がある。

以上、本研究から高消化性、除草剤耐性および雄性不稔を付与したトールフェスク形質転換体を作出した。得られた形質転換体は育種素材として有用であると考えられ、他の寒地型イネ科牧草および芝草への適用も期待できる。近年開発されたシスジェネシスおよび人工ヌクレアーゼによるゲノム編集技術は、交配育種により育成された植物と同様の遺伝子構成を有すること、あるいは人工ヌクレアーゼ遺伝子を交配で除くことができ外来遺伝子が残存しないことから、形質転換体に対する懸念緩和につながると考えられている。今後、形質転換体の実用化を効率的かつ迅速に行うため、トールフェスクにおいてもその技術開発に取り組む必要があると考えられる。