HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Evaluation of transgenic tall fescue (Festuca arundinacea 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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士（環境科学）　　氏 名 佐藤 広子

審査委員　主査　教 授　山 田 敏 彦
副査　教 授　荒 木 肇
副査　准教授　星 野 洋一郎
副査　准教授　三 輪 京 子
副査　教 授　貴 島 祐 治（大学院農学研究院）
副査　講 師　山 田 哲 也（大学院農学研究院）

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、環境適応性と永続性に優れる。自家不和合性による他殖性や異質六倍体という複雑な遺伝様式を有することから、育種は長い年月を要し、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。本研究では、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。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。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。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。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。選抜マーカー遺伝子として*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、*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T_1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。*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。

以上、本研究では、温暖化に伴う高温・干ばつ等の環境ストレスに耐性を示すトールフェスクを供試して、遺伝子組換えにより高消化性、除草剤耐性および雄性不稔を付与した形質転換体を作出することができた。特性評価の結果、得られた形質転換植物は育種素材として有用であることが認められた。また、本手法は他草種への適用も期待でき、さらには、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を活用すれば、将来、実用品種の育成にもつながる。

よって，申請者は博士（環境科学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。