

最終報告

実験進化遺伝子マイニングによる作物デザイン情報基盤創出

研究代表者：長谷 純宏 量子科学技術研究開発機構・上席研究員

共同研究者：堀江 智明 信州大学繊維学部・教授

佐藤 勝也 量子科学技術研究開発機構・上席研究員

北村 智 量子科学技術研究開発機構・上席研究員

鈴井 伸郎 量子科学技術研究開発機構・上席研究員



1. 研究の背景と達成目標

世界の食料需要が益々増えると予測される一方、高温、乾燥、塩類などの環境ストレスによる収量の低下が懸念され、ストレス耐性作物の開発は重要な課題である。ゲノム編集技術はその一翼を担うと期待されるが、そのためには、改変のターゲットとなる遺伝子情報が必要である。しかし、特にストレス耐性のように多くの遺伝子に支配される形質に関して、有用な遺伝子情報をゲノム全体から抽出することは依然として困難である。本研究は、高等植物では実施例のない実験進化という方法を利用してゲノム全体から有用遺伝子を発掘し、作物をデザインするための遺伝子情報基盤の拡充を目指すものであり、本プロジェクト期間内にこの技術体系の実現可能性を示すことを当初目標とした。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・微生物を用いた実験進化において、人為的な変異導入がストレス環境への適応を加速することを示した。また、独立に進化させた株において、類似の機能を持つ複数の遺伝子に共通して変異が生じていることを確認した。これらの成果は、人為的な変異導入を併用した実験進化法が細胞の機能向上及びそれらの機能に関連する有用遺伝子の発掘に有用であることを示唆し、今後、新たなアプローチとして、微細藻類や様々な産業微生物の改良に適用できると考えられる。

3. 研究成果

上記の目標達成に向けて、本研究ではイネの耐塩性をモデルケースとし、「変異の導入」と塩ストレス下での「選択」を繰り返して作製した集団における遺伝子組成の変化を検出するとともに、RITレーサーを利用した元素動態解析等により遺伝子の機能を迅速に評価し、耐塩性の向上に関わる有用遺伝子を発掘することを計画した(図1)。

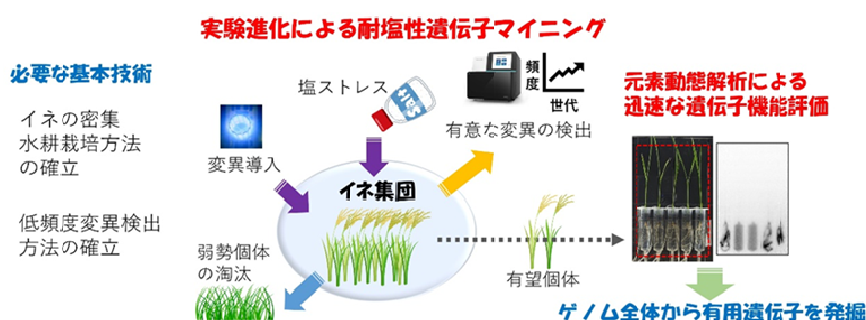


図1 実験計画の概要

まず、本研究に必要な2つの基本技術として、イネの集団を可能な限り早く且つ均一に世代更新する

密集水耕栽培方法を確立するとともに、集団内に生じたわずかな遺伝子組成の変化を捉える低頻度変異検出方法の確立に取り組んだ。

密集水耕栽培方法の確立に関しては、市販の部材を組み合わせて装置を作製し、約 1,000 個体のイネを均一に年間 3 世代以上、畳一畳分のスペースで栽培する方法を確立した（図 2）。矮化剤で草丈を抑えるとともに植物体の配置や照明を最適化することにより、日本晴は播種後 55～60 日で出穂し、個体あたりの稈実種子数は 6.9 ± 2.9 粒で、均一で速いサイクルでの栽培が可能であることを確認した。

低頻度変異検出方法の確立に関しては、集団内に 5% の割合で含まれる変異（1,000 個体のうち 50 個体に相当）を高精度で検出することを当初目標とした。これを実証するため、以前の研究で得たシロイヌナズナの変異蓄積システムを用いて、様々な種類の既知変異を 5.0% の割合で混入したモデル DNA 試料を作製した。ショートリードの次世代シーケンサーで十分な量（～50Gb）の塩基配列データを取得し、変異の検出方法及び擬陽性のフィルタリング方法を検討した結果、4.0% 以上の頻度で存在する変異の 97% を、擬陽性の混入率 1% 未満の精度で検出できることを確認した（図 3）。

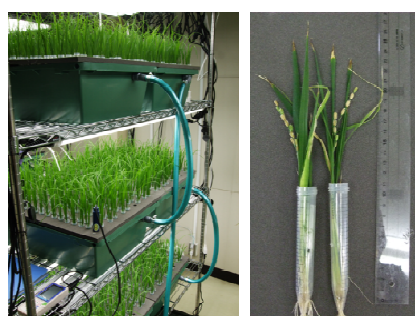


図 2 イネの密集水耕栽培装置及び稈実個体

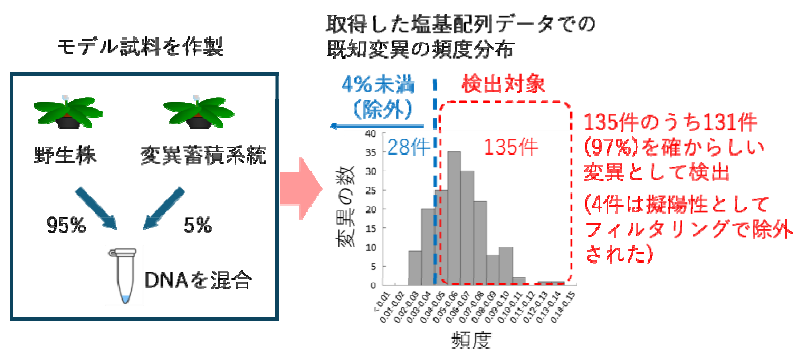


図 3 低頻度変異検出方法の検討結果

そこで、変異導入の有無及び塩ストレスの有無を組み合わせた 4 つの生育条件でイネ集団の育成を開始した。塩ストレスの強度は、塩濃度と収量との関係を事前に調査した結果に基づいて 700 mS/m（海水の約 1/6 の塩濃度に相当）とした。変異導入処理の対象として種子と生体（苗）のいずれが好ましいかという点を、イネよりもゲノムサイズの小さいシロイヌナズナを用いて検討した結果、生体（苗）への照射の方が全 6 種類の塩基置換が均等に生じることを見出したため（図 4）、変異のバリエーションが広がると期待し、苗に照射することとした。照射線量は事前に調査した生存率及び稈実率の線量反応に基づいて 10 Gy とした。これらの条件でイネ集団の世代更新を行った。3 世代目の各集団から無作為に選んだ個体に生じている変異を確認した結果、延べ 3 回のガンマ線照射によって、放射線に特徴的な欠失変異などの割合が増加するとともに、遺伝子領域上の変異の数が約 3 倍に増えることを確認した（図 5）。

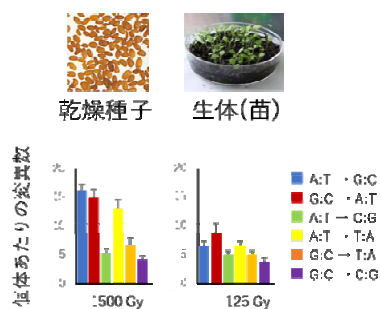


図 4 シロイヌナズナの種子と生体へのガンマ線照射で生じた塩基置換

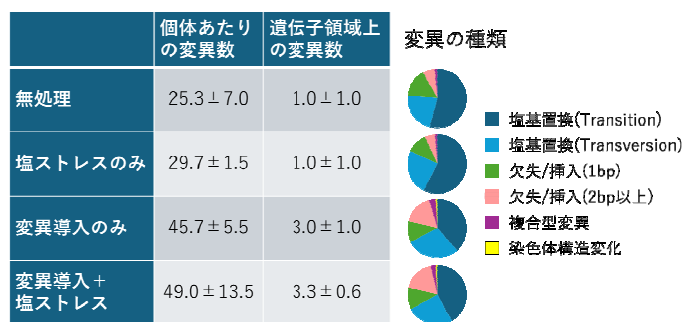


図 5 各処理区のイネに蓄積された変異の種類と数

この後、イネの世代促進を継続していたが、2 年目の半ばから栽培室内にハダニが蔓延し、薬剤散布

等では対応できず、育成管理方法を見直した上で残りの種子から育成を再開した。当初予定していた研究期間内での5回の世代更新は完了したが、集団内の遺伝子組成の変化を比較するまでには至らなかった。少なくともこれまでの継代操作によって耐塩性が向上しているか否かを確認するため、現在、5回または6回世代更新したイネ集団の耐塩性を水耕栽培によって確認中である。

このような状況の下、実験進化を利用してゲノム全体から有用遺伝子を発掘するという当初目標に関する知見を広く得るため、世代更新が速い微生物を用いた試験を2年目の半ばからイネの試験と並行して開始した。ここでは、温度上昇に敏感な根粒菌の高温耐性をモデルとした。根粒菌の野生株は32~34℃が増殖至適温度であるが、そこからわずかに2℃上昇した36℃で増殖が顕著に抑制される(図6)。シングルコロニーに由来する根粒菌を約2か月半かけて培養温度を34.0℃から37.0℃まで高めながら継代培養し、また、毎週1回の頻度で延べ10回のガンマ線による変異導入を行った(図7)。照射線量は0、40、80及び120Gyとし、各24系統を独立で継代培養した。最終的に、32℃と36℃の寒天培地上でのコロニー形成によって高温耐性を評価した。

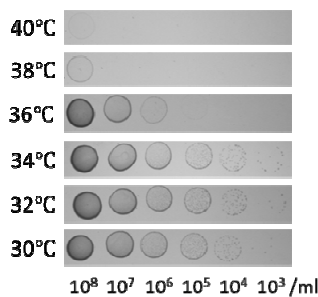


図6 根粒菌の温度感受性

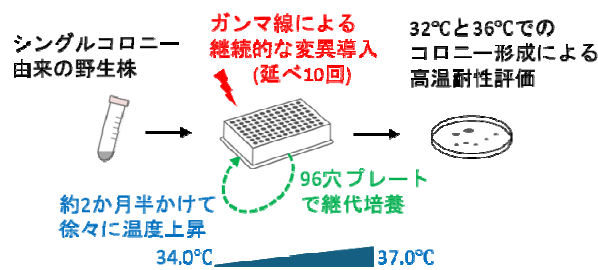


図7 根粒菌の高温耐性をモデルとした実験進化

36℃で一定以上のサイズのコロニーを形成した系統の数は40Gy及び80Gy区で多く、ガンマ線による変異導入が高温環境への適応を加速することが示唆された(図8)。別途調査した1回のガンマ線照射による変異率から推察すると、変異率が最大に達する80Gy以下の線量域での継続的な変異導入が高温耐性の向上に効果的であると考えられた(図9)。特に高温耐性が高いと思われる2つの系統について、ゲノムDNA配列を調べた結果、複数の共通する遺伝子に変異が生じており、この他にもこれらの遺伝子と機能的に関連の深い遺伝子に変異が生じていることを確認した(図10)。この結果は、複数の変異の複合的な効果によって高温耐性が向上したことを示唆するものであり、本研究の当初目標である実験進化を利用してゲノム全体からストレス耐性に関わる有用遺伝子群を発掘することが技術的に実現可能であることを支持する。

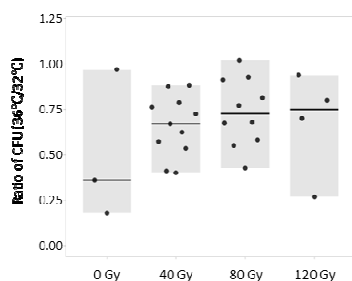


図8 各線量区の24系統のうち、36℃でコロニーを形成した系統についての、36℃と32℃でのコロニー数の比。Barは中央値を示す。

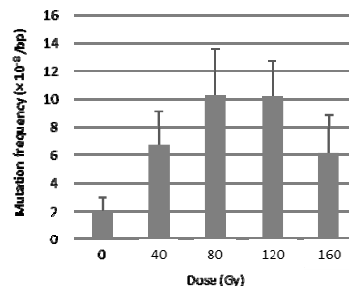


図9 菌野生株への1回のガンマ線照射によって生じる変異の頻度

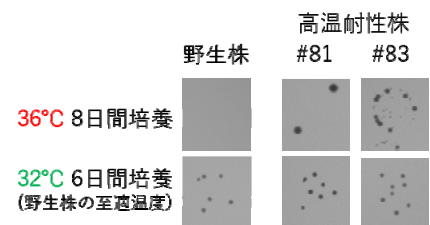


図10 ガンマ線照射を併用した実験進化で獲得した高温耐性系統

さらに、高温耐性向上が一過的なものであるか遺伝的に安定であるかを検討するため、図 8 に示した高温耐性株の培養液を 2 分割し、高温条件である 36℃ と本来の至適増殖温度である 32℃ でそれぞれ 18 日間培養した後、改めて高温耐性を評価した。なお、この 18 日間の間にガンマ線照射は行っていない。実験の結果、40Gy 区で獲得した高温耐性系統では、いずれの培養温度でも高温耐性が維持されていたのに対して、80Gy 及び 160Gy 区では 32℃ で培養した場合に多くの系統で高温耐性が失われた（図 11）。この原因は不明であるが、比較的高い線量域でガンマ線を照射した細胞では、一過的なストレス耐性向上が起こりやすいことを示唆する。

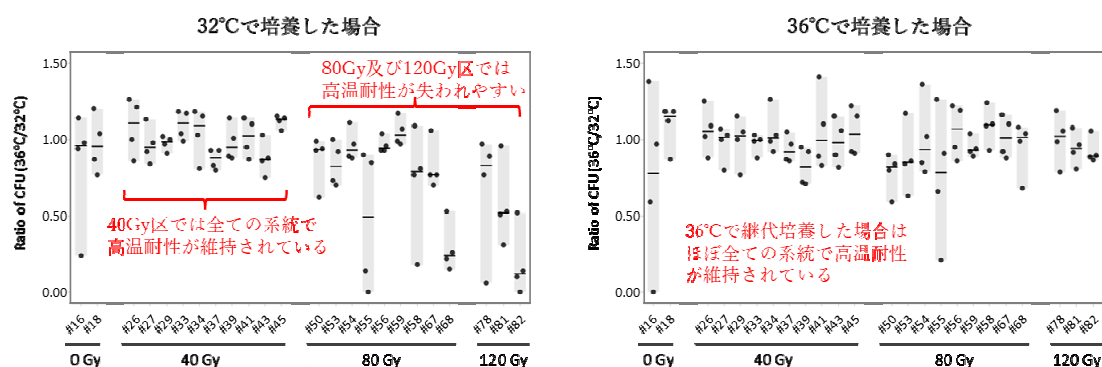


図11 高温耐性株を32℃及び36℃で18日間継代培養した後での高温耐性の再評価結果

4. 今後の展開

本研究で取り組んだ人為的な変異導入を併用した実験進化法は、比較的簡便で多くの生物種への適用が期待される。微細藻類は重要なターゲットの1つであり、既に本手法を利用した有用物質生産に関する課題が福島国際研究教育機構に採択され、2024年12月から研究を開始している。また、食料利用に向けた微細藻類の改良について予備検討を進めており、資源の多くを輸入に頼る日本の食料安全保障や将来求められるカーボンネガティブ達成への貢献を目指している。この他にも糸状菌などの様々な産業微生物への適用を検討する。当初のターゲットであるイネについては計画通りの進展とは至らなかったが、微生物で確認された高温耐性向上の仕組みを詳しく調査し、単細胞と多細胞という違いや世代更新の速度などから、植物への適用の可能性を改めて検討したい。高線量のガンマ線照射で一過的な耐性が生じるという現象は、我々の知る限り初めて確認されたものであり、一過的な耐性のスイッチをONにする仕組みが理解できれば実用価値の高い技術になる可能性が考えられる。

5. 発表実績

【論文】

- Hase Y, Nagafune I and Satoh K. Artificial mutagenesis accelerates the acquisition of high-temperature tolerance by experimental evolution of *Bradyrhizobium diazoefficiens*. (in preparation)
- Hase Y, Satoh K and Kitamura S. Genome-wide detection of subclonal mutations induced by gamma rays in Arabidopsis. (in preparation)
- Hase Y, Yin Y and Suzui N. High-density, uniform and rapid cultivation of rice population by hydroponic culture (in preparation)
- Hase Y, Satoh K and Kitamura S. Genome-wide detection of low-frequency mutations in plant population mutagenized with gamma ray. QST Takasaki Annual Report 2023, 57 (2025).
- Satoh K, Takeda K, Nagafune I, Wan Chik WD, Ohkama-Otsu N, Okazaki S, Yokoyama T and Hase Y. Isolation and characterization of high-temperature-tolerant mutants of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 by carbon-ion beam irradiation. Microorganisms 12, 1819 (2024).
- Kitamura S, Satoh K, Hase Y, Yoshihara R, Oono Y and Shikazono N. Differential contributions of double-strand break repair pathways to DNA rearrangements following the irradiation of Arabidopsis seeds and seedlings with ion beams. Plant Journal 120, 445-458 (2024).
- Hase Y, Satoh K and Kitamura S. Comparative analysis of seed and seedling irradiation with gamma rays and carbon ions for mutation induction in Arabidopsis. Frontiers in Plant Science 14, 1149083 (2023).

【学会発表】

- 長谷純宏、長舟郁子、佐藤勝也「ガンマ線による変異導入を併用した実験進化による新奇変異株の作出」QST 高崎サイエンスフェスタ 2024 (2024 年 12 月)
- 長谷純宏「量子ビーム誘発変異の特徴解明と実用品種開発」第 4 回日本量子医科学会学術大会 (2024 年 12 月)
- Hase Y, Nagafune I, Satoh K「Development of novel mutant lines by experimental evolution combined with gamma mutagenesis」日本放射線影響学会第 67 回大会 (2024 年 9 月)
- Hase Y, Nagafune I, Satoh K「Development of novel mutant lines by experimental evolution combined with gamma mutagenesis」第 26 回日本進化学会神奈川大会 (2024 年 8 月)
- Hase Y「Genome wide characterization of radiation-induced mutation and development of new varieties by Ion Beam Breeding」6th International Plant Breeding Conference (2024 年 3 月)
- 長谷純宏、佐藤勝也、北村智「ガンマ線によって変異導入した植物集団でのゲノムワイドな低頻度変異の検出」日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023 年 11 月)
- Hase Y, Satoh K, Kitamura S「Characterization of carbon-ion and gamma-ray induced mutations in Arabidopsis」日本放射線影響学会第 66 回大会 (2023 年 11 月)

【その他】

- プレスリリース「植物は傷ついた DNA の修復方法を成長に応じて使い分けていた」北村智、佐藤勝也、長谷純宏、吉原亮平、大野豊、鹿園直哉 (2024 年 9 月)