

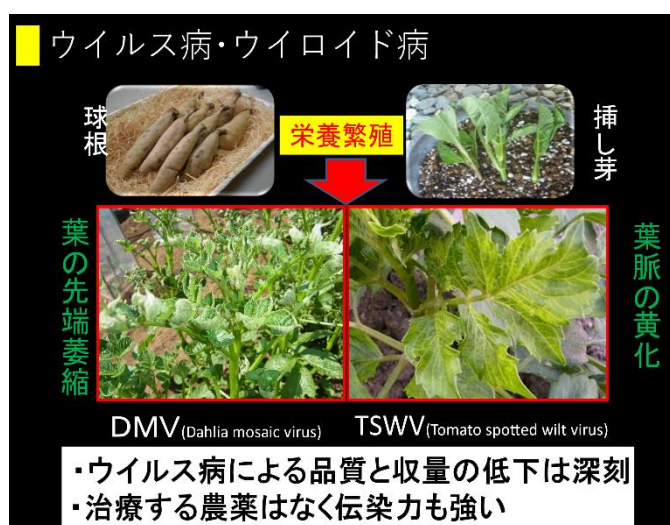
遺伝子組換えによる持続可能なウイルスフリーとウイロイドフリーおよび青色ダリア作出の研究

【2023年度研究報告書】

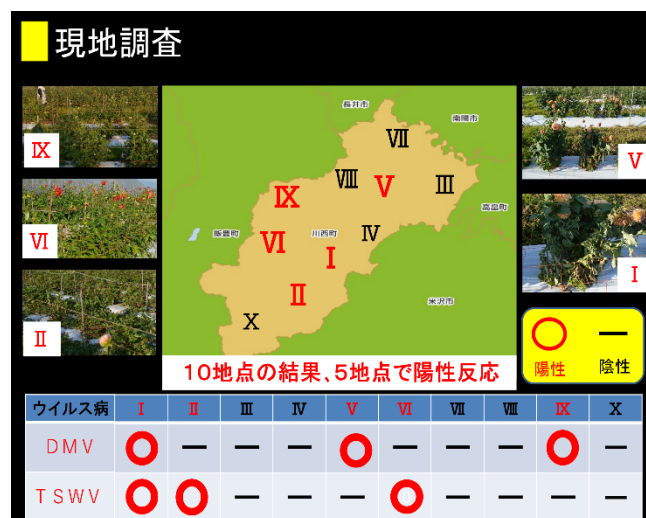
山形県立置賜農業高等学校 園芸福祉科3年 朝倉未来 伊藤 南 加藤ひより 佐藤未悠 長倉 壱 松田瑞姫
指導担当 教諭 遠藤忠樹

I. はじめに

置賜農業高校3年生ダリア研究班6名は「植物バイオテクノロジー」「課題研究」「総合実習」の専門科目の学習を活かしてダリアのウイルス病とウイロイド病対策に関する探究学習に取り組んでいます。ダリアは病気に弱く、特にウイルス病およびウイロイド病は伝染力が強く品質と収量の低下は深刻で大きな課題となっています(図1)。現地調査10地点の結果、5地点でダリアモザイクウイルス(DMV)と黄化えそウイルスの陽性反応を確認しました(図2)。



(図1)



(図2)

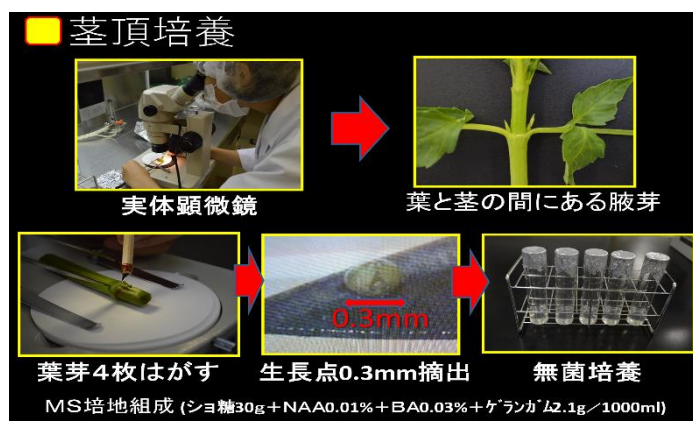


図3

これまで「茎頂培養」によりウイルスフリーおよびウイロイドフリーダリアの作出に取り組んできました(図3)。「茎頂培養」由来のウイルスフリーおよびウイロイドフリーのダリアは、主にアザミウマやアブラムシ等の害虫を媒体として再感染する恐れがあります。

ダリアは草花の中で花型と花色も豊富です。しかし、遺伝的に「青色」のダリアは存在せず遺伝子組換えに技術により作出する方法が考えられます。そこで、遺伝子組換えによる持続可能なウイルスフリーとウイロイドフリーおよび青色ダリア作出の探究学習に取り組みました。

この研究はバイテク情報普及会様より物心両面にわたるご支援をいただき、取り組んだ内容を報告書としてまとめました。

II. 事前学習

遺伝子組換えに用いる場合はウイルス、ウイロイドフリー(無病苗)であることが必須です。そのため「茎頂培養」から無病苗を作出すること。*千葉大学大学院三位正洋教授の先行研究を参考とし、遺伝子組換え実験はカルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)を遵守し実験の安全性を確保すること。そのため山形県園芸農業研究所バイオ育種部の専門員の各先生方よりご指導を受け実施しました。

III. 研究目標

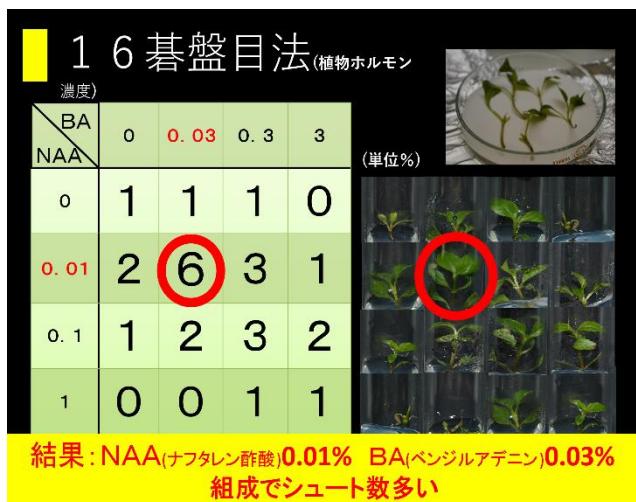
1. 遺伝子組換えに用いる無病化培養シュートの構築
2. ダリアDNAの抽出法の検討
3. ダリア遺伝子組換え方法の検討

IV. 実施内容

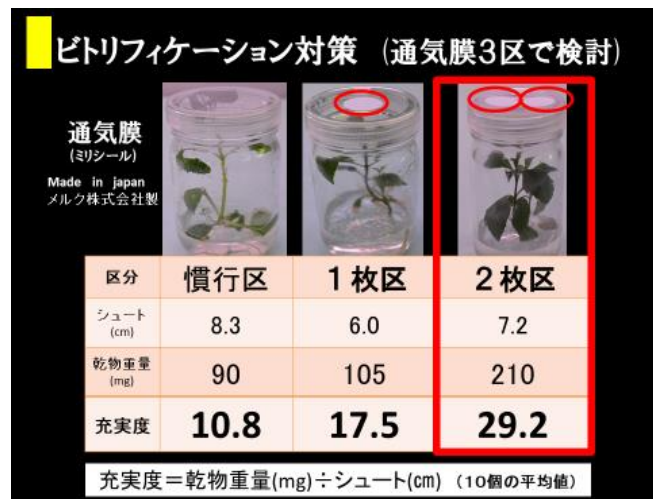
1. 遺伝子組換えによる無病化培養シュートの構築

(1) 茎頂培養

茎頂培養はクリーンベンチ内の実体顕微鏡により、ダリアの茎と葉の間にある生長点 0.3mm を摘出、1/2MS 培地で無菌培養しました。効率的な培養方法を探るため 16 基盤目法(図 4)により、ナフトレン酢酸 0.01% とベンジルアデニン 0.03% の組成では 21 日目で培養シュートの数が多く継代培養により 51 日間で 100 倍に増殖できました(図 5)。



(図 4)



(図 5)

得られた培養シュートを分割し継代培養する中でビトリフィケーションの発生が課題となり、原因は酸素不足と培地の高糖度にあると仮説を立てました(図 6)。酸素不足対策としてキャップに通气膜を取付け、酸素供給を図る実験を 3 区設定して行いました。結果、通气膜 2 枚区は培養シュートの充実度が高くなりました。高糖度対策は、ショ糖の添加量を 3 区に分け検討。結果、1% 区はビトリフィケーションの発生は見られませんでした(図 7)。しかし、培地の栄養源であるショ糖が少ないためか、培養期間は慣行区の 2.9 倍も長く課題となりました(図 8)。そこで、培養方法を再検討。香川大学で研究したカルチャーパックに着目。フッ素樹脂フィルムと通气膜を取付け、通気性と光透過性を向上させた効果から、充実したシュートとなり、培養期間は 31 日間で慣行区に比べて 28% 短縮しました(図 9)。無病苗作出の期間短縮を図るため、培養シュートを 5 分割、培地に挿す発根順化法により 30 日間で白い根が密に張りガッチリとしたプラグ苗を育苗できました。従来の 60 日間に比較すると期間を 50% 短縮できました。



(図 6)



(図 7)



(図 8)



(図 9)

(2) 遺伝子解析によるウイルス検定・ウイロイド検定

ウイルスおよびウイロイド検定はマルチプレックス RT-PCR による遺伝子解析で実施しました。国内で確認されている「ダリアモザイクウイルス」「黄化えそウイルス」「矮化ウイロイド」について(図 10)、県園芸農業研究所パイオ育種部の技術指導をいただきサンプル調整と検出を繰り返し、PCR で RNA を増幅、逆転写し泳動法で鑑

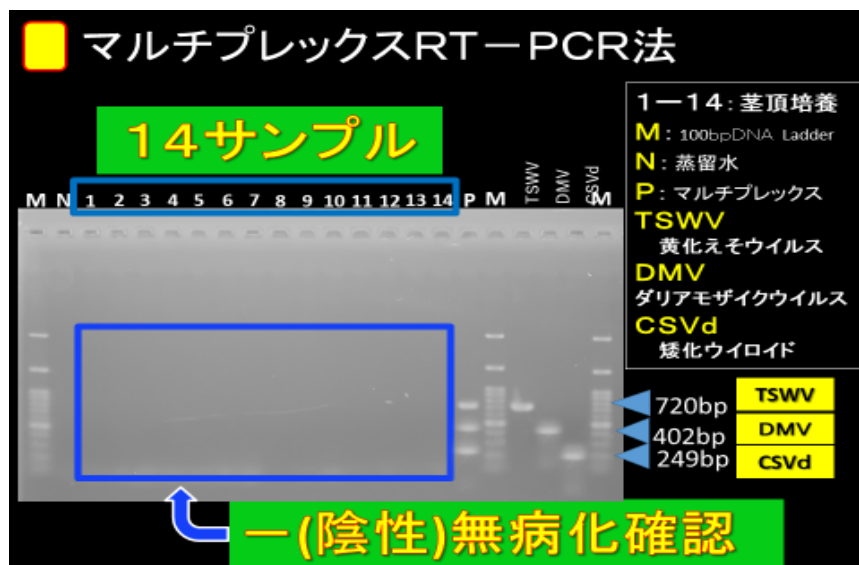
定しました(図1 1)。結果、ウイルスとウイロイドは検出されず、無病化していることを確認できました(図1 2)。以上から、目標1の遺伝子組み換えに用いる無病化培養シュートの構築に成功しました。



(図1 0)



(図1 1)



(図1 2)

(3) 生産力検定

生産力検定は、慣行区と比較し、葉数と草丈は1.4倍と生育旺盛です。茎葉と花弁に培養異は認められず鮮やかな大輪の花が咲きました(図1 3)。球根を掘り上げると肌の色艶に優れ、充実したものを1株平均5個収穫できました。無病苗から栽培したダリアの特徴は ①生育旺盛②花の品質向上③球根充実の3点です(図1 4)。



(図1 3)



(図1 4)

(4)普及活動

日本ダリア会主催、東京池袋サンシャインシティで開催された、国内最大規模「ダリアの華展」に高校初となる出展が実現しダリアの魅力を広くPRできました(図15、図16)。



(図15)



(図16)

(5)実証栽培の実験

実証栽培の実験を実施しました。3名の農家で延べ10a、500本の無病苗を実証栽培しました。本年度は記録的な猛暑となり、高温障害による立ち枯れや品質低下など被害は深刻でした。猛暑の影響は全国のダリア産地も同じであり品質と収量の低下は著しく、全国の市場で品薄傾向が続きました。そのような中、無病苗実証栽培をお願いしている渡部遼平さんの圃場では置賜農業高校が命名した「魅せる青春夢舞台」を中心に、置賜農業高校オリジナル品種「十七彩」の他、「幸せの花嫁」、「ピンクダイヤモンド」は猛暑の中でも順調に生育(図17)。

とりわけ「魅せる青春夢舞台」は昨年の豪雨と今年の猛暑で渡部さん以外全滅、市場出荷は皆無でした。実証栽培した「魅せる青春夢舞台」を出荷すると東京大田市場から大きな反響があったこと、無病苗は収量および品質に優れていることを報告してくださいました(図18)。



(図17)



(図18)

2. ダリアDNAの抽出法の検討

ダリアのDNA抽出は山形県園芸農業研究所バイオ育種部の先生方の技術指導を受け実施しました(図19)。DNAは水には溶けやすいですが、エタノールには溶けにくいという性質を持っています。この性質を利用しています。静かにエタノールを注ぐと、混ざらずにエタノール層と水層の2層になります。そこで、水層にとけているDNAがエタノールに触れると、DNAは溶けていられずに析出します(図20)。



(図19)



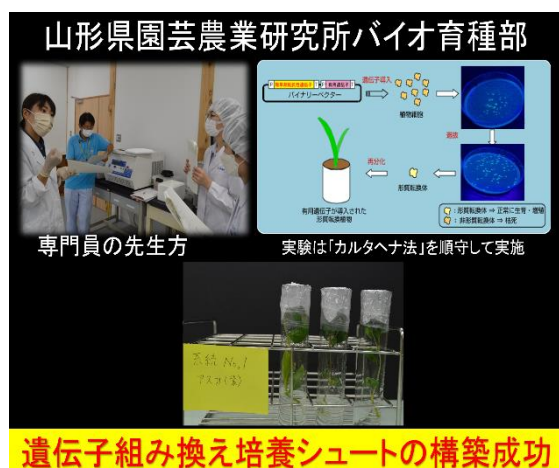
(図20)

3. ダリア遺伝子組換え方法の検討

これまで研究に取り組んできた「茎頂培養」によるウイルスフリーおよびウイロイドフリーの無病苗は栽培する過程で害虫による食害、栽培者が使用するハサミ等を媒体として再感染することが考えられます。つまりウイルスおよびウイロイドへの耐性はなく、持続可能なウイルスフリーおよびウイロイドフリーのダリアを作出するためには弱毒ウイルスとウイロイドを得てダリアへ組み込み再感染しない個体を作成することです。また、遺伝子組換えによる青色の色素を付与したダリアを咲かせるために解決しなければならないのは課題2つありました。1つ目は「青い花に含まれる数万種類ともいわれる遺伝子の中から青い色素「デルフィジン」を合成するために必要な遺伝子(青色遺伝子)を取り出すこと。2つ目はダリアの細胞に遺伝子を入れ、その細胞から遺伝子組換えダリアを作成する方法です。青色遺伝子は特許権で保護されている場合があるため入手は適正に行わなければならないことを学びました。青い花を咲かせる植物は自然界にたくさんあります。私たちは「濃い紫色のペチュニア」に注目しました。以前よりペチュニアはアントシアニンなどの花色研究のモデルであり1. 花色の遺伝子は花びらでは働いているが、葉では働いていない。2. 花弁が開く時に青色遺伝子が強く働く。3. 染色体上の遺伝子座が分かっていることです。

植物に遺伝子を入れる方法はいくつかありますが、ウイルスおよびウイロイドフリー、青いダリアを作成する場合「アグロバクテリウム」という土壌細菌の力を借りて導入する方法を検討しました。アグロバクテリウムは自分の遺伝子を植物の細胞に運ぶ能力があり、遺伝子導入に利用されているためです。導入後、遺伝子を受け取った細胞だけをうまく選び出してダリアの植物体に戻すためには、植物ホルモンや栄養分の種類、濃度等を最適化する必要があります。この作業を無菌的な条件下で組織培養を行います。青色の遺伝子はリンドウヤチョウマメ、トレニア、パンジーからも取得できる可能性があることも分かりました。

青色遺伝子を導入するため細胞の機能や形態がまだ分化していない不定型なカルス培養に取り組みました。カルスに青色遺伝子を導入して再分化させことを目標しました。カルス化と培養に約10ヶ月を要しました。この研究は1年間で作出を目指していましたが、進捗状況は、まだ道半ばです。令和6年度も継続研究に取り組んでいます(図21)。遺伝子組み換えは実験に時間がかかるため、ゲノム編集による青色ダリアとウイルスフリーおよびウイロイドフリーダリアの作出に向け新たな目標を掲げました。バイテク講習会を実施、アンケートの結果よい評価を得ました(図22)。



(図21)



(図22)

V. 研究のまとめ

1. 遺伝子組換えに用いる無病化した培養シュートを構築することができました。2. ダリアのDNAを抽出することができ、その手法を習得できました。3. ウイルスおよびウイロイドフリー化と青色の色素を遺伝子組換えにより作出する研究について知識と技術を学ぶことができ、ゲノム編集についても学習することができました。

VI. 今後の課題

今後の課題は、ダリアの遺伝子組換えおよびゲノム編集の研究を継続し深化することです。探究学習の深化に向け後輩にも研究成果を伝達します。

VII. 結びに

この探究学習は、NHK全国放送で紹介されると「ダリアを見に置賜へ行きたい」など大きな反響をいただきました。私達は自然界には存在しない「青色のダリア」などを遺伝子組み換えとゲノム編集により作出し必ず置賜農業高校から開花させます。



VIII. 謝意

この探究学習を進めるにあたり山形県園芸農業研究所バイオ育種部の先生方、千葉大学大学院の先生方、地域農家の皆様よりご指導をいただきました。また、バイオ情報普及会主催「全国科学教育大賞最優秀」を受賞でき多大なるご支援を頂戴いたしました。ここに心より感謝と御礼を申し上げます。全国最優秀という栄えある受賞を誇りに、これからも私たちの挑戦は続きます。