

地球規模課題対応国際科学技術協力 SATREPS

(生物資源研究分野「生物資源の持続可能な生産・利用に資する研究」領域)

メキシコ遺伝資源の多様性評価と持続的利用の基盤構築

(メキシコ合州国)

平成 25 年度実施報告書

代表者: 渡邊 和男

国立大学法人筑波大学・生命環境系・遺伝子実験センター 教授

<平成 24 度採択>

1. プロジェクト全体の実施概要

メキシコ政府が国家戦略として設立した国立遺伝資源センター (CNRG) に対し、JST と JICA の強力な枠組みである地球規模課題対応国際科学技術協力 (SATREPS) の課題として研究・運営活動支援を行い、気候変動対応に対応するための重要な研究基盤となる遺伝資源 (在来伝統品種や野生種などの品種改良の源) の生息域外保全を確実に実施し、同時に遺伝資源の持続的利用のための基盤的研究を行う。本研究課題ではメキシコ原産かつ地域的、国際的な農業経済上重要であるものの、研究が立ち遅れている植物種 6 種を中心とした遺伝的多様性評価及び長期保存法の確立や、遺伝資源の国際利用に関する利益配分の事例構築を通じ、メキシコの遺伝資源の保全管理及び遺伝資源の持続的利用を目指す。本国際共同研究を通じ、遺伝資源にかかわる利益配分の事例の構築、CNRG の機能強化による、途上国同士の南南協力を通じた地域の遺伝資源保全技術普及の拠点化を目指す。

本プロジェクト開始に先立って私たちの研究グループは CNRG に対し平成 22 年 7 月から平成 24 年 7 月まで科学技術研究員の派遣や研修生の受入れ等による協力を実施してきた。平成 24 年度は、JST ならびに JICA のご指導、ご協力のもと SATREPS 事業の本格的な実施のための協議議事録 (R/D) の両国責任者による署名、CNRG および CNRG の上部機関であるメキシコ国立農林牧畜研究所 (INIFAP) と筑波大学および (独) 農業生物資源研究所との研究協力の覚書署名、さらに相互交流により共同研究先との具体的な研究実施計画の策定が行なわれた。平成 25 年度からは、この研究実施計画に沿って研究活動を開始した。平成 25 年度は、日本人研究員の長期および短期派遣を通じ、メキシコでの実験設備・環境の整備、多様性評価および超低温保存のための評価材料の収集を開始した。日本側では、対象植物種の遺伝子マーカーの作出、メキシコ人研究員の受け入れと超低温保蔵法の技術移転および条件の検討を開始した。

2. 研究グループ別の実施内容

(1) 研究課題1「遺伝的多様性評価」

① 研究のねらい

対象種の遺伝的多様性評価手法の開発および評価を行い、CNRG および (他の) INIFAP 研究機関に保存されている対象種の遺伝資源の多様性を評価する。これより、CNRG における遺伝資源管理計画の策定が可能となる。

② 研究実施方法

CNRG および INIFAP 研究機関に保存されている対象植物種について、既存の分子マーカーのある種 (アボカド、アマランサス、カカオ) についてはその適応可能性を評価し、既存のマーカーの無い種 (ハヤトウリ、食用ホオズキ) については遺伝マーカーの作出を行った。マーカーの適用性評価を行った後、それらのマーカーを用いて CNRG および INIFAP 研究機関に生息域外保存されている遺伝資源の多様性評価を行った。この結果に基づき CNRG における遺伝資源管理 (コレクションの多様性評価、重複コレクションの同定、コアコレクションの選出) を行う。また、長期整備計画及び年次計画を策定した。また、多様性評価結果、コアコレクション等の情報を遺伝資源管理システムで公開することを試行した。

③ 当初の計画 (全体計画) に対する現在の進捗状況

平成 25 年度は筑波大学において日本産ハヤトウリを用い、ハヤトウリの遺伝マーカー 11 種を同定した。

現在は同マーカーを用いてメキシコ品種への応用を評価中。食用ホオズキについてもマーカーを作出したが、メキシコ遺伝資源での試用を CNRG と調整する段階になった。

既存のマーカーを使用する対象種(カカオ、アボカド、アマランサス)については、INIFAPに保存されているカカオ遺伝資源の多様性評価用のサンプリング(計 67 系統、252 個体)を行った。

アボカド遺伝資源の多様性評価について、INIFAP職員が筑波大学での研修を通じ基礎データの取得を行い、その結果に基づき平成 26 年度よりメキシコにて実際にINIFAP保存の遺伝資源の多様性評価を開始する予定である。アボカドについては、ほ場コレクションの所在地 Uruapan の治安が必ずしも安定でないため、現地技術職員と連携し、接ぎ木苗を多数作成し、これらからサンプル及び低温保存を目指した系統維持を行う手だてを手配中である。

アマランサスについては、他殖性であるため、集団はヘテロである。予定通り現地の INIFAP 職員によりサンプリングは行ったものの、サンプルが系統の個体識別なしでバルクされて提供されたため、そのままでは多様性解析用には不適であることが判明した。これについては平成 26 年度初頭に再度個別個体でのサンプリングを行うことを CNRG と再確認した。

表 1. 各対象種の 2014 年 3 月時点における進捗状況

項目/種	ハヤトウリ	カカオ	アボカド	食用ほおずき	アマランサス
遺伝資源所在地 (INIFAP 試験場)	GISeM	Rosario Izapa	Uruapan	Celaya	Valle de Mexico
CNRG への材料の分譲・移動	調整中	170 栽培系統 70 野生種	移動用接ぎ木作成の準備中	調整中	50 系統 (30-50 サンプル/系統)
基本情報の整備	準備中	完了	準備中	準備中	準備中
DNA の抽出方法	手法確定	独自手法確定	手法確定	試行	手法確定
DNA マーカーの利用可能数/状況 (種特異的 SSR など)	開発中	49 SSR	44 SSR	25 (<i>Physalis</i>) SSR 16 (<i>Solanum</i>) SSR	39 SSR
DNA マーカーの適用性の程度	準備中	28 SSR 適用可能	44 SSR 適用可能	5 SSR 適用可能	39 SSR 適用可能
マーカーの検出方法	キャピラリーシーケンサー	ゲル泳動試行	キャピラリーシーケンサー	ゲル泳動試行	ゲル泳動試行
当該プロジェクトでの新規の DNA マーカーの開発状況	11 SRR マーカー	追加必要か検討中	追加必要か検討中	追加必要か検討中	追加必要か検討中
多様性を評価した作物系統数	20 メキシコ系統	準備中	3 系統	準備中	準備中

- ④ カウンターパートへの技術移転の状況（日本側および相手国側とで相互に交換された技術情報を含む）

技術情報の交換として、カカオの既存マーカーを用いた多様性評価について、カウンターパート機関における先行研究の報告をもとに使用するマーカーの種類および数の選定を行った。

INIFAP職員が日本における研修期間中に、アボカドの多様性評価に向けた基礎データを取得したことにより、技術の獲得およびプロジェクトの円滑な推進に寄与することができた。このような日本における研修は効果的であり、帰国した職員がさらに他の職員に技術講習を行なうことでより大きな成果となる。

メキシコにおいて、派遣されている日本人研究者がINIFAP職員およびテクニシャンとともに多様性評価用の遺伝資源のサンプリングを実施したが、この機会を通じサンプリング手法の指導を効果的に行うことができた。アマランサスについては、サンプリング手法に関する理解の行き違いにより、平成 25 年度に集められたサンプルは多様性解析には不適で使用できないことが判明した。その後、担当者との打ち合わせより、平成 26 年度にはサンプリング手法を改善してのサンプル収集を行うことで合意した。これは研究材料の性質によってどのようにサンプリング計画を立てるべきかのよい実践指導となった。



図 1. 多様性評価用カカオ葉サンプリングの様子 (INIFAP ロサリオ・イサパ農場)

- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況（あれば）

平成 25 年度中に JICA の供与機材として、DNA シークエンサーおよび付属品が納入される予定であったが、JICA と INIFAP の間での現地での税金支払い手続きの調整のため、この機器の納入が半年ほど遅れている。この遅れにより、メキシコにおける大規模多様性解析の開始が当初の予定より遅れる見込み。このような状況の影響をできるだけ避けるため、代替手段として電気泳動による多様性解析は多数の電気泳動層で対応しており、徐々にではあるが進行している。

(2) 研究課題 2「遺伝資源の長期保存」

① 研究のねらい

CNRG における重要かつ本質的な活動である遺伝資源の安定した長期保存をめざし、低温・低湿条件で長期間保存可能ないわゆるオーソドックス種子に関して、それぞれの植物の貯蔵最適条件の検討を実施し、発芽力、生存能力評価法を開発する。また、熱帯原産の植物種に多い、難貯蔵性いわゆるリカルシ

トラント種子を持つ植物の安定的長期保存のための超低温保存法の確立を目指すとともに、その保存の基礎となる超低温条件下におけるリカルントラント種子の細胞生理学的知見を深める。

② 研究実施方法

オーソドックス種子(アマランサス、食用ホオズキ)について、CNRG 種子貯蔵庫の現行の貯蔵条件の妥当性確認および標準化を行う。また、難発芽性種子(ウチワサボテン)の長期保存法および種子の特性に関する研究を行う。これらの情報を含めた種子検査マニュアル作成に向けたプロトコルを作成する。また、種子病害検査法についても、遺伝資源保存事業において利用可能な手法の開発および標準化を行う。

リカルントラント種子を持つ対象種(アボカド、ハヤトウリ、カカオ)のそれぞれについて、まず組織培養系を確立する。その後、培養系の隔離した種から短期的な成長抑制保存法を確立するための効果的な成長抑制条件を検討した上で超低温保存法の開発を行い、プロトコル化する。また、この間に再生率の高い超低温保存法を開発し、多数の品種や系統に対して汎用性があるかどうかを検討する。すでに培養系の確立しているバレイショについては、超低温保存条件の標準化を行い、超低温保存を開始する。超低温条件下で保存された培養組織の遺伝的変異の確認、および細胞生理反応の解析を行う。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

平成 24 年度は対象種のうち培養系に移す材料(ハヤトウリとアボカド)の品種選定を行った。現在、平成 25 年に超低温保存法開発に用いる材料の準備を行っている。成長抑制保存法の確立についてはハヤトウリの培養に成功した系統を用いて、温度と培地条件の検討を行った。超低温保存に関してはクライオプレートを用いた乾燥法を開発し、ガラス化法とともに汎用性の高い手法であることを確認し、他植物への標準化を図っている。バレイショについてはすでに培養系(90 系統)が CNRG に保存されているので、超低温試験に用いる材料(13 系統)を選定し、増殖中である。SATREPS 事業の準備段階において、生物研ジーンバンクにてバレイショのクライオプレートを用いたガラス化法を開発しており(未発表)、その方法を CNRG に適応する計画である。したがって当初計画に沿って順調に進捗している。

④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

本プロジェクトの準備段階として科学技術研究員派遣制度による研究員派遣を行っていたが、その事業の一環として、2012 年 6 月 27 日～29 日にかけて『第 1 回 国際組織培養・超低温保存第 1 回栄養繁殖性植物のインビトロ保存と超低温保存国際シンポジウム』を開催した。CNRG、INIFAP、メキシコ国内の大学をはじめ、ラテンアメリカ地域から約 100 名が参加した。シンポジウムの一環として、低温保存や超低温保存の原理、手順の指導を行った。また、日墨グローバル・パートナーシップ研修計画で来日したメキシコ人研究者への熱帯果樹等の超低温保存の実習を行った。カカオの培養系を作るにあたって文献情報を提供した。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば) 特になし

(3) 研究課題 3「遺伝資源の国際社会との共同享受」

① 研究のねらい

遺伝資源の国際利用に関する利益配分の事例を構築し CNRG の遺伝資源の国際利用に関する運営に役立て、この経験を基に INIFAP が行なうメキシコ国内の遺伝資源に係る国家戦略に対する提言に貢献する。

② 研究実施方法

3.1 遺伝資源のアクセスと利益配分に関わる所有権と ELSI 要素の研究

日本国内の学術研究機関の遺伝資源に関わる取り扱いを材料譲渡契約書の観点から調査し、不備な点をあらいだし、利用に最適なモデル文書を検討する。

3.2 CNRG における国際間の遺伝資源交換および遺伝資源管理方針の策定及び事例構築

ラテンアメリカ諸国との関係の現状調査。

3.3 メキシコ国内の遺伝資源に係る国家戦略に対する提言

2012 年に政権が交代しているため、政府の天然資源に関わる基本方針に大きな変更の無いことを確認する。

3.4 遺伝資源管理学としての理論の構築および技術移転をにらんだ技術のパッケージ化

遺伝資源研究提要の構想の検討をおこなう。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

3.1 遺伝資源のアクセスと利益配分に関わる所有権と ELSI 要素の研究

日本国内の学術研究機関の遺伝資源に関わる取り扱いを材料譲渡契約書(MTA)の観点から調査し、不備な点をあらいだし、MTA に必要な事項を整理した。

3.2 CNRG における国際間の遺伝資源交換および遺伝資源管理方針の策定及び事例構築

ラテンアメリカ諸国との関係の現状調査。パラグアイとの事例を分析した。

3.3 メキシコ国内の遺伝資源に係る国家戦略に対する提言

政権交代後に政府の天然資源に関わる基本方針を確認し、当該プロジェクトが政府の重要な施策であることを再認識した。

3.4 遺伝資源管理学としての理論の構築および技術移転をにらんだ技術のパッケージ化

現代社会における遺伝資源の取り扱いについて提要の構想を検討した。

④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

遺伝資源の国際間譲渡に関する情報として、メキシコ国内で使用が奨励されている材料譲渡契約書(MTA)を入手した。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

特になし

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 0件、国際 2件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、国際 3件)
- ③ 論文詳細情報
 1. Ahmed M. Z., T. Shimazaki, S. Gulzar, A. Kikuchi, B. Gul, M. A. Khan, H.-W. Koyro, B. Huchzermeyer and K. N. Watanabe 2013. The influence of genes regulating transmembrane transport of Na⁺ on the salt resistance of *Aeluropus lagopoides*. Functional Plant Biology <http://dx.doi.org/10.1071/FP12346>
 2. Takao Niino, Shin-ichi Yamamoto, Kuniaki Fukui, Carlos Roman Castillo Martinez, Miriam Valle Arizaga, Toshikazu Matsumoto and Florent Engelmann, 2013, Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plate. CryoLetters 34:549-560.
 3. Toshikazu Matsumoto, Takashi Akihiro, Shinya Maki, Kouhei Mochida, Masaru Kitagawa, Daisuke Tanaka, Shin-ichi Yamamoto and Takao Niino, 2013, Genetic stability assessment of Wasabi plants regenerated from long-term cryopreserved shoot tips using morphological, biochemical and molecular analysis. CryoLetters 34, 128-136.

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0件、国際 0件、特許出願した発明数 0件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、国際 0件)

4. プロジェクト実施体制

(1) 「遺伝的多様性評価」グループ

- ① 研究者グループリーダー名： 渡邊 和男（筑波大学生命環境系 遺伝子実験センター・教授）
- ② 研究項目： CNRG において対象種の遺伝的多様性が評価され、その持続的利用の基礎が確立する
 - 1-1 対象種の遺伝子マーカーが開発される(筑波大学)
 - 1-2 開発したマーカーを用いた遺伝資源の多様性が解析される(CNRG)
 - 1-3 解析結果に基づき、CNRG において遺伝資源が管理される(筑波大学・NIAS・CNRG)
 - 1-4 ユーザーフレンドリーなインターフェースを備えた遺伝資源管理システムが構築される(NIAS・CNRG)
 - 1-5 CNRG の長期保全計画および年次計画が策定される(筑波大学・NIAS・CNRG)

(2) 「遺伝資源の長期保存」グループ

- ① 研究者グループリーダー名： 新野 孝男（筑波大学生命環境系 研究員）
- ② 研究項目： 対象種の長期にわたる安定した保全手法が確立する
 - 2-1 難貯蔵性種子の組織培養法およびによる長期保存法が開発される(筑波大学・NIAS・CNRG)
 - 2-2 難貯蔵性種子一般の超低温保存プロトコールが確立する（筑波大学・NIAS・CNRG）

2-3 種特異的な超低温保存プロトコールが確立する(筑波大学・NIAS・CNRG)

2-4 オーソドックス種子(乾燥、低温条件での長期保存の可能な種子)の長期貯蔵最適条件が確立する(筑波大学・NIAS・CNRG)

(3)「遺伝資源の国際社会との共同享受」グループ

① 研究者グループリーダー名: 渡邊 和男(筑波大学生命環境系 遺伝子実験センター・教授)

② 研究項目: CNRG の遺伝資源へのアクセスと利益配分(ABS)の方策が定められる

3-1 遺伝資源のアクセスと利益配分に関わる所有権とELSI要素が研究される(筑波大学)

3-2 CNRG における国際間の遺伝資源交換および遺伝資源管理方針の策定及び事例が構築される(筑波大学・NIAS・CNRG)

3-3 本プロジェクトの成果から、メキシコ国内の遺伝資源に係る国家戦略に対する提言がされる(筑波大学・NIAS・CNRG)

3-4 遺伝資源管理学としての理論が構築される(筑波大学・NIAS・CNRG)

以上