

キリンビールにおける植物分子育種

キリンビール(株)植物開発研究所 大谷 武

1983年、ノパリン合成酵素遺伝子プロモーターと、バクテリアのカナマイシン耐性遺伝子とからなる植物細胞発現用キメラ遺伝子が構築され、アグロバクテリウムTiプラスミドにより植物細胞に導入された。得られた形質転換タバコは、カナマイシンを含む培地上でも生育が可能な"組換え植物"となり、遺伝子工学による植物育種の幕開きとなった。その後の6年間、植物分子生物学では基礎・応用の両分野で目ざましい進歩がみられた。基礎分野では、アグロバクテリウムと植物の分子レベルでの相互作用、トランスポゾン、葉緑体遺伝子の構造、形質転換系の開発、遺伝子発現の調節機構など様々な領域で驚くべき知見が公表されつつある。一方応用面では、各種除草剤耐性、ウイルス抵抗性及び耐虫性植物等が遺伝子工学により育成され、野外でのフィールドパフォーマンスが評価されつつある。

地球的規模で進行中の砂漠化、酸性雨による森林の消失、21世紀中頃には100億人と予想される急激な人口増加は飛躍的な食糧生産性の向上を必要としている。植物遺伝子工学は、この要請に応えうる技術として、今や実験室段階から一歩進んで畑でその先端性と実用性が試されている。

キリンビール株式会社は、1983年10月に原料研究所(現植物開発研究所)を開設して以来、植物育種と効率的な生産システムの開発に携わってきた。前者については、従来育種、細胞及び遺伝子工学的な手法を用い、後者については組織培養、人工種子、バレイショのマイクロチューバー等の技術を開発中である。また、一部の植物についてはすでに商品化にも成功している。今回の講演では、キリン社が実施中の遺伝子工学による分子育種の中から、弱毒ウイルスcDNAの発現によるウイルス抵抗性育種とバレイショ形質転換系の確立及び遺伝子発現について紹介する。

(1) ウィルス抵抗性育種

ウィルスに感染した植物は、近縁種のウィルスによる二次感染からまぬがれる現象、いわゆる干渉作用が古くから知られている。これを利用して我が国では、生物農薬として弱毒ウィルスの散布が実施されてきた。我々がウィルス抵抗性育種として用いたアプローチは、弱毒系ウィルスRNAを植物細胞で産生し、強毒系ウィルスの被害に対して抵抗性を持つ形質転換植物を育種することにある。

タバコモザイクウィルス(TMV)はタバコウィルスグループに属し、一本鎖RNA分子とコートタンパク質から成り、広範囲の植物を宿主とする。まず初めに、トマト系TMVの野性株であるL株の完全長cDNA(6.4 Kb)をカリフラワーモザイクウィルス(CaMV)の35Sプロモーターの下流に連結した。なおここで、プロモーターからの転写はcDNAの5'末から始まるように構築し、cDNAの3'末下流には特別の転写終結シグナルを用いていない。このような構築遺伝子をアグロバクテリウムTiプラスミドベクターにより、リーフディスク法でタバコに導入した。得られた形質転換植物体の葉には、TMV感染葉に特有のモザイク病徴が出現した。L系TMV

cDNAを1コピー組み込んだ形質転換体を自殖し、後代について病徴を調べた。その結果、病徴を示すものとそうでないものの比が3:1のメンデル分離比を示した。これらの実験結果から、形質転換体では活性あるTMV-RNAが転写され、さらには野性株と同一の感染性のあるウイルスが増殖しているものと推定された。

そこで次に、弱毒系TMVであるL₁₁A株の全長cDNAの発現を試みた。L₁₁A株は、L株から高温処理と病徴選抜により作り出された弱毒株である。この株は弱毒性が非常に安定しているため、トマトのハウス栽培で生物農薬として実用化されてきた。また、L株及びL₁₁A株の全塩基配列の比較から、L₁₁A株の弱毒化は、L株の複製酵素である130Kタンパク質の3つのアミノ酸が置換したことに由来していることが明らかになっている。35Sプロモーター/L₁₁A cDNAを組み込んだ形質転換タバコの外見はほぼ正常で、L株感染で特徴的なモザイク病徴は見られなかった。また、生育の異常も観察されなかった。形質転換体で感染性のあるL₁₁A株TMV-RNAが産生(増殖)されていることは、葉の磨砕液をタバコXanthine種に接種すると局所病斑が現れることから証明された。32個体の形質転換体について、L株TMVの感染実験を実施した。その結果、すべての個体は感染後6週間後でも全く病徴を示さずに正常に生育した。干渉作用のメカニズムについては不明の点もあるが、弱毒株cDNA発現による抵抗性育種の有用性は実証されたと言える。現在、部分欠損株を用いた干渉能の可能性について検討を進めている。

(2) バレイショ形質転換

バレイショは世界で年間3億トン以上も生産される重要な作物の一つである。双子葉植物であり容易にアグロバクテリウムに感染し、また栄養繁殖により増殖が可能であり、分子育種に恰好の作物と言える。

我々は、日本の主要バレイショ品種である農林1号、メイクイーン、男爵、紅丸及びキリン社育成系統についてアグロバクテリウムによる形質転換系を実用レベルで確立した。塊茎から切り出した直径1cmのディスクにNPT-II遺伝子を組み込んだTiプラスミド中間ベクターあるいはバイナリーベクターを保有するアグロバクテリウムを感染させ、カナマイシン存在下で再分化培地に置床することによって、いずれの品種でも用いたディスクの半数以上からカナマイシン耐性の不定芽を得ることができた。

この形質転換系を用いて、CaMV 35Sプロモーターにより11Sダイズ種子貯蔵タンパク質の一つであるグリシニンA₂B_{1a}サブユニットcDNAをバレイショに導入した。A₂B_{1a}グリシニンは、ダイズ種子では酸性(A₂)と塩基性(B_{1a})サブユニットにプロセスされた後、ジスルフィド結合した中間サブユニット構造(A-B)6個よりなる6量体としてプロテインボディ中に存在する。一方、形質転換バレイショの塊茎中では、プロセスされない融合タンパク質として存在していることが示された。A₂B_{1a}のcDNAを形質転換タバコで発現させると、種子ではA₂とB_{1a}にプロセスされるが、葉などではバレイショ塊茎と同様にプロセスされないことを我々は確認している。プロセッシングや細胞内局在性がどの程度グリシニンタンパク質の安定性と関係があるかは不明だが、種子以外の器官ではプロセッシングに関与する酵素を欠いているか、細胞内ソーティングが正しく行われていないことを示している。