

花卉育種における遺伝子操作技術の応用

サントリー株式会社
基礎研究所分子育種研究室 声刈俊彦

長年の伝統的な植物育種により食糧としての効率的な生産のみならず、観賞用の植物にも精力的な育種がなされてきた。その結果として数多くの有用な植物が産み出されてきたが、伝統的な育種技術にはその技術固有の欠点と限界が存在する。例えば、i) 交配による育種では必要な遺伝形質のみならず不要な形質も持ち込まれることから、ある特定の遺伝子だけの導入は困難であり、育種としての正確さに欠けること。また、ii) それぞれの交配可能な植物種が持つ遺伝子プールに限度があるため、新しい植物の育種が制限される場合があることなどである。

1970年代の遺伝子組換え技術の進歩により、特定の遺伝子を単離し、他の生物に導入する技術が可能となった。植物においても1980年代に形質転換の方法が開発され、遺伝子組換えによる新しい植物の育種が可能になった。この方法を用いればある特定の遺伝子だけの導入が可能であるし、植物種が本来持たない遺伝子を導入することにより、全く新しい形質を導入することも可能である。このように遺伝子組換えの技術は先に上げた伝統的な育種での問題点を解決する方法として非常に有効である。現在、遺伝子組換えによる植物の育種は、そのマーケットの大きさから農作物を中心に展開されている。特にトマトでの研究が進んでおり、アメリカにおいて商品化も間近い。花卉分野での利用例も幾つか知られているが、まだ少ないのが現状である。今後活発に行われることになるだろう。

以下、当社で行っている研究を中心に遺伝子組換え技術の花卉育種への応用について紹介する。

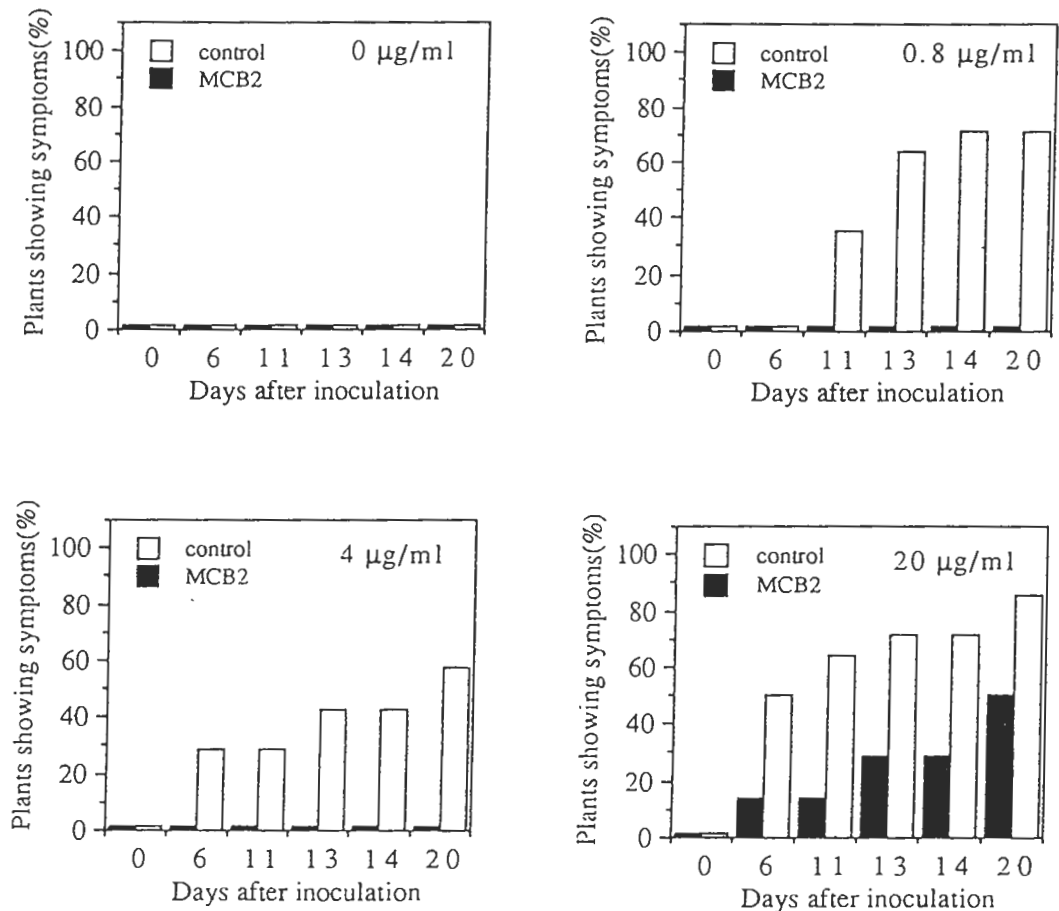
1. ウイルス抵抗性ペチュニアの育種

ウイルス病害は農作物の主要な病害の一つであり、その被害は極めて深刻である。しかも、現在のところウイルスに直接作用する薬剤は開発されておらず、その被害を抑える方法は間接的な手法に頼らざるを得ない。そうした中でウイルスの外被蛋白遺伝子を植物体内で発現させることにより、そのウイルスに対して抵抗性が現われるという現象が見い出された。我々はこの方法に基づいてキュウリモザイクウイルス(CMV)抵抗性のペチュニアを育種した。

始めに、CMV-Y系統をタバコで増殖させ、ウイルス粒子を精製した。このウイルスからゲノムRNAを抽出しcDNAを合成し、外被蛋白質遺伝子を取得した。さらにこのcDNAを35Sプロモーターの下流につなぎ、Tiプラスミドのバイナリー・ベクター系を用いてペチュニアに導入した。その後、カナマイシン抵抗性のカルスを選択し、植物体に再生させた。次に、これらの再生植物体の葉の抽出液を用いてELISAにより外被蛋白の発現を調べたところ、これらの植物6クローン中4クローンで発現が確認された。そのなかでELISA値の最も高いクローン(MCB2)を用いてCMV-Y系統の接種試験を行ったところ、

接種ウイルス濃度が4 $\mu\text{g/ml}$ まで完全なウイルス抵抗性を示した(第1図)。また、作出したウイルス抵抗性ペチュニアを元株と比較したところ、選択マーカーとしてのカナマイシン耐性と目的形質であるCMV抵抗性が獲得された以外に特性形質に差は認められていない。

我が国において、遺伝子組換え技術を用いて育種した植物を商品化するためには科学技術庁と農林水産省が設定したガイドラインに従って植物の安全性評価を行なう必要がある。そのプロセスは、閉鎖系実験、非閉鎖系実験(以上科学技術庁指針)、模擬的環境利用、開放系利用(以上農林水産省指針)の四段階に分けられる。いわゆる野外実験は模擬的環境利用以後の段階であるが、国内では農林水産省での組換えトマトの一例しかない。海外では既に数100例の報告がなされており、日本の研究の遅れが気になるところである。我々の組換えペチュニアは国内2例目の野外試験を目指して、非閉鎖系実験を行っている。

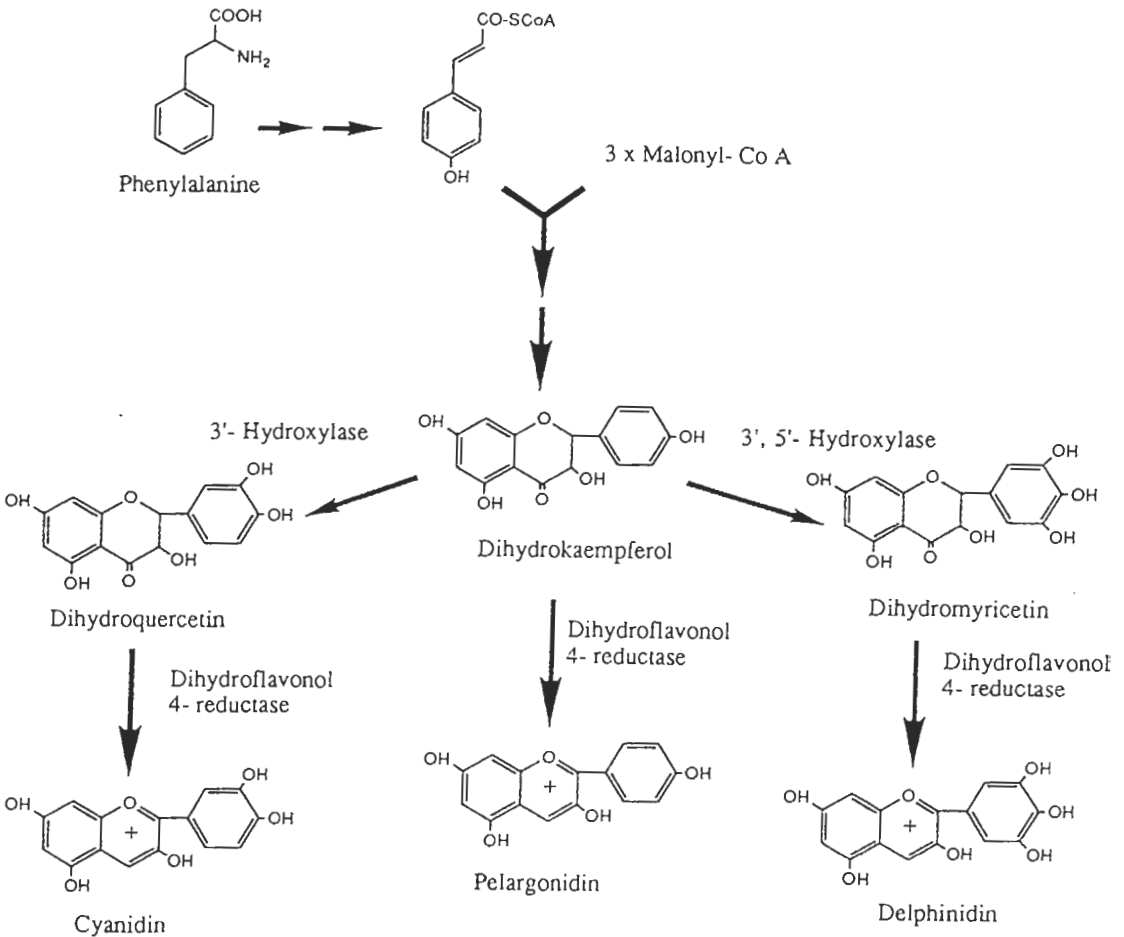


第1図 形質転換ペチュニアにおけるウイルス感染性

ウイルスフリーの組換え体(MCB2)及び非組換え体ペチュニアに純化したCMVを接種し、感染成立を病徴観察及びELISAにより調べた。各グラフの中の数字は感染に用いたCMVウイルスの濃度を示す。

2. 青バラの育種

バラ育種の歴史は長い。その歴史の中においても本当の青バラは得られていない。花が青色を示すためにはいくつかの条件を満足しなければならないが、もっとも重要な点は青色を示す化合物をその植物が合成できることである。青色には、植物色素のうちアントシアニ系の化合物が関係している。第2図にアントシアニン合成経路の略図を示した。この中でもB環に3つの水酸基を持つデルフィニジン骨格の化合物が重要である。また、安定した青色を示すためにはこのデルフィニジンがさらに修飾される必要がある。ところで、バラの花弁の色素を調べてみるとデルフィニジン骨格の化合物が認められない。さらに酵素化学的および遺伝学的解析の結果から、バラには3つ目の水酸基を付け



第2図 アントシアニジンの生合成経路

る酵素（3',5'-hydroxylase）の遺伝子が欠損していることが明かとなった。単純にはこの酵素の遺伝子を他の青い花から分離し、バラに導入することにより青いバラの育種が可能となる。我々はこの遺伝子の単離を試みた。

遺伝子の分離源として色素合成の遺伝学的研究の進んでいるペチュニアを用いた。ペチュニアでは3',5'-hydroxylaseの活性を直接制御する遺伝子座としてHf 1とHf 2の2つが知られている。これらは同じ酵素活性を担っているが、発現の部位が異なっている。Hf 1は花卉と花喉での活性発現に関係するが、Hf 2は花喉のみでの活性発現に関与している。また、酵素化学的な実験から、この酵素活性が、(1)ミクロソーム画分に存在すること、(2)NADPHに依存すること、(3)一酸化炭素や1-アミノベンゾトラジンなどのチトクローム P-450 阻害剤で阻害されること、が明かとなり、この酵素がチトクローム P-450 の一種であることが示唆された。そこで、ほ乳類等で既に知られている他のチトクローム P-450 の塩基配列をもとに保存されている領域の合成プライマーを作製し、PCR 法により花卉特異的なチトクローム P-450 の遺伝子バンクを作製した。それらの中から塩基配列の決定、ノーザン解析、RFLP 解析等の方法を用いて求めるクローンの選択を行った。その結果、2つの独立した候補クローンが得られた。これらのクローンについて酵母での発現を調べたところ、両クローン共に3',5'-hydroxylaseの活性が認められ、さらにペチュニアのhf 1/hf 2 変異株を相補すること、また、それぞれのクローンがHf 1とHf 2に連鎖することから、目的の遺伝子が単離できたと結論した。現在、この遺伝子をバラに導入中である。

デルフィニジン骨格の化合物を生合成させることは青い花の育種の第一歩であるが、それ以外にも青色発現に関する要因がいくつかある。例えばデルフィニジンを安定な青色に保つためには液胞のpHが高くなければいけない。また、他のフラボノイドとのコピグメンテーションも必要である可能性が高い。現在、これらの要因についても検討を試みている。

新しい形質を植物に特異的に導入できる遺伝子組換え技術は植物育種分野での救世主になりうるだろう。確かに遺伝子組換え技術により今まで困難であった農薬や病害虫への抵抗性や商品の日持ちを良くするといった改良がなされている。これらの導入された形質はその機構が単純な物ばかりであり、単一遺伝子の導入により育種されたものである。遺伝子組換えによる植物育種は新しい方法ではあるが、基本的には単なる技術の一つに過ぎない。機構の複雑な形質を導入するためには目的とする有用形質に関する十分な基礎的な研究成果が必須となる。植物生理の基礎的研究の進展が、今後におけるこの技術の利用に大きく関係することは明らかであり、基礎研究で成果を上げるところが育種分野においても有利であることは間違いない。遺伝子組換えによる植物の育種で成果を上げようとするならば、植物の生理や代謝に関する基礎研究に力を注ぐべきであろう。