

パーティクルガンによる

イネへの遺伝子導入法

石川県農業短期大学農業資源研究所

教授 島田 多喜子

1. はじめに

一昨年(1996年)の5月、遺伝子組換え技術によって育成された日持ちのよい完熟トマトが商品化され話題となった。これは遺伝子組換え作物の初めての市場化であり、歴史的なことであるかもしれない。このトマトは、果実が熟すにつれて軟らかくなるという遺伝子が働かないように遺伝子組換えされたもので、したがって完熟しても軟らかくならず、輸送保存による傷みが少ない。遺伝子組換えということで消費者の拒否反応が危惧されたが、スーパーマーケットに売り出されるとすぐに売り切れたということである。優秀な品種の良い点はそのままで、欠点のみを改良できるという遺伝子組換え技術は、これからどんどん実用品種を生み出していくことになるだろう。

遺伝子組換え作物の育成には、2つの要素があり、1つは遺伝子の単離であり、他は遺伝子の導入である。農業上有用な遺伝子、例えば耐寒性、耐病性、多収性などに関与する遺伝子を単離することは容易なことではない。しかし、ウイルス病に抵抗性の遺伝子、耐虫性に関する遺伝子、除草剤抵抗性遺伝子等いくつかの遺伝子が単離され、それらが導入され新しい野菜や穀物が育成されつつある。また、研究は日進月歩であり、これからもどんどん農業上有用な遺伝子が単離されていくだろう。次に、これらの遺伝子をどのようにして植物に持たせるかという問題がある。こちらの方は、かなり有効な方法が開発されてきている。ここでは、イネに遺伝子を導入する方法として、比較的新しい方法であるパーティクルガン法について紹介する。

2. 遺伝子を導入する方法

植物細胞に異種の遺伝子(DNA)を導入する

方法として、アグロバクテリウムという土壌細菌を介する方法と直接細胞に遺伝子を挿入する方法とがある。イネでは、現在のところどちらの方法でも異種遺伝子を導入した植物体(形質転換体)を得ることができる。

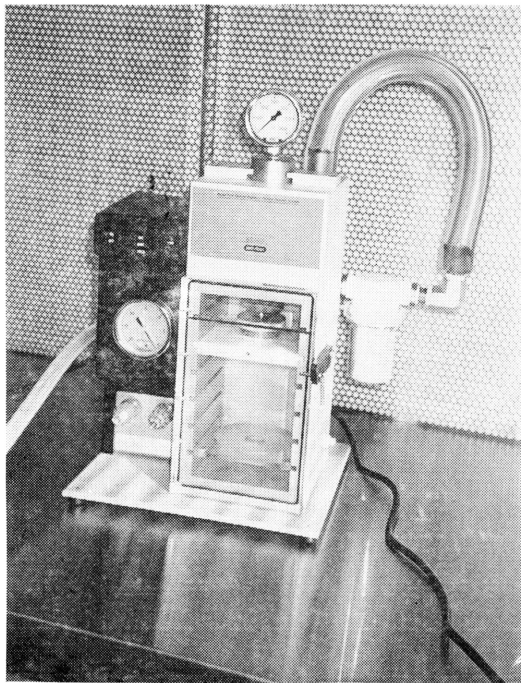
イネなど単子葉植物はアグロバクテリウムに感染することが困難であるためアグロバクテリウムを介する方法を用いて遺伝子導入することはできなかった。ところが一昨年日本たばこ産業株式会社の研究者達は、工夫を凝らしてアグロバクテリウムを用いてイネの形質転換に成功した。かなり効率的で、再現性もあり、これからのイネの形質転換系として重要な位置を占めると考えられる。

直接遺伝子導入法としては、2つの方法がある。植物細胞は動物細胞と違い、堅い細胞壁に守られている。そのため細胞内に遺伝子を機械的に挿入することは困難であった。そこで細胞壁を酵素で溶かし、裸の細胞「プロトプラスト」にして、それに遺伝子を導入する方法が開発された。現在までイネではこの方法が最も広く使われてきている。しかし、プロトプラストを用いる方法には、主に2つの難点がある。1つは、イネの品種の中にはプロトプラスト培養が困難な品種があり、この方法が使えない品種があるということである。他の点は、プロトプラスト培養など組織培養によって突然変異が生じやすく、稔性のある正常なイネを得る効率が低いことである。

プロトプラストにしないで細胞壁のある細胞に直接遺伝子を導入する方法として、パーティクルガン法が開発された。金あるいはタングステン微粒子(1~2 μ m)に遺伝子をまぶし、それを細胞壁を貫く強い力で発射して細胞内に導入し、遺伝子も一緒に細胞内に入れようというものであ

る。イネでは品種によってプロトプラスト培養が難しいものがあることを述べたが、プロトプラスト培養が困難な植物種は多い。例えば大変重要な作物であるコムギ、オオムギ、ダイズなどがそうである。それらの植物では、パーティクルガン法で形質転換体が得られるようになってきている。この方法について次節で詳しく述べる。

図1 パーティクルガン装置
Biolistic PDS1000/He (BioRad)



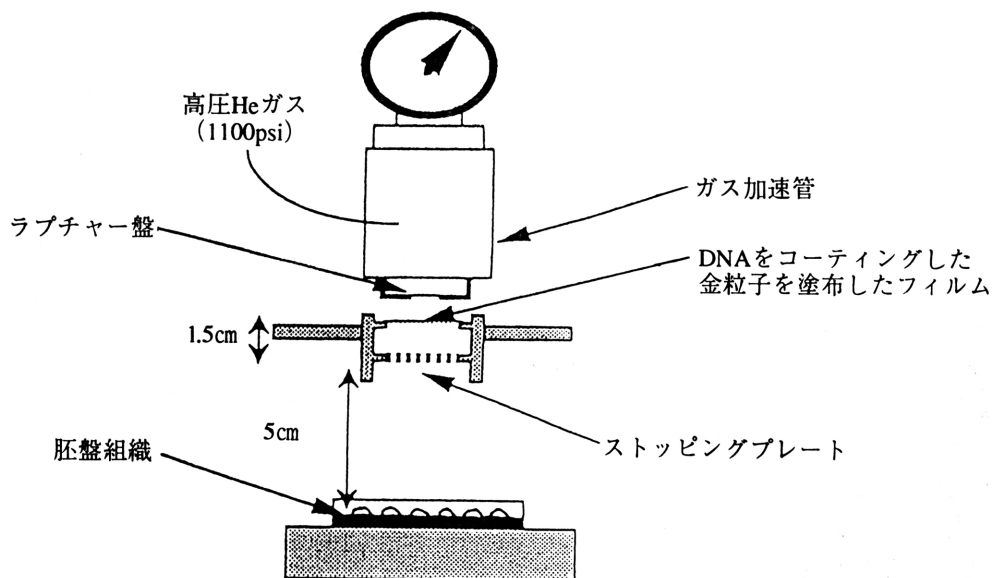
3. パーティクルガンによる遺伝子導入の原理

1987年、米国 Sanford らは、遺伝子をコーティングした金の微粒子を弾丸にぬりつけ、銃によって遺伝子を細胞壁のある細胞に導入することに成功した。現在では、パーティクルガン装置は改良され、図1に示すように銃とは想像もつかない形になっている。また、当初は火薬の爆発によって発射していたが、我々が使っている装置(図1)は Bio-Rad 社から発売されているもので、圧縮ヘリウムガスの圧力で発射している。広島大学森川弘道教授が開発したエアライフル式の装置もある。

パーティクルガンの模式図を図2に示す。遺伝子をコーティングした金の微粒子を発射体であるフィルムに塗り付けてセットする。ヘリウムガスの圧力でフィルムは強い力で発射されるが、すぐ下にある金網のストッププレートで止まる。しかしフィルムに塗り付けられた金粒子は網目から飛び出しターゲットの組織細胞に撃ち込まれ、遺伝子も細胞内に入ることになる。

金の粒子と共に遺伝子も細胞内に入り、うまく遺伝子が染色体に組み込まれた細胞を選抜して、それから植物体を再生させる。この点に関してはプロトプラストに遺伝子を導入する方法と大きな違いはない。ただパーティクルガン法の場合、生長点の細胞に遺伝子を導入して、直ちに形質転換

図2 パーティクルガン装置の模式図。ストッププレート(金網)から遺伝子をコーティングした金粒子が維織細胞に向かって飛び出す



した芽を獲得できる可能性がある。ダイズ等では、生長点にパーティクルガンで遺伝子を導入して形質転換体を得ている。ただし、この場合は遺伝子が組み込まれている部分とそうでない部分がキメラになっている可能性がある。

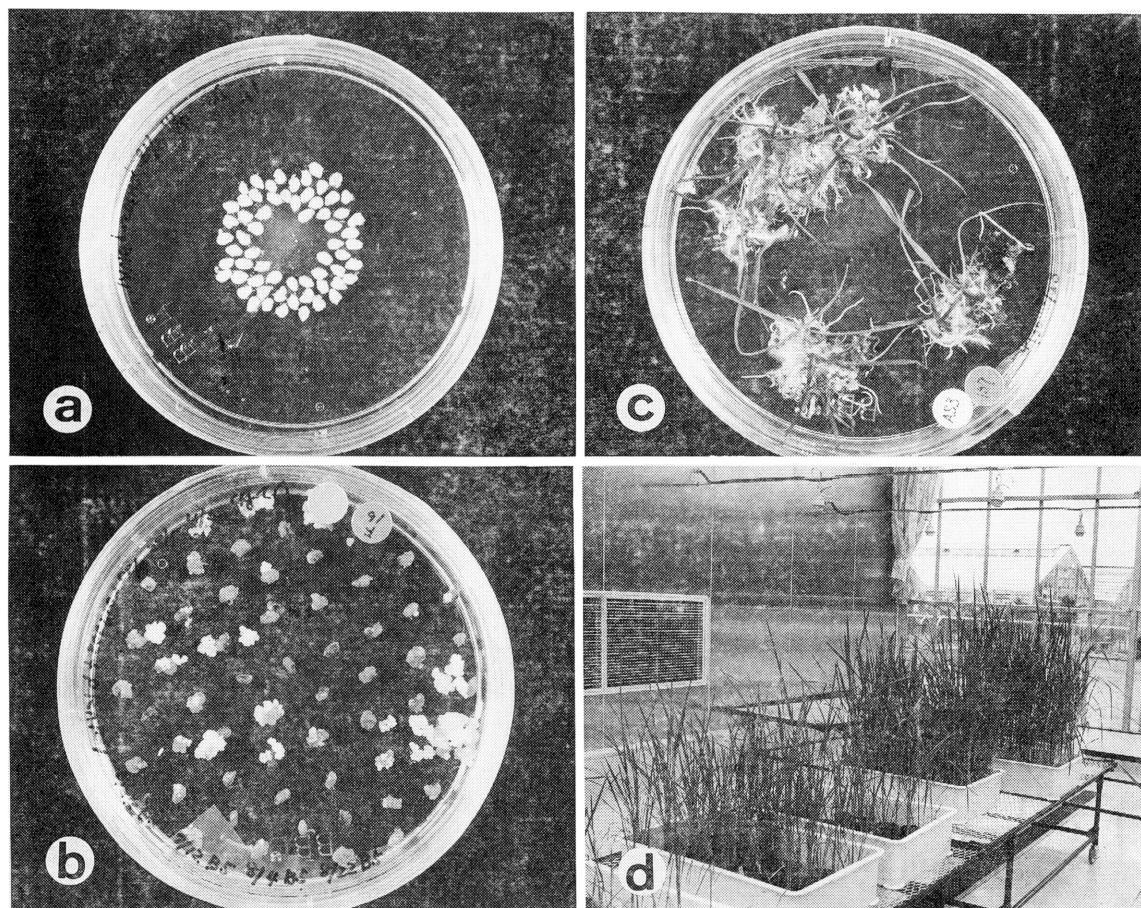
4. パーティクルガンによる形質転換イネの育成
実際に、どのようにして異種遺伝子を組み込んだ形質転換イネを作るのか、我々の行っているパーティクルガンを使った方法を述べる。

遺伝子を導入する組織としてイネ完熟種子の胚の胚盤組織を用いる。種子を滅菌し、2, 4-D ($2\text{ mg}/\ell$) 添加した培地上で培養する。約1週間後に発芽するが、胚盤組織が肥大してくる。その時期に胚を取り出し、芽の部分を取り除き、胚盤組織を上にしてシャーレに並べる(図3 a)。

そこに遺伝子をまぶした金の粒子をパーティクルガンで撃ち込む。

イネに導入したい遺伝子として、耐冷性に関係あると考えられているシロイヌナズナの脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*Fad7*) とする。外来遺伝子が組み込まれた細胞を選抜するためのマーカー遺伝子として、ピアラホス(除草剤ハービエースなどの成分)に対する抵抗性を付与する遺伝子 (*bar*) も同時に導入する。それぞれの遺伝子を含んだプラスミドを混合して金の微粒子($1.6\mu\text{m}$)にコーティングし、パーティクルガンでイネ胚盤組織に撃ち込む。その後、ピアラホスの含まれる培地上で胚盤組織を培養すると、約2ヶ月後にピアラホス抵抗性の細胞が増殖してくる(図3 b)。この細胞塊を再分化培地に移植すると植物体が再分化し、

図3 パーティクルガンによるイネの形質転換



- (a) パーティクルガンで遺伝子をうちこむために胚盤組織を上にして並べられたイネの胚
 (b) 除草剤が含まれている培地上で形質転換した細胞が増殖
 (c) 除草剤耐性の細胞から植物体が再生している
 (d) 融離温室内で正常に生育している形質転換イネ

形質転換体イネが得られる(図3c, d)。幸いなことに、この除草剤抵抗性形質転換イネの半数以上は、目的の *fad7* 遺伝子も組み込んでおり、目的の形質転換体を得られる。

100の種子を処理して、10個体以上の除草剤抵抗性イネが得られ、そのうちの半数以上が目的の遺伝子を組み込んでいることになる。形質転換効率としては5%程度といえる。これは、決して低い率ではないと考える。また、プロトプラスト培養が困難で遺伝子組換えが難しかったコシヒカリでも形質転換体を得られた。さらに形質転換イネの大部分は正常で稔性があった。このように、パーティクルガン法はプロトプラストを用いる方法より優れている点が多く、簡便な形質転換法として定着してきている。

5. パーティクルガン法の問題点

パーティクルガン法は、プロトプラストを用いる方法より優位な点が多いが、決して理想的な形質転換法とはいえない。

異種遺伝子が多く(多コピー)植物中に組み込まれると、遺伝子の不活化が起こりやすく、後の解析が複雑になるため、1コピーのみを組み込んだ形質転換体が望ましい。ところが直接導入法であると、多コピーを組み込んでしまうことが多く、組み込みを制御することができない。アグロバクテリウムを介する方法では1コピーのみを組み込むことが多く、この点でより優位である。

パーティクルガン法は、プロトプラスト培養を経ないため培養変異が比較的回避できると述べたが、培養過程を全く経ないというわけではないので、やはり低頻度でも培養変異は生ずる。また、培養能力の低い(培養細胞からの植物体の再生能力の低い)品種では、当然パーティクルガン法でも形質転換体を得るのは難しい。この点は、アグロバクテリウム法でも同じ制限を受ける。生長点

へのパーティクルガンによる遺伝子導入では、培養過程を経ない(カルス培養しない)ので培養変異および品種による制限を回避できるだろう。ただし、キメラの問題がある。

パーティクルガン法の場合、パーティクルガンという装置が必要である。商品化された装置がいくつか販売されるようになり、価格も下がってきているが、まだ高価である。さらに、この装置を使って得られた作物で商品化した場合、特許料を支払わなければならないという特許の問題がある。しかし、特許に関しては、この導入装置だけでなく、他の方法にもかかっているだろうし、遺伝子にも、形質転換体を得る色々な個所に特許がかかっていると聞いている。したがって、とりたててパーティクルガン装置のみの特許を問題にすることはないのかも知れない。

6. これから

イネへの異種遺伝子の導入方法が改善され、以前からは考えられないくらい簡単に形質転換イネが作られるようになってきている。昨年10月に、フィリピンにある国際イネ研究所で国際イネ遺伝学シンポジウムが開催された。そこでは、遺伝子組換えに関する発表が非常に多かったが、大部分はパーティクルガン法によるものであった。しかし、次の有望な方法としてアグロバクテリウム法が注目を集めていた。上に述べた問題点を解決するような理想的な独自の遺伝子導入法の開発と農業上有用な遺伝子の単離が相まって、我々の日常の食卓に遺伝子組換えイネのご飯が登場することになるのだろう。

(編集部注解)

キメラとはギリシャ神話に出てくるライオンの頭、ヒツジの胴、ヘビの尾を持つ怪物。生物学では二つ以上の異なった遺伝子型の細胞などから作られた一つの生物個体をいう。

