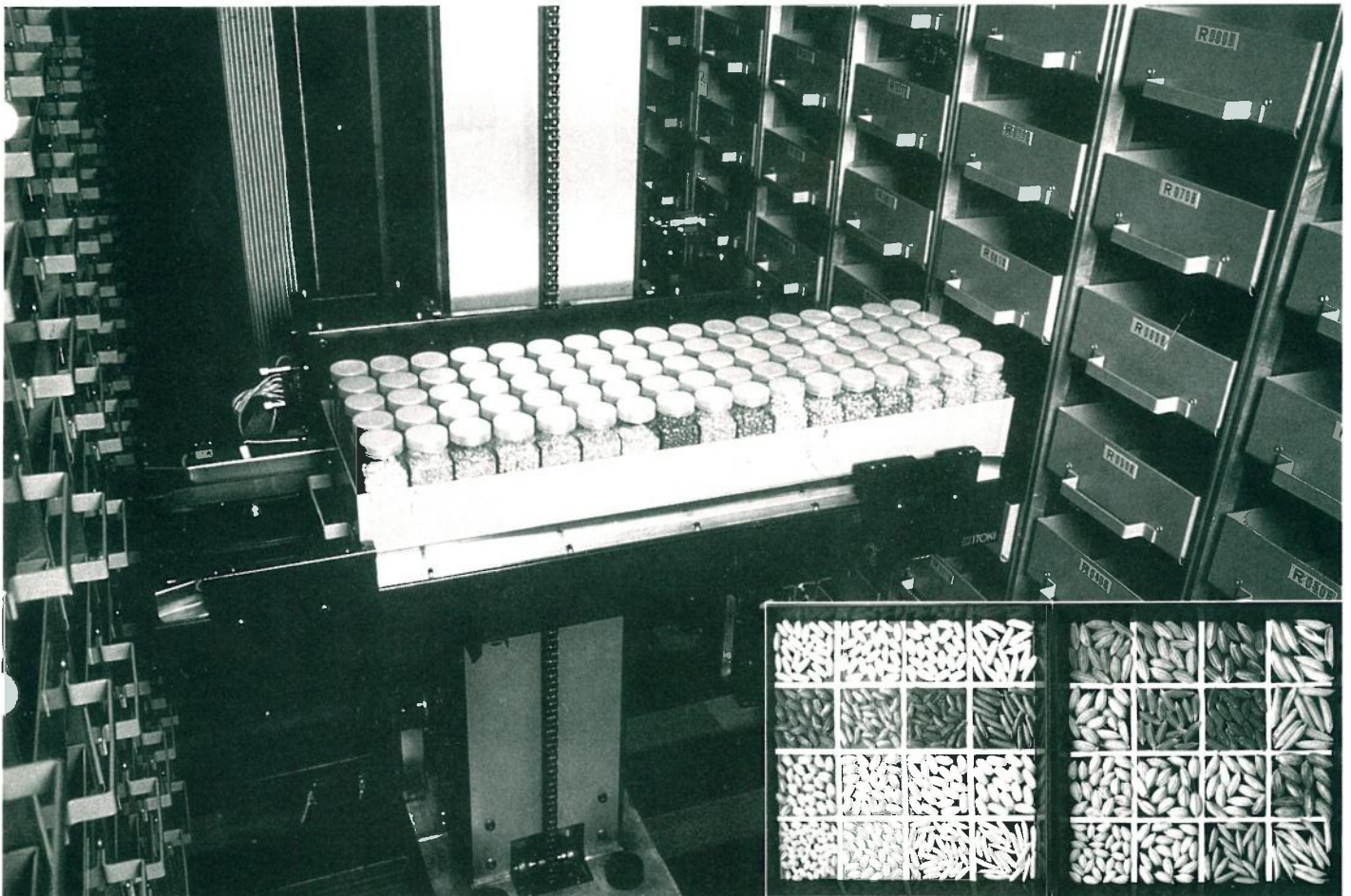


BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

農業試験研究一世紀記念



表紙説明

農林水産ジーンバンクの配布用種子貯蔵庫
とイネの種子および玄米

貯蔵庫は温度 -1°C 、湿度30%に保たれ、数十年間
種子の寿命を保ちます。現在、イネ関係では水稻、
陸稲、野生稲など約1万5千種の種子が保存されて
います。

(本文 26 ページ参照)

本号の紙面

- 国内情報.....1
イネのバイオテクノロジーに期待, waxy
遺伝子導入によるアミロース含量改変,
ソマクロナル変異による無毛品種育成,
薬培養による品種作出, 細胞融合による
細胞質雄性不稔イネの作出, 縞葉枯病抵
抗性トランスジェニックイネの安全性評
価, バイオテクノロジーを植物改良にど
う活かす, イネのバイテック関係既掲載情
報案内
文献情報.....21
1 本鎖RNAウイルスベクター, エイズウ
イルスの逆転写反応におけるRNase H活
性, アラビドプシスのエチレン反応調節
遺伝子, 生きた胚嚢をビデオで見る
特別情報.....26
イネの遺伝子源の保存

目 次

国内情報

櫛渕欽也

イネのバイオテクノロジーに期待する……………1

多田雄一

waxy遺伝子の導入によるイネのアミロース含量の改変……………2

西川 晶

ソマクロナル変異によるイネ無毛品種の育成……………5

丹野 久

薬培養によるイネ品種作出……………7

赤木宏守

細胞融合による細胞質雄性不稔イネの作出……………10

木村雄輔・島山重光・早川孝彦

縞葉枯病抵抗性イネの閉鎖系・非閉鎖系温室での安全性評価……………13

藤巻 宏

バイオテクノロジーを植物改良にどう活かす……………16

イネのバイオテクノロジー関係の既掲載情報についてのご案内……………20

文献情報

植物に外来遺伝子を導入する植物1本鎖RNAウイルスベクター……………21

エイズウイルスの逆転写反応におけるRNase H活性の重要性……………22

アラビドプシスのエチレン反応系の調節因子であるCTR1遺伝子は、

ガン遺伝子の一つであるRAF遺伝子の仲間であった……………23

生きた胚嚢をビデオで見る……………24

特別情報

國廣泰史

農林水産遺伝子バンクとイネ遺伝子源の保存……………26

お知らせ

話題の食品加工技術……………28

細胞融合による細胞質雄性不稔イネの作出 (本文 10 ページ)

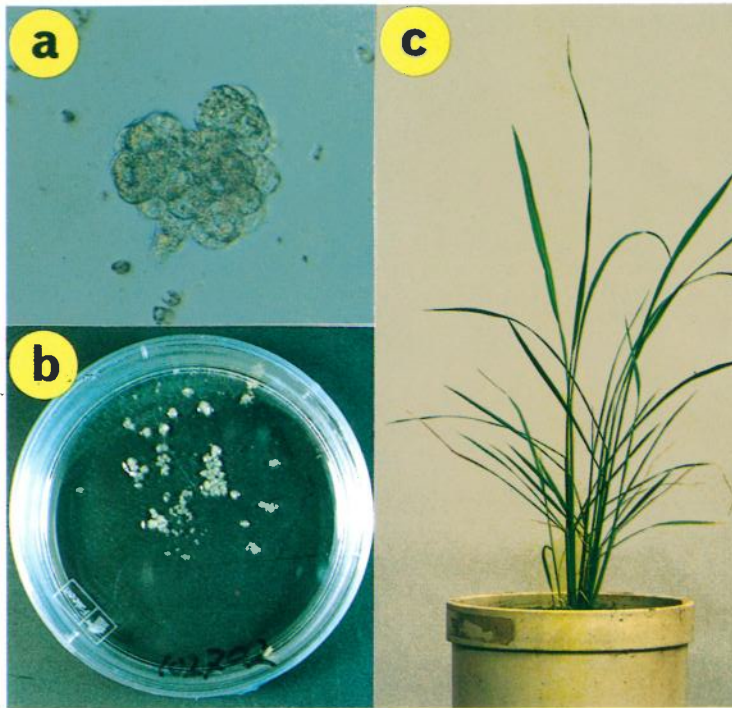


図1 サイブリッド植物の形成

- a: 分裂した融合細胞
- b: 形成した雑種コロニー
- c: 再生したサイブリッド植物

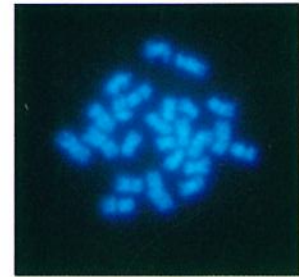
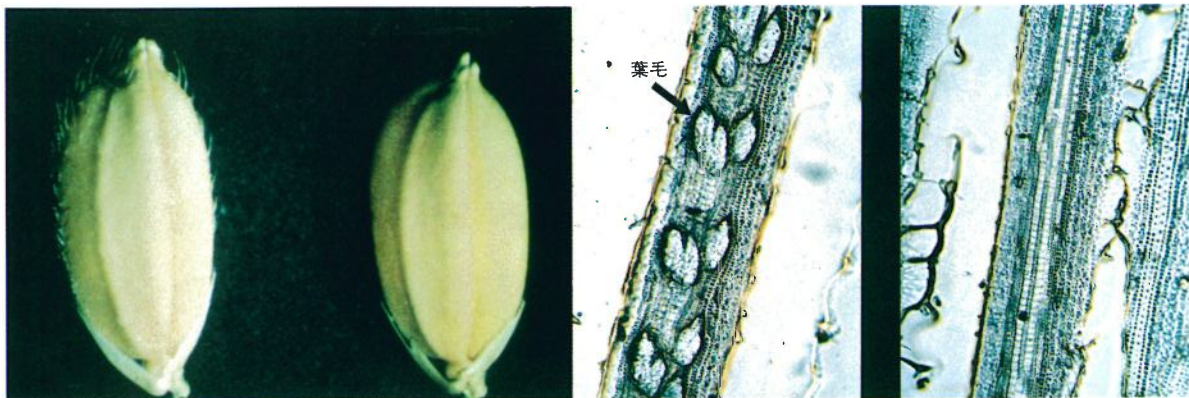


図2 サイブリッドの根端染色体
このサイブリッドは24本の染色体を有する

ソマクロナル変異によるイネ無毛性品種の育成 (本文 5 ページ)



薬培養により得られた無毛性品種「すみたから」のもみの毛茸
左: 黄金晴, 右: すみたから

有毛性 無毛性
大維管束表面の亞鈴型細胞上毛茸
左: 黄金晴, 右: すみたから

国内情報

イネのバイオテクノロジーに期待する

(財)日本植物調節剤研究協会

楢淵欽也

作物育種の立場からバイオテックは魅力ある手法を秘めた技術と期待されている。即ち、画期的遺伝変異の作出、負の遺伝相関の克服、細胞レベルでの超効率的選抜、人工種子、種苗増殖、育種年限の短縮など多くの面で従来育種の技術革新の可能性に期待がこめられている。

このような期待のもとに農水省の「バイオテック植物育種」プロジェクトが展開されて早くも10年が経過した。この間、都道府県や民間企業の参入も多く、イネのバイオテック育種は活発に進められてきた。

都道府県等では薬培養による半数体育種に取り組んでいるところが多く、既に数品種が育成され普及に移されている。この手法は育種年限の短縮技術として評価されているが現行手法に関する限り温室利用の世代促進法（従来法）との優劣は必しも明らかではなく、バイオテックならではの画期的技術とまでは云いがたいようである。半数体育種法のさらなる改良と成果向上を期待したい。

なお、細胞選抜によるストレス耐性等の効率的選抜法の開発は育種家にとって極めて魅力的である。「育種とは選抜なり」と云われるほど有用形質の早期、大量選抜は従来育種では全く及ばない効率的な手段であるだけにバイオテック研究陣の積極的な取り組みがのぞまれる。

バイオテックの本命と目される遺伝子操作に関しては、近年、プロトプラスト再分化系の確立や遺伝子の新しい導入手法の開発等によって、当初の予想を上廻るスピードでトランス

ジェニックイネを作出し得たという実績は高く評価される。

1990年代に入って、バイオテック研究の主流はゲノム解析に突入した感がある。イネのゲノムは12本のDNAラセン鎖であり、その上に数億の塩基対からなる約5万個の遺伝子の存在が推定されている。育種家が求める有用形質（耐病性、耐冷性、品質、耐倒伏性、多収性など）の発現に関与する遺伝子が染色体上のどこに在るか、どのような遺伝暗号をもっているかなどを究めるために、遺伝子の地図作りや塩基配列の決定などを中心としたゲノム解析研究の進展には育種家の熱い期待が寄せられている。

我が国の稲作には今日2つの観点から新たな変革が求められている。1つは担い手激減の中で規模拡大・基盤整備をふまえた省力・低コスト稲作の実現であり、さらに、1つは資源多消費型生産の現状反省にたつて、環境負荷の軽減に配慮したいいわゆる環境保全型農業の確立である。

このため、育種陣には、コシヒカリに代表されるいもち病耐病性や耐倒伏性に大きな弱点をもった銘柄品種群の改良が強く求められている。即ち、コシヒカリ級の良食味性と高度の耐病性や耐倒伏性等を組合せた新品種の開発が喫緊の課題となっている。コシヒカリ中心の現状の品種構成では、直播栽培や減農薬栽培等を指向する稲作の展望は拓きえないからである。

しかしながら、良食味性と耐病性や耐倒伏性とは負の遺伝相関が極めて高く、これらに関与する遺伝子の集積（育種）は長年に亙り育種家を手こずらせてきた。

今日、進展著しいバイテク手法の育種的利用によって、このような難問解決の緒を見出したいというのが育種家の切なる期待なのである。

イネのバイテク育種が名実ともに稔りある前進をとげるためには、バイテク研究者と育

種家との不断の交流の中で、育種的課題への理解と協力によって、従来型の育種法では及びもつかぬような画期的品種が創出されることを切に期待する。こうした実績をあげることに組換え体の安全性についての国民的理解を深めるためにも強く望まれる。

国内情報

waxy 遺伝子の導入によるイネの アミロース含量の改変

三井東圧化学(株)ライフサイエンス研究所
多田雄一

1. はじめに

コメの食味は「粘りけ」によって影響を受けることが知られており、日本ではコシヒカリのような粘りけのあるコメが好まれる。コメの粘りけはおもに穀粒中のデンプンを構成しているアミロースとアミロペクチンの量比によって決定される。アミロース含量はジャポニカイネで20%程度、粘りけの少ないインディカイネで25~30%程度である。この値が低いほど粘りけが強くなり、モチ米では0%である。アミロースの合成酵素遺伝子は遺伝学では Waxy 遺伝子座の遺伝子として染色体上の位置が知られていた。近年の分子生物学の進歩によりトウモロコシ¹⁾とコムギ²⁾で waxy 遺伝子が単離され、その塩基配列が決定された。これにより組換え DNA 技術を利用して作物の waxy 遺伝子の発現を制御し、貯蔵デンプンのアミロース含量を改変できる可能性が生まれた。

2. アンチセンス RNA 法

内生遺伝子の発現抑制方法としてはアンチセンス RNA 法が最も実用的であり、応用例

も多い。この方法の原理はまだ解明されていないが、アンチセンス遺伝子から転写されるアンチセンス RNA がセンス RNA (この場合は waxy mRNA) と相補的であるため両者で 2 本鎖が形成され、その結果、mRNA の翻訳が阻害されるために標的遺伝子の発現が抑制されると考えられている。植物ではカルコン合成酵素遺伝子の発現を抑制してペチュニアの花色を改変した例³⁾がアンチセンス RNA 法を実用形質の改変に応用した最初の報告である。筆者らはアンチセンス RNA 法で waxy 遺伝子の発現を抑制し、低アミロース米を作出することを試みた。

3. waxy 遺伝子の単離とアンチセンス waxy 遺伝子の構築、導入

本研究を開始した当時はイネの waxy 遺伝子を単離した報告はなかった。そこで筆者らはトウモロコシとコムギの waxy 遺伝子の塩基配列の相同性の高い部分をプライマーとした PCR によってイネ waxy 遺伝子の一部(エクソン 4 からエクソン 9 までの約 1.0 kb)を単離した⁴⁾。この配列をプラスミド pBI221 の CaMV35S プロモーターと β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子の間にアンチセンス鎖が転写される方向で挿入してアンチセンス waxy 遺伝子を含むプラスミド pWXA23 (図

TADA Yuichi

1) を構築した。ここで構築したアンチセンス waxy 遺伝子はレポーター遺伝子として GUS 遺伝子を持っているので GUS 活性を指標として遺伝子が導入された個体, カルスを容易に選抜できると考えられた。

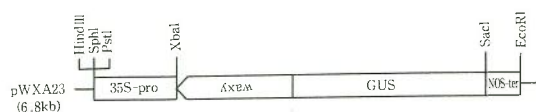


図1 アンチセンスwaxy遺伝子の構造

35S-pro: CaMV35Sプロモーター
GUS: β -グルクロニダーゼ遺伝子
waxy: PCR法で増幅したイネwaxy遺伝子の一部
NOS-ter: ノバリン合成遺伝子のターミネーター

アンチセンス waxy 遺伝子は AA バッファーを用いたエレクトロポレーション法⁵⁾によってイネの品種日本晴のプロトプラストにハイグロマイシン耐性遺伝子とともにco-transformationによって導入した。プロトプラストから形成されたハイグロマイシン耐性コロニーの中で GUS 活性を示すコロニーを X-Gluc による染色の有無で選抜し、これらのコロニーから5個体の再分化個体を得た。

4. 形質転換イネの解析

再分化個体の葉においても GUS 活性が認められたことからアンチセンス waxy 遺伝子が転写されていることが期待された。さらにサザンブロット解析によってアンチセンス waxy 遺伝子が染色体に組み込まれていることが確認された(図2)。

これらの個体はすべて4倍体であり極めて稔性が低かった。得られた自殖種子のアミロース含量を測定したところ、日本晴と同程度の含量の種子と低アミロース(6~14%)の種子に分離していた(表1)。さらに、これらの個体の葯培養から得られた2倍体においてもアミロース含量は15%であり、元品種の日本晴に比較して明らかに低い値を示した。また、4倍体の葉においてアンチセンスmRNAが転写されていることも確認した(図3)⁶⁾。さらに種子において waxy 遺伝子の mRNA

量と Waxy タンパクが減少していることも確認されている⁷⁾。このことからアンチセンス waxy 遺伝子によってアミロース含量を低下

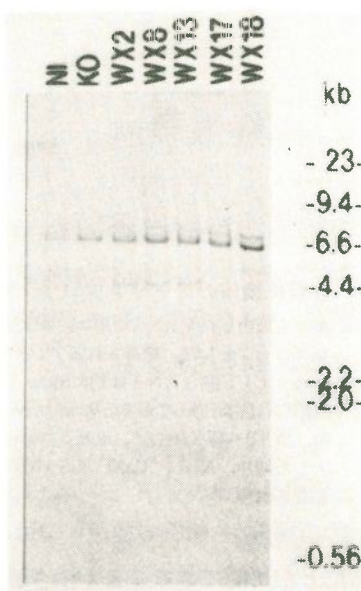


図2 形質転換体のサザンブロット解析

全DNAを *Eco*RI と *Hin*dIII で消化した。プローブは単離した waxy 断片を用いた。内生遺伝子は約 6.0kbである。形質転換体はサイズの異なる他のバンドがみられる。NI: 日本晴, KO: コガネモチ, WX2~WX18: アンチセンス waxy を導入した個体

表1 アミロース含量

親植物	導入遺伝子	倍数性	アミロース含量(%)				
WX2	pWXA23	4倍体	12	14	6	14	10
WX13	pWXA23	4倍体	9				
WX17	pWXA23	4倍体	9	19	18	14	14
			11	18	16		
WX18	pWXA23	4倍体	18	9	19	13	18
			19	13	18	17	15
NG14	pBI221	4倍体	15	18	19	16	16
			18	17	15	15	19
日本晴	-	2倍体	18	20	18	20	19
WX181	pWXA23	2倍体	15				
WX181-1	pWXA23	2倍体	15				
WX181-2	pWXA23	2倍体	15				
日本晴	-	2倍体	20				

表の上段(WX2から日本晴)は1粒ごとに分析、表の下段(WX18から日本晴)はまとめて粉砕して分析、WX181はWX18の葯培養由来のGUS活性を持つ個体、WX181-1, WX181-2はその自殖次代。

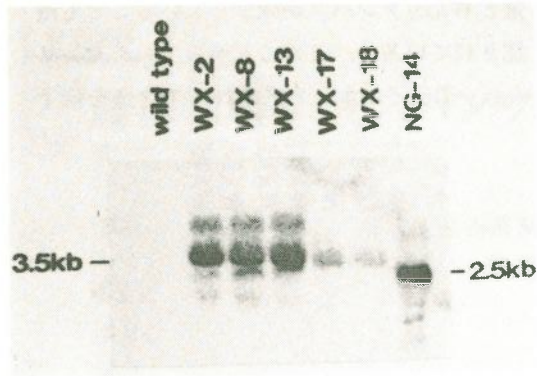


図3 形質転換体のノーザンプロット解析
葉から抽出した全RNAを用い、GUS遺伝子をプローブとした。期待されるアンチセンス waxy-GUS融合RNAは約3.5kb、GUSの mRNAは約2.5kbである。wild type: 日本晴, WX2~WX18: アンチセンスwaxyを導入した個体, NG14: CaMV35S-GUSを導入した4倍体

させることが可能であることが示された。

5. waxy 遺伝子のその他の導入例

また、中島らも同様にアンチセンス waxy 遺伝子の導入による低アミロース米の作出に成功している⁸⁾。彼らは waxy 遺伝子の cDNA と 2 種類のプロモーター (CaMV35S, トウモロコシ Adh) を用いてアンチセンス waxy 遺伝子を構築し、イネに導入した。彼らの実験では Adh プロモーターの場合にはアミロース含量 5~13% に低下したが、CaMV35S プロモーターの場合にはアミロース含量の低下はみられていない。いずれの場合もアミロース含量を完全にゼロに抑えることはできていない。また、彼らはセンス waxy 遺伝子をモチ米に導入し、25~30% のアミロースを産生させることにも成功している。

一方でジャガイモでもデンプン合成に関与する遺伝子の制御に関する研究が進んでおり、waxy 遺伝子にあたる顆粒結合性デンプン合成酵素のアンチセンス遺伝子の導入によってアミロースの合成が完全に抑制されたモチ性のジャガイモが作出されている⁹⁾。また、この遺伝子をセンスの向きでアミロース欠失ミュータントのジャガイモに導入することによってアミロースを産生させた報告もある¹⁰⁾。

6. おわりに

筆者らがここで紹介した低アミロース米は GUS 遺伝子を含むことから実用的な形質転換体とはいえない。現在、GUS 遺伝子を含まない形質転換体の作出を試みている。また、今後は様々なプロモーターの利用によって適度なアミロース含量のウルチ米や完全なモチ米が作出できると考えられる。逆に、モチ米にセンス waxy 遺伝子を導入して低アミロース米を作出することも試みている。さらに、アミロペクチンの合成能を高めて相対的にアミロース含量を低下させることも考えられる。これらの形質転換イネの食味は今後明らかにされるであろう。しかし、食味に関する因子は他にもいくつかあると考えられるため、低アミロース化だけで良食味になることは考えにくい。今後はさらに他の因子を解明し、その遺伝子を制御する必要が生じてこよう。しかしながら、従来は突然変異等に頼って行なわれてきた低アミロースなどの形質についての育種が分子育種によって可能になりつつあることは確かであり、今後の研究成果が期待される。

本研究は三井業際植物バイオ研究所の島田浩章博士、川崎努氏との共同研究による成果である。

文 献

- 1) Klosgen, R.B. et al. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 203 : 237-244
- 2) Rohde, W. et al. (1988) *Nucl. Acids. Res.* 16 : 7185-7186
- 3) van der Krol, A. J. et al. (1988) *Nature* 333 : 866-869
- 4) Shimada, H. and Y. Tada (1991) *Gene* 98 : 243-248
- 5) Tada, Y. et al. (1990) *Theor. Appl. Genet.* 80 : 475-480
- 6) 島田浩章・多田雄一 (1992) 日本農芸化学会誌 66 : 233
- 7) Shimada, H. et al. (1993) *Theor. Appl. Genet.* in press.
- 8) 中島みどりら (1991) 日本分子生物学会

年会講演要旨集, p. 178

9) Visser, R.G.F. et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225 : 289-296

10) van der Leij, F.R. et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 82 : 289-295

国内情報

ソマクロナル変異によるイネ無毛性品種の育成

住友化学工業(株)宝塚総合研究所
西川 晶

1. はじめに

育種のプロセスは①遺伝資源の探索・評価、②変異の拡大、③固定・選抜に分けることができる。変異拡大の手法として品種間交雑や突然変異がこれまで主として用いられてきた。近年、薬培養やプロトプラスト培養技術の進展により、組織培養に由来する変異すなわちソマクロナル変異の利用が試みられている。

一方、日本の水稻は葉身や籾に毛茸がある有毛品種が主体である。しかしながら、毛茸は籾すり時の粉塵の原因とされ、アメリカでは無毛性品種の作付けが大部分を占めている。日本では無毛性品種は他用途米として「アケノホシ」を農水省中国農業試験場が育成しているが、主食用の無毛性品種の育成はなされていないのが現状である。

そこで筆者らは薬培養によるソマクロナル変異を利用して主食用無毛性品種の育成を試みた。

2. 薬培養によるソマクロナル変異

薬培養の育種的利用の場面として、半数体經由でダブルハプロイドを得る遺伝的早期固定と培養により得られる変異の積極的利用がある。前者の場合には変異の抑制が、後者では変異の拡大が必要になる。いずれの目的に

おいても培養により生ずる変異の頻度や種類を正確に把握しておくことが不可欠である。

これまで、薬培養を行うことにより再分化植物体に染色体数、稈長、稔性、出穂期、穂の形態等の変異が認められることが報告されている^{1,2)}。しかしながら毛茸に関する変異は報告がなかったため筆者の研究室で検討した。「黄金晴」を材料として薬培養を行い、再分化植物体を個体ごとに自殖して得た種子(A₂世代)を系統栽培して変異を調査した。その結果、供試85系統中21系統で葉身毛茸に関する変異が認められた³⁾(表1)。変異には毛茸量が減少したものから、完全に無毛になったものまであり、系統内での分離も認められた。毛茸量が増加する変異は認められなかった。系統内で分離したものは薬培養時に染

表1 薬培養によるソマクロナル変異

変異形質	系統数*	頻度
供試系統数	85	100.0%
変異系統数計	58	68.2
稈長	37 (短34, 長12)	43.5%
葉身毛茸	21 (無9, 少・分離12)	24.7
稔性	17	20.0
穂長	10 (短9, 長1)	11.8
穂数	6 (多)	7.1
出穂期	3 (早生1, 晩生2)	3.5
粒大	1 (小)	1.2
芒	1 (多)	1.2
穎花の形態	1 (異常)	1.2

* : 1系統で2個以上の変異を示すものがあるため、各変異の合計は変異系統数計に一致しない。

色体が自然倍加した後に誘導された変異と考えられ、 A_2 世代で固定している系統については自然倍加以前に生じたものと推察される。本検討では稈長、稔性、穂長に関する変異も認められ、先の既報と一致している。

3. 無毛性の遺伝

組織培養で得た変異を育種で有効に利用するには変異の遺伝様式を把握しておくことが必要である。そこで、前述の薬培養に由来する葉身無毛性の系統（「スマライス2号」：現品種名「すみたから」）を用いて遺伝分析を進めた。葉身毛茸量を定量化するため、葉身中央部表面をスンプ法で写し取り、顕微鏡下で大維管束表面の3列の垂鈴型細胞上の剛毛数を測定することとした。材料として「スマライス2号」と有毛性品種「オオセト」および無毛性品種「アケノホシ」との F_1 、 F_2 を用いて解析を行った。「スマライス2号」/「オオセト」の F_1 では「オオセト」に比べて少ないものの葉身毛茸が観察されたことから劣性遺伝子に支配されていると考えられた（表2）。 F_2 では無毛性を示す個体群と「オオセト」の毛茸数をピークとする個体群に分離し、 $\chi^2(3:1)=2.01^{ns}$ と単因子支配による分離比3:1に適合した（表3）。したがって、本無毛性は単一の劣性遺伝子に支配さ

表2 無毛性の F_1 での発現

系統名	毛茸数 (本/10mm)
スマライス2号	0.0
スマライス2号/オオセト F_1	34.2
オオセト	124.0
スマライス2号/アケノホシ F_1	0.0
アケノホシ	0.0
参) 黄金晴	122.0

表3 無毛性の F_2 での分離

交雑組合せ	個体数		
	毛茸有	毛茸無	
スマライス2号/オオセト	135	57	$\chi^2(3:1)=2.01^{ns}$
スマライス2号/アケノホシ	0	100	

れていると推定された⁴⁾。また、「スマライス2号」/「アケノホシ」は F_1 で無毛性を示し、 F_2 でもすべての個体で無毛性を示したことから、「スマライス2号」の無毛性遺伝子は「アケノホシ」の無毛性遺伝子と同一であることが示された。以上のように薬培養により誘導される無毛性変異は単因子劣性遺伝子に支配され、これまで用いられてきた無毛性遺伝子と同一であることが示唆された。このように遺伝様式が単純であることは育種上の利用価値が高いことを示している。組織培養で得られる変異の分子レベルでの説明は現在各所で行われ、DNAのメチレーションによるとの知見も得られているが、今後より詳細な機作の説明が待たれるところである。

4. 無毛性品種「すみたから」の育成

上記の基本的知見を得るとともに、無毛性主食用品種の育成を試みた。親品種として温暖地良質多収品種である「黄金晴」を用い、1986年に薬培養を行い31個体の自殖種子を得た。翌1987年に各個体由来種子(A_2 世代)を単独系統として評価を行い、無毛性系統を含む13系統を選抜した。さらに1988年に選抜系統をそれぞれ系統群系統として評価し、無毛性および農業形質の固定を確認し育成を完了した⁵⁾。このように、短期間に育成を進めることができたのは前述のように薬培養により誘導される無毛性変異の遺伝様式が単純であることに加え、無毛性変異系統が他の不良変異を随伴しなかったことによると考えられる。育成系統は「すみたから」として1991年4月に品種登録された。

「すみたから」は葉身毛茸が無く、籾の毛茸も極少である。毛性以外の形質については親品種の「黄金晴」に類似している（表4）。また、いもち病抵抗性は「黄金晴」と同じ $Pi-a, i$ を持つ。

さらに、後代の安定性および地域適応性を調べるために系統適応性試験を実施した。1991年は A_6 世代種子を用いて滋賀県、兵庫県および広島県、1992年は A_7 世代種子を用

いて滋賀県、兵庫県、奈良県、岡山県および愛媛県の各試験場で行った。その結果、薬培養によると思われる不良な変異やポリジーンによる後代での分離は認められていない。また、農業形質に関しては次のような結論を得ている。「日本晴」と比較して、出穂期は同程度で、稈長は短稈、穂数がやや少なく、収量（精玄米重）は同程度かやや多収、玄米の品種および食味は同程度、耐倒伏性はやや強く、優れた農業特性を具備していると考えられる。ただ千粒重は小さい傾向にある。この点に関しては、無毛性遺伝子の多面発現的効果により千粒重が小さくなるとの報告もあり、無毛性品種開発にあたっての留意点と考えている。

5. おわりに

組織培養に由来する変異の育種上の有用性について我々の事例を中心に報告した。しかしながら、変異の分子レベルでの機作は言うまでもなく変異の方向性についても十分に解

表4 「すみたから」の生育特性

品種名	毛茸	出穂期	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/株)	全重 (kg/a)	玄米重 (kg/a)
すみたから	-	8.27	76.5	19.0	10.1	134.8	46.8
比) 黄金晴	+	8.28	77.2	19.1	10.3	127.6	44.5

明されているとは言えないのが現状である。組織培養は変異を生む技術であると同時に遺伝子操作や大量増殖の基盤技術である。したがって、本技術のメカニズムに対する理解が今後より一層重要となる。

文 献

- 1) 大野清春 (1975) 農技研報 D26 : 139-222
- 2) 若狭 暁 (1982) 農技研報 D89 : 121-200
- 3) 山本俊哉・副田康貴・西川 晶・広原日出男 (1990) : 育雑 40(別1) : 132-133
- 4) 西川 晶・山本俊哉・中島有紀・広原日出男 (1990) : 育雑 40(別1) : 272-273
- 5) 西川 晶・山本俊哉・辻 誠一・広原日出男 : 育雑 39(別2) : 360-361

国内情報

薬培養によるイネ品種作出

北海道立上川農業試験場場
丹野 久

1. はじめに

上川農業試験場では昭和55年より、良食味品種の早期開発のため、育種年限短縮の一手法として薬培養の育種の利用に取り組んできた。イネの薬培養についての基礎的な試験は多くあるものの、育種事業に本格的に適用した例としては日本ではじめての試みであった。これまでさまざまな試行錯誤を行い、薬培養

を用いた育種事業の体系を作りあげてきた。まだ十分とはいえないが、ここにその概要を紹介してみたい。

2. 育種年限の短縮について

表1のように、1年1作で行う標準的な育種法では品種育成まで11年も必要である。一方、冬期温室でのF₁養成や暖地（鹿児島）での世代促進法（世促法、1年2作）を用いて最も急いだ場合には、それを8年に短縮できる。しかし、さらに薬培養では、得られる系

表1 標準的な育種法と薬培養法による育種年限の比較

試 験 (世 代)	育 種 法 (年数)			
	標準 法	世 代 促進法	薬培養 A	薬培養 B
交 配 F ₁ 養成	1 2	夏 冬温室 } 1	夏 冬温室 } 1 3,4月培養	夏 冬温室 } 1 3,4月培養
F ₂ F ₃ 個体選抜 系統選抜	3 4 5 6	夏暖地 } 2 冬暖地 } — 3	夏温室A ₁ } 2 冬温室A ₂ } — —	夏温室A ₁ } 2 冬温室A ₂ } — —
生産力予 生産力本	7 8	4 5	3 4	— 3
奨 決 予 奨 決 本 奨 決 本	9 10 11	6 7 8	5 6 7	4 5 6

(新品種決定)

注) 生産力予: 生産力(収量性)検定予備試験
奨 決 予: 水稻奨励品種決定調査予備調査

統が純系なので、最短で交配から6年で品種育成が可能である。上川農試では生産力(収量性)検定本試験の供試系統数が限られることと、その供試種子量を十分に確保することが難しいことから、最初に生産力検定予備試験(生子)に供試している。この場合、交配から7年で品種が育成でき、世促法に比べ1年短い。なお、その育成期間の後期3か年は奨励品種決定試験であり、品種育成者間の取り決めて必ず必要とされている。

最短で育種した世促法由来と薬培養由来の生子の供試系統について比較すると、世促法由来系統では、組合せ、年次によって異なるが、その2~5割が分離を示し、その分離系統は圃場で廃棄される場合が多く、かなりの無駄を含むことになる。さらに、世促法由来系統にはその系統を構成する系統間、系統内の固定度を調査し、同時に次世代の試験のための採種を行う系統養成試験が必要であるが、薬培養由来の系統は純系なので固定度調査は不要で採種のみを行えばよく、そのために必要な圃場面積も1/2~1/3で済む。一方薬培養

由来の系統は、前世代で品質、熟期等の十分な選抜が行われず、世促法由来系統よりも特性が不十分な系統も含むことになる。

3. 薬培養の作業体系について

薬培養の材料作りから再分化個体の採種までの作業体系を図1に示した。供試材料は、夏に交配したF₁を冬期温室で養成し、それから採取した穂に10℃、10日間の低温処理を行ったものである。薬置床を行う場合、一核期の薬がカルス化しやすいことがわかっているが、顕微鏡で顕花ごとに確認することは労力がかかりすぎ実際的ではないので、外観からみて、外穎の幅がすでに成熟した時の大きさに達し、色はなお黄緑色で若く柔かいものを使う。培地はN₆。基本培地に、薬置床するカルス化培地では2・4-D 2mg/lを、それから得たカルスを移植する再分化培地には IAA 0.2mg/l と Kinetin 1mg/l を加えた培地を用い、いずれもしょ糖50g/l、寒天9g/lを含み、pHは5.8とする。培養条件については、温度は25℃で、照明はカルス形成には不要であるが、植物体の再分化には最低1,500ルクス程度が必要である。薬置床後1か月でカルスが形成され、カルス移植後1か月で再分化植物体を得られる。カルスを再分化培地に移植する場合、直径5mm程度が望ましく、あまり小さいものは増殖、再分化せず、大きすぎると再分化能が低下する。再分化植物は移植時のストレスに弱いので、まず最初に、25℃の恒温器の中で、外気に1週間ほどさら

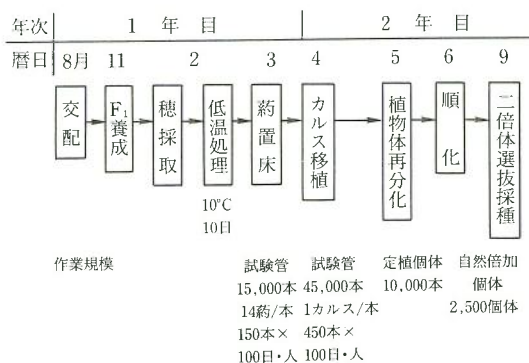


図1 薬培養作業体系

し、つぎに18℃の恒温器の中で、水温が20℃で酸素を供給した水を循環させた水槽に浮かべ、10日前後順化してから、遮光を行った温室ベッドに移植する。

以上の培養作業は、パート5人で1か月20日労働、ほぼ2か月で行い、試験管は計60,000本を使用し再生緑化植物体10,000個体、自然倍加稔実個体2,500個体を得ている。

4. 薬培養試験成績について

表2に示したように、薬当り稔実植物体(自然倍加個体)の割合が試験初年には0.2%であったが、数年後には1%、更にその後2%にも向上した。その原因は以下の3つによると思われる。第1に低温処理により安定的にカルスがとれるようになったこと、第2に、カルスの増殖が早すぎてその移植が間に合わなくなった場合、5℃で低温貯蔵することによりカルスの増殖を停止させ、大きくなりすぎて再分化能を低下させることなしに移植するようにしたこと。この場合、低温貯蔵が1か月もの長期にならないなら再分化能に大きな影響はないようである。第3に、順化装置の考案により、試験管から温室ベッドへの再生植物体の移植時の枯死率を低下させ、弱勢個体もある程度安定的に活着させることができるようになったことである。なお、再生植物体のほぼ7割を占める半数体については簡便で安定的に高率な倍加法が確立されておらず、育種的に利用できないのが現状である。

5. 育成品種について

薬培養が昭和55年に始まってから平成4年まで13年が経過した。この間、昭和62年に「上育394号」が、平成3年に「彩」が薬培養により育成された。「上育394号」は組合せが「しまひかり」×「キタアケ」で、そのF₁を薬培養したもので、日本ではじめての薬培養による実用品種である。玄米品質に欠点があるものの、その食味は「きらら397」並で

表2 薬培養試験成績

試験年次	供試薬数(A)	供試カルス数(B)	移植個体数(C)	生存個体中		B/A (%)	C/B (%)	E/A (%)
				稔実(E)	不稔()			
1980	99,364	8,256	—	161 (28)	406 (72)	8.3	—	0.2
1985	170,334	24,026	6,575	1,518 (29)	3,786 (71)	14.1	27.4	0.9
1988	138,904	34,238	10,860	2,721 (34)	5,238 (66)	24.6	31.7	2.0

注) 生存個体中の()の数字は各割合、%。
他の年次のデータは省略した。

ある。

「彩」は、食味をよくするために日本ではじめて低アミロース遺伝子を導入して育成された品種である。最初に、農林水産省農業生物資源研究所放射線育種場が「ニホンマサリ」にγ線(⁶⁰Co)を照射して作出した低アミロース突然変異系統「NM391」に、「イシカリ」を交配し「永系84271」が育成された。その「永系84271」に「キタアケ」を交配し、そのF₁の薬を培養して育成したのが「彩」である。昭和63年から平成2年までの3か年のアミロース含有率の平均値は、「彩」が15.1%で、「きらら397」の20.2%、新潟産「コシヒカリ」の16.8%よりも低かった。食味官能試験でも、柔らかすぎる、糯米臭がある、くどさがあるなどと嗜好による問題も一部指摘されているものの、粘りが「コシヒカリ」以上に強く柔らかく、総合で「コシヒカリ」に近いと評価される。このように低アミロース遺伝子のような特定の遺伝子を早期に北海道の品種に取り入れるには、薬培養は通常の育種法に比べ有利と思われる。

6. おわりに

今後とも薬培養による育種は継続され、育成される品種も着実に増えていくであろう。しかし、分離系統を多く含むとはいえ、世促法由来の系統は1年に20,000~30,000系統が供試されているのに対し、薬培養により育成される系統は2,500系統にすぎない。すなわ

ち、同じ育種年限の短縮を目的にしながらも、薬培養の担う育種規模は世促法の1割程度である。今後薬培養が育種事業で更に大きな役割を担うためには、培養効率や労働効率の向上のための基礎的な試験研究を積み重ねていく必要がある。

文 献

1) 大野清春 (1975) 農技研報告 D26 :

139-222

2) 新橋 登・相川宗敏 (1986) 育種学最近の進歩 第27集 : 13-18

3) 大槻義昭ほか (1989) 農業技術 44(3) : 135-139

4) 大槻義昭ほか (1989) 農業技術 44(4) : 177-182

国内情報

細胞融合による細胞質雄性不稔イネの作出

三井東圧化学(株)ライフサイエンス研究所
赤木宏守

1. はじめに

近年、イネにおいても雑種強勢の利用が試みられ、一部では既にハイブリッドライスとして実用的に栽培されはじめています。現在、このハイブリッドライスの種子を実用生産するために細胞質雄性不稔 (CMS) の現象が利用されている。

CMS は、高等植物に広く見られる現象で、CMS の植物では花粉の正常な発達が妨げられることで自殖種子が形成されなくなる。しかし、その雌蕊は正常に発達するため、正常な花粉を交配することによって種子を形成することができる。このため、CMS はハイブリッド種子の実用生産に広く利用されている。

従来、イネの CMS 系統は連続戻し交配により 8~10 世代かけて育成されており、求める栽培種を不稔化しハイブリッドライスを生産するまでには長い期間と多大の労力が必要であった。そのため、多数の栽培種をしかも短期間に CMS 化する方法の開発が望まれていた。

この CMS の原因となる因子は細胞質のミ

トコンドリアゲノムにコードされているとされる。したがって、細胞融合によって細胞質のみを栽培種に導入できれば、栽培種の CMS 化が可能であると考えられる。近年、イネでも細胞融合によって細胞質のみを導入することが可能となった^{1, 2, 3)}。我々も、この方法によってサイブリッドを合成し実用的に細胞質雄性不稔系統を育成することに成功した。

本稿では、この三井東圧化学で行ってきた細胞融合による細胞質雄性不稔系統の育成の研究例を紹介する¹⁾。

2. サイブリッドの合成系の確立

細胞質のみを導入したサイブリッドの合成系を確立するため、核および細胞質を特定できるマーカーを持つイネを材料として用いた。すなわち、核親としてジャポニカの栽培種“農林8号”のアリルアシルアミダーゼ1欠失突然変異株を、細胞質親としてインディカの細胞質を持つ“MTC-5A”を用いた。これらを用いることにより、マーカーを利用して合成したサイブリッドの細胞質と核の由来を明らかにすることができる。

サイブリッドを合成する手法として、放射線による核の破壊と薬剤による細胞質の部分

AKAGI Hiromori

的な破壊を組み合わせた方法を用いることにした。

1) X線による核の破壊

細胞に対してX線を照射することで核を選択的に破壊でき、細胞融合時に細胞質のみを導入できる。そこで、細胞質親の“MTC-5A”のプロトプラストを用いてX線の影響を調べた。従来、タバコやニンジンでは数 10krad で核が十分に破壊されるとされていたが、イネでは細胞分裂を完全に阻害するためには、120krad (2krad/min) 以上の照射線量が必要であった。このような強い処理でも、細胞は分裂が阻害されるのみで、一週間後でも原形質流動が観察され生存していた。そこで、この条件で処理したプロトプラストを細胞質親として用いることにした。

2) IOA による細胞質の不活化

雑種細胞のみを選抜するため、タンパク変成剤のヨードアセトアミド (IOA) を用いて核親の細胞質の不活化を行なった。“農林8号”のプロトプラストの分裂は、15mMのIOAで処理することで完全に抑制された。しかし、このプロトプラストはX線処理した細胞と混合して培養しただけで分裂能を回復したため、さらに条件を検討し、IOA濃度を30mMにあげることにより処理の効果を完全にした。

3) サイブリッドの構築

これらの処理を施した2種類のプロトプラストを混合し、電気刺激により融合させた。融合条件は蛍光色素を利用して設定した。すなわち、1MHz, 150V/cmの高周波を5秒間印加した後、2.5kV/cmの減衰波パルス50μ秒印加することで約15%の雑種細胞が形成された。上記、2種類の処理を施した細胞は、混合して融合させた場合にのみ多数のコロニーを形成した。したがって、得られたカルスは雑種であると期待される。これらのカルスを植物体再生培地に移植し、多数の植物体を得た (図1, 口絵)。

3. サイブリッドの同定

得られた植物体が目的とするサイブリッド

であることを確認するため、核と細胞質の由来のマーカを利用して特定した。

1) 核の構成

再生した植物体のアリルアシルアミダーゼ I 活性を測定した結果、これらは全てこの酵素を欠失していた。したがって、再生した植物体の核は、全て“農林8号”に由来することが明らかとなった。さらに、これら植物体は24本もしくは48本の染色体を有しており、X線によって“MTC-5A”の染色体が脱落したものと考えられた (図2, 口絵)。これらの結果から、得られた植物体は“農林8号”のみに由来する $2n=24$ の染色体からなる核を有すると結論した。

2) 細胞質の構成

サイブリッドの植物体から誘導したカルスを用いてミトコンドリアDNAを抽出し、その制限酵素パターンを比較した。サイブリッ

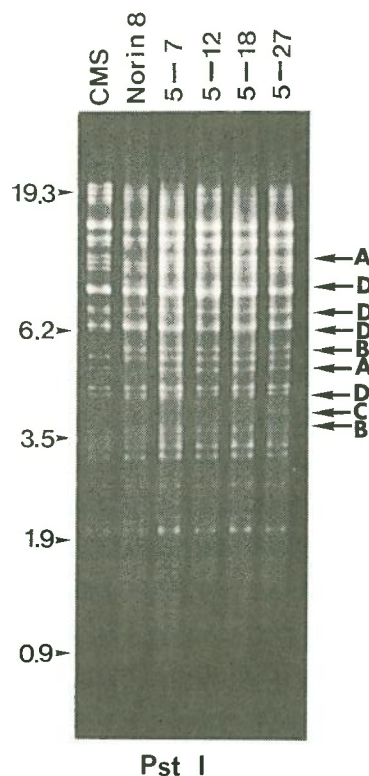


図3 サイブリッドのミトコンドリアDNAの制限酵素パターン

サイブリッド(5-7, 5-12, 5-18, 5-27)は、細胞質親(CMS)に特異的なバンド(A)と核親(Norin8)に特異的なバンド(B)を合わせ持つ。矢印Dはサイブリッドで欠失したバンド、矢印Cはサイブリッドに特異的なバンド。

ドは両親の特異的なバンドを合わせ持っており、その細胞質が両親に由来することが明らかとなった(図3)。(最近の研究で、共存した両親のミトコンドリアゲノムの間で組換えが生じているらしいことがわかってきた。)

以上の結果から、X線とIOAを用いた非対称融合によって得られた植物体は“農林8号”のみに由来する核と両親に由来する細胞質を合わせ持つサイブリッドであると結論した。

4. サイブリッドの特性

以上のように細胞融合によって細胞質のみを栽培種に導入することが可能となった。本研究の目的は、CMSの性質のみを栽培種に導入することにある。そこで、“ササニシキ”を核親として用い、非対称細胞融合によって、“Chinsurah Boro II”の細胞質を導入したサイブリッドを合成した。合成したサイブリッドの特性を、従来法によって育成した“ササニシキA”と比較解析した。比較に用いた“ササニシキA”は、“Chinsurah Boro II”にササニシキを連続戻し交配して育成したBT型のCMS系統である。

合成したサイブリッドの約85%の植物体が不稔性を示した。それらの不稔性がCMSであることを確認するため、10個体をランダムに選択し、“ササニシキ”の花粉を交配し、後代への遺伝様式を調べた。交配した全てのサイブリッドで交配種子(BC1)が得られ、得られたBC1植物は全て不稔であった。この結果は、不稔の原因が雄蕊にあり、その性質が母性遺伝することを示しており、サイブリッドがCMSであると結論した。

さらに、サイブリッドのCMSが導入した細胞質によるものであることを確認する目的で、BT型CMSの稔性回復遺伝子(*Rf1*)の影響を調べた。サイブリッドの後代(BC3)に*Rf1*をホモにもつ系統を交配して得たF₁を栽培し、その稔性を調べたところ全てのサイブリッドの系統で稔性の回復が認められた。また、F₁の花粉稔性からCMSが配偶体型

であることも示された。この結果から、サイブリッドでは導入した細胞質が機能してCMSを引き起こしていると考えられた。

現在まで7世代が経過したが、ブラシカのサイブリッドで報告されるような稔性の回復は認められない。このことは、導入した不稔性が安定していることを示している。さらに、細胞融合によって育成したCMS系統と戻し交配によって育成したCMS系統を母本として得たF₁を栽培し比較したが、形態的には全く差異が認められなかった。

以上の結果から、非対称細胞融合によってCMSの性質のみを栽培種に導入することが可能で、この方法で実用的にCMS系統の育成に応用できる結論した。

5. おわりに

今回開発した方法では、カルス誘導から約8か月でCMS化したサイブリッドのBC1種子が得られる。この方法では、培養変異等の変異が生じる可能性が予想される。そのため、戻し交配の過程での選抜が必要となるが、現実には3回の戻し交配で安定した系統が得られている。現在のところ、この方法で日本の栽培品種を中心に30品種をCMS化した。今後、これらのCMS系統を母本としたハイブリッドライスが実用化されていくと期待される。

また、このような実用化と平行して、サイブリッドを利用してCMSの因子を特定する試みも行ってきた。その結果、CMSのサイブリッドのみに共通に保存されている領域が見出され、これがCMSと深く関連しているらしいことなどもこの研究を通じて見出された。

文 献

- 1) Akagi, H. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215 : 501-506
- 2) Yang, Z.-Q. et al. (1989) *Theor. Appl. Genet.* 77 : 501-506
- 3) Kyouzuka, J. (1989) *Bio/Technology* 7 : 1171-1174

縞葉枯病抵抗性イネの閉鎖系・非閉鎖系 温室での安全性評価

*(株)植物工学研究所・**農業環境技術研究所
木村雄輔*・鳥山重光**・早川孝彦*

1. はじめに

近年のバイオテクノロジーの発展に伴い、新しい形質を持った遺伝子組換え植物の作出が可能となってきた。しかしこのような遺伝子組換え植物は今までに人類の歴史上触れたことのない性質をもつ場合があるため、野外で一般的に栽培する前に、その栽培特性を明らかにし環境への影響を評価することが要求されている。我々は、イネ縞葉枯ウイルス (rice stripe virus: RSV) の外被タンパク質 (RSV-CP) 遺伝子をイネ (品種: キヌヒカリ) に導入し、縞葉枯病抵抗性組換えイネの作出に成功した^{1,2)}。そこで、科学技術庁の指針に基づき閉鎖系、非閉鎖系の2種類の温室を用いて RSV 抵抗性組換えイネの環境に対する安全性評価試験を行った。以下にその概要を紹介する。

2. 調査項目

日本で組換え植物を野外で栽培するためには、閉鎖系温室、非閉鎖系温室、模擬的環境において栽培試験を行い、各段階で、既存の生態系等の環境への影響を評価することが、科学技術庁・農林水産省の指針によって定められている^{3,4)}。閉鎖系・非閉鎖系温室での「実験」は科学技術庁の指針により、模擬的環境・開放系利用による安全性評価「試験」は農林水産省の指針により定められている。

閉鎖系温室とは完全密閉型温室を指す。室内は陰圧に保たれ、給排気はフィルターを通じて行っているため花粉の流出は起こらない。また排水はタンクに貯めオートクレーブによる滅菌処理を行えるようになっている。非閉鎖系温室とは、昆虫等の進入を防ぐため網などでおおわれた一般的温室を指す。大気及び花粉は自由に流通できる。本試験の場合はポットは水槽式の台の上に置き、余剰の水は自然蒸発させるよう工夫したため排水はでない。模擬的環境利用とはフェンス等で隔離された野外の小規模圃場を指し、昆虫は飛来進入してくるが小動物の侵入は防げる。また、排水については特別な処置を講じていない。開放系利用とは通常栽培と同じであり、特別の制限措置は講じない。安全性評価試験では、閉鎖系温室から非閉鎖系温室、模擬的環境と徐々に一般的栽培環境へ近づけていき、各段階で安全性を確認した後に次の段階の栽培を行うものである。

我々は RSV 抵抗性組換えイネのうち、同一カルス由来の系統群 (以下組換えイネと総称) を用いて、平成3年4月~12月に閉鎖系温室 (R₁ 世代) で、平成4年4月~11月には非閉鎖系温室 (R₂ 世代) で導入遺伝子の安定性及び生態系に対する安全性評価試験を行った。

閉鎖系・非閉鎖系温室での調査項目及びその結果概略を表1に示す。閉鎖系温室と非閉鎖系温室の最大の相違点は、大気の流通の有無であることから、閉鎖系温室では自然交雑頻度等の繁殖に関する特性、大気中及び土壌中への有毒物質の産生性を中心に評価を行った。非閉鎖系温室では、次のステップが野外

KIMURA Yusuke, TORIYAMA Shigemitsu,
HAYAKAWA Takahiko

表1 閉鎖系・非閉鎖系温室での実験項目及び結果概略

実験項目	実験方法	閉鎖系	非閉鎖系	結果概略
1. 導入遺伝子の発現				
DNAの存在状態	サザン解析	○		RSV-CP 遺伝子確認
外被タンパク質の発現	ウェスタン解析	○	○	RSV-CP の発現確認
RSVに対する抵抗性	ヒメトビウンカによる 接種試験	○	○	RSV 抵抗性確認
2. 形態及び生育に関する特性*				
出穂期・稈長・ 穂長・穂数	観察・計測	○	○	体細胞変異は認められたが CP発現の影響なし
3. 繁殖に関する特性*				
雄性・雌性器官の形状	葯長・柱頭長の計測	○		差異なし
花粉稔性	ヨード染色により計測	○		差異なし
花粉飛散性	一定距離での自然交雑	○	○	自然交雑は検出できず
4. 雑草性に関する特性*				
低温感受性	10℃での生育観察		○	枯死程度に差異なし
種子の発芽性	成熟種子発芽率		○	差異なし
種子生産量	計測		○	差異なし
種子の脱粒性			○	差異なし
5. 有害物質の産生性*				
植物体内成分の比較	HPLC ^{a)}		○	ピーク位置・形状は同一
根からの分泌物の比較	HPLC ^{a)}	○		ピーク位置・形状は同一
植物体揮発性成分の比較	GC ^{b)}	○		ピーク位置・形状は同一
6. 後作に対する影響*				
イネ・コムギ・ ダイズ作への影響	組換えイネ作付土壌及び 組換えイネ体添加土壌で の栽培試験		○	組換えイネ栽培の 後作への影響なし
7. 土壌微生物生息数に対する影響*				
土壌中生息菌	出穂期・刈取期での 分離コロニー数計測		○	細菌数・糸状菌数 の差異なし

*) 組換えイネと非組換えイネとの比較試験

a) 高速液体クロマトグラフィー分析 b) ガスクロマトグラフィー分析

での栽培となるために、雑草化する可能性、植物体内での有毒物質の産生性、後作栽培への影響、土壌微生物生息数への影響を中心に評価を行った。なお、導入遺伝子発現の項目は文献1, 2) が詳しいので参照されたい。

3. 体細胞変異

組換えイネ作出の過程には、必ずプロトプラスト等の組織培養操作が必要である。このような組織培養を経た再生植物では一般に体細胞変異が起こることはよく知られており^{5, 6)}、イネのプロトプラスト再生系統でも

高頻度に観察されている。そこで、体細胞変異と RSV-CP 遺伝子の発現の影響を区別するために、同一カルス由来の系統中で、RSV-CP 遺伝子の発現が確認された系統（組換えイネ）と自殖後代の分離で RSV-CP 遺伝子の発現していない系統（対照系統）の出穂期・稈長・穂長・穂数を非組換えイネと比較した。その結果（表2）、出穂期の変化は認められなかったものの、組換えイネは非組換えイネに比べて、稈長、穂長が短く、穂数はやや増加していた。これらの形質は組換えイネと対照系統の間で差異は認められなかった。すなわち、これらの短稈化、短穂化、穂数の

表2 非閉鎖系温室での出穂期・稈長・穂長・穂数

植物体名	出穂期 (月・日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/株)
組換えイネ	8.24	79.4 b	20.4 b	8.9 a
対照系統	8.24	77.7 b	21.1 b	7.7 a b
非組換えイネ	8.24	83.1 a	22.5 a	6.7 b

播種期：6月3日，移植期：7月3日，1/5000 a ワグネルポットに1本植で移植。施肥はN分で4kg/10 a を全量基肥として施用。調査個体は各10個体。各数値のあとのa, bは分散分析によりa-b間で5%有意差があることを示す。

増加は外被タンパク質発現の影響ではなく、体細胞変異であると考えられる。

4. 自然交雑

組換えイネより産生された新しい遺伝情報を持った花粉が、周辺の植物にその遺伝情報を渡してしまうことは、遺伝子の種類によっては環境に大きな影響を与える可能性がある。イネの種間交雑の実験は多数行われているが、イネ (*Oryza sativa* L.) と交雑可能な種は、イネ属内の数種に限られ、いずれも我国では栽培されていない。そこで、イネ間の自然交雑頻度を測定した。

非閉鎖系温室内で組換えイネに隣接して非組換えイネを配置した。これら両者の間に交雑が起これば、非組換えイネについた種子中にRSV-CP遺伝子を持ったものが含まれるはずである。そこで非組換えイネより得られた種子200粒を播種し、苗からDNAを抽出し、PCR法を用いてRSV-CP遺伝子の有無を調査したが、全ての個体でRSV-CP遺伝子は検出されなかった。

イネは高度の自殖作物であり、花粉は数mは飛散するが⁷⁾花粉の寿命は数分から十数分と短い⁸⁾。実用的にも採種圃場の隔離距離は3mであり⁹⁾この距離以遠での交雑頻度は無視できるレベルと考えられている。これらのことから、通常の栽培では交雑による遺伝子拡散は無視できるレベルであると言える。

5. 雑草性

新しい遺伝情報を持った組換えイネが雑草化してしまうことも遺伝子の拡散につながり環境に与える影響が大きいと考えられる。イネは1年生草本であり、本州では低温・降霜のため植物体での越冬は不可能であり、イネの雑草化は問題になっていない。本実験では雑草化に関与すると考えられる形質で低温感受性、種子生産量、登熟種子の発芽率、種子脱粒性について比較調査した。その結果いづれの場合も組換えイネ、非組換えイネで差異は認められず、雑草化する可能性はほとんどないと考えられた。

6. 有毒物質産生性

組換えイネの有毒物質産生性の有無を調べるために我々は、植物体内の有機酸・核酸・糖の成分及び根から水耕液への分泌物を高速度液体クロマトグラフィーで、植物体からの揮発性成分をガスクロマトグラフィーで分析した。これらすべての分析において、組換えイネと非組換えイネでピークの位置・形状に差異は認められなかった。

組換えイネ・非組換えイネそれぞれの、作付土壌・イネ体添加土壌を用いてイネ・コムギ・ダイズを栽培したが、組換えイネ・非組換えイネの試験区間での生育には差異は認められなかった。また、出穂期・刈取期に土壌微生物(細菌・糸状菌)を分離したが、その生息数に差異は認められなかった。これらは植物・土壌微生物の生育・生存への影響は組換えイネ・非組換えイネで全く同等であることを示している。

以上より、組換えイネの有毒物質産生の可能性はほとんど考えられない。有毒物質の産生がないことを完全に証明することは難しいが、可能な限りのデータを揃えていくことが組換え植物の野外放出に向けて必要なことと考えている。

7. おわりに

世界的には、500件以上の組換え植物の野外試験報告例がある¹⁰⁾が、環境に対する悪影響の報告は1例もない。わが国では、組換え植物の安全性評価試験はまだ始まったばかりであり、一般栽培まで進んでいる例がこれまで1件あったのみである¹¹⁾。これはタバコモザイクウイルスの外被タンパク質遺伝子を導入したトマトであるが、栽培種と野生種の雑種(F₁)に導入したものであり、安全性評価試験のモデル植物の意味あいが強いと見える。

実用化を目指した組換え植物の安全性評価試験は、本組換えイネをはじめとして、同様の考え方によるRSV抵抗性イネ(農水省、本稿のイネとは別)、CMV抵抗性メロン(農水省)、CMV抵抗性ペチュニア(サントリー)で始まっている。組換え植物の閉鎖系、非閉鎖系温室段階での評価手法は確立しつつあり、今後、実用化を目指した様々な組換え植物の安全性評価試験がますます増加するであろう。組換え植物が科学的にも社会的にも受け入れられるには、食品としての安全性評価試験など乗り越えなければならない問題も多く残っているが、克服される日もそう遠く

はないと思われる。

文 献

- 1) 早川孝彦ら(1992):植物細胞工学 4: 92-100
- 2) Hayakawa, T. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9865-9869
- 3) 科学技術庁(1991)「組換え DNA 実験指針」
- 4) 農林水産省(1992)「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」
- 5) Shepard, J.F. et al. (1980) *Science* 208: 17-24
- 6) Evans, D.A. (1989) *Trends in Genetics* 5: 46-50
- 7) 生井兵治・加藤浩(1987):日本花粉学会会誌 33: 7-14
- 8) Koga, Y. et al. (1971) *Cytologia* 36: 104-110
- 9) 新潟県経済連米穀部米麦課編(1985)「主要農作物採種事業のしくみ」, 新潟県種子産米改良協会
- 10) 長谷部亮(1992):研究ジャーナル 15(8): 39-43
- 11) 組換えトマト安全性評価研究グループ(1992)「遺伝子組換えによってTMV抵抗性を付与したトマトの生態系に対する安全性評価」, 農環研報 第8号

国内情報

バイオテクノロジーを植物改良にどう活かす

農林水産省 農業生物資源研究所
藤巻 宏

はじめに

植物改良の研究の歴史をふりかえってみると、新しい技術が開発されるたびに、育種家は大きな夢をふくらませた。コルヒチンによ

る染色体数の制御、放射線や化学物質による人為突然変異の誘発、薬培養による育種年限の短縮、組織・細胞培養による優良遺伝子型のクローニング、そして最近では組換えDNAによる生物種の壁を越えた遺伝子の移行など。しかし、これらの技術も今までのところ植物育種のやり方を基本的に変えるにはいたらず、主要農作物の品種改良では相変わらず

FUJIMAKI Hiroshi

慣行育種技術が主流を占めている。それでは、バイオテクノロジーを植物育種にうまく活かすにはどうすればよいのであろうか。バイオテクノロジーを植物育種に活かすには、それによって何ができ、あるいはできないのかを見きわめ、その技術を育種操作の中に的確に位置付けることがとくに大切である。

農林水産業は生物とくにその集団の働きによって生産をあげる産業である。したがって、細胞融合や組換え DNA などによって新しい特性をもつ植物体を育成しても、直ちにそれが新品種や新作物とはならず、その特性を集団の中で遺伝的に安定させ計画どおりに発現させなければならない。

バイオテクノロジーは万能ではなく、できることとできないことがある。それらをよく見きわめて慣行の育種技術との連携をうまくとることが成功の鍵となろう。

バイオテクノロジーでできることとできないこと

従来の植物育種技術ではできないがバイオテクノロジーではできることはたくさんある。最たるものが交配不能な遠縁な生物種間での遺伝子の交換である。プロトプラストを用いた細胞融合では双子葉植物と単子葉植物の雑種細胞ができたり、組換え DNA によって動物や微生物の遺伝子を植物に導入することができる。バイオテクノロジーを用いれば、種の壁を越えた遺伝子の移行がある程度自由に行える。しかし、異なる生物種の遺伝子を導入して植物個体を作っても、それだけでは産業的な利用価値はない。導入した新しい遺伝子の本来の機能を植物体内で発揮させるとともに、植物集団の中で遺伝的に安定させて所期の形質を発現させなければならない。

一方、バイオテクノロジーだけではできないことも多い。たとえば、生物学的に有意義または人類にとって有用な遺伝子を新たに人為的に合成したり、有用な機能を高める方向に既存の遺伝子を改変したりすることは今のところできない。悠久の歳月をかけて自然が

進化させた野性生物の適応遺伝子や何万年もの年月をかけて選抜してきた農林生物の有用遺伝子はかけがえのない進化や改良の所産であり、一度失われると人為的に再現することは不可能である。

バイオテクノロジーだけで植物育種ができるものではなく、それは育種体系の中に部分技術として位置づけられるべきものである。細胞レベルで遺伝子进行操作し、植物体を再生させてトランスジェニック植物を作り出すところまではバイオテクノロジーでできる。しかし、その植物を増殖し集団化し、組換えた遺伝子の機能を植物体で発現させるとともに、集団の特性として発揮させるまでには、これまでに蓄積した多くの遺伝・育種学のノウハウが必要になる。こうした意味から新しい技術としてのバイオテクノロジーと従来からの育種技術の緊密な連携がなければ、農業技術の革新や新たな生物産業の展開はおぼつかない。

育種技術としての位置付け

植物育種操作の流れは次のように整理することができる。遺伝資源の確保に始まり、育種目標の設定と母本の選定、遺伝変異の誘発、有用変異の選抜、形質の遺伝的固定、特性と適応性の検定、種苗の増殖へと進む。バイオテクノロジーの発展によって開発された主要な技術を植物育種の流れの中に位置付けてみると、図1のようになる。これらの主要な技術を(1)DNA分析、(2)組織細胞培養、(3)組換えDNAに大別して、植物育種の流れの中に位置づけてみよう。

(1) DNA分析

この範疇には、RFLP分析、DNA指紋分析、トランスポゾン分析ならびにゲノム解析などが含まれる。ゲノム解析の中には、ゲノムDNAやcDNAの多型を利用する連鎖地図作成、cDNAカタログ化、物理地図の作成、全DNA塩基配列の解明などが含まれる。

RFLP、DNA指紋、トランスポゾンなどの分析では、まず、核ゲノムやミトコンドリア

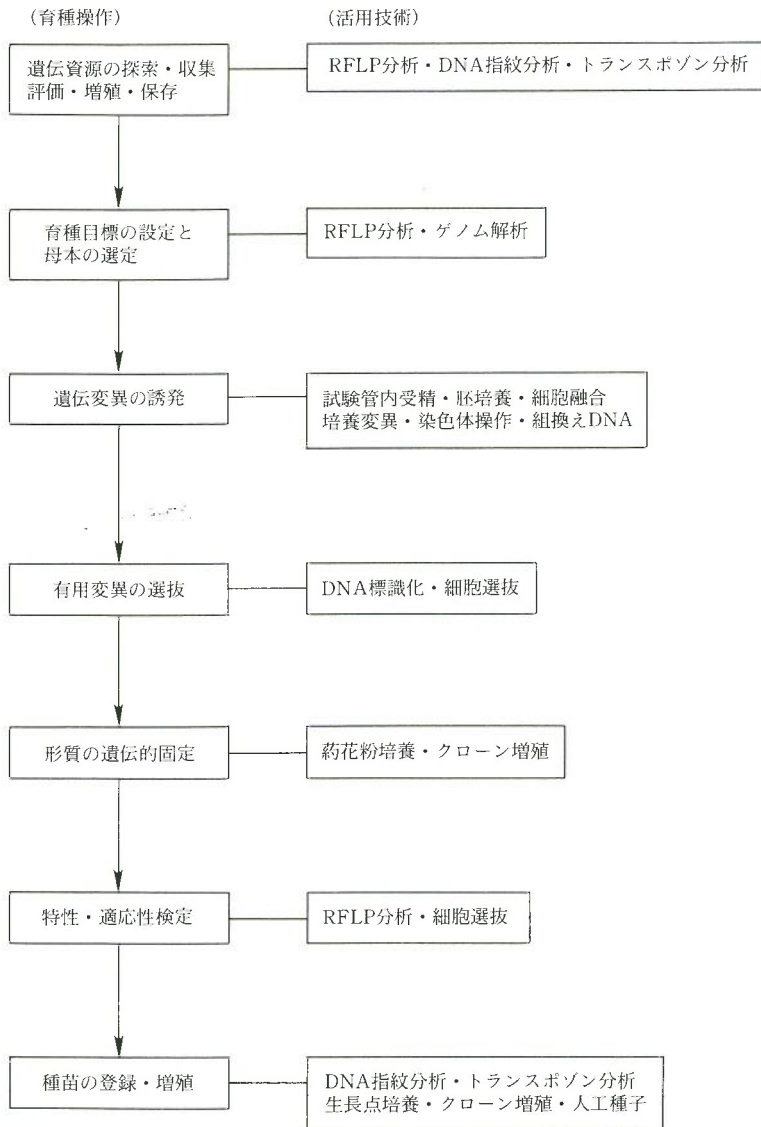


図1 植物育種の流れとバイオテクノロジーの活用

などの DNA を各種の制限酵素で切りだし、DNA 断片を電気泳動によって分別し、標識されたプローブで類似の塩基配列を検出する。このようにしてバーコード状に検出される DNA 断片の位置関係から植物個体、系統、品種、植物種などの間の遺伝的差異を検出できる。この差異は、DNA 塩基配列の違いに基づくもので、環境の影響を受けることは少なく、遺伝的に安定し再現性のきわめて高いものである。したがって、これらの手法を用いて遺伝資源の同定・評価、交配母本の選定、品種や種苗の同定などに応用することができる。

一方、ゲノム解析では、ゲノム DNA や

cDNA の多型を使って高精度の連鎖地図が作成され DNA の標識化が進められる。これによって、農業的に重要な量的形質を支配しているポリジーンの遺伝的解析ができたり、標識形質との連鎖関係を利用して有用な遺伝変異を効率よく選抜したり、特性検定を効率的に進めたりできるようになる。一方、精密な連鎖地図を活用して物理地図を作成し全 DNA の塩基配列を明らかにすることによって、組換え DNA の精度を高めることができる。また、組換えた遺伝子の発現をうまく制御して、形質発現を調節できるようになれば、予め設定された育種目標を達成するために綿密な育種計画をたてることができるようになる。

(2) 組織細胞培養

胚培養、試験管内受精、細胞融合などの方法によって、従来の人工交配ではできなかった遠縁な生物種の間で遺伝子の交換ができるようになり、遺伝変異の大幅な拡大が可能になる。また、培養それ自身によっても遺伝変異を拡大できるし、培養技術を基礎とした再分化系を用いて行なわれる染色体操作や組換え DNA などによって、遺伝変異を人為的に制御し、有用変異を効率よく誘発し選抜することができるようになる。

試験管やシャーレの中で培養されている細胞の特性と植物体の形質を関連づけて細胞選抜が可能となれば、有用変異の選抜をきわめて集約的かつ効率的に行なうとともに、特性検定の精度を高めることもできるようになる。

葯培養や花粉培養の技術が進むと、選抜される優良植物体の形質の遺伝的固定が促進され、育種年限の短縮ができる。しかし、この場合、形質の遺伝的固定に要する時間は節約できるが、植物育種の流れの中での他の操作に要する時間は短縮できないので、育種操作全体の短縮に及ぼす効果や従来からの世代短縮技術との効率などを慎重に比較検討する必要がある。

細胞培養や組織培養によるクローン増殖が遺伝的に安定してできるようになれば、植物育種の体系が基本的に変わってくる。つまり、すぐれた遺伝子型を安定的に無性増殖して、

繁殖様式に依存しない新たな育種体系を構築することができる。

(3) 組換え DNA

組換え DNA 技術はバイオテクノロジーの中で植物育種家が最も大きな期待をかけている分野であろう。生物種の壁を越えて動物や微生物の遺伝子を植物に導入し発現させることは、自然界にこれまで存在しなかった新しい生物種を創出することになる。

このようにして人為的に作り出される新生物種を農場などの解放的環境で栽培するまでには、その生物種が自然の生態系に対してどんな影響を及ぼすかを調べることをおろそかにしてはならない。自然交配による近縁植物種への遺伝的影響、雑草化の可能性、他の作物への生態的影響などを慎重に調べる必要がある。わが国では、科学技術庁による閉鎖系および非閉鎖系での影響評価ならびに農林水産省による模擬的環境と解放系での生態系への影響評価について指針が策定されている。

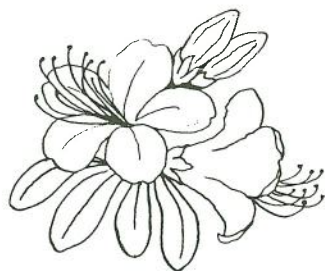
現在、プラスミドやウィルス感染などによる生物学的方法ならびにエレクトロポレーションやパーティクルガンなどによる物理学的方法で培養細胞や組織などに対して組換え DNA が行なわれている。しかし、今の段階では、特定数の遺伝子を予め決めた染色体上の位置に導入することはできず、組換え DNA によって作られるトランスジェニック植物の遺伝子分析によって、導入された遺伝子数や

染色体上の位置を推定している。また、決まった生育時期あるいは特定の組織や器官だけで特異的に導入遺伝子を働かせる発現調節も十分にはできない。また、いろいろな作物で細胞培養と再分化の技術が確立され遺伝子操作が可能になったが、単離され利用できる有用遺伝子の種類や数が少なく、組換え DNA 技術を活用した画期的な植物改良がなかなか進んでいないのが現状である。

このようなことから、これからのバイオテクノロジー研究では、形質—タンパク質—mRNA—ゲノムDNA とセントラルドグマをさかのぼる常套手段のほかに、ゲノムの構造解析や全塩基配列の解明などによる形質発現の物質的基礎の解明とともに、生体機能や遺伝子発現機構の解明などにより、有用遺伝子の単離や遺伝子の発現調節などが大きな研究ターゲットとなる。

おわりに

バイオテクノロジーは何でもできる魔法の杖ではない。従来の技術だけではできないがバイオテクノロジー導入によって何ができるようになるのかを冷静に見きわめた上で、慣行の植物育種技術との密接な連携を前提として、新たな植物育種体系を組み立てることがとくに重要な時期にきている。



国内情報

イネのバイオテクノロジー関係の既掲載情報についてのご案内

イネのバイオテクノロジーにつきましては、既に下記について本誌に掲載しております。今回の特集と併せてご利用下さい。

培養変異

イネ新品種「初夢」の育成経過とその特性 (1989)

14: 1-3 伊藤隆二 (植物工学研究所)

大量増殖

イネ F₁ の大量増殖培養法 (1989)

13: 1-2 吉田泰二 (農水省 農業研究センター)

通気攪拌型培養槽によるイネカルスからの植物体再生 (1992)

31: 15-16 中園敦之 他 (ナーサリー・テクノロジー)

遺伝子

イネ遺伝子組換えの新技术 アグロバクテリウムによる形質転換 (1989)

14: 10-12 加藤明 (農水省 農業生物資源研究所)

イネのトランスポゾンの分離 (1990)

19: 7-10 廣近洋彦 (農水省 農業生物資源研究所)

縞葉枯ウイルス外タンパク質遺伝子を導入したイネの作出 (1991)

24: 11-13 大槻義昭 (農水省 農業研究センター)

アレルギーとイネ種子タンパク質 (1992)

34: 1-4 松田幹 (名古屋大学農学部) (三井東圧化学共同研究)

遺伝子組換えによる低タンパク酒米品種の開発 (1992)

35: 12-14 角谷直人 (加工米育種研究所)

文献情報

植物に外来遺伝子を導入する
一本鎖 RNA ウィルスベクター

アグロバクテリウムの感染が困難な単子葉植物や、再生系が確立していない植物では、植物ウィルスをベクターとして用いることにより、外来遺伝子を導入・発現させる試みがすでにいくつか報告されている。植物ウィルスゲノムは多くの場合一本鎖(+) RNA であるから、ゲノム RNA から逆転写反応で合成した二本鎖 cDNA のいずれかの部位を目的の外来 DNA に置換するか、cDNA 中に挿入するか、どちらかの手段がとられる。

Chapman らは、ジャガイモ X ウィルス (PVX) をベクターとして選んでいる。完全長 cDNA の 5' 末端に T7 プロモーター配列を付加し、*in vitro* で転写させた RNA を植物に接種することにより、ウィルスの感染と同時に外来遺伝子の導入を図った。外来 DNA として GUS 遺伝子を外被タンパク質 (CP) 遺伝子のほぼ全域と置換した場合 (ΔG) では、転写した RNA 中から GUS コード領域が subgenomic RNA として合成され、発現すると期待された。しかし、接種した *Nicotiana clevelandii* 及び *N. tabacum* cv. Samsun NN いずれでもその複製量及び subgenomic RNA 合成量共にごくわずかで、また、接種葉にわずかな GUS 活性が認められただけであった。続いて、CP 遺伝子の subgenomic プロモーター配列を重複させ、1 番目のプロモーター下流に GUS 遺伝子を挿入し、GUS 及び CP がそれぞれ別の subgenomic RNA から翻訳されるように設計した場合 (GC3) では、ウィルス RNA の複製量は intact な場合に匹敵する程度となり、また CP の subgenomic RNA も大量に蓄積した。これに対し、GUS をコードする subgenomic RNA の蓄積量はかなり低いレベルであったが、X-Gluc. を基質とするアッセイでは、接種葉のウィルス感

染部位及び上位葉の蔓延部位で青色の呈色反応が認められ、ΔG と比較してもその GUS 活性は増高していると考えられた。しかしながら、GUS 遺伝子と CP 遺伝子が共通の subgenomic プロモーター配列を有するために、植物体内で homologous recombination を生じ、GUS 遺伝子が脱落する 경우가多く認められた。

一方、Dolja らは potyvirus グループのタバコエッチウィルス (TEV) をベクターとして利用している。potyvirus は 10kb 近い RNA から 1 つの長大なポリプロテインを翻訳し、そのポリプロテイン中のプロテアーゼが 7~8 個の機能を持ったタンパク質に切断を行うが、彼らはアブラムシ伝搬性に必須でプロテアーゼ活性をも有するタンパク質 (HC-Pro) の N 末端付近に GUS 遺伝子を導入し、GUS-HC-Pro の融合タンパク質が合成されるようにした。この構成で SP6 RNA ポリメラーゼにより転写された RNA を接種したタバコの 25% がウィルスに感染し、それらの植物では、HC-Pro 及び GUS それぞれのタンパク質の抗体に反応する 119kDa のタンパク質 (融合タンパク質の分子量に相当する) が検出された。ついで GUS 遺伝子の安定性について検討した。TEV-GUS の構成で接種したタバコから 4~6 日ごとにウィルスを継代接種したところ、試験した 2 系統のウィルスのうち 1 系統では 4 回目の継代で HC-Pro 抗体に反応する融合タンパク質が検出されなくなり、代わって本来の HC-Pro の大きさである 52kDa より小さな約 45kDa のタンパク質が検出されるようになった。また残りの 1 系統も 7 回の継代で安定して GUS 遺伝子が保持され続けたが、5 回目あるいは 6 回目の継代を行った植物の接種上位葉では、接種後日数が経過するにつれて 45kDa タンパク質が検出されるようになり、かつ GUS 活性も低下した。以上のように、今回紹介した 2 つの報告では導入した遺伝子の安定性の点で課題が残る結果となった。

Dolja らは、GUS 酵素活性を指標として、同時にウィルスの植物体内での複製・移行に

関しても言及している。接種後12時間で、接種葉上での最初の感染細胞が顕微鏡下で観察されはじめ、24時間後には周辺の細胞への拡大にともない、肉眼でも観察される程度の大きさとなった。感染部位の拡大はその後も続き、96時間までに接種葉全体が青色に染まるようになり、その結果ウイルスの移行は、1細胞/2時間の速度で進行すると推定された。このように、GUS活性をウイルスの動態をモニターすることに利用した例はこれまでになく、今後の展開が期待される。

(抄訳 柄澤 明—東北大)

KARASAWA Akira

Potato virus X as a vector for gene expression in plants

Chapman. S., T. Kavanagh and D. Baulcombe

Plant J. 2 : 549-557 (1992)

Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of β -glucuronidase into the viral polyprotein

Dolja, V.V., H.J. McBride and J. C. Carrington.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89 : 10208-10212 (1992)

文献情報

エイズウイルスの逆転写反応における RNase H 活性の重要性

レトロウイルスの持つ逆転写酵素(RT)は、ウイルス粒子から感染細胞中に放出された一本鎖RNAから二本鎖DNAを合成する酵素である。よく知られているように、RNAまたはDNAを鋳型としてDNAを合成する活性の他に、RNA/DNAハイブリッド中のRNAを分解するRNase H活性をRTは有している。レトロウイルスの1つであるhuman

immunodeficiency virus 1 (HIV-1)のRTは、p66とp51と呼ばれる2つのサブユニットからなるヘテロダイマーであるが、前者はポリメラーゼ活性とRNase H活性を両方共に有しているのに対し、後者はp66からRNase H活性を除いたものである。X線結晶解析の結果から、ヘテロダイマー中のポリメラーゼ及びRNase Hそれぞれの活性中心は約18~19塩基対分離していることが示されていたが、実際にRNAの鋳型にDNAプライマーを付加し、RTを働かせた実験では、15~16塩基対分の距離であるとされ、異なっていた。

Gopalakrishnanらは、40merのRNAオリゴマーとDNAプライマーとして15merのオリゴヌクレオチドを用い、HIV-1 RTのRNase H活性による分解産物について検討した。その際、ヘパリンを反応液に加え、一度反応を行った後遊離したRTを捕捉することにより、RNA鋳型の一定以上の分解を阻害するようにした。プライマーの3'-OH末端から4ないし5塩基伸長するのに必要なdNTPとその部位で停止するためのddNTP存在下で分解産物を調べたところ、反応開始後15秒でDNA鎖は19~20merに伸長し、その伸長にともない39merのRNA分解産物が生じた。ヘパリン存在下では、分解産物は39merのRNAのみであったが、ヘパリンを加えない状態では39mer以下の産物が時間の経過につれて生じた。このことは、DNAの3'末端より18~19塩基対分RNA上で3'側の部位でRNase H活性による分解が生じることを示しており、X線解析の結果と一致した。またその他の実験で、特異的に生じる分解の最終産物は14merのRNAであり、過去の実験データは最終産物にいたる過程を見落としたものではないかと推測した。

一方、Peliska & BenkovicはHIV-1 RTによる二本鎖DNA複製モデルについて検討している。HIV-1粒子中のRNAは細胞中に放出された後、自身の持つRTによりまず(一)鎖DNAが合成される。その際、鋳型RNAに損傷などのある場合には、合成途中で鋳型の乗り換えが生じ、組換え体DNAが

合成される forced copy-choice メカニズムが想定されているが、彼らは *in vitro* でこの反応が生じるためには、RT 中の RNase H 活性が必須であることを示した。すなわち、15mer の DNA プライマーの 3' -OH 末端に dNTP を次々と取り込んで DNA 鎖が伸長していくと、RNA の分解が生じ始め、14mer の RNA 最終分解産物が生じる。RT の非特異的 RNase H 活性により、さらに RNA の分解が進行し 10mer 以下になると、反応温度 (37°C) 下では DNA から解離しやすくなる。そこに acceptor となる RNA が存在すれば、鋳型のスイッチが生じて引続き RT 活性による DNA 合成が進行する、ということが明らかにされた。またこの過程で生じる DNA/RNA ハイブリッドの DNA 3' 末端には、高頻度で 1 塩基の付加が起こり、鋳型のスイッチやこのような塩基の挿入が、HIV-1 の高率の変異に関係があるのではないかと考察している。

いずれにしても、これら逆転写反応の詳細を理解することが非常に重要であることは言うまでもない。現在臨床応用されている AZT (3'-azido-deoxythymidine) や ddI (dideoxyinosine) がいずれも逆転写反応阻害剤であることから明らかである。今後さらに詳細が解明され、その反応を阻害する薬物のデザインに有効な情報をもたらすことを期待してやまない。

(抄訳 柄澤 明—東北大)

KARASAWA Akira

Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: spatial and temporal relationship between the polymerase and RNase H activities

Gopalakrishnan, V., J.A. Peliska and S.J. Benkovic

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 10763-10767. (1992)

Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase

Peliska, J. A. and S. J. Benkovic

Science 258: 1112-1118 (1992)

文献情報

アラビドプシスのエチレン反応系の調節因子である CTR1 遺伝子は、ガン遺伝子の一つである RAF 遺伝子の仲間であった

ここ数年来、エチレンの生合成系の酵素の遺伝子がいくつも単離され、生合成に関しては、いろいろなことが解ってきている。アンチセンスの技術を使えば、エチレンを与えないと決して熟さないトマトを作ることさえ可能である。その一方で、植物細胞が、いかにエチレンを認識し、その情報を核に伝え、そして、多くの遺伝子を発現させ、さらに複雑な生理的な変化を起こしていくかについては、ほとんど解っていない。そこで、筆者らは、エチレンがない状態でもエチレンのシグナルがきたかのように反応してしまうアラビドプシスの突然変異体を単離することで、この問題にアプローチしようと考えた。光のない状態で育てたアラビドプシス幼植物体を、エチレン処理してやると三つの生理的な反応 (1. 幼軸が短くなり、太くなる, 2. 根がのびにくくなる, 3. 幼軸と双葉がつくる角度が異常になる) を起こす。この反応を指標にして、各種変異源で処理した 1000 万本を超える幼植物体を調べたところ、400 の突然変異体を得、そのうち、18 個体から種子をとることができ、さらに解析を続けた。

エチレン生合成のインヒビターを用いた実験より、得られた突然変異体は二つのグループに分けられた。一つは、インヒビターにより表現型に変化があり、エチレンを野性型より多く作っているグループで、Eto (ethylene over producer) 変異体と名付けられた。このタイプの突然変異体は、エチレンの生合成系に関係がある遺伝子に変異がおこったと考えられる。もう一方のグループは、四つの変異体が同定され、交配実験の結果、全てが一つ

の遺伝子座と考えられ、*ctr1* 遺伝子と名付けられた。

この *ctr1* 変異体は、インヒビターを与えても表現型が変わらないので、植物細胞がエチレンを認識し、その情報を核に伝える過程にかかわっている遺伝子に変異がおこったと考えられる。この変異体は、小さなロゼッタしかつくれず、根の伸び方も悪く、稔性も高くない。この特徴は、野性型の植物を常にエチレンのある環境で育てたときに観察される特徴と似ているので、この変異体では、その生育過程において、常にエチレンのシグナルがきているかのように情報伝達系が働いていると考えられる。すでに報告されているエチレンに不感受性の突然変異体 *Ein1*, *Ein3* と *ctr1* をかけあわせることで、これら三つの遺伝子の遺伝学上の順序を決めたところ、*Ein1* が *ctr1* を、*ctr1* が *Ein3* を、それぞれ制御していることがわかった。Ken Feldmann の T-DNA 挿入系統を 13,000 ライン調べたところ、1 系統の *ctr1* 遺伝子のアリアル (*ctr1-5*) を同定、T-DNA タグging により *ctr1* 遺伝子を単離した。すべてのアリアルが、この遺伝子の中に変異を持っていることも確認された。

この遺伝子がコードしているタンパク質のアミノ酸配列をデータベースで検索したところ、アミノ酸配列の C 末にタンパク質リン酸化酵素と相同性を見いだした。とくに、セリン/スレオニンをリン酸化するタイプの一つである Raf タンパク質と強い相同性があった。N 末領域においても、わずかながら Raf タンパク質との相同性があることから、*ctr1* 遺伝子は、Raf 遺伝子の仲間であると考えられる。アリアル内に見つかったすべての突然変異は、*ctr1* 産物がリン酸化できなくなる変異と考えられるので、この *ctr1* 産物によるリン酸化が無くなると、エチレンの情報伝達系が ON になると考えられる。

Raf 産物は、ヒトの細胞系において、成長因子などの細胞外刺激による細胞増殖の情報伝達系で重要な働きをしていて、細胞のガン化に関係があることが解っている（最近、Raf 産物は、情報伝達のタンパク質のリン酸

化カスケードのなかで、上位の MAPkinase kinase kinase であることが同定された）。未発表ながら、上記の *Ein3* 遺伝子もすでに単離されており、さらに研究をかさねることで、動物と植物の細胞外刺激に関する情報伝達系の相関がより明らかになっていくことであろう。

(抄訳 井沢 毅—植工研)

IZAWA Taheshi

CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases

Kieber, J.J., M. Rothenberg, G. Roman, K. A. Feldmann and J.R. Ecker

Cell, 72 : 427-441 (1993)

文献情報

生きた胚嚢をビデオで見る

雌性配偶子の単離は、試験管内での半数体細胞の操作や胚形成における細胞系譜を調べるための実験系の開発に有効である。これらの目的のためには、細胞のバイアピリティーを十分に保つ単離方法を追求することが重要である。単離された材料の初期の活性を調べる方法としては、fluorochromatic reaction (FCR) のような酵素活性を調べる方法や、ルシフェラーゼ等を用いて代謝活性を調べる方法が有効であるが、オルガネラの細胞内での動きのような生理的パラメーターは、細胞活性のより敏感な指標になると考えられる。生きている胚嚢とそれを構成する細胞の単離は、配偶体の成熟と受精のときに起こる発達過程の現象の詳細な観察を可能にする。オルガネラと配偶子の動きは、花粉管において集中的に調べられているが、雌性配偶子に関する記述は乏しい。過去の研究としては、*Nicotiana* の固定した胚嚢の単離と観察などがあり、胚

囊の体制形成に関するいくつかの情報が報告されている。

本報告では、2種の *Nicotiana* 植物を用い雌性配偶体から生きている状態で細胞を単離するための手法を開発し、これらの細胞におけるオルガネラの移動に関して、video-enhanced microscopy (VEM) により視覚化し観察した結果を記述している。この単離方法によれば、生育可能な胚嚢細胞と組織を得ることができ、得られた単離産物は胚嚢の細胞骨格の構造、細胞質の配置状況、受精現象等を調べるために用いることができる。

著者らは、まず胚嚢の単離方法を開発した。材料には、*N. alata* と *N. tabacum* を用い、子房を酵素液で処理後、胚珠を解剖し、残っている珠皮と付着した珠心細胞を取り除き、胚嚢及びそれを構成する細胞を得た。得られた胚嚢は2つの助細胞、卵細胞、中央細胞及び3つの反足細胞を含んでいること、単離胚嚢は35%、卵装置細胞は40%、中央細胞は35%が、FCRで正の反応を示すことが明らかになった。この方法の特徴は、用いる酵素がセルラーゼとペクチナーゼの2種類だけであり、処理時間が30分と短いことである。特に酵素処理時間が短いことが単離細胞の生存率を高くすることに寄与しているものと推察されている。

次に著者らは、得られた単離細胞を微分干渉顕微鏡を用い観察し、その結果をビデオに記録しオルガネラの移動を解析した。このシステムにより、助細胞は液胞と密な細胞質を含むことを観察し、助細胞の中の顆粒の動きを3つのタイプ、振動する動き、方向性を持

った移動、ブラウン運動による移動に分けた。卵細胞のなかでは、そのような移動は明白ではないが、少数のオルガネラは、方向性を持って活発に移動することを示した。この観察結果から、卵細胞は生きているが生理的静止状態にあるということが推察された。中央細胞の液胞は、80%以上の体積を占めていた。細胞質の多くは周辺部に存在したが、細胞質の動的要素は中央の液胞を越えて進んだ。これらの移動は方向性を持ったものであり、移動の速度がオルガネラの大きさと密接な関係を持っていた。すなわち大きいオルガネラ（平均11.3 μm ）は小さいオルガネラ（平均1.71 μm ）に比べ移動速度が遅かった。

本報告により、比較的単純な操作によって生きた状態での雌性配偶子細胞の単離が可能なが示された。この手法は、技術的困難さにより雄性配偶子に比べ多少研究が遅れていた雌性配偶子の発達及び受精に関する研究のブレークスルーになるものと考えられる。また、単離された細胞内でもオルガネラの移動が起こることが確認された。著者らは、オルガネラの移動の観察が、細胞活性を直接調べるための有効な手段となる可能性を指摘している。

(抄訳 加藤紀夫—JT植物開発研)

KATOH Norio

Video microscopic observations of living, isolated embryo sacs of *Nicotiana* and their component cells

Huang, B.-Q., E.S. Pierson, S.D. Russell, A. Tiezzi and M. Cresti

Sexual Plant Reproduction 5:156-162 (1992)

特別情報

農林水産ジーンバンクとイネ遺伝資源の保存

農林水産省農業生物資源研究所
國廣泰史

1. はじめに

生物が誕生してから今日までに、地球上にはさまざまな生物が進化しており、私達はこれらの生物を衣・食・住の全般にわたって広く利用してきました。特に最近では、バイオテクノロジー等先端技術の開発が進み、生物遺伝資源に対する需要が急激に増えています。科学技術の進歩は優良な品種の育成を可能とし、これら近代品種の普及は少数品種への集中化を招き、生物の遺伝的多様性が失われつつあります。また、熱帯林の減少、砂漠化等による環境悪化により貴重な生物遺伝資源は減少、滅失の危険にさらされています。こうしたことから、生物遺伝資源を早急に集め、確保するとともに、その利用をすすめることが重要になっています。

2. 農林水産ジーンバンクの概要

農林水産省では、遺伝資源に対する社会的要請の高まりに応えるため、1985年から農林水産ジーンバンク事業を開始しました。農林水産ジーンバンク事業では、植物、微生物、動物、材木及び水産生物などの遺伝資源を国内外から収集し、分類・同定、特性評価、増殖及び保存するとともに、遺伝資源及び遺伝資源に関する情報を国公立機関、大学、民間などへ研究用として提供するほか、国際的な交流も図っています。1988年、農業生物資源研究所（茨城県つくば市）内に農林水産生物

遺伝資源管理施設が完成しました。この施設は植物、微生物、動物関係の遺伝資源を収集、保存、配布するという農林水産ジーンバンク事業の中核的施設であるとともに、バイオテクノロジーなどの研究を行う場としても利用されています。表紙の写真は、本施設に設置されている配布用種子の貯蔵庫で、庫内は常時 -1°C 、湿度30%に保たれ数十年間種子の寿命を保つことができます。現在、イネ、ムギ、マメ等の種子約7万種類が保存されています。

3. 農林水産省におけるイネ遺伝資源の保存

日本でイネの組織的な収集・保存が始まったのは、ちょうど100年前農商務省農事試験場が東京・北区西ヶ原に設立された1893年で、当時は低温貯蔵庫がなく毎年圃場で栽培することにより保存していました。保存庫によって組織的に貯蔵されるようになったのは戦後の1953年以降です。農業技術研究所遺伝科が中心になり、冷蔵庫保存を手始めに保存方法の工夫や改善がはかられました。また、収集にも力を入れ、1962年から1966年にかけて九州大学農学部と協力して本州、四国、九州各地域の在来品種1300品種を集め、保存しました。その後も東北地方におけるイネ品種の収集を行いました。1966年農業技術研究所遺伝科（神奈川県平塚市）に2万点収容可能な長期種子貯蔵庫が設立されました。1967年には同所に隔離栽培用温室が設けられ、海外からの導入が可能となり、海外に出かけての探索収集が本格化しました。こうして、イネ遺伝

KUNIHIRO Yasufumi

資源の収集活動が軌道に乗るようになりました。1978年にはつくばに5万点の品種種子が長期貯蔵できる遺伝資源種子貯蔵庫が設置されました。貯蔵種子量の増加に伴って容量・機能の両面から改善強化が必要になり、1988年、現在の農林水産生物遺伝資源管理施設が完成しました。この中の配布用種子貯蔵庫には、約1万5千種類のイネ品種・系統が貯蔵されており、水稻、陸稲等の栽培種は勿論、現在は栽培されなくなってしまった古い品種や野生種も含まれています。

イネ種子は一般に水分含量6～8%で低温下で貯蔵すれば、数十年は発芽力を維持できるとされています。農林水産ジーンバンクでの貯蔵は、二通りの保存方法を用いています。一つは配布用貯蔵庫で、温度-1℃、相対湿度30%で合成樹脂製容器を使用し、20～30年の貯蔵を目標にしています。永年用貯蔵庫は種子寿命を100年以上保たせようとするもので、庫内温度は-10℃、相対湿度30%に調節され、さらにブリキ缶で真空缶詰にして貯蔵しています。アメリカ農務省(USDA)では、すでに種子の貯蔵はその大部分を液体窒素による貯蔵に切り換えていると報告されています。また、イネ種子の液体窒素貯蔵は長期安定保存が確認されていますので、農林水産ジーンバンクにおいても、半永久保存を目標に液体窒素(-196℃)での貯蔵を計画しています。

4. その他機関におけるイネ遺伝資源の保存

日本国内でイネ遺伝資源の保有数が多く特徴ある材料を保持している機関は、国立遺伝学研究所遺伝実験生物保存研究センター(栽

培型近縁野生種ならびに遠縁野生種など1万点)、九州大学農学部育種学教室(突然変異系統)、北海道大学農学部作物育種学教室(遺伝子分析及び連鎖群研究材料)、琉球大学農学部育種学教室(細胞質雄性不稔系統ならびにその回復系統)などであり、これらの他各都道府県農業試験場等にもそれぞれの地域で栽培されてきた品種・系統が保存されています。外国では、フィリピンにある国際稲研究所(IRRI)の国際稲遺伝資源センターが世界のイネ遺伝資源のセンター的役割を果たしており、8万点(1991年)のイネ遺伝資源を保存する一方、各国保存機関、すなわち日本の農業生物資源研究所(NIAR)、アメリカ農務省(USDA)、国際熱帯農業研究所(IITA)、西アフリカ稲開発協会(WARDA)とはイネ遺伝資源の重複貯蔵を行うなど、イネ遺伝資源の安定保存に重要な役割を演じています。

5. おわりに

地球上の貴重な生物遺伝資源は人類の共有財産です。集められ、保存されている生物遺伝資源は国の内外で広く活用されてこそ価値が高まります。農林水産生物遺伝資源管理施設では、国、県、大学、民間を問わず申請に応じて植物、微生物等の遺伝資源を広く研究用に配布しています。また、外国へも配布しています。受け入れならびに配布は随時行っておりますので、いつでもお申し出ください。

連絡先：〒305 茨城県つくば市観音台2-1-2
農業生物資源研究所
TEL 0298-38-7050

本文の一部は「植物遺伝資源集成(松尾孝嶺監修)講談社発行」を引用しました。

「農業試験研究一世紀記念」

BRAIN テクノフォーラム

話題の食品加工技術

—最新の食品加工技術を概括し、将来展望を探る—

主催：生研機構 後援：農林水産省

演題及び講師

1. 食品加工技術の変遷 —量から質への転換—
日本大学 農獣医学部 講師 木村 進
2. 高圧食品加工 —高圧での生体高分子挙動と食品への応用—
立命館大学 理工学部 教授 谷口吉弘
3. 電磁波の新しい利用 —基礎概念と新しい応用展開—
OHT技術士事務所 所長 大森豊明
4. 甦る通電加熱 —基礎理論と応用への可能性—
農林水産省 食品総合研究所（筑波大学 農林工学系 教授） 野口明德
5. 超音波の応用技術 —食品加工への利用—
本多電子株式会社 課長 佐藤正典
6. 総合討論
総合司会 農林水産省 食品総合研究所 所長 梅田圭司

日 時 平成5年7月6日（火）10：00～17：30

場 所 飯田橋レインボービル 大会議室

〒162 東京都新宿区市ヶ谷船河原町11 TEL 03-3260-4791

参加人員 お申し込み先着 150名様限り。

申込み方法 ファックスまたはハガキにて御氏名（連名も可）、勤務先、所属、住所、電話番号を御記入のうえ、平成5年7月2日までにお申込みください。

参加費 一般：15,000円（但し、2名以上の場合は1人当たり10,000円）

（消費税、資料代を含む）学生：8,000円（当日、受付にて学生証をご提示下さい。）

参加費は参加券と一緒に請求書を送付させていただきますので、請求書記載の口座にお払い込みください。

申込み先 〒160 東京都新宿区新宿6-24-16 日本生命新宿6丁目ビル3F

生物系特定産業技術研究推進機構（略称：生研機構）

企画第1課（谷口、上田、玉木）TEL 03-3205-6585, FAX 03-3205-6566

編集後記

イネのバイテク研究は基礎から応用まで広範にわたって行われていますが、本号では品種の育成に焦点を合せて課題を逆定しました。そして巻頭には、長年イネの育種に取り組んで来られた榎渕欽也(勲)日本植物調節剤研究協会会長(元農業研究センター所長)のバイテク研究への期待を、締めくくりには藤巻宏農業生物資源研究所長の育種におけるバイテクの

位置づけについてを掲載させていただきました。今、農水省を中心に精力的に行われているイネゲノムの研究など基礎的分野については、今後逐次取り上げていきたいと考えていますので、併せてご利用下さい。

なお、次号(7月15日発行)は、畜産分野のバイテク研究を特集しますのでご期待下さい。
(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第37号)

平成 5 年 5 月 15 日発行

発行者 佐野宏哉

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒160 東京都新宿区新宿6丁目24-16 日本生命新宿6丁目ビル3F
TEL. 03-3205-6565 FAX. 03-3205-6566

編集 (社)農林水産技術情報協会

〒103 東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6F
TEL. 03-3667-8931 FAX. 03-3667-8933