

## 要 約

人類の生存は植物のあらゆる特性に依存している。植物ホルモンは植物の特性を決定しており、遺伝子工学を用いた植物ホルモンの制御は農業技術として大きな可能性を秘めている。研究の現状と問題点を探る。

名古屋大学・名誉教授 今関英雅

## はじめに

植物ホルモンと呼ばれる1群の物質は多細胞体制をもつ高等植物の種子発芽、伸長成長、肥大成長、細胞分裂、分化、組織老化、花芽形成、着果（果実形成）、果実追熟、落葉・落果、休眠など極めて多くの高次生理現象（これらを総称して成長現象とも言う）を調節しているものである。その性格は、「ホルモン」という言葉を用いてはいるが動物のホルモンとは次のような点で異なる。すなわち、1) 特定の産生細胞、特定の標的細胞が無い、2) 産生された細胞から移動して作用する場合もあるが、産生細胞において作用発現することが多い、3) 1つの植物ホルモンは多面的作用性を示し、細胞の種類、発生段階、齢などによって異なった生理効果を誘起する、4) 2つ以上の植物ホルモンが共存するとき濃度比に依存して異なる生理作用を示す（相乗作用）。発見の動機となった生理作用が、各植物ホルモンの主な生理作用と考えられがちであるが、それ以外の生理作用も重要な機能として理解される必要がある。特に、生理作用の多面性と相乗効果は異なった植物ホルモン間の濃度比が特定の生理作用の発現に重要な要因となっていることを示すものであり、1つの植物ホルモンに着目するとその組織内濃度は、植物個体の生活環の過程で時期特異的、部位特異的に変化するばかりでなく、外界から不規則に与えられる各種の生物的、物理的、化学的刺激にも応答して変化している。すなわち、植物ホルモンは外部刺激に応答する成長現象の作動因子ともなっている。植物ホルモンの細胞内濃度は生合成速度と代謝（不活性化、分解）速度のバランスで保たれているが、これまでの生理学的知見と分析の結果から生合成が極めて精緻な調節機構に支配されていると考えられる。

一方、植物ホルモンの多くの生理効果は成長現象を支配する遺伝子の発現を調節することに基づいている。したがって、植物ホルモンの生合成を部位特異的或いは時期特異的に制御することによって、植物の形質発現調節機構を変化させ、有用な形質を発現する植物体を得ることが期待できる。また、環境刺激に対する応答特性を変化させ得ることも期待できる。植物ホルモン作用の生化学的機構、分子的機構に関する知見は乏しいが、巨視的な生理効果に関する知見は比較的豊富であり、生合成を制御することで高次の形質の過剰発現或いは発現抑制を介して植物機能を改変する試みが開始されている。本稿では、この線に沿った限られた研究の中でも、エチレン生合成を制御することで農業に貢献する技術開発が先行しているので、その現状と問題点を中心に紹介し、バイオテクノロジーとしての可能性を考察することにする。

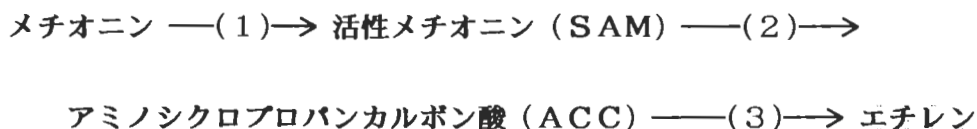
## 1. エチレン生合成の制御

エチレンは組織老化、落葉、落果、果実成熟などの誘起、促進作用のほか、茎の伸長成長を肥大成長へと切り替える作用、ある種の植物では花芽分化を誘起させる作用がある。その生理効果を積極的に利用して、エチレン自体または発生剤（エスレルなど）を用いた果実熟期の調節（例えば未熟バナナの追熟）、パイナップルの同調的花芽形成、フトモヤシの生産（通常のモヤシ生育の過程でエチレンガス処理を行い、茎の伸長を抑制し肥大成長を促して短く太いモヤシとする。繊維性が少なく歯触りがよいので近年好まれている）などが行われている。反対に不都合なエチレン作用を回避するものとして、生合成と作用を抑制する調整ガス貯蔵（CA貯蔵：リンゴ保蔵などに適用）、作用阻害剤による切り花の延命処理などがあり、何れも産業に利用されている。中でも、未熟果実の早期落果、収穫果実の過熟軟化、収穫後の取扱い中で避けられない物理的刺激による傷み（部分的過熟軟化）、野菜類の黄化（緑葉老化）、切り花の退色などによる農産物の損失は大きく、色々な対策がなされている。これらの現象はいずれもエチレンの作用で引き起こされているので、組織のエチレン生成を低下させれば損失の多くを回避することが可能である。エチレン生合成過程は生化学的に確立しており、また関与する酵素に対する遺伝子もクローン化されているのでエチレン生合成を遺伝子導入によって制御（低下）することが行われ、有望な技術になりつつある。

### 1.1. エチレン生合成経路と制御可能な反応段階

高等植物においてエチレンは次の図1の経路で生合成される。

図1：エチレン生合成経路



この経路でACCの細胞内濃度がエチレン生合成の速度を規定している。

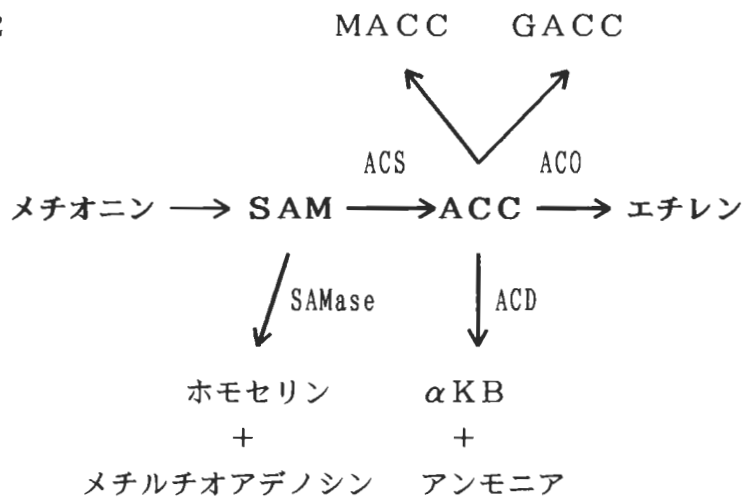
したがって、(2)を担う酵素（ACC合成酵素）の細胞内活性の程度が重要な要因となっている。しかし、(3)を触媒する酵素（ACCオキシダーゼ）も生合成の最終酵素として決定的な役割を担っている。(1)の酵素はすべての生物に共通にあり、その産物SAMは生物共通の重要な中間代謝物である。すなわち、ACC合成酵素とACCオキシダーゼはエチレン生合成にのみ関与する酵素で、高等植物にだけ特異的に見いだされるものである。ACC合成酵素の細胞内量を低下させると、生成されるACC量が減少するので直ちにエチレン生成速度に影響を与えるが、ACCオキシダーゼは通常過剰にあるのでその活性の大部分を低下させないとエチレン生成の減少にはつながらない。

植物組織は2つのACC代謝酵素をもっている。一つはACCのアミノ基にマロン酸残基を結合するACCマロニル転移酵素でN-マロニルACC (MACC)を生成する。2つめは最近発見された $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼでグルタチオンの $\gamma$ -グルタミル残基をACCのカルボキシル基に転移して $\gamma$ -グルタミルACC (GACC)を生成する。

MACCもGACCもエチレンに酸化されないので、これら酵素の働きでエチレン生成速度は低下する。

ACCを唯一の窒素源として生育する土壌細菌の一種Pseudomonas sp.はACCから直接アンモニアを脱離して $\alpha$ -ケト酪酸にするACCデアミナーゼをもっている。この酵素の遺伝子を利用出来ればACC濃度を低下させることが出来る。したがって、現在考えられるエチレン生成を制御し得る反応段階は図2の太線で示した反応である。MACC、GACC合成以外の酵素に対する遺伝子(cDNAを含む)はすべてクローン化されており遺伝子工学の対象となっている。

図2



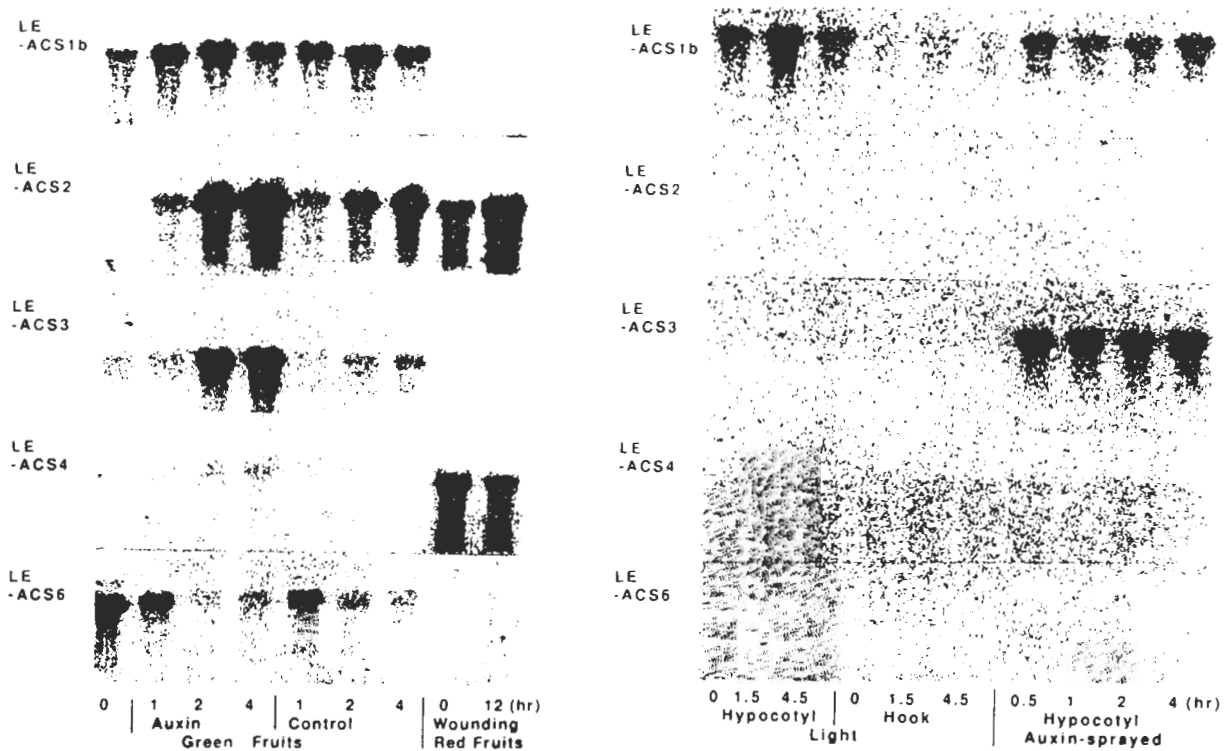
### 1.2. アンチセンス遺伝子による形質転換体

生物にアンチセンス遺伝子を導入すると、生物の対応するセンス遺伝子の発現を抑制されることが明らかにされ、植物にも適用されている。カリフラワーモザイクウイルス35S-RNAのプロモーター)の支配下においたトマトACCオキシダーゼ、ACC合成酵素のアンチセンスcDNAを導入することで、果実のエチレン生成速度が顕著に低下した安定形質転換トマトが作出された。エチレンは栄養成長期にも必要と考えられているが、緑葉老化は遅れるが個体成長に特に大きな変化のない形質転換体が得られている。この形質転換トマトの果実では追熟時に起こるはずの多量のエチレン生成が効果的に抑制され、追熟が進行しない。成熟緑果(成熟果の大きさに達しているが固い緑色の果実)を収穫し空气中に保存すると対照トマトの果実では正常に追熟が進行するが、アンチセンス転換体の果実は黄色になるが追熟が進行せず、赤色素の蓄積、香気物質の生成や軟化が起こらないで黄色に留まる。これらの果実をエチレン気中に置くと正常に追熟が進行する。アンチセンス転換トマトの果実ではエチレン生成が90%以上低下しており、そのため追熟進行が抑制されたと解釈される。しかし、未解決の問題がある。植物母体上においた果実は追熟が非転換体に比べ遅れるが、最終的には赤く追熟するが対照果実とは違って軟化せず、固い状態を保って過熟状態にならない。収穫した果実と植物母体上にある果実との生理的違いの原因は明かでなく、母体から何らかの信号が果実に伝わっていると考えられている。このようなトマト果実は母体上における鮮度保持、収穫果実の保蔵性が向上したものの

で、任意の時期に任意の程度まで追熟を制御することが出来、生食用や加工用果実として有用な特性を示すものである。

ACC合成酵素、ACCオキシダーゼ遺伝子は共に多重遺伝子族を形成しており、トマトのACC合成酵素遺伝子は少なくとも6個 (LE-ACS1-6) の遺伝子の発現が確認されている。ACCオキシダーゼ イソ遺伝子間の塩基配列は相同性が高いが、ACC合成酵素イソ遺伝子間の相同性は低く相互に相同対合しない。さらに、各ACC合成酵素イソ遺伝子の発現の組織、時期、刺激特異性が極めて高い。トマトの成熟緑果ではLE-ACS1、LE-ACS3とLE-ACS6が発現しているが、追熟過程に入ると何れも発現が停止し、代わってLE-ACS2、LE-ACS4が強く発現する。しかし、LE-ACS2は成熟緑果でも傷害を与えると発現するに対し、LE-ACS4は追熟過程でのみ発現し、追熟果実に傷害を与えるとその発現は完全に停止する。LE-ACS3は成熟緑果でも栄養組織でもオーキシンを与えると強く発現する。一方、栄養組織ではLE-ACS1のみが発現しているに過ぎないが、オーキシンを与えるとLE-ACS3が、傷害を与えるとLE-ACS2が発現してくる (図3)。したがって、イソ遺伝子を機能的に傷害誘導型 (LE-ACS2)、追熟誘導型 (LE-ACS4)、オーキシン誘導型 (LE-ACS3) に分けることが出来る。LE-ACS2が果実追熟過程で発現するのは、追熟の進行に伴う細胞壁溶解が傷害刺激となっていると考えられる。既に述べたようにこれらのイソ遺伝子は相同対合をしないのでACC合成酵素遺伝子をアンチセンス技法で利用するときには、発現を制御する器官に発現するイソ遺伝子のcDNA配列を用いることが必要である。

図3：トマトACC合成酵素イソ遺伝子の発現の違い



### 1. 3. センス遺伝子による形質転換体

植物酵素ではないがACCデアミナーゼはACCを分解するので、その過剰発現はエチレン生成を抑制することが期待できる。Kleeらは *Pseudomonas* strain 6G5の遺伝子を35Sプロモーターの下流につないでトマトに導入した。多くの1次形質転換体からACD発現の高い個体を選別し、果実のエチレン生成が80-97%抑制された個体を得た。ホモ個体の種子発芽、成長、形態、開花時期などは対照個体と区別できない程度に正常であったが、果実の追熟は2週間以上も遅れた。着色開始直前の果実を収穫し空気中においた場合、対照トマトは7日後には完熟に達し2週間後には顕著な軟化が起きたが、形質転換トマトが完熟に達するのに24日を要し、その後4カ月もの長期間軟化しなかった。同じことは植物体につけた果実でも見られ、形質転換トマトは40日以上完熟状態を保ち、落果しなかったが、対照トマトは14日後には落果した。独立に、Sheehyらも違って系統の *Pseudomonas* のACD遺伝子をトマトに導入し、同じような結果を得ている。35S-ACDカセットを2組導入してもmRNAレベルには大差は無かったが、翻訳開始コドン周辺の塩基配列を真核生物で保存されている配列に変えるとACD蛋白量が5倍に増加した。ACC合成酵素-、ACCオキシダーゼ-アンチセンス転換体と同様に、トマト果実の熟度調節が可能となっている。ACCデアミナーゼ形質転換トマトは近々のうちに市場に出ると言われている。

原核生物である細菌と真核生物である高等植物とでは使用するコドンが違うので、細菌の遺伝子をそのまま植物に導入しても期待する結果が得られない場合が多い。細菌遺伝子を植物が効果的に翻訳し得るように改変することは時間のかかるかなり困難なことである。

細胞内SAMレベルを低下させることは、SAMの代謝上の重要性を考慮すると器官及び時期特異的に行わねばならない。Goodらは、 $T_3$ フェージのSAMヒドロラーゼ (SAMase) 遺伝子を35Sプロモーター支配下にタバコに導入すると、形質転換体は矮化して、5cm以上には成長しなかったと報告している。彼らは、トマト果実の追熟時に特異的に発現するE8遺伝子のプロモーター支配下においてトマトに導入すると、SAMase遺伝子の発現は果実追熟時特異的であり、35Sプロモーターよりも強く見られた。興味深い知見は、E8-プロモーターも、通常よく用いられる1.1kb程度の5'側非転写領域を用いると果実着色初期に発現し、着色が進行すると低下する傾向があるが、長い2.3kbを用いると発現はさらに強く、長く継続することである。その果実のエチレン生成は効果的に抑制され、色素蓄積は対照果実より遅れ、3カ月もの間軟化しなかった。

### 2. 他の植物ホルモン生合成の制御

オーキシンは細胞伸長、細胞分裂、単為結果などに、ジベレリンは伸長成長、着果（受粉後、子房或いは花托が果実として定着すること）などに、サイトカイニン（SA）は緑葉老化、頂芽優勢の破壊などに、アブシジン酸は種子、芽の休眠、蒸散抑制（気孔を閉じる）、他の植物ホルモン作用の抑制などに機能を発揮している。その生合成を制御することで植物の形質発現を多彩に改変することが期待できる。これらの植物ホルモンの植物における生合成は生化学的には確立していない。ジベレリン生合成の2、3の酵素を除いて、生合成酵素に対する遺伝子は単離されていない。しかし、植物腫瘍の原因細菌である *Agrobacterium tumefaciens*、*Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* はインドール酢酸（IAA、オーキシン）やイソペンテニルアデノシン-1-リン酸（iPAP、サイトカイニン）を合成す

る遺伝子をもっておりいずれもクローン化されている。

現在までは、これら細菌由来の生合成遺伝子を35Sプロモーター支配下において全身的にIAA或いはサイトカイニン濃度を高めた形質転換体の生理学的性質を調べる基礎的研究であるが、いくつかの興味ある結果が得られている。

IAA合成遺伝子を導入したペチュニア、タバコ、シロイヌナズナでは期待通りIAAレベルが増加し、同時にエチレン生成も増加した。ペチュニアは異常な形態を示したが、タバコ、シロイヌナズナはほぼ正常な形態となった。いずれも伸長成長が抑制され、頂芽優勢が強まり（腋芽成長の抑制）、葉は下側に巻き（上偏成長）、茎の導管細胞が発達する。これらはオーキシン、エチレンの生理作用から予想されることで、確認されたことになる。しかし、オーキシン増加の効果か、エチレン増加の効果かを区別することは出来ない。ACCデアミナーゼ遺伝子でエチレン生成を抑制したタバコやシロイヌナズナとの交配で、IAA濃度は上昇するがエチレン生成は正常な転換体を作成し解析した結果、頂芽優勢は強く、葉の上偏成長は起こるが茎の伸長成長は回復した。構成的に発現するプロモーターを用いた全身的IAA増加が異常な形態を示すことは予想されるが、異常であっても生存し得るということは植物ホルモンが形態形成の全体的プログラムに関与するというよりも、組織、細胞特異的に成長、分化の発現過程を調節することを意味している可能性が高い。熱ショック蛋白のプロモーターやオーキシン誘導性遺伝子SAURのプロモーターを用いてサイトカイニン濃度を高めた転換体の調査から、頂芽優勢はオーキシンとサイトカイニンの濃度比で決まること、緑葉老化はサイトカイニンの濃度のみでなく蒸散作用が重要な働きをしていること、サイトカイニンは物質転流の吸引力となることなどが明らかにされている。ジベレリン生合成に関与する遺伝子は徐々にクローン化されつつある。GA 20 hydroxylase、ent-Kaurene synthase Aなどが既に単離されているので、内生ジベレリン過剰がどのような形態的、機能的変化をもたらすかも近い将来明らかになるであろう。

最近、サリチル酸、ジャスモン酸の広い生理的活性が注目されている。サリチル酸は病害抵抗反応に、JAは各種の遺伝子発現の制御に関与することが明らかになりつつある。*Pseudomonas putida*のサリチル酸ヒドロキシナーゼ(サリチル酸→カテコール)遺伝子を導入して内生サリチル酸レベルを低下させた形質転換タバコはTMV感染による獲得抵抗反応を示さないことが明らかにされ、サリチル酸レベルの上昇によるウイルス抵抗性作物を作成し得る可能性がある。しかし、いずれも植物における生合成経路は確定していないので生化学的研究の成果にかかっている。

これらの研究からは、エチレン生成制御のように応用に直結するアイデアはまだ出ないが、植物ホルモン生合成、代謝の遺伝子を、細胞、組織、部位特異的、時期特異的に発現するプロモーターとの組み合わせによって、特定の部位の形態、機能を特定の時期に改変することが可能であり、応用的価値は高いと考えられる。しかし、植物ホルモンは低分子で容易に細胞間、組織間を移動すること、1つの植物ホルモンの量的変化はその絶対的濃度の上昇のみでなく、他の植物ホルモンとの量比を変えること、他の植物ホルモンの生合成にも影響を与えることなど考慮すべき多くの問題点があるので、目的形質を限定した高度に精緻な研究計画が必要であろう。

### 3. その他の可能性

既に述べたように植物ホルモンは多面的作用を示すので、その量や特定の作用を制御して、期待する効果を得るためには、高度に制御された局所的、時期特異的発現を達成する必要がある。作用多面性の実体は解明されていないが受容体、信号伝達系の多様性が推定される。植物ホルモンではオーキシン、ジベレリン、エチレンで結合のkineticsから結合成分が複数あることが指摘されている。結合蛋白質の遺伝子が単離されているのはオーキシン結合蛋白質1種とエチレン受容体(Etr1)のみであるが、affinity labelingで別のオーキシン結合蛋白質が幾つか確認されている。エチレン非感受性変異体(Etr1、Ein1,3)、構成的にエチレン効果を発現する変異体(CTR1)などが幾つか単離され、遺伝解析から信号伝達経路の遺伝子と考えられている。今後の研究に待たなければならないが、受容体、信号伝達系の遺伝子が多数単離されることになるであろうが、これらの遺伝子は作用の特異性にも関与する可能性があり、将来の応用的研究が期待されるものである。

おわりに

遺伝子の構造と発現に関する基本的理解と組み替えDNA技術、生物への遺伝子導入技術などの長足の進歩によって、生物に特定の遺伝的形質を付与することが出来るかに見える時代となり、いわゆるバイオテクノロジーを基盤とした産業の将来性が期待されている。実際に、一部の分野では期待通りの成果が得られ、供給側の技術的諸問題が解決されている局面もあり、原理的に有望な技術として育ちつつあることは否定し得ないことである。しかしながら、遺伝子を操作して新しい安定形質をもつ生物を作るという点では、前核生物と真核生物、単細胞生物と多細胞生物、真核生物の中でも動物と植物とでは非常に大きな違いがあり、何を求めるかによって技術的困難さの幅は大きい。

植物において植物ホルモン濃度を改変することは、導入遺伝子の産物や産物の機能を直接利用したりすることとは違った局面をもつものである。これまでの生理学的研究から植物ホルモン作用は可逆的で、いわゆる「引き金」的性質でなく「作動因子」的性質であることが明らかにされており、限られた遺伝子導入研究の結果もこれを支持している。したがって、植物の部位特異的形態、機能の改変は可能である。この点を十分認識してバイオインダストリーの標的とする工夫が必要であろう。

遺伝子発現調節の詳細な機構が解明されていない現在では、外来遺伝子の導入によって予期しない結果に遭遇している。gene silencingはその一例であろう。センス遺伝子を導入してある遺伝子の過剰発現を意図しても、導入遺伝子ばかりでなく本来もっていた相同遺伝子の発現も停止することがしばしば現れる。また導入遺伝子をヘテロにもつ場合は発現するが、ホモになると発現が停止することもよく知られている。さらに、栽培条件によっても導入遺伝子の発現は左右される。例えば、恒温室或いは温室条件下では予想通りの導入遺伝子の発現がすべての個体について見られるのに、同じ系統を野外に栽培すると30~50%の個体は発現が見られなくなったり、移植操作によっても導入遺伝子の発現が不安定になる例が報告されている。植物では相同組み替えによる外来遺伝子の標的導入が実用段階ではなく、核染色体上の不特定の位置に導入された個体から期待した形質の個体を選別せざるを得ない。現在の技術は植物に対して非常な無理を強いているものである。35億年の生物進化の過程を経て現代の種の多様性が確立してきた事実は、現代の種の遺伝子構成が生育環境の下で安定化しようとする恒常性をもつものと考えられる。ランダムに

導入された外来遺伝子はこの恒常性によって排除（物理的或いは機能的に）される可能性を予想しなければならないであろう。綿密な材料吟味と精密な設計によって作成した機器ですら直ちに期待したように作動することは稀である。ましてや作動原理の完全な理解のない自律的な生き物を作成することは、作動原理が完璧に分かっている機器の開発以上の困難さの克服を要求されるものであることを正視し、遭遇する問題点を逐次解決しつつ前進する必要があると考えるものである。基礎的と考えられている研究成果が、応用研究にかなり直接結びつき得るところに遺伝子操作によるバイオテクノロジーの特徴があると思われるので企業の開発研究においても従来の基礎、応用といった区別を取り除いて知らねばならない情報は自らの手で見つけたす立場が独走的な開発につながるものと信ずるものである。