

遺伝子組換えによる低蛋白米の育種

(株)加工米育種研究所
研究員 丸田嘉幸

イネ玄米には乾燥重量当り10%程度の蛋白質が含まれている。蛋白質含量が高いと、食用米の食味が低下し、酒造原料米では清酒の品質が低下することが知られている。それ故、酒造業界を中心として低蛋白質品種の育成が強く望まれている。低蛋白質品種の育成のため利用可能な従来からの育成法としては、交雑育種法あるいは突然変異育種法がある。しかしながら、両育種法とも多くの労力と時間が必要となるものの、なおかつ画期的な低蛋白質品種の育成は困難である。

生体内の蛋白質合成において、mRNAと相補的なRNA（アンチセンスRNA）が、蛋白質合成を抑制する働きがあることが知られている。そこで、この作用を利用し、イネの主要な種子貯蔵蛋白質グルテリンのmRNAの相補鎖を転写するDNA配列（アンチセンスグルテリン遺伝子）をイネに導入することにより低蛋白質イネの作出を試みた。

本講では作出した形質転換イネの特性および閉鎖系温室での試験結果を中心に紹介する。

1. 形質転換イネの作製方法

水稻品種「ササニシキ」の緑葉から常法にしたがい核DNAを抽出し、その核DNAを制限酵素BamHI処理した断片群をEMBL3ファージに組み込みイネの遺伝子ライブラリーを作製した。このライブラリーの中からグルテリンのcDNAをプローブにしてグルテリンに対応する遺伝子を含む組換え体ファージを選抜した。その挿入断片の塩基配列を決定した後、グルテリンのプロモーター領域のみを含む断片をプラスミドpUC19へサブクローニングし、プラスミドpUCGPを得た。このプラスミドpUCGPにおけるグルテリンのプロモーター領域を含む配列の下流に、グルテリンのcDNAをアンチセンスの方向に挿入した。さらにその下流にノスターミネーターを挿入してアンチセンスグルテリン遺伝子を保持したプラスミドpANG2を作製した（図1）。

水稻品種「アキヒカリ」の薬由来の懸濁培養細胞よりプロトプラストを調製した。エレクトロポレーション法により、上記アンチセンスグルテリン遺伝子を保持したプラスミドpANG2と、選抜マーカーとしてCaMV35Sプロモーターの下流にハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子およびCaMV由来のターミネーターを有するプラスミドpGL2との同時形質転換をプロトプラストに対して行った。プロトプラストを培養後、ハイグロマイシン（20 μ g/ μ l）に耐性を示すカルスより正常な稔性を示す形質転換イネが9個体得られた。

形質転換イネの緑葉よりDNAを単離し、導入されたアンチセンスグルテリン遺伝子のみが増幅されるプライマーを用いてPCR反応を行った後、そのPCR

産物をサザン分析したところ、形質転換イネ9個体中アンチセンスグルテリン遺伝子を保持している植物体が6個体確認された(図2)。

2. 形質転換イネの種子の分析

アンチセンスグルテリン遺伝子は形質転換植物ゲノム上に組み込まれた際、ヘテロ型になると考えられるため、自殖第1代種子は導入遺伝子の遺伝子型に分離があり、胚乳中のグルテリン含量についても分離しているものと予想された。

自殖第1代の完熟種子を1粒ずつ乳鉢で磨砕した後、4% SDS、6M 尿素、5% 2-メルカプトエタノールを含む溶液に懸濁して種子中の全蛋白質を抽出した。抽出液を10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、さらにゲルをクマシーブルーで染色した。ゲル上の各バンドの相対蛋白量をデンストメーターによって測定することにより、種子中のグルテリン含量を調査した。その結果、自殖第1代種子の中にグルテリン含量が顕著に低減している米粒が存在していた。図3Aに自殖第1代種子の中でグルテリン含量に変化が見られない米粒のチャート、図3Bにグルテリン含量が顕著に低減している米粒のチャートを示した。

このデンストメーターの測定チャートから、1粒中における26キログルトングロブリン(図3、ピーク3)含量を1としたときのグルテリンの含量を算出し、無作為に選んだ24粒についての結果をヒストグラムで表した(図4、図5)。その結果、アンチセンスグルテリン遺伝子が導入された形質転換イネの自殖第1代種子の中に、グルテリン含量が非形質転換体より統計的に有意に低減している種子が存在することが確認された。

3. 形質転換イネの安全性評価試験

遺伝子組換え技術を用いて作られた植物は、導入した遺伝子以外はもとの植物とほとんど変わるところがないと考えられる。しかし、導入した遺伝子と宿主植物の持つ遺伝子の相互作用によって、事前に予想されなかった特性が形質転換植物に出現していないかどうか、あるいは、形質転換植物が生態系に与える影響について、一般の圃場で栽培する前に慎重な事前評価を行うことが義務づけられている。

そこで、作出した形質転換イネが生態系に対して安全であることを確認するため、科学技術庁の「組換えDNA実験指針」に基づく安全性評価試験を閉鎖系温室で行った。

1) 生殖・繁殖様式および遺伝的特性

生育調査、花粉稔性および葯長の調査、花粉の飛散調査、風媒による受粉に関する調査を行った。

生育調査の結果(表1)、形質転換体は非形質転換体より稈長が低い傾向が認

められた。前記のアンチセンスグルテリン遺伝子の導入が認められなかった個体でも同様の傾向が観察されたので、これはプロトプラストからの再生過程で起こった体細胞変異の結果であると推定された。

花粉稔性については形質転換体と非形質転換体との間には差異がなく、葯長については形質転換体の葯が非形質転換体の葯よりも僅かに短かかった(表2)。

花粉の飛散程度についての調査では扇風機による人工風を2日間送風し、飛散した花粉の数を計測した。形質転換体では花粉源からの距離80cmの位置に花粉飛散のピークを示し、非形質転換体では100cmまで飛散花粉が増加しピークは100cm以遠にある傾向を示した(表3)。このことから、形質転換体の花粉は非形質転換体に比べて遠くに飛散することはないと考えられた。

風媒による他殖に関する調査では温湯除雄後に剪穎したイネを花粉源より風下50cm、100cm、150cm、にそれぞれ配置し、結実の起きた種子数を調査した(表4)。形質転換体では距離100cm以内で5粒、非形質転換体では150cm以内で13粒が風媒で結実した。この結果、形質転換体では風媒による他殖が起きる可能性は非形質転換体よりも少ないことが判明した。

2) 有毒物質産生の有無

揮発性有毒物質産生に関する試験では、植物の葉に含まれる揮発性物質をガスクロマトグラフィー(GLC)により分析した(図6)。得られたクロマトグラムには、形質転換体の抽出物に特異的なピークは認められなかった。

植物体地下部からの有毒物質分泌に関する試験では、水耕栽培後の水耕液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析した(図7)。得られたクロマトグラムには、形質転換体を栽培した水耕液に特異的なピークは認められなかった。

以上の結果より、植物体から放出される揮発性物質と根から分泌される物質とについて、形質転換体と非形質転換体との間で差が無いことが確認された。

4. まとめ

以上のように、グルテリンのアンチセンス遺伝子を導入することにより、目的蛋白質を特異的に低減させることができた。また、閉鎖系温室での安全性評価試験の結果、この形質転換体は非形質転換体と比べて目的形質の他には何ら変わるところがないことが示された。

現在、次年度の隔離圃場栽培への移行に必要な安全性評価試験を非閉鎖系温室で行っている。

また、酒米品種の低蛋白化を進める一方、低減効果がさらに上がるよう検討を進めている。

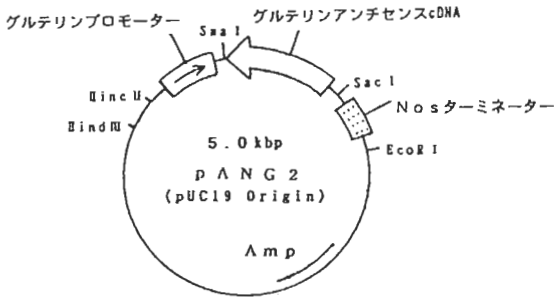


図1. 形質転換に用いた組換えプラスミドベクター

P 1 2 3 4 5 6 7 8 9 W

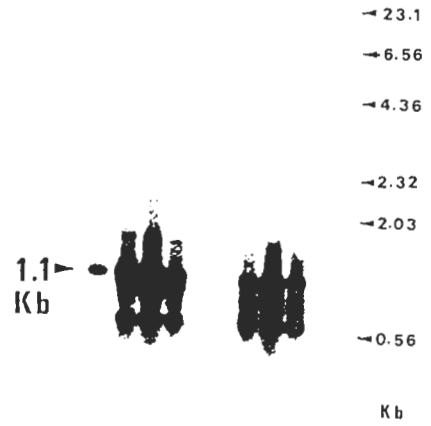


図2. アンチセンスグルテリン遺伝子のPCR産物サザン分析
P : pANG2
1-9 : 形質転換イネ
W : 非形質転換イネ

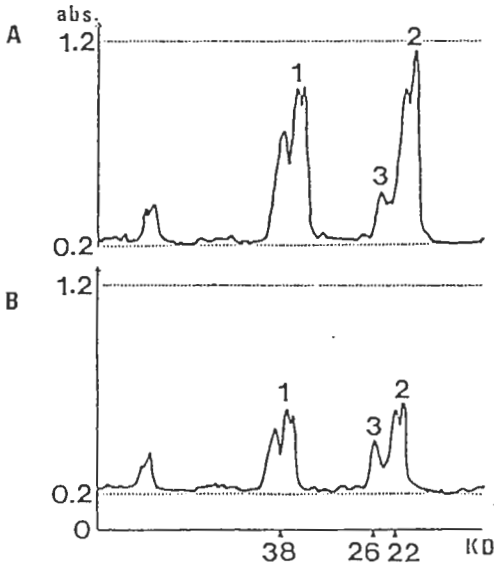


図3. デンシトメーターによる形質転換イネ自殖第1代種子の蛋白質の分析
A) グルテリン量に変化のない種子
B) グルテリン量が低減した種子
ピーク 1, 2 : グルテリン
ピーク 3 : グロブリン (内部標準)

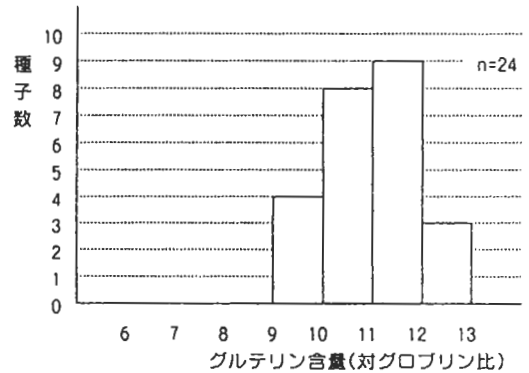


図4. 非形質転換イネのグルテリン含量ヒストグラム

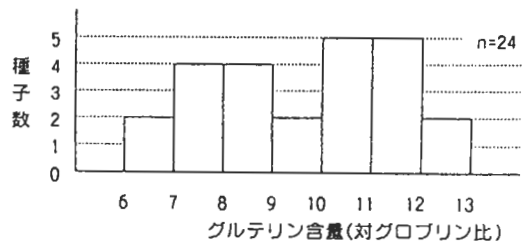


図5. 形質転換イネのグルテリン含量ヒストグラム

表1. 生育調査

植物	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本)
形質転換体	60.7 ± 6	15.5 ± 1.7	3 ± 0.8
非形質転換体	71 ± 5	16.3 ± 2.0	3 ± 0.1

-- : 1%水準で非形質転換体より有意に低い

表2. 花粉雄性・葯長調査結果

植物	花粉雄性 ¹⁾ (%)	葯長 ²⁾ (mm)
形質転換体	88.8 ± 5.5	1.61 ± 0.08
非形質転換体	88.4 ± 5.7	1.67 ± 0.09

- 1) 穎花当り花粉 200粒, 20穎花調査
生データによる解析結果, 角度変換データでも有意差無し
- 2) 穎花当り 6葯, 20穎花調査, 穎花毎の平均葯長を統計解析
- : 5%水準で有意に短い

表3. 花粉飛散調査

供試 株数	総数	花粉源からの距離 (cm)										
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
形質転換体	4	11	39	56	81	116	101	101	121	141	98	119
非形質転換体	4	12	8	9	15	18	26	54	54	97	110	134

捕集花粉数(粒)

表4. 風媒受粉調査

花粉源植物		花粉源からの距離 (cm)		
		50	100	150
形質転換体	調査穎花数	98	97	103
	検実数	4	1	0
	検実率 (%)	4	1	0
非形質転換体	調査穎花数	93	100	103
	検実数	8	2	2
	検実率 (%)	9	2	2
送風強度	花粉源位置	平均2.3m/sec (2.0-2.5m/sec)		
	50cm位置	平均1.3m/sec (1.1-1.5m/sec)		
	100cm位置	平均1.0m/sec (0.9-1.1m/sec)		
	150cm位置	平均0.6m/sec (0.5-0.7m/sec)		

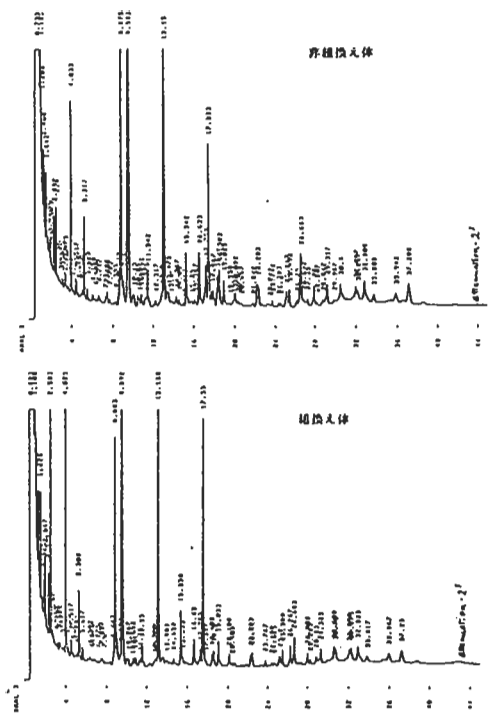


図 6. GLC 分析クロマトグラム

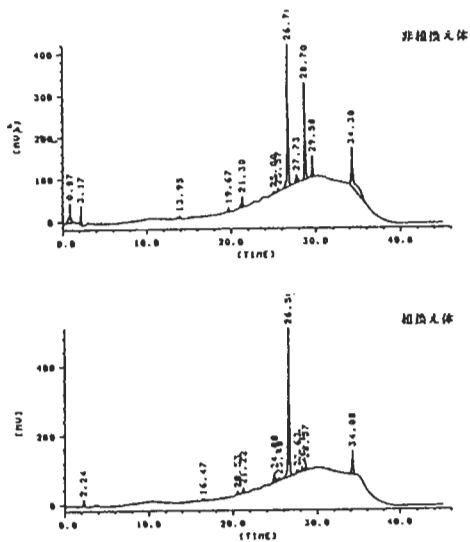


図 7. HPLC 分析クロマトグラム