

トランスポゾンによる新形質の創出

農業生物資源研究所・分子育種部
廣近洋彦

植物のバイオテクノロジーは、遺伝子の単離、解析、導入法の開発により飛躍的に進んだ。これらの成果を利用し、ウイルス抵抗性や、病害虫抵抗性、除草剤抵抗性などが付与された形質転換植物がえられている。ここで利用されているのは、細菌やウイルスなどの比較的解析の容易な遺伝子や、発現が強く産物の生化学的解析の進んだ遺伝子が中心である。植物自身のもつウイルス抵抗性、病害虫抵抗性、耐冷性、耐塩性、耐乾性などの有用形質についてはその分子機構はほとんど解明されておらず、これらに関与する遺伝子もほとんど単離されていない。今後バイオテクノロジーを進め新形質を付与した植物を創出するためには、これらの遺伝子の単離解析が必須であるが、従来の遺伝子単離法では、遺伝子産物である蛋白やRNAの情報が必要であるため、このことは困難である。近年、従来法とは異なった遺伝子単離法が幾つか開発され、このなかで最も成功をおさめた方法の一つがトランスポゾンを利用する方法である。これまでこの方法の植物での成功例はトランスポゾンの研究の進んでいるトウモロコシとキンギョソウに限られていたが、有用遺伝子単離の必要性を背景にトランスポゾンの研究が急速に進展し、これらの植物以外でもトランスポゾンを利用した遺伝子単離が可能となってきている。本講演では、植物のトランスポゾンを利用した遺伝子単離手法の開発の現状と、遺伝子導入ベクターやゲノム解析などにトランスポゾンを利用する研究の一端を紹介する。

1. トランスポゾンの遺伝子単離への利用

転移能を有するトランスポゾンが植物に存在すると、一定の頻度で遺伝子のなかに転移し、突然変異を誘発する。このようにして有用遺伝子に突然変異が誘発されると、この遺伝子はトランスポゾンによって目印が付けられたこととなる。トランスポゾンがクローン化されていれば、これをプローブに遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることにより有用遺伝子を単離できる。このような遺伝子単離法はトランスポゾンタギングと呼ばれている。植物でのトランスポゾンタギングの最初の成功例は、トウモロコシのトランスポゾンAcがクローン化された翌年の1984年に報告されている¹⁾。この方法による遺伝子単離には、目的遺伝子の生理生化学的な情報を全く必要としない。従って、従来の生化学的方法では分離不可能な遺伝子の単離が可能となる。たとえば、トウモロコシでは貯蔵タンパクであるzeinの合成を促進する転写調節因子の遺伝子O2や²⁾、病原菌に対する抵抗性遺伝子Hm³⁾等が単離されている。キンギョソウにおいては花の分化を調節する転写調節因子の遺伝子(DefA)⁴⁾が単離されている。トランスポゾンタギングはこれまで内在性のトランスポ

ゾンの研究のよく進んでいるキンギョソウとトウモロコシに限られていた。このような系が他の有用作物で利用できるようになれば、様々な有用遺伝子の単離が可能となる。このような系を作るために一つの方法は、トランスポゾンによるスクリーニングすること、もう一つは遺伝子導入法を利用してトウモロコシやキンギョソウのトランスポゾンを導入することが考えられる。

(1) トウモロコシのトランスポゾン Ac/Ds を利用したタギング系

トウモロコシの Ac/Ds は、もっとも解析の進んでいるトランスポゾンの一つであり、今から 8 年前にタバコに導入され転移能が示された⁵⁾。現在までに 15 種類の植物で転移能が確認されており、これらの植物でトランスポゾンタギング系の開発が勢力的に進められている⁶⁾。外来性のトランスポゾンを利用する方法の利点の一つは、遺伝子単離の効率を上げるようにトランスポゾンを変更できることである。例えば Ac の転移酵素遺伝子の発現を調節するプロモーターを換えることにより転移効率や転移の時期を調節することが可能である。また、多くの場合転移を調節するために非自律性因子である Ds を導入した系統と自律性因子である Ac の転移酵素遺伝子を導入した系統を作り、交配により Ds の転移を誘発する方法が取られている。この場合、後代で転移酵素遺伝子を分離させることにより Ds の再転移を抑制することが可能で、Ds により誘発された突然変異を安定化することが可能となる。Ac を利用したタギング系の開発の現状を、私達の進めているイネのタギング系を含めて紹介する。

(2) トウモロコシの Ac/Ds トランスポゾンを利用した新しいタギング系

トウモロコシでは遺伝子座あたり 10^{-4} から 10^{-6} の頻度でトランスポゾンによる突然変異体を得られており、トランスポゾンタギングにおいて突然変異体のスクリーニングに多大の労力を要することが予想される。スクリーニングの容易さからこれまでに単離された遺伝子は、その変異が種子レベルで、しかも肉眼的に同定可能なものが主である。細胞レベルで変異体のスクリーニングが可能であれば、変異体のスクリーニングが極めて容易となる。しかし、トランスポゾンによって誘発される変異の多くは劣性であり、倍数性のために変異形質が現われない。この問題を解決するために強いエンハンサー・プロモーターを組み込んだ Ds トランスポゾンの利用が考えられる。このような Ds が遺伝子の近傍に転移すると、遺伝子の発現が活性化され優性変異が誘発される。このようなタギング系は、ホルモンやアミノ酸合成に参与する遺伝子や除草剤耐性遺伝子、耐塩性遺伝子のような有用遺伝子の単離に利用できると考えられる。このような細胞系を用いたタギング系の開発の現状について紹介する。

(3) ストレス応答性のトランスポゾンを利用したタギング系

植物のトランスポゾンには構造及び転移の機構から大きく二つのグループに分けられている。一つは、これまでに述べてきたトウモロコシやキンギョソウでよく研究されているDNA型のトランスポゾンで、転移に切り出しを伴うため不安定な変異を誘発するという特徴を持つ。もう一つは、レトロトランスポゾンとよばれRNAを介して転移をし、安定な変異を誘発するという特徴を持つ。レトロトランスポゾンは不安定な変異を誘発しないため遺伝学的解析で同定することが困難で、これまで植物ではほとんど研究されていなかったが、私達は植物のレトロトランスポゾンを単離する分子生物学的手法を開発し^{7、8)}、この方法を利用してレトロトランスポゾンが植物に普遍的に存在することを明らかにした⁹⁾。また、タバコとイネから培養によって特異的に活性化されるレトロトランスポゾンを発見した^{10、11)}。このようなレトロトランスポゾンの活性化は、培養変異の一因として注目されている。トランスポゾンタギングにおいて最も労力と時間を要するのは突然変異体のスクリーニングである。植物において培養は増殖技術としてのみならず、突然変異体の作出に広く利用されている。このためすでに数多くの培養変異体が単離されており、これらを利用しタギングにより変異遺伝子の単離が可能と考えられる。培養によって活性化されるレトロトランスポゾンは簡単な方法で単離できるため、この方法は色々な植物での遺伝子単離に利用可能と考えられる。また、タバコからはサリチル酸によって活性化されるレトロトランスポゾンを単離しており、サリチル酸の投与によって植物体レベルで簡単に転移を制御できるため、この特長を効率的な遺伝子単離に利用できるものと期待される。

2. トランスポゾンの遺伝子解析への利用

現在急速な勢いで植物遺伝子の解析が行われている。たとえばイネでは約5000のcDNAの配列が決定され、その内20%について既知の遺伝子との相同性が明らかにされている¹²⁾。今後もさらに大量の遺伝子の配列が解析されるものと予想される。しかし、塩基配列の解析だけから機能を推定することは多くの場合困難であり、今後これらの遺伝子の機能解析が大きな問題として残されている。このような塩基配列のわかっている遺伝子の機能を明らかにする方法としてトランスポゾンによる挿入変異の利用が注目されている^{13、14)}。この方法は、活性のあるトランスポゾンをもつ個体の集団の中から、PCRを利用し目的とする遺伝子にトランスポゾンの挿入された個体を選抜し、その個体の示す表現型から機能を解析する方法である。選抜を容易にするため集団をブロック化する方法がとられている。個体あたりに独立な挿入変異をできるだけ多く含み、十分な大きさの集団を得ることがこの方法の鍵となっている。このような観点からイネの培養応答性のレトロトランスポゾンの利用が考えられる。イネの培養応答性レトロトランスポゾンの性質を紹介するとともに、遺伝子機能解析への利用可能性について議論する。

3. トランスポゾンの新しい突然変異原としての利用

突然変異を利用した育種のために新しいスペクトルを有する変異原の開発が望まれている。これまでに開発された変異原によって誘発される突然変異は、その機構から考えて多くの場合劣性である。一方、1-(2)で述べたエンハンサー・プロモーターを挿入したトランスポゾンを利用すると優性の変異を誘発することが可能であり、これまでに用いられてきた変異原では得られないタイプの変異を誘発することが可能と考えられる。エンハンサー・プロモーターの挿入されたトランスポゾンが遺伝子の近傍に転移するとその遺伝子の発現が増強されることが期待される。内在性の遺伝子の発現の増強により耐塩性¹⁵⁾や除草剤に対する抵抗性¹⁶⁾が増強されることが知られており、エンハンサー・プロモーターを挿入したトランスポゾンを変異原として利用することにより新形質の創出が可能と考えられる。

4. トランスポゾンの遺伝子導入ベクターとしての利用

遺伝子導入法としてアグロバクテリウム-Tiプラスミドベクターを利用した方法が双子葉植物でよく利用されているが、この方法の適用が困難な単子葉植物等への遺伝子導入法としてエレクトロポレーションや遺伝子銃などを用いた方法が利用されている。後者の方法では、特別なベクターを必要とせず遺伝子を直接植物細胞に導入可能で直接導入法と呼ばれている。形質転換が起こるためには、細胞内に導入された遺伝子が安定に植物染色体に組み込まれることが必要である。この組み込み機構は明かではなく、活性が低いため形質転換効率を改善するうえで制限要因になっている。トランスポゾンは染色体に組み込む機構をもっており、トランスポゾンをベクターとして利用すれば形質転換効率を飛躍的に改善することが可能と考えられる。事実、ショウジョウバエではP因子ベクターを利用してのみ形質転換体を得ることが可能で、その効率も最高50%という結果が得られている¹⁷⁾。これまでの遺伝学的解析によりAcの転移には複製が必要であることが示されている。そこでDNAウイルスベクターに組み込み転移させることを試みた¹⁸⁾。Dsの内部にハイグロマイシン抵抗性遺伝子を挿入し、ジェミニウイルス(MiSV)ベクターに組み込み込んだ。このプラスミドとAcの転移酵素を発現させるプラスミドと混ぜてイネプロトプラストにエレクトロポレーションで導入し、ハイグロマイシン抵抗性の形質転換体を得た。形質転換体のDNAを調べたところ、Dsの転移によりハイグロマイシン抵抗性遺伝子が導入されたことが確認された。このように染色体外のAc/Dsが直接植物ゲノムに転移することが初めて証明され、ベクターとして利用できることが示された。現在のところ形質転換効率を改善するには至っていないが、転移酵素の発現の増強等によって改善できるものと期待される。トランスポゾンベクターを利用する利点としてもう一つ上げられる。ベクターを用いない場合、導入したプラスミドはランダムに切断されて染色体に組み込まれる。従って、目的とする遺伝子領域で切断され染色体に組み込まれ

る場合がある。トランスポゾンベクターを用いると目的とする遺伝子を高頻度でしかも完全な形で組み込むことが可能である。とくに大きな遺伝子を導入する場合このことは重要になると考えられる。

5. トランスポゾンのDNAフィンガープリンティングへ利用

DNAフィンガープリンティングとはDNA構造の違いを利用し、個体を識別する方法であり容疑者の特定や、親子鑑定に利用されている。この方法は、植物の分野においても有用であり、品種や系統の識別に利用できる¹⁹⁾。DNA多型を示すプローブであれば由来が何であっても利用できる。これまで植物では、ランダムにクローン化されたDNA断片、リボソームRNA遺伝子、葉緑体DNA、ヒト由来のミニサテライトDNA等が利用されている。イネの品種の識別がこれらのプローブを用いて行われているが、現在日本で栽培されているイネについての報告はほとんどない。それは、これらが遺伝的に近縁であるため、多型が検出されないためと考えられる。私達はレトロトランスポゾンプローブが、これらのフィンガープリンティングに有効であることを示した²⁰⁾。日本型イネ6品種とインド型イネ6品種について調べ、例えばTos2トランスポゾンのプローブを用いると、すべての品種が同定可能であった。このように、レトロトランスポゾンプローブが多型を効率よく検出できる原因として次の様な要因が考えられる。(1) 転移による多型(2) トランスポゾンは高頻度でメチル化を受けており、制限酵素のメチル化感受性による多型(3) メチル化DNAは突然変異頻度が高く、突然変異による多型。さきに述べたように、任意の植物からレトロトランスポゾンプローブを簡単に得ることが可能であるので、他の植物においてもDNAフィンガープリンティングを容易におこなうことが可能と考えられる。

文献

- 1) Fedoroff, N. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3825-3829.
- 2) Schmidt, R.J. et al. (1987) *Science* **238**, 930-936.
- 3) Johal, G.S. and S.P. Briggs. (1992) *Science* **258**, 985-987.
- 4) Sommer, H. et al. (1991) *EMBO J.* **9**, 605-613.
- 5) Baker, B. et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4844-4848.
- 6) 4th International Congress of Plant Mol. Biol. (1994) Abstracts.
- 7) Hirochika, H., A. Fukuchi and F. Kikuchi. (1992) *Mol. Gen. Genet.* **233**, 209-216.
- 8) 廣近洋彦 (1992) 細胞工学 11、662-670.
- 9) Hirochika, H. and R. Hirochika. (1992) *Jpn. J. Genet.* **68**, 35-46.
- 10) Hirochika, H. (1993) *EMBO J.* **12**, 2521-2528.
- 11) Hirochika, H. et al. in preparation.
- 12) Rice Genome 3 (1994).

- 1 3) Ballinger, D.G. and S. Benzer. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9402-9406.
- 1 4) Zwaal, R.R. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**,7431-7435.
- 1 5) Glaser, H.-U. et al. (1993) *EMBO J.* **12**, 3105-3110.
- 1 6) Shah, P.M. et al. (1986) *Science* **233**, 478-481.
- 1 7) 柴忠義、富樫伸 (1989) トランスジェニックバイオロジー 講談社 サイエンティフィック、p 66-84.
- 1 8) Sugimoto, K., Y. Otsuki, S. Saji and H.Hirochika. (1994) *Plant J.* **5**, 863-871.
- 1 9) 矢野博 (1993) 農業および園芸 **68**、25-31.
- 2 0) Fukuchi, A., F. Kikuchi and H. Hirochika. (1993) *Jpn. J. Genet.* **68**, 195-204.