

除草剤抵抗性遺伝子の作物への導入

農業生物資源研究所 細胞育種部 細胞育種研究室長 石毛光雄

1. はじめに

人が地球上で作物生産を開始して何千年が経過しただろうか。作物の生産性をあげるために品種改良、肥培管理等多くの努力がなされてきた。作物と競合する雑草を除くためにも多大の労力を使ってきた。雑草防除の方法にも多くの工夫がされてきており、人力にたよっていた時代から、機械力の導入、そして除草剤の使用が普及してきた。

除草剤による雑草防除は画期的な技術であったため、先進国を中心に急速に普及してきた。薬剤散布により障害となる雑草を簡単に防除できるので、非常に効率的な方法である。除草剤は簡便で安易に使用できる技術であるために、除草剤の大量散布によるいくつかの問題点も生まれてきており、自然環境を保つための社会的要望が高まってきている。そのためには、不必要な除草剤の使用を控えるのは当然として、環境に優しい除草剤の開発や作物に新たな除草剤耐性を導入し、より安全な除草剤による雑草防除を可能とする技術開発が望まれている。

除草剤は植物の生理反応の特定のカ所を阻害する化学物質であり、この作用により選択的に雑草の生育を抑制することにより防除効果を発揮する。したがって、除草剤抵抗性の植物はその薬剤によっては生育に影響を受けないなんらかの別の代謝系を持つ必要がある。そうした代

謝系に関与する遺伝子がいくつか知られており、この遺伝子を作物に導入することにより除草剤耐性の作物を育種する試みがされており、こうした実験例は増加している。

抵抗性を作物に付加するための方法はいくつか試みられており、組織培養中の変異を除草剤入りの培地で選抜する「細胞選抜法」、野生の雑草中に存在する抵抗性を通常の交雑にはよらずに体細胞融合によって導入する「細胞融合法」、遺伝子組換えにより外来の除草剤抵抗性遺伝子を作物に導入する「形質転換法」がある。ここでは、これらの技術を使った作物への除草剤抵抗性の導入の例とこれらの技術上の問題点について述べてみたい。

2. 細胞選抜

植物の組織培養中、特にカルス培養中に突然変異が生じることはよく知られている。この突然変異の中から除草剤に抵抗性の変異体を選抜しようとする考え方がある。一般に突然変異育種では目的とする突然変異の頻度が極めて低いので数万を越す植物体のスクリーニングが必要となる。これに比べ細胞レベルでの選抜は格段に多くの細胞をとり扱うことが可能であるので、選抜効率は非常に高い。この細胞選抜の考え方は、バクテリア等での栄養要求性や薬剤耐性変異株の選抜で大きな成果をあげてきた手法であ

り、これを植物細胞レベルの選抜に適用する試みがなされている。

Swanson (1989)¹⁾らは、ナタネにおいて半数性の花粉培養と ethyl nitrosourea (ENU) による突然変異処理の技術を使って imidazoline 40 $\mu\text{g}/\text{l}$ の選抜圧で細胞選抜を行い、除草剤「Assert」, 「Pursuit」, 「Scepter」に抵抗性の植物を作出した。この植物は圃場での散布実験でも明らかな抵抗性を示すとともに F₁ hybrid でも抵抗性を示した。ここで使われた半数性の細胞で選抜し、その後染色体数を倍加する手法は、細胞選抜の効率を高めることができ、またホモ固定系統を得ることが容易なので細胞選抜では有力な方法といえよう。同様な手法で Schenck and Robbelen (1985)²⁾もナタネにおいて「Bentazon」に抵抗性の系統を作出している。

Sigematsu (1988)³⁾らは、タバコの培養細胞から 100 μM のアトラジンを含む培地で細胞選抜を行った。アトラジン耐性には葉緑体ゲノム (cpDNA) が関係しているが、この選抜された変異体は特定のアミノ酸残基が Serin から Threonin に変化していることが判明し、これまでの抵抗性の cpDNA と異なる場所でのポイント mutation であった。このように細胞選抜で明らかな抵抗性を獲得した細胞でのゲノム変化が明らかになった場合にはこの遺伝子をクローニングし、他の植物に導入できるので非常に有効であるが、一般には細胞選抜で得られた変異体についての遺伝的な解析が不十分な場合が多い。

Hauptmann (1988)⁴⁾らは、N-glyphosate に対するニンジンの細胞選抜により 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) 合成活性が 8.7 倍高い細胞を選抜

した。この細胞は EPSP をコードする遺伝子のコピー数が増加していることがサザンブロット分析から確認された。しかしながらこの増加したコピー数が再分化植物でも安定的に保たれているかは不明である。

細胞選抜では培地で多数の細胞に選抜圧がかかるので抵抗性細胞が得られやすい。例えば Taylor (1989)⁵⁾らは、赤クローバにおいて 2,4-D 抵抗性の細胞を選ぶことに成功している。また、Lupotto (1989)⁶⁾らは、トウモロコシにおいて体細胞胚分化の培養系を用いて、「Basta」に抵抗性の細胞を選抜した。これを再分化させたが、その抵抗性は植物体レベルでは明確でなかった。

細胞選抜はその原理や手法が簡単でカルスを経て再分化する培養系が開発できれば (プロトプラスト系、液体培養、花粉培養等) 適用できる範囲は広い。しかしながら、アイデアとしては簡単であるが、そこで起きている抵抗性獲得のメカニズムについては不明な点が多い。また、細胞レベルで抵抗性を示しても再分化した植物では抵抗性を示さない場合もあるし、再分化当代では抵抗性を示したとしても、種子繁殖した次代では抵抗性を失う場合もある。作物生産では遺伝的に安定した種子生産が不可欠であり、この点が細胞選抜の手法で解決すべき問題として残っている。細胞選抜の長所としては、形質転換作物はまだ一般圃場栽培が認可されていないが、細胞選抜された作物は、社会的に受け入れられやすいことがある。

3. 細胞融合

植物においては、種子繁殖の過程で自然交雑や人工交雑によりゲノムの組換えが起こり、新しい遺伝子の組合せを持つ植物が創られる。こ

の原理を明らかにしたのはメンデルであるが、メンデルの法則に基づいて異なる性質をもつ2つの親を人工交雑して、望ましい遺伝子の組合せをもつものを人為的に選抜する「交雑育種法」が現在でも最も強力な品種改良法となっている。しかしながら、この方法では交雑できる種の間でしか遺伝子の組換えを達成できないので、遠縁の種に利用したい遺伝子があったとしても利用できない。この種の壁を破ることを目的として開発されたのが、細胞を人工的に融合させ交雑不可能な種からも遺伝子を導入しようとする細胞融合法である。

Brassica 属や *Solanum* 属の野生種にはアトラジン等に抵抗性を持つ変異種があることが知られており、これらの野生種の除草剤耐性を細胞融合によって栽培種に導入する実験が行われている。

Barsby (1987)⁷⁾らは、ナタネにおいて非対称細胞融合で細胞質遺伝するトリアジン抵抗性 (cpDNA にコードされる) と細胞質雄性不稔 (CMS, mtDNA にコードされる) を合わせもつ系統を作出した。細胞融合後、再分化した植物は圃場での検定の結果トリアジン抵抗性を示した。また、このCMSを母親として交雑した次代の F₁ hybrid においても抵抗性を示したので、この系統を用いて除草剤耐性をもつ F₁ 雑種の採種体系を作ることができるようになった。彼らのグループは Chung (1988)⁸⁾らにおいても半数性の細胞間の細胞融合を実施し同様に細胞質雄性不稔でアトラジン抵抗性のナタネを作出した。

Jourdan (1989-1⁹⁾, 1989-2¹⁰⁾らは、*Brassia oleracea* と *B. napus* あるいは *B. oleracea* と *B. canpestris* との細胞融合により合成 *napus* で、トリアジン抵抗性の系

統を作った。融合細胞の選抜では、50mMのアトラジンで処理した。融合植物のなかで、アトラジン耐性でCMSのものは、ミトコンドリアゲノム (mt DNA) か *B. oleracea* で cpDNA が *B. canpestris* であり、細胞質の混在が確認された。GURI and SINK (1988)¹¹⁾は *Solanum nigrum* の変異体と *Soanum melongena* (ナス) を細胞融合し 0.1mM のアトラジンで細胞選抜し再分化個体を得た。アトラジン耐性を示した融合植物の cpDNA の一部が *S. nigrum* に由来することが確認された。しかし、花粉は、不稔で次代の種子が得られなかった。種子を得るには、1対1融合では種が遠縁すぎたためと思われる。

JAIN (1988)¹²⁾らは *S. nigrum* とトマト (*Lycopersicon esculentum*. L) とを融合し *S. nigrum* の細胞質 (この場合 cpDNA) を導入し、アトラジン耐性植物を得た。*S. nigrum* は、野生の雑草なので、トマトのプロトプラストを back fusion させて、よりトマトに近い除草剤耐性植物を得る方法を使用した。これまで細胞融合でとりこまれている除草剤耐性はトリアジン系除草剤に関するものがほとんどであった。これは、この耐性が cpDNA にコードされていて、葉緑体を導入するだけでよいから比較的容易であるためと思われる。細胞質の導入の場合は一方の核のみを不活化して融合する技術を使うことができる。しかしながら、細胞質でもミトコンドリアのゲノムは Erichsa and Kemble (1990)¹³⁾が示すように不安定であるので、注意をはらう必要がある。

Xiao (1986)¹⁴⁾らと Reith and Straus (1987)¹⁵⁾らが示したように、トリアジン耐性の cpDNA は、serine が glcine への一つのアミノ酸残基の置換の結果であることが判

明しており、これは、アラビトプシスや *S. nigrum* のトリアジン耐性のものと同様であった。

細胞融合は交雑不可能な種より除草剤耐性を導入するには強力な方法である。特に細胞質にコードされるものについては現在の形質転換では遺伝子を細胞質に導入することができないので有効である。また、遺伝子がクローニングされていなくても、適当な選抜システムがあれば抵抗性を導入できる利点もある。しかしながら、通常の1対1の融合では、除草剤耐性以外の形質も融合してしまうため、融合植物が望ましくない形質を多くもっていたり、種が遠すぎて次代の種子が生産できない場合もある。非対称融合や部分融合の技術の開発が望まれるが、現在のところ特定の形質のみを細胞融合でとり込むことは困難である。この点の技術開発が細胞融合法についての重点課題であろう。細胞融合では、ゲノムが両親の合計したものとなり、染色体数が多すぎるため不稔になる場合もあるので、半数性細胞の融合によりゲノムの倍加を防ぐのも重要な技術である。

4. 形 質 転 換

生物においては、遺伝子(DNA)からRNAへの転写、翻訳、タンパク質の合成を役で形質の発現がされる。したがって、遺伝子を取り出しそれを別の種に導入したらどうなるかという興味は誰でももつ。1970年代以降、生化学的手法特に分子生物学的手法が一段と発展し、まず微生物において遺伝子クローニング、形質転換の技術が確立した。植物では、形質転換をおこなう為の手法開発が遅れていたが、土壌中の細菌 *Agrobacterium tumefaciens* による形質転換系が確立して以来、急速に形質転換

技術が普及してきた。しかし *Agrobacterium* は一般に双子葉植物にだけ感染するのでイネ科等の植物には有効な手段とはなり得ない。

Agrobacterium が使えない場合の手段として、細胞壁を酵素処理して溶かしプロトプラスト状態にした細胞に電気パルスで小さな穴をあけDNAを注入するエレクトロポレーションの技術も確立した。また、プロトプラスト培養が困難な作物についてはDNAをまぶした微細な金属粒子を鉄砲で打ち込んで植物細胞に入れて形質転換する手法も報告されている。形質転換技術は除草剤耐性などのように比較的小数の遺伝子で制御される形質の導入には好適なものである。ただし、まだ開発されて間もない為、今後解決しなければならない問題もいくつかある。

除草剤「Bialaphos」は広い殺草スペクトラムを持ち作物除草剤としては有望であるが、作物をも殺してしまう。*Stereptomyces hygroscopicus* の株からとられた *bar* 遺伝子はこの Bialaphos に抵抗性を示す phosphinothricin acetyltransferase (PAT) をコードしている。この遺伝子を植物細胞中で働く遺伝子プロモーターと結合した後、植物に形質転換して Bialaphos 耐性の植物を作出する実験が進められている。Block (1987)¹⁶⁾ ら、Greef (1989)¹⁷⁾ らは、*bar* 遺伝子とカリフラワーモザイクウィルス 35Sプロモーターをつなげ、*Agrobacterium* をベクターとする形質転換でタバコ、トマト、バレイショに導入した。形質転換細胞の選抜にはカナマイシンと phosphinothricin (PPT) を用いた。形質転換したタバコにおいては除草剤「Basta」に対して除草剤処理によって通常引き起こされるアンモニアの蓄積もみられず、*bar* 遺

伝子が確実に働くことが証明された。ただし、PAT活性はいくつか再分化した形質転換体の間で大きく異なることも明らかになった。その後、形質転換したタバコとバレイショは圃場で試験がされ、タバコにおいては4,000 g/haのPPTに対して形質転換体は健全であったが、形質転換していない原品種は1,000 g/haの処理でネクロシスを起こし10日以内に死滅した。またPPT処理と無処理の場合を比較して形質転換体では、農業特性に有意な差は認められなかった。バレイショにおいては、品種Bintje, Berolina, Desireeを形質転換してbar遺伝子を導入した。形質転換体においては、除草剤の散布による影響はなかった。また、散布しなかった原品種との比較においても、大きな差は認められなかった。しかしこの試験は *In vitro* で育てたバレイショを直接畑で栽培した結果であり、収量性に関してはさらに大きな試験規模で通常の種イモからの栽培試験を行う必要があろう。Spener (1990)¹⁸⁾らと Gordon-Kamm (1990)¹⁹⁾らはbar遺伝子と35SプロモーターをつないでPUC19プラスミドに組込んだものをタングステン粒子(1.2 μ m)に混ぜて、トウモロコシのカルスにガンで打ち込んだ。1mg/lのbialaphosで形質転換した細胞を選抜しその後も細胞選抜を続けた。その後、再分化した植物を調べた結果bialaphosに抵抗性を持ち、遺伝することも確認された。しかしながら、この方法ではDNA打ち込み後、細胞がキメラ状態になり形質転換していない細胞から再分化する可能性があるので確実な細胞選抜系を使用することが重要であろう。

5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate (EPSP) synthase gene は除草剤 glyphosate 「Round up」に抵抗性を持つ

ことが知られている。Shah (1986)²⁰⁾らはペチュニアの細胞選抜の中からEPSPを多量に生産するcell lineを確立し、EPSP geneをクローニングし35Sプロモーターとつなげて *Agrobacterium* の系を用いてペチュニアにふたたび形質転換した。形質転換した植物は明らかに抵抗性を示した。同様の試みはアマでも Jordan and McIlughen (1988)²¹⁾によって試みられ、抵抗性植物の作出に成功している。これらの実験で使われた遺伝子がもとは細胞選抜で得られた抵抗性細胞からクローニングされたことは興味深い。

アラビドプシスのなかからchlorsulfuron耐性の植物が見い出されこれに関与するacetyl-lactate synthase (ACS) 遺伝子がクローニングされている。Haughn (1988)²²⁾らは、ACSをタバコに *Agrobacterium* の系を用いて形質転換し、1 μ Mでも抵抗性を示す植物の作質に成功している。同様の手法で McHughen (1989)²³⁾はアマで抵抗性植物を作出している。

2,4-Dは、除草剤として古くから用いられてきたが、Lyon (1989)²⁴⁾および Streber and Willmitzer (1989)²⁵⁾らは、*Alcaligenes eutrophus* から2,4-D monooxygenase 遺伝子 (TFDA) をクローニングし、35Sプロモーターとつないでタバコに形質転換した。形質転換したタバコは3,000 ng/lの2,4-Dに対しても明らかな抵抗性を示した。

除草剤 bromoxynil 「Buctril」は、光合成系IIを阻害するが、Stalker (1988)²⁶⁾らは、これに抵抗性を示すbxn遺伝子を *Klebsiella ozaenae* からクローニングした。これをタバコに形質転換した結果、抵抗性植物の作出に成功した。

このように形質転換による除草剤耐性遺伝子の導入と発現にはタバコを中心として多くの成功例が報告されている。今後も作物の形質転換技術の進歩にともなって、除草剤耐性を付加した多くの作物が作出されよう。ただし形質転換によって、除草剤耐性を付加した作物が実用化されるにはまだいくつかの問題がある。形質転

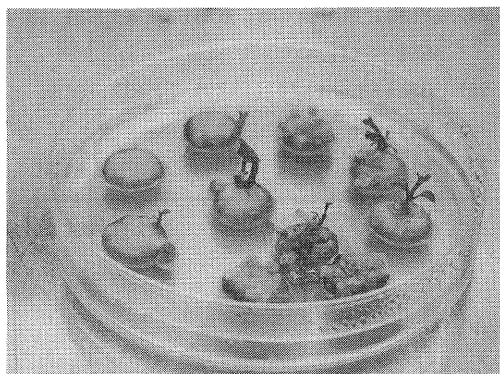


写真1. パレイシヨのチューバディスクからの形質転換体の再分化

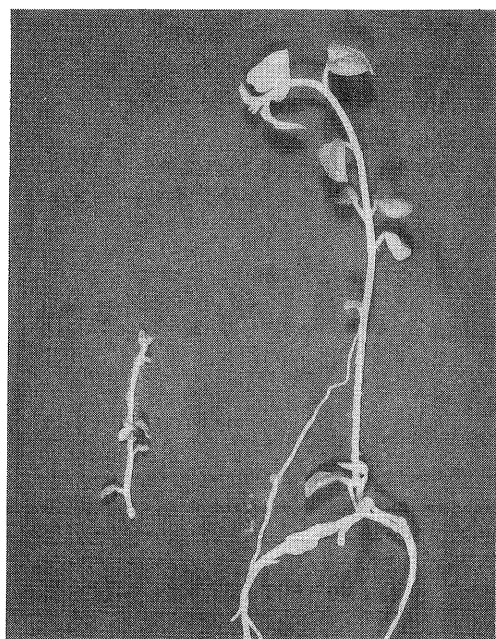


写真2. 形質転換体（右）と通常のパレイシヨの薬剤耐性（カナマイシン）（品種メイクイン）

換によって一般的な農業特性（収量、品質、耐病性）が悪化してはならないし、形質転換体が遺伝的に安定であることも非常に重要である。

Ishige (1991)²⁾（写真1, 2）らが示したように形質転換体はおなじ実験処理から再分化したとしても導入した遺伝子のコピー数、発現量が大きく変異することが多い。したがって、かなり多数の形質転換体を得て、通常の育種と同様な圃場での特性評価が必要となってくるであろう。これまでの形質転換では常時遺伝子発現をうながす35Sプロモーターを使用したものが多いが、本来除草剤耐性遺伝子は常に発現する必要はないし、除草剤の大量散布を防ぐ為にも、今後は遺伝子の発現調節の面でこれに代わるプロモーターが必要かもしれない。遺伝子組換え作物が社会的に認知され、除草剤耐性を付加した作物が品種となって生産されるのは、時間がかかるかもしれない。しかしながら、少なくとも本来人間にとって不必要な遺伝子の発現は極力おさえ込むような形で形質転換技術を確立する必要がある（例えば形質転換したあとの細胞選抜に用いるカナマイシン耐性等）。そうしなければたとえ安全性が動物テスト等で確認されたとしても消費者の理解は得られにくいのではないだろうか。形質転換技術は基礎技術が確立したばかりであり、今後各種の応用に向けての技術開発が急速に進むと思われる。最後に、本稿をとりまとめるに際し、斉藤博子さんの多くの協力に感謝する。

引用文献

- 1) T. A. G. (1989) 78 : 529-530.
- 2) Guruciferae News Letter (1985) 10 : 90-91.
- 3) M. G. G. (1988) 214 : 358-360.
- 4) M. G. G. (1988) 211 : 357-363.

- 5) T. A. G. (1989) 78: 265-270.
- 6) Maize Genetic Cooperation News Letter (1989) 63: 31-33.
- 7) T. A. G. (1987) 73: 809-814.
- 8) M. G. G. (1988) 211: 197-201.
- 9) T. A. G. (1989-1) 78: 271-279.
- 10) T. A. G. (1989-2) 78: 445-455.
- 11) Plant Science (1988) 58: 51-58.
- 12) Plant cell Tissue and Organ Culture (1988) 12: 189-192.
- 13) M. G. G. (1990) 222: 135-139.
- 14) T. A. G. (1986) 71: 716-723.
- 15) T. A. G. (1987) 73: 357-363.
- 16) EMBO Jornal (1987) 6: 2513-2518.
- 17) Biotechnology (1989) 7: 61-64.
- 18) T. A. G. (1990) 79: 625-635.
- 19) Plant cell (1990) 2: 603-618.
- 20) Science (1986) 233: 478-481.
- 21) Plant cell Reports (1988) 7: 281-284.
- 22) M. G. G. (1988) 211: 266-271.
- 23) Plant cell Reports (1989) 8: 445-449.
- 24) Plant Molecular Biology (1989) 13: 533-540.
- 25) Biotechnology (1989) 7: 811-816.
- 26) Science (1988) 242: 419-422.
- 27) Plant Science (1991) 73: 167-174.

Hoechst

**速くて、
しっかり**

**ダブル
W効果の除草剤**

- 速く効く、長く効くバスタ
- 人、作物、土、環境に優しいバスタ
- なんでも枯らすバスタ ●使いやすいバスタ

バスタ[®]液剤

®・ドイツ・ヘキスト社の登録商標

バスタ普及会 石原産業／日本農薬／日産化学

〈事務局〉ヘキストジャパン株式会社 〒107 東京都港区赤坂8-10-16 ☎03(3479)4382

新刊 山野草・樹木生態図鑑

シダ類・裸子植物・被子植物(離弁花)編 監修/沼田 真
編者/浅野貞夫・栗原義晴

B5判・664頁・オールカラー・定価25,000円(本体24,272円)

北海道から沖縄まで日本列島に生育するシダ植物、山野草、雑草、帰化植物、樹木について、カラー写真 2,655点、図版 830点をつかい、生活型、個々の種の特徴や類似植物との区別点などを追究

姉妹編 沼田真・吉沢長人／編集

日本原色雑草図鑑

B5判／414頁(カラー1,020点)

定価10,094円(本体9,800円)

全国農村教育協会

東京都台東区台東1-26-6(植調会館)

〒110 TEL.03-3833-1821(代)