

ジベレリン生合成制御によるわい化レタスの作出

花き研究所生理遺伝部開花生理研究室 仁 木 智 哉

1. はじめに

ジベレリン (GA) は、植物の茎伸長、休眠、花芽形成、種子発芽等、農業生産上重要な生理現象を制御している植物ホルモンの一つである。GAは微生物の生産するイネ馬鹿苗病の原因物質として、GA₃が最初に同定されたものであるが、その後、高等植物にも内在していることが証明された。現在では植物成長調節剤の一つとして、種なしブドウの生産、草丈・開花調節といった用途に広く普及している¹⁾。市販されているGAはGA₃であるが、これまでに植物および微生物より同定されたGAは126種類にもものぼる。ところが、これほどまでに多く同定されているGAのうち、実際に生理活性のある活性型GAとしてはGA₁、GA₂、GA₄、GA₇といったほんの数種類だけであり、大多数を占めるその他のGAは生理活性を示さない不活性型である。これらのGAがどのような意味を持っているかについては未だに明らかにされていない。逆に、主にわい化や開花調節などに用いられているウニコナゾール (UCZ)、プロヘキサジオンカルシウム塩 (PCa)、トリネキサバックエチル (TNE) 等の植物成長調節剤は主にGA生合成阻害剤であり²⁻⁸⁾、植物の活性型GAの量を減らすことにより生育調節を可能にしている。

一方、今日の分子生物学やゲノム研究の急速な発展により、動植物の様々な遺伝子とその機

能が明らかになってきた。また、それらの遺伝子を用いた植物の遺伝子組み換えにより、新たな形質を持った植物が開発されており、新たな形質を付与した植物の作出に遺伝子組み換え技術が有効な手段の一つであるということが実証されている。すでにアメリカでは市販品として対虫性トウモロコシ、除草剤耐性大豆などがあり、日本でも花き植物で青色カーネーションが発売されている。我々の研究所でも、アントシアニン合成酵素遺伝子の導入により、花色を改変したトレニアの作出等が行われている⁹⁻¹⁰⁾。まだ研究段階ではあるが、植物の生育調節技術の一例として、GA生合成遺伝子の利用の研究も行われている。

そこでここでは、遺伝子組み換え技術を利用した植物の生育調節について、花き研究所開花生理研究室で実施した、カボチャのGA生合成遺伝子を利用したGA生合成制御とわい化レタスの作出に関する研究成果を中心に紹介したい。

2. 高等植物におけるGA生合成経路とカボチャのGA 20-oxidase遺伝子

植物においては、GAは内生物質として植物体内で複雑な生合成経路を経て作られる。GA生合成に関わる酵素はすでに明らかにされており、また近年の植物ゲノム研究の急速な発展により、これらの酵素をコードしている遺伝子も数多く

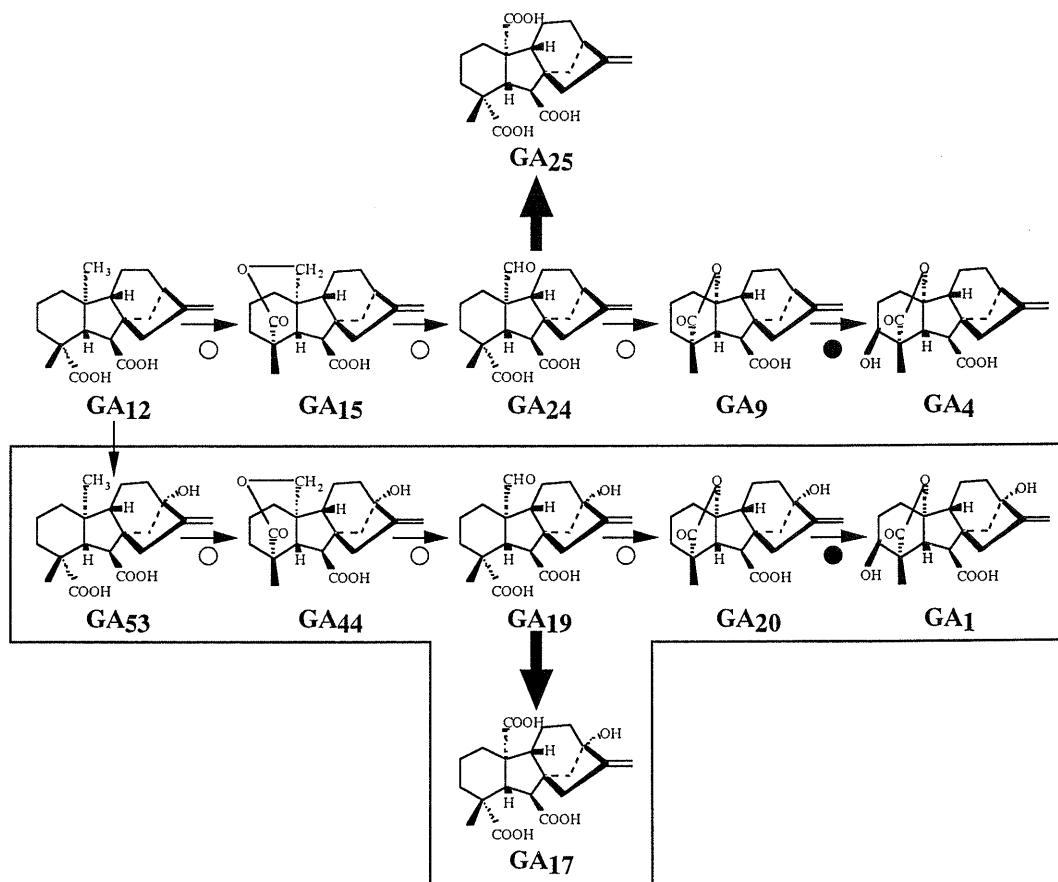


図-1 GA 生成経路のうち GA 20-oxidase (○) と GA 3β-hydroxylase (●) が触媒する反応
 □ で囲んだ部分はレタスで主に働いていると考えられる早期13位水酸化経路
 → はカボチャの GA 20-oxidase が触媒する反応

クローニングされており、これらの遺伝子は様々な形で発現調節が行われている¹¹⁾。GA 20-oxidase (ジベレリン20位酸化酵素) 遺伝子もこれらの研究の中で発見されたものの一つであり、植物の生育段階、光、内生GAの量などで発現が調節されることが知られているなど、GA 生成経路を調節する上でキーポイントの一つであると考えられている¹²⁻¹⁷⁾。図-1に示すように、植物ではGA 20-oxidaseが働く生成経路には主に2経路あり、GA₅₃から始まり活性型GAとしてGA₁が合成される早期13位水酸化経路と、GA₁₂から始まり活性型GAとしてGA₄が合成される13位非水酸化経路が存在することが示されている。

通常のGA 20-oxidaseはGA₅₃からGA₂₀あるいはGA₁₂からGA₉の3ステップの酸化反応を連続的に触媒し、次のGA 3β-hydroxylaseによる活性型GA (GA₁, GA₄) 生合成のための最終的な基質を作り出す酵素である¹¹⁾。モデル植物として植物ゲノム研究の最先端をいくシロイヌナズナでは、クローニングした内生のGA 20-oxidase遺伝子を、遺伝子組み換えによる形質転換によりシロイヌナズナ自身で過剰発現するように導入することにより、内生の活性型GAの量を増加させ、草丈の高いシロイヌナズナを作り出すといった研究も行われている¹⁸⁻¹⁹⁾。

しかしながら、これまでに単離されているGA

20-oxidaseのうち、カボチャ未熟種子より単離された酵素だけは触媒活性が異なり、GA生成経路を不活性型GA生成方向へと変化させる特徴を持っている²⁰⁾ (図-1)。カボチャにおいては主に13位非水酸化経路が働いていると考えられているが、この酵素が働くことにより連続的な3ステップの酸化反応の最後のステップで脱線が起き、 GA_{24} から GA_{25} が合成されてしまい、最終的な基質である GA_9 が合成されず、結果的に活性型GA (GA_1) が合成されなくなってしまうのである。このカボチャのGA 20-oxidaseは早期13位水酸化経路でも働くことが示されていて、13位非水酸化経路と同様最後のステップ脱線が起き、 GA_{19} から GA_{17} が合成される²⁰⁾。生合成経路の後半が主に早期13位水酸化経路であるか13位非水酸化経路であるかは植物の種類によって異なるが、単離した酵素ではどちらの経路でも働き得ることから、このような特異的な性質を持った酵素をコードしている遺伝子を応用できれば、植物の内生GAのレベルを調節でき、植物の生育・開花調節が可能になるものと考えられる。

そこで、植物の生育特性の改変を目的とし

て、カボチャのGA 20-oxidase遺伝子を、植物体内で過剰発現させるようなプロモーターの下流に接続し、アグロバクテリウムを介してレタスに導入した。導入遺伝子と共存させた薬剤マーカーを用いて選抜を行い、形態異常を伴わずにわい化した1系統の形質転換体 (SGΩ-4) を選抜した。導入遺伝子に由来するカボチャのGA 20-oxidaseの特異的な性質からすると、このわい化植物は遺伝子組み換え技術を用いた内生GAの調節と植物の生育調節のモデルとして利用

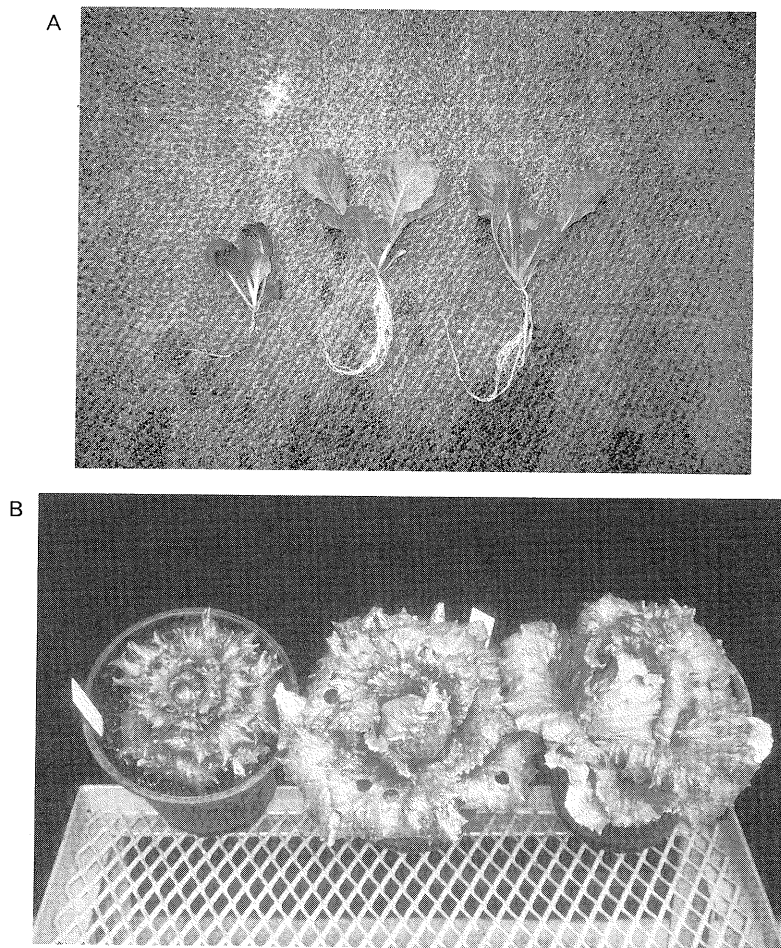


写真-1 形質転換レタス (SGΩ-4) の形態的特徴

A: 播種後3週間目の幼苗 (左より、形質転換体わい化個体、形質転換体正常個体、非形質転換体)

B: 成熟した植物体 (左より、形質転換体わい化個体、形質転換体正常個体、非形質転換体)

できる可能性が高いことから、SGΩ-4の自殖第2 (R₂) 世代の植物を用い、導入したカボチャのGA20-oxidase遺伝子の過剰発現が内生GAの生合成および植物の生育に及ぼす影響について研究を行ったものである²¹⁾。

3. カボチャのGA 20-oxidase遺伝子を導入したわい化レタスの形態的特徴

写真-1A, -1Bおよび表-1に形質転換体の形態的特徴を示した。幼苗の段階では、非形質転換体に比べ、わい化個体では胚軸長、節間長とも50%程度以上短くなっていた。地上部だけでなく、地下部の根においても主根は細い代わりに、側根の数が多いといった特徴が見られた(写真-1A, 表-1)。成熟個体においては、結球する特徴は維持しているものの、葉長は短く、葉の幅も狭くなっていた(写真-1B)。さらに、わい化個体では花茎が短く、花序が少なっただけでなく、開花期も2週間ほど遅くなった。しかしながら、形質転換体の正常個体では非形質転換体とほとんど違いは見られなかった。

これらの生育特性の変化が内生の活性型GA量の変化に依存的であるかを調べるために、非形質転換体をGA生合成阻害剤の一つであるユニコナゾール (UCZ) を培養土に添加して生育させてみたところ、葉長は短くなり、葉の幅も狭いといった形質転換体のわい化個体と同様の特徴を持った植物となり、その度合いはUCZの濃度依存的であった(写真-2)。この結果は、わい化個体では活性型GAの量が著しく減少してい

表-1 形質転換レタス (SGΩ-4) と非形質転換体の形態的特徴の比較

表現型	供試した植物体の数	分離比	胚軸長	節間長	葉長
SGΩ-4 植物				cm	
わい化個体	67	3	0.99±0.30	0.10±0.01	6.66±1.41
正常個体	24	1	2.72±0.31	0.32±0.05	12.88±1.50
非形質と転換体	24		2.44±0.61	2.44±0.03	11.37±2.12

胚軸長は播種後2週間後に測定
節間長と葉長は播種後1ヶ月後に測定
節間長は第1～第4節間長の平均値

ることを示唆している。

導入遺伝子の遺伝的な特徴については、形質転換体のわい化個体と正常個体の分離比が3:1であったことから、導入遺伝子が優性であり、また安定的に遺伝していることがわかる(表-1)。

4. わい化レタスにおける導入遺伝子の発現と内生GA生合成の変化

上に述べたような生育特性の変化が、導入遺伝子の過剰発現によるものかどうかを確認するために、導入遺伝子の発現産物の解析を行ったところ、わい化個体のみに強い発現産物のシグナルが見られ、正常個体および非形質転換体には発現産物は見られなかった(図-2)。このことから、わい化個体において導入遺伝子由来のGA 20-oxidaseが十分量存在していることが予想できる。

わい化個体の内生GAの生合成については、レタスが本来持っている活性型GAを生合成する方向に働くGA 20-oxidaseと不活性型GAを生合成してしまう導入遺伝子由来のGA 20-oxidaseが同じ基質を競合することになるが、導入遺伝子由来の酵素の方が過剰に存在するため、圧倒的に不活性型GAの生合成に傾いているはずである。そこで、非形質転換体およびわい化個体の内生GAを同定した。表-2に示すように、レタスでは一連のGAの存在量から活性型GAとしてGA₁

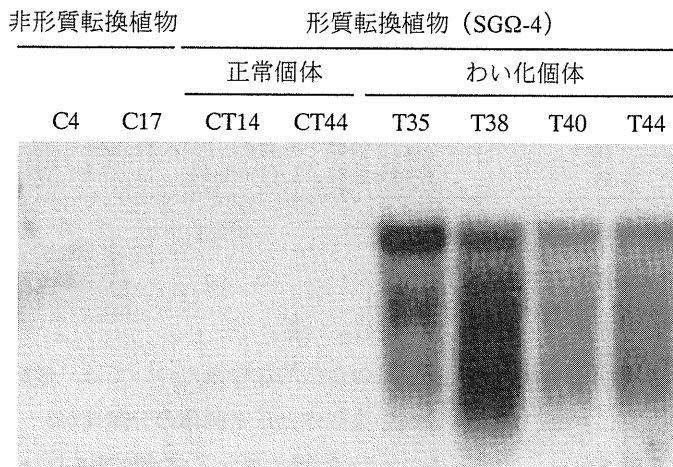


図-2 形質転換体 (SGΩ-4) と非形質転換体における導入遺伝子の発現産物の解析

であるGA₂₅が大量に蓄積していた。このことは、導入した遺伝子由来のカボチャのGA 20-oxidaseが、レタスの中で予想された機能を果たしていることを裏付けるばかりでなく、写真-2に示したように、GA合成阻害剤を処理し、内生の活性型GA量を減少させた非形質転換体が、わい化個体と同様の形態的特徴になったという結果と非常によく一致

を合成する早期13位水酸化経路が主要経路であると考えられるが、その中で活性型GA (GA₁) が大幅に減少していることがわかる。また、これらの前駆体であるGA₁₉, GA₂₀についても活性型GA同様、大幅に減少していた。これに対し、不活性型GAであるGA₁₇は非形質転換体ではほとんど検出されないのに対し、わい化個体では大量に蓄積していた。この傾向はレタスではマイナーな経路である13位非水酸化経路でも同様に、活性型GAであるGA₄およびその前駆体 (GA₂₄) が減少し、不活性型GAであり非形質転換体では検出限界以下

している。

これらの結果から、形質転換レタスのわい化形質は、カボチャのGA-20-oxidase遺伝子の過剰発現により、GAの生合成経路が変化し、前駆体の多くが不活性型GAに変換されてしまい、活



写真-2 ユニコナゾール (UCNZ) 処理した非形質転換レタスの形態変化 (左より、未処理の形質転換体わい化個体、未処理の非形質転換体、UCNZ処理 (0.001%および0.01%) した非形質転換体)

表-2 形質転換レタス (SGΩ-4) わい化個体と非形質転換体の内生GA量の比較

表現型	早期13位水酸化経路のGA				13位非水酸化経路のGA			
	GA ₁₉	GA ₂₀	GA ₁	GA ₁₇	GA ₂₄	GA ₉	GA ₄	GA ₂₅
SGΩ-4 植物	pg g ⁻¹ fresh weight							
わい化個体	87.2±10.0	14.3±7.1	30.9±4.1	11878.0±718.0	ND	ND	ND	36.0±10.4
非形質転換体	175.0±34.0	207.0±26.0	177.0±35.0	230.0±54.0	1.9±1.8	ND	7.7±7.2	ND

ND : 検出限界以下

性型GAがほとんど生合成できなくなったことにより引き起こされていることが明らかになった。また、カボチャのGA 20-oxidase遺伝子が、遺伝子組み換えにより他の植物においても発現させることができ、カボチャ本来の経路ではない早期13位水酸化経路の植物の中でも本来の性質を損なわずに機能していることも証明されたことから、この遺伝子がわい化植物の作出に広く利用でき得ることが期待できる。

5. 終わりに

これまで植物ホルモンについては、生育調節剤として、また植物ホルモンの合成阻害剤等を用いて外から植物体に処理する手法がほとんどであった。今回紹介したケースは、遺伝子組み換えにより植物ホルモンの生合成に関わる遺伝子の特異的な性質を応用し、植物内部からホルモンの生合成経路を変化させて生育調節を図るという新たな手法である。今までのところ、カボチャのGA 20-oxidase遺伝子を用いた形質転換植物の作出は、モデル植物としてのシロイヌナズナおよびナス科のSolanumで行われており、不完全ながらわい化することが示されているが²²⁻²³⁾、この手法を園芸植物で実証し、完全なわい化植物の作出に成功したことは大変意義の深いものであると考えている。ただし、食品としての遺伝子組換え作物については、GM (遺伝子組み換え) 食品として、安全性等について多くの議論されている現在では、この手法を花き植物に応用すべく、トレニアを用いて研究を行っており²⁴⁾、このような遺伝子の特異的な性質が広く植物の生育・開花調節に利用できるようになればと考えている。

参考文献

- 1) 奇跡の植物ホルモン (1980) 協和発酵工業株式会社
- 2) Izumi, K et al. (1985) Plant Cell Physiol. 26: 821-827
- 3) Griggs, D. L. et al. (1991) Phytochemistry 30: 2513-2517
- 4) Nakayama, I. et al. (1990a) Plant Cell Physiol. 31: 195-200
- 5) Nakayama, I. et al. (1990b) Plant Cell Physiol. 31: 1183-1190
- 6) Adams, R. et al. (1992) In: Karssen C.M. et al. (Eds), Progress in Plant Growth Regulation. Kluwer, Dordrecht, pp818-827
- 7) Junttila, O. et al. (1997) Aust. J. Plant Physiol. 24: 359-369
- 8) Hisamatsu, T. et al. (2000) Physiol. Plant. 109: 97-105
- 9) Aida, R. et al. (1998) Plant Science 138: 91-101
- 10) Aida, R. et al. (2000) Plant Science 153: 33-42
- 11) Hedden, P. and Kamiya, Y. (1997) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 431-460
- 12) Lange, T. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8552-8556
- 13) Phillips, A. L. et al. (1995) Plant Physiol. 108: 1049-1057
- 14) Wu, K. et al. (1996) Plant Physiol. 110: 547-554
- 15) Garcia-Martinez, J. L. et al. (1997) Plant Mol. Biol. 33: 1073-1084
- 16) Xu, Y-L. et al. (1997) Plant Physiol. 114: 1471-1476
- 17) Martin, D. N. et al. (1996) Planta 200:

- 159-166
18) Coles, J.P. et al. (1999) Plant J. 17: 547-556
19) Huang, S. et al. (1998) Plant Physiol. 118: 773-781
20) Lange, T. (1998) Planta 204: 409-419
21) Niki, T. et al. (2001) Plant Physiol.
- 126: 965-972
22) Xu, Y-L. et al. (1999) Plant Cell 11: 927-935
23) Curtis, I. S. et al. (2000) Plant J. 23: 329-338
24) 仁木ら (2000) 園学雑69 (別冊2) : 209

お知らせ

第16回報農会シンポジウム

『植物保護ハイビジョン — 2001』のご案内

— 植物保護における新世紀の方向性 —

趣 旨：我が国における植物防疫の発展を推進するため、植物防疫の学術・技術の研究、交流および普及を図る一環として、このシンポジウムを開催する。

主 催：財団法人 報 農 会

日 時：平成13年9月28日（金）10：00～17：00

場 所：「北とぴあ」つつじホール（東京都北区王子1-11-1）

TEL 03-5390-1100（会場への連絡は出来ません）

JR京浜東北線・地下鉄南北線：王子駅下車、徒歩2分

講 演：10：10～11：10 臭化メチルの現状と代替技術

社団法人 日本くん蒸技術協会

楯 谷 昭 夫

11：15～12：15 アジアを中心とした稲作と雑草防除の動向

クミアイ化学工業株式会社

近 藤 和 信

13：30～14：30 訪花昆虫と拮抗微生物の利用技術

岐阜県農業技術研究所

田 口 義 広

14：35～15：35 新技術による農業経営

福島県実践農家

小 川 光

15：45～16：45 総合討論

17：00～19：00 功労者表彰式および祝賀会

なお、参加申込み・問い合わせは下記まで

財団法人 報 農 会

事務局 中村 廣 明, 関 口 義 兼

〒187-0011 東京都小平市鈴木町2-772 植物防疫資料館内

TEL/FAX 042-381-5455