

「形質転換」とは外来遺伝子の導入により遺伝的形質が変わることである。今や植物科学の種々の領域でルーティンとなっている研究手法であり、応用的にも広く行われている。筆者はこの手法の初期段階に関わったので、それぞれのエピソードには特別な感慨を持っているとともに、いくつか発表できなかった事柄を抱えてきた。その中で発表できなかったことを最近発表することができたので、それも含めてここに紹介したい。なお、形質転換にはいくつかのカテゴリーがあるが、ここでは根頭癌腫菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) の感染による植物の形質転換に限る。

クラウンゴール

クラウンゴール (図-1) は *A. tumefaciens* の感染により誘導される植物腫瘍であり、その因果関係の発見は1905年に遡る。細菌がいなくなってもその腫瘍的性質は維持され、転移性が示されることから典型的な腫瘍とみなされている。このことから、ごく初期から形質転換であると推定され、その証

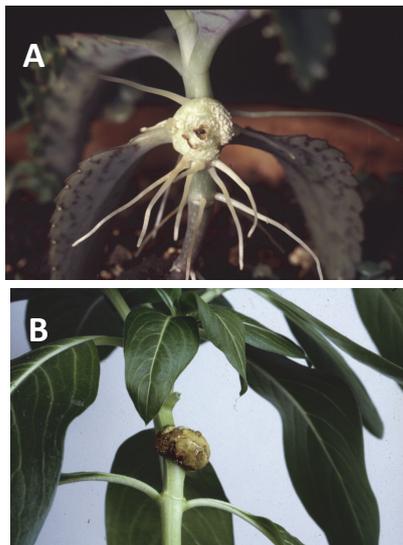


図-1 クラウンゴール

A. tumefaciens をカラコエ (*Kalanchoe daigremontiana*) (A)、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) (B) に接種して形成されたクラウンゴール。

明に数多の試みがなされたがそれは一向に明らかにならなかった。成立した腫瘍的性質の維持が植物ホルモン オークシン、サイトカイニンの非自律的生産にあり、条件により部分的形態形成が起こることは明らかになっていた (Braun 1977)。

Ti プラスミド

長かったその原因究明が混迷を脱したのは、1974年にベルギー ゲント大学のシェル (J. Schell), ファン モンタギュ (M. Van Montagu) らが *A. tumefaciens* に見出された Ti プラスミドと名付けられた巨大プラスミドと細菌の腫瘍誘導能が対応していることを明らかにしたときである (Larebeke *et al.* 1974)。これが筆者にとって特に印象が強いのは、筆者の最初の科学研究費の申請テーマが関連のものであり採択されることとなったが、フンボルト財団フェローとして渡独のため受けることができなかったからである。ただし、彼らの報告は Ti プラスミドの存在と腫瘍誘導能とが平行関係にあることであったので、クラウンゴール細胞に Ti プラスミドが存在しているかどうかの証明が次の課題であり、それは DNA の存在の有無を示すことであった。それは1977年にハイブリダイゼーションにより明らかにされたが (Chilton *et al.* 1977), 筆者はそれを同グループのゴードン (M.P. Gordon) 教授よりのクリスマスカードで知らされた。Ti プラスミドは丸ごとではなく、そのおよそ10-20%が植物細胞に組み込まれており、それは T-DNA (Transferred DNA) と名付けられた。なお、T-DNA の両端には25bpの特異な配列があり、それが形質転換に必要であった。

次は、T-DNA がいかにして Ti プラスミドから切り出され、どのような機構で植物細胞へ移行し、核へ入り宿主 DNA に組み込まれるかの機構である。それは T3 あるいは T7 トランスポゾンと Lac オペロンを組み合わせたプラスミドを *A. tumefaciens* へ導入し、Ti プラスミドのさまざまな箇所へ挿入して、機能発現を見ることで達成された。導入部位の腫瘍誘導能および Lac の発現を調べることで腫瘍誘導に

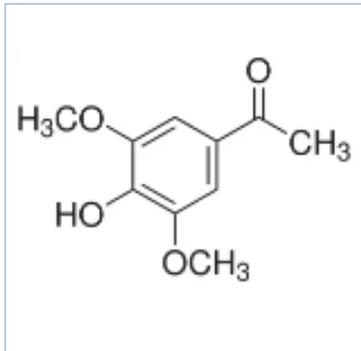


図-2 アセトシリンゴン

関する部位が同定されたが、それらは T-DNA 領域と独立で *Vir*(Virulence) 領域と名付けられたかなり大きな領域であり、そこに複数の遺伝子が存在していた。その実験遂行の際、反応をしらべるのに植物細胞が必要であったが、その役割を果たしたのが筆者の開発したタバコ BY-2 細胞の培養系であった。入手ソースの事情で長いこと明らかにすることができなかったが、その概要を最近発表することができた (Nagata 2023)。その結果明らかになったことは、T-DNA のシングルストランドが切り出され、*Vir* の産物の一つにより保護されて植物細胞へ移行し、核へ取り込まれ植物 DNA に組み込まれた。この結果については、多くの概説書に述べられているので (例えば長田 1993) ここでは繰り返さないが、微生物学、分子生物学、植物科学の知見が相まって進展したことが特に印象深い。

その次は、*Vir* 遺伝子群が発現誘導される機構であるが、そこにもタバコ BY-2 細胞が用いられた。それは論文にははっきりとは書かれていず、しかも、驚くべき出来事が伴っていた。その主導者ステイシャル (S. Stachel) はアメリカシアトルのワシントン大学でその誘導物質の見当をつけていたが、その事実を持って対立するゲント大学グループへ移ってその物質の同定を Nature 誌に発表した (Stachel et al. 1985)。それは植物細胞の生産するフェノール性物質の

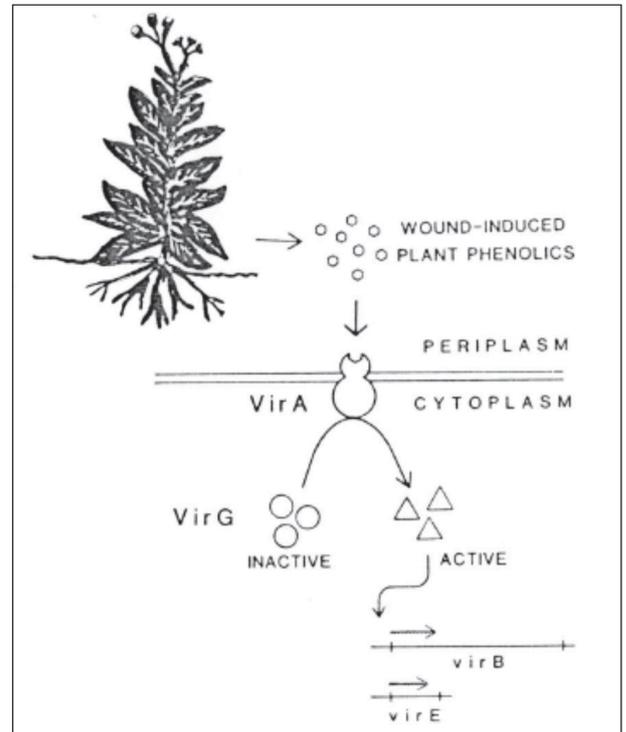


図-3 形質転換模式図

植物起源のフェノール性物質により *A. tumefaciens* の *VirG* が活性化され、その結果 *VirE* 以下が作動し、T-DNA の切り出しから、植物細胞への移行に移る (長田 1983 より)。

アセトシリンゴン (図-2) であった。そして、やや明確さは欠くが同様な内容は数か月後に Science 誌にシアトルグループから発表された (Bolton et al. 1986)。この顛末は上記ゴードン教授から筆者に私信として知らされたが、同教授は既に故人であるので、その事情は明らかにする必要があらうということで、筆者によって最近発表されることとなった (Nagata 2023)。この過程を示す要点は図-3 にまとめた。

遺伝子導入ベクターとして

その結果確立されたことは、形質転換の三条件は、1) T-DNA 両端の 25bp の配列、2) *Vir* 領域の存在、3) *A. tumefaciens* に存在する植物細胞への接着因子であった。重要なことは、機能発現に際して T-DNA と *Vir* 領域が同一の Ti プラスミドに載っている必要がないことで、そこから遺伝子導入のためのシステムが構築された。その一つは、T-DNA のみを持ったプラスミドで、そこに導入したい遺伝子を挿入し、適当な選抜マーカーを付けそれを T-DNA を欠いた例えば *A. tumefaciens* の LBA4404 株に導入することで達成される。これについては多くの実験方法集に載せられているので詳細を述べることは省くが、初期に達成された外来遺伝子が導入され、発現した例を示す (図-4)。そして、これらの背景の人間の活動のストーリーは、比較的最近一冊の本として



図-4 初期の形質転換体

左は形態的に野生型タバコであるが、Tiプラスミドにより導入された外来遺伝子が発現している。右は、T-DNA上に植物ホルモン産生遺伝子が発現しているため、腫瘍を生じる。中は植物ホルモン産生遺伝子が少なくなっているため、腫瘍のサイズは小さくなっている。マックスプランク育種学研究所シエル教授の厚意による。

纏められているので (Heimann 2018), 興味のある方はそちらを参照されたい。

その結果もたらされた二つの例を紹介する。除草剤グリホサートはその標的は芳香族アミノ酸合成経路の一ステップであるので、これを投与するとそれらの植物は芳香族アミノ酸が作られないので枯死することになる。ところが、ここにバクテリア起源の遺伝子 EPSPS を導入するとその植物はグリホサート耐性となるので、芳香族アミノ酸合成が可能となる。その結果、導入された植物のみ生存でき、他の雑草は全て枯死させてしまう。この手法はアメリカの主要作物ダイズなどに導入されてアメリカ大陸では広範に使用され、その産物は輸入されていることは広く知られている。これら植物はいわゆる GMO であるので、日本では栽培されていない。また他の例はトマトで、エチレン生合成のキイ遺伝子である ACC 合成酵素を抑制させたフレーバーセイバー (Flavor Savr) であり、市場に登場している。これはエチレンに被爆されない限り成熟に到らないので市場に出され、一時的にアメリカでは大きな話題となったが、現在では沈静化している。

なお、この *A. tumefaciens* が植物に感染して原核生物の遺伝子を真核生物に導入して遺伝子の改変を行い、ある種植物では自然界である種植物の進化に影響を及ぼしていることは

系統樹の枝の間での遺伝子の影響があるということで、水平遺伝子移動として注目されている。

今回の稿のまとめとしては、植物腫瘍の原因となる Ti プラスミドが植物遺伝子を変更させるわけで、これにより植物遺伝子の変更が可能となり、GMO 植物が可能となった。GMO 植物の受容に関しては国により、さまざまであるが、日本では受け入れられていない。この点導入された遺伝子の置換に基づくゲノム編集が社会に容認されていることはお耳にされてと思うので、ここでは触れない。

引用文献

- Bolton, G.W. *et al.* 1986. *Science* 282, 983-987.
 Braun, A.C. 1977. *The story of cancer*, Adison Wesley Pub. Co.
 Chilton, M.-D. *et al.* 1977. *Cell* 11, 263-271.
 Heimann, J.M. 2018. *Using nature's shuttle: the making of the first genetically modified plants and the people who did it*. Wageningen Acad. Press.
 長田敏行 1993. *植物プロトプラストの細胞工学*. 講談社サイエンティフィック.
 Larebeke, N. V. *et al.* 1974. *Nature* 252, 169-170.
 Nagata, T. 2023. *J. Plant Res.* 136, 781-786.
 Stachel, S. *et al.* 1985. *Nature* 318, 624-629..