

芝草への Bt 遺伝子導入技術の開発

千葉県農業試験場 ^{ふじいえ} 藤家 ^{あずさ} 梓・伊東 ^{いとう} 靖之・深見 ^{やすゆき} 正信 ^{ふかみ まきのぶ}

はじめに

害虫の防除方法を多様化し、化学農薬の使用量を減らしていこうという試みは古くからあり、防除理論「総合防除」あるいは「総合的害虫管理」の根底にもなっている考え方である(藤家, 1985)。化学農薬に依存したいわゆる化学的防除技術にかわる防除法として、生物的・物理的・生態的防除技術に関連した技術開発も盛んに行われており、最近では生物農薬も次々に実用化されている。また、これらの防除技術の基盤となる害虫対策として、害虫抵抗性品種の育種にも大きな期待がよせられている。近年、DNA の組換え技術の進展に伴い、多くの害虫抵抗性トランスジェニック作物が作出されている。それらの多くには、土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* の殺虫タンパク遺伝子 (Bt 遺伝子) が導入されている (BARTON et al., 1987; FISCHOFF et al., 1987; VAECK et al., 1987; DELANNAY et al., 1989; PERLAK et al., 1990; FUJIMOTO et al., 1993)。

一方、芝草に対する実用遺伝子の導入例としては、トールフェスク (WANG et al., 1992)、ペントグラス (HARTMAN et al., 1994) およびレッドフェスク (SPANGENBERG et al., 1994) への微生物系除草剤抵抗性遺伝子 (bar 遺伝子) の導入が報告されているだけである。千葉県農業試験場では化学農薬に依存しない芝草管理技術の開発をめざしてプロジェクト研究を実施しているが、その一環として Bt 遺伝子導入による害虫抵抗性芝草の育成を試みている。現在、鱗翅目害虫に対する抵抗性芝草の育成を目指した技術開発を実施中であるが、ペントグラスの細胞培養系を確立し、Bt 遺伝子の導入に成功した(伊東ら, 1995)。そこで、これまでの研究経過についてその概要を報告する。なお、芝草のバイオテクノロジー育種の全般については、浅野 (1995) の総説を参照されたい。

本技術開発の実施に当たっては、千葉大学園芸学部の浅野義人助教授から研究全般にわたってご指導いただいた。また、北海道大学農学部の高塚敏彦教授からは Bt 遺伝子をご恵与いただいた。さらに、(株)ジャパン ターフ

グラスには共同研究を通して協力いただき、農林水産省農業研究センター、農業生物資源研究所からは遺伝子の構築や導入に関してご指導いただいた。

I ペントグラスの細胞培養系の確立

1 カルスの誘導と培養

遺伝子導入法として、PEG 法、ポリカチオン法、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等が知られているが、本プロジェクトではエレクトロポレーション法を用いることにした。

この方法では、遺伝子を導入したプロトプラストを植物体にするための安定した培養系を必要とする。そこで、ペントグラス *Agrostis palustris* (品種: ペンクロス) の完熟種子を MS 培地 (5 mg/l 2,4-D, 3% シュークロース, 0.8% 寒天添加, pH 5.8) に置床することにより、カルスを誘導した。しかし、再分化能の高いカルスは数%しか出現しなかったため、カルス誘導培地に 1 mg/l BA (ベンジルアデニン) あるいは 1.15 g/l L-プロリンをさらに加えた。BA の添加効果は高く、植物体 (アルビノを除いた緑色個体) の再生率は 55.9% と対照の 10 倍にも高まった (表-1)。

再分化能の高いカルスを N 6 AA 液体培地 (2 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BA, 3% シュークロース, 3% ソルビトール添加, pH 5.8) に移し、増殖率の高い培養系を選抜しながら継代した。しかし、再分化能の高い培養系は増殖率が低く、プロトプラストの単離も難しかった。培養過程で裏ごし操作 (農業生物資源研究所大槻義昭博士のご教示による) を加えながら増殖率を高め、6 か月にわたって選抜・継代した結果、プロトプラストの単離可能な数系統の培養系を得ることができた。増殖率およびプロトプラスト収量と再分化能は裏腹の関係にあり、前者が上昇するに従い後者は低下傾向を示した。しかし、この点に関しても培地に BA を添加することにより再分化能を改善することができた。

2 プロトプラストの単離と培養

酵素処理の前処理として、培養系の継代カルスを MS 培地 (2 mg/l 2,4-D, 6% シュークロース添加) で 6 日間培養した。この前処理の効果はイネでも知られている (大槻ら, 1988) が、ペントグラスでは 6% シュークロースを 3% グルコースにかえることにより、さらに高いプロトブ

表-1 *Agrostis* 属芝草の再分化に及ぼすカルス誘導培地への BA および L-プロリンの添加効果(伊東ら, 1992)

種 名	品 種 名	カルス形成率(%)			植物体再生率(%)		
		BA	プロリン	対照	BA	プロリン	対照
<i>A. palustris</i>	ベンクロス	74	64	72	57	6	3
"	サウスショア	50	46	57	53	5	5
"	ベンリンクス	91	87	89	50	4	4
"	ナショナル	87	87	83	40	14	11
"	ペンイーグル	76	81	81	64	16	7
"	SR 1019	76	69	74	44	4	6
"	エメラルド	69	71	78	44	10	4
"	シーサイド	71	66	70	30	3	7
"	SR 1020	54	65	50	28	4	4
"	コブラ	58	64	53	61	7	2
"	バター	32	54	56	31	2	3
<i>A. tenuis</i>	ハイランド	91	92	88	62	17	8
"	アストリア	92	79	81	54	12	3
<i>A. alba</i>	レッドトップ	94	82	80	76	24	11
平 均		72.2	71.7	72.1	55.9	9.0	5.6

- 1)カルス誘導培地として MS 培地を用いた。対照区では 5 mg/l 2,4-D を添加し, BA 区ではさらに 1 mg/l BA, プロリン区ではさらに 1.15 g/l L-プロリンをそれぞれ添加した。
- 2)再分化培地として, 1/2 MS 培地(3%シュクロース, 1.6%ゲルライト, ホルモンフリー)を用いた。
- 3)植物体再生率の算出に際しては, アルビノ個体を除いた。
- 4) *Agrostis palustris* をペントグラスと呼んでいる。

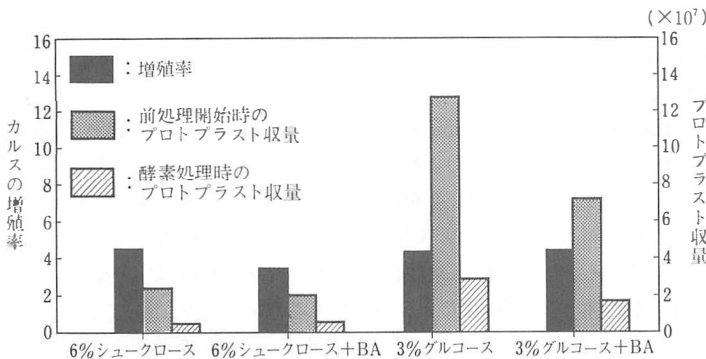


図-1 ペントグラスのプロトプラスト収量に及ぼす前処理の影響(伊東ら, 1993)
BA を 0.5 mg/l 添加した。
カルス 1g 当たりのプロトプラスト数で収量を示した。
6 日間培養し, 培養前後のカルスの重量比で増殖率を示した。

ラスト収量を得られることが明らかになった(図-1)。

プロトプラストを単離するため, 酵素液(2%セルラーゼオノズカ RS, 0.05%ペクトリアーゼ Y-23, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1%デキストラン硫酸カリ, 9%マンニトール, pH 5.6)にカルスを浸漬し, 30°C で 3~4 時間振とう(40 rpm)した。単離したプロトプラストを 5~1.0×10⁶ 個/ml に調整し, K 8 P アガロース培地(1 mg/l 2,

4-D, 0.2 mg/l BA, 10%グルコース, 1.2% Seaplaque agarose 添加)に包埋した。その後, アガロース断片を K 8 P 液体培地に移し, 培養を続けた。最初の 2 週間ナース細胞を加え, アガロース濃度を 2.4% に高めることにより, 10~20% という高いコロニー形成率を得ることができた。

プロトプラストの分裂により形成されたコロニーは, 1~2 か月で直径 1 mm 以上に生長した。植物体の再生には, 炭素源としてマルトースが有効であることが確認された(表-2)。そこで, 生長したカルスを 3%マルトースを含んだ 1/2 MS 再分化培地(1 mg/l BA, 0.8%ゲルライト, pH 5.8)に移し, 植物体を再生させた。

II エレクトロポレーション法による導入

1 ベクターの構築

抗生物質耐性遺伝子(npt II)を選抜用のマーカーとした植物発現ベクターの npt II 部分を制限酵素で切り出し, かわりに *Bacillus thuringiensis* var. *sotto* の cryIA(a) 遺伝子の殺虫活性のある部分(29-618 番目のアミノ酸をコード)をつなぎ, Bt 遺伝子のベクター pFFBT を構築した。pFFBT と npt II を持つベクターと一緒にプロトプラスト懸濁液に入れ, 同時に導入する方法(co-transformation 法)により遺伝子導入実験を行った。

2 遺伝子の導入

ペントグラスのプロトプラスト(1~2×10⁶ 個/ml)を DNA(pFFBT と npt II のベクター各 10~20 μg/ml, キャリア DNA 20~40 μg/ml)とともに緩衝液(70 mM アスパラギン酸, 5 mM グルコン酸カルシウム, 5 mM MES, 0.4 M マンニトール, pH 5.8)に懸濁した液を作った。この懸濁液を 20 ml ずつ導入実験に用いた。

遺伝子導入にはエレクトロポレーション装置(BTX

表-2 ベントグラスの植物体再生への培地中の炭素源の影響(ASANO ら, 1994 を改変)

炭素源	供試カルス数	グリーンスポットカルス数	未分化カルス数	植物体再生カルス数
シュクロース	196	82	49	65
ラクトース	196	40	7	149
マルトース	196	7	6	183

1)カルス継代培地として N 6 AA 培地(2 mg/l 2,4-D)を用いた。
2)再分化培地として, 1/2 MS 培地(1 mg/l BA)を用いた。シュクロース, ラクトース, マルトースをそれぞれ 3 %添加した。

社製 ECM-600, チャンバー：島津製作所製 FTC-54)を用いた。電気ショックを与えた後, プロトプラストの生存率を約 50%に保てるような条件を試行錯誤的に探索した。その結果, 電界強度 550 V/cm, パルス幅 38~40 ms が好適条件であると考えられた。

III 遺伝子導入処理をした細胞の培養

1 耐性コロニーの選抜

遺伝子導入処理をしたプロトプラストを培養し, 処理の 2 週間後に抗生物質で耐性コロニーを選抜した。選抜に先立ち, 抗生物質 G 418 を用いて好適な濃度を調査した。G 418 を添加することによって細胞の増殖は 10 μg/ml までは直線的に抑制され, 20 μg/ml ではほとんど増殖しなくなった。したがって, 10~20 μg/ml が選抜には好適濃度であると判断した。

遺伝子導入処理をしたプロトプラストを 5~10×10⁵ 個/ml の濃度で K 8 P アガロース培地に包埋し, K 8 P 液体培地でナース培養した。2 週間後にナース細胞を除去し, G 418 10 μg/ml を添加した N 6 AA 液体培地にコロニーをアガロース片とともに移した。さらに 2 週間後には G 418 の濃度を 20 μg/ml に高め, 以後 2 週間間隔で継代培養した。培養 5~6 週間後には肉眼で確認できるコロニーが出現した。これらは, 抗生物質に対する耐性コロニーであると判断した。

2 植物体の再生

選抜したコロニーを 1 個ずつマイクロプレートに移し, さらに培養した。植物体を再生させるため, 増殖したカルスを再分化培地 (1/2 MS, 1 mg/l BA, 3%マルトース, 0.8%ゲルライト, pH 5.8)に移した。培養中のエスケープを防ぐため, 抗生物質による選抜圧をかけ続け, 植物体を得た (図-2)。

IV 形質転換体の確認

1 導入遺伝子の検出

PCR 法と PCR 法により増幅した遺伝子を用いたサザン ハイブリダイゼーション (PCR-サザン法) によって,

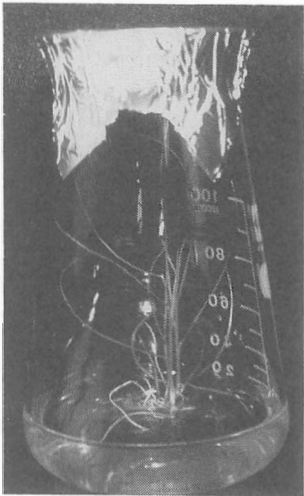


図-2 再生したベントグラスの植物体 (伊東, 原図)

導入遺伝子のベントグラスのゲノムへの組込みを確認した (図-3)。植物体の生葉 1~3 g から CTAB 法によりゲノム DNA を抽出し, プライマー (おのおの 20~25 塩基) とともに PCR 装置 (アテックス製 PC-700) で反応させた。反応条件はディネーチャー 95℃で 1 分, アニーリング 55℃で 0.5 分, エクステンション 72℃で 2 分, 30 サイクルとした。さらに, Digoxigenin 標識法を用いてサザン ハイブリダイゼーションを行った。npt II を対象としては, Dot blot assay によって酵素活性の検出も行った。その結果, *cryIA(a)*, npt II のいずれの遺伝子の導入も確認された。また, npt II では酵素活性により発現も確認された。

2 生物検定

cryIA(a) の発現を確認するため, 芝草に甚大な被害 (図-4) を及ぼすシバツトガやスジキリヨトウの幼虫を用いて生物検定を実施した。しかし, これまでのところ実用的な抵抗性を示す植物体は得られていない。

芝草での生物検定に先立ち, 大腸菌で発現させた *cryIA(a)* のタンパクを用いてスジキリヨトウ, シバツト

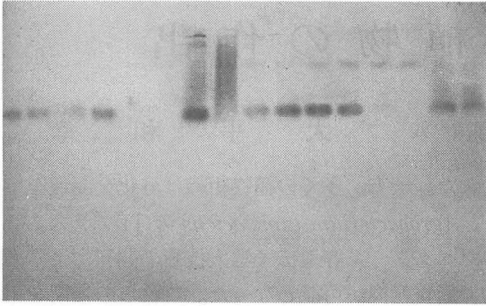


図-3 PCR-サザン法による再生したベントグラスの植物体からの Bt 遺伝子 (*cryIA(a)*) の検出 (深見, 原図)



図-4 シバツトガによるベントグラスの被害(藤家, 原図)

ガおよびカイコガを対象に生物検定を行った。*cryIA(a)* のタンパクはいずれの種にも有意な殺虫性を示した。しかし、カイコガに対する殺虫性は極めて高かったにもかかわらず、他の 2 種に対する殺虫性は比較的低かった。

B. thuringiensis var. *kurstaki* 由来の Bt 遺伝子 *cryIA(c)* は、鱗翅目害虫の幼虫に *cryIA(a)* より高い殺虫活性を示すことが期待されるので、その導入実験も行っている。また、野生型の Bt 遺伝子を直接植物体に導入した場合、その発現率は低いことが知られている(表-3)。そこで、殺虫性を高めるための遺伝子改変も試みている。

おわりに

害虫抵抗性品種の有効利用は、総合防除の基盤的な技術であると位置づけられる。あらゆる防除技術の前提として害虫抵抗性品種が用いられるべきであるが、従来の技術では品種開発は容易ではなかった。しかし、DNA 組換え技術による害虫抵抗性遺伝子の導入により、品種開発の可能性が大きく高まった。芝草管理における害虫対策においても、害虫抵抗性品種が開発されることによっ

表-3 Bt 遺伝子の発現率の比較 (PERLAK ら, 1991 を改変)

遺伝子	害虫抵抗性株率(%)	
	タバコ	トマト
<i>cryIA(b)</i> 野生型	6	26
<i>cryIA(b)</i> 部分改変	60	63
<i>cryIA(b)</i> 全面改変	55	58

1) tobacco hornworm の幼虫で検定した。

て生物的・物理的・生態的防除技術をより容易に適用することができるようになる。

しかし、問題点もある。導入用の害虫抵抗性関連の遺伝子として使えるのは、今のところ Bt 遺伝子のほかには昆虫の消化酵素の阻害物質遺伝子ぐらいしかない。Bt 遺伝子も *Bacillus thuringiensis* の系統によって殺虫活性に違いがあるだけでなく、導入する植物の種類によって発現の効率に違いがあるようである。今後これらの点に対応するため、遺伝子の改変や芝草での発現をよくするためのベクターの改良を行わなければならない。さらに、遺伝子組換え芝草を品種として実用化するには、科学技術庁や農林水産省のガイドラインにしたがった安全性評価試験や栽培試験を実施する必要がある。防除方法の多様化は総合防除の実践において不可欠である。各種の防除技術の開発が望まれるが、その基盤技術として害虫抵抗性品種の開発技術を早急に確立したいと考えている。

引用文献

- 1) ASANO, Y. et al. (1994): Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39: 101~103.
- 2) 浅野義人 (1995): 芝草研究 24: 64~76.
- 3) BARTON K. A. et al. (1987): Plant Physiol. 85: 1103~1109.
- 4) DELANNAY, X. et al. (1989): Bio/Technology 7: 61~64.
- 5) FISCHOFF D. A. et al. (1987): ibid. 5: 807~813.
- 6) 藤家 梓 (1985): 植物防疫 39: 449~454.
- 7) FUJIMOTO et al. (1993): Bio/Technology 11: 1151~1155.
- 8) HARTMAN, C. H. et al. (1994): ibid. 12: 919~923.
- 9) 伊東靖之ら (1992): 育種 42(別 2): 6~7.
- 10) ——— (1993): 芝草学会春季大会講演要旨 p. 72~73.
- 11) ——— (1995): 芝草研究 23: 128~133.
- 12) 大槻義昭ら (1988): 育種 38 (別 1): 78~79.
- 13) PERLAK, F. J. et al. (1990): Bio/Technology 8: 939~943.
- 14) PERLAK, F. J. et al. (1991): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3324~3328.
- 15) SPANGENBERG, G. et al. (1994): Plant Science 97: 83~94.
- 16) VAECK, M. et al. (1987): Nature 328: 33~37.
- 17) WANG, Z. et al. (1992): Bio/Technology 10: 691~696.