

# ウイルス抵抗性植物の作出

サントリー株式会社基礎研究所植物工学・育種グループ **おお 大 平 和 幸**

## はじめに

植物のウイルス病は、世界中で農作物に深刻な被害を与えている。しかし、ウイルスに直接作用して、ウイルス病を防除する有効な薬剤はまだ開発途上である。交配育種によりウイルス抵抗性を付与することが可能な場合もあるが、すべてのウイルスに対して抵抗性の育種母本が存在するわけではなく、また、交配育種ではウイルス抵抗性のみを付与することは不可能で、それ以外の不必要な形質も同時に導入され、さらに育種年数がかかるといった問題点があった。そこで他の有用な形質を変化させずに、ウイルス抵抗性のみを短期間に付与する方法の開発が待たれていた。

このような状況の中で、1970年代に開発された組換えDNA技術により遺伝子の単離が可能となり、RNAウイルスのcDNAを逆転写によりクローン化する技術も確

立された。一方、多くの植物組織は分化全能性を持っており、*Agrobacterium tumefaciens*のTiプラスミドを利用したベクター系等遺伝子導入技術の開発により多数の植物で形質転換が可能となった。これらの技術を組み合わせ、ウイルス由来の遺伝子を植物に導入することにより、多くの植物で様々なウイルスに対する抵抗性が付与されており、実用化に耐えるレベルのものも作出されている。

ここでは、筆者らが行ったキュウリモザイクウイルス(CMV)抵抗性サフィニアの作出を中心に、その手法についても紹介する。

## I ウイルス抵抗性植物の作出方法

ウイルス抵抗性を付与する方法は、現在までに多種多様な方法が開発されている(表-1)。そのうち、まず、ウイルス由来遺伝子を用いる方法について簡単に説明す

表-1 ウイルス抵抗性トランスジェニック植物の作出例

供与遺伝子	適用ウイルス	参考文献 <sup>a)</sup>
ウイルス由来遺伝子		
CP	TMV, CMV 等	POWELL-ABEL et al. (1988)
複製酵素	TMV, CMV 等	ANDERSON et al. (1992)
細胞間移行タンパク質	TMV 等	LAPIDOT et al. (1993)
プロテアーゼ	TVMV	MAITI et al. (1993)
サテライトRNA	CMV	HARRISON et al. (1987)
ウイルス由来遺伝子以外		
ヨウシュヤマゴボウの抗ウイルスタンパク質	PVX, PVY 等	LODGE et al. (1993)
S-アデノシルホモシステインハイドロレーズ	TMV, CMV, PVY, PVX	MASUTA et al. (1995)
GTP-結合タンパク質	TMV	SANO et al. (1994)
N 遺伝子	TMV	DINESH-KUMAR et al. (1995)
dsRNase (PacI)	TMV, CMV, PVY	小川(1994)
抗体	AMCV	TAVLADORAKI et al. (1993)
2'-3'oligoadenylate synthase	PVX	TRUVE et al. (1993)

a) : 参考文献は多数な数が存在するので代表的なもののみを掲載した。

略号: TVMV: tobacco vein mottling virus; PVY: ジャガイモ Y ウイルス; PVX: ジャガイモ X ウイルス。他は本文参照。

る。

### 1 ウイルス由来の遺伝子を用いる方法

ウイルスゲノムの一部分を導入することにより、そのウイルスに対する抵抗性の植物が得られる場合が多数報告されている。この現象は病原体由来抵抗性 (pathogen-derived resistance: PDR) と呼ばれている (LOMONOSOFF, 1995)。

#### (1) 外被タンパク質 (CP) 導入によるウイルス抵抗性

PDR の最初の報告は、当時ワシントン大学の BEACHY (現 Scripps Research 研究所) らによるタバコモザイクウイルス (TMV) の CP 遺伝子導入により得られた (POWELL-ABEL et al., 1986)。それ以来、多数のウイルス CP 導入トランスジェニック植物が作られ、その普遍的有効性が証明されている (FITCHEN and BEACHY, 1993)。最初に開発された言わば古典的な方法ではあるが、ほとんど完全な抵抗性を示すことから、現在でも最も有効な方法の一つであり、サントリーで作出したウイルス抵抗性サフィニアもこの方法を採用している。

#### (2) 複製酵素遺伝子を用いる方法

ウイルスの複製酵素遺伝子の導入によっても、PDR が得られることが示されている。この場合も TMV により最初に証明された。この方法は tobra-, cucumo-, potex-, tombus- および potyviruses についても有効であることが示されている (CARR and ZAITLIN, 1993)。

#### (3) その他の遺伝子を用いる方法

ウイルスゲノムの他の部分も、ウイルス抵抗性を付与できることが示されている。そのような部分としては、potyvirus の NIa プロテアーゼ (MAITI et al., 1993)、介助遺伝子 (helper component, VARDI et al., 1993)、tobamo-, bromo-, potexviruses の細胞間移行に関与するタンパク質 (BECK et al., 1994; LAMBOT et al., 1993; MALYSHENKO et al., 1993)、tymovirus の 3'-noncoding region (ZACCOMER et al., 1993) が報告されている。サテライト RNA、弱毒ウイルスの全ゲノム導入によってもウイルス抵抗性が得られている (HARRISON et al., 1987; YAMAYA et al., 1988)。これらのことから、ウイルス遺伝子のどの部分も PDR の可能性を秘めていると考えられる (LOMONOSOFF, 1995)。

また、タンパク質の発現を伴わない RNA-mediated resistance も最近注目されている (LINDBO and DOUGHERTY, 1992)。

このように、PDR についてはウイルスゲノムの各部分または全部を用いる方法が開発されているが、現在、最も実用化に近い方法は依然として CP を用いる方法であ

る。ここでは、筆者らが 1989 年から東京大学植物病理学研究室と共同で開発したウイルス抵抗性サフィニアについて安全性試験の結果も含めて紹介する。

## II ウイルス抵抗性サフィニアの作出

サントリー株式会社、京成バラ園芸株式会社の共同開発したペチュニアの新品種サフィニアは病気に強く、開花期が長く、多数の花をつけるという特徴を持っている。しかし、CMV に感染しやすいという問題があった。CMV 抵抗性を交配育種により導入することは困難であったので、CP を利用して CMV 抵抗性サフィニアを作出することにした。純化 CMV-Y 粒子よりゲノム RNA を調製し、cDNA を常法によりクローニングした。そのうち、CP のコード領域を Ti プラスミド由来のバイナリーベクター pBI 121 の  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子と置換したプラスミド pBI 121 CMV-Y を構築した。このプラスミドを三親交雑により *A. tumefaciens* に移し、葉共存培養法によりサフィニアの一品種、パープルを形質転換した。得られたカナマイシン (300 mg/l) 抵抗性カルスから通常の組織培養の方法 (タバコと同じ方法) を用いて再分化、発根、馴化させ、完全な植物個体を得た。得られた植物体には、すべて遺伝子が導入されていることがサザン解析により確認された。そのうち、CP の発現量が最も多かったクローン MCB 2 を用いて CMV-Y に対する抵抗性を検討した。元株および MCB 2 の植物体を挿し芽により増殖し、各接種濃度について 10 個体を用いて、0.8, 4, 20 mg/l の濃度で接種試験を行った。その結果、MCB 2 は機械的な接種に対し、0.8, 4 mg/l の接種濃度ではまったく発病が認められなかった。これに対し、無処理の元株は各接種濃度において 60%~70% の感染性を示した。また、20 mg/l の高濃度接種においても元株は 100% 発病したが、組換え体は 70% のみが病徴を示した。さらに、組換え体では感染した植物個体

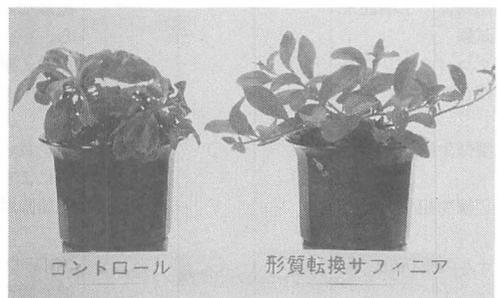


図-1 CMV 抵抗性サフィニア  
接種後 3 週間目。左が元株、右が形質転換体

においても病徴の軽減が認められた(大平ら, 1991)。これらのことから CMV-Y CP 発現サフィニアは CMV-Y に対して抵抗性であることが明らかとなった(図-1)。

### III 安全性評価

このようにして CMV 抵抗性サフィニアが得られたが、一般の植物と同様に扱うためには科学技術庁の指針に基づく閉鎖系、非閉鎖系試験、農林水産省の指針に基

表-2 組換えペチュニアの安全性評価における調査項目と結果の概要

調査項目	閉鎖系 実 験	非閉鎖 系実験	模 擬 的 環境利用	調査方法	結果の概要
1.分類学上の位置と由来				文献調査	南米大陸およびアメリカ南部原産、日本には同属の野生種はない。
2.繁殖様式					
風媒による交雑率	○	○		強制送風により、花粉の飛散性および風媒による結実性を調べた。	花粉の飛散はほとんどなく、風媒による結実は観測されない。
虫媒による交雑率		○	○	温室内での蜜蜂による交雑と隔離圃場での自然交雑を調べた。	模擬的環境利用での虫媒による結実が認められたが宿主植物との差異なし。
訪花昆虫相の調査			○	隔離圃場のペチュニアを訪花した昆虫類の観察を行った。	11種 19個体を観察。
和合性、結実性		○		人工交配による結実性や結実果実中の種子数および発芽率を調べた。	弱い自家不和合性で、宿主植物と差異なし。
花粉の稔性	○			開花当日採取した花粉をアセトカーミン染色し、稔性を調査した。約長および約幅を測定した。	宿主植物と差異なし(稔性は90%程度)。
花粉寿命の調査			○	保管した花粉の寿命を人工受粉により調査した。	宿主植物と差異なし(2日間は完存)。
種子発芽率の調査			○	結実種子の発芽率をMS平板培地上で調査した。	播種後1週間で平均95%の発芽率。宿主植物と差異なし。
3.生育状況	○	○	○	栽培を通して、生育速度、草丈、花付き等の調査を行った。	宿主植物と差異なし。
越冬性の調査			○	冬期間における植物の生育状況を観察した。	冬期間は生育できず越冬性の可能性は低い。宿主植物と差異なし。
4.有毒物質産生性					
植物体内成分		○		植物を磨砕後抽出し、高速液体クロマトグラフィーにより分析した。	宿主植物と差異なし。
揮発性成分	○			植物体を水蒸気蒸留し、エーテル抽出後の精油成分をガスクロマトグラフィーにより分析した。	宿主植物と差異なし。
根からの浸出物	○	○		水耕栽培後の栽培液をエーテル抽出し、HPLCにより分析した。また、栽培液を用いてレタスの発芽試験と生育試験を行った。	宿主植物と差異なし。栽培液はレタスの発芽・生育に影響なし。
植物体の土壌混入試験		○		乾燥した植物体を粉砕後土壌に混和し、キュウリの種の生育を観察した。	2%未満で弱い生育阻害が認められるが宿主植物と差異なし。
5.アグロバクテリウムの残存性	○			組換え植物体を磨砕し、希釈平板法によりアグロバクテリウムの検出を行った。	アグロバクテリウムの残存は認められない。
6.土壌微生物相		○	○	植物栽培土壌中の微生物相を希釈平板法により調べた。	宿主植物と差異なし。
7.周辺植物相			○	隔離圃場周辺の植物相について調査した。	ペチュニア属と交雑可能な植物はない。
8.ウイルス抵抗性	○	○	○	CMV ウイルスの接種実験を行い、病徴を観察した。	閉鎖系および非閉鎖系実験では抵抗性あり。
9.外被タンパク質検出	○			ELISA法により、葉でのCMV外被タンパク質の発現量を調べた。	組換えペチュニアからは検出。

づく隔離圃場、一般圃場栽培試験が必要とされる。そこでまず、閉鎖系実験室、非閉鎖系温室における安全性試験を行った。試験項目は表-2のとおりである。その結果、ウイルス抵抗性を除くすべての項目について元株と差は認められなかった。そこでさらに、農林水産省の農業環境技術研究所の隔離圃場において、1993年5月から1994年3月にかけて栽培試験を行った(農業環境技術研究所、農林水産先端技術産業振興センター(STAFF)、サントリー株式会社、東京大学との共同研究)。その結果、組換え植物と元株とで栽培性、越冬性、微生物相等について有意な差は認められなかった(表-2、山田・大平, 1994)。これらの結果から、安全性に問題は認められなかったため一般圃場における栽培試験を行った。一般圃場としてはサントリー研究センターの一角を用いた。その結果、栽培性には特に問題は認められなかった。

以上の結果から、ウイルス抵抗性トランスジェニックサフィニアは指針上は一般消費者に販売可能となっている。しかし、社会的受容性、特許、消費者メリットが小さいこと等の問題があり、販売には至っていない。社会的受容性については、本年秋に組換えナタネ、ダイズ、トウモロコシが輸入、販売される見通しであり、これらの組換え体が一般消費者に受け入れられれば状況が変化する可能性もありうる。

#### IV PDR以外のウイルス抵抗性トランスジェニック植物の作出方法

CPをはじめとするPDRを用いる方法は上述のように有効ではあるが、以下の点から環境に与える影響が危惧されている。すなわち、(1)導入遺伝子と感染ウイルス間でのRNA-RNA組換えによる新規ウイルスの出現、(2)導入CPによる感染ウイルスRNAのパッケージング(heteroencapsidation)による伝搬経路の変化、(3)サテライトRNAを利用した場合の、サテライトRNAの急速な拡散等の可能性、が指摘されている(TEFFER, 1993)。これに対して、ウイルス遺伝子を利用しない以下の方法はそういった不安がないため社会的には受け入れられやすいというメリットを持つ(表-1)。

##### 1 植物由来遺伝子を用いる方法

植物由来の遺伝子を用いる方法としては、ヨウシュヤマゴボウの抗ウイルスタンパク質(LODGE et al., 1993)、タバコのs-アデノシルホモシステインハイドロレース(SAHH; MASUTA et al., 1995)を発現させることにより、多種のウイルスに対する抵抗性を付与できることが報告されている。

また、イネのRas関連タンパク質であるGTP-結合タ

ンパク質(SANO et al., 1994)を過剰発現させることによりTMVに対する抵抗性が高まることが示されている。

さらに最近では、植物自体の持つ抵抗性遺伝子の利用も報告されている。DINESH-KUMAR et al. (1995)はタバコのN遺伝子をタバコSR1に導入することにより、N遺伝子を持つタバコと同様の抵抗性を示すことを示した。この遺伝子は細菌に抵抗性を示すRPS2(MINDRINOS et al., 1994)、カビに抵抗性を示すL6(LAWRENCE et al., 1995)と相同性を持っていることから、ウイルス、カビ、細菌に対する抵抗性のメカニズムに共通または類似のシグナル伝達経路が関与する可能性が考えられ、興味深い。

##### 2 酵母由来遺伝子を用いる方法

小川(1994)は、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)の二本鎖RNAを特異的に分解する酵素(dsRNase: pacI)を発現させることにより、TMV, CMV, PVYの発病が遅延することを示した。

##### 3 動物由来遺伝子を用いる方法

TAVLADORAKI et al. (1993)は、artichoke mottled crinkle virus (AMCV)のCPに対するモノクローナル抗体の可変領域と保存領域を、一つのペプチドに連結した抗体を導入した植物がAMCVに対して抵抗性になることを報告した。この場合、抗原決定部位の選定が重要であることが示唆されている。

TRUVE et al. (1993)はラットの2'-5'oligoadenylate synthetase(動物のインターフェロンによる抗ウイルス作用を引き起こす酵素)をジャガイモに導入することにより、ウイルス濃度がCP導入個体よりも減少することを報告している。

#### おわりに

このように、CPを利用したウイルス抵抗性植物が作出されて、およそ10年の間にウイルス抵抗性を付与する研究は長足の進歩を遂げてきた。ウイルス抵抗性植物の作出は、植物バイオテクノロジーにおける成功例の一つとなっている。

しかし、様々な手法が開発されてきたにもかかわらずすべてのウイルスに実用レベルの抵抗性を付与するような方法はまだ開発されていない。感染するすべてのウイルスに実用レベルの抵抗性を付与しなければ、消費者サイドからみてウイルス抵抗性とはいえないと思われる。

多種のウイルスに、抵抗性を付与する方法を探索するためには植物ウイルスの研究のみならず、宿主植物、動物、酵母における抵抗性のメカニズムが解明されることが重要であろう。PDRは一般に特異性が高いが、宿主植物あるいは動物、酵母の遺伝子を利用する方法の中には

上述のように多種のウイルスに効果のある方法が多い。また、先述のタバコ *N* 遺伝子は細菌、カビ抵抗性遺伝子と相同性を持つことが見いだされている (LAWRENCE et al., 1995)。もし類似の機構によってウイルス、細菌、カビに対する抵抗性が発現するとすれば、異なる種類の病気に対しても抵抗性を付与できる可能性が出てくる。

また、多種の病気にに対する抵抗性を付与するもう一つの方法として、昨年、海老沼ら (1995) により報告されたマーカー遺伝子除去の方法が利用できるかもしれない。この方法を用いれば形質転換後、マーカーを除去することにより何度でも同じマーカーを用いて形質転換できることから、対象植物に感染するすべてのウイルスの CP を導入することも理論的には可能である。

最近宿主生物由来の抵抗性遺伝子が次々とクローン化されてきた。また、上述のような新たな形質転換系、効率の良い再分化系などが開発されつつある。植物の遺伝子操作は近い将来、革命的な新品種を生み出すと予想される。

CMV 抵抗性サフィニアの作出に当たっては、社内外の多数の方々にお世話になった。ウイルスの精製、cDNA クローニング、ウイルス接種試験に当たっては東京大学農学部植物病理学研究室土崎常男前教授、難波成任助手 (当時、現東京大学農学部教授)、模擬的環境利用における安全性試験においては農業環境技術研究所岡田 斉 環境研究官 (当時)、同原田二郎植生管理科長 (当時)、同松村 雄 昆虫分類研究室長、STAFF 山田 実 部長、サントリー基礎研究所芦刈俊彦主席研究員らに大変お世話になった。ここに記して深く感謝する次第である。

#### 引用文献

1) ANDERSON, J. et al. (1992) : Proc. Natl. Acad. Sci.

- USA 89: 8759~8763.  
 2) BECK, D. L. et al. (1994) : ibid. 91: 10310~10314.  
 3) CARR, J. P. and M. ZAITLIN (1993) : Semin. Virol. 4: 339~347.  
 4) DINESH-KUMAR, S. P. et al. (1995) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4175~4180.  
 5) 海老沼宏安ら (1995) : 第18回日本分子生物学会年會講演要旨集, 2D-01.  
 6) FITCHEN, J. H. and R. N. BEACHY (1993) : Annu. Rev. Microbiol. 47: 739~763.  
 7) HARRISON, B. D. et al. (1987) : Nature 328: 799~802.  
 8) LAPIDOT, M. et al. (1993) : Plant. J. 4: 959~970.  
 9) LAWRENCE, G. J. et al. (1995) : Plant Cell 7: 1195~1206.  
 10) LINDBO, J. A. and W. G. DOUGHERTY (1993) : Virology 189: 725~733.  
 11) LODGE, J. K. et al. (1993) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7089~7093.  
 12) LOMONOSOFF, G. P. (1995) : Annu. Rev. Phytopathol. 33: 323~343.  
 13) MAITI, I. B. et al. (1993) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6110~6114.  
 14) MALYSHENKO, S. I. et al. (1993) : J. Gen. Virol. 74: 1149~1156.  
 15) MASUTA, C. et al. (1995) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6177~6121.  
 16) MINDRINOS, M. et al. (1994) : Cell 78: 1089~1099.  
 17) 大平和幸ら (1991) : 日植病報 57: 441~442.  
 18) 小川俊也 (1994) : ウイルス 44(1) : 69~76.  
 19) POWELL-ABEL, P. et al. (1986) : Science 232: 738~743.  
 20) RITTER, E. et al. (1991) : Mol. Gen. Genet. 227: 81~85.  
 21) SANO, H. et al. (1994) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10556~10560.  
 22) TAVLADORAKI, P. et al. (1993) : Nature 366: 469~472.  
 23) TEPPER, M. (1993) : Bio/Technology 11: 1125~1129.  
 24) TRUVE, E. et al. (1993) : ibid. 11: 1048~1052.  
 25) VARDI, E. et al. (1993) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7513~7517.  
 26) 山田 実・大平和幸 (1994) : TechnoInnovation 4: 61~63.  
 27) YAMAYA, J. et al. (1988) : Mol. Gen. Genet. 215: 173~175.  
 28) ZACCOMER, B. et al. (1993) : Gene 136: 87~94.

#### 主な次号予告

次6月号は、下記原稿を掲載する予定です。  
 農薬危害防止運動月間にちなんで (仮題) 大森正和  
 スクミリングガイの生態と防除 菖蒲信一郎  
 マレーシアとタイにおけるスクミリングガイの発生  
 実態と防除対応 平井剛夫  
 東南アジアにおけるイネ紋枯病シミュレーションモ  
 デル (BLIGHTASIRRI) の開発とモデルによる予  
 測 小林 隆・羽柴輝良・井尻 勉・T. W. MEW  
 灰色かび病菌の人工交配法と薬剤感受性の遺伝解析  
 への応用 山田正和

果樹園における光反射シートマルチによるアザミウ  
 マ類の防除 土屋雅利・増井伸一  
 カンキツグリーニング病の推定病原体の研究の現状  
 と課題 大津善弘  
 (植物防波基礎講座)  
 灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) の選択分離培地  
 を用いた空中孢子密度測定法 岡田清嗣  
 (リレー随筆) 産地の研究室から——地域ブランドを  
 育てる(9) / らっきょう 本多範行  
 ネオニコチノイド——作用機構と創製研究 山本 出

定期購読者以外のお申込みは至急前金にて本会へ  
 定価1部800円 送料76円