

イチゴへのキチナーゼ遺伝子の導入

奈良県農業試験場	あさ 浅 にし 西	お 尾 ざわ 澤	ひろ 浩 よう 洋	し 史 こ 子 しげる
農林水産省農業生物資源研究所	あら 荒	い 井	まさ 正	し 滋
奈良県農業試験場	ひら 平	い 井	ただ 忠	し 志
農林水産省野菜・茶業試験場	ひ 日	び 比		あき 明
東京大学農学部植物病理学研究室				

はじめに

人間は有史以来、自分たちに都合が良い作物を求めて野生の植物を元に何代にもわたって交配を繰り返しながら、病気に強く収穫量が多く、しかも食味の良い品種を育種してきた。その結果、数多くの有用な植物が育成されてきたが、このような伝統的な品種改良技術にも欠点と限界がある。仮に良い形質を持ったもの同士を交配しても他にも様々な形質を合わせ持っているため、必要な遺伝形質のみならず不要な形質も持ち込まれ、特定の遺伝子だけを導入するのは困難である。そのため、一つの品種を育成するには長い時間と莫大な労力を必要とする。また、近縁の植物間でしか交配はできず、利用できる遺伝形質には限界があり、新しい植物の育種が制限される場合が多々ある。しかし、植物遺伝子工学技術の急速な進歩により、特定の遺伝子を単離し、他の生物に導入することが可能となった。この技術を用いれば、目的とする品種の育成効率が非常に高まり、伝統的育種における問題点を解決する上で有効である。実際、遺伝子工学によって病害抵抗性遺伝子を導入した耐病性植物や、アンチセンス RNA によって目的遺伝子の翻訳を抑制した植物などの作出が盛んに行われている。また、地球規模で議論されている環境破壊や食糧不足の問題解決に貢献するような植物を分子育種する研究も活発に行われている。

高等植物はその構成成分としてキチンを持たないにもかかわらず、キチンを分解する酵素、キチナーゼを産生する。このキチナーゼの産生は病原菌の感染や傷害に加え、植物ホルモンのエチレン、化学物質のサリチル酸などによっても誘導される。これらのキチナーゼは植物の過敏反応に伴って作られる PR タンパク質（感染特異的タンパク質）の一つであることが明らかにされている。

さらにキチナーゼは、多くの植物病原菌の細胞壁の構成成分であるキチンを溶解して直接菌類の生育を阻害すると同時に、このように低分子化された菌体細胞壁のキチンオリゴマーが、ファイトアレキシンの産生やプロテアーゼインヒビターの合成など、一連の防御反応を誘導する。

このように、植物の生体防御において、重要な役割を果たしていると考えられるキチナーゼ遺伝子を導入することによって、病害抵抗性のトランスジェニックイチゴを作出したので、その概要について紹介したい。なお、本研究は奈良県農業試験場と農業生物資源研究所の微生物機能利用研究室および野菜・茶業試験場の育種第一研究室との共同で行った（地域バイオテク事業）。

I イチゴにおける遺伝子組換え技術の有効性

わが国においてイチゴの育種は長年行われているが、現在の主要品種は“とよのか”、“女峰”および“宝交早生”である。これらの品種は食味は良いが、“とよのか”はうどんこ病に、“女峰”は炭そ病に、“宝交早生”は萎黄病にそれぞれ弱いという欠点がある。特に、日本で作付面積が最も多い“とよのか”は、うどんこ病に対して罹病性であるため、農家に薬剤散布労力の負担がかかっており本病抵抗性品種の開発が望まれている。しかし、8 倍体であるイチゴでは一般の種子繁殖性植物とは異なり、交配により耐病性など一部の形質を既存の品種に付加するのは困難であるので、目的とする一つの遺伝子を付加することが可能な遺伝子組換え技術が有効であると考えられる。

イチゴの組織からの再生系については幾例の報告 (NEHRA et al., 1989; 1990) はあるが、その品種間差が大きく、日本の品種においては効率の良い再生系が確立されていなかった。そこで、奈良県農業試験場では数年前から日本の主要イチゴ品種の培養系 (荒井・浅尾, 1993) や *Agrobacterium tumefaciens* を用いたイチゴの遺伝子

導入技術 (浅尾ら, 1994) の開発に取り組み, それらの技術を確立した。次いで, イチゴに NISHIZAWA・Hibi (1991) がイネから単離した酸性クラス I キチナーゼ遺伝子を導入することによって, うどんこ病抵抗性イチゴを作出することを試みた。うどんこ病菌の分生孢子が植物体の表面に付着すると, 発芽後に付着器を経て養分の摂取器官である吸器を形成する。吸器によって植物から栄養分を得た菌は, 新たに第二次菌糸を伸ばし近くの表皮細胞に再び吸器を形成するというサイクルを繰り返し, 最後には菌糸上に分生孢子を作ってうどんこ病菌が広まっていく。IKEDA et al. (1991) は, イチゴうどんこ病菌 *Sphaerotheca humuli* の吸器が形成されたイチゴ細胞へキチナーゼを注入することにより吸器が分解することを確認した。これは, イチゴにキチナーゼ遺伝子を導入・発現させることにより, うどんこ病抵抗性個体が作出される可能性を示唆するものである。

II イチゴへのキチナーゼ遺伝子の導入

1 遺伝子導入の手法

無菌的に大量増殖 (藤本ら, 1987) した “とよのか” の葉片と葉柄片をカルス形成液体培地 (MS 培地にシヨ

糖 3%, BA 2 mg/l および 2,4-D 0.2 mg/l を添加し, pH 5.8 に調整したもの) に 1 日間浸漬し, 供試材料とした。一方, イネ由来キチナーゼ遺伝子を GUS 遺伝子を削除したバイナリーベクター pBI 121 中の CaMV 35S プロモーターの下流に連結し, これを *A. tumefaciens* LBA 4404 株に導入した菌を用意した。カナマイシン 50 mg/l を添加した YEB 培地で一晚振とう培養した *A. tumefaciens* の 1/10 希釈液に外植片を 10~30 分間浸して菌を接種し, カルス形成培地で 2 日間培養した。その後, 除菌のためのカルペニシリン 100 mg/l と形質転換カルス選抜のためのカナマイシン 50 mg/l を添加したカルス形成培地に移植した。次に, 形成したカルスを前記抗生物質を含んだ再分化培地 (カルス形成培地から 2,4-D を除いたもの) に移植して不定芽を形成させた。葉片 4,000 個から 246 個 (6.15%) のカルスが, 葉柄片 4,128 個から 298 個 (7.21%) のカルスがそれぞれ形成されて, それらのカルスから 123 個の植物体が得られた (図-1, 表-1)。

これらの再分化個体中の導入遺伝子の確認は次のようにして行った。すなわち, 再分化したイチゴの葉片を 400 μ l の緩衝液 (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 25 mM DTT, 0.5% SDS) と少量の海砂が入ったエッペンドルフチューブの中ですりつぶし, 遠心分離後, 上清 300 μ l を新しいエッペンドルフチューブへ移して, イソプロパノール 300 μ l を加えて室温で 2 分間放置した。これを遠心分離した後, 沈殿物を乾燥させ, 100 μ l の TE 緩衝液に溶かし DNA 溶液とした。得られた DNA の 10~30 ng を鋳型として, キチナーゼ遺伝子の翻訳領域および NOS ターミネーター部の塩基配列と相補的な配列を持つプライマーを用いて PCR を行った。なお PCR は, 94°C・2 分保温の後, 変性 94°C・30 秒, アニーリング 60°C・2 分, 伸長反応 72°C・3 分を 45 サイクル反復した後, 72°C・7 分保温の条件で行った。増幅産物は, 1 μ g/ml エチジウムブロミドを含む 1.5% アガロースゲル電気泳動により分析した。その結果プラスミド DNA を鋳型とした場合と同じ約 320 bp の DNA 断片が増幅され, これらの個体がキチナーゼ遺伝子を持つ形質転換体であることが確認された。

表-1 アグロバクテリウムを用いた形質転換イチゴ (“とよのか”) の作出

供試部位	外植片数	カルス形成数	再分化個体数
葉	4,000	246 (6.2%)	36 (0.9%)
葉柄	4,128	298 (7.2%)	87 (2.1%)
Total	8,128	544 (6.7%)	123 (1.5%)

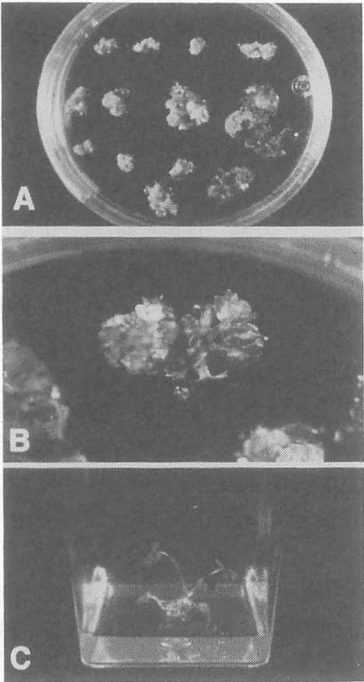


図-1 形質転換イチゴの作出
A: カルスからの茎葉水分, B: 茎葉の伸長, C: 植物体

2 形質転換体におけるキチナーゼ活性とうどんこ病に対する抵抗性

(1) 形質転換体のキチナーゼ活性

各個体 0.5 g の新鮮葉を 0.02 M citric acid-0.04 M Na₂HPO₄ 緩衝液 (pH 6.8) でホモジナイズし、遠心分離後、上清を一晩透析し、不溶物を遠心分離で除き、上清を前記緩衝液で 10 ml/ にして粗酵素抽出液とした。次に、基質としてのカルボキシメチルキチン 20 mg を 0.05 M citric acid-0.1 M Na₂HPO₄ 緩衝液 (pH 6.8) 1 ml/

に懸濁し、粗酵素抽出液 1 ml/ を加えて 37℃ で 1 時間振とう反応させ、トリクロロ酢酸で反応を停止後、酵素反応液 1.5 ml/ とシャーレス変法試薬 (IMOTO and YAGISHITA, 1971) 2 ml/ を混合して 15 分間沸騰水浴中で加熱した。その後、420 nm の吸光度で *N*-アセチル-*D*-グルコサミン量を測定した。その結果調査した 5 個体のうち 2 個体は対照個体と比較して約 5 倍量の *N*-アセチル-*D*-グルコサミンが検出でき、キチナーゼ遺伝子を導入することによりキチナーゼ活性が向上したものと考えられた。

表-2 形質転換“とよのか”の小葉へのうどんこ病菌の接種試験結果(1週間後)

葉位	小葉番号	対照個体		形質転換個体								
				A			B			C		
新生 第1葉	1	++ ¹⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
新生 第2葉	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
新生 第3葉	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- 1) 病徴程度
- : 病徴が認められない
+ : 肉眼では判定できないが、顕微鏡下で孢子形成が認められる
++ : 肉眼で菌叢が認められる

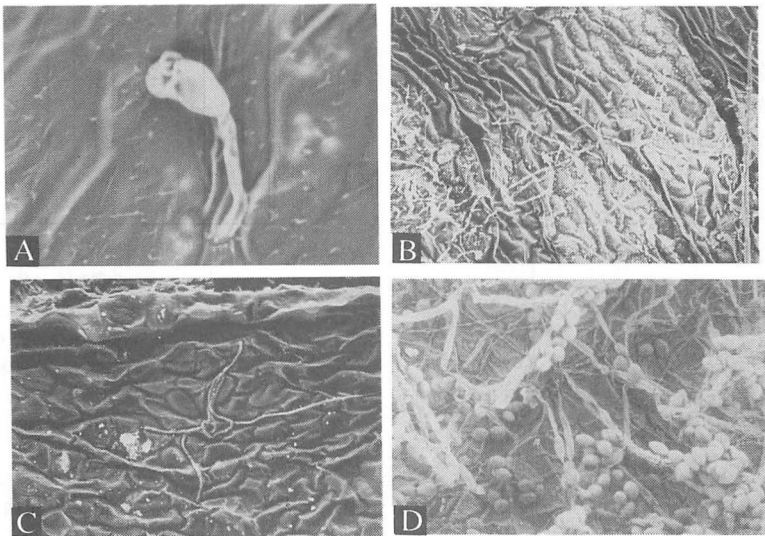


図-2 イチゴ葉上における接種うどんこ病菌の走査電顕像
A : とよのかの形質転換体 (800 倍) B, D : とよのか (200 倍)
C : 宝交早生
A, B : 接種 3 日後 C, D : 接種 12 日後

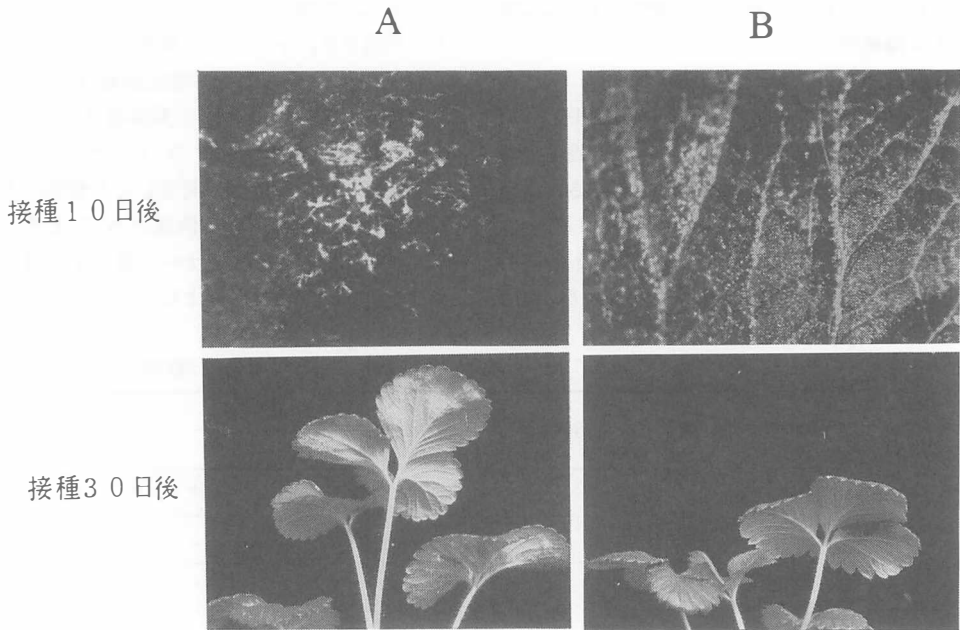


図-3 うどんこ病菌を接種した形質転換イチゴ（とよのか）の病徴

A：対照，B：形質転換体

(2) 小葉へのうどんこ病菌の接種

形質転換していない“とよのか”，“女峰”および“宝交早生”の新生第2葉の小葉3枚を沓紙を敷いたシャーレに置き，うどんこ病菌 (*S. humuli*) の孢子（数個）を接種して1週間後に病徴を観察した。次に，形質転換“とよのか”と非形質転換“とよのか”の新生第1葉から新生第3葉までの小葉3枚を沓紙を敷いたシャーレに置き，うどんこ病菌の孢子（数個）を各小葉につき3点に接種して1週間後に病徴を観察した。形質転換していない3品種にうどんこ病菌を接種した場合，“とよのか”では孢子が旺盛に発芽しコロニーが観察されたが，“女峰”と“宝交早生”では病徴は観察されなかった。一方，うどんこ病菌を接種した3個体の形質転換体のうち1個体は対照の“とよのか”と同様な病徴を示したが，あとの2個体は抵抗性を示した（表-2）。

走査電子顕微鏡による観察の結果，イチゴの葉にうどんこ病菌を接種すると，抵抗性品種の“宝交早生”では菌糸が吸器を形成できず渦を巻きながらさまよっている（図-2C）のに対して，“とよのか”では接種12日目でも多数の数珠状孢子を形成した（図-2D）。一方形質転換“とよのか”では，接種初期における菌糸の伸長は観察されず，コントロールと比較して明らかにうどんこ病菌に対して抵抗性を示した。時間の経過と共に形質転換“とよのか”でも菌糸は伸長したが，“宝交早生”のように菌糸

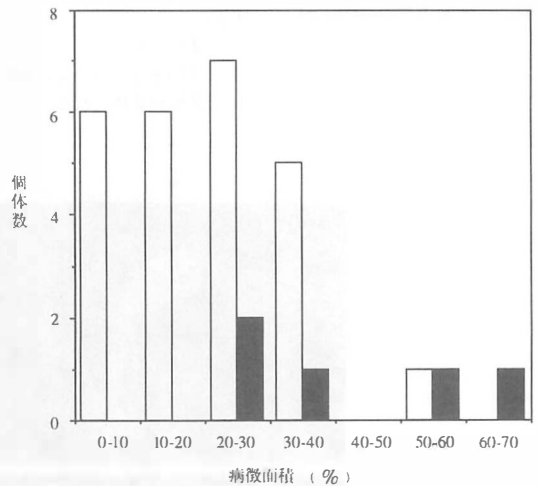


図-4 形質転換イチゴのうどんこ病抵抗性

□：形質転換体（25 個体）

■：対照個体（5 個体）

が渦を巻くようなことはなかった。このように，形質転換“とよのか”では病徴発現が遅延したが，この抵抗性は“宝交早生”とは異なったメカニズムによるものであると考えられる。

(3) 閉鎖系温室での接種試験

閉鎖系温室内で育成した形質転換体および非形質転換

体の“とよのか”にうどんこ病菌の孢子 (10^5 個/ml) を接種し, 30 日後に各個体の新生第 1 葉から新生第 4 葉までの各葉における病徴発現の程度を, 葉の全面積に対する菌叢面積の率を調査することによって算出した。形質転換体の菌叢面積率の平均は, 非形質転換体の“とよのか”より低かったが, いずれの系統においても個体差が大きかった。形質転換体の中には菌叢面積率が 2.5% あるいは 3.8% と非常に低い値を示した個体があり, うどんこ病に対してかなり強度の抵抗性があると考えられた (図-3, 図-4)。

(4) 形質転換体の安全性評価

ベクターに用いた *A. tumefaciens* の残存性を調査するため, 試験管内で生育させた形質転換体の茎葉部, 根部および乳鉢で磨砕した茎葉組織に, 各供試材料の 20 倍量の滅菌蒸留水を加えて 2 時間振とうした後, その上清を 0 mg/l および 50 mg/l カナマイシンを含む YEB 培地に塗布し 28°C で 5 日間培養した。また, 形質転換体の花粉の飛散性を調査するため, 閉鎖温室内で植物体の後部から風 (4 m/s) を送り, 花粉発芽用培地 (0.2% ゲルライト) を植物体から 0 cm から 150 cm に置き, 6 時間放置後花粉を検鏡した。その結果, 形質転換体の茎葉表面, 根部表面および茎葉組織内のいずれからも *A. tumefaciens* は検出されなかった。一方, 形質転換体および非形質転換体とも 40 cm の距離までは花粉の飛散は認められたが飛散量は少なく, かたまって飛散した花粉が観察された。これは, イチゴが虫媒花であることに起因していると考えられる。

次に, 形質転換体の根からの分泌物および茎葉からの揮発性成分を調査するため, 発根しかけている形質転換体と非形質転換体をペーパーブリッジ法で支持して根を蒸留水 10 ml に浸漬させ, 移植後 14 日目の蒸留水を採取し, 高速液体クロマトグラフィーで根からの分泌物を分析した。また, 2~3 枚の複葉を展開している形質転換体と非形質転換体をホルモンフリーの 1/2 MS 培地に移植してクリーンベンチ内で 1 時間開栓し, 密栓後 21 日目に気相を採取してガスクロマトグラフィーで茎葉からの揮発性成分を分析した。これらの分析の結果, 検出ピークの位置や高さに有意な差は認められず, 形質転換体において特異的に産生される物質はないと考えられた。

お わ り に

BROGLIE et al. (1991) は, インゲンマメのキチナーゼ遺伝子をタバコに導入し, 苗骨折病抵抗性個体を作出した。西澤ら (1992) はイネのキチナーゼ遺伝子をタバコに導入し, うどんこ病抵抗性個体を作出した。ZHU et al.

(1994) はイネのキチナーゼ遺伝子とアルファルファのグルカナナーゼ遺伝子をタバコに導入し, 白星病抵抗性個体を作出した。また最近, LIN et al. (1995) はイネのキチナーゼ遺伝子をイネ (インディカ) に導入して, 紋枯病抵抗性個体を作出した。このように, キチナーゼのような植物の溶菌酵素遺伝子を植物に導入することによって菌類病に強い植物が作出したという報告が増えてきているが, 本研究においても, イチゴの菌類病抵抗性植物を育種するうえでキチナーゼ遺伝子を用いた遺伝子組換え技術が有効であることが証明された。以上にみられるように, 植物へのキチナーゼ遺伝子やグルカナナーゼ遺伝子の導入は, キチンや β -1, 3-グルカンが細胞壁の主要骨格である病原菌類の防除には有効であると考えられる。

ここ数年いくつかの病害抵抗性遺伝子が新たに単離されていることから, 耐病性植物の育成において遺伝子組換え技術はさらに有効な手段となるであろう。現在までに, *Pto* (MARTIN et al., 1993), *RPS2* (BENT et al., 1994), *RPM1* (GRANT et al., 1995), *N* (WHITHAM et al., 1994), *Cf-9* (JONES et al., 1994), *Xa21* (SONG et al., 1995) などの抵抗性遺伝子の単離が報告されている。*Pto* を除く他の抵抗性遺伝子にはロイシンリッチリピート (LRRs) 構造が共通して存在しており, *Xa21* と *Pto* の遺伝子産物はプロテインキナーゼをコードしている。今後, 分子生物学的解析の深化により, 植物細胞における病原菌の認識機構やシグナル伝達機構の詳細がより明らかにされるとともに, それらの知見を応用した病害抵抗性トランスジェニック植物の作出がさらに盛んになることが期待される。

引用文献

- 1) 荒井 滋・浅尾浩史 (1993) : 奈良農試研報 24 : 19~24.
- 2) 浅尾浩史ら (1994) : 植物組織培養 11(1) : 19~25.
- 3) BENT, A. F. et al. (1994) : Science 265 : 1856~1859.
- 4) BROGLIE, K. et al. (1991) : ibid. 254 : 1194~1197.
- 5) 藤本まなみら (1987) : 奈良農試研報 18 : 65~71.
- 6) GRANT, M. R. et al. (1995) : Science 269 : 843~846.
- 7) IKEDA, S. et al. (1991) : Ann. Phytopathol. Soc. Japan 58 : 780~783.
- 8) IMOTO, T. and K. YAGISHITA (1971) : Agr. Biol. Chem. 35(7) : 1154~1156.
- 9) JONES, D. A. et al. (1994) : Science 266 : 789~793.
- 10) LIN, W. et al. (1995) : Bio/Technology 13 : 686~691.
- 11) MARTIN, G. B. et al. (1993) : Science 262 : 1432~1436.
- 12) NEHRA, N. S. et al. (1989) : J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114 : 1014~1018.
- 13) ——— et al. (1990) : Science 66 : 119~126.
- 14) NISHIZAWA, Y. and T. HIBI (1991) : Plant Science 76 : 211~218.
- 15) 西澤洋子ら (1992) : 植物防疫 46(13) : 500~506.
- 16) SONG, W. Y. et al. (1995) : Science 270 : 1804~1806.
- 17) WHITHAM, S. et al. (1994) : Cell 78 : 1101~1115.
- 18) ZHU, Q. et al. (1994) : Bio/Technology 12 : 807~812.