

学位論文題名

ダイズ遺伝子組換え技術の改良と成分育種への利用

学位論文内容の要旨

遺伝子組換え技術は、交配では不可能な異種生物由来の遺伝子による新規形質の付与を可能にし、農業生産そのものを変革する影響力を持っている。また、植物のゲノム研究や分子生物学研究などにおいて遺伝子の機能解析に利用される基盤的な技術である。1983年にタバコにおいて初めて遺伝子組換え体の作出が報告されて以降、数多くの作物において遺伝子組換え体が作出されてきた。直ちに、ダイズ(*Glycine max* (L.) Merrill)においてもアグロバクテリウム法や遺伝子銃法を用いた遺伝子組換え技術が開発され、除草剤耐性や高オレイン酸などの有用形質が付加された実用的な組換え体が作出された。とくに、除草剤耐性ダイズはアメリカを中心に世界の栽培面積の約 60%に作付けされるに至っている。しかし、遺伝子組換え体の作出効率は低く、現在においても一般的な研究室で適用できる技術とはなっていない。遺伝子組換えでは形質転換した細胞から植物を再生させる技術が重要である。Finer and Nagasawa (1988) は体細胞胚(不定胚)を経由する効率的な再分化系を確立した。その後、不定胚への遺伝子導入により組換え体を作成する技術が開発され、再現性の高い方法として多くの研究室で利用されるようになった。そこで本研究では、ダイズの遺伝子組換え技術を習得、改良するとともに、種子成分の改変を目的に遺伝子導入を行い組換え体を作成した。

第1章では、ダイズの生産やゲノム研究における遺伝子組換え技術の重要性を論じた。また、国内外のこれまでの遺伝子組換え研究の経緯や最近の進展を概説し、普及を進める上での問題点に関して論じた。

第2章では、すでに確立されている遺伝子銃を用いた不定胚への遺伝子導入技術を習得するために、「Jack」から誘導した不定胚を用いて組換え体の作出を試みた。導入遺伝子として、除草剤耐性の付与が期待できる放線菌に由来する新規なホスフィノスリシンアセチル転移酵素(PAT)遺伝子である、*hpat*あるいは*mat*を用いた。*hpat*あるいは*mat*を含む発現カセットを遺伝子導入用プラスミドに組み込み、金粒子に塗布して不定胚へ撃ち込んだ。同じ遺伝子導入用プラスミドを用いた過去の報告(Khalafalla et al. 2005)よりも効率は低いものの、*hpat* 遺伝子を導入した組換え体2系統(h-7 と h-9)、*mat* 遺伝子を導入した組換え体1系統(m-12)を得ることができた。これらの組換え体は葉からはそれぞれの PAT タンパク質

が検出され、PAT 活性が認められた。また、有効成分としてホスフィノスリシンを含む除草剤バスタに対して耐性を示した。

主要な貯蔵タンパク質を欠失したダイズ系統「QF2」は種子にアルギニン、アスパラギンやグルタミン酸などの遊離アミノ酸を高濃度に蓄積している(Takahashi et al. 2003)。そのため、外来タンパク質や有用なアミノ酸あるいはその誘導物の合成と貯蔵の場(植物工場)としての利用が期待される。しかし、不定胚の誘導と再分化には品種間差の存在が報告され、一部の品種でしか第2章で用いた遺伝子組換え技術の適用例はない。そこで第3章では、「QF2」に「Jack」を戻し交配することにより、遺伝子組換えに適した貯蔵タンパク質欠失系統の作出を試みた。BC₁F₃世代の戻し交配系統「JQ1」と「JQ2」を温室で栽培し、登熟途中の未熟子葉を使用して不定胚の誘導能と再分化能を比較した。「Jack」は未熟子葉から鮮やかな緑色の不定胚を誘導し、再分化能を維持したまま良好な増殖を示した。一方、「QF2」は黄色で小さい不定胚を誘導したものの、培養を継続してもほとんどが褐変し、それ以上増殖することはなかった。また、「QF2」の不定胚からは正常に成熟した胚を得ることはなく、再分化植物体を得ることはできなかった。「JQ1」と「JQ2」では「Jack」に類似した鮮やかな緑色の不定胚を誘導し、また、「Jack」に匹敵する良好な増殖能を示した。また、「Jack」と遜色ない頻度で子葉と胚軸を分化した胚へと成熟し、植物体へと再分化した。これらの結果から、不定胚の誘導および再分化の能力は遺伝的に制御された形質であり、交配によって他のダイズに導入できることが明らかになった。次に「JQ1」、「JQ2」とそれらの兄弟系統である「JQ6」から誘導・増殖した不定胚へ遺伝子を導入し、組換え体の作出を行った。18 処理を行い、総計3系統の組換え体を得た。以上のように、不定胚の誘導能と再分化能を改良することにより組換え体の作出に成功した。これらの能力が高い品種・系統を探索し、遺伝子導入に用いることで、「Jack」以外の品種や系統でも組換え体を作成できるものと考えられた。

「JQ」は主要な種子貯蔵タンパク質を欠失すると同時に、アルギニン、アスパラギンやグルタミン酸などの遊離アミノ酸を高度に蓄積することにより窒素含量の恒常性を維持していた。そこで第4章では、「JQ」にトリプトファン(Trp)生合成の鍵酵素である、イネ改変型アントラニル酸合成酵素遺伝子(*OAS1D*)を導入することにより、「Jack」のような普通品種よりも高濃度にトリプトファンを生産する可能性について検討した。「JQ1」ならびにその兄弟系統である「JQ7」の不定胚に *OAS1D* を導入し、両系統から組換え体を得て、種子中の遊離トリプトファン含量を比較した。非組換え体と比較して組換え体は約 12~17 倍の遊離トリプトファンを種子に蓄積した。しかし、その含量は *OAS1D* を導入した普通品種「Jack」の組換え体と同程度であった。また、アルギニンやアスパラギンなどの遊離アミノ酸の含量は組換え体においても高いまま維持された。以上の結果から、貯蔵タンパク質の欠失によってアルギニンやアスパラギンなどの特定のアミノ酸が優先的に生合成され、窒素成分が取り込まれるものと考えられた。あるいは、遊離トリプトファンの蓄積量には限界があり、高遊離アミノ酸系統でも「Jack」と同程度しか蓄積できない可能性も考えられた。

第5章の総合考察では、本研究結果から示されるダイズの遺伝子組換え技術の応用と問題点について考察を行い、今後の研究の進展について総合的な見解を述べた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜多村 啓 介

副 査 教 授 石 本 政 男

副 査 助 教 山 田 哲 也

学 位 論 文 題 名

ダイズ遺伝子組換え技術の改良と成分育種への利用

本論文は 5 章 104 頁からなる和文論文であり、図 19、表 9 を含む。

遺伝子組換え技術は、交配では不可能な異種生物由来の遺伝子による新規形質の付与を可能にし、農業生産そのものを変革する影響力を持っている。また、植物のゲノム研究や分子生物学研究などにおいて遺伝子の機能解析に利用される基盤的な技術である。しかし、ダイズにおける遺伝子組換え体の作出効率は低く、現在においても一般的な研究室で適用できる技術とはなっていない。遺伝子組換えでは形質転換した細胞から植物を再生させる技術が重要である。Finer and Nagasawa (1988) は体細胞胚(不定胚)を経由する効率的な再分化系を確立した。その後、不定胚への遺伝子導入により組換え体を作成する技術が開発され、再現性の高い方法として多くの研究室で利用されるようになった。そこで本研究では、ダイズの遺伝子組換え技術を習得、改良するとともに、種子成分の改変を目的に遺伝子導入を行い組換え体を作成した。

1. ホスフィノスリシン耐性遺伝子を導入した組換え体作出と除草剤耐性評価

これまでに確立されている遺伝子銃を用いた不定胚への遺伝子導入系の技術を習得するために、「Jack」から誘導した不定胚を用いて組換え体の作出を試みた。導入遺伝子として、除草剤耐性の付与が期待できる新規なホスフィノスリシンアセチル転移酵素 (PAT) 遺伝子である *hpat* あるいは *mat* を用いた。*hpat* あるいは *mat* を組み込んだ遺伝子導入用プラスミドを金粒子に塗布し不定胚へ撃ち込んだところ、*hpat* 遺伝子を導入した組換え体 2 系統 (h-7 と h-9)、*mat* 遺伝子を導入した組換え体 1 系統 (m-12) を得ることができた。これらの組換え体は葉からはそれぞれの PAT タンパク質が検出され、PAT 活性が認められた。また、有効成分としてホスフィノスリシンを含む除草剤バスタに対して耐性を示した。

2. 遺伝子組換えに適した貯蔵タンパク質欠失系統の育成と組換え体の作出

主要な種子貯蔵タンパク質を欠失した系統「QF2」は遺伝子組換えに適した不定胚を得るこ

とが困難なため、これまでのところ組換え体を得るには至っていない。そこで、「QF2」に「Jack」を戻し交配することにより、遺伝子組換えに適した貯蔵タンパク質欠失系統「JQ」(BC₁F₃ 世代)の作出を試みた。「JQ1」と「JQ2」を温室で栽培し、登熟途中の未熟子葉を使用して不定胚の誘導能と再分化能を比較した。「Jack」は未熟子葉から鮮やかな緑色の不定胚を誘導し、再分化能を維持したまま良好な増殖を示した。一方、「QF2」は黄色で小さい不定胚を誘導したものの、培養を継続してもほとんどが褐変し、それ以上増殖・再分化することはなかった。「JQ1」と「JQ2」では「Jack」に類似した鮮やかな緑色の不定胚を誘導・増殖した。また、「Jack」と遜色ない頻度で植物体へと再分化した。これらの結果から、不定胚の誘導および再分化の能力は遺伝的に制御された形質であり、交配によって他のダイズに導入できることが明らかになった。次に「JQ1」、「JQ2」と兄弟系統の「JQ6」から誘導・増殖した不定胚を用いて組換え体の作出を行った。各系統それぞれ 6 シャーレの不定胚に遺伝子を撃ち込み、「JQ1」から 1 系統、「JQ6」から 2 系統の組換え体を得た。以上の結果から、不定胚の誘導能と再分化能は組換え体作出に重要であり、これらの能力が高い品種・系統を探索し、遺伝子導入に用いることで、「Jack」以外の品種や系統でも組換え体を作成できるものと考えられる。

3. イネ改変型アントラニル酸合成酵素遺伝子の導入による高トリプトファン含有ダイズの作出

「QF2」は種子貯蔵タンパク質代わりに遊離アミノ酸を高濃度に蓄積している。この「QF2」にトリプトファンの過剰合成をもたらす、イネ改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニット遺伝子(*OASAI*D)を導入することにより、「Jack」のような普通品種よりも高度にトリプトファンを蓄積した組換えダイズの作出の可能性を検討した。しかし、第3章で述べたように、「QF2」はこれまで組換え体を得るには至っていない。そこで、「QF2」に「Jack」を戻し交配することにより作出した「JQ1」ならびにその兄弟系統である「JQ7」の不定胚へ *OASAI*D を導入した。「JQ1」と「JQ7」は両系統とも「QF2」と同様に種子に遊離アミノ酸を高濃度に蓄積していた。*OASAI*D の導入により「JQ1」ならびに「JQ7」両系統から組換え体(JQ1-6とJQ7-3)を得て、種子中の遊離トリプトファン含量を比較した。非組換え体と比較して、組換え体は約 12~17 倍の遊離トリプトファンを蓄積した。しかし、その含量は *OASAI*D を導入した「Jack」組換え体と同程度であった。また、トリプトファンを除くアルギニン、アスパラギンやグルタミン酸などの遊離アミノ酸の含量は非組換え体と比較してほとんど差がなかった。以上の結果から、貯蔵タンパク質の欠失によってアルギニンやアスパラギンなどの特定のアミノ酸の生合成が優先的に発動され、窒素成分が取り込まれるものと考えられた。

本研究は、ダイズ遺伝子組換え技術を改良するとともに、成分育種への応用に重要な道筋を立てるものであり、学術的に高く評価できる。

よって、審査員一同は、喜多 洋一が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。