

第 5 章． 総合考察

本章では、本研究を通して明らかになった点を総合的に考察し、果樹育種全体における形質転換技術の利用の今後の展望について考察する。

果樹類において形質転換の技術を実際に育種に利用するためには、効率的な形質転換法を確立することが必要である。形質転換を成功させるためには、組織培養による植物組織からの効率的な再分化系の確立が不可欠である。しかし、果樹類には再分化が困難なものが多く、このことが形質転換法を利用した分子育種が進展しない最大の原因となっている。ブドウ、カンキツ、リンゴ、キウイフルーツでは、多くの研究者が形質転換の成功例を報告しており、安定した形質転換系が確立されている。カンキツやブドウでは、胚発生カルス (embryogenic callus: EC) からの再分化系を用い、リンゴやキウイフルーツでは葉片などの組織片からの不定芽再分化系を用い、形質転換が行われているが、これらの樹種でも、再分化可能な品種に限られていたり、再分化率が低いなどの問題が残されている。形質転換法をより簡便で安定した技術とするためには、材料とする植物の組織や、組織からの再分化のための培養条件等についてさらに検討し、植物の再分化率の向上を図る必要がある。カンキツでは、近年、茎の節間や珠心胚実生の胚軸切片からの直接不定芽形成系を用いた、より簡便な形質転換法が開発されている (Bond and Roose, 1998; Cervera et al., 1998a, 1998b; Gutiérrez-E et al., 1997; Kaneyoshi-Hiramatsu et al.,

1994; Moore et al., 1992; Peña et al., 1995a, 1995b, 1997; Pérez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo 1998)。ブドウでは早期の未受精胚珠を用いて EC を誘導することにより、これまで再分化が困難とされた巨峰などの品種についても再分化系が確立され、形質転換への利用が進められている (Nakajima et al., 1998)。

カキについては葉片からの再分化系を用いて形質転換法が開発されている (Tao et al., 1997) が、カキ葉片からの再分化は、長期間のカルス培養期間が必要で、再分化率もあまり高くなかった。本研究第 2 章における実験で、カキの種子内胚軸をゼアチン 2 mg/l を含む培地で培養すると、9 割以上の頻度で不定芽が直接形成されたことから、著者はこの系を用いて効率の良い形質転換法を開発した。一般に、植物の交雑胚の胚軸や子葉は再分化能が高いとされ (松田, 1991)、再分化が困難な核果類などの植物においては、交雑胚の子葉からの再分化系を用いて形質転換体の育成が行われている (Da Câmara Machado et al., 1994; Hammerschlag and Smigocki, 1998; Korte, 1994; Laimer da Câmara Machado et al., 1992; Mante et al., 1991; 松田ら, 1999; Scorza et al., 1994, 1995a; Smigocki and Hammerschlag, 1991)。交雑胚のような生殖器官からの再分化系を用いた形質転換系は、既存品種への遺伝子導入には用いることができないが、交配母本など育種素材の作出に利用することが出来る。カキでは葉片からの直接不定芽形成系も報告されている (福井ら, 1989; 西村・山田, 1992; Yokoyama and Takeuchi, 1988) ことから、この系を利用したより効率的な形質転換系の開発を進めているところである。

アグロバクテリウム法で遺伝子導入を行う場合、アグロバクテリウムの系統によって形質転換率に差が認められるため、樹種ごとに

適したアグロバクテリウム系統の検討が必要である。現在、植物の形質転換には、LBA4404 系統 (Hoekema et al., 1983) が最も一般的に用いられ、キウイフルーツやブドウでは LBA4404 系統で形質転換体が獲得されている。しかし、植物の種類によっては LBA4404 系統では十分な感染が得られず、さらに感染力の強い EHA101 系統 (Hood et al., 1986)、EHA105 系統 (Hood et al., 1993)、C58 (pGV3850) 系統 (Zambryski et al., 1983) などが用いられている。本研究第 2 章におけるカキの形質転換の場合にも、LBA4404 系統では形質転換体が得られず、EHA101 系統を用いることによって形質転換体を得ることが出来た。カンキツでも同様なことが報告されている (Bond and Roose, 1998)。また、ナシでは、目的の植物から単離された野生株のアグロバクテリウムにバイナリーベクターを導入し、形質転換体が得られたと報告されている (金好ら, 1998)。このように、樹種に適したアグロバクテリウムの系統を検討することにより、形質転換率の向上を図ることが出来る。

緒言でふれたように、これまでに得られている形質転換体の多くは、実験系の開発のために用いられたマーカー遺伝子を導入したものであり、有用遺伝子を導入した例は少ない。これまで果樹に導入されている遺伝子のほとんどは、他の植物に導入して効果が認められたもので、利用されている遺伝子の種類も限られている。しかし、現在では数多くの遺伝子が単離され、その発現や発現調節機構が急速な勢いで解明されつつあり、さらに利用できる遺伝子が増えるものと考えられる。今後、果樹の育種に形質転換法を利用していくためには、さまざまな遺伝子を実際に果樹に導入し、その効果を調査し、遺伝子の利用に関するデータを蓄積していく必要がある。

病害抵抗性関連遺伝子の導入による病害抵抗性の賦与は、形質転換技術の利用が最も期待される分野である。これまでに、難防除病害のウィルス病に対する抵抗性賦与を目的として、さまざまな果樹でウィルス外皮タンパク質遺伝子の導入が行われており、パパイアではパパイアリングスポットウィルス病に抵抗性を示す個体が得られている (Fitch et al., 1992; Lius et al., 1997; Tennant et al., 1994)。著者は、本研究第3章において、糸状菌病害抵抗性賦与を目的とし、キウイフルーツに、イネのキチナーゼ遺伝子およびダイズの β -1,3-エンドグルカナーゼ遺伝子を導入した。その結果、キチナーゼ遺伝子を導入した場合、キチナーゼ活性が有意に高まった個体は得られず、同じイネのキチナーゼ遺伝子を導入したキュウリ (Tabei et al. 1998)、トルコギキョウ (丸田ら, 1998)、キク (高津ら, 1998)、トマト (佐藤ら, 1999) で報告されているような灰色かび病害抵抗性を示す個体は認められなかった。一方、 β -1,3-エンドグルカナーゼ遺伝子を導入した場合、対照の6倍のグルカナーゼ活性を示す形質転換体を得られ、この個体では灰色かび病の病斑の拡大の遅延が認められた。しかし、高度な抵抗性は認められず、圃場抵抗性にはつながらないと考えられた。現在、ブドウやリンゴでも、同様の試みが行われており、同じイネのキチナーゼ遺伝子を導入したブドウでうどんこ病や黒とう病に対して抵抗性の増強が認められ (山本ら, 1998, 1999)、またクモノスカビのキチナーゼを導入したリンゴで斑点落葉病に対して抵抗性の増強が認められている (星ら, 1998)。今後はより高度な糸状菌病害抵抗性を賦与するため、複数の病害抵抗性に関与する遺伝子を同時に導入することが考えられる。実際、タバコやトマトにおいては、キチナーゼと β -1,3-エンドグルカナーゼなどを同時に発現させ

た場合、いずれか一つが発現している個体よりも高度な糸状菌病害抵抗性が得られたとの報告がある (Jach et al., 1995; Jongedijk et al., 1995; Zhu et al., 1994)。

果樹では細菌病による被害も大きく、効果的な農薬がないことから、抵抗性品種の育成が望まれている。いくつかの植物病原細菌は毒素を産生して植物を加害することが知られているが、病原菌自身はこの毒素に対して耐性の遺伝子を持っていることから、この遺伝子を植物に導入することによって抵抗性を賦与する試みも行われている。タバコではタバコ野火病菌の産生する毒素を分解して不活化する酵素の遺伝子を導入し、病害抵抗性植物が得られている (Anzai et al., 1989)。また、インゲンかさ枯れ病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) は、毒素ファゼオロトキシンを産生してインゲンを加害するが、この細菌の持つ毒素耐性のターゲット酵素の遺伝子をタバコに導入することで、この病原細菌に対する抵抗性が得られたとの報告がある (De la Fuente-Martínez et al. 1992)。キウイフルーツのかいよう病菌は、この病原細菌に非常に近縁で、同じ毒素を産生することから、この毒素耐性遺伝子をキウイフルーツに導入し、かいよう病抵抗性を賦与する試みも行われている (著者ら, 未発表)。

また、植物体が大きく、収穫その他に多大な労力を必要とする果樹では、植物をわい化させることは非常に重要な課題である。外来遺伝子導入による植物体のわい化については、果樹では rol 遺伝子を導入したカラタチ (Kaneyoshi and Kobayashi, 1999)、イネのホメオボックス遺伝子 (OSH1) を導入したキウイフルーツ (Kusaba et al., 1999) が報告されている。また、リンゴなどでジベレリン合成関連酵素遺伝子の単離解析が進められており (草場ら, 1999; 坂本ら, 1999)、これ

らの遺伝子を利用したおい化も期待されている。

近年、果実に含まれるさまざまな成分が、抗ガン作用などの機能性を示すことが明らかにされ、機能性食品として注目されている。本研究第4章においては、新機能をもつ果樹を作出する目的で、キウイフルーツに創傷治療薬の効果のある hEGF の遺伝子を導入し、形質転換体における hEGF の産出を確認した。この事例は、果樹が本来持っていない新しい機能を賦与し、何らかの有益な物質を果実内で生産させることにより、高付加価値機能性食品または医薬品として果物を利用するという新しい育種の方向性を示すものと考えられる。その他、経口生ワクチンの生産を目的として、ヒトの病原微生物の抗原遺伝子をバナナ (Katz, 1997; Mason and Arntzen, 1995; Mor et al., 1998; Smith et al., 1997)、リンゴ (Sandhu et al., 1999) に導入する試みも行われており、将来、果実で医薬品を生産することも行われるかもしれない。ただし、このようなヒトに医薬的な作用を及ぼす果樹の形質転換体の栽培や流通については、通常の農作物とは異なる新たな規定が必要であろう。

果実品質の向上は、果樹の育種では最大の課題であるが、この中で、特に日持ち性の向上は形質転換技術の利用が期待される分野である。ポリガラクチュロナーゼ遺伝子のアンチセンス遺伝子の導入によって日持ち性を向上させたトマトの例 (Smith et al., 1988, 1990) は有名であるが、最近、果樹においても、果実の軟化に関与するさまざまな遺伝子について単離解析が進められていることから、これらの遺伝子の発現抑制による日持ち性の向上が期待されている。さらに、果実の糖集積に関する分子生物学的な研究も進められている (Kanayama, 1998) ことから、分子育種による高糖系果実品種の育成も

可能になるかもしれない。

また、より実用的な形質転換体を得るためには導入遺伝子の発現調節についても考慮する必要がある。遺伝子の発現を制御するためのプロモーターとしては、これまでは構成的に発現する CaMV 35S プロモーターまたは nos プロモーターを使用している場合がほとんどであった。しかし、果樹の生育期間が長いことから、果樹の生育期間を通した導入遺伝子の発現や果実での発現についてはほとんど調査されておらず、今後はこの点について調査する必要がある。その他のプロモーターとしては、トマト由来の果実特異的に発現するプロモーターを用いたラズベリーの例 (Mathews et al., 1995) があるが、今後さまざまなプロモーターの開発が進めば、目的に応じて器官特異的にまたは生育ステージ特異的に遺伝子発現をコントロールすることが可能となり、より実用的な品種の育成が行われるものと考えられる。

形質転換技術を実際の育種に利用していくためには、導入した遺伝子が安定して機能し、後代にも安定して遺伝することが必要である。しかし、形質転換体では、キメラ構造が原因で、後代への遺伝が不安定になる例が報告されている (Dong and McHughen, 1993; Schmidt and Willmitzer, 1988)。また、外来遺伝子の発現レベルは個体によって異なり、導入した遺伝子の不活化が生じやすいことが知られている (Finnegan and McElroy, 1994; Flavell, 1994; Meyer, 1995)。果樹では長期にわたって形質転換体の外来遺伝子の発現を検討した報告はないが、タバコ属植物を用いた実験で、植物体が成長する過程で GUS 遺伝子の発現が不活化する現象が報告されている (Balandin and Castresana, 1997; Elmayan and Vaucheret, 1996; Kunz et al., 1996)。トレニアでも同様な

現象が報告され、GUS 遺伝子発現量が高い個体ほど早期に不活化が生じることが明らかにされている(間, 1997)。また、小麦では同じクローン由来の細胞間で遺伝子発現レベルが異なるという報告(Mueller et al., 1996)がなされており、このような現象は栄養繁殖で増殖する果樹では特に問題が大きい。遺伝子の不活化は、いくつかの異なるメカニズムによって生じており、どの植物種でも起こりうるということが明らかになりつつあり(Matcke and Matcke, 1995; Meyer and Saedler, 1996; Stam et al., 1997)、果樹も例外ではないと考えられる。遺伝子発現の不活化は、形質転換によって有用遺伝子を導入、発現させる場合には、非常に不都合な現象であり、実際の育種の場面では、不活化を生じない系統を選抜するなどの対策が必要である。

形質転換法は植物に限らず全生物種のどんな遺伝子でも利用できるため、得られた形質転換体において予期できない形質や特性が現れる可能性が考えられる。特に果樹の場合、生の果実を食することがほとんどであるため、組換え食品としての安全性は厳しく審査する必要がある。また、最近 BT トキシンを導入したトウモロコシの花粉を食べたチョウの死亡率が高まったという報告(Losey et al., 1999)がなされ、組換え農作物の環境に及ぼす影響について様々な議論がなされている。他にも、導入した遺伝子が組換え農作物から近縁の野生種へと交雑によって拡散するという報告(Bergelson et al., 1998; Chèvre et al., 1997; Mikkelsen et al., 1996)、極めて低い頻度であるが、導入した遺伝子が組換え農作物から植物病原微生物へと水平移動する可能性があるという報告(Hoffmann et al., 1994; Nielsen et al., 1998; Schlüter et al., 1995)がなされている。組換え農作物が一般に栽培されるようになってからまだ数年であり、これらの環境に及ぼす影響に

については、今後さらに追跡調査する必要がある。特に果樹のように長年にわたって圃場で栽培される作物については、より長期的な調査が必要であろう。我が国の形質転換植物体に関する安全性評価システムは3段階から成り立っている。研究段階では、科学技術庁または文部省の「組換え DNA 実験指針」に基づいて、遺伝子組み換え実験は行われており、閉鎖系実験から非閉鎖系実験へと研究は進められ、非形質転換体と形質転換体との性質・成分の比較が行われる。その後、形質転換体そのものの利用を図る場合は、農林水産省の「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、形質転換体を屋外の隔離圃場に移し、環境に対する安全性評価が行われる。さらに、食品としての利用を図る場合は、厚生省の「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」に基づいて、既存の食品とその成分を比較し、食品としての安全性評価が行われる。研究段階での安全性評価には、花や果実に関する評価が含まれているが、果樹は花芽を着けるためにある程度の加齢と樹体の大きさが必要であること、落葉果樹では生育に低温が必要であることなどの理由から、我が国において作出された果樹の形質転換体で実用化に向けて安全性評価を行っているものはまだない。唯一、米国で遺伝子改変されたウィルス病抵抗性パパイヤについて、国際農林水産業研究センター沖縄支場の隔離圃場において現在安全性評価が行われているところであり、今後、得られた形質転換体の安全性評価を積極的に進めていく必要がある。また、今後の育種目標に沿った実用的な品種を育成するためには、形質転換体を交配母本とし、通常の交雑育種を行うことが必要になると考えられ、従来の育種体制とうまく組み合わせ、形質転換法を利用していくことが必要であ

る。

また、形質転換体の実用化には特許の問題は避けて通れない。特許は形質転換法自体にも、導入した遺伝子にもかけられているため、形質転換体を実用化する場合、莫大な特許料を支払わなければならない可能性がある。将来これらの問題が解決されれば、形質転換技術の果樹育種への利用が急速に進むものと考えられる。