

氏 名 杉 田 耕 一

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大乙第89号

学位授与の日付 平成13年3月23日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目 MATベクターシステムによる選抜マーカー・フリー  
形質転換植物の作出

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	西村 幹夫
	教授	堀内 嵩
	教授	飯田 滋
	教授	長谷部 光泰

## 論文内容の要旨

形質転換植物は、急速に進む人口増加や飼料用作物の需要増加に伴う食料不足を解決できる手段として注目されている。1996年に開始された形質転換植物の商業用作付は、1999年には世界耕地面積の2.5%にも達する急速な進展を遂げている。現在までに商品化されている形質転換植物は、害虫耐性や除草剤耐性が付与されている。これら形質転換植物により効率的で安定的な収穫が実現されている。しかしながら、最近では、ヨーロッパ諸国や日本を中心とする先進諸国の消費者の間に、形質転換植物に対する漠然とした不安感が広まりつつある。その1つの原因は、現在までに商品化されている形質転換植物のメリットを消費者が実感できないからだと推測されている。害虫耐性や除草剤耐性は、生産者サイドにメリットが大きい第一世代の形質転換植物であった。したがって、高栄養化や健康増進機能が付与された形質転換植物や、医薬品や工業製品を生産できる次世代の形質転換植物などの消費者にメリットが感じられる次世代形質転換植物の商品化により消費者の不安を払拭できると考えられている。

また、形質転換植物を推進するためには、有用遺伝子自体の性質だけでなく、有用遺伝子の導入技術を含む第二世代の形質転換植物作成システムの開発も重要である。現在商品化されている形質転換植物は、有用遺伝子と共に細菌由来の抗生物質耐性遺伝子などの選抜マーカー遺伝子が残留し発現している。そのため、食品としての安全性や、抗生物質耐性遺伝子の自然界への伝播を危惧する報告もある。彼らは、このような問題点を解決するため、選抜マーカー遺伝子は削除され有用遺伝子のみが残留した選抜マーカー・フリー組換え植物(MF植物)を作成するため *ipt* 型MATベクターシステムを開発した。

従来の形質転換システムでは、抗生物質耐性や除草剤耐性遺伝子が選抜マーカー遺伝子として用いられてきた。それに対し、*ipt* 型MATベクターシステムでは、サイトカイニン合成酵素 isopentenyl transferase (*ipt*) 遺伝子を選抜マーカー遺伝子として用いていることが特徴である。*ipt* 遺伝子は、未だ植物からは単離されておらず、*ipt* 型MATベクターではアグロバクテリウムのT-DNAから単離した *ipt* 遺伝子が利用されている。*ipt* 遺伝子は、植物の傷口に感染し根頭癌腫病を引き起こす土壌細菌アグロバクテリウムの Ti-plasmid のT-DNA上に存在する腫瘍化遺伝子の一つである。CaMV 35Sプロモーターにより *ipt* 遺伝子が過剰発現すると、植物ホルモンのフリー培地で不定芽分化が生じ、それらは発根せず頂芽優性が崩壊した芽の集合体(多芽体)となる。すなわち、*ipt* 型MATベクターシステムでは、*ipt* 遺伝子と共に有用遺伝子を導入し、植物ホルモンのフリー培地で形成された多芽体を肉眼で選抜すれば、有用遺伝子が導入された形質転換芽を選抜することができる。さらに、*ipt* 型MATベクターシステムの第2の特徴は、*ipt* 遺伝子をDNA除去因子により除去することにより、発根する正常形態の芽を出現させることである。この際 *ipt* 型MATベクターでは、有用遺伝子がDNA除去因子外に配置されているため、選抜マーカー *ipt* 遺伝子が除去されても有用遺伝子は形質転換植物染色体に保持されたままとなる。すなわち、*ipt* 型MATベクターシステムにより、交配を経由することなくMF植物を作成することが可能になった。本論文では、タバコ及び樹木アスペンを材料として用い、*ipt* 型MATベクターシステムの有用性が報告されている。

第1章では、*ipt* 遺伝子の除去因子としてトウモロコシの転移因子 *Ac/Ds* 系を利用した

*ipt* 型 M A T ベクターが構築され、タバコ及び樹木アスペンで有用性が検討された。その結果、*Ac/Ds* 系による *ipt* 遺伝子の除去により MF 植物が得られることが判明した。しかしながら、その作成効率は極めて低く実用化レベルに達しなかった。

第 2 章では、*ipt* 遺伝子の除去因子として酵母由来の部位特異的組換え系 *R/RS* を利用した *ipt* 型 M A T ベクターが構築され、タバコで有用性が検討された。*R/RS* 系の組換え酵素遺伝子 *R* のプロモーターとして、CaMV35S プロモーターが利用された。その結果、高効率で MF 植物が出現し、*R/RS* 系が *ipt* 型 M A T ベクターシステムに適した組換え系であることが示された。しかし、*R/RS* 系の高効率が、逆に有用遺伝子 (T-DNA) の多コピー化を引き起こすということも判明した。

第 3 章では、*R/RS* 系の組換え酵素遺伝子 *R* のプロモーターとして、トウモロコシ由来の GST-II-27 プロモーターを利用した G S T - M A T ベクターが構築され、タバコで有用性が検討された。GST-II-27 プロモーターは、除草剤解毒剤 "safener" により誘導される誘導型プロモーターである。その結果、効率よく MF 植物が出現し、しかも有用遺伝子が低コピーで導入されていることが判明した。

また、MF 植物作成システムは、同一選抜マーカー遺伝子を用いた遺伝子導入の繰り返しを可能にする。現在商品化されている形質転換植物の大部分は、一つの有用遺伝子が導入されている。しかしながら、今後は様々な有用遺伝子の組合せや、複雑な 2 次代謝系遺伝子群の改変のため、遺伝子多重導入システムが必要不可欠と考えられる。

そこで第 4 章では、*ipt* 型 M A T ベクターシステムによる遺伝子多重導入システムの有用性が検討された。第 2 章において *ipt* 型 M A T ベクターによりモデル遺伝子である GUS 遺伝子と  $Km^r$  遺伝子が導入された MF タバコ植物に対し、G S T - M A T ベクターにより GFP 遺伝子が多重導入された。その結果、GFP 遺伝子が多重導入された MF 植物を作成することに成功した。

以上の結果から、*ipt* 型 M A T ベクターシステムは交配が不必要な実用的 MF 植物作成システムであることが示された。また同時に、同一の選抜マーカー遺伝子を用いた遺伝子多重導入システムとしても有用であることも報告された。また、モデル植物であるタバコだけでなくアスペンでも実用性が示されたことから、様々な植物種に適用できると考えられる。特に、非交配のシステムであることから、ポテトなど栄養繁殖植物への応用が期待される。

現行の多くの形質転換植物は、導入有用遺伝子と共に抗生物質耐性遺伝子などの選抜マーカ－遺伝子が残留し発現しており、食品としての安全性や抗生物質耐性遺伝子の自然界への伝播を危惧する報告もある。この問題点を解決するため、選抜マーカ－遺伝子は削除され有用遺伝子のみが残留した選抜マーカ－・フリー組換え植物 (MF 植物) 作成用の ipt 型 MAT ベクターシステムを開発した。この ipt 型 MAT ベクターシステムでは、サイトカニン合成酵素 isopentenyl transferase (ipt) 遺伝子を選抜マーカ－遺伝子として用いる。ipt 遺伝子は、未だ植物からは単離されていないので、本論文では植物に根頭癌腫病を引き起こす土壤細菌アグロバクテリウムの T-DNA 上の腫瘍化遺伝子の一つである ipt 遺伝子を利用している。CaMV35S プロモーターにより ipt 遺伝子が過剰発現すると、植物ホルモンフリー培地で不定芽分化が生じ、それらは発根せず頂芽優性が崩壊した芽の集合体 (多芽体) を形成するので、ipt 遺伝子と共に有用遺伝子を導入し、植物ホルモンフリー培地で形成された多芽体を肉眼で選抜して有用遺伝子が導入された形質転換芽を選抜する。次いで、ipt 遺伝子を DNA 除去因子により除去させて、有用遺伝子を保持しながら、発根する正常形態の芽を出現させて形質転換植物を作出させる。すなわち、ipt 型 MAT ベクターシステムは交配を経由することなく MF 植物を作成するシステムである。さらに本論文では、タバコ及び樹木アスペンを材料として使い、ipt 型 MAT ベクターシステムの有用性を検討している。

第 1 章では、ipt 遺伝子の除去因子としてトウモロコシの転移因子 Ac/Ds 系を利用した MAT ベクターを構築し、タバコ及び樹木アスペンで有用性を検討した。その結果、MF 植物が得られることを示し得たが、作成効率は極めて低いことが判明した。

第 2 章では、ipt 遺伝子の除去因子として酵母由来の部位特異的組換え系を利用した MAT ベクターを構築し、タバコで有用性を検討した。その結果、高効率で MF 植物を作出し得たが、導入有用遺伝子の多コピー化が起こっていることも判明した。

第 3 章では、導入有用遺伝子の多コピー化を抑制するため、部位特異的組換え酵素遺伝子の発現を除草剤解毒剤 safener により誘導できるトウモロコシの GST-II-27 プロモーターを用いて制御する GST-MAT ベクターを構築して、タバコで有用性を検討した。その結果、導入有用遺伝子のコピーが低い MF 植物を効率よく作出できることが判明した。

第 4 章では、MAT ベクターシステムによる遺伝子多重導入システムの有用性を検討した。その結果、モデル遺伝子である GUS 遺伝子と Kmr 遺伝子が導入された MF タバコ植物に、GST-MAT ベクターにより GFP 遺伝子を多重導入し、GFP 遺伝子が多重導入された MF 植物を作成することに成功した。

本研究により開発された MAT ベクターシステムは実用的 MF 植物作成システムであり同一の選抜マーカ－遺伝子を用いた遺伝子多重導入システムとしても有用であることが示されたことから、審査委員会は本論文が学位論文として十分な内容をもつものと判定した。

学位論文として提出された研究結果について申請者による口頭発表後、審査委員が論文の内容、次いで関連研究分野の一般的知識とその背景となる基礎的知識について口頭試問により審査を行った。これらの試問に対する申請者の応答はいずれも明解かつ的確であった。これらの結果をもとに、審査委員会は申請者が学位取得に十分な学識と研究遂行能力

をもつものと判定した。

英語の能力に関しても、発表論文などから博士の学位に足る十分な能力を有するものと判定した。