

細胞・組織培養技術を利用した小豆の新育種素材の作出

背景と研究ニーズ

水稻、小麦、ばれいしょ、豆類など主要作物の品種改良は、主として交雑育種法により行われています。近年バイオテクノロジーの進展はめざましく、作物育種への利用も可能になってきました。薬培養によって育種年限を短縮することができ、胚培養は交配困難な遠縁交雑を可能にしました。また、除草剤耐性や耐病性の細胞レベルでの選抜の可能性が示唆されており、さらに細胞融合や遺伝子組換えによる新たな育種素材の作出が可能となっています。これらのバイオテクノロジー技術が育種技術として使われるためには個々の作物に適した手法の開発が必要です。

試験場の開発成果

中央農試では昭和62年から畑作物を中心に細胞・組織培養技術の開発研究に着手しています。ここでは小豆の培養系の開発、遺伝子導入法の現状を紹介します。

無菌的に発芽させた小豆の上胚軸（茎の一部）をオーキシシン（2, 4-D）を含むMS培地（組織培養で一般的に使われている培地）に植えてカルス（細胞の塊り）を誘導します。カルスは同じ培地で数回継代した後、サイトカイニン（BAP）を含む再分化培地に移し不定芽を形成させます。培養2か月後の植物体再分化率は最も高い場合には80%でした。現在は上記カルスの液体培養細胞を酵素液で処理しプロトプラスト（裸の細胞）にした後、再び植物体にする培養系もエリモショウズ、カムイダイナゴンなど数品種で確立しています。このプロトプラストから再び植物体を作る技術は、細胞選抜や遺伝子導入などの基礎技術として大変重要ですが、非常に難かしいため小豆以外の豆類ではまだ確立されていません。

また前述の上胚軸をサイトカイニン（BAP）を含むMS培地に直接植えて、カルスを経由せずに不定芽を形成する培養系も同時に確立しました。不定芽の形成率はハヤテショウズ、ベニダイナゴンなどの反応の良い品種では約90%の高率でしたが14品種平均ではその半分にとどまりました。

遺伝子導入法には生物的な方法（アグロバクテリウム：を用いる）と物理的な方法（エレクトロポレーション法など）がありますが、小豆では前者により進めています。遺伝子を組み込んだアグロバクテリウム（土壌細菌の一種）を小豆の上胚軸に感染させて遺伝子を導入します。現在、小豆子実を食害するアズキゾウムシの耐虫性遺伝子を用いて抵抗性の小豆を作っています。

今後の展望と課題

小麦、大豆、菜豆、てん菜は細胞・組織培養の難かしい作物ですが、現在、培地・培養条件を検討しており早い時期に培養系を確立する予定です。また、培養系が確立されているばれいしょ、小豆では培養変異を利用するとともに、細胞選抜や遺伝子導入により病虫害耐性などの新しい育種素材の作出を進めています。

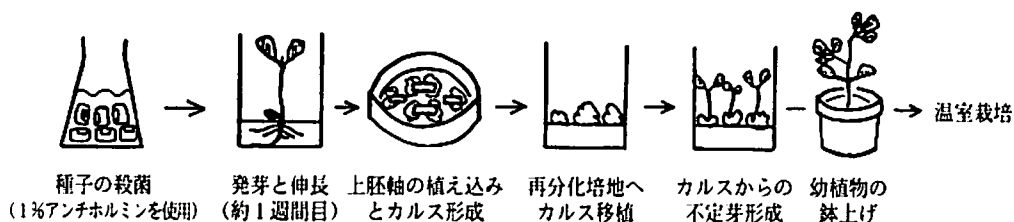


図1 小豆上胚軸カルスからの植物体再分化

表1 ハツネショウス上胚軸カルスからの再分化

BAP 濃度 (mg/l)	shoot ^{a)} (個)	shoot ^{b)} (個)	鉢上げ 固体 ^{c)} (個)	収穫 固体 (個)	採種数 (粒)
0.1	1	3	12	11	40
0.5	1	3	10	9	27
1.0	3	17	40	38	121
5.0	0	4	25	20	62
10.0	0	3	5	3	12

供試カルス数は50個

a) カルス置床後2カ月

b) カルス置床後4カ月

c) カルス置床後10カ月

表2 アグロバクテリウム感染による形質転換効率

アグロバクテリウム	品 種 名	不 定 芽 形成率 (%)	形 質 転 換 率 (%)
無 感 染	エリモショウス	49/52 (94%)* ¹	0/10 (0%)* ²
	ハツネショウス	40/51 (78%)	0/10 (0%)
感 染	エリモショウス	19/30 (63%)	12/19 (63%)
	ハツネショウス	16/30 (53%)	6/16 (38%)

* 1 不定芽形成切片数/置床切片数

* 2 発根切片数/置床切片数

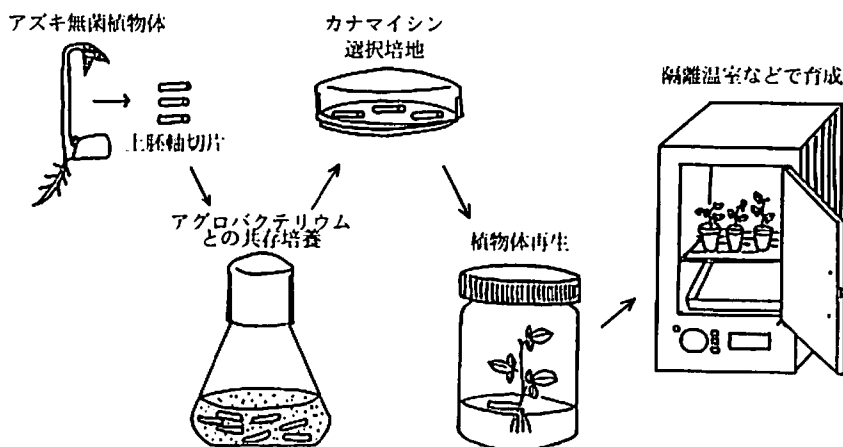


図2 アグロバクテリウムの感染方法と形質転換体の作出

てん菜そう根病の生物防除

背景と研究ニーズ

基幹作物としてのてん菜は、より一層の安定生産が求められていますが、最近、そう根病の被害が目立ち、栽培上の大きな問題になっています。

そう根病はカビの一種ポリミキサ菌でうつされるウイルス病で、適切な防除法がなく、また発病すると被害が大きく、特に根中糖分を著しく低下させます。病原菌は土の中で長期間生存し、一度汚染されると他の作物を10年近く栽培しても回復することがありません。発生圃場は作付面積の約20%に及んでおり、中にはてん菜の栽培を中止せざるを得ないところもあり、このまま進行すればてん菜原料の確保が困難になる恐れもあります。そのため、そう根病の防除法、特に生物防除技術の開発が強く求められています。

試験場の開発成果

そう根病の病原ウイルス（BNYVV）は、桿状で外被蛋白と核酸（RNA 遺伝子）から成りたっています。ウイルスには通常、サイズの異なる4種類のRNA（RNA-1、-2、-3、-4）が存在し、RNA-1は複製、RNA-2は外被蛋白、RNA-3は病原性、RNA-4は菌伝搬性に各々関与していることを明らかにしました。さらに病原性に関与するRNA-3遺伝子を除くと弱毒ウイルスになることがわかりました。

さらにRNA-3遺伝子の解析を進め、全塩基配列を決定しました。その結果、このRNA-3は1775塩基から成り、447番目から1107番目までの660塩基が分子量25kの蛋白質を作成し、この蛋白質の発現が病徴発現に関わっていることを突き止めました。そこでこの蛋白質を作る領域363塩基が欠失した遺伝子を見つけ、RNA-3 cと命名し、それを用いた弱毒ウイルス（RNA+1+2+3 c+4）を作りました。

このウィルスは通常の汁液接種では感染させることができないため、ポリミキサ菌に弱毒ウィルスを保有させ、てん菜の幼苗に接種を行い発病圃場で栽培し検定した結果、対照の無接種区と比べ、高い防除効果が認められました。このことから、RNA-3の内部欠失遺伝子が新しい弱毒ウイルスとして働くことを発見しました。

今後の展望と課題

本研究の結果、干渉性欠失遺伝子を用いた弱毒ウイルスの作出に成功しました。今後は弱毒ウイルスの圃場での実証試験を行い、実用化技術として発展させる必要があります。さらに将来は、遺伝子工学を利用したウイルスの人工改変、ウイルス遺伝子を利用した抵抗性品種作出への発展が期待されます。

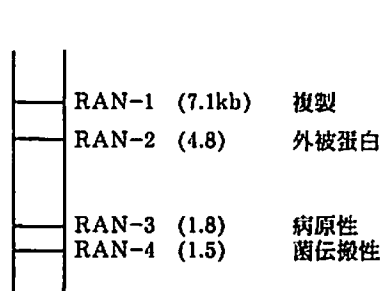


図1 ウイルス遺伝子の種類と機能

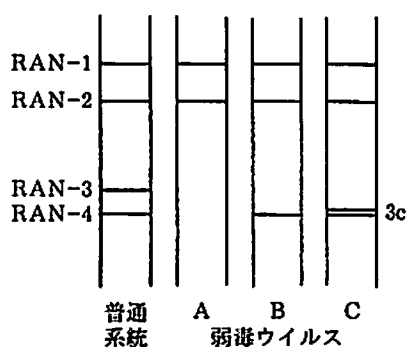


図2 弱毒ウイルスのRAN組成
(アガロースゲル電気泳動)

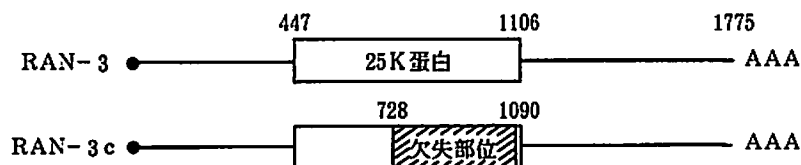


図3 RAN-3 とRAN-3cの遺伝子地図

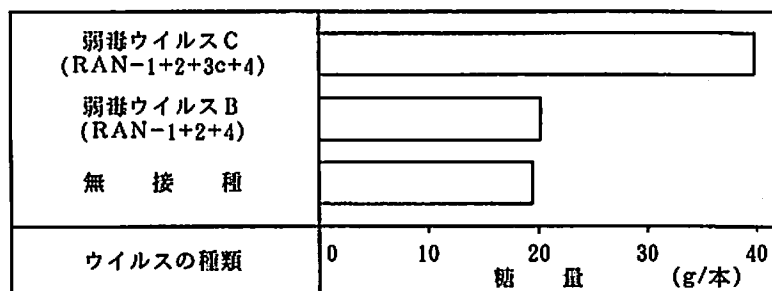


図4 弱毒ウイルスの防除効果

主な普及奨励・指導参考事項（本単位の内容に関わる課題、年次）

本研究の一部は、日本甜菜製糖株式会社総合研究所との共同研究として実施し、その成果の一部を共同で特許出願をしました。

平成2年3月26日付

「そう根病の防除剤とその製法および防除方法並びにこれを用いるBNYVV弱毒ウイルスとその作出」

平成4年1月予定

「干渉性欠失遺伝子を用いた弱毒ウイルスとその利用」