解説

遺伝子組換え技術を利用した綿繊維特性の改良

春日部芳久・猪原 泉・前川宜彦

1. はじめに

通常、綿繊維はゴシピウム属に属する綿花を栽培し、樹上に得られた蒴果(コットンボール)より収穫される。綿花には種々の品種があり、それぞれ異なった繊維特性を有し、その繊維特性に応じて各種用途に使い分けられている。綿花の主な栽培品種の繊維特性を表1にまとめた。綿繊維は種々の特性値によって特徴づけられるが、その中でも、特に重要なものとして繊維長、繊度(太さ)、強度が挙げられる。現在の繊維特性が改善された綿花の栽培品種はほとんどが交配育種によって作り出されている。しかしながら、近年の遺伝子工学のめざましい進展により、遺伝子組換えによる綿花新品種の開発が可能となり、従来の交配技術では不可能であった品種改良が行われ始めている。

綿花への遺伝子導入が1987年に報告され、以来、米国

表1 綿花の主な栽培種の繊維特性

種類	品種	繊維長 (Inches)	繊維強度 (Grams/Text/ 8Gage)	繊度 (Range)
アップランド綿	Acala	1.13-1.19	26-31	3.2-4.2
	Deltapine	1.10-1.16	26-32	3.8-4.8
	Stoneville	1.06-1.13	24-31	3.7-4.8
	Coker	1.09-1.16	25-28	3.7-4.7
海島綿	Sea island	1.50-1.60	39	3.2-3.4
スーパーマ綿	S-7	1.38-1.50	38	3.5-4.9

の企業を中心に実用化へ向けた激しい研究開発競争が行われている。企業が遺伝子組換え綿花の開発に力を注いだ背景には、綿花は米国では主要な作物であり非常に大きな市場であること、さらに、綿花は農作物であるが主製品が食品でないことから、遺伝子組換え植物のパブリックアクセプタンスや国の認可が容易であったことが考えられる。

現在開発されている遺伝子組換え綿花を表2にまとめた。遺伝子組換え技術により害虫抵抗性BT毒素(Bacillus thuringiensis産生殺虫性タンパク毒素)産生綿花、プロモキシニル除草剤抵抗性綿花が1996年に商品化され、1997年にはグリフォセート除草剤抵抗性綿花が商品化され、急速に商業栽培されている。1998年には米国の作付け面積の5割～6割が遺伝子組換え綿花に置き換わったと報

表2 遺伝子組換え綿花の研究開発状況

開発者	付与する形質	特徴	備考
モンサント社	害虫抵抗性	BT毒素産生	商品化 (1996年)
カルジーン社	除草剤抵抗性	プロモキシニル耐性	商品化 (1996年)
モンサント社		グリフォセート耐性	商品化 (1997年)
デュポン社		スルファニルウレア耐性	
アグラシアタス社	保温性向上	ポリエステル様物質産生	
アグラシアタス社	繊維強度向上	ペルオキシダーゼ産生	
カルジーン社	繊維着色	メラニン産生

春日部芳久

Improvement of Cotton Fiber Properties by Genetic Engineering

著者紹介 YOSHIHISA KASUKABE*, IZUMI IHARA** and YOSHIHIKO MAEKAWA***

Toyobo Research Center, Toyobo Co., Ltd.

東洋紡績株式会社総合研究所 *研究員, **主席部員, ***研究主幹 工学博士

本稿では、遺伝子組換え技術による綿花の新品種開発の可能性と最近注目されている植物ホルモン“ブラシノステロイド”の綿花への応用について紹介していただいた。

告された。これらの遺伝子組換え綿花は第1世代とも言えるべきもので、比較的開発の容易なものであった。何故なら目的の形質を与えるためのメカニズムが明らかになっている遺伝子を導入し、それを恒常的に発現させればその効果が得られるからである。

今後遺伝子組換え綿花の研究が行われる分野は、繊維品質の改良、多収性の付与、早期収穫性の付与、雄性不稔性の付与、環境ストレス抵抗性の付与した綿花の開発であり、第2世代とも言えるべきものである。例えばモンサント社(アグラシータス社)の繊維中にポリエステル様物質を発現させ保温性の向上した綿花の開発¹⁾、ペルオキシダーゼ遺伝子を導入し強度を高めた綿花の開発²⁾、カルジーン社のメラニン生産制御遺伝子を導入し着色性綿花の開発³⁾などがある。

筆者らは第2世代の分野である繊維特性の改良として特に重要な特性値である繊維長と繊維強度に着目し、最近の遺伝子組換え技術による“より長く”“より強い”繊維を産する綿花の開発をこれまで研究してきた。その一端を以下に紹介する。

2. 遺伝子組換えによる繊維特性の改良

2.1 繊維伸長および形成に関与する新規遺伝子

綿花の繊維特性を改良するためには、まず繊維伸長のメカニズムを遺伝子レベルで明らかにする必要がある。綿繊維は胚珠の表皮細胞が分化した単一細胞であり、開花直後から伸長開始(initiation)、伸長(elongation)、肥厚(secondary thickening)、成熟(maturation)の4段階を経て成熟した1本のワタ繊維となる。すでに遺伝子レベルでの研究は幾つか行われているが⁴⁻⁷⁾、まだまだ不明な点が多い。筆者らは伸長開始と伸長段階の胚珠では繊維伸長あるいは形成に関わる種々の遺伝子が活発に発現していると考え、繊維伸長が盛んな時期と完全に停止した時期の胚珠を用い、ディファレンシャルスクリーニング法により繊維長、強度などの点で優れているスーパー綿から繊維伸長あるいは形成に関与する遺伝子の取得を行った。

繊維伸長中の胚珠をポジティブサンプル、繊維伸長が停止している胚珠をネガティブサンプルとして採取した。ポジティブサンプルからはcDNAライブラリーとプローブを、ネガティブサンプルからはプローブのみを調製しディファレンシャルスクリーニングを行った。ポジティブサンプルから作製したプローブとより強くハイブリダイズしたクローンを陽性クローンとして選抜した(図1参照)。選抜した陽性クローンについて発現部位と発現時期をノーザン解析し、特に繊維伸長に関与していると考えられる4つのクローンをそれぞれKC22, KC03, KC18, KC

矢印は陽性(特異的)クローンを示す

図1 繊維伸長に関与する遺伝子の取得方法

17と命名した。

KC22は小豆やトマトなどのキシログルカントランスフェラーゼ遺伝子⁸⁾、シロイヌナズナの頂端分裂組織に特異的に発現するmeri-5⁹⁾、植物ホルモンのブラシノステロイドで特異的に発現誘導されるBRU1¹⁰⁾と部分的な相同性を示した。キシログルカントランスフェラーゼは細胞伸長中の組織に多く発現し、細胞壁の構成成分であるキシログルカンの置き換えを触媒する酵素である。

KC03はトマトのエクステンシン¹¹⁾と相同性を示した。エクステンシンは細胞壁に存在するヒドロキシプロリンを多量に含む糖タンパク質であり、はっきりとした機能はまだわかっていないが、細胞の伸展性に関与するコラーゲン様タンパク質と想像されている。

KC18はナタネの英から単離されたSAC25遺伝子¹²⁾と高い相同性を示した。SAC25遺伝子は英の裂開組織に特異的に発現し、英の発達により伴い発現量が増加する。英

裂開部の細胞壁のゆるみに関与していると推定されている。

KC17はmyb様遺伝子¹³⁾と高い相同性を示した、myb様遺伝子はDNA結合蛋白質をコードしており、最近の研究では転写因子の一つと考えられシードトライコーム(綿繊維)の分化や伸長に関与すると考えられている。

特にKC22は細胞生長過程の細胞壁構築に関与するキシログルカントランスフェラーゼ遺伝子と部分相同性を示したことから、綿繊維から単離したKC22は繊維伸長過程に関わる遺伝子である可能性が高い。

2.2 細胞生長制御に関与する既知遺伝子

2.1の新規遺伝子の他に細胞生長制御に関与する遺伝子として、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ遺伝子(prxCla)¹⁴⁾とエンドウ由来のカタラーゼ遺伝子(CAT)¹⁵⁾が考えられた。

ペルオキシダーゼは細胞壁酵素の一つであり、細胞壁中ではイオン結合あるいは共有結合で存在し、リグニン形成や細胞壁の堅固作用に関与すると考えられている。西洋ワサビペルオキシダーゼのアイソザイム遺伝子であるprxClaは植物の生長性に関与することが示唆されている¹⁶⁾。

カタラーゼはミクロボディに局在し、代謝上産生される毒性H₂O₂を水と酸素に分解する無毒化酵素である。CATの機能は十分明らかになっていないが、著者らは細胞壁の堅固作用に関与すると推定されている細胞壁酵素ペルオキシダーゼの作用をCATは基質レベルでコントロ

ールできると推定した。

2.3 トランスジェニックコットンの作製

ディファレンシャルスクリーニングで単離した遺伝子の一つであるKC22、CATおよびprxClaを綿花に導入し、トランスジェニックコットンを作製することとした。綿花はカルスから植物体の再生が非常に困難であり、当時再生が可能な品種は限られており、コーカー種やアカラ種(いずれもアップランド綿)で成功していた¹⁷⁻¹⁹⁾。外来遺伝子の導入についてはアグロバクテリウム法^{20,21)}とパーティクルガン法^{22,23)}が用いられていた。筆者らは宿主としてコーカー種を選択し、遺伝子導入法としてはアグロバクテリウム法を用いて、形質転換を行った。作製方法の概要を図2に示した。なお、トランスジェニックコットンの作製は米国テキサス工科大学との共同研究で行った。また、発現を調節するプロモーターとしてカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを用いた。

2.4 トランスジェニックコットンの野外試験

作製したトランスジェニックコットンを最初に閉鎖系温室で試験栽培し、導入遺伝子の確認と得られた綿の繊維特性の分析を行った。温室レベルの試験栽培で繊維長や強度に変化が見られ、導入遺伝子が安定して発現している形質転換体を選抜した。選抜した形質転換体からT₁種子を取得し、T₁種子を調べ確実に目的遺伝子が組み込まれているセルラインを選び出した。

選抜したセルラインの種子を用いて隔離圃場で野外試験を行った。選抜した種子を播種し、綿花を生長させて

図2 遺伝子組換え綿花の作製方法の概略

開花後、自家受粉を行いコットンボールを得、開じょしたコットンボールからワタを採取した。採取したワタはマシンジニングを行い得られた綿繊維について繊維長、繊維強度を測定した。測定結果を表3にまとめた。その結果、KC22を導入した形質転換体はすべてのセルラインで顕著に繊維長が非形質転換体に比べて増大していることが明らかとなった。CATを導入した形質転換体は全てのセルラインで顕著に繊維強度が非形質転換体に比べて増大していることが明らかとなった。prxClaを導入した形質転換体はすべてのセルラインで顕著に繊維長が非形質転換体に比べて増大していることが明らかとなった。

表3 トランスジェニックコットンから得られた綿繊維の特性評価

導入遺伝子	セルライン	繊維長 (inches)	繊維強度 (1000Lbs/in ²)
非形質転換体	コーカー312	1.21±0.03	86.4±2.6
KC22	7-114#5-34	1.31±0.03	91.0±3.2
	114#41-3	1.35±0.02	87.9±3.3
	114#46-10	1.32±0.03	90.5±2.4
CAT	R-9#15-1	1.20±0.03	95.0±4.4
	9-52-16	1.30±0.03	95.3±5.1
prxCla	11#27-31-1	1.26±0.04	90.9±4.1
	11#14-12C	1.28±0.04	88.7±3.2
	11#14-12A	1.31±0.02	88.6±1.5

以上の結果より、KC22、CATおよびprxClaが綿花の繊維特性の改良に有効であることがわかった。現在、著者らは本試験で得られた効果の再現性や安定性を確認中である。さらに、ディファレンシャルスクリーニングで取得した新規遺伝子、KC18、KC17などについても綿花における効果の確認を行う予定である。

3. ブラシノステロイドによる繊維特性の改良

これまで遺伝子組換え技術を利用した綿新品種の育種について述べてきたが、遺伝子組換えによる新品種の開発およびその実用化には非常に多くの時間を必要とする。そのため筆者らはこれと並行して植物ホルモンの一種であるブラシノステロイドを利用した繊維特性の改善についても検討を行ったので、その概要について紹介する。

ブラシノステロイドの一種であるブラシノライドがミッチェルやマンダーバラによってセイヨウアブラナの花粉より発見され²⁴⁾、その後、多くの植物で同様の物質が確認された。これまでに40種以上のブラシノステロイド類縁体が見いだされている²⁵⁾。ブラシノステロイドは一般的には植物の成長や分化に重要な役割を果たしている

と考えられており、細胞伸長、維管束系の分化、ストレス耐性など様々な生理機能が報告されている²⁶⁾。

筆者らは、ブラシノステロイドの細胞伸長作用に着目し、綿花への散布処理による繊維特性への影響を調べた。スーピマ綿を播種し、開花後2日目から20日目までコットンボールにブラシノステロイド水溶液を散布し、得られた綿繊維について繊維長、強度、織度を測定した。測定結果を表4にまとめた。その結果、繊維長、強度、織度のいずれもが未処理に比べて、顕著に増大していることがわかった。さらに、データは示さないが、繊維をほとんど形成しない突然変異体品種に同様の処理を施すと、繊維の形成がかなり回復することもわかった。

表4 ブラシノライドの繊維特性に及ぼす効果

処理剤	濃度 (ppm)	繊維長 (inches)	繊維強度 (Grams/Tex1 /8Gage)	織度 (Range)
無処理	0	1.421±0.019	47.604±3.362	4.309±0.086
ブラシノライド	0.01	1.463±0.024	49.402±2.268	4.255±0.067
ブラシノライド	0.1	1.455±0.015	50.373±3.231	4.507±0.069
ブラシノライド	0.5	1.507±0.019	52.133±2.329	4.548±0.040

以上の結果より、ブラシノステロイド処理が綿花の繊維特性改善に有効であることが確認された。著者らは得られた知見に基づいて米国特許(Patent No.5880110)を取得した。実用化にあたっては、さらに処理濃度、散布回数、散布方法などの課題が残っている。本技術は、遺伝子組換えに比べ、安全性やパブリックアクセプタンスの面で有利であるばかりでなく、すでに実用化されている除草剤耐性組換え綿などへの適用も可能な有望な技術であり、綿繊維特性の改良において遺伝子組換えと両輪をなすものと位置づけている。

4. おわりに

綿花の繊維特性改良を目的とする遺伝子組換え技術による育種は、まだ緒についたばかりであり、実用化に向けてはまだ多くの課題が残されている。しかし、これまでの研究で繊維伸長時に特異的に発現している遺伝子を取得でき、その一つであるKC22およびprxClaやCATを綿花に導入することによって、繊維特性を改変できることが明らかになったことは大きな収穫と考えている。

我が国の綿紡績業は東南アジア各国からの輸入攻撃を受け、非常に厳しい環境にある。生き残っていくためには従来品と異なった特徴のある製品の開発が必要である。遺伝子組換えによる綿花新品種の育種は、これからの要望に十分応えることのできるものと期待している。

文 献

- 1) M. E. Jhon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 12768 (1996).
- 2) M. E. Jhon et al., WO 95/08914
- 3) B. M. Martineau et al., US 5, 530, 185
- 4) M. E. Jhon et al., *TIBTECH*, **10**, 165 (1992).
- 5) M. E. Jhon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 5769 (1992)
- 6) M. E. Jhon et al., *Plant Physiol.*, **108**, 669 (1995).
- 7) M. E. Jhon, *Plant Molecular Biology*, **30**, 297 (1996).
- 8) K. Okazawa, K. Nishitani, *J. Biol. Chem.*, **268**, 25364 (1993).
- 9) J. I. Medford et al., *Plant Cell*, **3**, 359 (1991).
- 10) D. M. Zurek, S. D. Clouse, *Plant Physiol.*, **104**, 161 (1994).
- 11) A. M. Showalter et al., *Plant Molecular Biology*, **16**, 547 (1991).
- 12) S. A. Coupe et al., *Plant Molecular Biology*, **24**, 223 (1994).
- 13) S. F. Li et al., *The Plant Journal*, **8**, 963 (1995).
- 14) K. Fujiyama et al., *Eur. J. Biochem.*, **173**, 681 (1988).
- 15) S. H. Isin, R. D. Allen, *Plant Molecular Biology*, **17**, 1263 (1991).
- 16) A. Kawaoka et al., *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 49 (1994).
- 17) R. C. Shoemaker et al., *Plant Cell Reports*, **3**, 178 (1986).
- 18) N. L. Trolinder et al., *Plant Cell Reports*, **6**, 231 (1987).
- 19) J. J. Finer, *Plant Cell Reports*, **7**, 399 (1988).
- 20) E. Firoozabady et al., *Plant Molecular Biology*, **10**, 105 (1987).
- 21) P. Umbeck et al., *BIO/ TECHNOLOGY*, **5**, 263 (1987).
- 22) J. J. Finer et al., *Plant Cell Reports*, **8**, 586 (1990).
- 23) D. E. McCabe, *BIO/ TECHNOLOGY*, **11**, 596 (1993).
- 24) J. W. Mitchell et al., *Nature*, **225**, 1065 (1970).
- 25) S. Fujioka et al., *Nat. Prod. Rep.*, **14**, 1 (1997).
- 26) N. B. Mandava, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**, 23 (1988).

第15回バイオハイブリッド研究会

協 賛：(社)繊維学会他

日 時：平成12年5月30日(火) 10:00~17:30

会 場：メルパルク横浜(郵便貯金会館) 〒231-0023 横浜市中区山下町16番地

TEL: 045-661-8155, FAX: 045-661-1349

JR京浜東北・根岸線・東急東横線桜木町駅下車, タクシー5分

JR根岸線石川町駅下車徒歩12分

研究会参加費：本研究会賛助会員及び協賛学会会員 2,000円, 学生1,000円, 一般3,000円(抄録代を含む)

懇 親 会：18:00~20:00 メルパルク横浜

懇親会費：5,000円

プログラム詳細及び申込方法については下記にお問い合わせ下さい。

参加申込締切：5月15日(2000年)

問い合わせ先：〒225-8502 横浜市青葉区鉄町1614

桐蔭横浜大学桐蔭人間科学工学センター

バイオハイブリッド研究会事務局代表 稲田 祐二

TEL: 045-974-5060, FAX: 045-972-5972