

牧草・飼料作物における バイオテクノロジーの現状と展望

東北農業試験場 牧草育種研究室

山田敏彦

1 はじめに

将来の農業生産を考えると、経費の低コスト化が最も重要な課題であり、高度ストレス耐性、耐病虫害抵抗性、容易な定着性、高栄養性などを有する優良な品種の育成が強く要望されている。バイオテクノロジーは従来からの育種技術に加え、今後、優良な品種の育成に重要な役割を果たすと考えられる。バイオテクノロジーは育種の多くの過程で応用できる技術である。交雑が困難な近縁種からの有用な形質の導入には、接合胚の培養及び細胞融合・遺伝子組換えなどの技術により可能となる。また、各種の耐病虫害性や環境耐性の系統を選抜するには、細胞レベルでの選抜が効率的である。さらに、有用な遺伝資源の増殖・保存にも有効となる。最近では、牧草・飼料作物の育種分野でもバイオテクノロジーに関する研究がさかに行われるようになってきた。

ここでは、バイオテクノロジー研究の進展状況、最近のトピックス、東北農試で行なっているシロ

クローバにおける研究及びバイオテクノロジーの今後の展望について述べる。

2 研究の進展状況

牧草・飼料作物へのバイオテクノロジーの利用は他の作物に比較して遅れていたが、最近では研究が盛んになり、報告も増加している。表1に主な草種における研究の進捗状況を示した。

①カルス、プロトプラスト培養

カルス培養は多くの草種で検討され、ほとんどの草種でカルスから植物体への再分化に成功している。また、プロトプラストからの植物体再分化もいくつかの草種で報告されている。特に、これまで寒地型イネ科牧草ではプロトプラストからの植物体再分化が非常に困難とされてきたが、最近では、主な草種において成功し、我が国でも草地試験場でトールフェスクにおいて植物体への再分化に成功している。このように、バイオテクノロジーの必須条件であるカルス、プロトプラストからの植物体再分化系の確立に伴い、今後、細胞選

抜、細胞融合、遺伝子組換え技術などが開発されると期待される。

②接合胚の培養

種・属間交雑にみられる胚の崩壊などの障害を克服できる技術である接合胚の培養は、クローバ類を中心に検討され、これまでにいくつかの種間雑種植物が作り出されている。

表1 主要な牧草・飼料作物におけるバイオテクノロジー研究の進展状況

| 草種名 | カルス培養 | プロトプラスト培養 | 接合胚の培養 | 薬培養 | 細胞選抜 | 細胞融合 | 細胞融合 | 遺伝子組換え | 茎頂培養 |
|--------------|-------|-----------|--------|-----|------|------|------|--------|------|
| アルファルファ | ◎ | ◎ | ○ | × | ◎ | ○ | ○ | ◎ | |
| アカクローバ | ◎ | ○ | ◎ | × | × | △ | × | ◎ | |
| シロクローバ | ◎ | ◎ | ◎ | × | △ | △ | ○ | ◎ | |
| アルサイククローバ | ◎ | ◎ | ◎ | × | × | △ | × | ◎ | |
| バーズフットトレフォイル | ◎ | ◎ | ○ | × | ○ | △ | ◎ | ◎ | |
| オーチャードグラス | ◎ | ◎ | × | × | × | × | ○ | ◎ | |
| イタリアンライグラス | ◎ | ○ | × | ○ | × | △ | △ | ◎ | |
| ベレニアルライグラス | ◎ | ◎ | ○ | ○ | × | × | × | ◎ | |
| トールフェスク | ◎ | ◎ | ○ | ○ | × | △ | × | ◎ | |
| チモシー | ◎ | × | × | × | × | × | × | ◎ | |
| トウモロコシ | ◎ | ◎ | × | ◎ | ◎ | △ | ○ | ◎ | |

◎：成功した報告が数例ある，○：成功例がある，△：成功していない報告がある，×：報告がない，なお，この場合，成功とは植物体への再生を指す。

③ 薬培養

薬培養は遺伝的変異の固定を容易にするため、自殖系統間の一代雑種により多くの品種が育成されているトウモロコシにおいて、育種年限の短期の目的で研究が盛んに行われている。他の草種では、育種への利点が少ないこともあり、ほとんど研究されていない。

④ 細胞選抜

細胞に各種のストレスを与え、生育できる細胞だけを選抜して目的とする植物体を再分化させて利用する細胞選抜法は、アルファルファを中心として報告がある。これまでに、フザリウム萎ちょう病、パーティシリウム萎ちょう病、耐塩性などについて細胞選抜が行われ植物体が得られている。

⑤ 細胞融合、遺伝子組換え

細胞融合により種間雑種個体を作り出した報告はアルファルファやバーズフットトレフォイルであるが、雑種個体が不稔の場合が多いなどのため、最近では目的とする遺伝子のみを導入する遺伝子組換え技術の開発へ研究の中心がシフトしている。遺伝子組換えはこれまでアルファルファ、バーズフットトレフォイル、オーチャードグラス、トウモロコシなどで成功している。しかしながら、多くの場合、微生物由来の抗生物質耐性遺伝子の導入にすぎず、今後有用な遺伝子の単離、クローニングが急務である。

⑥ 遺伝資源の保存・増殖

合成品種の母本などは栄養系で保存・増殖する必要があり、多くの草種においてウイルスフリー化のための茎頂培養法が確立されている。また、培養中の茎頂組織の低温で保存する方法も検討されている。最近、東北農試ではシロクローバ茎頂における液体窒素を用いた各種の超低温保存法を開発しており、他の草種についても今後その適用が期待されている。

3 最近のトピックス

① トウモロコシにおける遺伝子組換え

最近の植物バイオテクノロジー研究において、最も特筆すべきことは、トウモロコシにおける遺伝子組換え植物の作出の成功であろう。トウモロコシは単子葉植物であるため、アグロバクテリア

ムの Ti プラスミドを用いた遺伝子組換えが困難であった。しかしながら、プロトプラストへ電気パルスを利用して直接遺伝子を導入するエレクトロポレーション法や金属微粒子に DNA をコーティングして高速度で細胞・組織に打ち込むパーティクルガン法が最近相次いで開発された。トウモロコシでは、1988年にアメリカ合衆国のサンド社がエレクトロポレーション法により外来遺伝子の導入した植物を作り出すことに成功したが、植物は不稔であった。その後、1990年になるとパーティクルガン法により、アメリカ農務省やデカルブ社で相次いで稔性のある組換え植物が作り出された。デカルブ社ではグルタミン合成酵素を阻害する除草剤であるビアラフォスに対する耐性植物を得ている。すなわち、放線菌の一種、ストレプトミセス・ハイグロスコピクスから、このビアラフォスを不活性化させるタンパク質の遺伝子 (bar) が既に単離されているため、この遺伝子をパーティクルガン法により培養細胞へ導入して組換え体を作り出した。今後、トウモロコシにおいて除草剤耐性の実用品種が開発される可能性はきわめて高いと思われる。

② 遺伝子組換えによる雄性不稔植物の作出

最近、薬のタベート組織に特異的に発現する遺伝子にリボヌクレアーゼを連結してタバコとナタネに導入したところ、雄性不稔植物が得られたという興味深い報告が Nature 誌に掲載された。トウモロコシでは T 型細胞質雄性不稔系統がごま葉枯病により壊滅的な被害を受けて以来、有効な雄性不稔系が見いだされていないため、今後、トウモロコシへ導入できれば、その波及効果は極めて高いと考えられる。

③ アンチセンス技術

メッセンジャー RNA と相補的な RNA をアンチセンス RNA と呼ばれるが、変異の作出としてアンチセンス技術が最近開発されて注目を浴びている。アンチセンス RNA を大量に作ると、メッセンジャー RNA とハイブリダイズしてタンパク質への翻訳が阻害されるため、突然変異を作り出すことができ、この手法を利用して、こちらの目的とする変異を作り出すことが可能になる。現在外国では、トマトの硬い繊維質の細胞を壊す酵素をアンチセンス

技術で阻害する試みなどが行われている。

今後、牧草・飼料作物においても、その利用が期待される。

4 東北農試で行なっている シロクロバ育種への バイオテクノロジーの利用

①カルス、プロトプラスト培養

シロクロバ 24 品種における胚軸由来カルスの再分化能を検能したところ、再分化能には遺伝子型特異性が存在し、わずかに 2 つの遺伝子型でのみ植物体再分化が見られた。特に、スウェーデンの品種「Undrom」由来カルスは安定した再分化能を示した。この培養系統由来のプロトプラストからは容易に植物体を再生することができた(写真 1)。選抜した高い遺伝子型は、今後、遺伝子組換えなどで有用な材料になると考えられる。

一方、*Trifolium* 属の 65 種についてカルス培養を行なったところ、10 種で植物体再分化に成功し、そのうち 7 種は最初の報告であった。

②胚珠培養

シロクロバとモザイク病抵抗性を有する近縁種クラクロバとの間で交雑を行うと、胚発育の比較的初期段階の球状胚以降に雑種胚が崩壊するため、胚珠培養法を検討して、雑種植物を得ることができた。雑種植物は花粉稔性が極めて低く、シロクロバとの戻し交雑の場合にのみわずかな種子が得られ、育成できた戻し交雑個体は形態的にはシロクロバに類似し、モザイク病抵抗性を示した(写真 2)。今後、モザイク病抵抗性中間母本を作成できる可能性が示唆された。

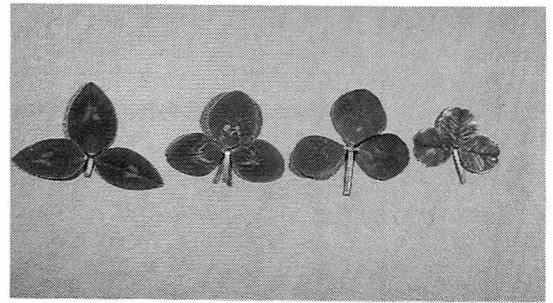


写真 2 小葉の形態。
左から、クラクロバ、雑種個体、シロクロバとの戻し交雑個体、シロクロバ。
それぞれの個体にウイルスを接種したところ、シロクロバの個体のみにも病徴が認められた。
(東北農試)

③細胞融合

鼓脹症を引き起こさないシロクロバを開発する目的で、再分化能を有するシロクロバプロトプラストをヨード酢酸処理をして、再分化能のないラビットフットクロバのプロトプラストと細胞融合を行なった。雑種性を示すカルスまでは得られたが、その後、褐変して植物体にまでは至らなかった。

④遺伝資源保存技術の開発

ウイルスフリー化の手法として茎頂培養法を開発し、次に培養中の茎頂組織を低温下で保存して約 1 年間は安定して保存できることを明らかにした。

プログラムフリーザーを用いた緩速冷却による超低温保存技術を検討し、茎頂組織を凍害防御剤を含む培地で前培養することなどにより安定した生存率を得ることができた。また、今回開発した方法では品種の耐寒性の強弱に関係なく、高い生存率が得られた。

最近、氷晶を形成しないガラス化法が開発され、高価なプログラムフリーザーを必要としないばかりでなく、操作が簡便、迅速であるため、その保存技術として期待が高まっている。シロクロバ茎頂の場合もこれまでに 70~80% の高い生存率を得ている(写真 3)。

5 今後の展望

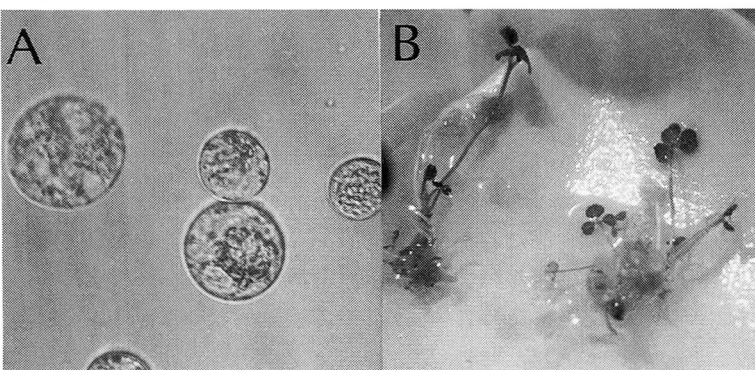


写真 1 シロクロバのプロトプラスト(A)とその再分化植物(B) (東北農試)