

【特 集】「林木育種事業 60 周年記念シンポジウム

林木育種におけるバイオテクノロジーのこれまでとこれから

谷口 亨\*,1

はじめに

林木は長寿命であり、また、樹体が巨大であることなどにより、林木の育種には長い年月と広いフィールドや多大な労力が必要である。この林木育種の困難さを解決する技術の一つとして遺伝子組換えなどのバイオテクノロジーがある。遺伝子組換えでは特定の注目する形質に関与する遺伝子を実験室において生物に人為的に導入することにより、短期間で形質を変える、或いは交配では不可能な新規形質を与えることが可能であり、遺伝子組換えは林木育種において大変意義深い技術である。更に、近年、CRISPR/Cas9 に代表されるゲノム編集と呼ばれる画期的な新しいバイオテクノロジーが

誕生した。この技術は、ゲノムの狙った位置に塩基の欠失や挿入や遺伝子の挿入が可能な技術である。我々は、これまでに遺伝子組換えによりスギを無花粉化する技術を開発しているが、最近ではゲノム編集をこれからのスギ育種に取り入れるための基盤的研究を行っている。本稿ではこれらの近年のスギにおけるバイオテクノロジー研究の成果について概説する。

遺伝子組換えによるスギの無花粉化

まず、スギを遺伝子組換えする方法を説明する(図-1)。7月上旬に未成熟な種子を培養して不定胚形成細胞と呼

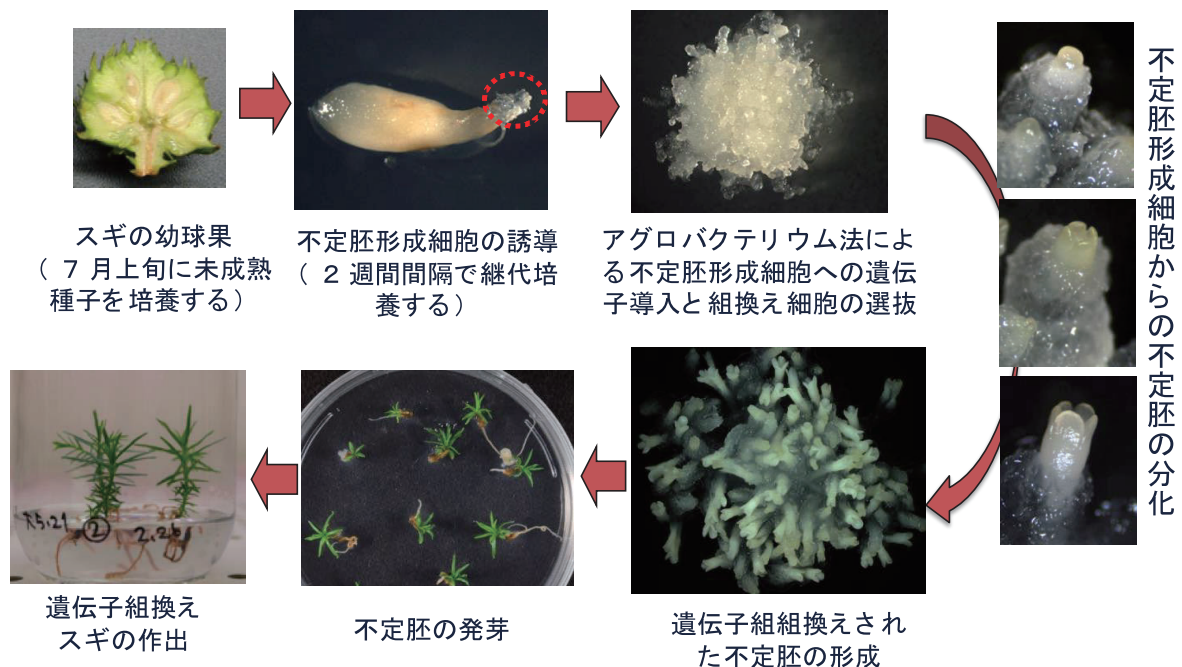


図-1 遺伝子組換えスギを作出するまでの実験の概要 (森林総合研究所森林バイオ研究センター業務資料を改変)

\* E-mail: toru.t@affrc.go.jp

1たにぐち とおる 森林総合研究所森林バイオ研究センター

ばれる細胞を誘導する。この細胞にアグロバクテリウム法による組換え操作を行って遺伝子を導入し、その後、組換え細胞を選抜する。選抜した不定胚形成細胞から不定胚を形成させ、これを発芽、生育させれば遺伝子組換えスギができて上がる。

スギの無花粉化のためには、タバコなど他の植物での無花粉化の報告があるバルナーゼ/バルスターのシステムを用いた。このシステムでは、バルナーゼと呼ばれるRNA分解酵素を雄花（正確には、発達途中の花粉及び花粉を取り囲むタペト層と呼ばれる花粉発達に必須な雄花の組織）で働かせることにより花粉形成を阻害する。その一方で、バルナーゼが葉など雄花以外で働いた場合に起こる成長阻害を防ぐためにバルスターと呼ばれるバルナーゼ阻害因子をスギの全身で弱く働かせる。このシステムが機能するように設計した遺伝子をアグロバクテリウム法によりスギに導入し、遺伝子組換えスギを作成した。温室栽培で20 cm程度に成長した組換えスギにジベレリン処理することにより雄花を誘導し、10月から花粉が成熟する12月まで経時的に採取して作成した雄花の凍結切片を顕微鏡で観察した。スギの花粉は、花粉母細胞期、四分体期、小孢子期を経て成熟花粉となるが、温室で比較用に栽培した非組換えスギでは成熟花粉が12月末には見られた。一方、組換えスギでは成熟花粉が12月末には見られなかった。この温室で2年間続けて雄花形成過程を観察したところ、結果は同じであった。次に野外でも無花粉であることを確認するために、隔離ほ場での遺伝子組換えスギの栽培試験を文部科学大臣と環境大臣に申請し、2014年11月17日から2018年3月31日まで栽培試験を行う承認を得た。なお、隔離ほ場とは遺伝子組換え植物を栽培するためのほ場で、組換え植物が意図せずに持ち出されることを防止するためフェンスで囲まれている。大臣承認後の2015年4月に90 cm程度の苗木（組換えスギ3系統が各27本、非組換えスギ1系統が27本）を隔離ほ場に植栽した。植栽後、伐倒するまでの3年間、ジベレリン処理により強制着花させて雄花を観察したところ温室での場合と同じ結果が得られ、花粉形成は全くみられなかった。また、最終年度には自然着花した雄花についても調査し、花粉は全くみられなかった。成長を比較するためには、樹高と地際直径を毎月調査した。3年間の樹高成長量は3.5 mを越え、肥大成長量は6~7 cmであり、遺伝子組換えスギの成長は非組換えスギと同程度であった。

## 林木育種におけるゲノム編集の可能性

ゲノム編集とは、ゲノムの狙った位置を切断し、その修復の過程で塩基の欠失や挿入、あるいは新たな遺伝子の挿入を行う技術であり、医療、植物育種、動物育種など多方面での応用を目指し、精力的に研究が行われている。標的遺伝子に数塩基の欠失や挿入を起こせば、標的遺伝子の機能が喪失し（図-2）、いわゆる突然変異育種と同じような効果を正確に短期間で起こすことができる。このことを利用し、例えば、花粉形成のために必要なスギの遺伝子を標的遺伝子としてゲノム編集を行えば、花粉形成遺伝子の機能が喪失し、その結果、花粉ができない無花粉スギを作成できる。我々はゲノム編集を林木育種のための新しい技術として利用するため、スギでゲノム編集が可能かどうか、また、その効率は何の程度であるかを知るための研究を進めている。具体的には、緑色蛍光タンパク質遺伝子が組み込まれており緑色に光るスギ細胞をモデルとして、CRISPR/Cas9によるゲノム編集の実験を行った。その結果、緑色蛍光が失われた細胞が得られた。この細胞の標的遺伝子（緑色蛍光タンパク質遺伝子）の塩基配列を調べた結果、塩基の欠失や挿入がみられ、実際にゲノム編集が起こっていることが明らかになった。その効率はイネなどの先行研究が進んでいる作物に比べると低いものの、無花粉化などスギの形質変化にゲノム編集の利用が十分

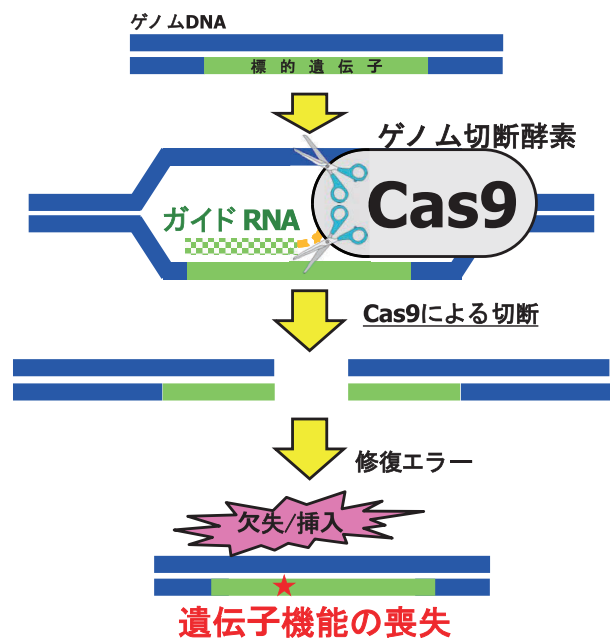


図-2 ゲノム編集による標的遺伝子の破壊（機能の喪失）

に期待できる。

標的配列に欠失変異などを生じさせるゲノム編集で外来遺伝子の挿入を伴わない場合、ゲノム編集で作出された個体は遺伝子組換え生物と見なされず、カルタヘナ法の規制を受けないことが期待される。しかし、現時点では多くの植物ではゲノム編集に必要なゲノム編集要素（ゲノム切断酵素やガイドRNA：図-2）を遺伝子組換えにより導入しているために外来遺伝子が挿入されていることとなる。自殖が容易なイネなどでは交配により外来遺伝子を除いたゲノム編集個体（ヌルセグリガントと呼ばれる）を得ることはそれほど困難ではないだろう。しかし、林木のような他殖性で世代期間の長い植物では、交配によりヌルセグリガントを得ることは困難と考えられるため、ゲノム編集要素を細胞内に直接導入する方法も模索している。

## 終わりに

遺伝子組換えによりスギを無花粉化する技術を開発し、隔離ほ場での野外栽培試験によりこの技術の有効性と安定性を確認できたことは、バイオテクノロジーにより意図した形質を林木に付与できることを示した事例として意義深いと感じている。しかし、遺伝子組換え技術はカルタヘナ法による環境影響評価において厳しい規制があり、また国民の遺伝子組換えに対する不安感をまだ取り除くことができていないことも事実であろう。このような状況下で登場したゲノム編集は植物育種に大きな可能性をもたらす新技術である。ゲノム編集には数塩基の欠失を誘導するものや遺伝子を新たに挿入するものまで幾つかのタイプがあり、環境省中央環境審議会ではカルタヘナ法の規制の対象範囲を整理するための検討が今年の秋までを目処に進められている。