

## 接ぎ木と RNA 篩管輸送システムによる品種改良

原田 竹雄

国立大学法人 弘前大学農学生命科学部 特任教授

### はじめに

この 10 数年間において世界各国の研究者から、「植物の篩管には RNA 分子が長距離輸送され、それらが運搬先で機能することで、植物は調和的に成長している」という新知見が発表されてきました。著者の研究室においても特定 RNA の篩管輸送、その輸送先での発現を確認できました。そこで、人工的に特定の輸送 RNA を産生する個体を作成し、接ぎ木することで、その RNA を接ぎ木相手に輸送させることが可能となります。このシステムを活用して、接ぎ木相手にエピジェネティックな変化を誘導する技術を開発してきました。本論説では、この全く新たな作物の品種改良法を紹介します。

### 接ぎ木とは

接ぎ木は紀元前から中国の柑橘栽培に採り入れられていたとの記録があるほど古くから知られている栽培法です。古代ギリシャ時代のリンゴ栽培においても接ぎ木が活用されており、その目的は優良なクローンの増殖や穂木の早期開花の誘導にありました。接ぎ木の現象は自然界でも樹木間で観察され、ある程度の力が加わる状態で幹や枝が長時間接触した場合、その両者間での接ぎ木が生じます。この様態が接ぎ木栽培法の発想に至ったのだらうと、専門家たちは考察しています。また、地中の根においても接ぎ木が生起しているとの報告があります。我々は土中の根の生育形状を直接観ることはほとんど不可能ですが、木本植物の根をとり囲む土を慎重に除去すると、かなりの頻度で接ぎ木現象が観られると報告されています。この場合、接ぎ木相手が同じ種のものに加え、異種間の例もあるようです。根の接ぎ木現象の生理学的意義の考察もされていますが、まさに、根という Hidden Half の世界には、まだまだ未知のことが多くありそうです。

接ぎ木栽培は果樹や花木に加えてトマト、キュウリ、ナスなどの果菜類にお

いても行われています。果菜類での接ぎ木技法の最初の論文（スイカにおける実験）は1931年に本邦から発表されており、日本のオリジナル技術です。台木種には土壌病害抵抗性や耐乾燥性などを有する野生種が一般に用いられます。連作障害の強力な対策法となる果菜類の接ぎ木栽培技術は、アジアやヨーロッパにおいて急速に普及が広がっています。さらに、接ぎ木栽培法を重要作物であるダイズなどに展開できる可能性が検討されています。

### 篩管輸送とは

篩管は導管と同様、植物の全身に張り巡らされている管状の組織ですが、導管は死細胞からなる内容物が無い筒状構造であるのに対して、篩管は原形質を有する棒状の細胞が連結した構造体であり、連結部の細胞壁は篩版となっています。さらに、核やリボゾームが存在しないのですが、ミトコンドリアや小胞体は認められ、特に、未だ機能が判っていない特殊な色素体が多く存在する原形質を有しています。根からは無機養素、葉からは光合成産物といった養分を長距離輸送するための通路として機能することは古くから知られていますが、どのような機構によって物質が目的の部位に運ばれているかについての詳細は不明であります。

### 篩管と伴細胞

光合成産物の糖は葉肉細胞のソース組織から、根、花器、種子、果実や塊茎などの貯蔵器官であるシンク組織へと篩管輸送されます。ソース細胞からの糖は先ず篩管に隣接する伴細胞に搬入されてから篩管に積み込まれます。篩管と伴細胞は共通する一つの細胞から不等分裂により分化するので、篩管細胞と伴細胞は基本的には同数存在し、篩管の機能は伴細胞によって大きくサポートされています。すなわち、伴細胞は通常細胞のおよそ2倍量のミトコンドリアが存在しており、活発な代謝が常時行われています。伴細胞と篩管細胞間には核膜孔に類似した特殊な構造を呈する原形質連絡糸が存在しており、選択された物質を出し入れする機構が関係していると考えられますが、この搬入・搬出についても未知のことが多く残されています。木本植物においては樹皮の直ぐ内側に篩管細胞は輪状に存在していますが、それに隣接する伴細胞の生理活動は樹の一生を通して絶え間なく続くことから、樹の生命を支える長寿細胞であると言われてしています。

## RNA 篩管輸送

カボチャなどウリ科の蔓切断面の溢泌液に多様なRNAが検出されたことから、特殊なRNAが篩管を通して輸送されていることが指摘されました。そこで、篩管輸送RNAの解析実験が接ぎ木個体を材料として精力的に行われたところ、台木から穂木、穂木から台木へと特定のmRNAが輸送されていました。どの位の数のmRNA種が輸送されているかについて、接ぎ木体から得たトータルRNAのトランスクリプトーム解析が本格的に進められています。最新のアラビドプシス近縁種間の接ぎ木実験は、一塩基多型 (SNPs) 解析により行われた大規模なものです。驚くべきことに、2000種を超えるmRNAが接ぎ木点を介して接ぎ木相手に輸送されている事実を明らかにしました。この報告では器官別や生育条件 (ストレス下) の違いによっても、そのプロファイルが異なることが示されています。さらに、mRNAの一部においてはそれらの翻訳産物が接ぎ木相手に検出されており、mRNAの転写と翻訳が距離的に大きく異なる細胞で、それぞれが行われている実態も明らかにされました。

## siRNAの輸送

miRNAやsiRNAなどのsmall RNAも篩管輸送されています。siRNA長距離輸送はウイルスやウイロイドの感染に対する植物の全身防御機構として機能していることが知られています。一方、miRNAの研究からは、茎葉における無機栄養物のリン酸やイオウ等の量的変動を根毛細胞のそれぞれのトランスポーターの発現量に連動させるべく、遠距離組織間の情報伝達を担うメッセンジャーとして特定のmiRNAが働いていました。これらの事実より、多種・多様なsmall RNAが篩管輸送されていることが判明しました。そこで、人工的なsiRNAを篩管輸送させるシステムの開発が進められました。

## siRNAとエピジェネティックの変化

エピジェネティックとは正式には「DNA塩基配列の変化を伴わない細胞分裂後も継承される遺伝子発現あるいは細胞表現型の変化を研究する学問領域」を意味します。最も良く知られているエピジェネティックの変化はDNAシトシン塩基のメチル化ですが、新たにメチル化を受ける領域を指定するのはsiRNAであるこ

とが判っています。そこで、人工的siRNA産生システムを導入した組換え体を作成します。この時、siRNAを伴細胞で大量に作出するため、ある植物ウイルスのプロモーターを使用することで、siRNAは接ぎ木相手により効率よく輸送されます。特定ターゲット遺伝子のプロモーター配列を逆位反復構造とするコンストラクトを発現させることでsiRNAが作出され、いわゆる転写型遺伝子サイレンシング (TGS: Transcriptional Gene Silencing)が生起、その結果、ターゲット遺伝子は転写が抑制されます。このメチル化状態は減数分裂時は解除される例も知られていますが、一方で、数世代にわたって維持されるとする実験結果も報告されています。そこで、siRNA産生体を接ぎ木して接ぎ木相手のターゲット遺伝子の転写を抑制することで、サイレンシングが誘導された細胞が生じます。この細胞から再分化個体を獲得すれば、siRNA産生のための導入遺伝子を有しない、さらに、ターゲット遺伝子の塩基配列は全く変わらない、そして、ターゲット領域のメチル化状態が変わることで「エピジェネティックな変化」が生じた、「エピ変異体」が作出できることとなります。

#### 栄養繁殖作物のエピ変異体獲得

エピジェネティックの変化は減数分裂時に解除されるものと維持されるものがあることが判っています。一方、果樹やイモ類のように配偶子形成と受精の過程を経ずに体細胞の分裂を続けることで栄養的に繁殖される作物がたくさんあります。そこで、エピ変異ジャガイモを作出すべき、実験を行いました (図1)。ある特定の遺伝子プロモーター領域をターゲットとするsiRNA産生の穂木をタバコ (*Nicotiana benthamiana*)として、これをジャガイモ台木に接ぎ木します。タバコとジャガイモは同じナス科ですので接ぎ木が成立します。結果、siRNAはジャガイモに篩管輸送され、ターゲット遺伝子はサイレンシングされます。このタバコ/ジャガイモ接ぎ木個体を培養体として育成すると、ジャガイモ台木に塊茎 (マイクロチューバー) が形成されますが、その塊茎細胞全域にサイレンシングが起きることが判りました。このジャガイモ塊茎を「種イモ」として増殖したその次代のジャガイモを調べてみたところ、サイレンシングが継承されていたので、エピ変異体ジャガイモが作出できたこととなります。遺伝子発現抑制が農業上、有益となるターゲット領域を設定すれば、接ぎ木とRNA篩管輸送システムを活用した新たな品種改良法となります (図1)。実用的なエピ変異ジャガイモの作出が本格的に進められています。

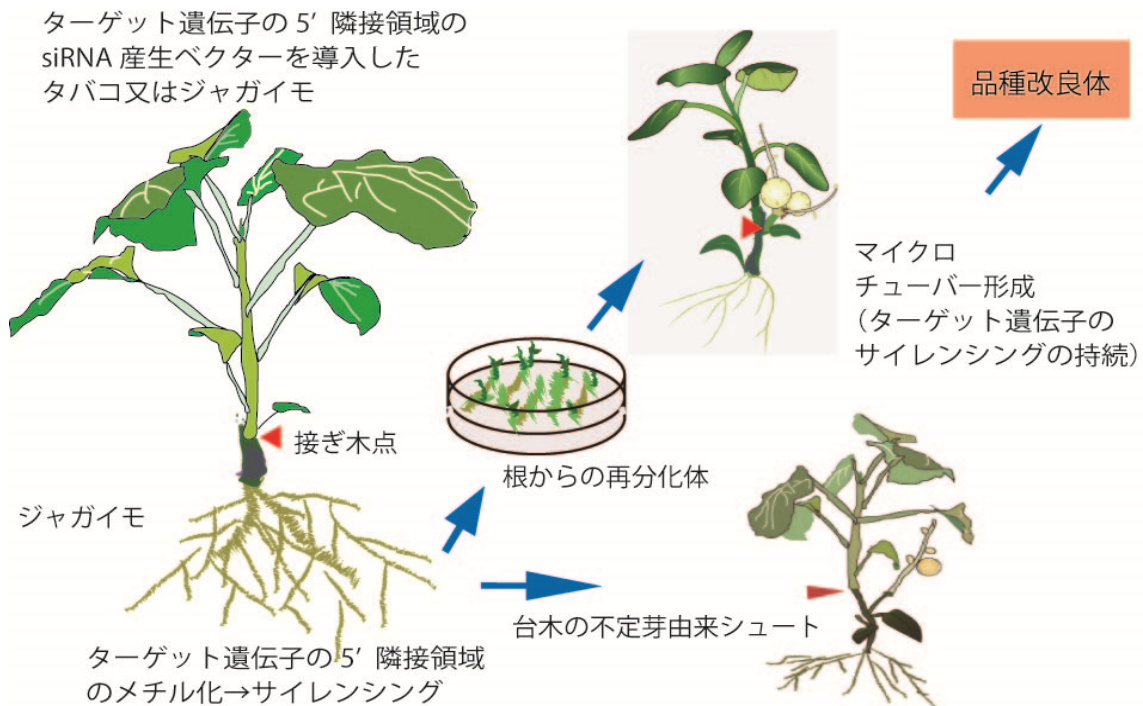


図1 接ぎ木と RNA 篩管輸送機能によるエピ変異ジャガイモの作出

## おわりに

栄養繁殖性作物のエピ変異体は枝変わり(芽条変異体)と同等と考えられます。枝変わりは体細胞で生じた突然変異ですが、果樹においてはこれまで多くの品種・系統が誕生してきました。例えばリンゴ‘ふじ’においても多くの枝変わり品種・系統が選抜されています。枝変わりのメカニズムの一つとしてトランスポゾンの転移が知られていますが、エピ変異による枝変わり事象も確認されてきており、今後、エピ変異と枝変わりの関係がより明確にされるのではと考えます。

著者らが開発したエピ変異誘導システムにおいては、培養の段階では組換え体を使用しますが、接ぎ木相手のジャガイモ塊茎にはその導入遺伝子は存在しません。遺伝子組換え体(GMO)は「プロダクトベースで判断」を原則とするのであれば、「本技法によるエピ変異体は非GM」となります。本技法によるエピ変異リンゴの作出も著者らによって進められています。

## 参考文献

葛西厚史・原田竹雄 生物の科学 遺伝 特集 育種技術の新展開 140-144 頁