



植物の形質転換に関する終端の問題

鈴木 克周

遺伝子組換え植物はすでにさまざまな分野で利用されている。その作出には、アグロバクテリアが媒介する形質転換法がもっぱら用いられる。土壌細菌のアグロバクテリア（根頭癌腫病菌）が保有する腫瘍誘導（tumour-inducing (Ti)）プラスミドの一部であるtransfer DNA (T-DNA) 部分が植物細胞核に注入される特質を利用したDNA導入法である。すでに30年以上前から利用されてきた技術であり、当初Tiプラスミドを直接改変するcointegration法が用いられていたが、Tiプラスミドの全長が約200 kbpときわめて大きいため、クローニング用の小型T-DNAベクターとT-DNAを欠失させたTiプラスミドを共存させるバイナリー法が開発された。ベクターの小型化でDNA操作が容易となり、バイナリー法が一般的に利用されるようになって現在に至っている。しかし、T-DNA以外のベクター部分も植物細胞核に挿入されてしまうことが報告されるようになり、予期せぬ遺伝子組換えが遺伝子汚染につながるのではないかと問題視されるようになってきた。基礎科学の分野でも、たとえば特定の遺伝子を植物に導入したことにより生理効果を観察できたと考えていたのに、余分な長いDNAも導入されていたとすれば解釈を誤ることもあるので無視できない問題である。

最近Oltmannsら¹⁾は、3つの菌株と複製機構の異なる4つのバイナリープラスミドおよびバイナリープラスミドに換えて染色体にT-DNAを保持させた形を組み合わせた合計14種類の供与体アグロバクテリアを用いて、植物への導入効率と組み込まれたコピー数およびベクター部分が入り込む頻度を測定した。バイナリープラスミドを用いると植物細胞核への導入効率は高まるものの、ベクター部分が入り込む頻度も高くなり50%前後にも達した。一方、アグロバクテリアの染色体にT-DNAを保持させた供与体では導入効率は低下するものの、1コピーのみ挿入された形質転換植物の出現率が高まると共に、ベクター部分が入り込む頻度は数%に止まると報告している。彼らの示すベクター部分の導入頻度は従来の研究報告から考えると異常に高いと感じられるが、この他にもバイナリープラスミドを用いた実験で高頻度のベクター部分の導入が複数報告されている²⁾。かなりの頻度で終端であるleft border (LB) の認識が行われずにベクター部分の遺伝子導入が起きていることと、この頻度を低下させるのに染色体DNAの利用が有効であることは

事実であると考えられる。

T-DNAはright border (RB) とLBと呼ばれる25塩基の配列に挟まれたDNA領域である。RBは接合プラスミドの転移起点 $oriT$ に相当する。接合プラスミドでは $oriT$ 部位でニックがはいる、一本鎖として輸送が始まり最終的にプラスミド全体が受容菌へ輸送される。Tiプラスミドも類似の機構でRBから輸送が行われるが、LBが終端となるためRB-LB間のみが輸送されると考えられている。天然のTiプラスミドをもつアグロバクテリアを用いた場合、T-DNA以外の部分も導入された植物形質転換体が低い頻度で見いだされる。したがって、天然のTiプラスミドではT-DNA切り出しの終端であるLBの認識がやや甘く、従来考えられていたよりも高い頻度でLBを越えた長い一本鎖DNAが生成されるが、著しく長いDNAが輸送されるという困難さを伴うために、実際上は目立たない頻度に留まっていると解釈することが可能である。RBの認識と切断の機構についてはすでに明らかにされているが、終端であるLBの認識と再度の切断の分子機構についてはほとんど解明されておらず、今後の基礎的課題である。

さて、予想外の形質転換を起こさせないために、アグロバクテリア染色体にT-DNAをもたせる方式を活用する方法もOltmannsらは提案している。植物に導入したい目的遺伝子を組み込んだ大腸菌ベクターを、あらかじめアグロバクテリア染色体上に挿入しておいたRBとLBに挟まれた領域に組み込むという方法である。アグロバクテリアと植物の両方の形質転換効率が低くなる点を除けばメリットが多い。今後、この方式のベクター系が増えると予想される。よくよく考えてみると、天然のTiプラスミドのT-DNA部位に小型プラスミドを挿入したcointegration法に立ち戻った感がある。古きを訪ねて新しきを知る。先人の知恵の中には今でもヒントになるものがありそうだ。T-DNA輸送の分子機構についてはChristieの総説³⁾、天然のTiプラスミドの構造に関する情報については拙文⁴⁾を参照されたい。

- 1) Oltmanns, H. *et al.*: *Plant Physiol.*, **152**, 1158 (2010).
- 2) Smith, N.: *Trends Plant Science*, **3**, 85 (1998).
- 3) Christie, P. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1694**, 219 (2004).
- 4) Suzuki, K. *et al.*: In: *Microbial Megaplasmids* (Schwartz E.) p.133, Springer Verlag, Heidelberg (2009).