

# 植物バイオテクノロジーに関する実験実習

野 副 朋 子, 安 部 淳

## 1. はじめに

植物は人類生存の基盤である。植物の定義は、「細胞壁を有し、独立栄養で光合成を行うことのできる生物」である（日本大百科全書）。光合成とは太陽の光エネルギーを利用して、二酸化炭素を原料に、炭水化物を作り出す生化学反応である。私たちヒトやその他の動物は光合成を行うことはできず、エネルギー源となる炭水化物を食べ物から摂取しなくてはならない。つまり植物が存在しないと食べ物がなくなるためヒトは生存できない。世界人口は2019年度では78億人であったが、2050年度には90億人以上に膨れ上がると予測されている（United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019)）。一方で、世界の耕作可能面積は限られており、これ以上農作物を増産するためには新たな技術を開発する必要がある。実際、第二次世界大戦後、アジア諸国を中心に急激な人口増加が生じたため食糧難が危惧されたが、高収量品種の作物が開発されたことで単位面積当たりの収量が増加して食糧増産が達成され、食糧難は回避された（日本大百科全書）。今後、さらに食糧を増産していくためには、新たな作物品種改良技術などの開発が望まれる。

植物は人類が誕生するはるか昔から地球上に存在し、原始地球には存在しなかった酸素を光合成により発生させた。私たちヒトは呼吸により酸素

を吸収して、二酸化炭素を放出する。現在、世界的な地球温暖化が問題視されているが、その原因は二酸化炭素を含む温室効果ガスの人間活動に伴う増加であると考えられている。さらに、世界的な森林減少が問題となっており、世界24か所で日本の国土の1.2倍に匹敵する森林が減少している（WWF (2020)）。森林減少の主要な要因も人間活動によるものである。森林は二酸化炭素を吸収する能力が高いため、大規模な森林減少は地球温暖化を加速させるとしてその対応が迫られている。世界的に植物生産を増大させることは、食糧難の回避だけでなく、地球環境問題の解決にも貢献しうると期待される。

植物バイオテクノロジーの発展により、食料増産や環境問題を回避しうる植物が開発されてきた。その中の一つに「遺伝子組み換え作物」がある。遺伝子組み換え作物とは、遺伝子を人為的に操作することにより、その作物が本来は持っていなかった性質へと改変した作物のことである。有名な例では、モンサント社の開発した「ラウンドアップ・レディ」や「害虫抵抗性作物」がある。「ラウンドアップ・レディ」は除草剤ラウンドアップを撒いても枯れない性質を付与した作物である。モンサント社は、ラウンドアップを無毒化する酵素タンパク質を微生物から単離・同定し、その酵素タンパク質を作る遺伝子を作物に導入することで、ラウンドアップを無毒化する性質を付与した。「害虫抵抗性作物」は農薬をまかなくても害虫が排除さ

れる性質を付与した作物である。モンサント社はトウモロコシやワタなどを好みこれら作物の収量を激減させる害虫であるガの天敵である微生物に着目した。この微生物がガを死滅させる原因であるタンパク質を特定し、このタンパク質を作るための遺伝子を作物に導入することで、ガを死滅させる性質を付与した。「ラウンドアップ・レディ」や「害虫抵抗性作物」は生産者である農家にとって安価に育てやすいというメリットなどがあったため世界的に栽培されるようになった。一方で、これまで自然界に存在しなかった作物が栽培されていくことに対する安全性を疑問視する声も噴出した。日本では、遺伝子組み換え作物の安全性を評価して流通させるための法整備を行っているが、社会的なパブリックアクセプタンスが得られない状況が続いており、日本での遺伝子組み換え作物の栽培は行われていない。しかしながら日本は食糧自給率がカロリーベースで37%（農林水産省、2021年）であり、多くの農作物を輸入している。その中には多くの遺伝子組み換え作物も含まれているため、日本でも遺伝子組み換え作物は消費されている。現在、遺伝子組み換え技術の不安点を解消した技術として様々な新たな育種技術（New Plant Breeding Technics: NPBT）が開発されている。その中には、2020年度にノーベル化学賞を受賞したゲノム編集技術も含まれている。日本においても食糧自給率を向上させるとともに、世界に流通しうる植物新品種を開発する取り組みがなされている（ゲノム編集技術等の新たな育種技術（NPBT）を巡る動向／農林水産省平成28年3月）。ここで特筆すべきは、農林水産省がNPBTを社会が受容するための環境を整備するための取り組みにも力を入れていることである。前述したとおり、植物生産の増大は現在そして今後も続く問題を解決していくためには必須であり、それを解決

する技術として遺伝子組み換え技術を含むNPBTは非常に有効であると期待されている。しかし、いくら良い技術が開発されたとしても、それを社会が受容しなければ普及することはない。デメリットのない科学技術はほぼ存在しないので、メリットとベネフィットを天秤にかけて社会は科学技術を利用していくべきである。またどのように受容するかについて正解があるわけではなく、一部の専門家だけではなく全ての社会構成員が技術について理解して向き合っていく必要がある。日本においてNPBTの普及を阻む最も大きな要因として、植物バイオテクノロジーについての知識不足があると考えられている。本稿では、明治学院大学で行った「植物バイオテクノロジー」を理解するための実習について報告する。

## 2. 植物細胞融合実験

育種においては、人類にとって有用な性質を持つ親同士を交配して子どもを誕生させ、その中から有用な性質を併せ持つ子どもを選別することにより品種改良が行われる。しかし、いくら有用な性質を持っていたとしても、子どもが生まれない異なる種同士では交配させても子どもを誕生させることはできない。細胞融合技術は、種の壁を乗り越え、異種間同士の子孫を作出しうる技術である。植物細胞は動物細胞と異なり、細胞膜の周りを細胞壁と呼ばれる硬い壁が覆っている。この細胞壁を溶かす酵素を作り出す微生物が発見され、プロトプラストと呼ばれる細胞壁のない植物細胞を作り出せるようになった。さらにポリエチレングリコール（PEG）を作用させることにより、プロトプラストの融合が促進されることが見出され、様々な異種の植物細胞同士の融合が報告されるようになった。融合した細胞内で、核融合が生じると、

細胞が細胞分裂を開始し、一つの個体に再生しうることも報告された。実際、ポテトとトマトの細胞を融合することでポマトというポテトとトマトの性質を併せ持つ植物が創製された。

本実習では、様々な野菜のプロトプラストを作成し、PEGを添加することにより細胞融合を試みた(図1)。ナス、オレンジ、赤パプリカ、ムラサキキャベツ、カボチャ、ピーマンの果実とハウレンソウの葉から約3-4ミリ角の切片を約10片作成し、酵素液(0.5M マンニトール, 1% セルラーゼ・オノヅカ R-10, 0.2% マセロザイム R-10, 0.01% ペクトリアーゼ Y-23, 3.5% 塩化カリウム KCl, 0.5% 塩化カルシウム  $\text{CaCl}_2$ )に浸した。アスピレーターにより約3分減圧処理を行い、30℃のプロックインキュベーターに15分静置し酵素反応を行った。この間、3分ごとにチューブを振った。酵素反応後、細胞片を浸透させて5分静置した後、大きい細胞片をピンセットで除去し、チューブの下部の液体をパスツールピペットでとってスライドグラスに滴下し、カバーガラスをかけずに生物顕微鏡で観察した。ナス、オレンジ、赤パプリカ、ムラサキキャベツ、カボチャ、ピーマン、ハウレンソウのいずれにおいても球状のプロトプラストが観察された(図1)。ナス、オレンジ、赤パプリカ、カボチャ、ハウレンソウ、ピーマンでは、それぞれ黄色、緑、赤、橙色、緑、緑の複数の小胞が球状のプロトプラスト内に観察された(図1A-C, E-G)。これらは色素体と呼ばれる細胞内小器官であると考えられた。ムラサキキャベツでは、細胞全体が紫色を呈した(図1D)。プロトプラストの大きさは20 $\mu\text{m}$ から100 $\mu\text{m}$ の幅でさまざまであった。カボチャとピーマンのプロトプラストをそれぞれパスツールピペットでスライドグラスに滴下し、混合した後、PEGを添加して細胞融合を誘発した後、顕微鏡で観察した(図1H)。色の異なるカボチャ(図1H

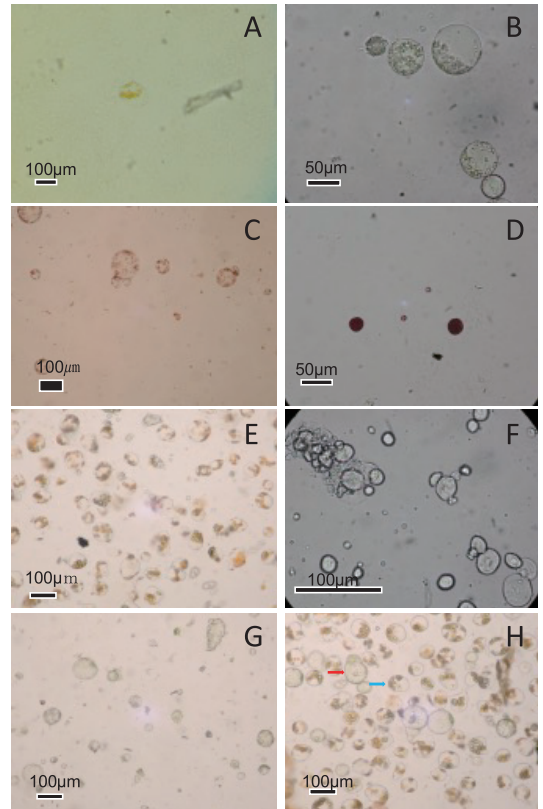


図1 野菜のプロトプラスト作成と細胞融合実験

ナス(A)、オレンジ(B)、赤パプリカ(C)、ムラサキキャベツ(D)、カボチャ(E)、ハウレンソウ(F)、ピーマン(G)の果実あるいは葉から作成したプロトプラスト。カボチャ(E)とピーマン(G)のプロトプラストを混合してポリエチレングリコール(PEG)を添加して細胞融合実験を試みた(H)。スケールはA, C, E, F, G, Hは100 $\mu\text{m}$ 、B, Dは50 $\mu\text{m}$ 。

青矢印)とピーマン(図1H赤矢印)のプロトプラストがそれぞれ観察されたが、プロトプラストが附着する様子は確認されなかった。授業内に学生が行った実験では、細胞融合に使えるプロトプラストまでは作成でき、それを学生自身が確認することができた。いずれにおいても球状の構造が確認され、硬い細胞壁が除かれていた。また、色

彩の異なる野菜を使ったことにより、色によりプロトプラストを区別することができた。一方で、細胞融合実験においてはプロトプラスト同士が接着する様子をはっきりと観察することはできなかった。細胞融合の方法については、PEGの濃度や誘発時間などさらに検討をする必要があると考えられた。

### 3. 植物の二次代謝産物抽出実験

二次代謝産物とは、生物の細胞成長、発生、生殖には直接的には関与していない有機化合物のことである。一次代謝産物とは異なり、二次代謝産物の欠如は、生物の即時の死に至らないが、生存や繁殖力、美しさにおいて長期間の障害を与えるか、あるいは顕著な変化は全くないこともある。二次代謝産物は植物の感染防御やその他の種間の防御に重要な役割を果たしている場合が多い。植物においても様々な二次代謝産物が単離・同定され、その役割が明らかとされてきた。例えば、植物には赤や黄色、緑など様々な色のものがあるが、それは色素と呼ばれる二次代謝産物が合成されるためである。植物が合成する二次代謝産物は、医薬品や化粧品材料として用いられるほか、食べ物中の機能性物質としても注目されている。植物がどのような二次代謝産物を作るか調べることは、植物がどのように生きているのか解明できるだけでなく、私たちヒトにとっても有用である。

本実習では、植物の二次代謝産物の中でも色素に着目し、様々な野菜から色素を抽出して分析する実験を行った。カボチャ、黄パプリカ、シシトウ、パセリ、ホウレンソウ、ニンジンをそれぞれ細かく刻み、約1-2 gを乳鉢に入れ、乳棒ですりつぶすことでスープ状にした。アセトン・メタノール(8:

2)溶液を1-2 ml加えて、乳棒で野菜を押しつぶし、色素を抽出した。上清約1 mlを試験管に移し、ジエチルエーテルを1 ml入れて軽く振り、さらに蒸留水を約1 ml加えて軽く振った。上層をマイクロチューブに移し、薄層クロマトグラフィー(TLC)の試料とした。TLCはTLC用ペーパーシートクロマトシートII(富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて、石油エーテル・アセトン(6:4)溶液によって展開した(図2)。コントロールとして単離されたクロロフィルaを用いた。カボチャ、黄パプリカ、ニンジンでは黄色、オレンジ色の色素が複数検出された。ホウレンソウ、パセリでは、緑に加えて黄色の色素が検出された。カボチャ、黄パプリカ、パセリ、ニンジン、ホウレンソウ、シシトウから抽出された色素はそれぞれ5, 3, 6, 4, 6, 3種類であった。各色素について、溶媒に対する移動度を示すrate of flow(Rf)値を計算した(表1)。パセリの色素番号2、ホウレンソウの色素番号2は、標品のクロロフィルaと同じ緑色であり、Rf値も類似していたことから、クロロフィルaであると推定された。一方、カボチャの色素番号3はクロロフィルaとRf値は同一であったが色が一致しないため、クロロフィルaとは異なると考えられた。既知の色素の色とRf値の比較から、シシトウ以外の色素番号1はβ-カロテンであると推測された。また、パセリの色素番号3、ホウレンソウの色素番号3はクロロフィルbであると考えられた。本学生実験により、1つの野菜でも複数の色素が含まれていることを確認できた。異なる野菜では、同系統の色に見えても、含まれている色素の種類が異なっていた。実験を行った学生自身が、二次代謝産物である色素を単離し、おおまかに色素の同定を行うことができ、理解につながったと考えられた。

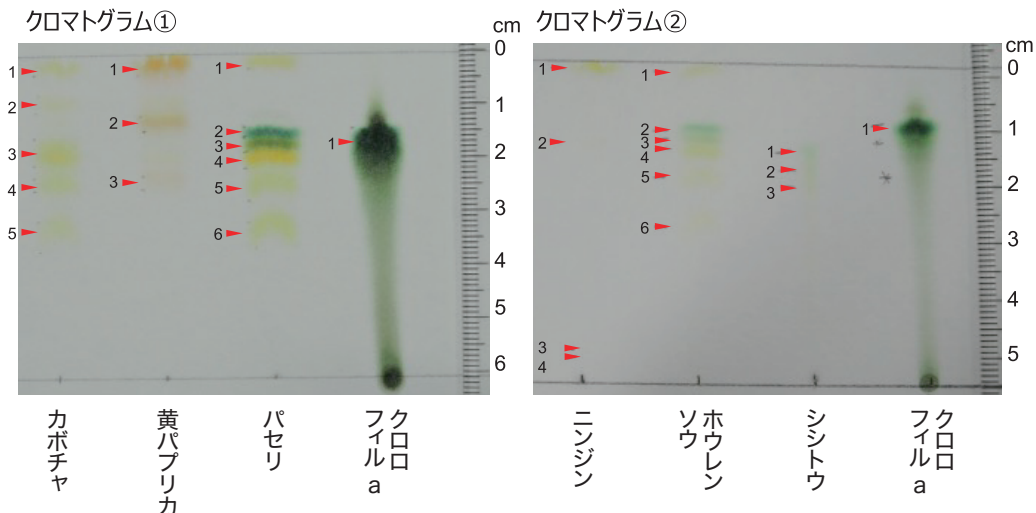


図2 野菜から抽出した色素の薄層クロマトグラフィーによる分離

カボチャ、パプリカ、パセリ、ニンジン、ホウレンソウ、シシトウの果実または葉から抽出した色素を薄層クロマトグラフィーにより分離した。コントロールとして単離・精製されたクロロフィル *a* を分離した。分離は2枚のクロマトシートに分けて行った(クロマトグラム①、②)。下部の直線上に抽出した色素を染み込ませ、クロマトシートの下端を溶媒に浸すことにより展開した。上部の直線は展開溶媒の移動末端を示す。赤矢印は検出された色素の位置を示し、展開溶媒の先端に近い方から順に色素に番号を振った。

表1 野菜から抽出した色素の Rf 値

色素番号	クロマトグラム①				クロマトグラム②			
	カボチャ	黄パプリカ	パセリ	クロロフィル <i>a</i>	ニンジン	ホウレンソウ	シシトウ	クロロフィル <i>a</i>
1	0.95	0.97	0.95	0.72	0.98	0.98	0.71	0.80
2	0.85	0.77	0.75		0.75	0.80	0.76	
3	0.72	0.59	0.72		0.09	0.76	0.58	
4	0.61		0.67		0.04	0.75		
5	0.46		0.57			0.45		
6			0.43					

色素番号は展開溶媒の先端から順に番号を付けたものであり、図2と同一である。

#### 4. 遺伝子組み換え植物、青いバラ・青いカーネーションを用いた実験

前述したように遺伝子組み換え作物は日本では社会的な受容が得られない状態が長く続いてき

た。しかし、日本で開発された遺伝子組み換え作物の中でも、社会的受容が得られている遺伝子組み換え作物がある。それが、(株)サントリーが開発した青いバラ「アプローズ」、青いカーネーション「ムーンダスト」である (<http://www.suntorybluerose>.)

com/shop/, <http://moondust.co.jp/shop/>)。自然界には様々な色の花を咲かせる植物が存在している。しかし、園芸作物として人気の高いバラの仲間には「青い」品種は存在していなかった。前述したように、従来であれば別の種が示す性質を子どもが生まれない間柄の種の子どもに付与することはできない。青いバラの開発は「不可能への挑戦」という壮大な目標を掲げた研究プロジェクトであった。研究チームは青い花を咲かせるペチュニアに着目し、青い花に含まれている色素の単離・同定を試みた。その結果、青色だけでなく赤やオレンジなどの種類もあるアントシアニンという色素の仲間であるデルフィニジンが青いペチュニアでは作られているために、花卉が青くなることを突き止めた。さらに、アントシアニンの仲間のうち赤色色素のシアニジンやオレンジ色素のペラルゴニジンの一部の構造を変化させる酵素であるフラボノイド 3,5' 位水酸化酵素 (F3'5'H) が青いペチュニアでは作られ、青くないペチュニアでは作られないことから、F3'5'H をバラで作らせることができればバラの花びらを青くできると考えた。研究チームは F3'5'H を作るための酵素遺伝子 *F3'5'H* 遺伝子の単離・同定を行い、バラに遺伝子導入することにより、青いバラ作出を試みた。バラではなかなかうまくいかず、バラと同じく青色の品種が存在しなかったカーネーションで遺伝子組み換え技術により青いカーネーションの作出に成功した。その後の試行錯誤の結果、ついにバラでも青いバラの開発に成功した。アブローズの意は「喝采」、そして花言葉は「夢かなう」であり、「不可能への挑戦」の開発ストーリーとともに、日本社会で受容される希望の遺伝子組み換え作物となっている。

本実習では、青いバラと青いカーネーションから遺伝子を抽出し、遺伝子導入した *F3'5'H* 遺伝

子が実際に導入されているのかをポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で調べる実験を行った (図 3)。プロトコールは、アブローズ及びムーンダストを開発したサントリーグローバルイノベーション株式会社研究部と広島大学、筑波大学の研究チームにより開発された手法を参考に行った (山内ら, 2013 年)。DNA 抽出には DNA 抽出キット (ISOPLANT, 株ニッポンジーン) を用いた。また、用いたプライマー配列は以下の通りである。プライマー a : 5'-GAGCTAGGCCACATGCTTA-3' と 5'-CTTTGCGCTCATGACTCGT-3', プライマー b : 5'-TGTGGCATGGCAGTTGCTTCT-3' と 5'-GCACTAGAAGAAGTGTCCGTACC-3'。青いバラにはパンジー *F3'5'H* が導入されている。一方、青いカーネーションにはパンジー *F3'5'H* が導入されているムーンダスト・プリンセスブルーとペチュニア *F3'5'H* が導入されているムーンダスト・ベルベットブルーを用いた。予備実験においては、想定通り、青いバラの DNA を鋳型としてプライマー a を用いて PCR 反応を行った場合に、342 塩基対 (bp) の DNA 断片の増幅が確認された (図 3C, 赤矢印)。青いバラの DNA を鋳型としてプライマー b を用いて PCR 反応を行った場合には、DNA 断片の増幅は確認されなかった。また、ペチュニアの *F3'5'H* が導入されているベルベットブルーの DNA を鋳型としてプライマー b を用いて PCR 反応を行った場合に 704 bp の DNA 断片の増幅が確認された (図 3C, 青矢印)。ベルベットブルーの DNA を鋳型としてプライマー a を用いて PCR 反応を行った場合には 342 bp 付近に薄くバンドが見られたが、青いバラのバンドに比べると明確に確認できるものではなかった。本実習において、青いバラや青いカーネーションに、遺伝子組み換え技術によって導入された異種の遺伝子が含まれていることを確認できた。学生実習においては、

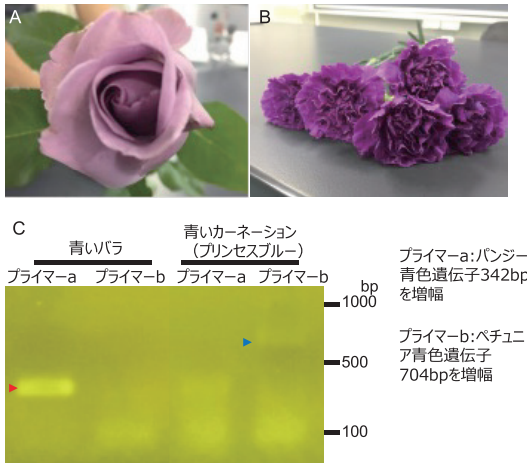


図3 青いバラ（アプローズ）と青色カーネーション（ムーンダスト）のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法による遺伝子解析

青いバラ (A) と青いカーネーション (B) から DNA を抽出して、PCR 法により青色遺伝子  $F3'5'H$  の増幅を行った (C)。青いバラにはパンジーの  $F3'5'H$  が導入されている。一方、青いカーネーションにはパンジー  $F3'5'H$  が導入されているムーンダスト・プリンセスブルーとムーンダスト・ベチユニア  $F3'5'H$  が導入されているベルベットブルーを用いた。また、プライマーにはパンジーの  $F3'5'H$  の 342 塩基対 (bp) 長の断片を増幅するプライマー a と、ベチユニアの  $F3'5'H$  の 704bp 長断片を増幅するプライマー b を用いた。また、ネガティブコントロールとして  $F3'5'H$  を持たない赤いバラの DNA と水を用いた。

予備実験の通りの結果にならないことも多かった。プライマー a とプライマー b では増幅される青色遺伝子の種類が異なるはずであるが、プライマー a とプライマー b で同様の DNA 増幅が見られたり、複数のバンドが確認されたりした。PCR 反応は DNA がきちんと抽出されているかや、各反応の溶液が混じり合っていないかなどが正確に行えないと予想通りの結果が出ない。以上から、学生にとってはうまくいかない場合もあったことも含めて、新型コロナでよく耳にするようになった PCR を実践することによって、対象の DNA や RNA 中に特定の配列が含まれているか否かを確認できる原理を学生自身が身をもって理解するこ

とができたと考えられた。

## 5. 終わりに

2020 年度は新型コロナウイルスの世界的な蔓延により、一般社会に PCR 法が広く認知された。また、新型コロナウイルスが生命体であることから、生命科学やバイオテクノロジーに対する知識の重要性も強く認識されたと考える。実際、本稿で報告した実習（生命科学方法論 B）を 2020 年度に履修した学生に「実習（生命科学方法論 B）で学びたいこと、興味のあることは何ですか?」というアンケートを取りながめてみると、「バイオテクノロジー」や「遺伝子組み換え」に加えて「コロナウイルス」や「生命科学」という言葉も見受けられた (図 4)。百聞は一見に如かずという言葉があるが、分からないと未知で不安に思うことでも、実際自分で目にして体験することで、知識が身近となり不安が解消されることは多い。本実習を通して、多くの学生が植物バイオテクノロジーについての知識を身につけ、日々目まぐるしく進歩す

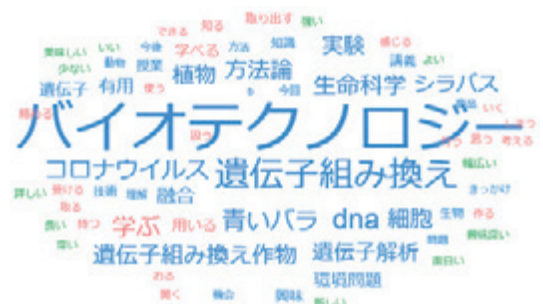


図4 データマイニングによる学生の興味の可視化  
授業のはじめに「実習（生命科学方法論 B）で学びたいこと、興味のあることは何ですか?」というアンケートを取り、データマイニングにより解析した。スコアが高い単語を複数選び出し、その値に応じた大きさと図示している。単語の色は品詞の種類で異なり、青色が名詞、赤色が動詞、緑色が形容詞、灰色が感動詞を表している。

る技術に正確に向き合えるようになれるよう尽力したいと考えている。

### 謝辞

本稿で報告した青いバラ、青いカーネーションの予備実験は長田恵美氏により行われました。この場を借りて御礼申し上げます。

### 引用文献

日本大百科全書, <https://kotobank.jp/word/%E7%B5%90%E6%9E%9C%28%E6%A4%8D%E7%89%A9%29-1530501>, 小学館, 2021年11月26日  
United Nations, Department of Economic and Social

Affairs, Population Division (2019). World Population Prospects 2019: Highlights. ST/ESA/SER.A/423.

WWF (2020) Deforestation Fronts: Drivers and responses in a changing world. Pacheco, P.; Mo, K.; Dudley, N.; Shapiro, A.; Aguilar-Amuchastegui, N.; Ling, P.Y.; Anderson, C. and Marx, A. WWF, Gland, Switzerland.

農林水産省 HP : [https://www.maff.go.jp/j/zyukyu/zikyu\\_ritu/012.html](https://www.maff.go.jp/j/zyukyu/zikyu_ritu/012.html), 2021年11月26日アクセス  
山内宗治, 田中伸和, 竹下俊治 (2013) 高等学校生物におけるPCR法を利用した遺伝子判定実験を取り入れた教材開発 (遺伝子組換え青いバラ・青いカーネーションを材料として), 生物教育 (53) 242