

氏名(本籍)	たべい 田部井	ゆたか 豊	(茨城県)
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第1,176号		
学位授与年月日	平成8年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	バイオテクノロジーを用いたウリ科野菜の育種に関する研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	高柳謙治
副査	筑波大学教授	農学博士	岩堀修一
副査	筑波大学教授	農学博士	生井兵治
副査	筑波大学教授	理学博士	鎌田博

論 文 の 要 旨

本論文は、主要野菜の中でアブラナ科やナス科野菜に比べて比較的培養が困難だとされているウリ科野菜、とくにキュウリ、メロンおよびスイカについて、バイオテクノロジーを適用した育種法を確立するための問題点を解決しようとしたものである。

まず、組織からの個体再分化条件を検討した。メロンとキュウリについて、培養に供する部位の検討を行い、乾燥した子葉または未展開子葉が、展開子葉、胚軸、葉柄、本葉等よりも個体再分化能が高いことを見いだした。また、再分化培地のオーキシン濃度により不定芽または不定胚を経由して個体の再分化が起こるが、メロンにおいては、基本培地に一定濃度のサイトカイニン (BA 0.1 mg/l) と低濃度のオーキシン (2,4-D 0~0.01 mg/l, NAA 0~0.1 mg/l, IAA 0~1 mg/l) とを添加することで不定芽が、または、高濃度のオーキシン (2,4-D 1~2 mg/l, NAA 3~10 mg/l, IAA 25~100 mg/l) を組み合わせることで不定胚が分化しやすいことを明らかにした。キュウリにおいてもメロンとほぼ同様の結果を得たが、スイカでは高濃度のオーキシン (IAA 10~30 mg/l) とサイトカイニン (BA 7~12 mg/l) を組み合わせても不定芽が得られるのみで、不定胚形成は見られなかった。以上のように、不定胚分化・不定芽分化に関して、一部に種・品種間差異はあるもののウリ科野菜でも安定した個体再分化系が得られることが明らかにされた。

ウリ科野菜の細胞融合については、まず、プロトプラストからの不定芽誘導条件を検討した。展開子葉から単離したプロトプラストを修正 MS 培地 (硝酸アンモニウム 200 mg/l, ショ糖 10 g/l) に 2,4-D 0.05 mg/l, BA 0.5 mg/l と浸透圧調節剤 (マニトール, グルコース各 0.2 M) を加えた培地で効率よくカルスが誘導された。カルスからの不定芽誘導には BA 2 mg/l と GA₃ 0.5 mg/l を組み合わせた培地が適していた。この培養系を用いて、メロンとメロンの近縁野生種 *Cucumis meturiferus* との細胞融合を行った。融合カルスの段階でアイソザイムによる雑種性の検定を行ったが、すべてメロン型であり野生種特有のアイソザイムは検出されなかった。この現象をさらにメロンとハイグロマイシン抵抗性の遺伝子を組み込んだキュウリとの細胞融合によって検討した。融合細胞のカルスにはハイグロマイシン抵抗性遺伝子が検出された。その他の形質の雑種性検定には、より高感度のジゴキシゲニン (DIG-RAPD 法を試み、メロンばかりでなく、キュウリに特異的な PCR 産物の一部が細胞融合産物で確認できた。このことからウリ科植物の細胞融合においては、片親の形質が脱落する傾向にあるものの、一部の形質は導入される可能性が示された。

次に、キュウリを用いて形質転換体の作出を試みた。イネのキチナーゼ遺伝子をアグロバクテリウム系を用いてキュウリに導入し、灰色かび病抵抗性の個体を得た。この場合不定芽分化培地に ABA を 1 mg/l 添加することにより不定芽分化効率が向上した。この培養条件では不定芽形成における品種間差異が解消し、どの品種でも高率で不定芽が分化した。さらに、キュウリモザイクウイルスの外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換メロンを用いて、閉鎖系および非閉鎖系温室における栽培を行い、環境に対する安全性の評価を行った。形態的変異、他の植物との交雑性、新たな物質の産生性、他の植物や微生物に及ぼす影響、用いたベクターの残存性等を検討したが、いずれも形質転換体と非形質転換体との間に差が認められなかった。これは他殖性で虫媒性の組換え植物の安全性評価についてのわが国における最初の実施例であった。

以上のように、ウリ科野菜において組織片からの個体再分化条件と、プロトプラストからの不定芽分化の最適条件が明らかとなり、効率的な増殖に利用できることを示すとともに、ウリ科の種間または属間で非対称細胞融合が起きている可能性を示し、あわせて簡便な雑種性の判定法も開発した。さらにイネキチナーゼ遺伝子のような他の植物起源の遺伝子を取り込み、キュウリに耐病性を賦与できたこと、形質転換体の環境に対する安全性についても確認できたことなどから、バイオテクノロジーを利用したウリ科野菜の育種を進めるための主な問題点が解決できたものと考えられる。

審 査 の 要 旨

ウリ科野菜の育種において耐病性などの有用形質は、交雑が困難な近縁野生種や他の外来遺伝子に求められるが、細胞融合や遺伝子組換えなどのバイオテクノロジーの利用に関する研究は少なかった。これまでウリ科のメロン、キュウリ、スイカなどで植物組織培養によって個体再分化に成功したという報告はあるが、散発的で、再現性にも問題があった。著者は培養に供する組織片と再分化培地に添加するオーキシン濃度について広範囲にかつ系統的に検討し、サイトカイニンとオーキシンの濃度調節によって、種子の未展開子葉の切片から効率的に不定芽または不定胚を経由して個体再分化を起こす条件を明らかにした。さらに、プロトプラストからの不定芽分化条件についても明らかにし、メロンと近縁野生種との細胞融合を試みた。この場合融合細胞は形成されるが、その後片親（野生種）の性質が失われることが分かった。次いで、メロンとハイグロマイシン抵抗性キュウリ（形質転換体）との融合をも試みた。この場合も片親のキュウリの形質が大部分失われたが、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子は導入され、さらにより検出感度の高い DIG-RAPD 法による DNA の解析によってキュウリの遺伝物質の一部が融合カルスに導入されていることを確認した。これにより、部分融合が起きている可能性が高まった。また、イネのキチナーゼ遺伝子をアグロバクテリウムを用いてキュウリに導入し、灰色かび病抵抗性キュウリの作出にも成功した。この過程で、形質転換体を効率よく形成する不定芽分化系についても検討し、ABA 添加培地の有効性を確認した。著者らはまた、組換えメロン（キュウリモザイク病抵抗性メロン）の環境に対する安全性評価についての検討も行い、閉鎖系、非閉鎖系温室内での栽培ではとくに問題はないことを注意深く確認した。

以上のように、本論文はこれまで比較的研究の少なかったウリ科野菜のバイオテクノロジーを利用した育種に大きく貢献するものと評価される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。