

氏名(本籍)	あいだ 間	りゅう たろう 竜太郎	(広島県)
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第1,384号		
学位授与年月日	平成10年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	トレニアの形質転換系の確立と有用形質の改変		
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

### 論文の内容の要旨

花卉の育種において、花の日持ち性の改良や新花色の作出、花形の改変などには形質転換法が画期的な育種法となる可能性がある。本研究は、熱帯アジア原産のゴマノハグサ科の一年生草本植物で、耐暑性に優れ、夏の花壇用花卉として利用されているトレニア (*Torenia fournieri* Lind.) を材料として、形質転換系の確立と有用形質の改変を試みたものである。

トレニアの形質転換系について：トレニアでは再分化培養系がすでに開発されているので、アグロバクテリウム法による形質転換を試みた。トレニア葉片へのアグロバクテリウムの初期感染には、ホルモン条件などを種々検討した結果、0.1mg/1 IAA, 0.5mg/1 BA および50 $\mu$ M アセトシリゴン添加のMS 固体培地上で7日間共存培養を行うのが良かった。形質転換体の選抜には、同様に1mg/1 BA, 100mg/1カルベニシリンを含む培地に、300mg/1カナマイシンまたは20mg/1ハイグロマイシンを添加するのが良かった。濃緑色の硬いカルスを經由して再分化してきた濃緑色のシュートが形質転換体であった。鉢上げ後、閉鎖系温室で栽培した形質転換体は野生型植物(非形質転換体)と形態的な差は認められず、正常に生長・開花した。反復して形質転換実験を行ったところ、'クラウンミックス' および在来の紫花系統ともに安定して外植片数の10%前後の形質転換体を得られた。これらの結果をまとめて、アグロバクテリウム法によるトレニア形質転換体作出のプロトコルを提示した。

外来遺伝子の発現調節：タバコで外来遺伝子の発現を高めることが知られている E12  $\Omega$  プロモーターおよび、傷害やサリチル酸処理等のストレスによって誘導される PRLa プロモーターが、有効に機能するかどうかを GUS 遺伝子に接続して調べた。その結果、トレニアにおいても E12  $\Omega$  プロモーターは 35S プロモーターに比べて明らかに高い発現力を示した。また、PRLa プロモーターはサリチル酸処理により、トレニアにおいても誘導された。

外来遺伝子の後代への遺伝及び外来遺伝子の発現量：35S プロモーターに接続した GUS 遺伝子を用いて形質転換したトレニアの、自殖後代および野生型との交雑後代について、外来遺伝子 (GUS) の遺伝および発現量の安定性について調べた。その結果、導入された外来遺伝子はメンデルの法則に従って後代に遺伝することが示された。また、発現の程度はその遺伝子の状態がホモかヘミかによって異なることが示された。すなわち、ホモ接合体では発芽後12日目くらいまでは、ヘミ接合体よりも高い GUS 活性を示したが、発芽後4週間を過ぎると逆転して、ホモ接合体での活性が急激に低下した。この現象は「特定の遺伝子の mRNA 量がある限度を超えると、遺伝子発現が不活性化される」という Smith らの仮説で説明できるのではないかと考えた。つまり、生育初期の

GUS 活性がヘミ接合体より高いホモ接合体が、その後、閾値に達して不活性化が起こったのではないかと考えられる。

トレニアの有用形質の改変：トレニアの花の日持ち性に関係するエチレンの生成に関与する ACC 酸化酵素遺伝子の断片を、センスあるいはアンチセンス方向に導入した結果、開花期間の延長した形質転換体が得られた。その性質は後代にも遺伝し、遺伝子の有無と開花期間の長さが対応する結果を示した。また、花色を変更しようとしてアントシアニン合成系の CHS 遺伝子あるいは DFR 遺伝子をセンスあるいはアンチセンス方向に導入し、もとのものと違った花色の形質転換体が得られ、パステル調の花色のものや唇形部に波打つような模様が生じたりという園芸的にも価値のありそうなものも含まれていた。これらの結果から、アグロバクテリウム法による形質転換法は花卉の実用的な育種法として有用であることが示された。また、他の花卉に比較しトレニアは実験上の取扱いが容易で、生長が早く、培養容器中でも開花するなどの特長を持つため、形質転換法による花卉育種や遺伝子発現の制御や生理機構の解析などの実験植物（モデル植物）としても有用なものであることを示した。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、これまであまり改良の進んでいなかったトレニアを材料として、花色などの育種に形質転換法を利用しようとしたものである。トレニアは生育が早く、培養容器内でも 2～3 か月で生活環を全うし、培養操作上也取扱いが容易であるという特長を生かして、アグロバクテリウム法による形質転換実験を試みたところ、無菌的な葉片培養からアグロバクテリウム法で安定して、ほぼ10%の形質転換体が得られる方法を確立した。さらに、GUS 遺伝子のような標識遺伝子を導入してその遺伝子の遺伝性、形質発現量を調べ、プロモーターの効果、導入遺伝子の後代への遺伝性を確認した。また、GUS 遺伝子の発現程度が、発育ステージによって逆転する現象を、ホモの個体とヘミの個体を用いて明らかにした。さらに、花の開花期間に関係するエチレン生成系や花色に関係するアントシアニン合成系の遺伝子をセンスあるいはアンチセンス方向に導入して、開花期間の延長した形質転換体や花色の変化した実用的な形質転換体を作成するなど、形質転換法による育種の可能性を明確にした。

以上のように本論文は、花卉の実用的形質の改変をねらってアグロバクテリウム法による形質転換実験を繰り返し、トレニアに関してはほぼ安定して再現性の高い形質転換条件を明らかにした。さらにこれらの実験を通してトレニアの実験植物としての特長を明らかにしたことも高く評価される。

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。