

氏名(本籍)	なか しま いく こ 中 島 育 子 (京 都 府)			
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	博 甲 第 6544 号			
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	Study of Adventitious Shoot Regeneration and Genetic Transformation in Japanese Pear (ニホンナシにおける再分化および形質転換技術に関する研究)			
主査	筑波大学教授 (連係大学院)	博士 (農学)	山 本 俊 哉	
副査	筑波大学教授 (連係大学院)	博士 (農学)	森 口 卓 哉	
副査	筑波大学准教授 (連係大学院)	理学博士	池 谷 祐 幸	
副査	筑波大学教授	農学博士	弦 間 洋	

論 文 の 内 容 の 要 旨

ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai) では、病害抵抗性、果実の生育や成熟、日持ち性、果皮色、休眠などの重要形質について遺伝子レベルでの解析が進められている。単離された候補遺伝子の機能解析や画期的な新品種育成のために、効率の良い組織培養技術と形質転換技術の確立が望まれているが、これまでに形質転換の報告は無い。そこで本研究では、ニホンナシでの形質転換技術を確認するための要素技術として、

- 1) ナシの子葉を外植片として用いる再分化技術確立のために最適植物ホルモン組合せの検討、
- 2) 多様な遺伝的背景を持つナシ品種の子葉からの再分化効率の検討、
- 3) アグロバクテリウム感染時に植物側の防御に関わるカルシウムイオン抑制や超音波処理による細胞壁への物理的な傷害付与による形質転換の検討、
- 4) 異なる発育段階の子葉を用いた形質転換の効率化に関する研究を行った。

ニホンナシ品種「晩三吉」およびマンシュウマメナシ (*P. betulaefolia*) 品種「ホクシマメナシ」子葉を用いて、MS基本培地 (3% ショ糖、0.85% 寒天) に、5, 10, 25, 50 μ M の NAA (1-naphthaleneacetic acid) と 5, 10, 25, 50 μ M の BA (6-benzylaminopurine) を組合せて添加し、不定芽再分化を検討した。その結果、「晩三吉」と「ホクシマメナシ」では、5 μ M NAA と 10 あるいは 25 μ M BA を添加した培地で、不定芽の再分化効率が高かった。

最適化された培地条件を用いて、近年のニホンナシ育成品種 5 品種、ニホンナシ在来品種 11 品種、マンシュウマメナシ 2 品種、チュウゴクナシ 7 品種、セイヨウナシ 8 品種の合計 33 品種について、不定芽再分化を調査した。その結果、ニホンナシ在来品種の「今村秋」(68%) および「安下庄支那梨」(66%) で、不定芽再分化率が最も高かった。また、チュウゴクナシ品種では再分化効率が 35% 以上と高い傾向にあった。

アグロバクテリウム法での形質転換を阻害すると考えられている植物側の防御反応に参与するカルシウムイオンを共存培地から除去、カルシウムイオンキレート剤である EGTA (ethylenedioxybis (ethylamine) -N,N,N',N'-tetraacetic acid) の添加、超音波処理によるアグロバクテリウム感染の物理的な促進について検討した。ニホンナシ品種「安下庄支那梨」、「幸水」、「なつしずく」および「伯帝竜」の子葉を用い、オワンク

ラゲの緑色蛍光遺伝子 (sgfp) を導入した *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 を感染させた。感染 2 週間後では、EGTA と超音波処理を組合せた区において、「安下庄支那梨」子葉の 85% で、一過的な GFP (green fluorescent protein) 蛍光が認められた。感染 5 ヶ月後では、EGTA と超音波処理を組合せた区において、「なつしづく」子葉の 68% で、安定的な GFP 蛍光が認められた。5 ヶ月後に 14 個体の不定芽が再分化し、そのうち「安下庄支那梨」から得られた 1 個体で安定的な GFP 蛍光が認められ、PCR およびサザン解析によって、3 コピーの遺伝子のナシゲノム中への導入が確認された。超音波処理は GFP 蛍光割合を有意に増加させたが、EGTA 処理はポジティブな効果は得られなかった。

ニホンナシ「今村秋」の異なる発育段階の子葉を用いて、形質転換の効率化を検討した。2011 年 7 月 14 日 (ステージ 1) から 9 月 15 日 (ステージ 4) まで 3 週間ごとに 4 つのステージで採取した子葉を、ブドウの着色遺伝子 *myb* を持つ *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 を感染させた。不定芽様組織を再生した子葉割合は、ステージ 3 が 35.3%、ステージ 4 で 28.2% と高い値であり、それぞれ 32 個と 26 個の子葉でシュートを再生した。合計 63 個体の再分化個体が得られ、うちステージ 3 および 4 から合計 3 個体 (全着色した不定芽 1 個体、キメラ状 2 個体) の形質転換体を得られた。これらの結果から、完熟あるいは完熟に近い種子由来の子葉で形質転換効率が高いことが示唆された。本研究では、合計 2,118 個の子葉を供試し、得られた形質転換体はキメラを含めて 4 個体で、形質転換効率は 0.2% であった。

本研究により、最適植物ホルモン組合せや品種間差の解析を通じてニホンナシの効率良い再分化技術を確立することができた。さらに、形質転換実験での超音波処理による細胞壁への物理的な傷害付与や異なる発育段階の子葉の解析により、ニホンナシで初めて形質転換体を得ることができた。今後、ニホンナシでの形質転換技術は、重要形質に関連する候補遺伝子の機能解析の推進に役立つとともに、遺伝子導入による画期的な新品種の作出に貢献すると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、ニホンナシにおける再分化および形質転換技術に関するもので、1) 再分化に最適な植物ホルモン組合せを見だし、2) 品種間差の解析により再分化効率の良い品種を同定し、3) アグロバクテリウム法の改良によりニホンナシで初めての形質転換に成功し、4) 形質転換に適した子葉の発育段階を同定したもので、いずれも初めての成果・知見である。特筆すべきは、主要な果樹類の中で形質転換の報告が無かったニホンナシで、形質転換に成功し、その再現性を示したことである。これらは、園芸学、植物生理学、分子生物学、育種学、遺伝学を効果的に融合した学際的成果である。本研究の成果は、ニホンナシにおいて、画期的新品種の育成のための極めて有効な基盤的手法を提案したという意味でも高く評価できる。

平成 25 年 1 月 21 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判断された。

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。