

第 1 章 . 緒 言

果樹の育種は主に交雑育種によって行われているが、果樹は種子を播いてから結実までの世代期間が長いため、新品種の育成に十数年から二十数年を要し、このことが育種を進める上で大きな障害となっている。また、果樹は接ぎ木・挿し木といった栄養繁殖によって品種が維持されているため、遺伝的にヘテロで、他の草本植物に比べて遺伝解析が遅れていることも、効率的に育種を進める上で障害となっている。

我が国における組織的な果樹の育種は、主に農林水産省果樹試験場および公立の試験場によって行われている。果樹の育種は現在、果物の市場性を高めることに重点をおいて進められており、熟期(早晩性)の拡大や果実品質(大きさ、食味、日持ち性等)の向上といった果実形質の改善が主な育種目標となっている。このため、これまで用いられてきた交配母本は品質の優れた主要品種・系統が中心で、それらの交雑実生の中から熟期の異なるものや品質の優れたものを選抜することにより、新品種が育成されてきた。このような交雑育種法により、これまでに、リンゴの‘ふじ’、ナシの‘幸水’‘豊水’のような優良品種が生み出されており、これらの品種が市場性向上に果たした役割は大きい。

しかし、今後は、①果物の本格的な輸入自由化の時代に対応した、国際競争力のある高品質・高付加価値品種の育成、②これからの環境調和型農業に不可欠な病虫害抵抗性や環境ストレス耐性を備えた品種の育成、③今後の果樹産業従事者の減少・高齢化に対応した、

おい性などの省力適性を備えた品種の育成が重要な育種目標になると考えられる。このような育種目標に沿って、交雑育種を行う場合、従来用いられてきた主要品種群とは異なる遠縁のものに遺伝資源を求め、遺伝子の導入を図る必要がある。そのためには、まず遺伝資源を収集して利用可能な育種素材の探索を行わなければならないが、果樹の育種の現場では、このような育種素材の探索は十分には行われていないのが現状である。また、交雑育種では、目的とする形質が交雑可能な近縁種に存在しない場合には、育種を行うこと自体が不可能である。野生種や近縁種に目的とする遺伝資源が見つかったとしても、交雑によって遺伝子の導入を行うと、得られた育成系統には、交配親に用いた野生種や近縁種由来の経済品種としては望ましくない目的外の形質も同時に導入されてしまうため、これを直ちに実用品種として利用することができない場合が多い。そのため、主要品種に戻し交雑を繰り返して世代を進め、有用形質の復元を行う必要がある。しかし、果樹のような世代期間の長い作物では、世代を進めるためには非常に長い年月が必要となり、このような方法を採用することは極めて困難である。

このような交雑育種における問題点を解決する方法として、近年開発された形質転換法が注目を集めている。形質転換法は、特定のDNAのみを人為的に植物に導入する方法であり、形質転換法によれば、植物に限らず全生物種の遺伝子の利用が可能であるため、交雑育種法にみられるような制限は全くない。このため、従来の交雑育種では得られない形質の導入が可能となり、作物育種の可能性は飛躍的に増大すると考えられる。従って、遺伝解析が遅れており、有用形質を持つ遺伝資源の探索が不十分な果樹のような作物でも、

目的とする機能を持つ遺伝子が他の生物で単離されていれば、その遺伝子を利用することによって育種を行うことができる。また、形質転換法では、DNAの導入によって特定の形質のみが転換または賦与されることから、交雑育種で生じるような不要な形質が同時に導入されることがないため、戻し交雑による有用形質の復元の過程が不要である。従って、果樹のように世代期間が長く、育種年限の短縮化が大きな課題となっている作物では、このような形質転換法は非常に有効であると考えられる。また、形質転換によって導入した遺伝子は、種子繁殖性の作物では自殖後代を採って遺伝子を固定する必要があるが、果樹類は栄養繁殖性作物で挿し木・接ぎ木等によって個体の維持・繁殖を行えることから、注目すべき形質を持った個体が1個体でも獲得されれば、導入遺伝子を固定することなくそのまま品種として実用化することができる。さらに、得られた形質転換体を交配母本として交雑育種に用いることにより、有用形質を持った高品質果樹へと、育種を進めることが可能である。

植物の形質転換については、1983年にタバコを用いた実験で成功して以来(Herrer-Estrella et al., 1983)、多くの植物で成功例が報告されている。既に、形質転換法によって作出された、特定の除草剤に対する抵抗性を賦与されたダイズ、ナタネ、トウモロコシ、ワタ、害虫に強いトウモロコシ、ワタ、ジャガイモ、果実の軟化を抑制して日持ち性を良くしたトマト、花の日持ち性を良くしたカーネーション、花の色を改変したカーネーションが一般栽培されている(農林水産省技術会議調べ、平成9年12月)。形質転換の方法には、アグロバクテリウム菌を用いて間接的に導入する方法と、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法(PEG)法、エレクトロポレーション

ョン法などの遺伝子を直接、物理的に細胞に導入する方法がある (Uchimiya et al., 1989)。アグロバクテリウム法は、特別な装置を必要とせず、最も簡便に遺伝子導入を行うことが可能な方法で、組織片からの再分化が可能であれば双子葉植物はもちろん、最近ではイネなどの単子葉植物にも適用できる (Hiei et al., 1994; Raineri et al., 1990) ことが明らかになっており、植物の形質転換法として最も多く用いられている。

果樹類でも、アグロバクテリウム法を利用した例が最も多く、ブドウ (Baribault et al., 1990; Berres et al., 1992; Gall et al., 1994; Gölles et al., 1997; Hoshino et al., 1998; Krastanova et al., 1995; Martinelli and Mandolino, 1994; Matsuta et al., 1993; Mauro et al., 1995; Mullins et al., 1990; Nakano et al., 1994; Perl et al., 1996; Scorza et al., 1995b)、カンキツ (Bond and Roose, 1998; Cervera et al., 1998a, 1998b; Gutiérrez-E et al., 1997; Hidaka et al., 1990; Kaneyoshi-Hiramatsu et al., 1994; Kaneyoshi and Kobayashi, 1999; Moore et al., 1992; Peña et al., 1995a, 1995b, 1997; Pérez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo 1998)、リンゴ (De Bondt et al., 1994, 1996; Hammerschlag et al., 1997; James et al., 1989; Lambert and Tepfer, 1992; Maheswaran et al., 1992; Puite and Schaart, 1996; Schaart et al., 1995; Sriskandarajah et al., 1994; Sriskandarajah and Goodwin, 1998; Yao et al., 1995)、モモ (Hammerschlag and Smigocki, 1998; Smigocki and Hammerschlag, 1991; 松田ら, 1999)、スモモ・アンズ (Da Câmara Machado et al., 1994; Korte, 1994; Laimer da Câmara Machado et al., 1992; Mante et al., 1991; Scorza et al., 1994, 1995a)、オウトウ (Da Câmara Machado et al., 1995; Gutiérrez-Pesce et al., 1998)、アーモンド (Archilletti et al., 1995; Miguel and Oliveira, 1999)、ナシ (Mourgues, 1996; 金好ら, 1998)、カキ (Tao et al., 1994, 1997)、キウイフルーツ (Fraser et al., 1995; Janssen and Gardner, 1993; Matsuta et al., 1993; Rugini

et al., 1991; Uematsu et al., 1991; Yamakawa and Chen, 1996; Yazawa et al., 1995)、パパイヤ (Cheng et al., 1996; Fitch et al., 1993)、バナナ (May et al., 1995)、マンゴー、(Mathews et al., 1993)、パッションフルーツ (Manders et al., 1994)、アボカド (Cruz-Hernández et al., 1998)、クルミ (Dandekar et al., 1994; McGranahan et al., 1988, 1990)、クリ (Seabra and Pais, 1998)、ベリー類 (Graham and McNicol, 1990, 1991; Graham et al., 1990, 1996; Hassan et al., 1993; Kokko and Kärenlampi, 1998; Mathews et al., 1995) で形質転換の成功例が報告されている。

パーティクルガン法は、特別な装置が必要であるが、茎頂などにも適用でき、アグロバクテリウム法に比べて形質転換効率は高くないものの、汎用性が非常に高い方法で、果樹類では、ブドウ (Hébert et al., 1993; Kikkert et al., 1996)、カンキツ (Yao et al., 1996)、パパイヤ (Cabrera-Ponce et al., 1995; Fitch et al., 1990, 1992; Mahon et al., 1996)、バナナ (Sági et al., 1995)、クランベリー (Serres et al., 1992) で報告がある。PEG法、エレクトロポレーション法を用いた形質転換は、プロトプラスト培養系が必要なため、果樹では、カンキツでのみ成功例が報告されている (Hidaka and Omura, 1993; Kobayashi and Uchimiya, 1989; Vardi et al., 1990)。しかし、形質転換が成功している樹種においても、適用品種が限られていることや、形質転換体を得られる頻度が低いことなどの課題が残されており、形質転換法を実際の育種に利用するためには、さらに研究を進め、安定した技術とする必要がある。

これまでに得られた果樹類の形質転換体の多くは、実験系の開発のために用いられた抗生物質抵抗性遺伝子や β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子などのマーカー遺伝子を導入したもので、有用遺伝子を導入した報告はあまり多くない。果樹類に導入された有用遺伝子

としては、ウイルス病抵抗性賦与を目的としたウイルスの外皮タンパク質遺伝子[ブドウ (Gall et al., 1994; Gölles et al., 1997; Krastanova et al., 1995; Mauro et al., 1995)、カンキツ (Gutiérrez-E et al., 1997)、スモモ・アズメカ (Da Câmara Machado et al., 1992, 1994; Korte, 1994; Scorza et al., 1994, 1995a)、パパイヤ (Cheng et al., 1996; Fitch et al., 1992, 1993; Tennant et al., 1994)]、耐虫性の賦与を目的とした *Bacillus thuringiensis* の BT トキシン遺伝子[カキ (Tao et al., 1997)、クルミ (Dandekar et al., 1994)、クランベリー (Serres et al., 1992)]、除草剤抵抗性遺伝子[リンゴ (Yao et al., 1995)、ブラックベリー (Hassan et al., 1993)]、果実の日持ち性を改善することを目的としたエチレン生成抑制遺伝子[ラズベリー (Mathews et al., 1995)]、植物体のわい化や発根性の改善を目的とした *Agrobacterium rhizogenes* の rol 遺伝子[カラタチ (Kaneyoshi and Kobayashi, 1999)、キウイフルーツ (Rugini et al., 1991)]等がある。このうち、導入遺伝子の効果が確認された例は極めて少なく、パパイヤリングスポットウイルス外皮タンパク質遺伝子を導入したパパイヤ (Fitch et al., 1992; Lius et al., 1997; Tennant et al., 1994) で強いウイルス抵抗性が、同じパパイヤリングスポットウイルス外皮タンパク質遺伝子を導入したスモモ (Scorza et al., 1995a) でウイルス増殖を遅らせる効果が、BT トキシン遺伝子を導入したカキ (Tao et al., 1997) で耐虫性の効果が、除草剤抵抗性遺伝子を導入したリンゴ (Yao et al., 1995) およびブラックベリー (Hassan et al., 1993) で除草剤抵抗性が、rol 遺伝子を導入したカラタチ (Kaneyoshi and Kobayashi, 1999) でのわい化、キウイフルーツ (Rugini et al., 1991) での発根性の改善がそれぞれ確認されたとの報告があるだけで、現在のところ、果樹類で実用品種として利用されているものはない。また、導入に用いられた遺伝子の種類も少ない

ため、今後は、さまざまな有用遺伝子を実際に果樹に導入し、導入遺伝子の効果について検討を加え、実際の育種への利用に関するデータを蓄積していくことが重要である。

カキおよびキウイフルーツは我が国における主要な果樹である。現在、カキについては農林水産省果樹試験場で、キウイフルーツについては香川県農業試験場で交雑による組織的な育種が行われている。今後、カキとキウイフルーツの育種を進める上で、形質転換法の利用は極めて有効であると考えられることから、カキおよびキウイフルーツの育種に対する形質転換法の利用に関する研究を開始した。研究を始めた 1994 年当時、カキについては、*Agrobacterium rhizogenes* の野生株を用いて形質転換に成功した報告 (Tao et al., 1994) があるのみで、本格的な形質転換法は確立されていない状況にあった。そこでまず、形質転換法の開発から着手した。キウイフルーツでは、アグロバクテリウム法を用いた形質転換法が既に確立されており (Matsuta et al., 1990, 1993; Uematsu et al., 1991; Janssen and Gardner, 1993)、この方法を用いて実際に有用形質を導入し、その発現解析を行った。

本論文においては、カキの形質転換法の開発、およびキウイフルーツへの形質転換法による有用遺伝子の導入とその発現について研究を行い、カキの種子内胚軸培養系を用いる形質転換の条件、キウイフルーツにおける β -1,3-エンドグルカナーゼ cDNA の導入の効果などが明らかとなったので、その詳細を取りまとめて報告する。