

| | |
|---------|----------------------------|
| 氏名(本籍) | なかむら 中村 ゆり (愛媛県) |
| 学位の種類 | 博士(農学) |
| 学位記番号 | 博乙第1559号 |
| 学位授与年月日 | 平成11年10月31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 | カキおよびキウイフルーツ育種における形質転換法の利用 |
| 主査 | 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 西村繁夫 |
| 副査 | 筑波大学教授 理学博士 鎌田博 |
| 副査 | 筑波大学助教授 農学博士 弦間洋 |

論文の内容の要旨

本研究ではカキおよびキウイフルーツの育種における形質転換法の利用を図るために、カキについて効率的な形質転換法の開発を行った。また、形質転換法が既に確立しているキウイフルーツについては、病害抵抗性遺伝子などの有用遺伝子を導入して、その発現解析を行い、今後の形質転換法を利用するための知見を得た。

まず、カキの種子胚軸からの個体再分化条件を検討した。種子から摘出した胚軸外植片を、0.2~10mg/lのゼアチン、4-Cl-4PU又はBAを含む、窒素成分を1/2にしたMS培地(1/2NMS)で培養した。その結果、2mg/lのゼアチンを含む場合に、高頻度で外植片切断部から直接不定芽が形成された。この不定芽形成は、25mg/l以上のカナマイシンで完全に阻害された。また、不定芽形成はクラフォランでは阻害されないが、カルベニシリンでは阻害された。以上の結果から、アグロバクテリウム法による形質転換体の選抜培地としては2mg/lゼアチン、25mg/lカナマイシン、500mg/lクラフォランを含む1/2NMS培地が適当であることが明らかになった。

上記の再分化系を用い、アグロバクテリウム法による形質転換系の開発を行った。アグロバクテリウムはLBA4404/pBI121, LBA4404/pTOK233及びEHA/pSMAK251を用いた。接種後3日間共存培養した後、前述した選抜培地で培養した。その結果、EHA/pSMAK251を用いた場合にのみ、外植片の約10%から形質転換体が得られた。このことから、カキの形質転換にはEHA101系統が適しており、LBA4404系統は適していないことが明らかになった。また、この方法では、カルスを経ずに直接不定芽が形成されるため、アグロバクテリウム感染から4~5ヶ月後には、完全な形質転換体が得られた。

本形質転換法は、交雑胚の胚軸を材料に用いるため、既存の栽培品種に遺伝子を導入することはできないが、台木品種の育成や交配母本の作出などに利用することができる。

キチナーゼや β -1, 3-エンドグルカナーゼは植物細胞が糸状菌に感染した際に生産する溶菌酵素であるが、これらの酵素遺伝子を導入すると、植物の糸状菌病害抵抗性が增強することが報告されている。キウイフルーツでも果実軟腐病、灰色かび病などの糸状菌病が問題になっていることから、本研究では、糸状菌病害抵抗性を強化するため、キウイフルーツにイネキチナーゼ遺伝子及びダイズ β -1, 3-エンドグルカナーゼ遺伝子を導入した。イネキチナーゼ遺伝子導入形質転換体では、非形質転換体に比べてキチナーゼ活性が有意に高まった個体は得られず、灰色かび病に対する病害抵抗性の增強は認められなかった。一方、ダイズ β -1, 3-エンドグルカナーゼ遺伝子導入形質転換体では、非形質転換体に比べてグルカナーゼ活性が有意に高まっており、最大で非形質転

換体の約6倍のグルカナーゼ活性を示す個体が得られた。高いグルカナーゼ活性を示した形質転換体では、灰色かび病に対する病害抵抗性の増強が認められた。以上の結果から、キウイフルーツの糸状菌病害抵抗性育種にダイズ β -1, 3-エンドグルカナーゼ遺伝子が利用できることが明らかになった。

ヒト上皮細胞生長因子 (hEGF) 遺伝子は動物の上皮細胞の増殖を促進する働きを持つタンパク質であり、創傷治療薬として臨床試験が進められている。本研究では、新機能を有するキウイフルーツを作出するため、hEGF 遺伝子をキウイフルーツに導入した。得られた形質転換体の若い葉では、最大で可能性タンパク質 1 mgあたり 65pg の hEGF が生産されていた。本実験は、果樹にヒトに対して生理活性のあるペプチドの遺伝子を導入し、その生産を証明した最初の例である。この結果は、形質転換法を用いることで植物が本来持っていない新機能を賦与し、付加価値を持った果実を作出するという新しい育種の可能性を示すものである。

審査の結果の要旨

本研究はカキとキウイフルーツを用い、果樹育種における形質転換法の利用を試みたものである。従来果樹育種は主に交雑育種法によって行われているが、交配から開花結実に至るまでの期間が非常に長く、耐病性育種などに必要な世代を重ねることが困難である。また、カキは雌雄同株であるが、重要品種では雄花を欠くものが多い。一方、キウイフルーツは雌雄異株で、雄花の遺伝特性が明らかでないなど、育種を進めるうえで障害となっている。果樹育種のこのような困難を打破する方策として形質転換法を考えられるが、現在までのところその成功例は少ない。

カキは形質転換のために不可欠な不定芽再分化系が確立されていなかった。本研究では、カキ種子の胚軸外植片切断面から直接不定芽を形成させ、この再分化を利用することで形質転換体を得られ、4~5ヶ月で完全な植物体となった。この方法は、雑種由来の植物となるため、栽培品種には直接用いることはできないが、短期間に高い割合で形質転換体を得られるため台木の育成などに利用可能であろう。

本研究ではキウイフルーツで糸状菌による果実の軟腐病に抵抗性の品種を作る目的で、イネのキチナーゼあるいはダイズの β -1, 3-エンドグルカナーゼ遺伝子を導入して形質転換体を育成している。 β -1, 3-エンドグルカナーゼ遺伝子導入形質転換体では、グルカナーゼ活性が著しく高まった個体を得られ、これらの個体では灰色かび病による葉の病斑の拡大が抑制された。この結果は、果樹で形質転換体を利用した病害防除の可能性を示したものとして高く評価できる。

また、キウイフルーツにヒト上皮細胞成長因子 (hEGF) の遺伝子を導入した形質転換体を作成し、hEGF の生産を確認した。本研究は、ヒトに対して生理活性のあるペプチドの遺伝子を果樹に導入し、その生産を証明した初めての研究であり、今後果樹に今までにはまったく無かった機能性を賦与し、新しい付加価値をもった果樹を作り出す可能性を示している。

これらの研究は、台木の育成、耐病性品種や新しい機能性を賦与した品種の育成に形質転換法が用いられ得ることを示したものであり、今後の果樹の育種のための基礎資料として価値が高いものと認める。

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。