

氏名(本籍)	しの やま はる え 篠山治恵(福井県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第2050号		
学位授与年月日	平成16年7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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	キク [ <i>Dendranthema × grandiflorum</i> (Ramat.) Kitamura] におけるバイオテクノロジーを用いた育種技術の確立と新育種素材の作出		
主査	筑波大学教授	農学博士	西村 繁夫
副査	筑波大学教授	農学博士	弦間 洋
副査	筑波大学助教授	農学博士	大澤 良
副査	筑波大学助教授	農学博士	江面 浩
副査	筑波大学教授	理学博士	鎌田 博

### 論文の内容の要旨

キク [*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] は、これまで交雑育種によって様々な品種が育成されてきたが、交雑できる範囲は限られており、それが遺伝変異の拡大を妨げる要因になっている。そこで、まず、細胞融合法と遺伝子組換え技術を確立し、これらにより新育種素材の作出を行った。細胞融合では、電気融合条件を検討することにより、キクとハイイロヨモギを両親とした体細胞雑種を作出した。これらの雑種植物は、強い白さび病抵抗性と両親に無い花形・花色、草姿を示したことから、有用遺伝子の導入と遺伝変異の拡大に大きく貢献すると考えられる。しかし、得られた雑種植物は雄性不稔であり、両親と比較して発根力が弱かった。今後、非対称融合などによって種子稔性のある有用な形質を持った育種素材を作出することが可能であると考えられた。

つぎに、遺伝子組換えによる耐虫性キクの作出を試みた。キクの遺伝子組換えは数多く報告されているが、形質転換率の低さやキメラの出現により実用化が困難であった。そこで、形質転換細胞からの植物体再分化を従来の不定芽経由からカルス経由に変更することで、キメラの無い形質転換体を作成することに成功した。さらに、対数増殖期の *Agrobacterium* の使用、感染液への界面活性剤の添加、共存培地へのカザミノ酸の添加等の改良を加えることで、高い感染効率を示す新しい形質転換技術を確立した。

改良した形質転換技術を用いて、鱗翅目昆虫に殺虫性を示す *Bacillus thuringiensis* 由来の *cryIAb* 遺伝子をキクに導入した。その結果、害虫による食害面積が非組換え体では 91.1%であったのに対し、*cryIAb* 遺伝子を導入した組換え体では 10.0%へと著しく減少した。幼虫に対しては 2 週間程度の発育遅延効果が認められたが、殺虫効果は認められなかった。そこで、殺虫性をさらに高めるため、*cryIAb* 遺伝子の塩基配列をキクのコドン使用頻度に合わせて改良し、mRNA 不安定配列を除去することにより、改良 *cryIAb* 遺伝子 (*mcbt*) を構築した。この遺伝子を、遺伝子組換え技術によってキクに導入したところ、完全長の殺虫性タンパク質 CryIAb が合成された。これにより、殺虫性タンパク質生成量が高まり、食害面積が 1% 以下となり、供試したオオタバコガの初齢幼虫の全てにおいて強い殺虫性を持つ遺伝子組換えキクの作出に成功した。

遺伝子組換え植物を一般圃場で栽培するにあたっては、農林水産省のガイドラインによって、閉鎖系温室、非閉鎖系温室および隔離圃場において段階的に環境への影響を評価することが指示されている。そこで、作出した組換えキク对环境に対する環境評価を閉鎖系温室で行い、導入遺伝子の安定性、アレロパシー物質産生性、土壤微生物相への影響、遺伝子拡散性、*Agrobacterium* 残存性の5項目について調査した。その結果、導入遺伝子は生活環を通して安定に発現し、環境への影響は原品種と基本的に変わらないことが証明された。

以上のように、本研究により細胞融合法を用い、キクにおいて新たな有用遺伝変異を持つ育種素材を作出できることが示された。また、有用遺伝子をキクに導入し、安定して発現させる新しい遺伝子組換え技術が確立され、交雑育種や突然変異育種では得られなかった新しい形質を持つ育種素材の作出に成功した。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

キクにおいてこれまでよりも格段に効率的な細胞融合法と形質転換技術を確立し、それぞれの方法により新規の育種素材を作出することに成功した。これらはいずれも世界で初めてのことであり、今後、キクの育種に大きな貢献をされると考えられることから、その成果は高く評価される。

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。