

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	田中 秀幸
学位授与の日付	平成25年3月31日	
論文名	In vitro 全茎切断によるナスの効率的な再分化法の確立と形質転換体作出への応用	
論文審査委員	主査	小田 雅行
	副査	大門 弘幸
	副査	青木 考

論文要旨

遺伝子組換え作物は、作物の生産性および機能性の向上を可能にするため、世界中で導入が進んでいる。しかし、植物における遺伝子組換えは、組織培養による再分化系の確立が前提であるにもかかわらず、未確立または不安定な植物種が多い。ナス (*Solanum melongena* L.) においても、遺伝子組換えによる病害虫抵抗性および機能性を付与した形質転換体作出の研究が進められているが、組織培養による再分化が不安定なため実用化には至っていない。そこで、ナスにおける効率的な再分化法および形質転換体作出法が求められている。

ナスの組織培養に関する研究は多いが、再分化は不安定である。そこで、フェノール化合物の生合成阻害剤である L-2-アミノオキシ-3-フェニルプロピオン酸 (AOPP) に着目した。AOPP は、フウランの組織培養で不定芽形成を安定的に促進した (Mitsukuri ら、2011) ので、ナスの組織培養による再分化を安定化して再分化効率を向上できる可能性がある。また、植物成長調節物質 (PGR) を使用しない新しい再分化法についても検討した。PGR は品種および外植体部位により、培地に添加する最適な種類、濃度およびそれらの組み合わせが異なるので、これまでに報告のない品種の再分化系の確立には多くの労力と時間を必要とする。そこで、圃場のトマトの主茎を切り取って成長点を取り除くと大量の不定芽を形成した全茎切断 (Harada ら、2005) を、*in vitro* のナスに適用して、

PGR を使用せずに再分化が可能か検討した。

本研究では、*in vitro* での再分化が不安定または未確立な品種が多いナスにおいて、容易で効率的な再分化法の確立と、さらにその方法を応用した形質転換体の作出を目的とした。第 1 章では、はじめに組織培養における安定的な再分化促進法として、AOPP 処理を検討した。次に、PGR を使用しない再分化法として *in vitro* 全茎切断を通常の組織培養と比較するとともに、これを応用した台木培養を検討した。第 2 章では、台木培養の形質転換体作出への適用を試みた。

第 1 章 ナスにおける効率的な再分化法の確立

再分化に関する報告のないナス‘紫水’を用いて、AOPP 処理が再分化に及ぼす影響を調査した。子葉および下胚軸（以下、胚軸とする。）を外植体として用い、他品種で報告された最適 PGR 条件の培地に、0 から 250 μM AOPP を添加して培養した。その結果、子葉培養では全処理区でカルスは形成されたが、不定芽は形成されなかった。一方、胚軸培養では全処理区で不定芽が形成された。培養 6 週間後における 1 cm 以上のシュート形成数は、0、2、10、50 および 250 μM AOPP で、それぞれ 1.0、1.5、4.2、0.3 および 0.9 本となり、10 μM AOPP で最も多かった。シュートを切り取り、MS 培地に置床したところ、発根率は対照区で 62% だったのに対し、最もシュート形成数の多かった 10 μM AOPP 処理区でも 69% にとどまった。以上の結果より、ナスの組織培養において、AOPP 処理はシュート形成数を増加したが、形成したシュートの発根率を向上するには至らなかった。

ナスの組織培養では、外生サイトカニンによって形成されたシュートは発根しにくい (Franklin ら、2005)。そこで、PGR を使用しない *in vitro* 全茎切断による再分化を検討した。対照として、子葉培養および胚軸培養を行った。その結果、子葉培養では不定芽を形成せず、胚軸培養および *in vitro* 全茎切断ではすべての外植体が不定芽を形成した。*in vitro* 全茎切断による不定芽形成は、胚軸培養より 1 週間早かった。また、不定芽から 1 cm のシュートへの発達も、*in vitro* 全茎切断の方が胚軸培養より 2 週間早かった。切断 6 週間後におけるシュート形成数は、胚軸培養で 2.4 本だったのに対し、*in vitro* 全茎切断では 8.1 本と有意に多かった。また、シュートを MS 培地に置床したところ、発根率は胚軸培養で 63% だったのに対し、*in vitro* 全茎切断では 100% だった。これらの結果より、*in vitro* 全茎切断は組織培養より大量のシュートを迅速に形成させ、シュートはすべて発根することが明らかになった。また、子葉培養の結果から、組織培養では再分化の最適 PGR 条件が品種によって異なり、これまでに報告のない品種の再分化系を確立するためには、新たに PGR 条件を検討する必要性が示唆された。

次に、ナス 4 品種を用い、*in vitro* 全茎切断における再分化率の品種比較を行った。その結果、‘紫水’、‘千両二号’および‘黒曜’の不定芽形成率は 100% だったのに対し、‘庄屋大長’では 80% だった。切断 6 週間におけるシュート形成数は‘紫水’が最も多く、続いて‘千両二号’、‘黒陽’そして‘庄屋大長’となり、それぞれ 8.1、7.6、5.8 および 3.4 本であった。シュートの発根率は、全品種で 100% であった。以上の結果より、*in vitro* 全茎切断は、再分化率に品種間差異があるものの、採取したシュートは全て発根する効率的な再分化法であることが示された。

さらに、*in vitro* 全茎切断の効率化のために、再分化率が低い品種のシュート形成促進法を検討した。カルスからの不定芽形成にはサイトカイニンが不可欠である。植物体内のサイトカイニンは、主に根で生合成されるので、*in vitro* 全茎切断におけるシュート形成数の差異は根に依存すると考えた。そこで、シュート形成数が少ない‘庄屋大長’をシュート形成数の多い‘紫水’に接ぎ木する台木培養（‘庄屋大長’ / ‘紫水’）によって、シュート形成を促進しようとした。‘庄屋大長’と‘紫水’をそれぞれ穂木と台木とした 4 つの処理区を設けて実験を行った。その結果、‘庄屋大長’ / ‘庄屋大長’のシュート形成数は 2.8 本だったのに対し、台木を‘紫水’にかえた‘庄屋大長’ / ‘紫水’では 6.9 本に増加した。一方、‘紫水’ / ‘紫水’のシュート形成数は 8.1 本だったのに対し、台木を‘庄屋大長’にかえた‘紫水’ / ‘庄屋大長’では 3.2 本に減少した。以上の結果より、*in vitro* 全茎切断を応用した台木培養は、シュート形成数が少ない品種のシュート形成を促進することが示された。

第 2 章 台木培養による形質転換体の作出

再分化率の低い品種のシュート形成を促進する台木培養が形質転換体の作出に適用できれば、品種にかかわらず形質転換体を安定的に作出できる可能性がある。しかし、台木培養では、アグロバクテリウムに感染させた胚軸は培地に接していないため、通常の組織培養と同様の選抜が行えない。そこで、台木培養に適した効率的な選抜法を検討した。

アグロバクテリウムに感染させて 2 日間共存培養した‘紫水’の胚軸を、‘紫水’台木に接ぎ木し、その台木をカナマイシン 0 および 100 mg/L 添加した MS 培地に移植して根からカナマイシンを吸収させる選抜法を検討した。その結果、培養 4 週間におけるシュート形成数は、カナマイシン無添加区で 3.4 本だったのに対し、添加区では 1.9 本と減少した。GUS 活性が認められたシュートの割合は、無添加区では 0%、添加区では 7% であり、形成されたシュートのほとんどが非形質転換細胞由来であった。この結果より、根から抗生物質を吸収させる

方法は、選抜効果が低いことが示された。

そこで、台木培養により形成されたカルスを切り取り、選抜培地に置床する方法を検討した。まず、台木培養により形成されたカルスではどの時期に再分化の方向が決まるか調査した。台木培養後毎日胚軸先端を切り取って PGR を含まない MS 培地に置床したところ、台木培養 10 日以降に切り取った胚軸上のカルスはシュートを形成した。そこで、アグロバクテリウムに感染させて 2 日間共存培養した胚軸を台木培養し、10 日後に胚軸先端を切り取って、カナマイシン 100 mg/L 添加培地に置床した。その結果、シュート形成率は 20% になり、得られたシュートの GUS 活性が植物体全体で確認できた。以上により、再分化の方向が決まったカルスを切り取って選抜培地に置床する方法は、形質転換体の選抜効果が高いことが示された。したがって、この選抜方法を用いれば、台木培養により形質転換体を作出できることが示唆された。

総括

本研究では、再分化が不安定なナスを材料として、培地に PGR を添加せずにシュートを迅速かつ大量に採取できる新しい再分化法として、*in vitro* 全茎切断法を確立した。この方法は、組織培養と比較して採取したシュートの発根率が高いので、効率的な再分化法と考えられる。また、*in vitro* 全茎切断によって再分化しにくい品種も、再分化率の高い品種を台木として用いた培養法によりシュート形成を促進できた。この台木培養は、形質転換体の作出にも適用できた。これらの結果より、*in vitro* 全茎切断および台木培養は、再分化率が不安定または未確立な品種に対しても、最適 PGR 条件の検討なしに高い再分化率と発根率を示す効率的な再分化法であり、これらの方法は形質転換体作出に応用可能であることが示された。

審査結果の要旨

植物における遺伝子組換えは、組織培養による再分化系の確立が前提であるにもかかわらず、未確立または不安定な植物種が多い。ナス (*Solanum melongena* L.) においても、遺伝子組換えによる病害虫抵抗性および機能性を付与した形質転換体作出の研究が進められているが、組織培養による再分化が不安定なため実用化が困難である。そこで本研究では、ナスにおいて、容易で効率的な再分化法を確立し、その方法を形質転換体の作出に応用しようとした。

第 1 章では効率的な再分化法の確立を目的とした。まず、フェノール化合物の生合成阻害剤である L-2-アミノオキシ-3-フェニルプロピオン酸 (AOPP) 処理が、子葉および胚軸培養の再分化に及ぼす影響を調査した。その結果、子葉培養では AOPP 処理してもシュート形成は促進されなかったが、胚軸培養では 10 μ M AOPP で促進された。しかし、シュートの発根率は、対照 (0 μ M AOPP) で 62% だったのに対し、10 μ M AOPP 処理でも 69% にとどまった。このことより、ナスの組織培養において、AOPP 処理はシュート形成数を増加したが、形成したシュートの発根率を向上するには至らないことが示された。これは、組織培養でシュート形成のために使われる外生サイトカニンが発根を抑制していることに起因すると考えられた。

そこで、植物成長調節物質 (PGR) を使用しない *in vitro* 全茎切断による再分化を検討した。その結果、切断 6 週間におけるシュート形成数は、胚軸培養で 2.4 本だったのに対し、*in vitro* 全茎切断では 8.1 本と有意に多かった。また、*in vitro* 全茎切断で形成されたシュートの発根率は 100% だった。これらの結果より、*in vitro* 全茎切断は多くのシュートを迅速に形成させ、得られたシュートはすべて発根することが明らかになった。

次に、*in vitro* 全茎切断により再分化効率を向上させるために品種比較を行った。その結果、切断 6 週間におけるシュート形成数は ‘紫水’ が最も多く、続いて ‘千両二号’、‘黒陽’ そして ‘庄屋大長’ となり、再分化率に品種間差異が認められた。そこで、シュート形成数が少ない ‘庄屋大長’ をシュート形成数の多い ‘紫水’ に接ぎ木 (置床) する台木培養 (‘庄屋大長’ / ‘紫水’ と記す。) を検討した。その結果、‘庄屋大長’ / ‘庄屋大長’ のシュート形成数は 2.8 本だったのに対し、台木を ‘紫水’ にかえた ‘庄屋大長’ / ‘紫水’ では 6.9 本に増加した。以上の結果より、*in vitro* 全茎切断を改良した台木培養は、シュート形成数が少ない品種のシュート形成を促進することが示された。

第 2 章では、開発した台木培養を形質転換体の作出に応用するために、従来の方が適用できない形質転換体の選抜法について検討した。根からカナマイシンを吸収させる選抜法は、形成されたシュートのほとんどが非形質転換細胞由来であり、選抜効果が低いことが示された。そこで、台木培養により形成されたカルスを切り取り、選抜培地に置床する方法を検討した。まず、台木培養により形成されたカルスの再分化時期を調査したところ、台木培養 10 日後には再分化の方向が決定していることが明らかになった。そのカルスを切り取って、カナマイシン 100 mg/L 添加培地で選抜した結果、シュート形成率は 20% になり、得られたシュートの GUS 活性が植物体全体で確認できた。以上により、再分化の方向が決まったカルスを切り取って選抜培地に置床する方法は、形質転換体の選抜効果が高いことが示された。

本研究では、再分化が不安定なナスにおいて、シュートを迅速かつ大量に採取できる新しい再分化法として *in vitro* 全茎切断法を確立した。また、それを改良した台木培養法では、再分化率の高い品種を台木にすれば、再分化しにくい品種のシュート形成がさらに促進されることを明らかにした。そして、この台木培養は形質転換体の作出に適用できることも示した。台木培養法は、外植体再分化のための培養条件を検討するのに必要な労力と時間を大きく節約し、しかもこれまで形質転換が困難だった品種の形質転換体作出効率を著しく向上する可能性がある。これら一連の研究成果は、園芸学、植物分子育種学、植物生理学に大きく貢献すると考えられる。したがって、最終試験の成績と併せて博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。