

学位論文題名

形質転換によるキュウリモザイクウイルス抵抗性
メロンの作出と利用に関する研究

学位論文内容の要旨

本研究はメロン (*Cucumis melo* L.) 栽培に多大な被害をもたらすキュウリモザイクウイルス (CMV) の防除を目的として、CMV 外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換メロンを作出し、その CMV 抵抗性について検討したものである。研究内容は 1. メロンの形質転換法の確立、2. CMV 外被タンパク質遺伝子のメロンへの導入、3. CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの CMV 抵抗性検定、ならびに 4. CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの後代の特性調査の 4 事項に要約される。

1. メロンの形質転換法の確立

(1) メロンのカナマイシン感受性

形質転換体を選抜するためにカナマイシン耐性を指標として用いるので、メロンのカナマイシン感受性について調査した。感受性は、培養部位、培養法、品種等に左右されると考えられたので、種子の発芽時、苗条原基からのシュート再生時、完熟種子胚軸部からの不定胚誘導時、完熟種子子葉部からの不定芽誘導時の 4 つの状態における 6 品種のカナマイシン感受性について調査した結果、品種間で多少の差異は認められたものの不定胚誘導時を除く全ての場合においてカナマイシン 100mg/l 以上の添加区で生長が抑制されることを明らかにした。

(2) 形質転換に適した植物体再生系の検討

3 つの安定した植物体再生系、すなわち苗条原基による再生系、不定胚による再生系、不定芽による再生系を用いて *Agrobacterium tumefaciens*

を利用した形質転換を試み、形質転換に最も適した植物体再生系の検討を行った。その結果、全ての植物体再生系で形質転換体を得ることができたが、①再生率の高さ、②キメラ個体の出現頻度の低さ、③形質転換処理の簡便さの3つの事項を考慮すると不定芽培養系が最も形質転換に適していることを確認した。

2. CMV外被タンパク質遺伝子のメロンへの導入

不定芽培養系を利用した形質転換の諸条件を検討するとともに、CMV外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出を試みた。

(1) 不定芽培養系を利用した形質転換の諸条件の検討

不定芽培養系を利用した形質転換での前培養の効果、ならびに *Agrobacterium tumefaciens* との共存培養時における糖類の効果を検討したところ、生長調節物質を含まないMS培地での2日間の前培養に続いてスクロース3%の培地での共存培養を行うことにより最も効率的にカナマイシン耐性シュートを誘導できることがわかった。また、カナマイシンによる選抜法を検討した結果、①第1次選抜：シュート再生用培地＋カナマイシン50mg/l、②第2次選抜：シュート伸長用培地＋カナマイシン100mg/l、③第3次選抜：発根用培地＋カナマイシン75～100mg/lの順で3段階の選抜を行うと最も効率的に形質転換体を選抜できることが明らかになった。

(2) CMV外被タンパク質遺伝子の導入

CMV-Y系の外被タンパク質遺伝子cDNA、及びカナマイシン耐性遺伝子をコードした植物発現用ベクターを構築し、上記の諸条件を考慮して形質転換を行った。作出したカナマイシン耐性個体から Polymerase Chain Reaction 法を用いて外被タンパク質遺伝子を検出し、それらが形質転換体であることを確認した。また、Dot-immunobinding Assay 法を用いて外被タンパク質を検出し、導入した外来遺伝子が発現していることを確認した。

3. CMV外被タンパク質遺伝子導入メロンのCMV抵抗性検定

純化CMV1 μ g/mlを接種した場合、形質転換体で病徴発現の抑制

が観察され、CMV抵抗性を有することを確認した。CMV濃度を10 $\mu\text{g/ml}$ に高めた場合も非形質転換体に比べ病徴発現が遅延した。形質転換体のCMV抵抗性の程度を、一般市販品種やウイルス病抵抗生品種の育種母本のそれと比較した結果、形質転換体と高いウイルス抵抗性を有する品種‘ミータンカン’のみで病徴の発現が抑制された。このことから、形質転換体のもつウイルス病抵抗性が実用的利用に耐えうるものであることが示唆された。

4. CMV外被タンパク質遺伝子導入メロンの後代の特性

作出した形質転換体の自殖及び交雑後代を作出し、その特性、特にCMV抵抗性を中心に調査した。

(1) 自殖後代の特性

形質転換メロンの自殖後代を作出し外来遺伝子の確認を行った結果、導入した遺伝子を検出し、これが次代へ遺伝したことを確認した。遺伝子の検出比は、ほぼ3 : 1に一致し、導入した遺伝子は1コピーであるか、あるいは染色体の1か所に挿入されたことが示唆された。これら後代の形態、開花特性などを調査した結果、非形質転換体の自殖後代と著しい差異のないものであった。また、これら後代に純化CMV $2\mu\text{g/ml}$ を接種した結果、非形質転換体の自殖後代に比べて病徴発現の遅延及び抑制が観察され、形質転換体自殖後代がCMV抵抗性をもつことを確認した。また、CMV抵抗性は親系統により左右され、同一系統内でも個体間に差異が認められた。

(2) 形質転換体交雑後代の特性調査

形質転換体当代およびその自殖後代と一般市販品種およびウイルス病抵抗性品種との交雑後代を作出しその特性を調査した。形態、開花特性などは形質転換体との交雑後代は非形質転換体との交雑後代と著しい差異のないものであった。形質転換体との交雑後代の外来遺伝子の確認を行った結果、これを検出し交雑後代へ遺伝したことを確認し

た。検出比はほぼ 1 : 1 に一致し、供試した形質転換体自殖後代の外来遺伝子は、当代と同様 1 コピーであるかあるいは染色体の 1 か所に挿入されたことが示唆された。

これら交雑後代に純化 C M V $2\mu\text{g/ml}$ を接種した結果、非形質転換体との交雑後代やもとの品種に比べて病徴発現の遅延及び抑制が観察され、形質転換体交雑後代の C M V 抵抗性を確認した。

以上のように、本研究では、C M V 外被タンパク質遺伝子導入メロンならびにその自殖および交雑後代を作出して、それらがウイルス抵抗性を有することおよび形態・開花特性などについて変化がないことを明らかにした。これらの結果は、メロンにおける形質転換法を確立するとともに外被タンパク質遺伝子の導入によりウイルス病抵抗性品種の育成が可能であることを実証したのみならず、今後のメロン栽培に大きく貢献するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 田 隆
副 査 教 授 木 下 俊 郎
副 査 教 授 木 村 郁 夫
副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

形質転換によるキュウリモザイクウイルス抵抗性 メロンの作出と利用に関する研究

本論文は、7章および緒言、摘要、引用文献からなり、図58、表24を含む206頁の和文論文で、別に参考論文7編が添えられている。

メロン (*Cucumis melo* L.) 栽培において多大な被害をもたらすキュウリモザイクウイルス (CMV) の防除を目的として、CMV外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換メロンを作出し、そのCMV抵抗性について検討しており、内容は次のように要約される。

1. メロンの形質転換法の確立

(1) メロンのカナマイシン感受性

種子の発芽時、苗条原基からのシュート再生時、完熟種子胚軸部からの不定胚誘導時、完熟種子子葉部からの不定芽誘導時におけるカナマイシン感受性について調査した結果、カナマイシン 50~100mg/lを培地に添加すると生長が適度に抑制され、この濃度で形質転換体を選抜するのが適切であることを見出した。

(2) 形質転換に適した植物体再生系の検索

苗条原基による再生系、不定胚による再生系、不定芽による再生系を用いて *Agrobacterium tumefaciens* を利用した形質転換を試み、全ての植物体再生系で形質転換体を得ることができたが、①再生率の高さ、②キメラ個体の出現頻度の低さ、③形質転換処理の簡便さなどの点から不

不定芽培養系が最も形質転換に適していることが明らかになった。

2. CMV外被タンパク質遺伝子のメロンへの導入

不定芽培養系を利用した形質転換の諸条件を検討するとともに、CMV外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出を試みた。

(1) 不定芽培養系を利用した形質転換における諸条件の検討

不定芽培養系を利用した形質転換における前培養の効果並びに *Agrobacterium tumefaciens* との共存培養時における糖類の効果を検討したところ、生長調節物質無添加のMS培地で2日間前培養を行った後スクロース3%を含む培地で共存培養を行うことにより、最も効率的にカナマイシン耐性シュートを誘導できることがわかった。また、カナマイシンによる選抜を行い、①第1次選抜：シュート形成培地+カナマイシン50mg/l, ②第2次選抜：シュート伸長培地+カナマイシン100mg/l, ③第3次選抜：発根培地+カナマイシン75~100mg/l, の順で3段階の選抜を行うと最も効率的に形質転換体が選抜できることを見出した。

(2) CMV外被タンパク質遺伝子の導入

CMV-Y系の外被タンパク質遺伝子cDNA, およびカナマイシン耐性遺伝子をコードした植物発現用ベクターを構築し、形質転換を行ったところ、作出したカナマイシン耐性個体から外被タンパク質遺伝子が検出され、それらが形質転換体であること、および導入した外来遺伝子が発現していることを確認した。

3. CMV外被タンパク質遺伝子導入メロンのCMV抵抗性検定

純化CMV 1 μ g/mlを接種したところ、形質転換体で病徴発現が抑制され、CMV抵抗性を有することを確認した。また、一般市販品種およびウイルス抵抗性品種と比較して、形質転換体では高いウイルス抵抗性が認められ、形質転換体のもつウイルス抵抗性が実用的利用に耐え得るものであることが示唆された。

4. CMV外被タンパク質遺伝子導入メロンの後代の特性

(1) 自殖後代の特性

形質転換メロンの自殖後代を作出し、導入した遺伝子を確認して、これが次代へ遺伝したことを明らかにするとともに、これら後代の形態、

開花特性などを調査した結果、非形質転換体の自殖後代と著しい差異のないものであった。また、これら後代に純化CMV 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を接種したところ、非形質転換体の自殖後代に比べて病徴発現の遅延および抑制がみられ、形質転換体自殖後代がCMV抵抗性をもつことを確認した。

(2) 形質転換体交雑後代の特性調査

形質転換体当代およびその自殖後代と一般品種およびウイルス病抵抗性品種との交雑後代を作出しその特性を調査した。すなわち、形質転換体との交雑後代の外来遺伝子を検出し交雑後代へ遺伝したことを確認するとともに、これらの交雑後代に純化CMV 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を接種した結果、非形質転換体との交雑後代および元の品種に比べて病徴発現の遅延および抑制がみられ、形質転換体交雑後代がCMV抵抗性を有することが明らかになった。また、形態、開花特性などについては、形質転換体との交雑後代は、非形質転換体との交雑後代と比較して著しい差異のないものであることを確認した。

以上のように、本研究は、メロンにおける形質転換法を確立するとともに、ウイルス病抵抗性品種の作出が可能であることを実証しており、今後のメロン栽培に大きく寄与するものと考えられる。

よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者吉岡啓子は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。