

学 位 論 文 題 名

林木の形質転換系の開発

学位論文内容の要旨

林木は永年性であり、生殖活動を開始するまでの期間が極めて長い。したがって、従来の育種技術により、すぐれた形質を有する品種を作出することは数十年の期間を必要とするために非常に困難である。林木の遺伝子操作技術は、親の望ましい形質の全てを保持させたまま、単一の形質のみを選択的に改変するための有効な手段といえる。林木を対象とする分野では、遺伝子導入も特定の樹種に限定されており、形質転換体の実用化は、農作物の世界に比べ非常に遅れている。本研究では、最初にセイヨウハコヤナギにおいて、薬剤耐性選抜効率の良いエレクトロポレーション法を利用するための前段階として葉肉プロトプラストからの植物体の再生系の確立を目的として実験を行った。次に、簡易で形質転換効率の高いTiプラスミド法によってセイヨウハコヤナギ、シラカンバ、ココノエギリの形質転換系を開発することを目的として実験を行った。そしてセイヨウハコヤナギでは、その形質転換系を利用してイネの形態形成に関わる遺伝子 *OSH1* を導入し、林木におけるホメオボックス遺伝子の機能を解析した。また、ココノエギリではホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子(*LUC*)を用いてパーティクルガン法による遺伝子導入を試みた。クロマツ、アカマツ、スギでは、 β -グルクロニダーゼ(*GUS*)及び *LUC* 遺伝子を用いてパーティクルガン法による遺伝子導入のための最適条件を検討した。

セイヨウハコヤナギ葉肉プロトプラストは、サッカロースーデキストラン密度勾配遠心法によって精製し、培地及び培養条件を検討することによって培養7日目に細胞分裂を開始し、培養45日目に小カルスを形成した。さらに、プロトプラスト由来カルスを寒天培地上で増殖し、最終的に不定芽を誘導した。

茎は、*Agrobacterium tumefaciens* を用いたセイヨウハコヤナギ形質転換体の作出で最も有効な組織切片であり、カナマイシン耐性カルスを高頻度に誘導させた。形質転換体の葉は、x-gluc 溶液中で全体的に青く染まり、強い *GUS* 活性を示した。蛍光強度分析では、形質転換体の葉は、コントロールと比較して約200倍の蛍光強度を示した。さらに、サザンハイブリダイゼーションにより、形質転換体にはゲノムあたり約1コピーの *GUS* 遺伝子が導入されていることを

明らかにした。次に、セイヨウハコヤナギ形質転換系を利用して、イネホメオボックス遺伝子 *OSH1* を 35S プロモーターにより大量発現させ、形質転換体の形態異常の誘導を試みた。*OSH1* 遺伝子を導入した形質転換体は、葉の形状が細葉状になったもの、極度に矮性のもの、萌芽状になったものなど様々な形態異常を示した。次に、これらの形態異常と *OSH1* 遺伝子の発現量との関係をノーザンハイブリダイゼーション及び RT-PCR/サザンハイブリダイゼーションにより解析した。ノーザンハイブリダイゼーションでは、萌芽状タイプの形質転換体において、約 1.5kb のバンドが検出され、*OSH1* 遺伝子の発現が確認できた。さらに、RT-PCR/サザンハイブリダイゼーションにより、極度に矮性なタイプ及び葉が細葉状タイプの形質転換体でも *OSH1* 遺伝子のバンドが検出された。以上の結果より、木本性植物でもイネホメオボックス遺伝子 *OSH1* が形態形成に大きな影響を与えることが明らかとなった。

シラカンバにおける *A. tumefaciens* による *GUS* 遺伝子の導入実験では、葉は、形質転換体の作出で最も有効な組織切片であり、カナマイシン耐性カルスを高頻度に誘導させた。また、100 μ M のアセトシリンゴンは、カナマイシン耐性カルスの誘導効率を著しく向上させた。形質転換体の葉は、x-gluc 溶液中で全体的に青く染まり、強い *GUS* 活性を示した。蛍光強度分析では、形質転換体の葉は、コントロールと比較して約 450 倍の蛍光強度を示した。さらに、サザンハイブリダイゼーションにより、形質転換体にはゲノムあたり約 1 コピーの *GUS* 遺伝子が導入されていることを明らかにした。

ココノエギリにおける *A. tumefaciens* による遺伝子導入実験では、葉柄は、他の組織切片よりも高頻度にカナマイシン耐性カルスを誘導させた。また、150 μ M のアセトシリンゴンは、カナマイシン耐性カルスの誘導効率を著しく向上させた。カナマイシン耐性カルスは、いずれも x-gluc 溶液中で全体的に青く染色され、高い *GUS* 活性を示した。また、ココノエギリを用いたパーティクルガンによる遺伝子導入実験では、遺伝子導入処理した植物体切片は、高い発光強度を示し、一過性のルシフェラーゼ遺伝子の発現が検出された。

クロマツ、アカマツへのパーティクルガンによる遺伝子導入実験では、遺伝子導入処理した種子胚において、*GUS* 及び *LUC* 遺伝子の一過性発現が観察された。クロマツ、アカマツとも 1.6 μ m 径の金粒子に DNA をコーティングし、種子から胚を取り出して 4 日目に遺伝子導入処理した時に最も効率良く *GUS* 遺伝子が発現した。

スギへのパーティクルガンによる遺伝子導入実験では、遺伝子導入処理した種子胚から *LUC* 遺伝子の一過性発現のみが観察され、*GUS* 遺伝子はいかなる条件下でも発現が観察されなかった。スギにおいても種子から胚を取り出して 4 日目に遺伝子導入処理した時に、最も効率良く *LUC* 遺伝子が発現した。

以上のように、広葉樹ではセイヨウハコヤナギ、シラカンバ、ココノエギリにおいて効率の良い形質転換系を確立した。また、針葉樹のクロマツ、アカマツ、スギにおいて再現性の高い遺伝子導入系を開発した。これらの形質転換系は、経済的に有用な遺伝子、形態形成を制御する遺伝子や病虫害耐性に関わる遺伝子を発現させた形質転換体の作出を可能とするものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浦 清
副 査 教 授 三 上 哲 夫
副 査 教 授 寺 沢 実

学 位 論 文 題 名

林木の形質転換系の開発

本論文は5章からなり、図26、表14、文献69を含む頁数122の和文論文であり、別に参考論文10篇が付されている。

林木を対象とする分野では、遺伝子導入も特定の樹種に限定されており、形質転換体の実用化は、農作物の世界に比べ非常に遅れている。

本研究では、最初にセイヨウハコヤナギにおいて、葉肉プロトプラストからの植物体の再生系の確立を目的として実験を行い、培地及び培養条件を検討することによって細胞分裂、カルスを誘導し、最終的に再生個体を誘導した。次に、土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* を用いたセイヨウハコヤナギの形質転換系の開発を目的とし、実験を行った。形質転換体の葉は、x-gluc 溶液中で全体的に青く発色し、蛍光強度分析では、コントロールの葉と比較して約200倍の β -グルクロニダーゼ (*GUS*) 活性を示した。さらに、サザンハイブリダイゼーションにより、形質転換体のゲノムDNAに *GUS* 遺伝子が導入されていることを確認した。さらにその形質転換系を利用して、イネの形態形成に関わる遺伝子 *OSH1* を大量発現させた。形質転換体は、葉の形状が細葉状になったもの、極度に矮性のもの、萌芽状になったものなど様々な形態異常を示した。それらの形質転換体について、ノーザンハイブリダイゼーションあるいはRT-PCR/サザンハイブリダイゼーションによる解析で、*OSH1* 遺伝子のバンドが1.5kbのところで検出された。

次に、*A. tumefaciens* によるシラカンバの形質転換系の開発を目的とし、実験を行った。アセトシリンゴンは、カナマイシン耐性カルスの誘導効率を著しく向上させた。形質転換体の葉は、x-gluc 溶液中で全体的に青く発色し、蛍光

強度分析では、コントロールの葉と比較して約 450 倍の *GUS* 活性を示した。さらに、サザンハイブリダイゼーションにより、形質転換体ゲノム DNA に *GUS* 遺伝子が導入されていることを確認した。

ココノエギリにおける *A. tumefaciens* による遺伝子導入実験では、葉柄は、他の組織切片よりも高頻度にカナマイシン耐性カルスを誘導させた。また、アセトシリンゴンは、カナマイシン耐性カルスの誘導効率を著しく向上させた。また、ホタル由来のルシフェラーゼ (*LUC*) 遺伝子を用いたパーティクルガンによる遺伝子導入実験では、遺伝子導入処理した植物体切片は、高い発光強度を示し、ルシフェラーゼ遺伝子の一過性発現が検出された。

クロマツ、アカマツへのパーティクルガンによる遺伝子導入実験では、遺伝子導入処理した種子胚において *GUS* 及び *LUC* 遺伝子の一過性発現が観察された。クロマツ、アカマツとも 1.6 μ m 径の金粒子を用い、培養 4 日目の種子胚に遺伝子導入処理した時に最も効率良く *GUS* 及び *LUC* 遺伝子が発現した。

スギへのパーティクルガンによる遺伝子導入実験では、遺伝子導入処理した種子胚において *LUC* 遺伝子の一過性発現のみが観察され、*GUS* 遺伝子はいかなる条件下でも発現が観察されなかった。スギにおいても、培養 4 日目の種子胚に遺伝子導入処理した時に最も効率良く *LUC* 遺伝子が発現した。

以上のように、広葉樹ではセイヨウハコヤナギ、シラカンバ、ココノエギリにおいて効率の良い形質転換系を確立した。また、針葉樹のクロマツ、アカマツ、スギにおいて再現性の高い遺伝子導入系を開発した。これらの形質転換系は、経済的に有用な遺伝子、形態形成を制御する遺伝子や病虫害耐性に関わる遺伝子を発現させた形質転換体の作出を可能とするものである。

よって審査員一同は、毛利 武が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認定した。