

学 位 論 文 題 名

Establishment of Systems for Plant Regeneration
and *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation
in Callus Culture of the *Alstroemeria*.

（アルストロメリアのカルス培養における植物体再生系と
Agrobacterium 法による形質転換系の確立）

学位論文内容の要旨

アルストロメリアは南アメリカ原産の単子葉植物であり、最もポピュラーな切り花の一つである。現在、アルストロメリアの増殖は rhizome の分割や胚珠培養によって行われているが、増殖効率は極めて低く、これに代わる増殖技術の確立が望まれている。また、アルストロメリアには数多くの自生種があるが、種間交雑によって雑種を得ることが難しく、種間雑種が得られたとしても不稔の場合がほとんどであるため、伝統的な育種方法を用いての品種改良が困難である。近年、多くの植物種において確立されている遺伝子導入法はアルストロメリアにおいても有効な育種技術となるものと考えられる。本研究は、新しい増殖・育種技術の確立を目的として、胚珠由来のアルストロメリアカルスからの効率的な植物体再生と *Agrobacterium* 法による形質転換について検討したものである。

1. カルスからの効率的な植物体再生系の確立

増殖・育種技術として組織培養を利用するためには、短期間に大量の再生個体を得られることが望ましい。しかし、アルストロメリアは組織培養による植物体再生は困難であるとされている。そこで、*A. pelegria* (L.) var. *rosea* と *A. magenta* の種間交雑によって得られた胚珠由来カルスからの植物体再生条件について検討を行った。

カルスを 0.5 mg/l ナフタレン酢酸 (NAA) および 0.5 mg/l ベンジルアデニン (BA) を添加した 1/2 濃度の Murashige and Skoog (MS) 培地で液体振盪培養したところ、friable なカルスが増殖した。これを生長調節物質を含まない 1/2MS 固形培地上で培養したところ、多くの proembryo が分化した。この proembryo は 0.1–2.0 mg/l BA を含む 1/2MS 固形培地上で健全な植物体に生長した。これまで報告されているアルストロメリアの組織培養系においては、植物体再生までに長期間 (8–10 か月以上) を要し、増殖効率も低かったが、本培養系を用いることで 1 g のカルスから約 3 か月でおよそ 450 の再生個体を得ることができた。なお、proembryo 経由の植物体再生は液体培地を用いた場合に特有の現象であり、固形培地のみを用いた場合の植物体再生は器官形成によることが分かった。器官形成による植物体再生は、proembryo 経由の場合と比べ、長期を要し、増殖効率も低かった。以上のことから、液体培養を用いることにより、アルストロメリアの短期での大量増殖が可能であることが明らかとなった。

2. *Agrobacterium* 法による形質転換系の確立

Agrobacterium 法による単子葉植物の形質転換は困難であるとされており、成功例も数少ない。単子葉植物の形質転換には、particle bombardment 法が一般的であり、アルストロメリアにおいても報告例が一つある。しかし、*Agrobacterium* 法は particle bombardment 法に比べ、コスト面および技術的な簡易さに利点がある。そこで、*Agrobacterium tumefaciens* および *A. rhizogenes* を用いての形質転換法について検討した。

2.1 *A. tumefaciens* による形質転換

本研究では、*A. tumefaciens* に binary vector として pIG121Hm を保持する EHA101 および pTOK233 を保持する LBA4404 の 2 系統を用いて形質転換を試みた。どちらの binary vector も β -glucuronidase (GUS) 遺伝子、neomycin phosphotransferase II (NPTII) 遺伝子および hygromycin phosphotransferase (HPT) 遺伝子を有している。

胚珠由来のカルスに *A. tumefaciens* EHA101 (pIG121Hm) および LBA4404 (pTOK233) の 2 系統をそれぞれ接種し、500 mg/l Claforan で除菌、20 mg/l hygromycin で選抜を行った。いずれの系統を接種した場合においても、hygromycin 耐性カルスが得られた。このカルスは組織化学的 GUS 染色により青色を呈し、また、polymerase chain reaction (PCR) により外来遺伝子 (GUS 遺伝子および NPTII 遺伝子) の導入が確認された。形質転換カルスは、1. で確立した液体培養系では植物体は再生出来なかったが、0.5 mg/l NAA と 0.5 mg/l BA とを組み合わせ添加した 1/2MS 固形培地上で培養した場合に、多くの植物体を生じた。再生個体における外来遺伝子の導入ならびに発現を PCR, Southern hybridization および reverse transcription PCR (RT-PCR) により明らかにした。アルストロメリアカルスは *A. tumefaciens* により効率的に形質転換され、導入遺伝子は再生個体においても安定して発現することを示した。

2.2 *A. rhizogenes* による形質転換

単子葉植物において、*A. rhizogenes* による形質転換の成功例はこれまでにない。本研究では野生型 Ri プラスミドおよび binary vector pIG121Hm を持つ *A. rhizogenes* A13 系統を用いて形質転換を試みた。

A. tumefaciens の場合と同様に、カルスに *A. rhizogenes* 接種した後、Claforan で除菌を行い、hygromycin で選抜を行った。Hygromycin 耐性カルスは組織化学的 GUS 染色により青色を呈し、PCR により pIG121Hm および Ri プラスミドの T-DNA (NPTII 遺伝子および *rol* 遺伝子) の導入が確認された。このカルスからは 1. および 2.1 に示した再生条件では植物体は得られなかったが、0.1 mg/l ジベレリン酸 (GA_3) を添加した 1/2MS 固形培地上で培養した場合、多くの不定芽を生じた。再生個体における *rol* 遺伝子および NPTII 遺伝子の導入ならびに発現を PCR, Southern hybridization および RT-PCR により明らかにした。再生個体は非形質転換体と比べ、若干旺盛な根の生長を示したが、典型的な Ri-形質転換体の形質 (毛状根、節間伸長の不全、葉のしおれ等) は示さなかった。アルストロメリアカルスは *A. rhizogenes* によっても形質転換され、Ri-形質転換カルスからの植物体再生には GA_3 が必要となることが明らかとなった。

以上のように本論文は、アルストロメリアの効率的な植物体再生系と *A. tumefaciens* および *A. rhizogenes* を用いた形質転換系を確立し、今後のアルストロメリアの増殖および育種技術の新しい可能性を示した。この基礎的な知見が発点となって、アルストロメリアの新しい農業技術の開発および新品種の育成が進むことが期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	佐藤	博二
副査	教授	中嶋	博
副査	教授	大澤	勝次
副査	助教授	由田	宏一

学位論文題名

Establishment of Systems for Plant Regeneration and *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation in Callus Culture of the *Alstroemeria*.

(アルストロメリアのカルス培養における植物体再生系と
Agrobacterium 法による形質転換系の確立)

本論文は5章からなり、図14個、表7個、引用文献114を含む総頁数102の英文論文であり、他に参考論文2編が付与されている。

アルストロメリアは南アメリカ原産の単子葉植物であり、最もポピュラーな切り花の一つであるが、増殖効率は極めて低く、一般的な増殖技術の開発が望まれている。アルストロメリアは伝統的な育種方法を用いての品種改良が困難であり、近年多くの植物種において確立されている遺伝子導入法は有効な育種技術となるものと考えられる。本研究は、新しい増殖・育種技術の確立を目的として、アルストロメリアカルスからの効率的な植物体再生と *Agrobacterium* 法による形質転換について検討したものである。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. カルスからの効率的な植物体再生系の確立

増殖・育種技術として組織培養を利用するためには、短期間に大量の再生個体を得られることが望ましい。そこで、カルスからの植物体再生条件について検討を行った。

A. pelegria (L.) var. *rosea* と *A. magenta* の種間交雑によって得られた胚珠由来カルスを 0.5 mg/l NAA 及び 0.5 mg/l BA を添加した 1/2 濃度の MS 培地で液体振盪培養し、増殖した friable なカルスを生長調節物質を含まない 1/2MS 固形培地上で培養したところ、多くの proembryo が分化した。この proembryo は 0.1–2.0 mg/l BA を含む 1/2MS 固形培地上で健全な植物体に生長した。液体培養と固形培養を効果的に用いることで 1 g のカルスから約 3 か月でおおよそ 450 の再生個体を得ることが可能であり、これまでのアルストロメリアにおける植物体再生に関する報告と比べ、最も効率的である。

2. *Agrobacterium* 法による形質転換系の確立

Agrobacterium 法による単子葉植物の形質転換は困難であるとされているが、直接導入法

などの他の方法と比べコスト面および技術的な簡易さに利点がある。そこで、*Agrobacterium tumefaciens* および *A. rhizogenes* を用いての形質転換法について検討した。

2.1 *A. tumefaciens* による形質転換

GUS 遺伝子, NPTII 遺伝子および HPT 遺伝子を有する binary vector を組み込んだ *A. tumefaciens* をカルスに接種し, 500 mg/l Claforan で除菌, 20 mg/l hygromycin で選抜を行ったところ, 形質転換カルスが得られた。形質転換カルスは, 0.5 mg/l NAA および 0.5 mg/l BA を添加した 1/2MS 固形培地上で培養した場合に, 多くの植物体を生じた。再生個体における外来遺伝子の導入ならびに発現を PCR, Southern hybridization および RT-PCR により明らかにした。*A. tumefaciens* によるアルストロメリアの形質転換を証明した。

2.2 *A. rhizogenes* による形質転換

野生型 Ri-plasmid および GUS 遺伝子, NPTII 遺伝子および HPT 遺伝子を有する binary vector を保持する *A. rhizogenes* をカルスに接種した後, Claforan で除菌, hygromycin で選抜を行ったところ, binary vector および Ri-plasmid の T-DNA 領域の遺伝子が組み込まれた形質転換カルスが得られた。このカルスを 0.1 mg/l GA₃ を添加した 1/2MS 固形培地上で培養したところ, 多くの不定芽を生じた。再生個体における外来遺伝子の導入ならびに発現を PCR, Southern hybridization および RT-PCR により明らかにした。再生個体は非形質転換体と比べ, 若干旺盛な根の生長を示したが, 典型的な Ri-形質転換体の形質は示さなかった。アルストロメリアのみならず, 単子葉植物において, *A. rhizogenes* による形質転換を実証したのは本研究が初のことである。

以上のように本論文は, アルストロメリアの効率的な植物体再生系と *Agrobacterium* を用いた形質転換系を確立し, 今後のアルストロメリアの増殖および育種技術の新しい可能性を示し, 今後新しい農業技術としての応用の可能性を明らかにしたものであり, 学術上, 応用上高く評価される。審査担当者一同は阿久津雅子に博士(農学)の学位を与えるに十分であると認定する。