

学 位 論 文 題 名

Establishment of efficient *in vitro* culture and
particle bombardment-mediated transformation systems
in two warm season grass species,
Miscanthus sinensis and *Zoysia japonica*

(ススキおよびシバの2つの暖地型イネ科草種における効率的な
組織培養系とパーティクルボンバードメントによる形質転換系技術の確立)

学位論文内容の要旨

ススキ(*Miscanthus sinensis* Anderss.)およびシバ(*Zoysia japonica* Steud.)は日本を始めとして東アジアに自生する暖地型イネ科植物(C4植物)で、特に冷涼な環境下でバイオマス生産性が高いとともに低養分要求性、永続性、土壌への炭素隔離などサステナブルな生物生産に適した優れた特性を持っている。シバは広く放牧地や芝生に利用され、ススキは近年、エネルギー資源作物として注目されている。シバでは秋以降の生育期間拡大や耐寒性改良などが、ススキでは高糖含量や低リグニン含量によるバイオエタノール生産に適する糖化効率の改良などが求められている。分子育種技術によりこれらの遺伝改良が期待されている。そこで、本研究では、ススキおよびシバにおける分子育種技術開発の基盤研究として、効率的な組織培養系とパーティクルボンバードメントによる形質転換系技術の確立を図った。

最初に、ススキの効率的な組織培養系技術を確立するために完熟種子を外植片に用いて検討を行った。カルス誘導用として、MS基本培地に 5 mg L^{-1} 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、 0.01 mg L^{-1} 6-ベンジルアミノプリン(BA)の植物ホルモンを含む培地が、植物体再分化用には、 0.5 mg L^{-1} BAと 0.5 mg L^{-1} ナフタレン酢酸(NAA)を含む培地がそれぞれ適していることを明らかにした。日本各地から収集したススキ18系統を供試してエンブリジェニックカルス形成率を調査した。その結果、カルス形成率は収集地点の平均気温との間に有意な正の相関関係がみられ、「種子島」系統がカルス形成率に最も優れていた。一方、植物体再分化率については、北海道から収集した「今金」系統が優れていた。そこで、以下の形質転換系技術に関する研究では、この両系統を供試した。

ススキの形質転換系技術を確立するために、レポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク質

(GFP)遺伝子を用いて最適な実験諸条件を明らかにした。パーティクルボンバードメント法によりエンブリオジェニックカルスに遺伝子を撃ち込んだ。撃ち込んだカルスを4～5日間抗生物質ハイグロマイシン(Hm)を含まない培地で培養した後、Hmを含む培地で2回選抜を行った。一回目の選抜には50 mg L⁻¹、2回目の選抜には150 mg L⁻¹のHm濃度が適していた。選抜の結果、全体にGFPが発色するカルスが得られた。その後、カルスを50 mg L⁻¹ Hmを含む再分化培地に置床し、GFPが発色するシュートを得ることができた。その後シュートは20 mg L⁻¹ Hm含む1/2MS培地で発根し、GFPの形質転換植物体を作出することができた。PCRおよびRT-PCR法で導入遺伝子の存在と発現を確認し、ススキの形質転換系技術を確立することができた。

ススキは光合成同化産物を主としてデンプンに変換して葉緑体に貯蔵するため、フルクタン合成能力をもたない。そこで、寒地型イネ科牧草のベレニアルライグラスから単離したフルクタン合成酵素遺伝子をススキへ導入することを検討した。*prf11*(6-SFT 遺伝子)、*prf13* (6G-FFT 遺伝子)を組み込んだベクターを構築し、開発した形質転換系技術により、ススキカルスへの導入を行った。その結果、それぞれの遺伝子について形質転換植物体を得ることができた。これらの植物体でPCRおよびRT-PCR法で導入遺伝子の存在と発現を確認した。

次に、シバにおける効率的な組織培養系技術の確立を検討した。完熟種子から切り出した胚を外植片として培養するとカルスが短期間で形成され、その形成率が向上した。カルス誘導用として、MS基本培地に5 mg L⁻¹ 2,4-D、0.2 mg L⁻¹ BAの植物ホルモンを含む培地が、植物体再分化用としては、0.5 mg L⁻¹ チジアズロン、0.05 mg L⁻¹ NAA、0.1 mg L⁻¹ ジベレリン酸を含む培地がそれぞれ適していた。8種類のタイプのカルスが形成されたが、フライアブルカルスで最も植物体再分化率が高かった。今回確立した組織培養系技術はカルス誘導から植物体再分化までの培養期間を16週間までに短縮することができた。

シバにおける新しい形質転換系技術を確立するために、完熟種子から切り出した胚を数日間前培養してからパーティクルボンバードメント法やアグロバクテリウム法によって形質転換させる手法を検討した。GFPの発現が細胞で観察され、遺伝子が効率よく導入されたことを確認することができた。カルスの増殖速度の遅いシバにおいては、形質転換植物体作出の期間短縮に有効であると考えられた。

以上、ススキの効率的な組織培養系とパーティクルボンバードメント法による形質転換系技術を開発し、フルクタン合成酵素遺伝子を導入したススキ形質転換植物体を作出することができた。さらに、シバにおいて培養期間を短縮できる効率的な組織培養技術を確認し、完熟胚を前培養して遺伝子導入する新しい形質転換技術を開発した。これらの技術開発は、ススキやシバにおいて分子育種技術により遺伝改良を行う際に、有用な知見になることが期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山田敏彦
副査	教授	荒木肇
副査	助教	星野洋一郎
副査	特任助教	三輪京子
副査	准教授	金澤章 (大学院農学研究院)

学位論文題名

Establishment of efficient *in vitro* culture and particle bombardment-mediated transformation systems in two warm season grass species, *Miscanthus sinensis* and *Zoysia japonica*

(ススキおよびシバの2つの暖地型イネ科草種における効率的な
組織培養系とパーティクルボンバードメントによる形質転換系技術の確立)

ススキ(*Miscanthus sinensis* Anderss.)およびシバ(*Zoysia japonica* Steud.)は日本を始めとして東アジアに自生する暖地型イネ科植物(C4植物)で、特に冷涼な環境下でバイオマス生産性が高いとともに低養分要求性、永続性、土壌への炭素隔離などサステナブルな生物生産に適した優れた特性を持っている。シバは広く放牧地や芝生に利用され、ススキは近年、エネルギー資源作物として注目されている。シバでは秋以降の生育期間拡大や耐寒性改良などが、ススキでは高糖含量や低リグニン含量によるバイオエタノール生産に適する糖化効率の改良などが求められている。分子育種技術によりこれらの遺伝改良が期待されている。そこで、本研究では、ススキおよびシバにおける分子育種技術開発の基盤研究として、効率的な組織培養系とパーティクルボンバードメントによる形質転換系技術の確立を図った。

最初に、ススキの効率的な組織培養系技術を確立するために完熟種子を外植片に用いて検討を行った。カルス誘導用として、MS基本培地に 5 mg L^{-1} 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、 0.01 mg L^{-1} 6-ベンジルアミノプリン(BA)の植物ホルモンを含む培地が、植物体再分化用には、 0.5 mg L^{-1} BAと 0.5 mg L^{-1} ナフタレン酢酸(NAA)を含む培地がそれぞれ適していることを明らかにした。日本各地から収集したススキ18系統を供試してエンブリジェニックカルス形成率を調査した。その結果、カルス形成率は収集地点の平均気温との間に有意な正の相関関係がみられ、「種子島」系統がカルス形成率に最も優れていた。一方、植物体再分化率については、北海道から収集した「今金」系統が優れていた。そこで、以下の形質転換系技術

に関する研究では、この両系統を供試した。

ススキの形質転換系技術を確立するために、レポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を用いて最適な実験諸条件を明らかにした。パーティクルボンバードメント法によりエンブリオジェニックカルスに遺伝子を撃ち込んだ。撃ち込んだカルスを4～5日間抗生物質ハイグロマイシン(Hm)を含まない培地で培養した後、Hmを含む培地で2回選抜を行った。一回目の選抜には 50 mg L^{-1} 、2回目の選抜には 150 mg L^{-1} のHm濃度が適していた。選抜の結果、全体にGFPが発色するカルスが得られた。その後、カルスを 50 mg L^{-1} Hmを含む再分化培地に置床し、GFPが発色するシュートを得ることができた。その後シュートは 20 mg L^{-1} Hm含む1/2MS培地で発根し、GFPの形質転換植物体を作出することができた。PCRおよびRT-PCR法で導入遺伝子の存在と発現を確認し、ススキの形質転換系技術を確立することができた。

ススキは光合成同化産物を主としてデンプンに変換して葉緑体に貯蔵するため、フルクタン合成能力をもたない。そこで、寒地型イネ科牧草のペレニアルライグラスから単離したフルクタン合成酵素遺伝子をススキへ導入することを検討した。*prf11*(6-SFT遺伝子)、*prf3*(6G-FFT遺伝子)を組み込んだベクターを構築し、開発した形質転換系技術により、ススキカルスへの導入を行った。その結果、それぞれの遺伝子について形質転換植物体を得ることができた。これらの植物体でPCRおよびRT-PCR法で導入遺伝子の存在と発現を確認した。

次に、シバにおける効率的な組織培養系技術の確立を検討した。完熟種子から切り出した胚を外植片として培養するとカルスが短期間で形成され、その形成率が向上した。カルス誘導用として、MS基本培地に 5 mg L^{-1} 2,4-D、 0.2 mg L^{-1} BAの植物ホルモンを含む培地が、植物体再分化用としては、 0.5 mg L^{-1} チジアズロン、 0.05 mg L^{-1} NAA、 0.1 mg L^{-1} ジベレリン酸を含む培地がそれぞれ適していた。8種類のタイプのカルスが形成されたが、フライアブルカルスで最も植物体再分化率が高かった。今回確立した組織培養系技術はカルス誘導から植物体再分化までの培養期間を16週間までに短縮することができた。

シバにおける新しい形質転換系技術を確立するために、完熟種子から切り出した胚を数日間前培養してからパーティクルボンバードメント法やアグロバクテリウム法によって形質転換させる手法を検討した。GFPの発現が細胞で観察され、遺伝子が効率よく導入されたことを確認することができた。カルスの増殖速度の遅いシバにおいては、形質転換植物体作出の期間短縮に有効であると考えられた。

以上、ススキの効率的な組織培養系とパーティクルボンバードメント法による形質転換系技術を開発し、フルクタン合成酵素遺伝子を導入したススキ形質転換植物体を作出することができた。さらに、シバにおいて培養期間を短縮できる効率的な組織培養技術を確立し、完熟胚を前培養して遺伝子導入する新しい形質転換技術を開発した。これらの技術開発は、ススキやシバにおいて分子育種技術により遺伝改良を行う際に、有用な知見になることが期待される。特に、ススキの形質転換系技術に関しては世界で最初の報告で、今後、応用的に利用価値が非常に高いものである。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位なども合わせて、申請者は博士(環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。