

## カキおよびキウイフルーツ育種における形質転換法の利用

著者	中村 ゆり
著者別名	Nakamura Yuri
内容記述	筑波大学博士（農学）学位論文・平成11年10月31日授与（乙第1559号）
発行年	1999
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/6606">http://hdl.handle.net/2241/6606</a>

## 摘 要

本研究では、カキおよびキウイフルーツの育種における形質転換法の利用をはかるため、カキについて効率的な形質転換法の開発を行い、また、形質転換法が既に確立しているキウイフルーツを用いて有用遺伝子の導入を行い、導入遺伝子の発現解析を行った。

### 1. カキ種子内胚軸からの再分化系の確立

形質転換法の開発のためには、効率の高い不定芽の再分化系が不可欠であるため、まずカキの植物体再生の培養条件を検討した。

カキ種子内胚軸を無菌的に種子から摘出し、子葉と幼芽を取り除いて外植片を調整した。この胚軸外植片をゼアチン、2-Cl-4PU、BAの3種類のサイトカイニンを0.2~10 mg/lの濃度で含む窒素成分のみを1/2にしたMS培地(1/2NMS)培地で培養した結果、2 mg/lゼアチンを添加した場合、高頻度で胚軸外植片切断部から直接不定芽が形成された。

続いて、形質転換体の選抜に必要な不定芽形成を阻害するカナマイシンの濃度を検討したところ、25 mg/l以上のカナマイシンで不定芽形成が完全に阻害された。また、アグロバクテリウムの除去に用いる抗生物質であるクラフォランは不定芽形成を阻害しなかったが、カルベニシリンは不定芽形成を阻害した。

以上の結果から、アグロバクテリウム法による形質転換体の選抜培地には2 mg/lゼアチン、25 mg/lカナマイシン、500 mg/lクラフォランを含む1/2NMS培地が適当であることが明らかとなった。

## 2. カキ種子内胚軸再分化系を用いた効率的な形質転換体の作出

上記で確立した再分化系を用いて、アグロバクテリウム法による形質転換系の開発を行った。アグロバクテリウムは LBA4404/pBI121、LBA4404/pTOK233 および EHA101/pSMAK251 系統を用いた。アグロバクテリウムを接種した胚軸外植片を3日間共存培養した後、前述した選抜培地を用いて培養を行った。その結果、EHA101/pSMAK251 を用いた場合にのみ、用いた外植片の10%程度の頻度で形質転換体を得られた。LBA4404 系統では不定芽は形成されたが、形質転換体は得られなかった。従って、カキの形質転換には EHA101 系統が適しており、LBA4404 系統は適していないことが明らかとなった。この方法では、カルスを経ずに直接不定芽が形成されるため、アグロバクテリウム感染から4~5か月後には、完全な形質転換体を得ることが出来た。

この形質転換法は、胚軸という雑種由来の材料を用いているため、既存品種に有用遺伝子を導入することは出来ない。しかし、交雑育種のプログラムに組み込んだ形での利用は可能である。今後、本法により、有用な交配母本の作出または台木品種の育成が行われるものと期待される。

## 3. キウイフルーツへの糸状菌病害抵抗性遺伝子の導入

キチナーゼや $\beta$ -1,3-エンドグルカナーゼは植物細胞が糸状菌に感染した際に生産する溶菌酵素である。これらの酵素は菌の生育を直接阻害し、さらに酵素によって低分子化された糸状菌細胞壁の成分がエリシターとなってファイトアレキシンの生産など一連の植物の

防御反応が誘導されることが明らかにされている。既にこれらの酵素の遺伝子を植物に導入し、糸状菌病害抵抗性が高まったという報告がなされている。キウイフルーツでも果実軟腐病、灰色かび病などによる糸状菌病害が問題となっていることから、本研究ではキウイフルーツの糸状菌病に対する抵抗性を強化することを目的とし、キウイフルーツにイネのキチナーゼ遺伝子あるいはダイズの $\beta$ -1,3エンドグルカナーゼ遺伝子を導入し、形質転換体を作成した。

キチナーゼ遺伝子導入形質転換体では、導入遺伝子は植物細胞内で mRNA に転写されていたが、非形質転換体に比べて有意にキチナーゼ活性が高まった個体は得られず、灰色かび病に対する病害抵抗性の増強が認められた個体は得られなかった。

$\beta$ -1,3エンドグルカナーゼ遺伝子導入形質転換体では、非形質転換体に比べて有意にグルカナーゼ活性が高まった個体が得られた。最も高い活性を示した形質転換体は非形質転換体の約 6 倍のグルカナーゼ活性を示した。灰色かび病に対する病害抵抗性検定では、高度な病害抵抗性を示す個体は得られなかったが、グルカナーゼ活性の高まった形質転換体では、非形質転換体に比べて病斑の拡大が抑制された。

#### 4. キウイフルーツへのヒト上皮細胞成長因子 (hEGF) 遺伝子の導入

hEGF は約 50 個のアミノ酸からなるタンパク質で、動物の上皮細胞の増殖を促進する働きを持っている。このため、創傷治療薬として臨床試験が進められている。本研究では新機能を有するキウイフルーツを作成するため、CaMV 35S プロモーターに連結した hEGF 遺

伝子をキウイフルーツに導入し、形質転換体を作成した。得られた形質転換体の若い葉より可溶性タンパク質を抽出し、hEGFの含量を測定したところ、最大で可溶性タンパク質1 mgあたり65 pgのhEGFが生産されていた。

本実験は、ヒトに対して生理活性のあるペプチドを果樹に導入して、その生産を証明した例である。この結果は、形質転換法を用い、本来当該植物が持っていなかった新しい機能を植物に賦与し、何らかの有益な物質を果実内で生産させることにより、付加価値を持った果樹を作成するという新しい育種の可能性を示すものである。

これらの結果をもとに、果樹育種全体における形質転換技術利用の今後の展望について考察した。