



# 細胞融合および遺伝子組換え技術を用いた耐病性ナス台木とイチゴの育成

浅尾, 浩史

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2003-09-19

(Date of Publication)

2009-05-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2710

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002710>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 3 4 1 】

氏 名・(本 籍) 浅尾 浩史 (奈良県)

博士の専攻分野の名称 博士(農学)

学 位 記 番 号 博ろ第61号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成15年9月19日

【 学位論文題目 】

細胞融合および遺伝子組換え技術を用いた耐病性  
ナス台木とイチゴの育成

審 査 委 員

主 査 教 授 上島 脩志  
教 授 安田 武司  
教 授 中村 千春

(様式 3)

(氏名：浅尾 浩史 No. 1)

## 論文内容の要旨

氏名 浅尾 浩史

### 論文題目：細胞融合および遺伝子組換え技術を用いた耐病性ナス台木とイチゴの育成

わが国のナスとイチゴの生産量はそれぞれ 45 万トン（世界第 5 位）および 21 万トン（世界第 3 位）に達するが、これらは一般に病害を受けやすく、病害抵抗性品種の育成が強く望まれている。ナス栽培において通常耐病性台木に栽培品種を接ぎ木した苗が用いられている。それにもかかわらず、土壌病害である青枯病によってしばしば大きな被害を受ける。そのため、奈良県農業技術センターは高度抵抗性台木品種「カレヘン」を育成したが、これは低温期の伸長性が悪く、胚軸が細いという欠点を持っていた。そこで本研究では、まず、青枯病に対して高度抵抗性を有し、かつ低温伸長性の優れた台木品種の育成を目的として、ナスにおけるプロトプラスト培養系を確立するとともに、青枯病萎凋誘導物質の培地への添加による抵抗性細胞の選抜における有効性を検討した後、「カレヘン」と、これとは交雑が困難である低温伸長性の優れた栽培品種「千両二号」との細胞融合による体細胞雑種の作出を試みた。一方、日本のイチゴ栽培において、最も栽培面積の大きな「とよのか」はうどんこ病に罹病性であるため、大量の農薬散布が必要であり、これは農家の負担を大きくするとともに、安全性の面かも問題になっている。そこで本研究では、イチゴの葉組織から再分化個体を獲得するための培養系を確立し、植物の生体防御において、重要な役割を果たしていると考えられるキチナーゼ遺伝子をイチゴへ導入することによって、うどんこ病抵抗性個体を作出できるか検討した。さらに、うどんこ病抵抗性を獲得した遺伝子組換えイチゴの環境に対する安全性評価試験を行った。

第 1 編では、細胞融合技術を用いた青枯病抵抗性を持つ有用ナス台木の育成を育種目標にして実験を行った。

第 1 章では、ナスの栽培品種と台木品種におけるプロトプラスト培養系の確立をめざした。栽培品種の「千両二号」(*Solanum melongena* cv. Senryou II)

(氏名：浅尾 浩史 No. 2)

と、台木品種の「カレヘン」(*S. sanitwongsei*)、「トルバム・ビガー」(*S. torvum*)、「ヒラナス」(*S. integrifolium*) および「耐病 VF」(*S. spp* cv. Taibyou VF) を供試材料とし、プロトプラスト単離条件、コロニー形成に及ぼすプロトプラスト培養における培地の種類と細胞密度の影響および再分化に対する最適条件について検討した。その結果、子葉切片を低濃度のセルラーゼとマセロザイムに 16 時間静置処理して得たプロトプラストを  $5 \times 10^4$  個/ $m\ell$  の細胞密度で培養し、カルスグリーン化培地 (C 培地)、再分化培地 (IAA と Zeatin を含む MS 培地) および発根培地 (1/2 MS 培地) へ移植することによって、約 3 ヶ月で完全な植物体を得ることができた。特に「トルバム・ビガー」を侵す青枯病菌にも抵抗性を示す「カレヘン」は、コロニー形成率が高く、IAA と Zeatin を添加した MS 培地で容易に再分化することを明らかにした。

第 2 章では、ナス幼苗を萎凋させる青枯病菌培養液から抽出した青枯病萎凋誘導物質が、本病害に抵抗性を有する細胞を選抜する上で有効であるかを検討した。その結果、青枯病萎凋誘導物質は、「ヒラナス」と「千両二号」のプロトプラストの分裂とコロニー形成に対して著しい抑制作用を示したが、「カレヘン」のそれらに対してはほとんど影響を及ぼさなかった。「カレヘン」についても、プロトプラスト由来小カルスを青枯病萎凋誘導物質を添加した C 培地で培養すると、その生育が抑制され褐変したが、このカルスを再分化培地へ移植すると半数以上のカルスは生育が回復し緑色化した。そして、「カレヘン」から細胞選抜によって得た個体を台木とし、「千両二号」を接ぎ木して青枯病抵抗性を検定したところ、実生「カレヘン」を台木とした場合よりも高度の抵抗性を示した。この結果から、プロトプラストの培養開始直後の培地や C 培地に、青枯病萎凋誘導物質を添加して培養すれば抵抗性細胞を選抜できることが明らかになった。

第 3 章では、「カレヘン」と「千両二号」を細胞融合し、青枯病抵抗性細胞を選抜するのに有効であった青枯病萎凋誘導物質をプロトプラスト培養の培地および C 培地に添加して、体細胞雑種を作出し、青枯病汚染圃場で抵抗性個体の選抜を試みた。その結果、得られた体細胞雑種は、形態的には両親の中間を示し、染色体数は両親の染色体をあわせ持った 48 本で、種子稔性は良好であり、しかも青枯病に対して耐病性を示した。

第 4 章では体細胞雑種とその後代の特性を調査した。体細胞雑種当代およびその後代は、「カレヘン」が有する青枯病抵抗性と同等以上の抵抗性を示し、低温伸長性も著しく改善され、胚軸も太くなっていた。そこで、この体細胞雑種はナスの青枯病抵抗性台木として普及が期待できることから、1997 年に「ナクロス」として種苗登録した。

(氏名：浅尾 浩史 No. 3)

第2編では、遺伝子組換え技術を用いた耐病性イチゴの作出を育種目標に実験を行った。

第1章では、イチゴへの遺伝子組換え技術を開発するため、著者らが開発したイチゴの葉組織から再分化個体を獲得することができる培養系を用いて、アグロバクテリウム法による遺伝子導入における諸条件と、遺伝子組換え体のランナーにおける導入遺伝子の発現について検討した。供試したイチゴ外植片のカナマイシンに対する感受性は高く、50 mg/ℓの添加で、葉片と葉柄片からのカルス化は認められず、遺伝子組換え体を効率良く選抜できることが判明した。GUS 遺伝子を導入した遺伝子組換え体の葉脈、維管束および根の生長点で高いGUS 活性が認められ、また、ランナーにも安定的にGUS 活性が確認できた。これらのことから、遺伝子導入によって有用個体の作出が可能であることが示唆された。

第2章では、イネ由来キチナーゼ遺伝子導入によるうどんこ病抵抗性イチゴの作出を試みた。キチナーゼ活性は、非組換え体の平均が13.8 mU/gであるのに対して、遺伝子組換え体の平均は44.0 mU/gと約3倍の値を示した。また、閉鎖系温室内において行ったうどんこ病菌接種試験の結果、病叢面積率の平均は遺伝子組換え体が22.0%であるのに対して、非組換え体では40.0%であり、キチナーゼ遺伝子を導入したイチゴの方がうどんこ病菌による病叢面積が有意に小さかった。これらの結果から、イネ由来キチナーゼ遺伝子を導入することにより、うどんこ病抵抗性個体を選抜できることが明らかとなった。

第3章では、イネ由来キチナーゼ遺伝子を導入してうどんこ病抵抗性を獲得した遺伝子組換えイチゴを用い、文部科学省と農林水産省の指針に従って、閉鎖系温室、非閉鎖系温室および隔離圃場で環境に対する安全性評価試験を行った。遺伝子組換えイチゴの花粉は正常でかつ風によって飛散する距離も非組換えイチゴと差異はなかった。また、遺伝子組換えイチゴの栽培土壌における微生物相(糸状菌、細菌、放線菌)は非組換えイチゴの栽培土壌と差異が無く、栽培土壌が後作(二十日大根、ホウレンソウ)の生育に対して影響を与えることもなかった。さらに、HPLC 分析とGC 分析によって、遺伝子組換えイチゴの根および茎葉から新たな分泌物や揮発性物質は検出されなかった。このように、遺伝子組換えイチゴはうどんこ病抵抗性が高まった以外に非組換えイチゴとの間に差異は認められなかったことから、遺伝子組換えイチゴの栽培が環境に与える影響は、非組換えイチゴを栽培したときの影響と同等であると結論付けた。

第3編では、総合考察を行い、本研究で用いた細胞融合技術や遺伝子組換え技術が、従来の交配育種を補完する技術として将来的に有望であることに言及

(氏名：浅尾 浩史 No. 4)

した。また、遺伝子組換え作物の作出において、導入遺伝子を効率良く発現させるシステムの整備など遺伝子組換え技術の改善すべき課題について述べた。

氏名	浅尾 浩史		
論文 題目	細胞融合および遺伝子組換え技術を用いた耐病性ナス台木とイチゴの育成		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	上 島 脩 志
	副査	教授	安 田 武 司
	副査	教授	中 村 千 春
	副査		

要 旨

わが国のナスとイチゴの生産量はそれぞれ45万トンおよび21万トンに達するが、これらは一般に病害を受けやすく、病害抵抗性品種の育成が強く望まれている。ナス栽培においては、通常耐病性台木に栽培品種を接ぎ木した苗が用いられている。しかし、土壌病害である青枯病によればしばしば大きな被害を受ける。そのため、奈良県農業技術センターは高度抵抗性台木品種「カレヘン」を育成したが、これは低温期の伸長性が悪く、胚軸が細いという欠点を持っている。一方、イチゴにおいて日本で最も栽培面積の大きい品種「とよのか」は、うどんこ病に罹病性であるため大量の農薬散布が必要であり、これは農家の負担を大きくするとともに、安全性の面からも問題になっている。そこで本研究では、まず、ナスにおけるプロトプラスト培養系を確立した後、「カレヘン」と、これとの交雑は困難であるが低温伸長性の優れた栽培品種「千両二号」との細胞融合を行い、融合細胞を青枯病萎凋誘導物質添加培地で培養することにより、青枯病に対して高度抵抗性を有しかつ低温伸長性の優れたナス台木用体細胞雑種個体の作出を試みている。次いで、イチゴの葉組織に由来するカルスから再分化個体を獲得するための培養系を確立し、植物の生体防御において重要な役割を果たしていると考えられるキチナーゼ遺伝子をアグロバクテリウム法で葉組織へ導入することにより、うどんこ病抵抗性個体が作出できるかを検討している。さらに、うどんこ病抵抗性を獲得した遺伝子組換えイチゴの環境に対する安全性評価試験を行っている。

第1編は、細胞融合技術を用いた青枯病抵抗性を持つ有用ナス台木の育成を目標にした研究の成果をまとめたものである。

第1章では、ナスのプロトプラストから植物体を再分化させるための培養系を確立するために、栽培品種の「千両二号」(*Solanum melongena* cv. Senryou II)と、台木品種の「カレヘン」(*S. sanitwongsei*)、「トルバム・ピガー」(*S. torvum*)、「ヒラナス」(*S. integrifolium*)および「耐病VF」(*S. spp* cv. Taibyou VF)を供試材料とし、プロトプラストの単離方法、コロニー形成させるためのプロトプラスト培養における培地の種類と細胞密度およびプロトプラスト由来カルスから植物体を再分化させるための培地について、それぞれの最適条件を検討した。その結果、子葉切片を低濃度のセルラーゼとマセロザイムに16時間静置処理して得たプロトプラストを $5 \times 10^4$ 個/mlの細胞密度で培養したときにコロニー形成率が高いこと、得られたコロニーをカルスグリーン化培地(C培地)に移植して小カルスを生じさせ、これをIAAとZeatinを含むMS培地(再分化培地)に移植すれば全ての供試材料で茎葉が再分化すること、青枯病菌に対して最も強い抵抗性を示す「カレヘン」は、コロニー形成率および再分化率がいずれも高いことを明らかにしている。

第2章では、ナス幼苗を萎凋させる青枯病菌培養液から抽出した青枯病萎凋誘導物質が、本病害に抵抗性を有する細胞を選抜する上で有効であるかを検討している。その結果、青枯病萎凋誘導物質は、「ヒラナス」と「千両二号」のプロトプラストの分裂とコロニー形成に対して著しい抑制作用を示すが、「カレヘン」のそれらに対してはほとんど影響を及ぼさないこと、「カレヘン」についても、プロトプラスト由来小カルスを青枯病萎凋誘導物質を添加したC培地で培養すると、その生育が抑制され褐変するが、褐変カルスを再分化培地へ移植すると半数以上のカルスは生育が回復し緑色化することを明らかにした。さらに、「カレヘン」から細胞選抜によって得た再分化個体は、「カレヘン」の実生個体よりも高度の抵抗性を示すことを認めた。これらの結果から、プロトプラ

氏名	浅尾 浩史
----	-------

ストまたはそれに由来するコロニーを青枯病萎凋誘導物質を添加した培地で培養すれば、抵抗性細胞が選抜できることを示唆している。

第3章では、「カレヘン」と「千両二号」との融合細胞を、青枯病萎凋誘導物質を添加したプロトプラスト培養培地およびC培地で培養して体細胞雑種個体を作成し、さらにこれらを青枯病汚染圃場で栽培することにより、抵抗性個体の選抜を試みた。その結果、青枯病汚染圃場で生存する個体を得ることができ、この個体は、形態的には両親の中間を示し種子稔性も良好であること、この個体およびその自殖第1代の個体の染色体数はいずれも両親の染色体をあわせ持った48本であることを明らかにしている。

第4章では、体細胞雑種の自殖第1代から第5代にわたって青枯病抵抗性の検定を行い、いずれの世代でも「カレヘン」が有する青枯病抵抗性と同等以上の抵抗性を示すことを明らかにするとともに、体細胞雑種では低温伸長性が著しく改善され胚軸も太くなっていること、これを台木としたときの穂木の収量は影響を受けないことを認め、この体細胞雑種はナスの青枯病抵抗性台木として普及が期待できることを示唆している。

第2編は、遺伝子組換え技術を用いてうどんこ病抵抗性イチゴの作出を目標として行った研究成果をまとめたものである。

第1章では、イチゴにおいて遺伝子組換え技術を用いた遺伝子導入法を開発するため、アグロバクテリウム法によりイチゴの葉組織へ遺伝子導入を行う際の諸条件と、再分化した遺伝子組換え体のランナーにおける導入遺伝子の発現について検討した。その結果、培地に50 mg/lのカナマイシンを添加して培養すると、カナマイシン抵抗性遺伝子を導入しない葉組織からはカルスが形成されないが、この遺伝子を導入した葉組織からはカルスと不定芽が形成されること、GUS遺伝子を導入した遺伝子組換え体およびこれから生じたランナーでは、葉脈、維管束および根の生長点で高いGUS活性が認められることを明らかにし、遺伝子導入によって有用個体の作出が可能であることを示唆している。

第2章では、イネ由来キチナーゼ遺伝子の導入処理を行った約8000の葉組織から123の再分化個体を獲得し、これらの個体にキチナーゼ遺伝子が導入されていることを確認した後、キチナーゼ活性は非組換え体において平均値が13.8 mU/gであるのに対し、遺伝子組換え体では平均44.0 mU/gと約3倍の値となっていることを認めた。さらに、閉鎖系温室内において行ったうどんこ病接種試験により、病徴面積率の平均は非組換え体では40.0%であるのに対し、遺伝子組換え体では22.0%と有意に小さいことを明らかにし、イネ由来キチナーゼ遺伝子を導入することにより、うどんこ病抵抗性個体が選抜できることを示唆している。

第3章では、イネ由来キチナーゼ遺伝子を導入してうどんこ病抵抗性を獲得した遺伝子組換えイチゴを用い、文部科学省と農林水産省の指針に従って、閉鎖系温室、非閉鎖系温室および隔離圃場で環境に対する安全性評価試験を行った。その結果、遺伝子組換え体の花粉は正常でかつ風によって飛散する距離も非組換え体と差異のないこと、遺伝子組換え体を栽培した土壌における微生物相(糸状菌、細菌、放線菌)は非組換え体の栽培土壌と同様であり、栽培土壌が後作作物(二十日大根、ホウレンソウ)の生育に対して影響を与えないことを認めている。さらに、HPLC分析とGC分析によって、遺伝子組換え体の根および茎葉から新たな分泌物や揮発性物質は検出されないこともみている。このように、遺伝子組換え体はうどんこ病抵抗性が高まった以外に非組換え体との間に差異が認められなかったことから、遺伝子組換え体の栽培が環境に与える影響は、非組換え体を栽培したときの影響と同等であると結論づけている。

第3編は、総合考察であり、本研究で用いた細胞融合技術や遺伝子組換え技術が、従来の交配育種を補完する技術として将来的に有望であること、また、遺伝子組換え作物の作出において、導入遺伝子を効率良く発現させるシステムの整備など遺伝子組換え技術の改善すべき課題について述べている。

以上のように、本研究は、ナスおよびイチゴにおいてプロトプラストおよび葉組織から植物体を再分化させる培養系を確立し、細胞融合法によりナスの青枯病抵抗性体細胞雑種を、また遺伝子組換え技術によりイチゴのうどんこ病抵抗性個体の作出に成功したものであり、今後の耐病性品種の育成に対して重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、学位申請者 浅尾浩史 は、博士(農学)の学位を得る資格があると認める。