

学位論文要旨

ニホンナシにおける再分化および形質転換技術に関する研究

中島育子*

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
 果樹研究所栽培・流通利用研究領域
 305-8605 茨城県つくば市

Study of Adventitious Shoot Regeneration and Genetic Transformation in Japanese Pear

Ikuko NAKAJIMA*

Plant Physiology and Fruit Chemistry Division, Institute of Fruit Tree Science,
 National Agriculture and Food Research Organization (NARO)
 Tsukuba, Ibaraki 305-8605, Japan

ニホンナシでは、病害抵抗性、果実の生育や成熟、日持ち性、果皮色、休眠などの重要形質について遺伝子解析が進められている。単離された候補遺伝子の機能解析や画期的な新品種の作出のために、効率の良い組織培養技術と形質転換技術の確立が望まれているが、これまでに形質転換の報告は無い。

そこで本研究では、ニホンナシでの形質転換技術を確立するための要素技術として、(1) ナシ子葉を用いた再分化系確立のために最適植物ホルモン組合せを検討し、(2) 多様な遺伝的背景を持つナシ品種の子葉からの再分化技術を確立し、(3) アグロバクテリウム感染時に植物側の防御に関わるカルシウムイオン抑制や超音波処理による細胞壁への物理的な傷害付与による形質転換実験を行い、(4) 異なる発育段階にある子葉を用いた形質転換の効率化に関する研究を行った。

クシマメナシ' 子葉において MS 基本培地 (3% ショ糖, 0.85% 寒天) に、5, 10, 25, 50 μM の 1-naphthaleneacetic acid (NAA) と 5, 10, 25, 50 μM の 6-benzylaminopurine (BA) を組合せて添加し、不定芽の再分化を検討した。その結果、'晩三吉' および 'ホクシマメナシ' では、5 μM NAA と 10あるいは25 μM BA を添加した培地で、不定芽の再分化効率が高かった。最適化された培地条件を用いて、近年のニホンナシ育成品種 5 品種、ニホンナシ在来品種 11 品種、マンシュウマメナシ 2 品種、チュウゴクナシ 7 品種、セイヨウナシ 8 品種の合計 33 品種について、子葉を用いて不定芽再分化を調査した。その結果、ニホンナシ在来品種の '今村秋' (68%) および '安下庄支那梨' (66%) で、不定芽再分化率が最も高かった。またチュウゴクナシ品種では再分化効率が 35% 以上と高い傾向にあった。

(1) ニホンナシおよび多様な遺伝的背景を持つナシ品種の子葉からの再分化

ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai) 品種 '晩三吉' およびマンシュウマメナシ (*P. betulaefolia* Bunge) 品種 'ホ

(2) ニホンナシ子葉を用いたアグロバクテリウム法による形質転換技術の確立

アグロバクテリウム法でニホンナシの形質転換を行う際に、防御反応を起こしている可能性や細胞壁が厚いな

* Corresponding author. E-mail: ikuko@affrc.go.jp

ど物理的に感染できない可能性を克服・検証するために、防御反応の引き金となるカルシウムイオンを共存培地から除去すること、カルシウムイオンキレート剤である ethylenedioxybis (ethylamine) -*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) の添加、超音波処理によるアグロバクテリウム感染の物理的な促進について検討した。ニホンナシ品種 '安下庄支那梨', '幸水', 'なつしずく' および '伯帝竜' の子葉を用い、オワンクラゲの緑色蛍光遺伝子 (*sgfp*) を導入したアグロバクテリウム LBA4404 を感染させた。感染から 2 週間後では、EGTA と超音波処理を組合せた '安下庄支那梨' 子葉の 85% で GFP (green fluorescent protein) 蛍光が認められた。感染から 5 ヶ月後では、EGTA と超音波併用区で 'なつしずく' 子葉の 68% で GFP 蛍光が認められた。超音波処理は、感染 2 週間後と 5 ヶ月後で GFP 蛍光割合を有意に増加させたが、EGTA 処理は両時期でポジティブな効果は得られなかった。5 ヶ月後に 14 個体の不定芽が再分化し、うち '安下庄支那梨' から得られた 1 個体で安定的な GFP 蛍光が認められた。PCR およびサザン解析によって、3 コピーの遺伝子がナシゲノム中に導入されたことが確認された。

(3) 異なる発育段階のニホンナシ子葉を用いた形質転換の効率化

異なる発育段階の子葉を用いた形質転換の効率化を検

討した。2011年 7月14日(ステージ 1)から 9月15日(ステージ 4)まで 3 週間毎に 4 ステージ (1, 2, 3, 4) で、ニホンナシ '今村秋' の子葉を採取して形質転換を行った。ブドウの着色遺伝子 *myb* を持つアグロバクテリウム EHA105 を用いた。不定芽様組織を再生した子葉割合やシュートを再生した子葉数はステージ 3 が 35.3% および 32 個、ステージ 4 で 28.2% および 26 個でステージ 1, 2 より高かった。合計で 63 の再分化個体が得られた。*myb* 遺伝子による組織の赤い着色によって形質転換のスクリーニングを行ったところ、着色した個体がステージ 4 から 2 個体、ステージ 3 から 1 個体を得られた。ステージ 4 あるいはステージ 3 の完熟あるいは完熟に近い種子由来の子葉の方が、形質転換効率が高いことが示唆された。

本研究では、合計 2,118 個の子葉を供試し、得られた形質転換体は 4 個体で、形質転換効率は 0.2% であった。近年、再分化に関わる複数の遺伝子(転写因子)がシロイヌナズナで同定され、ニホンナシにも相同性の高い遺伝子配列が存在する。今後、再分化に関わる遺伝子を利用した再分化効率や形質転換効率の向上と画期的な新品種作出での利用、それらの遺伝子発現を指標にして、再分化能力が高い品種やホルモン組成と組合せの解析への応用が期待される。