

氏 名 佐 藤 隆 徳
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2218 号
 学位授与の日付 平成 11 年 1 月 25 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
 学 位 論 文 題 目 アブラナ科野菜の小孢子培養および遺伝子組換え技術を用いた育種
 法に関する研究

(主査)
 論文調査委員 教授 矢澤 進 教授 池橋 宏 教授 泉井 桂

論 文 内 容 の 要 旨

アブラナ科野菜にはダイコン、ハクサイ、キャベツなど、わが国の主要な野菜が含まれている。今日これらの野菜はほとんどが一代雑種 (F_1) である。 F_1 品種は遺伝的に固定した両親系統を交雑することにより育成される。アブラナ科野菜では自家不和合性を利用した F_1 採種の技術体系が確立されている。本研究はアブラナ科野菜において短期間で自殖系統を作出することを目的とした小孢子培養法の確立、自家不和合性遺伝子のアブラナ科野菜への導入並びに遺伝子組換え植物体の作出について検討したものである。その主な内容は以下の通りである。

1. ハクサイ (*Brassica campestris* var. *pekinensis*) の小孢子培養を実際の育種技術として利用するためには、効率的に胚様体を形成させる必要がある。ハクサイの蒴培養において胚様体形成能力が高いことが認められた捲心群に属する南方系のハクサイを供試し、小孢子培養系を確立した。まず、33℃、24時間の高温前処理後、高濃度ショ糖 (10~13%) を含む Nitsch & Nitsch 培地で小孢子を培養すると高頻度の胚様体形成が認められた。しかし、胚様体から正常な植物体へ分化する率が低かった。そこで、生育の進んだ魚雷型胚を低ショ糖濃度の 1/2 Murashige & Skoog 培地で培養すると、効率的に植物体を分化することが認められた。さらに、小孢子培養由来の自然倍加個体を用いた、DNA 多型による純度検定により、得られた個体は遺伝的に純系であることを確認した。

2. *B. campestris* の小孢子培養系を利用してアグロバクテリウムおよびパーティクルガン法による pBI221 と pAII_{GusN} 遺伝子の導入を検討した。その結果何れの手法も非効率的であった。一方、*B. napus* では花茎、*B. oleracea* では胚軸を用いた、アグロバクテリウム法により、ハイグロマイシンおよびカナマイシン選抜でそれぞれの遺伝子の形質転換体が得られた。

3. 自家和合性の *B. napus* 'Westar' を供試し、自家不和合性の認識機構に関与する S 座に特異的な糖タンパク質 (SLSG) をコードしている 4 種類の S 座遺伝子 (SLG) の導入を行った。形質転換植物の SLSG は、SLG 遺伝子を単離した自家不和合性系統の SLSG と比較して、明らかに同じ電荷、分子量および抗原特性を示した。しかし、対照の自家不和合性植物体と比較して、形質転換体では、柱頭における SLSG の発現レベルは明らかに低下していた。SLG 遺伝子を導入した形質転換植物の 'Westar' は、自家不和合性を示さなかった。

4. アブラナ科植物にみられる自家不和合性の花粉と柱頭での相互作用は、柱頭の乳頭細胞の細胞壁に局在する SLG 遺伝子によりコードされている糖タンパク質と相関があるとされている。レポーター遺伝子である β -glucuronidase (GUS) 遺伝子を、SLG の 5' 側の上流にある発現調節領域に結合し、キメラ遺伝子を作成した。これを用いた *Brassica* 属の形質転換植物体では乳頭細胞で SLG-GUS キメラ遺伝子が高レベルで発現することが認められた。組織化学的並びに蛍光測定解析の結果から、SLG-GUS キメラ遺伝子は柱頭の乳頭細胞で発現が認められた。この結果は、さらに SLG をプローブとしてノーザン解析を行ったところ、組織特異的に SLG 遺伝子の発現が確認された。SLG のプロモーターは、胞子体である蒴組織におけるタペートの栄養細胞のみならず、半数性の小孢子においても活性化されていることが明らかになり、発生過程に

におけるSLG遺伝子の発現と小胞子の遺伝的行動の関わりが明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

わが国では現在アブラナ科野菜の品種のほとんどは一代雑種 (F_1) である。 F_1 品種育成の際には、両親系統を短期間で自殖系統を作出することおよびアブラナ科野菜では自家不和合性遺伝子の付与が問題となる。本論文はアブラナ科野菜について、育種年限の短縮のために実用レベルでの利用が可能な小胞子培養法の確立並びに自家不和合性遺伝子の植物体への導入とその発現についての研究成果をまとめたものであり、評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. ハクサイ (*Brassica campestris* var. *pekinensis*) を用いて高温前処理後、高濃度ショ糖培地で小胞子を培養すると胚様体が極めて高い率で形成した。この胚様体をショ糖濃度の低い培地で培養すると容易に植物体が分化することを明らかにした。本方法を用いることによりハクサイの小胞子培養の実用化が可能となる。この方法は現在育種の実際の場に普及しつつある。

2. 西洋ナタネ (*B.napus* var. *olerifera*) では花茎を、ブロッコリー (*B.oleracea* var. *italica*) では胚軸を用いて、アグロバクテリウム法により、pBI221あるいはpAI1GusN遺伝子の導入が比較的容易に行えることを明らかにした。

3. 自家不和合性の *B.napus* 'Westar' を供試し、花茎-アグロバクテリウム法を用いて自家不和合性の認識機構に関与する4種類のS座遺伝子 (SLG) の形質転換植物を育成した。その結果、いずれの遺伝子を導入したものも自家不和合性を発現しなかった。このことはSLG遺伝子の発現量が少なく、また薬でのこの遺伝子の発現が認められていないことが原因であると結論した。

4. つぎに、レポーター遺伝子である β -glucuronidase (GUS) 遺伝子を、SLGの5'側の側の上流にある発現調節領域に結合したSLG-GUSキメラ遺伝子を作成した。この遺伝子を導入した植物体の後代で、SLG遺伝子の主要な発現部位である柱頭の乳頭細胞においてSLG-GUS遺伝子の強い発現が認められた。このことは、さらにノーザン解析の結果からも確認された。また、SLGのプロモーターにより、薬組織におけるタペートの栄養細胞のみならず、半数性の小胞子においてもSLG-GUSキメラ遺伝子の発現が認められ、胞子体型の自家不和合性について、小胞子の発生過程における自家不和合性遺伝子の発現様相が明らかになった。

以上のように、本論文は、アブラナ科野菜の育種技術として利用可能な小胞子培養法並びに、 F_1 採種上広く利用されている自家不和合性遺伝子の植物体への導入法とその発現機構について解明したものであり、蔬菜園芸学並びに育種学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成10年12月21日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。