

氏 名	高 玫
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1170 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 農 学 専 攻
学位論文題目	TRANSFORMATION OF JAPANESE PERSIMMON (<i>Diospyros kaki</i> Thunb.) WITH THE GENES INVOLVED IN BIOSYNTHESIS OF COMPATIBLE SOLUTES (適合溶質の生合成に関与する遺伝子によるカキの形質転換)
論文調査委員	(主 査) 教 授 杉 浦 明 教 授 谷 坂 隆 俊 教 授 矢 澤 進

論 文 内 容 の 要 旨

グリシンベタインや糖アルコールなどの適合溶質が、植物の環境ストレス耐性に深く関与していることは、これまでの研究から多くの証拠が得られており、また、実際にこれら適合溶質の合成能を遺伝子組み換えにより賦与・増強することにより、環境ストレス耐性が高まることも明らかにされている。しかしながら、これらの知見の多くは草本性のモデル植物を用いた実験により得られたものであり、遺伝子組み換えによって適合溶質合成能を賦与することが、作物育種に有効であるかどうかを示した例はきわめて少ない。特に木本性作物である果樹の育種への有効性は全く知られていない。本研究は遺伝子組み換えによって、木本性作物であるカキに環境ストレス耐性を賦与することが可能かどうかを検証するために、グリシンベタインと糖アルコールであるソルビトールの合成に関与する酵素の遺伝子を導入し、得られた形質転換体におけるこれらの適合溶質の生合成を調査し、さらに塩ストレス耐性を検討したものである。論文は2章よりなっており、得られた成果の概要は以下のとおりである。

第1章では、グリシンベタインの生合成に関わる土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* 由来のコリン酸化酵素遺伝子 (*codA*) を導入したアグロバクテリウム菌を用いて、リーフディスク法によりカキの形質転換を行っている。得られた20系統の形質転換体のうち、1あるいは2コピーの T-DNA が組み込まれた8系統についてイムノブロット分析によって、コリン酸化酵素タンパク質の生合成の確認を行った。その結果、供試葉から調整した総可溶性タンパク質の0.03~0.1%がコリン酸化酵素タンパク質であることが明らかになった。また、¹H-NMR により葉中のグリシンベタイン含量を測定したところ、1g 新鮮重当たり 0.02~0.12 μ mol のグリシンベタインの生合成が確認された。これに対して、非形質転換体及びマーカー遺伝子のみが組み込まれた形質転換体では、グリシンベタインは全く検出されなかった。グリシンベタイン生成量の多い形質転換体2系統と対照の形質転換体及び非形質転換体を鉢上げし、得られた幼植物に 100mMNaCl 添加のホーグランド液を与えて、クロロフィル蛍光の変化によって光合成の光化学系 II の活性を測定することで耐塩性を調査したところ、グリシンベタインの生合成能が賦与された形質転換体において、耐塩性が高まっていることが示された。

第2章では、前章と同様にアグロバクテリウム法によって、リンゴ (*Malus domestica*) におけるソルビトール生合成の鍵酵素であるソルビトール-6-リン酸脱水素酵素 (S6PDH) の cDNA 由来の遺伝子をカキに導入し、6系統の形質転換体を得ている。これら6系統における S6PDH タンパク質の生合成はイムノブロット分析によって確認されたが、S6PDH 活性は5系統では認められたが、1系統では認められなかった。GC-MS 分析により、これら形質転換体と非形質転換体におけるソルビトール生合成を確認したところ、非形質転換体と S6PDH 活性を欠く1系統を除く全ての形質転換体でソルビトールの生合成が認められ、その葉中含量は1g 新鮮重当り 14~60 μ mol であった。この含量は、同じ遺伝子を用いて形質転換したタバコの葉中のソルビトール含量の約100倍程度もあり、また、リンゴ成葉に認められるソルビトール含量の10~30%程度にも達した。なお、同じく糖アルコールの1種であるマニトールはカキの非形質転換体にもわずかに存在するが、形質転換体ではその含量が2~3倍にも増加する傾向が認められ、その原因について炭水化物の代謝経路より考察を加えて

いる。これらソルビトール生合成能が賦与された形質転換体の耐塩性を、第1章と同様にクロロフィル蛍光の測定により調査したところ、ソルビトール生合成量の最も多かった1系統において、耐塩性の向上が認められた。なお、この系統は耐塩性の向上とともに矮化した生育特性を示したことから、将来的には耐塩性をもった矮性台木としての利用の可能性が考えられた。以上のとおり、本論文は遺伝子組み換えにより木本性植物に適合溶質合成能を賦与し、耐塩性の向上を認めた初めての論文である。

論文審査の結果の要旨

従来、果樹の育種は主として交雑により行われてきたが、交雑育種には長期間を要し、長い場合は数十年を要することもある。また、不良形質が優良形質と連鎖していることが多く、交雑育種では既存の優良品種に新たな有用形質を賦与することはきわめて困難である。近年、遺伝子組み換え技術の作物育種への応用が試みられ、多様な生物種由来の有用遺伝子を果樹に導入し、既存優良品種に有用形質を賦与することが可能になってきた。これまで、遺伝子組み換えにより、果樹類の耐病性や耐虫性を改良した報告は見られるが、環境ストレスに対する耐性を持った形質転換果樹の作出の例は全くない。本論文は、環境ストレス耐性に深く関わっているとされる適合溶質のうちグリシンベタインとソルビトールの生合成に関与する遺伝子をカキに導入し、これらの適合溶質が生体内で合成されることを確認するとともに、耐塩性向上の効果を確かめ、カキ育種を行う上での有効性を検証したものである。成果として評価される主な点は以下のとおりである。

1. グリシンベタインの生合成に関与する土壌細菌 (*Arthrobacter globiformis*) 由来のコリン酸化酵素遺伝子 (*codA*) をアグロバクテリウム法によって導入し、本来グリシンベタイン生合成能を持たないカキにグリシンベタインの生合成能を賦与することができた。
2. クロロフィル蛍光の測定によって、塩ストレス条件下でのカキ形質転換体の光合成の光化学系Ⅱの活性変化を調査し、グリシンベタイン生合成の賦与によってカキの耐塩性の増強が可能であることを示した。
3. 糖アルコールであるソルビトールの生合成に関与するリンゴ (*Malus × domestica*) 由来のソルビトール-6-リン酸脱水素酵素遺伝子をカキに組み込み、得られた形質転換体におけるソルビトールの生合成を確認した。
4. ソルビトールの生合成能が賦与されたカキの形質転換体の可溶性炭水化物の組成を測定し、これらの含量の非形質転換体との違いを明確にし、ソルビトール-6-リン酸脱水素酵素遺伝子の導入によって形質転換体の代謝系が変化することを示した。
5. ソルビトール生合成能の賦与されたカキの形質転換体においても耐塩性が高まることを示した。

以上のように、本論文は遺伝子組み換えにより、木本性植物であるカキに適合溶質の合成能を賦与し、耐塩性を増強することを示した初めての研究であり、果樹園芸学並びに育種学の発展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13年2月15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。