

BULLETIN
OF THE
HIROSHIMA PREFECTURAL
AGRICULTURE RESEARCH CENTER

MAY 2004

広島県立農業技術センター研究報告

果樹の台木育種における
形質転換法の開発と利用に関する研究

第 77 号

平成16年 5月

広島県立農業技術センター
(広島県東広島市八本松町原)

果樹の台木育種における 形質転換法の開発と利用に関する研究

キーワード：カンキツ，カラタチ，マンシュウマメナシ，台木，育種，形質転換
アグロバクテリウム，野性株，わい性，*rolC*

金 好 純 子

— 2004 年 —

目 次

序 論	1
第 1 章 カラタチ形質転換法の開発	5
第 1 節 実生の組織培養による植物体再生系の開発.....	6
第 2 節 アグロバクテリウム法による形質転換系の開発.....	13
第 3 節 要 約.....	24
第 2 章 バイナリーベクター法によるカラタチへの <i>rolC</i> 遺伝子の導入	25
第 1 節 <i>rolC</i> 遺伝子の導入と形質転換体の形態特性	26
第 2 節 形質転換体の繁殖特性.....	34
第 3 節 要 約.....	41
第 3 章 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> によるカラタチへの <i>rol</i> 遺伝子群の導入	42
第 1 節 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 野生株によるカラタチ形質転換系の開発.....	42
第 2 節 <i>rol</i> 遺伝子群を導入した形質転換体の特性	50
第 3 節 要 約.....	56
第 4 章 ナシ台木形質転換法の開発	57
第 1 節 ナシ台木の形質転換に適した国内産 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 野生株の選抜	57
第 2 節 国内産 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 野性株を用いた形質転換系の開発	63
第 3 節 要 約.....	72
総合考察	73
引用文献	79
Summary.....	92
謝 辞	94

略語集 (以下の記述に度々出てくる用語の略語をまとめた)

BA : 6-benzylaminopurine

CaMV35S : cauliflower mosaic virus 35S RNA

2, 4-D : 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid

CTAB : hexadecyltrimethylammonium bromide

DIG : digoxigenin

EDTA : ethylenediamine-N, N, N',N'-tetraacetic acid

GUS : β -glucuronidase

HEPES : N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

hpt : hygromycin phosphotransferase

IBA : indole-3-butyric acid

MS medium : Murashige and Skoog's medium

MUG : 4-Methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide

NAA : α -naphthalen acetic acid

nos : nopaline synthase

NPTII : neomycin phosphotransferase II

PCR : polymerase chain reaction

PVP : polyvinylpyrrolidone

SDS : sodium dodecyl sulfate

SSC : saline-sodium citrate

X-Gluc : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide

序 論

作物の育種は、より利用価値の高い品種を求めて脈々と行われてきた。その品種の形質を維持するために、遺伝的にヘテロな果樹では、台木に食用品種を接ぎ木して繁殖するのが一般的である。それゆえ、果樹栽培において台木は、樹勢の調節、果実品質の向上、土壌の乾湿や寒暖などの環境適応性の付与、病害虫に対する抵抗性の付与など重要な役割が求められ、食用品種の変遷や栽培法の進展に伴って、その改良が必要とされてきた。

我が国における台木研究は、海外で育成されたブドウのフィロキセラ抵抗性台木を1914年に導入し、適応性試験を行い優良台木を選抜した（神沢ら 1937）ことに始まる。その後、リンゴのわい性台木 M9, M26, 西洋なしのマルメロ台木, スモモのミロバラン29C 台木等、海外で育成された台木を導入し、我が国の果樹栽培に適合する台木を選抜が進められた。また、ナシ, カキ, モモ等では我が国の自生種, あるいは在来種の実生が古くから台木として用いられてきた。このように、我が国の果樹台木は海外からの導入品種, あるいは国内の自生種や在来種の利用が主に行われてきた。

一方、果樹台木の交雑育種は農林水産省果樹試験場（現独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所）でモモにおいて1967年から開始され、ネコブセンチュウ抵抗性の台木である筑波1～10号を育成し（吉田・清家 1981）、各地で適応性検定試験が行われてその有用性が報告された（松川ら 1985, 山西ら 1985）。また、リンゴにおいても、近年交雑育種により台木用品種が育成され（Soejima et al. 1997）、わい性でさし木繁殖性に優れた台木として注目を集めている。しかし、果樹の台木もまた栽培品種と同様、遺伝的にヘテロであるため、他の草本作物に比べて遺伝解析が遅れており、効率的な育種を進める上で大きな障害となっている。また、交雑育種では目的とする形質が近縁種に存在しない場合は、育種を行うこと自体が不可能である。目的とする形質が野生種や近縁種に見つかったとしても、交雑によって遺伝子の導入を行うと、得られた育成系統には目的外の形質も同時に導入されてしまうため、これをそのまま利用することができない場合が多い。そのため、有用形質の復元を行うには、戻し交雑を繰り返して世代を進める必要がある。しかし、果樹のように種子をまいてから結実に至る期間が長い作物では、世代を進めるには非常に長い年月が必要となり、このような育種法を採用することは困難である。そのため、我が国での交雑育種による台木品種育成の研究事例は数少ない現状にある。

このような育種の問題点を解決する方法として、近年、形質転換法が注目されている。植物の形質転換については、1983年に Herrera-Estrella et al. がタバコを用いた実験で成功して以来、多くの作物で成功例が報告されている。すでに有用遺伝子を導入し、安全性評価を終えて商品化されている形質転換体は、特定の除草剤に抵抗性のダイズ、ナタネ、トウモロコシおよびワタ、害虫に強いトウモロコシ、ワタおよびジャガイモ、果実の軟化を抑制して日持ちをよくしたトマト、花の日持ち性をよくしたカーネーション、花の色を改変したカーネーション等があり、作物育種における形質転換法の有用性が示されている。形質転換法では果樹のように遺伝解析が困難で遺伝子の単離が容易でない作物においても、目的とする遺伝子が他の生物から単

離されていれば、その遺伝子を利用して育種を行うことができる。また、形質転換法ではDNAの導入によって特定の形質のみを付与できることから、交雑育種で生じるような不要な形質が同時に導入されることがなく、戻し交雑による有用形質の復元が不要である。そのため、果樹のように世代期間が長く、育種期間の短縮が大きな課題となっている作物では、形質転換法は非常に有用な手法であると考えられる。

これまで果樹では、形質転換法に必須である培養組織からの植物体再生が困難な樹種が多かったことから、草本植物に比べ形質転換技術の開発は遅れていた。しかし、近年、培養法、形質転換法、有用遺伝子単離技術の進展により、果樹でもほとんどの樹種で形質転換の成功例が報告されている（カンキツ：Hidaka et al. 1990, Kobayashi and Uchimiya 1989, Moore et al. 1992, Vardi et al. 1990, リンゴ：James et al. 1989, Maheswaran et al. 1992, Yao et al. 1995, ブドウ：Baribault et al. 1990, Berres et al. 1992, Colby et al. 1991, Matsuta et al. 1993, Mullins et al. 1990, ナシ：Merkulov et al. 1998, Mourgues et al. 1996, Mourgues and Chevreau 1997, 松田ら 2000, モモ：Hammerschlag and Smigocki 1998, 松田ら 1999, カキ：Nakamura et al. 1998, Tao et al. 1994, Tao et al. 1997, キウイフルーツ：Janssen and Gardner 1993, Matsuta et al. 1993, Uematsu et al. 1991, Yazawa et al. 1995等）。

また、開発された形質転換法により、有用遺伝子を導入して形質転換体を作成した報告が多くなされている。これまでに果樹類に導入された有用遺伝子としては、食用品種では、ウイルス病抵抗性付与を目的としたウイルス外被タンパク質遺伝子（カンキツ：Gutierrez-E et al. 1997, 岩波ら 2000, ブドウ：Golles te al. 1997, Krastanova et al. 1995, 1998, Le Gall et al. 1994, Mauro et al. 1995, Spielmann et al. 2000, Xue et al. 1999, モモ：Korte et al. 1994, Scorza et al. 1995a, b, アンズ：Da Camara Machado et al. 1994, Laimer da Camara Machado et al. 1992, パパイヤ：Cheng et al. 1996, Fitch et al. 1992, Tennant et al. 1994), 耐虫性の付与を目的とした *Bacillus thuringiensis* のトキシシン遺伝子（リンゴ：Cheng et al. 1998, James et al. 1993, Pei et al. 1996, カキ：Tao et al. 1997), 糸状菌抵抗性付与を目的としたキチナーゼ遺伝子, グルカナーゼ遺伝子, スチルベンシンターゼ遺伝子など(リンゴ：Bolar et al. 1999, 2000, Hanke et al. 2000, Norelli et al. 2000, Ozdemir et al. 1998, ブドウ：Harst et al. 2000, Kikkert et al. 1997, Nakajima et al. 1998, Yamamoto et al. 2000, キウイフルーツ：Kobayashi et al. 2000, Nakamura et al. 1999), 細菌病抵抗性付与を目的とした抗菌性タンパク質遺伝子など(リンゴ：Aldwinckle・Brown 1996, Abdul-Kader et al. 1999, Borejsza-Wysocka et al. 1999, Hanke et al. 1999, Ko et al. 1999, Norelli et al. 1994, ナシ：Chevreau 1998, Chevreau et al. 1999, Malnoy et al. 2000, Reynoird et al. 1999a, b, c,), 植物体の発根性, 樹形の改善を目的とした *Agrobacterium rhizogenes* の *rol* 遺伝子, イネ由来のホメオボックス遺伝子など(ナシ：Bell et al. 1999, Scorza et al. 1998キウイフルーツ：Rugini et al. 1991, 1997) などがある。また、台木用品種では植物体の発根性, 樹形の改善を目的とした報告が最も多く, *A. rhizogenes* の *rol* 遺伝子, イネ由来のホメオボックス遺伝子, リンゴ由来の *gal* (GA-insensitive) 遺伝子などを導入した形質転換体が出来ており(カラタチ：草葉・Jackson 2001, リンゴ：Holefors et al. 1998, 2000, Lambert・Teofer 1992, 増田ら 1989, 山下ら 1996, カキ：Koshita et al. 2002), その他,

ウイルス病抵抗性付与を目的としたウイルス外被タンパク質遺伝子（カラタチ：岩波ら 2000），糸状菌抵抗性付与を目的としたイネ由来キチナーゼ遺伝子（マンシュウマメナシ：林ら 2000）等の導入が報告されている。

現在，果樹で実用化に最も近いのは，パパイヤにウイルスの外被タンパク質を導入した形質転換体であり，ウイルスに対する抵抗性が增強していることが確認され，農作物としての安全性評価を終えている。果樹の台木においては，実用化されている形質転換体は未だない。現在，様々な遺伝子が導入された形質転換体が作出されており，有用性が認められた形質転換体は安全性評価が行われ，実用化に向けた取り組みが行われていくと考えられるが，その実現のためには導入する有用遺伝子の単離を前提として，次の3項目の基礎となる技術開発が必要である。

1. 植物組織・器官あるいはカルスからの植物体再生系の開発
2. 遺伝子の効率的な導入技術の開発
3. 有用遺伝子を導入した形質転換体の評価

このうち本研究では，広島県の主要特産果樹を対象とし，カンキツにおいて1，2および3の技術開発，ナシにおいては1，2の技術開発を行った。

本県ではカンキツは沿岸島しょ部を中心として約4000ha栽培されており，沿岸島しょ部の産業を支える主要な特産品である。研究を開始した1992年当時，カンキツ産地では栽培品種，栽培様式の多様化に伴い，条件に応じて樹勢調節ができるように，主要台木のカラタチよりもわい性あるいは強勢の台木ニーズが高まっていた。また，他作物において *A. rhizogenes* から単離された *rolC* 等のわい化遺伝子の導入により，節間が詰まりわい化した形質転換体の作出が報告されていた（Kurioka et al. 1992, Oono et al. 1987, Schmulling et al. 1988,）ことから，わい性台木育成の手法として形質転換法に着目した。形質転換法にはアグロバクテリウム菌を用いて間接的に遺伝子を導入する方法と，パーティクルガン法，ポリエチレングリコール法およびエレクトロポレーション法など遺伝子を直接物理的に導入する方法がある。研究を開始した当時，カンキツの形質転換法は，多胚性品種の珠心組織から誘導される珠心カルスを用いたポリエチレングリコール法（Kobayashi and Uchimiya 1989, Vardi et al. 1990）とアグロバクテリウム法（Hidaka et al. 1990）が開発されていた。しかし，珠心カルスが誘導でき形質転換が可能な品種は限られていた。また，実生の茎培養系を用いたアグロバクテリウム法による形質転換系が報告され（Moore et al. 1992），珠心カルスが誘導できない品種での形質転換系開発への可能性が示された。カラタチは多胚性品種であるが珠心カルスの誘導は困難であり，形質転換法は開発されていない状況であった。そこでまず，カラタチの形質転換法の開発に着手し，実生の胚軸培養系を用いてアグロバクテリウム法による効率の良い形質転換法の開発に成功した。この技術によりカラタチに *rolC* 遺伝子，あるいは *rolC* 遺伝子を含む *rol* 遺伝子群の導入を行い，様々なわい化度のカラタチの育成に成功した。

また，果樹栽培では土壌病害の白紋羽病が産地の存亡に大きく関わり，抵抗性台木の育成が強く望まれている。中でもナシは，白紋羽病に最も感染しやすい樹種であるが，特効薬や抵抗性の育種素材が見つかっていないため，本県のナシ経営を脅かしている。一方，タバコ等では

形質転換法を用いてキチナーゼ遺伝子や β -1, 3-エンドグルカナーゼ遺伝子の導入により、病害抵抗性植物の作出が報告されていた (Broglie et al. 1991, 西澤ら 1992, Yoshikawa et al. 1993)。そこでナシ台木の改良法として、形質転換法の開発を目指した。研究を開始した1994年当時、ナシに関する形質転換系開発の事例は皆無で、果樹の中でも形質転換法の適用が困難な樹種とされていた。しかし、栽培樹では *A. tumefaciens* の感染による癌腫病が発生しており、*A. tumefaciens* の中にナシに感染しやすい系統が存在するものと考えられた。そこで、本研究ではナシ台木の形質転換に適する国産 *A. tumefaciens* 野性株の選抜から着手し、選抜した野性株を用いたバイナリーベクター法により、ナシ台木における形質転換法の開発に成功した。このように本研究においては、カラタチの胚軸培養系を用いた効率的な形質転換系を開発するとともに、*rol* 遺伝子を導入したカラタチ形質転換体の特性を明らかにした。また、*A. tumefaciens* 野性株を用いたバイナリーベクター法により、ナシ台木の形質転換法を開発した。

本報告は広島大学に提出した学位論文である。

第1章 カラタチ形質転換法の開発

カラタチは我が国のカンキツ栽培における主要台木である。その特性として、耐寒性、カンキツトリステザウイルス免疫性、高品質果実生産性などの優れた形質を有することから、我が国ではほとんどの品種でカラタチ台木が用いられてきた。一方、海外においては、すそ腐れ病に強く、収量、品質面でも優れたサワーオレンジが主に用いられていた。しかし、サワーオレンジ台木はカンキツトリステザウイルスに罹病性であったため、1930~50年代にかけて世界各地のカンキツ産地に甚大な被害をもたらした。そのため、海外ではサワーオレンジに代わる台木の育成・導入が活発に行われてきた。その結果、カンキツトリステザウイルスに抵抗性のクレオパトラマンダリン、カラタチ等を交配親に用いて育成されたシングルシトルメロ、トロイアシトレンジおよびキャリゾシトレンジ等が各地の諸条件に適した台木として導入された。また、米国では1869年に我が国からカラタチを導入以来、系統選抜によって、ルビドー系、USDA系等の台木が育成された。さらにカラタチの変異系統であるヒリュウを台木として用いるとカラタチ台木よりもわい化することが明らかにされた (Bitters et al. 1979)。我が国でもこれらの系統を導入して試験研究が行われており、ヒリュウはウンシュウミカン(小林ら 1994)等でわい化効果が確認され、カンキツ産地に導入されつつある。しかし近年、栽培品種、栽培方式の多様化に伴い、様々な条件に対応して樹勢調節ができるよう、カラタチよりもわい性あるいは強勢な台木へのニーズが高まっている。そのため、広範囲な樹勢の変異に対応できるよう多様な台木の育成が必要である。また、カラタチはカンキツタターリーフウイルス、カンキツエクソコーティスウイロイドおよびカンキツかいよう病等の病害に罹病性であり、これらの病害に対する抵抗性も要望されている。

カラタチは上記のような重要な有用形質を有することから、海外でも交配親として活発に活用されているが (Cameron et al. 1986)、一方でこれらの形質を維持しつつ、目的とする形質を付与できる育種法が望まれている。そのような台木の育種を進める上で、特定の遺伝子のみを導入できる形質転換技術は、きわめて重要な手法であると考えられる。そこで、著者はカラタチの改良に形質転換法を活用するため研究開発に着手した。

形質転換を行うためには、植物組織・器官あるいはカルスからの効率の良い植物体再生系が必要である。植物の組織培養において、再分化は若い器官ほど容易であり、果樹においても実生組織は再分化能が高いことが知られている (Burger 1981, Moore 1986, 山田ら 1987)。しかし、果樹はヘテロであるため実生は遺伝的に親植物とは異なる形質を持ち、既存品種の改良に実生組織を用いることはできず、果樹の培養系開発の大きな障害となっている。一方、カンキツでは多胚性という現象が認められ、一種子中に雑種胚と体細胞組織である珠心組織から無性的に発生する多数の珠心胚が混在する (Frost 1926)。この珠心胚は雑種胚よりも旺盛に生育し、種子を播くと珠心胚由来の実生が発芽する頻度が高い。したがって、カンキツ類の多胚性品種の珠心胚実生は種子親と同じ遺伝的形質を持つクローンである。我が国の主要台木であるカラタチは多胚性であり、その珠心胚実生の組織は親と同じ遺伝的形質を持ち、しかも成木組織より再分化能が高いことが想定でき、形質転換の材料には非常に適していると考えられる。さら

に、カラタチ台木の繁殖は一般に種子で行われているが、有用な形質転換体が得られた場合、種子繁殖にもかかわらず珠心胚実生により、有用遺伝子を導入した形質転換体当代そのままの形質での繁殖が可能である。

このような利点を考え合わせて、カラタチ実生組織を用いた形質転換系の開発を試みた。形質転換技術では目的の遺伝子のみを植物に導入できるが、個体により導入遺伝子の発現量が異なるので、目的の個体を得るには多くの形質転換体を作り、その中から選抜を行うことが必要である。そのため、実際の育種に形質転換技術を活用するには、形質転換効率の高いことがきわめて重要である。本章では、再分化能の高いカラタチの実生培養系を確立し、その培養系を用いてアグロバクテリウム法による効率的な形質転換技術を開発した。

第1節 実生の組織培養による植物体再生系の開発

試験方法

1. 植物材料

10月上旬に収穫したカラタチ (*Poncirus trifoliata* Raf.) の果実から採取した種子は洗浄後、1% 8-ヒドロキシキノリン硫酸塩溶液で20分間表面殺菌し4℃に保存した。試験に供試する際に種子は外皮と内皮を剥皮後、70%エタノールに数秒、次に1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分間浸漬して滅菌し、最後に滅菌水で3回洗浄した。その後、種子は3%ショ糖および0.8%寒天を添加し、pH5.8に調製した植物生長調節物質無添加の Murashige and Skoog (1962) の培地 (以後 MS 培地とする) に播種した。これを28℃、暗所で2週間育成し、約40mmに生育した実生を供試した。実生は芽を切除し、約10mmの長さに調製した胚軸および根を外植片とした。

2. 実生組織から植物体を再生する植物生長調節物質濃度の検討

実生組織から植物体の再生に適した植物生長調節物質の濃度および組成を明らかにするため、MS培地に、0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0mg/lのベンジルアデニン (6-benzylaminopurine, 以後 BA とする) の添加区と、0, 0.1, 1.0, 10.0mg/lのナフタレン酢酸 (α -naphthalen acetic acid, 以後 NAA とする) の添加区を相互に組み合わせた24種類を設定した。外植片は胚軸と根に分けて培養を行い、培養条件は気温28℃、日長12時間、照度3000lux とし、置床34日後に不定芽、不定根およびカルスの形成を調査した。

3. 実生組織各部位の植物体再生能調査

実生組織のどの部位が植物体再生能に優れているかを明らかにするため、2の試験で不定芽形成が比較的旺盛であった1.0, 5.0, 10.0mg/l BA および0, 0.1, 1.0mg/l NAA を組み合わせて添加した9種類の MS 培地を用いて、実生の胚軸と根を部位別に培養した。培養条件は2の試験と同様とし、置床34日後に不定芽形成を調査した。また、カラタチの種子培養では、

不定芽と不定胚形成が報告されているので (Matsumoto and Yamaguchi 1983), 再生組織を同定するため, 再分化が認められた胚軸および根のパラフィン切片を作成し組織学的調査を行った。外植片は10%ホルマリン溶液で固定し, エタノールとブタノールで脱水・透徹を行った後, パラフィン包埋を行いマイクロトームにより切片を作成し, サフラニンとファーストグリーンで染色して顕微鏡下で観察した。

4. 形質転換体選抜のための抗生物質濃度の検討

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濃度について検討した。カナマイシンは0, 25, 50, 100, 200, 400mg/lになるように5 mg/l BA+0.1mg/l NAAのMS培地に添加した。10mmに調製した胚軸の切片を培養し, 不定芽形成に及ぼすカナマイシン濃度の影響を調査した。また, アグロバクテリウムの除菌のために必要な抗生物質であるクラフォランを0, 500mg/lになるように同組成の培地に添加し, 不定芽形成に対する影響を調査した。

結 果

1. 実生組織から植物体を再生する植物生長調節物質濃度の検討

植物体を再生する植物生長調節物質の最適濃度を明らかにするため, 実生の胚軸および根の組織を外植片として, 各種濃度のBAおよびNAAを組み合わせた培地で培養を行った。

その結果, カルス形成と発根は胚軸と根で同様な傾向を示した。すなわち, カルス形成は0.5 mg/l BA+10.0mg/l NAA, 不定根形成は10.0mg/l NAAでそれぞれ最も旺盛であった(表1, 表2)。一方, 不定芽形成は両者では分化部位, 発達状態の点で差異があった。胚軸では0.5 mg/l BA+0~0.1mg/l NAAを含む培地において, 切断面から1~4の不定芽が分化し, シュートへと生育した(図1A)。しかし, 根では同様なホルモン濃度でも不定芽を分化するのみで, シュートへと生育する事例は見られなかった(図1B)。また, 5~10mg/l BA+0~1 mg/l NAAを含む培地において, 胚軸では切断面から多数の不定芽が分化した(図2A)。このうち, 不定芽形成が最も旺盛な区は5 mg/l BA+0.1mg/l NAAの添加区であった(表1)。また, 胚軸においては側面からの分化はきわめて少なかった。これに対し, 根では5~10mg/l BA+0.1~1 mg/l NAAを含む培地において, 切断面に加え側面から不定芽が多数分化した(図2B)。しかし, 不定芽を多数形成した切片は, 同一培地上で培養を継続した場合, 不定芽の分化は進むが伸長は認められなかった。そこで不定芽を分化した外植片を0.5mg/l BAを含む培地に移植したところシュートへと生育した(図2C)。次いでシュートを基部で切断し, 0.5 mg/l NAAを含む培地で培養したところ, 容易に発根し完全な植物体へ生育した。以上より胚軸と根のどちらでも再分化は可能であったが, 不定芽形成度は胚軸が高い傾向にあった。

表1 カラタチの胚軸培養におけるBAおよびNAAの影響

NAA (mg/l)	BA	不定芽形成度 ²		カルス ² 形成度	不定根 ² 形成度
		切り口	側面		
0	0	12	0	0	0
0	0.1	12	0	0	0
0	0.5	5	20	0	0
0	1.0	84	0	0	0
0	5.0	56	0	36	0
0	10.0	28	24	28	0

0.1	0	8	0	0	0
0.1	0.1	12	0	4	0
0.1	0.5	60	0	0	0
0.1	1.0	44	0	8	0
0.1	5.0	92	0	16	0
0.1	10.0	64	24	44	0

1.0	0	0	0	4	0
1.0	0.1	4	0	0	0
1.0	0.5	8	20	8	0
1.0	1.0	44	0	0	0
1.0	5.0	48	24	36	0
1.0	10.0	24	16	28	0

10.0	0	0	0	4	48
10.0	0.1	0	0	4	20
10.0	0.5	0	0	52	8
10.0	1.0	4	0	16	8
10.0	5.0	4	24	4	0
10.0	10.0	40	0	16	0

² 形成度 = [(+ × 1) + (++ × 3) + (+++ × 5)] / (供試切片数 × 5) × 100

+ : わずかに認められる, ++ : 認められる, +++ : 旺盛に認められるの三段階で評価

表2 カラタチの根の培養におけるBAおよびNAAの影響

NAA (mg/l)	BA	不定芽形成度 ²		カルス ² 形成度	不定根 ² 形成度
		切り口	側面		
0	0	0	0	0	0
0	0.1	0	0	0	0
0	0.5	0	0	0	0
0	1.0	0	0	0	0
0	5.0	20	20	4	0
0	10.0	0	20	4	0

0.1	0	0	0	0	0
0.1	0.1	0	0	0	0
0.1	0.5	24	0	0	0
0.1	1.0	0	12	4	0
0.1	5.0	40	32	4	0
0.1	10.0	24	32	24	0

1.0	0	0	0	4	0
1.0	0.1	0	0	0	0
1.0	0.5	0	0	0	0
1.0	1.0	40	24	8	0
1.0	5.0	60	52	20	0
1.0	10.0	60	50	28	0

10.0	0	0	0	0	20
10.0	0.1	0	0	0	0
10.0	0.5	0	0	32	0
10.0	1.0	0	0	12	0
10.0	5.0	20	20	20	0
10.0	10.0	4	0	4	0

² 形成度 = [(+ × 1) + (++ × 3) + (+++ × 5)] / (供試切片数 × 5) × 100

+ : わずかに認められる, ++ : 認められる, +++ : 旺盛に認められるの三段階で評価

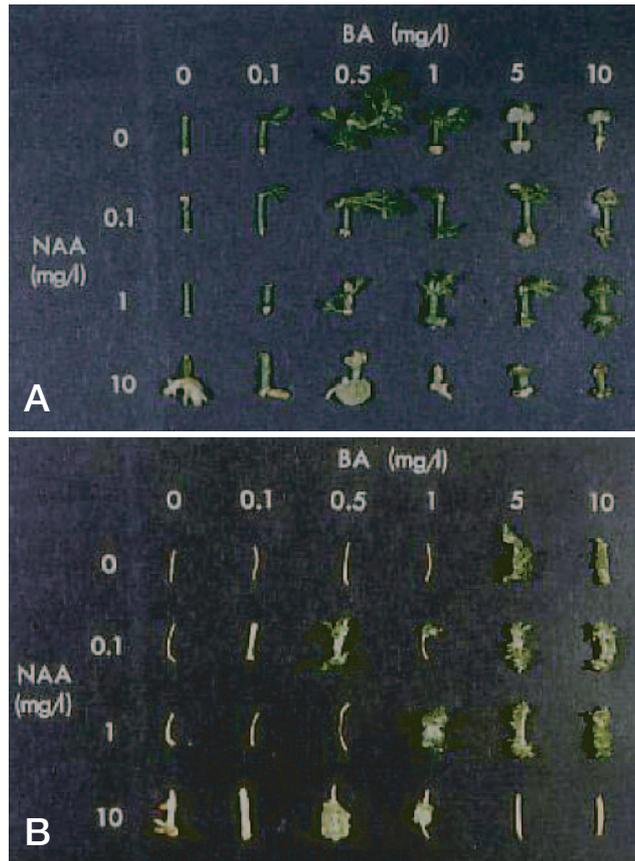


図1 実生組織の培養における BA および NAA の影響
A：胚軸切片，B：根切片

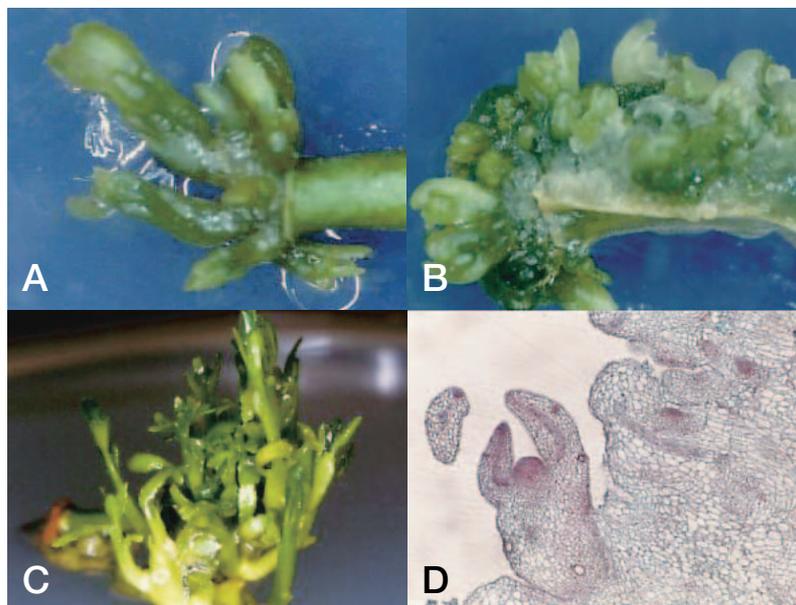


図2 実生組織からの再分化

- A：胚軸切片切り口からの不定芽形成
- B：根切片切り口および側面からの不定芽形成
- C：不定芽からのシュート伸長
- D：茎頂分裂組織が認められる不定芽の垂直切片

2. 実生組織各部位の植物体再生能調査

実生組織の部位別に不定芽形成能を調査したところ、胚軸では不定芽形成は胚軸頂に近い部位から子葉に近い部位（外植片1～6）のどこでも認められ、特に子葉に最も近い部位（外植片6）は顕著に形成度が高かった（図3）。根においても子葉に最も近い部位（外植片7）が不定芽形成度は最も高かったが、他の部位（外植片8～12）ではほとんど不定芽形成は認められず、胚軸と著しく相異していた。以上より、カラタチの実生組織においては、根よりも胚軸が不定芽誘導に適していた。

胚軸および根の切片からの再分化における組織学的調査では、外植片の垂直切片において多数の茎頂分裂組織が認められた（図2D）。しかし茎頂分裂組織と根端分裂組織の2極を備えた不定胚様組織は認められなかった。このことから本試験で認められた胚軸および根の切片からの再分化組織は不定芽であることを確認した。

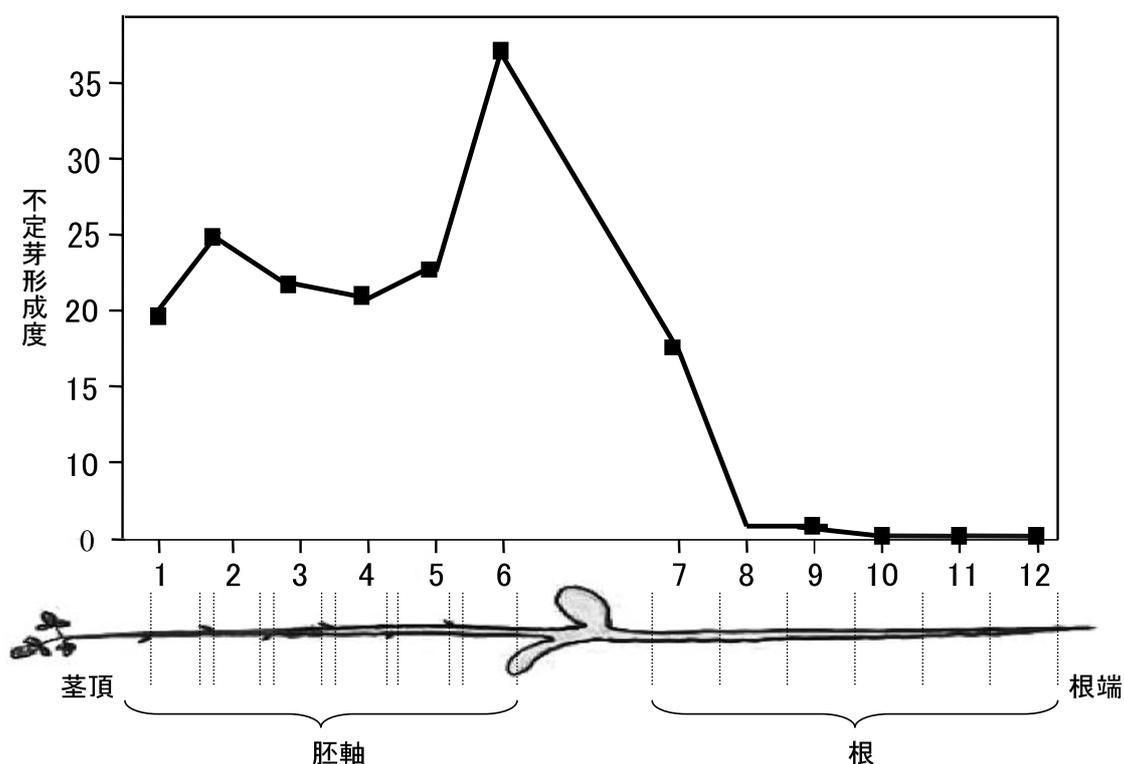


図3 実生組織各部位の不定芽形成能

注) 不定芽形成度 = $\frac{(+ \times 1) + (++ \times 3) + (+++ \times 5)}{\text{供試切片数} \times 5} \times 100$

不定芽形成は+：わずかに認められる, ++：認められる, +++：旺盛に認められるの三段階で評価
 ・1, 5, 10mg/l BAと0, 0.1, 1mg/l NAAを組み合わせ添加工した9種類の培地で培養した平均値

3. 形質転換体選抜のための抗生物質濃度の検討

胚軸切片を0, 25, 50, 100, 200, 400mg/1のカナマイシンを添加した培地で培養したところ50mg/1で完全に不定芽形成を阻害した(表3, 図4)。また, 500mg/1クラフォラン添加培地では, 不定芽形成がやや劣ったが大きな影響はなかった。以上から, 形質転換体の選抜, 除菌には50mg/1以上のカナマイシン, 500mg/1のクラフォランを添加した培地が適していることが明らかとなった。

表3 不定芽形成に及ぼす抗生物質の影響

抗生物質濃度 (mg/1)		供試 切片数	不定芽形成 切片数	平均 不定芽数
カナマイシン	クラフォラン			
0	0	10	10	6.7
0	500	10	9	5.0
25	500	10	6	2.7
50	500	10	0	0
100	500	10	0	0
200	500	10	0	0
400	500	10	0	0

注) 5 mg/1 BA と 0.1mg/1 NAA を含む MS 培地で培養を行い置床30日後に調査

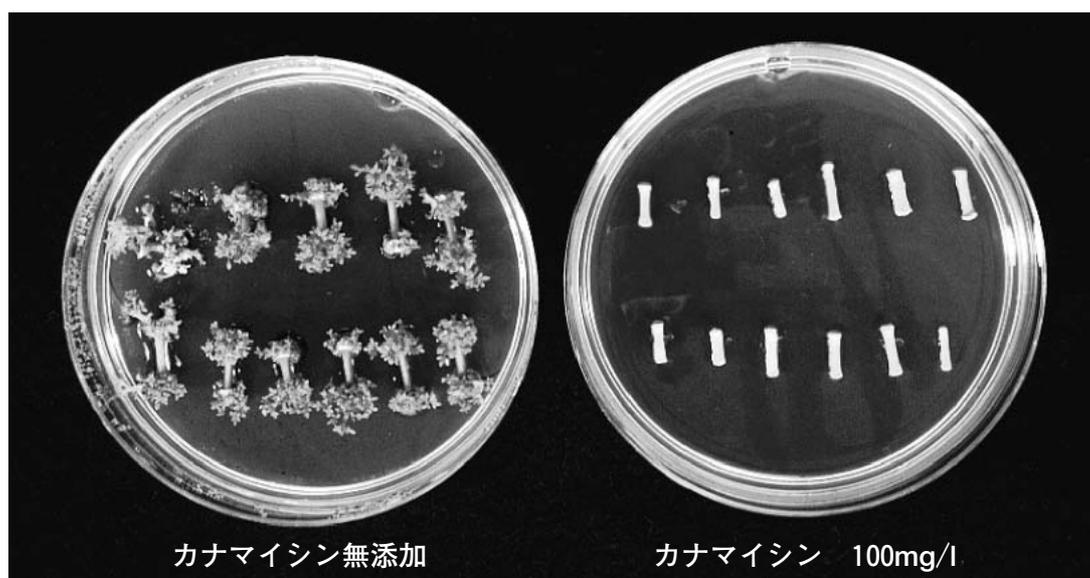


図4 胚軸切片からの不定芽形成に及ぼすカナマイシンの影響

注) 5 mg/1 BA, 0.1mg/1 NAA を含む MS 培地で培養30日後の状況

考 察

遺伝子導入を行う材料は周年得られることが望ましく、カラタチの種子は採取後滅菌して冷蔵保存すれば約1年間利用できる利点がある。また、無菌播種後の実生組織を外植片とすることから、雑菌汚染の可能性が低い利点もあり、効率的に形質転換の試験を進めることができる材料である。また、カンキツの実生組織は高い再分化能を持つことが報告されている。Burger (1981) はバレンシアオレンジにおいて、播種17日後の実生を BA と NAA を組み合わせて培養し、不定芽形成は上胚軸が最も優れ、至適濃度が1.0mg/l BA+0.01mg/l NAA であると報告している。また、Moore (1986) はサワーオレンジ、カジノシトレンジおよびクレオパトラにおいて、播種8週間後の実生の茎を培養し、いずれの品種においても不定芽形成が認められ、至適濃度は5.0mg/l BA+1.0mg/l NAA であるとしている。カラタチにおける再分化系については、発芽し始めた種子の子葉近傍から不定芽および不定胚を形成し、カラタチの幼苗における再分化能が高いという報告がある (Matsumoto and Yamaguchi 1983)。その際の至適濃度は5 mg/l BA+1.0mg/l NAA, または10.0mg/l BA+2.0mg/l NAA であった。しかしながら実生の他の部位の再分化能は解明されていなかった。そこで著者は、カラタチの播種2週間後の幼苗を用い、胚軸および根切片の培養における BA および NAA の影響について検討した。その結果、不定芽形成は根よりも胚軸で旺盛であり、胚軸切片切り口からの不定芽形成には5 mg/l BA+0.1mg/l NAA が最適であり、この条件において胚軸の切り口からカルス形成も観察された。このことから、この系は切片切り口からの不定芽形成率が高く、形質転換体の作出に適した再分化系であると考えられる。

Burger (1981) はバレンシアオレンジ実生組織の胚軸培養において、子葉に最も近い部位の不定芽形成率が高いことを報告している。この現象はカラタチ実生の胚軸および根でも同様に観察された。一般に形質転換には子葉に最も近い胚軸切片のような再分化能の高い植物組織が適しているが、1つの実生から利用しうる外植片はきわめて少ない。そこで、胚軸ではどの部位でも再分化能は安定して高いことから、えき芽を除去した胚軸すべてを形質転換処理を行う外植片として用いることにした。

本試験では形質転換体選抜のための遺伝子として、最も一般的に多くの作物で活用され、遺伝子組換え体の安全性評価の事例が多いカナマイシン抵抗性遺伝子を用いて検討した。Moore (1992) はカジノシトレンジ等の茎切片を用い、100mg/l カナマイシンを添加した培地で選抜し形質転換体を得ている。本報告ではカラタチの胚軸切片は50mg/l で完全に不定芽形成が阻害されたことから、カラタチにおいてもカナマイシンでの選抜が可能と考えられた。そこで形質転換体の選抜に当たっては、選抜培地で生存しうる非形質転換体 (エスケープ) の出現率を低下させるため、カナマイシン濃度は100あるいは200mg/l で選抜を試みることにした。また、アグロバクテリウム法による形質転換において、用いたアグロバクテリウムが形質転換体の組織に残存しないよう除菌を行う必要がある。このためクラフォラン、カルベニシリン等の抗生物質が用いられているが、本試験では植物組織への影響が少ないとされている500mg/l クラフォランが、不定芽形成への影響が認められなかったことから、アグロバクテリウムの除菌に適して

いると判断した。

以上から、本節では形質転換に用いる植物材料の部位として胚軸、再分化に適する植物生長調節物質の濃度として5 mg/l BA+0.1mg/l NAA, 形質転換体の選抜・除菌に用いる抗生物質の濃度として50mg/l以上のカナマイシン, 500mg/lクラフォランを明らかにすることができ、形質転換体を作成する上での基本条件を決定した。

第2節 アグロバクテリウム法による形質転換系の開発

試験方法

1. 植物材料

種子は第1節と同様な方法で採種して滅菌し、保存したものを用いた。種子は外皮と内皮を剥皮後、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に20分浸漬して滅菌した。その後滅菌水で3回洗浄し、3%ショ糖と0.8%寒天を添加し、pH5.7に調製した植物生長調節物質無添加のMS培地に播種した。これを27℃、暗所で2~3週間育成し、約40~60mmに生育した実生を材料とした。実生は芽を切り除き、約10mmの長さに調製した胚軸を外植片とした。

2. アグロバクテリウムの系統とベクター

形質転換にはバイナリーベクター pBI121 (Jefferson et al. 1987) または pBI101-012-pl (Sugaya et al. 1989) を有する *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema et al. 1983) を用いた。A. *tumefaciens* LBA4404 はストレプトマイシンおよびリファンピシンに耐性である。この2つのプラスミドベクターのT-DNA領域の概略図を図5に示した。pBI121はcauliflower mosaic virus 35S (CaMV 35S) プロモーター、pBI101-012-plは*rolC* 遺伝子のプロモーター下流にそれぞれ連結したβ-glucuronidase (GUS) 遺伝子を持つプラスミドである。pBI101-012-plを用いたのは、後にわい化遺伝子として他作物で活用されている*rolC* 遺伝子をカラタチに導入することを計画しており、*rolC* 遺伝子のプロモーターの発現様式を明らかにする必要があったためである。また、pBI121, pBI101-012-plは共にnopaline synthase (nos) プロモーター下流に連結したneomycin phosphotransferase II (NPTII) 遺伝子を持つ。そのため、どちらのプラスミドもカナマイシンによる形質転換体の選抜が可能である。

なお、pBI101-012-plは東京大学の内宮博文博士より分譲を受けた。

3. アグロバクテリウムの調製と胚軸外植片への接種

A. *tumefaciens* LBA4404/pBI121 および A. *tumefaciens* LBA4404/pBI101-012-pl は、50mg/l カナマイシン, 300mg/l ストレプトマイシン, 100mg/l リファンピシンを含むLB培地 (Sambrook et al. 1989) で、各々28℃で一昼夜振とう培養して増殖させた。これらの細菌培養液を3500rpmで5分間遠心分離して集菌し、植物生長調節物質無添加のMS培地に懸濁した。再度、3500

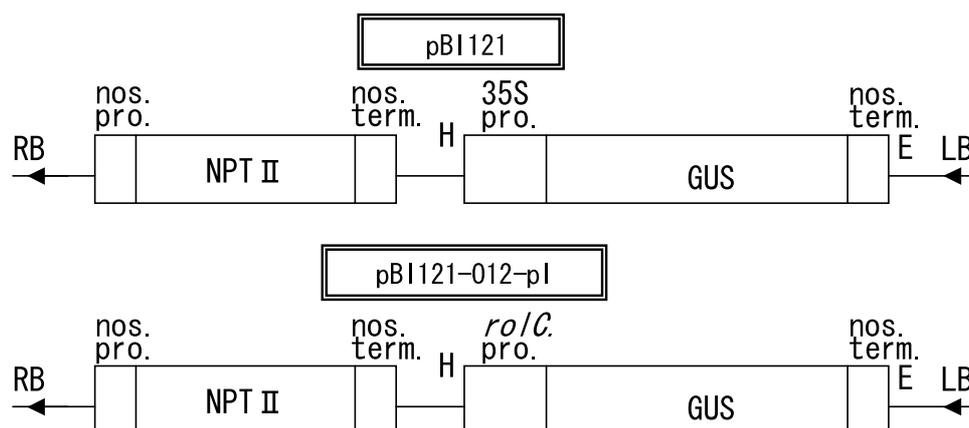


図5 形質転換に用いたプラスミド (pBI121, pBI101-012-pI)

RB: right border, LB: left border, 35S pro.: CaMV 35S promoter,
rolC.pro.: *rolC* promoter, nos. pro.: nopaline synthase gene promoter,
 nos.term.: nopaline synthase gene terminator, NPTII: neomycin
 phosphotransferaseII gene, GUS: β -glucuronidase gene,
 H: *Hind*III, E: *Eco*RI

rpm で5分間、遠心分離して集菌し、 $100\mu\text{M}$ のアセトシリンゴンを含むMS培地に懸濁して、 $5\times 10^8\text{cfu/ml}$ となるように同培地で希釈調製し接種に用いた。外植片への接種は、調製したアグロバクテリウム溶液に胚軸外植片を15分間浸漬することによって行った。接種後、滅菌した濾紙上で余分な菌液を除去した。共存培養には $100\mu\text{M}$ アセトシリンゴンを含む植物生長調節物質無添加のMS培地を用い、 28°C 、暗黒条件で3日間培養して外植片へのアグロバクテリウムの感染を促した。

4. 形質転換体の選抜と植物体再生

共存培養3日後、 5mg/l BA, 0.1mg/l NAA, 100 あるいは 200mg/l カナマイシン, および 500mg/l クラフォランを含むMS培地に外植片を移植し、形質転換体の選抜とアグロバクテリウムの除菌を行った。3~4週間後、不定芽を形成した外植片は、 0.5mg/l BAとカナマイシン 200mg/l および 500mg/l クラフォランを添加したMS培地に移植して培養を続けた。2~3週間ごとに継代し、約 10mm 以上伸びたシュートについて、基部から切り取り 0.5mg/l NAAを添加したMS培地に置床して発根させた。すべての行程においてMS培地のシヨ糖濃度は5%, 寒天濃度は0.8%, pH5.7とし、培養条件は 26°C 、日長16時間とした。

再生した植物体内にアグロバクテリウムが残存しているか否かを予備的に調べるため、植物体の一部を採取し、滅菌蒸留水を加えて磨碎し、YEB培地 (Vervliet et al. 1975) に塗布し、 28°C 、暗黒条件下で3日間培養した。アグロバクテリウムの残存は、アグロバクテリウムが増殖するか否かによって判断した。

5. 組織化学的 GUS 染色による導入遺伝子の確認

導入遺伝子の予備的な確認を行うため、アグロバクテリウムが残存していないことを確認した再生植物体から茎を採取し、メスで薄く切り組織切片を作成し、Jefferson et al. (1987)の方法

に従い、組織化学的 GUS 染色を行った。組織切片は約 $100\mu\text{l}$ の 50mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) 溶液に浸漬し、 37°C で2時間インキュベートした。染色後、組織が青色に染色されているか否かを肉眼あるいは実体顕微鏡下で観察した。

6. PCR 分析による導入遺伝子の確認

得られた再生植物の葉 0.5g から SDS 法 (Honda and Hirai 1990) により DNA を抽出した。GUS 遺伝子を検出するためのプライマーとしては、同遺伝子の 1.1kbp の断片を増幅するように設計したプライマー (5'-AACTGGACAAGGCACTAGCGG-3', 5'-AAGTTCATGCCAG TCCAGCGT-3') (Jeferson et al. 1986) を用いた。反応液は、 10mM Tris-HCl (pH8.8), 50mM KCl, 1.5mM MgCl_2 を組成とする緩衝液を用い、 10ng 鋳型 DNA, $1\mu\text{M}$ プライマー, $200\mu\text{M}$ dNTPs, 0.5units Taq DNA ポリメラーゼ (Wako, Osaka, Japan) を混合し、全量 $20\mu\text{l}$ で反応を行った。PCR 反応はアステック社製 PC-700型機を用いて行い、 94°C で5分間熱変性を行った後、 94°C 1分間、 63°C 2分間、 72°C 3分間を45回繰り返した後、 72°C 15分間行った。NPTII 遺伝子を検出するためには、NPTII 遺伝子と nos ターミネーター間の 1.4kbp 断片を増幅するように設計したプライマー (5'-ATGATTGAACAAGATGGATTG-3', 5'-GTATAATTGCGGGACTCTAAT-3') を用いた。PCR は GUS 遺伝子検出の場合と同様に行った。得られた PCR 産物はいずれも、TAE バッファー (40mM Tris, 5mM 酢酸ナトリウム, 1mM EDTA (pH8.0)) 中の 2.0% アガロースゲルで 100V , 30分間 電気泳動した後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、UV 下で観察した。

7. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

得られた再生植物体の葉を液体窒素中で粉碎し、CTAB 法 (Rogers and Bendich 1985) を用いて全 DNA を抽出した。 1 個体当たり $5\mu\text{g}$ の DNA を制限酵素 *Hind*III と *Eco*RI で二重切断した。制限酵素処理は $5\mu\text{g}$ の DNA に対し $200\mu\text{l}$ の溶液中で、 20unit の制限酵素を加え、 8 時間、 37°C でインキュベートして行った。消化した DNA をエタノール沈殿法によって回収し、 $20\mu\text{l}$ の TE バッファー (10mM Tris, 1mM EDTA (pH8.0)) に溶解した。この DNA を TAE バッファー中の 1% アガロースゲルで 18V , 16 時間電気泳動して分画した後、 0.5M 水酸化ナトリウムでアルカリ変性し、キャピラリートランスファーによってナイロンメンブラン (Tropix 社, トロピロンプラスチックメンブラン) に転写し、UV クロスリンカーを用いてメンブランに固定した。プローブには、pBI121の 3kbp の *Eco*RI-*Hind*III フラグメント (GUS 遺伝子) を、DIG ラベリングキット (ベーリンガー・マンハイム社, ドイツ) を用いてジゴキシゲニン (DIG) ラベルしたものをを用いた。ハイブリダイゼーションは $5\times\text{SSC}$ (saline-sodium citrate), 0.5% ブロッキング・リジェント (ベーリンガー・マンハイム社), 0.1% N-ラウロイルサルコシン・ナトリウム塩, 0.02% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で 68°C , 16 時間行った。メンブランは $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS, 室温, 5 分間の条件で2回洗浄した後、 $0.1\times\text{SSC}$, 0.1% SDS, 65°C , 15 分間2回洗浄した。プローブ・ターゲット DNA の検出はベーリンガー・マンハイム社のプロトコル (the chemiluminescent detection of DIG labeled nucleic acids) に従って行った。

8. プロモーターの違いによる GUS 遺伝子の発現様式

プロモーターの違いによるGUS遺伝子の発現組織の差異を, *A. tumefaciens* LBA4404/pBI121あるいは*A. tumefaciens* LBA4404/pBI101-012-plの2種を用いて得られた形質転換体を供試して比較調査した。それぞれの形質転換体から葉, 茎および根を採取し, マイクロスライサー(DTK-2000, 堂阪イーエム(株))を用いて切片を作成し, 前述の方法でGUS染色を行った。また, 葉は組織切片とせず, そのままの形状で同様の染色を行い, 染色時間は一晩とした。染色後, 組織が青色に染色されている組織を, 肉眼または実体顕微鏡下で調査した。

また, プロモーターの違いによるGUS遺伝子の発現量の差異を, 2種のバイナリーベクターを用いて得られた形質転換体を用いて比較調査した。GUS遺伝子の発現量の調査はJefferson et al. (1987)の方法に従った。すなわち, 葉10mgを採取し250 μ lのlysis bufferで磨砕した。その後12,000rpmで5分間遠心し, 上澄み200 μ lに4-Methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) 1mM溶液200 μ lを加え, 37 $^{\circ}$ Cで反応させた。20, 40, および60分後に, 反応液100mlと0.2M Na₂CO₃900 μ lを混合して反応を停止させ, 蛍光分光光度計(HITACHI 650-10S)で蛍光強度を測定した。

結 果

1. 組織化学的 GUS 染色による導入遺伝子の確認

アグロバクテリウムを接種した外植片を選抜培地上で培養した。約3~4週間後に, 外植片は白く変色したが, 切断面からは緑色の不定芽が形成された(図6A)。接種を行っていない外植片からは不定芽は形成されなかった。不定芽形成の頻度はLBA4404/pBI121を接種した場合, 100mg/lカナマイシンの選抜培地では35.6%, 200mg/lの選抜培地では21.7%であった(表4)。LBA4404/pBI101-012-plを接種した場合100mg/lの選抜培地では44.6%, 200mg/lの選抜培地では29.2%であった。不定芽を形成した外植片は0.5mg/l BA, 200mg/lカナマイシンを添加したMS培地に移植してシュート伸長を促しながら形質転換体の選抜を行った。

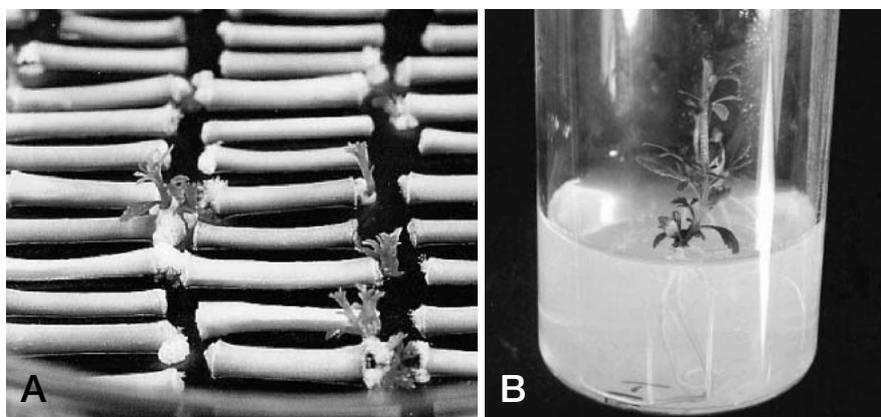


図6 選抜培地での不定芽形成と再生植物体

- A: カナマイシン添加選抜培地での不定芽形成
B: カラタチ形質転換体

表4 形質転換効率に及ぼすベクターおよび抗生物質濃度の影響

ベクター	カナマイシン 濃度 (mg/l)	供試	シュート形成	再生シュート	GUS+シュート ^a	GUS+シュート ^a が
		切片数 A	切片数 (%) B (B/A%)	総数 C	総数 D (D/C%)	再生した切片数 E (E/A%)
pBI121	100	149	53 (35.6)	148	82 (55.4)	38 (25.5)
	200	60	13 (21.7)	22	14 (63.6)	8 (13.3)
pBI101-012-pl	100	65	29 (44.6)	65	57 (87.7)	28 (43.1)
	200	65	19 (29.2)	48	40 (83.3)	19 (29.2)

^a: PCR 分析により GUS 遺伝子が検出されたシュート

伸長したシュートにおいて、植物内にアグロバクテリウムが残存していないことを予備的に調査するため、植物体の一部を採取し、滅菌蒸留水を加えて磨砕したものを、YEB 培地に塗布して培養した。3～4日後、YEB 培地上でバクテリアの増殖は確認されず、アグロバクテリウムの残存は無いものと考えられた。

アグロバクテリウムの残存が無いことを確認したシュートは、茎を採取して組織化学的 GUS 染色を行った。青色に染色され GUS 遺伝子の発現が認められたシュート (以下 GUS(+)) とする) が得られた外植片は、LBA4404/pBI121 を接種した場合、100mg/l カナマイシンの選抜培地では25.5%、200mg/l の選抜培地では13.3%であった (表4)。一方、LBA4404//pBI101-012-pl を接種した場合100mg/l の選抜培地では43.1%、200mg/l の選抜培地では29.2%であった。また、非形質転換植物のシュートは全く染色されなかった。GUS(+)) のシュートは基部から切り取り、0.5mg/l NAA を添加した MS 培地に移植したところ、81.1%が発根して完全な植物体に生育した (図6B)。

2. PCR 分析による導入遺伝子の確認

GUS 遺伝子および NPTII 遺伝子の導入を判定する目的で、LBA4404/pBI121あるいは LBA4404/pBI101-012-pl の接種によって得られ、GUS 活性の認められた再分化シュートそれぞれ7本について PCR 分析を行った。その結果、14本のすべてのシュートにおいて、1.1kbp の GUS 遺伝子に相当する DNA 断片 (図7A lanes 1-14) と、1.4kbp の NPTII 遺伝子に相当する DNA 断片が増幅され (図7B lanes 1-14)、GUS 染色の結果と一致した。非形質転換体のシュートからはどちらのバンドも検出されなかった (図7 lane 15)。

3. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

導入遺伝子が植物ゲノムに組み込まれていることを確認するために、7個体の GUS(+)) シュートについて、サザンブロット分析を行った。順化後の植物体の葉から抽出した DNA を *Hind*III と *Eco*RI で二重消化した時、全ての GUS(+)) シュートで、CaMV35S プロモーター、GUS 遺伝子および nos ターミネーターに相当する3.0kbp のバンドが検出された (図8 lanes 2-8)。しかし、非形質転換体ではこのバンドは検出されなかった (図8 lane 1)。1つの GUS(+)) シュ

ート (図 8 lane 7) では, 3.0kbp のバンド以外にも, 非形質転換体では検出されない強くハイブリダイズするバンドが 2 本検出された。これらのバンドは, 形質転換の過程で T-DNA が再編成されて植物ゲノムに組み込まれたことを示すものと考えられた。

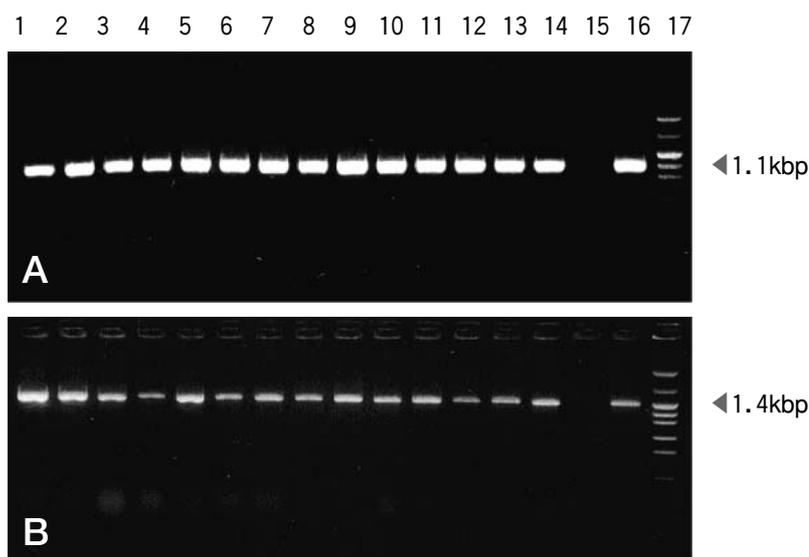


図 7 PCR 分析による導入遺伝子の検出

A : GUS 遺伝子, B : NPT II 遺伝子

1 - 7 : LBA4404/pBI121 による形質転換体

8 - 14 : LBA4404/pBI101-012-pI による形質転換体

15 : 非形質転換体, 16 : pBI121, 17 : DNA サイズマーカー (pHY)

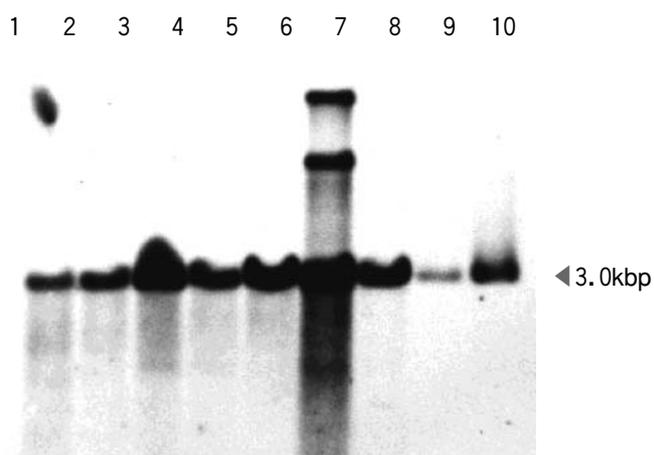


図 8 サザンブロット分析による GUS 遺伝子の検出

1 : 非形質転換体, 2 - 5 : LBA4404/pBI121 による形質転換体

6 - 8 : LBA4404/pBI101-012-pI による形質転換体

9, 10 : プラスミド pBI121

プローブは pBI121 の 3 kbp の *EcoRI-HindIII* フラグメント (GUS 遺伝子)

4. プロモーターの違いによる GUS 遺伝子の発現様式

GUS 遺伝子のプロモーターが、CaMV 35Sプロモーターであるバイナリーベクター pBI121と、*rolC* 遺伝子のプロモーターであるバイナリーベクター pBI101-012-pl を用いて作出した形質転換体の GUS 遺伝子の発現組織の差異を調査した。組織切片を X-Gluc 溶液で染色したところ、CaMV 35S プロモーターでは葉 (図 9 A, D), 茎 (G, J), 根 (M, P) のいずれでも組織の広い範囲が青色に染まり GUS 遺伝子が発現した。これに対し、*rolC* 遺伝子のプロモーターでは葉 (図 9 B, E), 茎 (H, K), 根 (N, Q) のいずれでも、維管束組織で青色に染まりその発現が認められた。一方、非形質転換体ではまったく染色されず、GUS 遺伝子の発現は認められなかった (図 1-9 C, F, I, L, O, R)。

プロモーターの違いによる GUS 遺伝子の発現量の差異を知るために、2 種のバイナリーベクターにより得られた形質転換体の GUS 活性を MUG を基質として調査した。その結果、葉、茎および根由来のいずれ反応液でも、CaMV 35Sプロモーターでは *rolC* 遺伝子のプロモーターよりも蛍光強度が強く GUS 活性が高かった (表 5)。また、各組織の発現量を比較すると、CaMV 35S プロモーターでは各組織間で大差がないのに対し、*rolC* 遺伝子のプロモーターでは根において GUS 遺伝子の発現量が多かった。非形質転換体では GUS 遺伝子の発現はほとんど認められなかった。

表 5 GUS 遺伝子のプロモーターと発現量の関係

植物体	GUS 遺伝子の プロモーター	GUS 活性 (4-MU pmoles/min/mg protein)		
		葉	胚軸	根
形質転換体 1	CaMV35S	12,326	18,999	13,637
2	〃	18,559	13,216	15,034
3	〃	11,081	10,914	10,495
4	〃	6,781	5,029	8,609
5	〃	14,567	9,393	9,853
平均	〃	12,663	11,510	11,526
形質転換体 6	<i>rolC</i>	4,571	6,296	9,214
7	〃	5,326	6,116	11,170
8	〃	4,886	7,298	9,250
9	〃	2,320	4,019	3,768
10	〃	3,180	3,353	4,358
平均	〃	4,057	5,416	7,552
非形質転換体	—	13	24	22

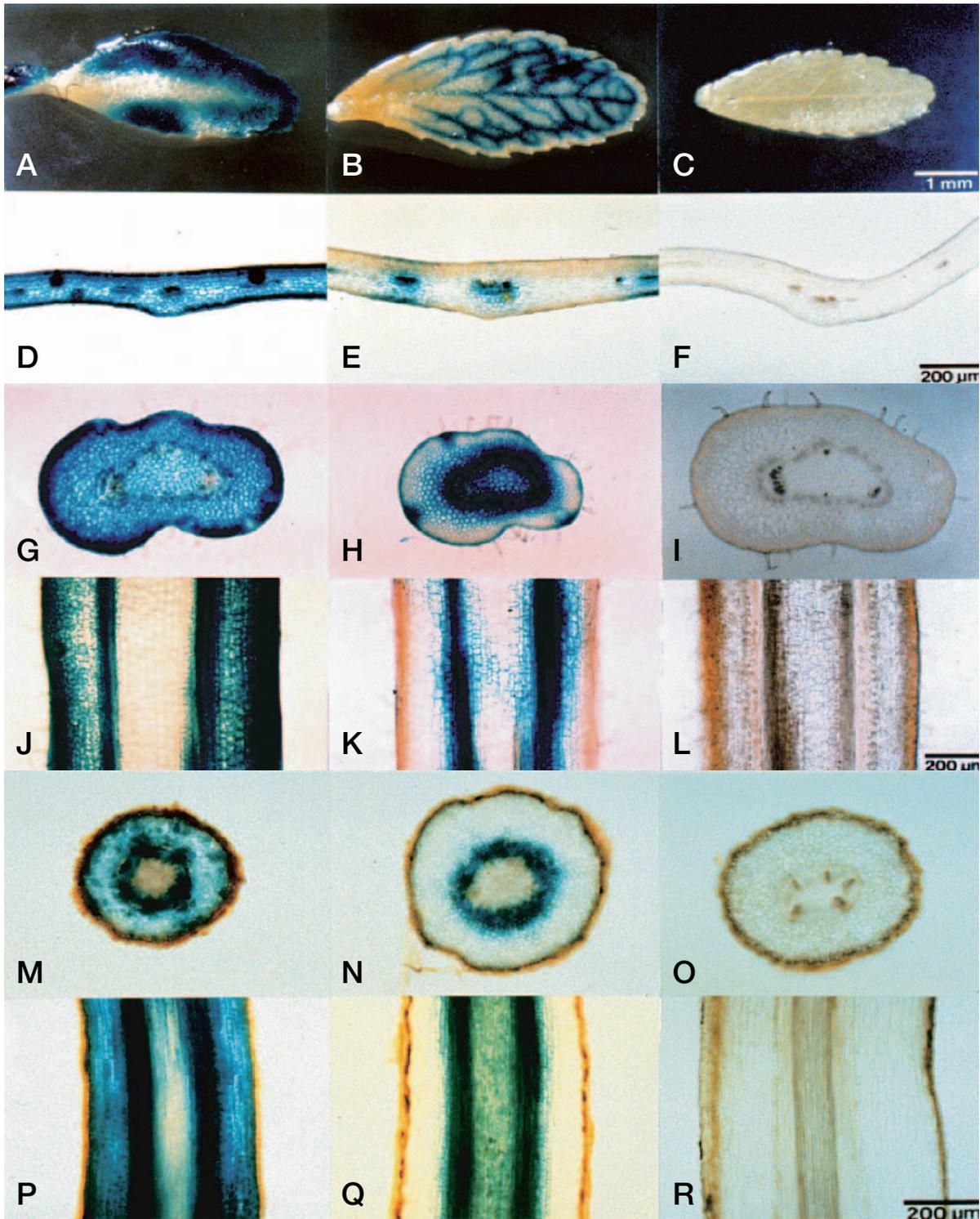


図9 カラタチ形質転換体における GUS 遺伝子の発現

A-C : 葉, D-F : 葉の横断面, G-I : 茎の横断面, J-L : 葉の縦断面,
M-O : 根の横断面, Q-R : 根の縦断面,
A, D, G, J, M, P : CaMV 35s プロモーター
B, E, H, K, N, Q : *rolC* プロモーター,
C, F, I, L, O, R : 非形質転換体

考 察

形質転換体の選抜に用いる抗生物質は、その生育を阻害する濃度で培地に添加されている。カラタチの胚軸では50mg/lカナマイシンで不定芽形成が完全に阻害された。そこで、形質転換体の選抜は、選抜培地で生存しうる非形質転換体（エスケープ）の出現率を低下させるため、カナマイシン濃度を100mg/lおよび200mg/lの2段階で形質転換体の選抜を行った。その結果、アグロバクテリウム LBA4404/pBI121と LBA4404/pBI101-012-pl のいずれの接種でも、100mg/lカナマイシンの方が形質転換効率が高かった。また、カナマイシン添加培地で再生したシュートのうち、エスケープ個体の混入率（GUS(-)/再生シュート総数、表4）は、カナマイシン濃度100mg/lおよび200mg/l間で大差がなかった。これらの結果より、形質転換体の選抜には形質転換効率の高い100mg/lカナマイシンが適していると判断し、以後の有用遺伝子導入の実験ではこのカナマイシン濃度を用いることにした。また、不定芽からのシュート伸長においては、予備試験により200mg/lカナマイシンでシュートの先端が褐変し伸長が完全に抑制されたことから、形質転換シュートの選抜濃度は200mg/lとした。

本試験では、形質転換体を選抜する際、初めに組織化学的 GUS 染色を行うことによって早期選抜を行った。GUS 染色では LBA4404/pBI121を接種した場合、再生した170本のうち96本のシュート、LBA4404/pBI101-012-pl を接種した場合、再生した133本のうち97本のシュートで GUS(+)の反応が認められた。さらに、PCR 法を用いて GUS 遺伝子断片および NPTII 遺伝子断片の増幅を行った。その結果、調査した14本の GUS(+)シュート全てで、想定されたサイズの GUS 遺伝子断片と NPTII 遺伝子断片が増幅され、GUS 染色の結果と PCR 分析の結果は一致した。GUS(+)の反応や PCR による増幅産物が植物中に残存したアグロバクテリウムによるものでないことを確認するため、組織片の磨砕液を YEB 培地で培養したが、アグロバクテリウムの増殖は認められず、植物体中にアグロバクテリウムの残存は無いものと判断した。最終的に、植物体を順化、育苗してサザンブロット分析を行った。分析を行ったすべての GUS(+)シュートにおいて、GUS 遺伝子が植物体ゲノムに組み込まれていることが確認できた。

現在、植物の形質転換には、アグロバクテリウム LBA4404系統 (Hoekema et al. 1983) が最も一般的に用いられている。しかし、植物の種類によっては LBA4404系統では十分な感染が得られず、さらに高い感染力を持つ EHA101系統 (Hood et al. 1986) 等が用いられている。本実験では、アグロバクテリウム LBA4404系統により、供試した外植片の13.3~43.1%から形質転換体を得られた。このようにカラタチでは強感染系統のアグロバクテリウムを用いなくても、LBA4404系統により効率よく形質転換体を得られることが明らかとなった。

カンキツの形質転換は、主に珠心カルスを用いてポリエチレングリコール法 (Kobayashi and Uchimiya 1989, Vardi et al. 1990) とアグロバクテリウム法 (Hidaka et al. 1990) により行われていた。珠心カルスは不定胚形成能の高いカルスであるが、その誘導、植物体再生には長期間を有し、また品種によっては珠心カルスを誘導できない問題点があった。Moore et al.(1992)は茎切片を用いて初めて形質転換系を開発し、迅速な形質転換体の作出、形質転換が可能な品種拡大への可能性を示したが、その形質転換効率は5%以下と低かった。カラタチは珠心カルス誘

導の報告はなく、形質転換系も開発されていなかった。本研究で開発したカラタチの胚軸を用いた形質転換系は、その効率が13.3~43.1%であり、既往の報告 (Moore et al. 1992) に比べ高かった。カラタチの胚軸は高い再分化能を有していることから、この形質転換効率の違いは、主に用いた植物組織の再分化能の違いが一因であると考えられる。

遺伝子はそのプロモーターにより発現の部位、時期および量等が制御されている。本試験では GUS 遺伝子のプロモーターとして、CaMV 35S プロモーターと *rolC* 遺伝子のプロモーターを用い、発現様式の違いを調査した。CaMV 35S プロモーターは恒常的にどの組織でも強く発現するが、*rolC* 遺伝子のプロモーターはタバコ (Sugaya et al. 1989) やイネ (Matsuki et al. 1989) において、維管束で特異的に発現することが報告されている。カラタチにおいても CaMV 35S プロモーターは葉、茎および根の組織の広い範囲で発現し、*rolC* 遺伝子のプロモーターは維管束組織で発現した。また、発現量は CaMV 35S プロモーターがいずれの器官でも多く、発現部位、量ともに上記の他作物の報告と一致した。このことから CaMV 35S プロモーターと *rolC* 遺伝子のプロモーターは、カラタチでも他作物と同様な遺伝子の発現様式を示すことが本研究によって証明された。そこで、次の段階でカラタチに *rolC* 遺伝子を導入する際にも、プロモーターによりわい化程度が異なる可能性が高いと考え、CaMV 35S プロモーターと *rolC* 遺伝子のプロモーターを用いることにした。

最後に、開発したカラタチのアグロバクテリウム法による形質転換の手順を図10に示した。植物材料は播種後、暗所で2~3週間育苗したカラタチ実生の胚軸とする。アグロバクテリウムは LBA4404 系統を用いて、菌密度を 5×10^8 cfu/ml に調製した細菌懸濁液に長さ 1 cm に切断した胚軸切片を約15分間浸漬した後に共存培養に供する。共存培養は $100 \mu\text{M}$ アセトシリンゴンを添加した MS 培地上で、 28°C 、暗黒条件で3日間行う。その後、 100mg/l カナマイシン、 500mg/l クラフォラン、 5mg/l BA および 0.1mg/l NAA を含む MS 培地を用い不定芽形成を促して形質転換体の選抜を行う。不定芽を形成した外植片は 100mg/l カナマイシン、 500mg/l クラフォラン、 5mg/l BA、 0.1mg/l NAA を含む MS 培地を用いシュートの伸長、形質転換体の選抜を行う。伸長したシュートは基部から切り取り、 0.5mg/l NAA を含む MS 培地に移植し発根を促す。形質転換体の選抜から発根までの培養条件は 26°C 、16時間日長条件で行う。本形質転換法を用いることにより、アグロバクテリウム感染から2~3カ月後には形質転換体を得ることができる。

本法はカラタチへの有用遺伝子導入に多く活用されており、ヒトの上皮細胞成長因子 (Kobayashi et al. 1996)、温州萎縮ウイルスの外被タンパク質遺伝子 (岩波ら 2000)、*gal* (GA-insensitive) 遺伝子 (草場・Jackson 2001) 等を導入した形質転換体が作出されている。また、短期間で非常に効率良く形質転換体を得られることから、果樹における遺伝子導入のモデル実験系としても活用されている (清水 1998)。本手法開発後、珠心胚実生の胚軸あるいは茎培養系を用いたアグロバクテリウム法による効率の良い形質転換系は、カンキツの多くの品種で報告された (Bond and Roose 1998, Cervera et al. 1998a, 1998b, Gutierrez-E et al. 1997, Peña et al. 1995a, 1995b, 1997.)。このように、カンキツでは茎あるいは胚軸培養系の利用による形質転換系の開発により、形質転換が可能な品種数が拡大し、効率的な遺伝子導入が可能となった。

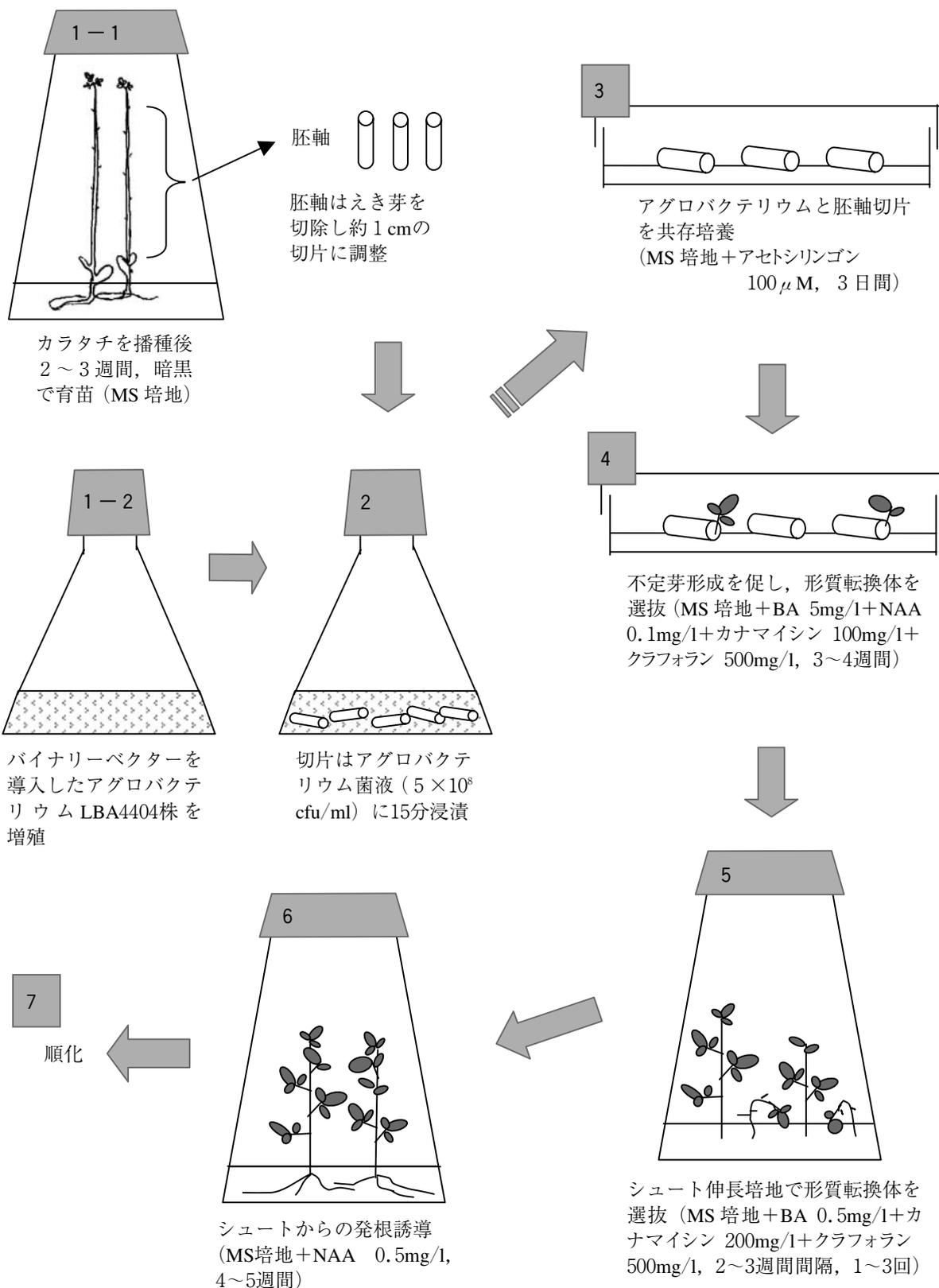


図10 カラタチ胚軸培養系を用いた形質転換体作出法フロー

第3節 要約

カラタチ台木の育種において、有用形質のみを導入できる形質転換法を活用するため、形質転換に用いる培養系を開発し、アグロバクテリウム法による効率的な形質転換系を確立した。

形質転換に用いる培養材料としては、カラタチ珠心胚実生の胚軸が適していた。不定芽形成に適した植物生長調節物質濃度は5~10mg/l BA および0~0.1mg/l NAA であり、外植片の切り口から多くの不定芽を形成できた。

形質転換に用いる菌株としては、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404系統で効率よく形質転換体を得ることができた。胚軸切片とアグロバクテリウムとの共存培養を行った後の形質転換体の選抜に適する抗生物質濃度は、100mg/l カナマイシンであった。選抜培地で不定芽を形成した切片は、カナマイシンを200mg/l に濃度を上げ、0.5mg/l BA 添加した培地に継代して選抜を継続しながらシュート伸長を促した。約10mm 以上に伸長したシュートは、0.5mg/l NAA を添加した培地で容易に発根した。また、GUS 遺伝子のプロモーターとして CaMV 35S プロモーターと、*rolC* プロモーターを比較したところ、葉、茎および根のいずれにおいても、CaMV 35S プロモーターのほうが発現量が多く広い組織で発現するのに対し、*rolC* プロモーターは維管束で特異的に発現することを明らかにした。

本法によってアグロバクテリウムの接種後2~3カ月と短期間で、22.5~43.1%の外植片から形質転換体を得られた。このように、本法は形質転換効率が高く手法が簡便で短期間に多くの形質転換体を得られることから、カラタチ台木の育種に活用できると共に、果樹の遺伝子導入のモデル植物としても活用できることがわかった。

第2章 バイナリーベクター法によるカラタチへの *rolC* 遺伝子の導入

本県のカンキツ産地は沿岸島しょ部が主体であり、急傾斜が多く立地条件は厳しい園地が多い。また、生産農家の労働事情は、年々高齢化するとともに婦女子への依存度が高まっている。このような状況の中、栽培管理の軽労働化、省力化、安全性が求められ、そのためにコンパクトな樹形とする技術開発が重要な課題となっている。果樹の樹高の調節はわい性台木の利用、整枝剪定による樹形改造、根域制御、植物生長調節物質の利用等により行われている。このうち、わい性台木による低樹高化はリンゴ、西洋ナシ、モモ、オウトウ等多くの果樹で実用化されている(福田 1995)。カンキツではカラタチが我が国の気候風土に適した台木として、ほとんどの園地において用いられている。カンキツのわい性台木は、樹高が2.4mを越えないものとされているが(Roose 1986)、我が国のカラタチ台木のウンシュウミカン樹は、栽培条件により成木時には3m以上に達することもあることから(河瀬 1988)、カラタチは半わい性台木に属する。近年、カラタチよりもわい性な台木として、カラタチの変異系統であるヒリュウが注目されている。ヒリュウは幼木時の初期生育はカラタチよりやや劣る程度であるが、開花・結実を開始すると樹の生育は緩慢となる。この現象は樹勢の強い穂木品種ではその時期が遅く(Roose 1986, 小林ら 1994)、樹勢の弱い穂木品種ほどその傾向が早く強い(高原ら 1994, 小林ら 1994)ため、早生温州、大谷伊予柑のような弱樹勢品種や、耕土が浅い条件ではヒリュウ台は樹勢が衰弱しすぎて利用できないものと考えられている。一方、青島温州などの高糖系ウンシュウのように樹勢が強い品種の台木として利用した場合は、幼木時の生育は比較的良好で、結実を開始すると生育は緩慢となり、樹体をコンパクトに維持できて果実品質は良好であることが報告されている(小林ら 1994)。現在、我が国の経済栽培で広く用いられているわい性台木はヒリュウのみであり、品種や栽培様式の多様化が進む中、様々な条件に対応して樹勢調節ができるよう、多様な台木の育成が求められている。

カンキツの台木の育成においては、CTV 抵抗性等その優良性から海外でもカラタチが育種素材として多用され、カラタチの系統選抜、あるいはカンキツ属との雑種を育成し活用されている(Castle 1987)。我が国においては特にカラタチ台木での栽培が浸透し、その優良性が実証されていることから、カラタチの形質を維持しながら改良を行う育種が望まれている。一方、形質転換法を用いてわい化遺伝子を導入し、わい性植物を育成する試みが他の作物でなされている。土壌細菌の一種である *Agrobacterium rhizogenes* が感染した植物は、その感染部位に毛状根と呼ばれる不定根を形成する。この現象は *A. rhizogenes* の Ri プラスミドの一部である T-DNA が植物ゲノム中に導入されることによって起こり(Chilton et al. 1982)。その T-DNA 上には18個の転写可能なオープンリーディングフレーム(ORF)が存在している(Slinghtom et al. 1986)。また、部位特異的突然変異による実験から、毛状根の形成に関与すると考えられる *rolA* (ORF10)、*rolB* (ORF11)、*rolC* (ORF12)、*rolD* (ORF15)の4つの遺伝子座が同定された(Taylor et al. 1985)。また Nakamura et al.(1988)は、*A. rhizogenes* による形質転換体における転写産物を解析し、*rolC* (ORF12)に相当すると思われる mRNA が強く検出されたことを報告している。さらに、タバコ等に *rolC* 遺伝子のみを植物に導入した形質転換体は、非形質転換体に比べ10%以上草丈が短く

わい化することが報告された (Kurioka et al. 1992, Oono et al. 1987, Schmulling et al. 1988)。

このように *rol* 遺伝子の導入により植物の形態変化が起こり, その中でも *rolC* 遺伝子は特にわい化に影響を及ぼすことが示唆され, 実際に作物に導入され節間が詰まりわい化した形質転換体が生産された。そこで, カンキツのわい性台木育成の手法として形質転換法の活用を試みた。本章では第1章で開発したカラタチ実生組織を用いたバイナリーベクター法により *rolC* 遺伝子を導入し, 得られた形質転換体の形態, 繁殖ならびに形質転換体後代の特性を明らかにした。

第1節 *rolC* 遺伝子の導入と形質転換体の形態特性

試験方法

1. 植物材料

植物材料は, 第1章, 第2節の試験方法に記載した方法で, カラタチ実生の養成および切片の調製を行い, 形質転換に用いる外植片とした。

2. アグロバクテリウムの系統とベクター

形質転換には, わい化遺伝子として *A. rhizogenes* から単離された *rolC* 遺伝子, および形質転換体の選抜を行うために必要なマーカー遺伝子としてカナマイシン抵抗性 (NPTII) 遺伝子を有するバイナリーベクター pBY09および Bin19-O12 (Oono et al. 1987) を用いた。用いた2つのプラスミドベクターの T-DNA 領域の概略図を図11に示した。すなわち, pBY09は CaMV 35S プロモーターに連結した *rolC* 遺伝子(以下 CaMV35S-*rolC*), Bin19-O12は *rolC* 遺伝子自身のプ

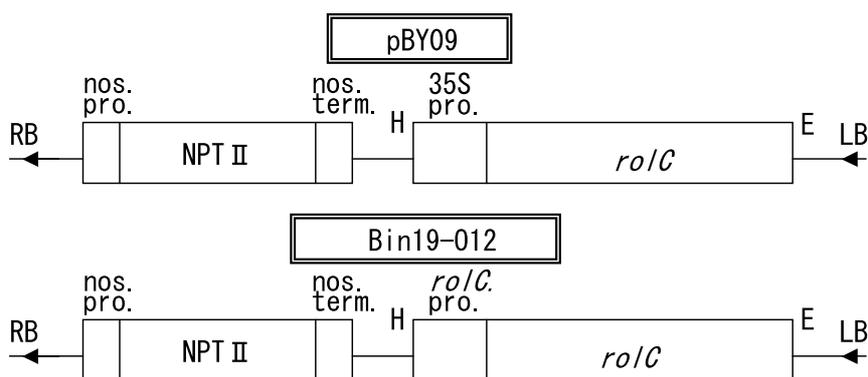


図11 形質転換に用いたプラスミド (pBY09, Bin-O12)

RB : right border, LB : left border, 35S pro. : CaMV 35S promoter,
rolC pro. : *rolC* promoter, nos. pro. : nopaline synthase gene promoter,
 nos. term. : nopaline synthase gene terminator, NPTII : neomycin
 phosphotransferaseII gene, GUS : β -glucuronidase gene,
 H : *Hind*III, E : *Eco*RI

ロモーターを持つ *rolC* 遺伝子(以下 *rolC-rolC*)を持つプラスミドである。また、pBY09, Bin19-O12は、共に *nos* プロモーターに連結した NPTII 遺伝子を持つ。

アグロバクテリウムの菌株は第1章, 第2節と同様の *A. tumefaciens* LBA4404とした。なお、pBY09, あるいは Bin19-O12を有する *A. tumefaciens* LBA4404は日本原子力研究所先端基礎研究センターの大野豊博士より分譲を受けた。

3. アグロバクテリウムの調製と外植片への接種

A. tumefaciens LBA4404/pBY09および *A. tumefaciens* LBA4404/Bin19-O12は、50mg/l カナマイシン, 300mg/l ストレプトマイシン, 100mg/l リファンピシンを含む LB 培地で、各々28℃で一昼夜振とう培養して増殖させた。これらの細菌培養液を第1章, 第2節の試験方法に記載した方法で調製し、カラタチ外植片への接種を行った。

4. 形質転換体の選抜と植物体再生

第1章, 第2節の試験方法に記載した方法(図10)で形質転換体の選抜, 植物体再生を行った。なお第1章, 第2節において、基本培地は MS 培地を用いていた。しかし、本章では予備試験を行い、MS 培地と 1/2 濃度の MS 培地を比較したところ、生育に差が認められなかったため、いずれの行程においても 1/2 濃度の MS 培地を用いることにした。

5. PCR 分析による導入遺伝子の確認

形質転換体の選抜培地で再生した植物の葉0.5g から、SDS 法 (Honda and Hirai 1990) により DNA を抽出した。*rolC* 遺伝子を検出するためのプライマーとしては、*rolC* 構造遺伝子の一部 538bp の断片を増幅するように設計したプライマーセット12468-12486 (5'-GAAGACGACCTGTGTTCTC-3') および12986-13005 (5'-CGTTCAAACGTTAGCCGATT-3') (Slightom et al. 1986) を用いた。また、得られた *rolC* 遺伝子の PCR 増幅産物が、シュート内に残存したアグロバクテリウムの DNA に起因するものではないことを確認するため、同じ DNA サンプルを用い、アグロバクテリウム中の野生型 Ti プラスミドの *virC* 遺伝子を PCR で検出した。プライマーとしては *virC* 遺伝子の0.7kbp 断片を増幅するように設計したプライマーセット (5' - ATCATTTGTAGCGACT-3' および5' - AGCTCAAACCTGCTTC-3') (Sawada et al. 1995) を用いた。PCR の反応液, 検出条件は第1章, 第2節と同様な方法で行ったが、PCR の反応条件は94℃45秒, 55℃30秒, 72℃2分間を45回繰り返した後、72℃15分間とした。

6. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

PCR 分析で *rolC* 遺伝子のバンドを検出し、アグロバクテリウムがシュート内に残存しないことを確認した58個体から、わい化度の異なる35S プロモーターの3個体 (T1, T3, T4) および *rolC* プロモーターの3個体 (T2, T5, T6) の合計6個体を選び、サザンブロット分析による導入遺伝子の確認を行った。第1章, 第2節の試験方法に記載した方法により、DNA を抽出して、サンプル当たり 5 μ g の DNA を制限酵素 *Hind*III と *Eco*RI で二重消化した。消化

した DNA はアガロースゲルで電気泳動して分画した後、ナイロンメンブランに転写した。プロンプには、pBY09の1.79kbpの *EcoRI-HindIII* フラグメント (*rolC* 遺伝子) を DIG ラベルしたものをを用いた。ハイブリダイゼーション、およびターゲット DNA の検出は、第 1 章、第 2 節の試験方法に記載した方法と同様に行った。

7. 形質転換体の形態特性調査

形質転換体の特性調査は、PCR 分析で *rolC* 遺伝子を検出した58個体を用いた。それぞれの個体は試験管内のシュートのえき芽を切り取り、バーミキュライトに播種し、暗所で20日間育成したカラタチ実生に接ぎ木した。対照として非形質転換体の培養シュートを同様に接ぎ木した。2カ月後、節間長は伸長した主幹中位5節を測定して平均値を算出し、形質転換体の節間長/非形質転換体の節間長×100により節間長比率を算出し、わい化度の指標とした。また、葉身長は主幹中位の5葉を測定した。

また、形質転換体を台木試験に用いるため、2年間育苗した苗木の特性調査を行った。接ぎ木2カ月後の調査で、わい化度を把握した形質転換体58個体の中から、プロモーターおよびわい化度の異なる3個体(35SプロモーターのT4および*rolC*プロモーターのT5, T6)を選び、中間台木試験に供試するため継続して育苗を行った。また、形質転換体の台木としての特性を明らかにするため、3個体(T4, T5, T6)はさし木繁殖して自根苗を養成した。対照は形質転換体と同様に接ぎ木あるいはさし木して育苗したカラタチ非形質転換体とした。培養土はUCソイル(Nauer et al. 1968)を用いて2リットルのポットで育苗を行い、年間施肥量は全窒素3g/ポットとした。なお、育苗はP1レベルのガラス温室(17~30℃)で行った。調査は接ぎ木あるいはさし木してから2年後に行い、主幹長、主幹径、主幹中位の節間長および葉身長を測定した。節間長比率の算出は上記の接ぎ木2カ月後の苗と同様に行った。

結 果

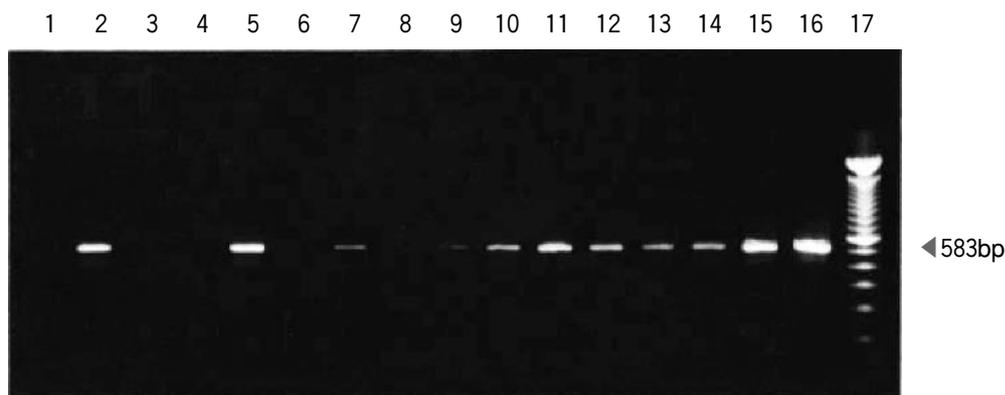
1. 形質転換体の選抜と PCR 分析による導入遺伝子の確認

カラタチ胚軸切片は、アグロバクテリウムを感染させた後、カナマイシン100mg/lを添加した培地で培養し、形質転換体の選抜を行った。2~3週間後に切断面から緑色の不定芽が形成され、不定芽はシュートが伸長する選抜培地に移植して選抜を続けた。その結果、pBY09では供試した外植片の21.9%にあたる37の外植片でシュートが再生した(表6)。また、Bin19-O12では24.5%にあたる53の外植片でシュートが再生した。再生したシュートにアグロバクテリウムが残存していないことを予備的に確認するため、植物体の一部を採取し、滅菌水を加えて磨砕したものを、YEB培地に塗布して培養した。3~4日後、YEB培地上でバクテリアの増殖は確認されず、アグロバクテリウムの残存は無いものと考えられた。

再生したシュートのうちpBY09の29個体、Bin19-O12の42個体についてPCR分析を行ったところ、pBY09では22個体(75.9%)、Bin19-O12では36個体(85.7%)のシュートで538bpの*rolC*遺伝子を増幅した(以下PCR+) (図12)。しかし、非形質転換体ではこのバンドは検出されな

表6 カラタチへの *rolC* 遺伝子導入における形質転換効率

バクター	供試切片数	シュート形成 切片数(%)	PCR 分析			
			分析シュート数	+	(%)	-
pBY09	169	37 (21.9)	29	22	(75.9)	7
Bin19-O12	216	53 (24.5)	42	36	(85.7)	6

図12 PCR 分析による *rolC* 遺伝子の検出

1：非形質転換体， 2-15：LBA4404/pBY09による形質転換体，
16：プラスミド pBY09， 17：DNA サイズマーカー 100bp ladder

かった。また、シュート内のアグロバクテリウムの残存を調査するため、*virC* 遺伝子を PCR で検出を試みたところ、どのシュートでも *virC* 遺伝子は検出されなかった。このことから、供試したシュートはアグロバクテリウムが除菌できていると考えられた。

2. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

導入遺伝子が植物ゲノムに組み込まれていることを確認するため、PCR+の個体のうちプロモーター及びわい化程度の異なる6個体(T1~6)(図13)について、DNAを *Hind*III と *Eco*RI で二重消化して、プローブとして pBY09の1.79kbpの *Eco*RI-*Hind*III フラグメントを DIG ラベルしたものを用いサザン分析を行った。その結果、すべての個体で強くハイブリダイズするバンドが検出され、形質転換体であることを確認した。しかし、そのバンディングパターンは個体により異なり、T4では *rolC* 遺伝子の一部に相当する1.79kbpのバンドのみが検出された(図14)。また、T3、T5、T6の3個体では1.79kbpのバンドとともに、それよりも大きなサイズのバンドが1~6本検出された。T1、T2では1.79kbpのバンドは検出されず、より大きなサイズのバンドのみを検出した。一方、非形質転換体ではバンドは検出されなかった。



C T1 T2 T3 T4 T5 T6

図13 *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体の形態

C：非形質転換体, T1-6：形質転換体

C T1 T2 T3 T4 T5 T6 P

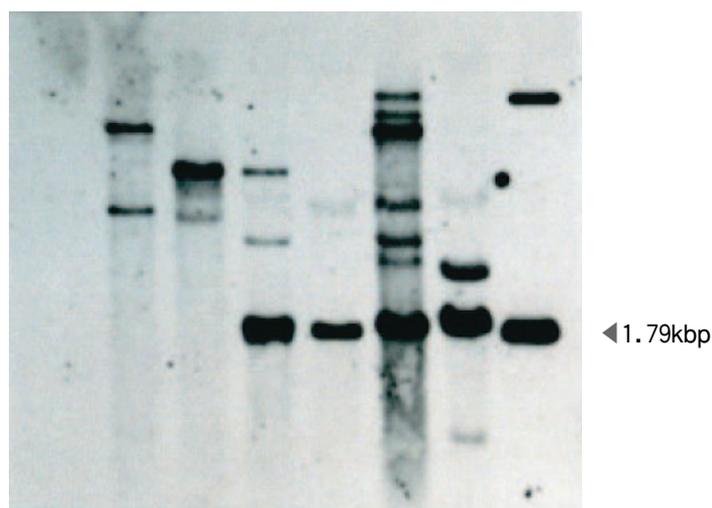


図14 サザンブロット分析による *rolC* 遺伝子の検出

C：非形質転換体, T1-6：形質転換体, P：pBY09

プローブは pBY09の1.79kbp の *EcoRI-Hind III* フラグメント (*rolC* 遺伝子)

3. 形質転換体の形態特性調査

PCR+であった58個体を用いて、それぞれの個体のえき芽をカラタチ実生に接ぎ木し、2カ月後に幼苗の形態調査を行った。その個体の節間長は、CaMV 35S プロモーターでは20個体のうち18個体が非形質転換体の50%以下であり、10%以下の極わい性を示すものが6個体、10~20%のわい性を示すものが5個体あり、著しく節間が短い個体が多かった(図15)。一方、*rolC* プロモーターは CaMV 35S プロモーターに比べわい化の程度は小さく、節間長が非形質転換体の0.8~120%と幅広いわい化度を示し、特に40~70%の中程度のわい化個体が多かった。また、節間

長が短くわい化度の強いものほど、どちらのプロモーターでも葉身長は短く葉は小型化していた(図16)。形質転換体は調査後も育苗を続けると、わい化度の強いものほど枝の先端から枯れ込む個体が多く観察された。

形質転換体の中間台木あるいは台木としての特性を明らかにするため、58個体のうちプロモーターおよびわい化度の違いから3個体(T4, 5, 6)を選んだ。選んだ形質転換体はカラタチ台木に接ぎ木あるいはさし木を行い、2年後に苗木の形態特性調査を行った。その結果、カラタチ実生に形質転換体を接ぎ木した苗木の形質転換体の節間長は非形質転換体の54.6~69.1%, 葉身長は, 61.4~93.4%, 主幹長は53.4~83.2%であり, 個体間で差異が認められるもののいずれもわい化した(表7)。また, さし木繁殖した形質転換体の自根苗は, 節間長が非形質転換体の38.5~65.4%, 葉身長が63.3~82.7%, 主幹長が60.8~87.1%, 地際部から3 cm上の主幹径が77.3~96.0%であり, 個体により差はあるがいずれもわい化していた(表8)。カラタチ台接木苗と自根苗を比較すると, 節間長はわい化度の強い形質転換体T4, T5では自根苗が短く, 形質転換体T6では同等であった(表7, 8)。

以上の結果, *rolC* 遺伝子を導入したカラタチ形質転換体は, 自根の台木用苗木でも, カラタチを台木として接ぎ木した中間台用苗木でも, 葉が小さくなり, 節間が詰まって主幹長が短くなりわい化した。また, わい化度の強い形質転換体では, 自根苗木と中間台用苗木を比較すると, そのわい化度は自根苗がやや強いことが明らかになった。

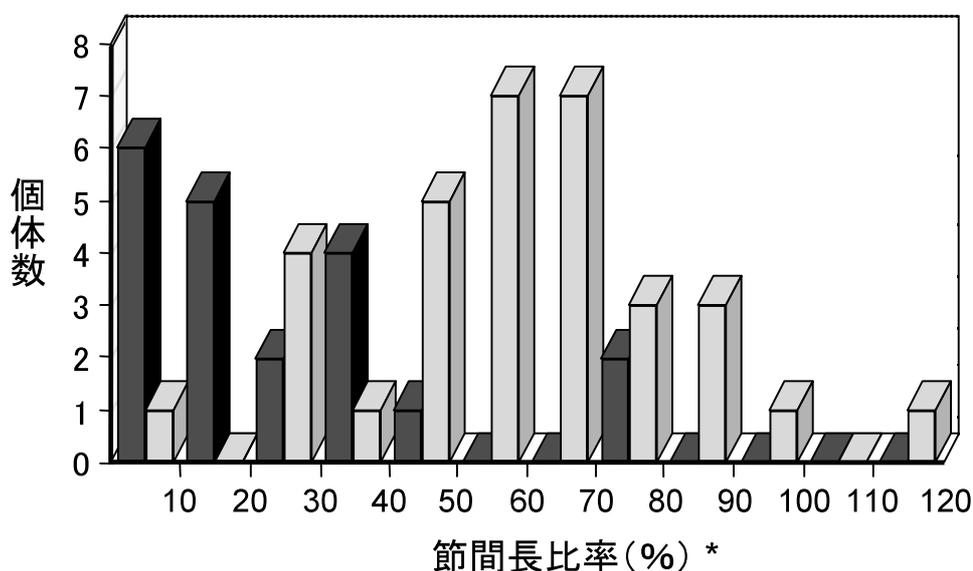


図15 *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体における節間長とプロモーターの関係

■ : 35S promoter, □ : *rolC* promoter,

注) 各系統3~5樹を供試し, 播種20日後のカラタチ非形質転換体に接ぎ木して2カ月後に調査

*形質転換体の節間長/非形質転換体の節間長×100
節間長は主幹中位5節の平均値

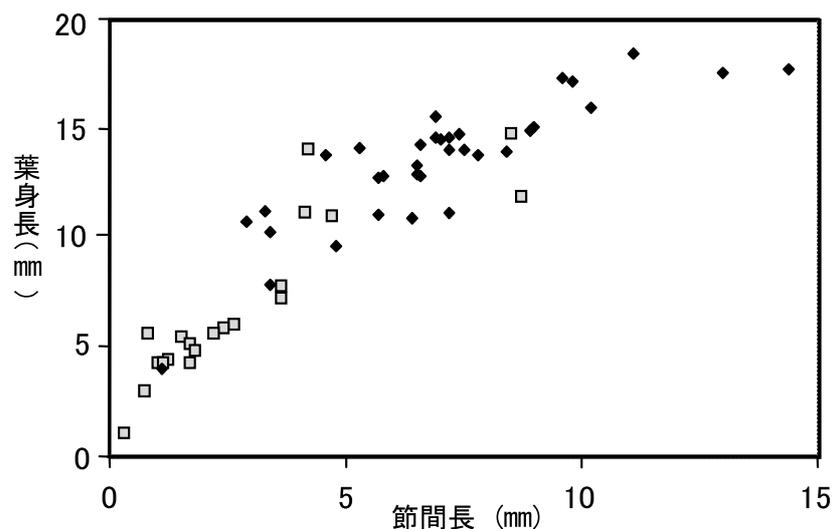


図16 *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体の節間長と葉身長の関係

□ : 35S promoter, ◆ : *rolC* promoter

表7 *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体をカラタチ非形質転換体へ接ぎ木した苗木の形態特性

系統 No.	節間長 ^z (mm)	同左比 ^y (%)	節数	葉身長 (cm)	主幹長 (cm)	主幹径 ^x (mm)
形質転換体(T4)	8.3±0.6 ^w	54.6	48.5	17.8	40.4	4.6
形質転換体(T5)	8.4±0.3	55.3	69.0	20.2	58.1	4.3
形質転換体(T6)	10.5±0.8	69.1	60.0	27.1	63.0	5.9
非形質転換体	15.2±1.3	100.0	49.8	29.0	75.7	5.6

注) 各系統4樹を供試し、接ぎ木2年後に調査

^z: 主幹中位の節間長5節の平均値

^y: (形質転換体の節間長/非形質転換体の節間長)×100

^x: カラタチ台木への接ぎ木部から5cm上の主幹径を測定

^w: 数値は測定値±標準誤差

表8 *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体の自根苗の形態特性

系統 No.	節間長 ^z (mm)	同左比 ^y (%)	節数	葉身長 (cm)	主幹長 (cm)	主幹径 ^x (mm)
形質転換体(T4)	5.9±0.2 ^w	38.5	26.6	15.0	15.8	5.8
形質転換体(T5)	6.1±0.2	39.9	28.0	16.2	17.0	6.2
形質転換体(T6)	10.0±0.2	65.4	23.0	19.6	22.9	7.2
非形質転換体	15.3±2.1	100.0	17.8	23.7	26.3	7.5

注) 各系統5樹を供試し、さし木2年後に調査

^z: 主幹中位の節間長5節の平均値

^y: (形質転換体の節間長/非形質転換体の節間長)×100

^x: 地際部から3cm上の主幹径を測定

^w: 数値は測定値±標準誤差

考 察

カンキツのわい性台木を育成することを目的として、カラタチへ CaMV 35S プロモーターあるいは *rolC* プロモーターの支配下にある *rolC* 遺伝子の導入を試みた。その結果、58個体の形質転換体が得られた。遺伝子の発現はプロモーターによって制御されるが、*rol* 遺伝子のプロモーターとしては、*rol* 遺伝子自身のプロモーターよりも CaMV 35S プロモーターを用いたほうが、わい化度が強くなることが明らかにされている (Schmulling et al. 1988)。本研究においても、カラタチ形質転換体の節間長は CaMV 35S プロモーターでは著しく節間が短い個体が多かった。一方、*rolC* プロモーターは CaMV 35S プロモーターに比べ幅広いわい化度を示し、中程度のわい化個体が多かった。このように CaMV 35S プロモーターを用いて *rolC* 遺伝子を過剰発現させ、わい化度を強くすることはできる。しかし、そのわい化度は非常に強く、得られた形質転換体の55%が、非形質転換体の20%以下の節間長となった。そのような極わい性の形質転換体は、枝の先端から枯れ込む個体も多いことから、カンキツ栽培への活用は困難であると考えられた。一方、*rolC* 遺伝子自体のプロモーターは、幅広いわい化度の形質転換体を作成でき、特に中程度のわい化個体が多いことから、カラタチでは CaMV 35S プロモーターよりも実用化できる可能性が高いと考えられた。

わい性台木の活用法としては、台木として用いる他に、中間台木として台木と食用品種の間挿入する方法がある。カンキツにおいてもヒリュウを中間台木に用いて栽培すると、樹がわい化することが報告されている (湯浅 1997)。また、*rolC* 遺伝子は毛根病を引き起こす遺伝子の一部であるため、台木として根部を用いた場合、病的な形質が強く発現することも想定された。そこで、形質転換体をさし木繁殖した自根苗と共に、中間台木としての活用を視野に入れ、カラタチ非形質転換体を台木として形質転換体を接ぎ木した苗木の生育調査も行った。その結果、自根苗と接ぎ木苗の形質転換体の生育に大差はなかったが、わい化度が強い形質転換体では、自根苗の生育がやや劣る傾向にあった。これは形質転換体を中間台木として用いるよりも台木として用いたほうが、根部においてより多くの *rolC* 遺伝子の産物が生産され、わい化を促進するためであると考えられる。以上のことから、*rolC* 遺伝子を導入した形質転換体は、台木および中間台木のいずれとしても利用できる可能性がある。

本実験後、*rolC* 遺伝子は他の果樹へも導入され、リンゴ (齊藤ら 2001) やカキ (Koshita et al. 2002) で節間の短縮、小葉化等の形態変化が確認されている。このように *rolC* 遺伝子は、果樹においても樹体をわい化する効果があることが明らかになってきた。これらの形質転換体の特性評価は閉鎖系温室で行われ、閉鎖系での安全性評価を終えたものは開放系での試験が許可される。果樹のように樹体が必要な作物は、閉鎖系の限られたスペースでの試験は困難な場面が多い。特にわい化は、限られた根域となるポット試験では、その効果の評価には限界がある。今後はわい化の確認された形質転換体は、閉鎖系での安全性評価を終え、開放系における栽培により実用性評価を進める必要がある。また、*rolC* 遺伝子を導入した形質転換体自体のわい化は、多くの作物で確認されている。しかし、*rolC* 遺伝子を導入した形質転換体を台木に用いて、食用品種を接ぎ木した樹の特性に関する報告はなく、今後の研究の進展が期待される。

第2節 形質転換体の繁殖特性

試験方法

1. さし木による繁殖特性調査

第2章, 第1節で作出した形質転換体58個体の中から, プロモーターおよびわい化度の違いにより6個体を選び, サザン分析により形質転換体であることを確認した個体(図13, 表9のT1-6)を供試した。さし穂は2年生の形質転換体の当年枝から6月下旬に採取し, 3~4葉を付けて約12cmに調製した。発根促進処理としてオキシベロン(IBA 0.5%)粉剤を基部約1cmに塗布した。さし床は粒径約5~6mmの鹿沼土を用い, 密閉挿して行った。その後, 閉鎖系温室(17~30℃)で管理し, さし木40日後に掘り上げ, 発根率, 発根数, 最長根長を調査した。各個体19~52本のさし穂を供試し, 対照は形質転換体と同様に養成した非形質転換体とした。

2. 形質転換体の果実特性調査

さし木繁殖特性調査に供試した形質転換体6個体のうち, 開花・結実したわい化度39.9%の個体(T4)と68.2%の個体(T6)の2個体について果実特性を調査した。閉鎖系温室(17~30℃)で栽培中の7年生形質転換体から, 10月中旬に果実を採取し, 果実重, 果実横径, 果実縦径, 種子数, 種子重および種子中の胚数を調査した。供試数は各個体8果実とした。

3. 形質転換体の珠心胚実生における *rolC* 遺伝子の安定性調査

上記2. で果実調査を行い種子形成が認められた形質転換体(T6)を供試し, 形質転換体の果実から得られた実生における *rolC* 遺伝子の存在を調査した。10月中旬に収穫した果実から種子を採取し, 水道水で洗浄後, 70%エタノールに数秒, 1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分間それぞれ浸漬して滅菌した。さらにその種子は滅菌水で3回洗浄した。その後, 外皮と内皮をはく皮し, 胚を分離し大きさ順位を付けた。分離した胚は3%シヨ糖および0.8%寒天を添加し, pH5.7に調整した植物生長物質無添加の1/2濃度のMS培地に置床した。培養条件は温度25℃, 日長16時間, 照度3000luxとした。発芽, 発根して完全な植物体となった個体は, 試験管内の葉0.05gを用いてDNAを抽出し, PCR分析により *rolC* 遺伝子の検出を行った。DNA抽出とPCR分析は第1章, 第2節と同様の方法で行った。

4. 形質転換体の珠心胚実生の形態特性調査

上記3. で *rolC* 遺伝子を検出した形質転換体(T6)の珠心胚実生の形態特性調査を行った。調査は胚分離して培養2カ月後に行い, 胚の発芽, 発根, 主幹長および主幹中位の節間長5節を測定した。節間長比率の算出は, 第2章, 第1節と同様な方法で行った。対照はカラタチ非形質転換体の種子を同様に胚分離して培養し, 再生した植物体とした。

結 果

1. さし木による繁殖特性調査

さし木発根率は非形質転換体が57.7%であったのに対し、形質転換体5個体(T1~T5)は93.5~100%であり非常に高かった(表9, 図17)。しかし、わい化度の最も低い *rolC* プロモーターの1個体(T6)の発根率は39.4%であり、非形質転換体よりも低かった。一方、節間長が非形質転換体の39.9%である1個体(T4)の発根数、最長根長は、非形質転換体に比べやや多かったが、他の形質転換体5個体は、非形質転換体との差はなかった(図18)。

表9 *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体のさし木発根力

系統 No.	<i>rolC</i> 遺伝子のプロモーター	節間長比率 ²	供試さし穂数	発根率(%)	発根数(本)	最長根長(mm)
形質転換体(T1)	CaMV 35S	22.6	36	94.9a ³	4.2±0.3 ⁴	63.5±3.2 ⁴
形質転換体(T2)	<i>rolC</i>	29.6	34	97.1a	4.7±0.4	71.8±4.8
形質転換体(T3)	CaMV 35S	31.3	21	100.0a	3.9±0.3	65.9±2.8
形質転換体(T4)	CaMV 35S	40.0	19	94.7a	5.6±0.3	86.3±3.4
形質転換体(T5)	<i>rolC</i>	49.6	31	93.5a	4.2±0.2	61.6±4.3
形質転換体(T6)	<i>rolC</i>	64.3	33	39.4c	4.4±0.5	65.0±7.2
非形質転換体	—	100.0	52	57.7b	4.4±0.3	63.4±5.7

²: カラタチ台木に接ぎ木して2カ月後に節間長を測定し、非形質転換体の節間長を100として比較

³: a~cは、Tukeyの多重検定(5%水準)を示し、同一項目の同一文字間に有意差なし

⁴: 数値は測定値±標準誤差

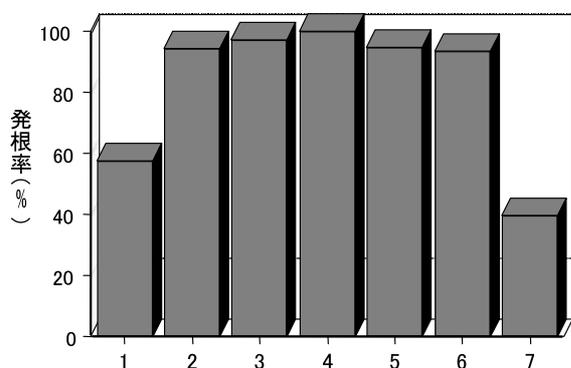


図17 *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体のさし木発根率

1: 非形質転換体, 2-7: 形質転換体

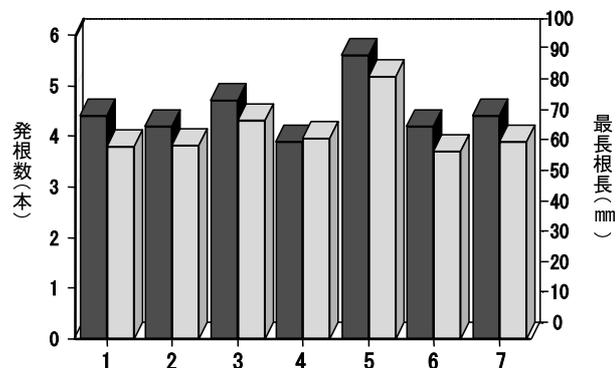


図18 *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体のさし木発根力

■: 発根数, □: 最長根長,

1: 非形質転換体, 2-7: 形質転換体

2. 形質転換体の種子および果実特性調査

節間長が非形質転換体の39.9%であった個体 (T4) の果実は、果面にしわがあり非常に小果で(図19)、種子はまったく形成されなかった(表10)。一方、節間長が非形質転換体の68.2%であった個体 (T6) は、表面にしわもなく非形質転換体と果実の外観は同様であったが小果であり、果実重は非形質転換体の50.5%であった。T6 の一果中の完全種子数、不完全種子数および種子重は非形質転換体とほぼ同様であった。しかし、一種子中の胚数は非形質転換体が5.0であったのに対しT6 は7.5とやや多かった。このように個体により種子形成能は異なったが、非形質転換体と同等な種子形成を示した形質転換体 (T6) が得られた。

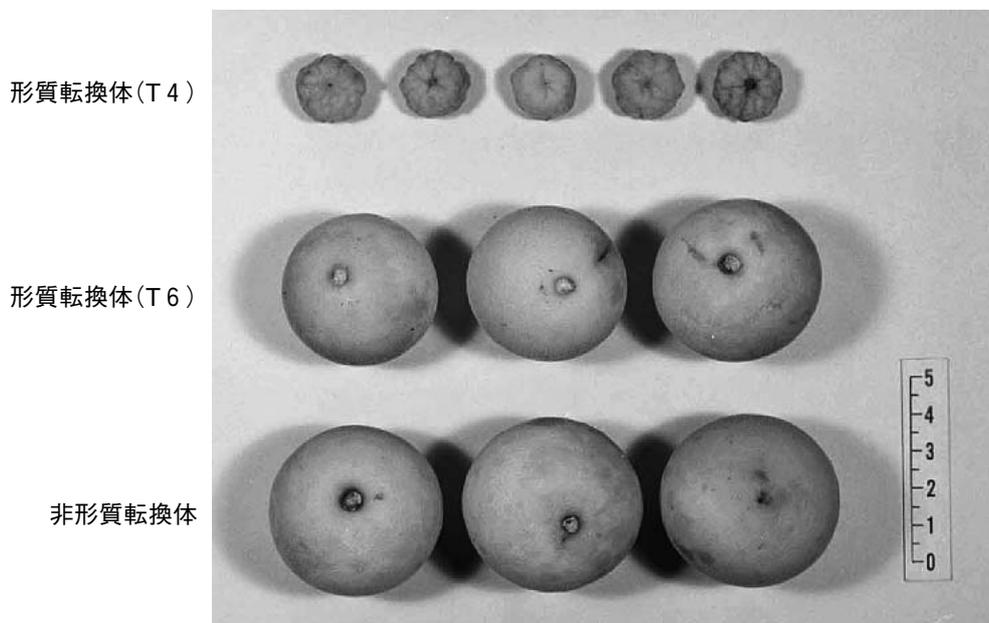


図19 *rolC* 遺伝子を導入したカラタチの果実

表10 *rolC* 遺伝子を導入したカラタチ形質転換体の果実特性

系統 No.	果実重 (g)	種子数		種子重 (g)	1 種子中の 胚数
		完全	不完全		
形質転換体(T4)	2.6±0.4 ^z	0	0	—	—
形質転換体(T6)	10.9±1.5	15.8±2.7 ^z	1.0	0.24	7.5±0.4 ^z
非形質転換体	21.6±2.0	17.0±2.6	0.8	0.26	5.0±0.3

注) 各系統 8 果を供試して調査

^z: 数値は測定値±標準誤差

3. 形質転換体の珠心胚実生における *rolC* 遺伝子の安定性調査

形質転換体の種子中の胚を分離し大きさ順に培養を行なったところ、胚は2～3日後には発根し始め、次いで発芽した。61種子の447胚のうち発芽および発根して完全な植物体となった個体（以下 発芽+発根 とする）は66.2%であった（表11）。発芽+発根の率は、1種子中の胚の大きさ順位によって大きな違いはなかった。しかし、胚の大きさ順位が1～3の胚では発芽のみの個体が多かったのに対し、それより小さな胚では発芽も発根もせず生育しなかった個体が多い傾向にあった。

発芽+発根した個体は、PCR分析により *rolC* 遺伝子の検出を行った。その結果、調査した299個体のうち99.0%で *rolC* 遺伝子が検出された（表12）。*rolC* 遺伝子が検出されなかったのは、3種子においてそれぞれ1個体ずつの合計3個体であり、その個体の種子中の胚の大きさ順位は2、5および6であった。

表11 *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体(T6)の種子の胚分離培養

1種子中の胚の 大きさ順位	培養 胚数	胚の発育			
		発芽+発根(%)	発芽のみ	発根のみ	生育せず
1	61	44 (72.1)	11	2	4
2	61	44 (72.1)	14	1	2
3	60	36 (60.0)	13	6	5
4	58	34 (58.6)	3	7	14
5	53	37 (69.8)	8	2	6
6	47	33 (70.2)	1	1	12
7	36	27 (75.0)	1	2	6
8	27	17 (63.0)	0	0	10
9	22	12 (54.5)	0	1	9
10	15	11 (73.3)	0	1	3
11	12	8 (66.7)	0	1	3
12	8	4 (50.0)	0	1	3
13	6	4 (66.6)	0	0	2
14	5	2 (40.0)	0	0	3
15	4	2 (50.0)	0	0	2
16	1	0 (0.0)	0	0	1
17	1	1 (100.0)	0	0	0
合計	447	316 (66.2)	51	25	85

注) 61種子を供試し胚分離して培養した

表12 *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体 (T6) の後代における PCR 分析による導入遺伝子の検出

1 種子中の胚の 大きさ順位	供試 個体数	<i>rolC</i> 遺伝子の検出	
		+	-
1	45	44	0
2	36	35	1
3	47	47	0
4	32	32	0
5	41	40	1
6	29	28	1
7	25	25	0
8	16	16	0
9	7	7	0
10	9	9	0
11	5	5	0
12	3	3	0
13	3	3	0
14	0	-	-
15	1	1	0
合計	299	296	3

4. 形質転換体の珠心胚実生の形態特性調査

形質転換体後代349個体の形態特性調査を行ったところ、平均の節間長は非形質転換体の60.0%であった(図20)。節間長は個体によりばらつきがあり、形質転換体(T6)では0.7mm~9.5mmの範囲であったが、最も多かったのは1~4mmであり、60.4%の個体がこの範囲に含まれていた。一方、非形質転換体の節間長は1.4mm~17.2mmの範囲であったが、最も多かったのは3~6mmであり、47.1%の個体がこの範囲に含まれていた。このように形質転換体は非形質転換体に比べ節間が短かった。形質転換体と非形質転換体は、共に試験管内で正常に生育し、培養2カ月後の調査において先端の枯れ込み、枯死等はほとんど認められなかった。

考 察

果樹の台木はさし木が困難な樹種が多く、その繁殖はほとんどが種子繁殖で行われている。しかし、果樹は遺伝的にヘテロであるため、実生は形質のばらつきがある。そこで、均一な繁殖が行える台木育成を目的として、さし木繁殖可能な台木の育成がリンゴのわい性台木等で行われている(Soejima et al. 1997)。*rol* 遺伝子は毛状根の形成に関与する遺伝子である。*rol* 遺伝

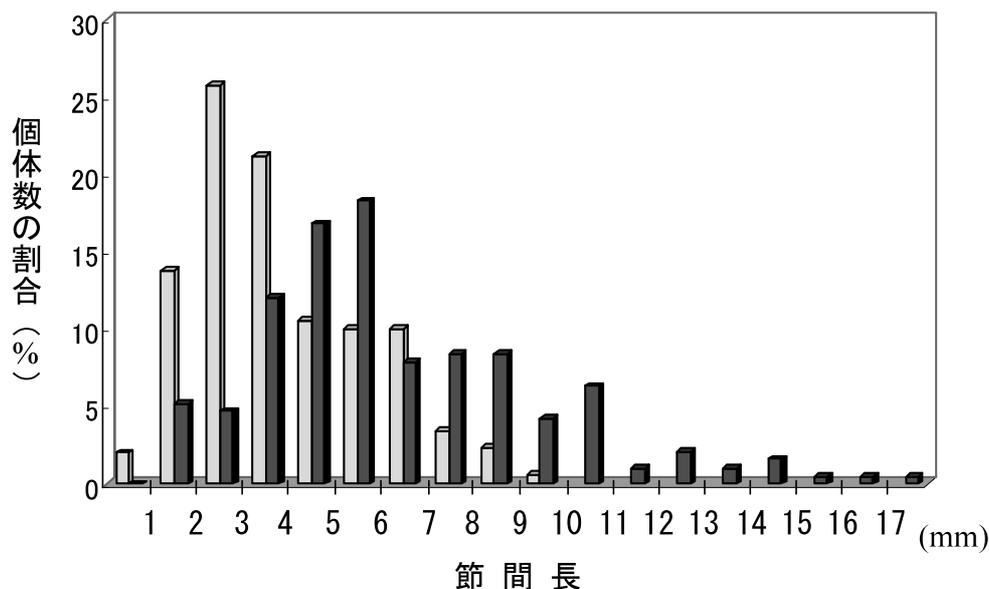


図20 *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体の珠心胚実生の節間長

□：形質転換体 (T6)，■：非形質転換体

子のうち、Spena et al. (1987) は、*rolB* が単独でタバコ、カラニコエに根を形成させる能力があり、*rolA*、*rolC* はタバコでは弱い根の形成誘導能を示すが、カラニコエに対しては示さないことを報告した。また、彼らは、*rolB* と *rolA* か *rolC* のいずれかを組み合わせると、タバコとカラニコエに対する根の形成促進が強くなることも明らかにした。また、Schmullig et al. (1988) も、*rolA*、*rolB* あるいは *rolC* 遺伝子を単独でタバコに導入すると発根が誘導され、組み合わせるとより効果的であることを報告している。このように植物により反応は異なるが、*rolA*、*rolB* あるいは *rolC* 遺伝子は発根誘導能を持つことが明らかになった。本試験でも *rolC* 遺伝子を導入したカラチ形質転換体では、さし木発根能を調査した6個体のうち、5個体が非形質転換体よりも発根率が高まっていた。また、発根数、最長根長は非形質転換体とほとんど差がなかった。この結果から、*rolC* 遺伝子の導入は、さし木繁殖が困難な樹種において、発根性の向上に活用できることが裏付けられた。

形質転換から7年後に初結実した形質転換体の果実重は、非形質転換体の12.0%あるいは50.5%と小果であった。今後、これらの形質転換体を台木として栽培したとき、接ぎ木した食用品種がわい化することが期待されるが、その果実についても台木の影響が及ぶことが想定される。そのため、強樹勢で大玉になりすぎることが問題となっている高糖系温州ミカン等で、有用なわい性台木となる可能性があると考えられる。

著しく小玉であった形質転換体の果実は種子がなかったが、果実重50.5%の形質転換体では非形質転換体と同様な種子形成が認められた。カラチの繁殖は現在、種子繁殖により行われ

ている。形質転換によって導入した遺伝子は通常、相同染色体の一方にのみ導入されヘテロの状態である。形質転換体を実用化するためには種子繁殖性作物では、自殖を行い導入遺伝子をホモとし固定を行う必要がある。しかし、カラタチは多胚性であり、その珠心胚実生は親と同じ遺伝的形質を持つ。そのため、有用遺伝子を導入した形質転換体当代そのまま、導入した遺伝子を持つ実生の種子繁殖が可能であることが想定される。そこで、本試験で得られた形質転換体の種子繁殖特性を調査した。果樹においては播種から結実までに要する期間が長いので、形質転換法により導入した遺伝子の遺伝あるいは安定性についての報告は未だ少ない。カンキツでは Kobayashi et al. (1994) が、珠心カルスに導入した遺伝子が液体窒素中で凍結保存後も安定して保持されていることを報告している。また、モモでは plum pox virus (PPV) 外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換体の後代において、導入遺伝子が遺伝することが確認されている (Ravelonandro et al. 1998, Scorza et al. 1998)。本試験で得られた形質転換体のうち、結実し種子を得られた1個体において、導入した *rolC* 遺伝子が珠心胚実生で安定して維持されているかどうかを調査した。その結果、61個の種子から得られた299個体の実生のうち、99.0%で *rolC* 遺伝子が検出され、導入遺伝子は珠心胚実生で安定して維持されていることが明らかとなった。

多胚性品種の1種子中には複数の珠心胚と交雑胚が存在するため、本実験で得られた実生は珠心胚実生と交雑実生が混在する。形質転換体当代では導入遺伝子はヘテロの状態が存在し、その自殖後代は25%が *rolC* 遺伝子を保有しないことが想定される。また、カラタチは1種子中の胚数は5個程度であり、雑種実生の発生率は20%程度であるとされている (Hirai et al. 1986)。そのため、形質転換体の果実から得られた実生において、*rolC* 遺伝子を保有しない雑種実生の割合は5%程度であると想定される。しかし、本試験では *rolC* 遺伝子が検出されなかった個体は3個体(1%)のみであった。カンキツの多胚性品種では一種子中の胚数が多いほど交雑胚の発生率は低くなることが報告されており (中谷ら 1980, 奥代ら 1981)、形質転換体 (T6) の種子中の胚数が非形質転換体よりも胚数が多かったことは、*rolC* 遺伝子を保有しない雑種が少なかった一因であると考えられる。しかし、本試験では形質転換体 (T6) に導入された *rolC* 遺伝子のコピー数は調査していないため、複数の *rolC* 遺伝子が導入されていることも想定され、雑種実生発生率の低さはそのことに起因する可能性もあり、今後の調査が必要である。また、*rolC* 遺伝子が検出されなかった3個体の胚の大きさ順位は2, 5および6であり、大きさ順位5および6のような小さな胚は、通常の土壌への播種では発芽しない可能性が高く、実際の台木養成場面では *rolC* 遺伝子を有しない雑種実生の発生率は、さらに低くなると考えられる。種子繁殖を行う場合、このような雑種の発生率が低いという形質は、珠心胚実生の発生割合が高くなるため、均一な台木生産に有利な特性である。

形質転換体の種子を胚分離して得られた *rolC* 遺伝子を検出した実生は、その平均節間長が非形質転換体の60.0%であり、第2章、第1節で報告した形質転換体当代の節間長比率(68.2%)に近い値であった。この調査は試験管内のシュートを用いたものであり、今後は順化、育苗を行って形態特性、導入遺伝子の安定性を調査する必要がある。以上のことから、カラタチに導入した *rolC* 遺伝子は、形質転換体の珠心胚実生においても安定して存在し、*rolC* 遺伝子により発現するわい性な形質を維持していることが示唆された。

第3節 要約

カンキツのわい性台木育成のため、他作物で節間が詰まりわい化することが報告されている *A. rhizogenes* から単離された *rolC* 遺伝子を、開発した形質転換技術を用いてカラタチに導入した。*rolC* 遺伝子のプロモーターとしては、恒常的に広い組織でも強い発現を誘導する CaMV 35S プロモーターと、*rolC* 遺伝子自身のプロモーターの2種類を用いた。その結果、*rolC* 遺伝子を導入した形質転換体58個体を得た。この個体の形態特性調査を行ったところ、35S プロモーターでは節間の長さが非形質転換体の40%以下の個体が多く、著しくわい化していた。それに対し *rolC* プロモーターでは節間の長さが非形質転換体の40~70%の個体が多かった。このようにカラタチに *rolC* 遺伝子を導入することにより、節間が詰まりわい化した植物体を得られ、そのわい化度は個体により異なること、また、プロモーターにより *rolC* 遺伝子の発現程度に違いがあることを明らかにし、様々なわい化度のカラタチを育成することに成功した。形質転換体をカラタチ非形質転換体に接ぎ木した苗木、およびさし木繁殖した自根の形質転換体は、2年間の育苗の間、生育異常は認められず、中間台木あるいは台木として活用できる可能性がある。

また、*rolC* 遺伝子を導入した形質転換体のさし木繁殖特性を調査したところ、調査した6個体のうち5個体が、非形質転換体に対し明らかに高いさし木発根力を有していた。このことから、*rolC* 遺伝子はさし木発根力の増大をもたらすことが示唆された。

開花・結実した2個体の形質転換体の種子繁殖特性調査を行ったところ、1個体は非常に小果で種子がまったく形成されなかった。他の1個体は小果であったが、種子形成数は非形質転換体とほぼ同様であった。この種子中の胚数は非形質転換体よりやや多く、多胚性の形質を維持していた。この種子から得られた実生について、PCR法により *rolC* 遺伝子の検出を行ったところ、99.0%の実生で *rolC* 遺伝子が検出された。このことから導入した遺伝子は、珠心胚実生においても安定的に維持されており、珠心胚実生によるクローン増殖が可能な形質転換体であることが明らかとなった。

第3章 *Agrobacterium rhizogenes* によるカラタチへの *rol* 遺伝子群の導入

Agrobacterium rhizogenes は植物に感染すると、その感染部位に毛状根を形成する。これは *A. rhizogenes* の保有する Ri プラスミドの一部である T-DNA が、植物ゲノム中に導入されることによって起こる (Chilton et al. 1982)。この現象は植物への遺伝子導入に活用され、T-DNA 領域の遺伝子を有用遺伝子やマーカー遺伝子に入れ替えて、植物への遺伝子導入に用い品種改良が行われている。一方、野生型 Ri プラスミドの T-DNA 上には毛状根を形成する遺伝子や、オパインと呼ばれる特殊なアミノ酸を合成する遺伝子が存在し、T-DNA を導入された植物中で転写・翻訳されて機能している。この毛状根は培養条件下でホルモンバランスを変えることにより植物体を再生する。こうして得られた植物体は、節間の短縮、分枝の増加などの形質の発現が報告され (Handa 1992, Yazawa et al. 1995)、農業への活用あるいは毛状根自体の培養による二次代謝物質の生産 (Kamada et al. 1986, Tanaka and Matsumoto 1993) 等、産業における利用の可能性が示されていた。著者は第2章でカラタチに *rolC* 遺伝子を導入した際、35S プロモーターでは非常に節間が短い個体が多く、*rolC* 遺伝子自体のプロモーターを用いた方が、幅広い化程度の個体得られ、実用栽培に適合する個体が選抜できる可能性が高いこと報告した。そのため、*A. rhizogenes* 野生株による形質転換体でもわい性台木が育成できる可能性があると考えた。また、*rolC* 遺伝子を持つバイナリーベクターをアグロバクテリウムに導入した菌株により作出した形質転換体は、遺伝子組換えの規制の対象となる。一方、*A. rhizogenes* の植物への感染による T-DNA 領域の導入は、自然界で起こっている現象である。そのため、得られた形質転換体は、遺伝子組換えの規制に触れず安全性評価を行う必要はないので、有用な形質転換体得られれば直ちに実用化することができる利点がある。*A. rhizogenes* 野生株による形質転換体の作出は、果樹においてはリンゴ (Lambert and Teofer 1992, 増田 1989)、カキ (Tao et al. 1994) およびキウイフルーツ (Yazawa et al. 1995) などにおいて報告されていたが、カンキツでは研究事例がなかった。そこで、本章ではカンキツのわい性台木を育成することを目的として、国内で分離された *A. rhizogenes* 野生株を用いてカラタチの形質転換系を開発し、作出した形質転換体の形態特性、繁殖特性および台木としての特性を明らかにした。

第1節 *Agrobacterium rhizogenes* 野生株によるカラタチ形質転換系の開発

試験方法

1. 植物および菌株

植物材料はカラタチ実生の胚軸を、第1章、第2節の試験方法に記載した方法で調製し、形質転換に用いる外植片とした。形質転換体を作成するための菌株は、千葉県でメロンより分離された *Agrobacterium rhizogenes* MAFF 301724 (以下1724株とする) (塩見ら 1987) を用いた。なお、本菌株は農業生物資源研究所から分譲を受けた。

2. 形質転換体の作出

1724株は3 mlのYEB培地 (Vervliet et al. 1975) で約16時間液体振盪培養して増殖させ遠心して集菌後、100 μ M アセトシリンゴンを添加した1/2濃度のMS培地で約 10^9 cfu/mlに調製して、切片を浸漬する菌液とした。形質転換処理区の茎切片は、菌液に10分間浸漬した後、100 μ M アセトシリンゴンを添加した1/2濃度の植物生長調節物質無添加のMS培地に置床し、25°C、暗黒条件下で、菌と4日間共存培養して感染を促した。その後、切片は500mg/l クラフォランを添加した1/2濃度のMS培地に移植して毛状根を誘導した。対照区の切片は、菌液への浸漬を行わずに500mg/l クラフォランを添加した1/2濃度のMS培地に置床し、処理区と同一条件で培養した。なお、供試切片数は、処理区では216本、対照区では30本とした。切片から発生した毛状根は、500mg/l クラフォランを添加した1/2濃度のMS培地を用い、2～3週間の間隔で同組成の培地で5～7回継代培養して除菌した。その後、毛状根を約1 cmに切り、0.5mg/l BAを添加した1/2濃度のMS培地に移植し、不定芽の形成を促した。不定芽から伸長したシュートは、1/2濃度のMS培地で発根させた。毛状根誘導から発根までの培養条件は、温度25°C、日長16時間、照度3000luxとした。

3. オパイン分析による導入遺伝子の確認

遺伝子の導入及び発現は、形質転換体が生産するオパインの分析により確認した。分析に供試する個体は、毛状根から再生した植物体のうち、わい化程度の異なる6個体とした。オパインは1724株が生産するオパインの一種であるミキモピン (Isogai et al. 1988) を、田中 (1990) の方法により検出した。すなわち、毛状根より再生したシュートの葉は、1 N 塩酸を加えて磨碎し10分間煮沸した後、磨碎液の上清を濾紙電気泳動し Pauly 試薬で染色してミキモピンを検出した。

4. PCR 分析による導入遺伝子と除菌の確認

rol 遺伝子の導入及び1724株の除菌の確認は、オパイン分析を行った6個体についてPCR分析により行った。PCR分析に用いるDNAは、再生したシュートの葉からSDS法 (Honda and Hirai 1990) により抽出した。*rol* 遺伝子の導入の確認は、T-DNA領域の*rol*遺伝子の一部(ORF1の一部とORF2の一部) 1635bpを増幅するプライマーである1724A-1724B (清川ら 1992) を用いた。また、アグロバクテリウムの除菌の確認はTL-DNAの境界領域と、その近傍のORF1を認識して962bpを増幅するプライマーTL-B-ORF1を用いた。反応液は、10mM Tris-HCl(pH 8.8)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂を組成とする緩衝液 (Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Germany)を用い、50ng 鋳型DNA、1 μ M プライマー、200 μ M dNTPs、0.5units Taq DNAポリメラーゼ (Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Germany) を混合し、全量50 μ lで反応を行った。PCR反応は、ザイモリアクターII (アトー社製、型式AB-1820)を用い、反応条件は94°Cで2分間保温した後、94°Cで45秒、次いで55°Cで30秒、次いで72°Cで2分を1サイクルとし、45サイクル反応させた。

5. *A.grobacterium rhizogenes* を用いたバイナリーベクター法による遺伝子導入法の開発

上記の試験により *A. rhizogenes*1724株が、カラタチ胚軸に効率良く感染することが明らかになったため、この菌株を用いたバイナリーベクター法による、カラタチへの有用遺伝子導入法を検討した。植物材料は第1章、第2節と同様に調製したカラタチの茎切片を用いた。形質転換には、pBI121 (図5) を保有する *E. coli* HB 101 を用いたトリペアレンタルメーティング法 (Lichtenstein and Draper 1985) によって、pBI121を1724株に導入した菌株 (以下1724/pBI121とする) を用いた。アグロバクテリウムの調製と外植片への接種、形質転換体の選抜と植物体再生は、第1章、第2節に記載した方法 (図10) により行った。再生した植物体は、第1章、第2節に記載した方法で組織学的 GUS 染色を行い、導入遺伝子を確認した。また、導入遺伝子の検出は PCR 分析により行い、pBI121の T-DNA 領域については、GUS 遺伝子を第1章、第2節と同様の方法で検出して導入を確認した。また、1724株の Ri プラスミドの *rol* 遺伝子の導入およびアグロバクテリウムの除菌の確認は本節、試験方法4. に記載した方法で行った。

結 果

1. 形質転換体の作出

1724株と共存培養を行い感染を促した切片は、培養10日目頃から切り口に毛状根を形成し始めた (図21A)。培養30日後の処理区の毛状根形成率は32.4%であった (表13)。対照区では毛状根の形成はまったく認められなかった。毛状根は、継代培養して除菌を行う間、分枝することなく伸長するのみで、その伸長量は1カ月で2~3倍と緩慢であった。

除菌後の毛状根は、約1cmに切って0.5mg/l BAを添加した1/2濃度のMS培地に移植すると、30日後には、79.5%の根の切片で不定芽を形成した (図21B)。これらの不定芽の一部は、伸長してシュートに生育した。このシュートは基部から切り取り、植物生長調節物質無添加の1/2濃度のMS培地に移植すると容易に発根し完全な植物体に生育した。

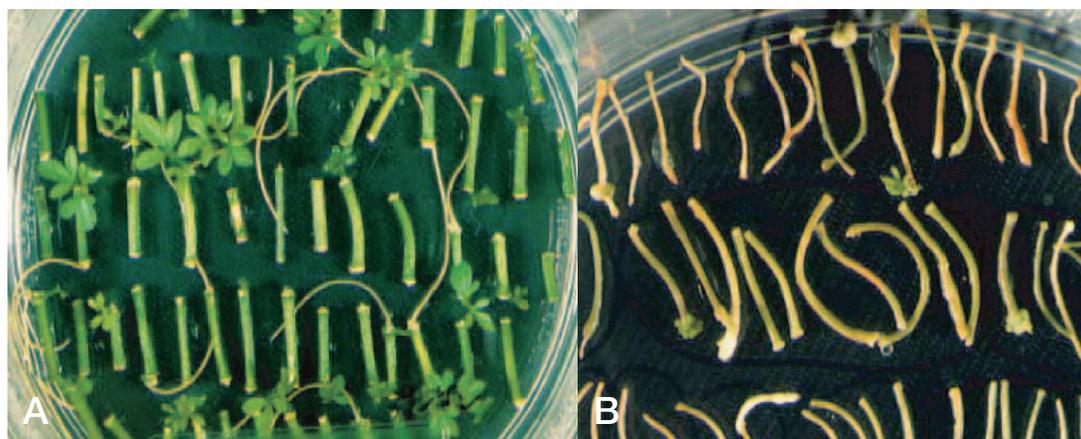


図21 *A. rhizogenes* 1724株による形質転換体の作出

A : カラタチ茎切片からの毛状根形成

B : 毛状根からの不定芽形成

2. 導入遺伝子の解析

毛状根から再生した植物体6個体について、オパイン分析を行った結果、5個体からミキモピンが検出された(図22)。さらに、5個体は *rol* 遺伝子を検出するプライマーを用いたPCR分析においても、*rol* 遺伝子の存在を示す1635bpのバンドが検出され、導入遺伝子の存在が確認できた(図23A)。また、TL-DNAの境界配列をプライマーに用いたPCR分析では、供試した6個体のいずれにも、1724株の存在を示す962bpのバンドは検出されず、除菌されていることが確認できた(図23B)。

表13 *A. rhizogenes*1724株による形質転換効率

感染菌	供試切片数	毛状根形成切片数	毛状根形成率(%)	毛状根からの不定芽形成率(%)
1724株	216	44	32.4	79.5
control ^z	30	0	—	—

^z: 菌液につけずに培養

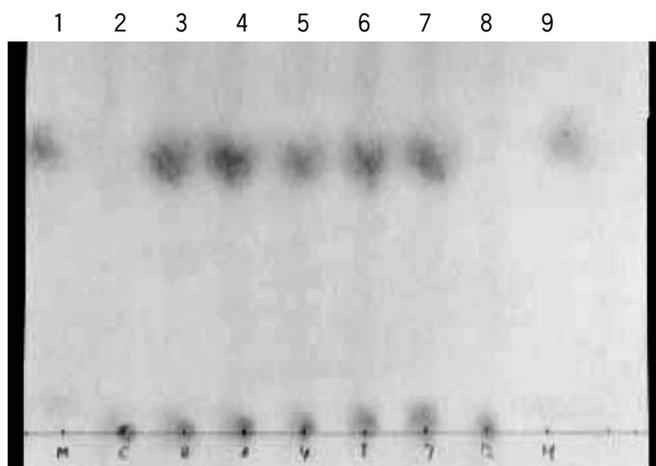


図22 毛状根からの再生植物体におけるミキモピンの検出

1, 9: ミキモピン (標品), 2: 非形質転換体,
3-8: 毛状根からの再生植物体

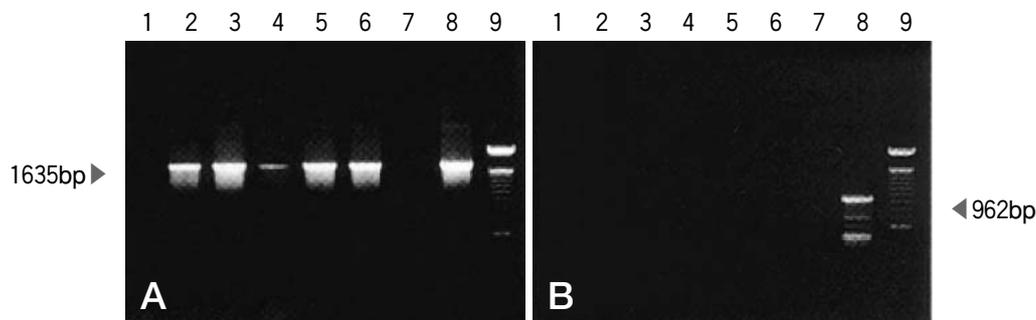


図23 PCR分析による導入遺伝子の検出と除菌の確認

A: *rol* 遺伝子の検出, B: 除菌の確認

1: 非形質転換体, 2-7: 毛状根からの再生植物体,

8: MAFF301724株, 9: DNAサイズマーカー (100bp ladder)

表14 *A. rhizogenes* 1724株を用いたバイナリーベクター法による形質転換効率

供試 切片数 A	カルス形成 切片数 B (B/A%)	カルス+不定芽 形成切片数 C (C/A%)	(下段につづく)	
			選抜培地で生存 した不定芽数 D (D/A%)	
161	27 (16.8)	23 (14.3)	19 (11.8)	
GUS+ 不定芽数 E (E/A %)	PCR 分析			
	分析数	GUS	1724	TL-B-ORF 1
17 (10.6%)	8	8	8	0

3. *Agrobacterium rhizogenes* を用いたバイナリーベクター法による遺伝子導入法の開発

1724/pBI121の感染処理を行った切片は、選抜培地で培養後35日目に調査を行った。切片は白く変色していたが、切り口より16.8%の切片でカルス形成、14.3%の切片でカルスと不定芽の形成が認められた(表14)。形成した不定芽は切り取って継代培養を行い、選抜、除菌を繰り返した。生存した19の不定芽の GUS assay を行ったところ、17の不定芽の組織が青く染まった。GUS 活性が認められた不定芽のうち、8 個体について PCR 分析で導入遺伝子の確認を行った。その結果、すべての個体で GUS 遺伝子と *rol* 遺伝子が検出され、形質転換体であることを確認した。また、すべての個体で1724株の存在を示す962bp のバンドは検出されず、除菌されていることを確認できた。1724/pBI121による形質転換効率は、10.6%であった。

以上のことから、*A. rhizogenes* を用いたバイナリーベクター法による遺伝子の導入が可能であったが、有用遺伝子と共に、Ri プラスミドの T-DNA 上に存在する *rol* 遺伝子も導入されることが明らかとなった。

考 察

A. rhizogenes 野生株の感染により毛状根を誘導し、Ri プラスミドの T-DNA 領域が導入された形質転換体を作成した報告は、これまで多くの植物でなされている (Handa 1992, Toyoda et al. 1991, Yazawa et al. 1995)。その手法としては植物組織切片を *A. rhizogenes* の菌液に浸漬した後、植物生長調節物質無添加の培地で培養して毛状根形成を促し、得られた毛状根はホルモンバランスを変えることにより植物体再生を行い、形質転換体を作成するのが一般的である。しかし、カキにおいて Tao ら (1994) は、培養植物体に *A. rhizogenes* を接種したところクラウンゴールを形成し、これを培養して誘導したカルスから不定芽形成を促し、Ri プラスミドの TL-DNA が導入された形質転換体を得ている。また、キウイフルーツにおいて Yamakawa and Chen (1996) は、*A. rhizogenes* を感染させた葉片から毛状根を経由せず、直接不定芽を形成したことを報告している。このように、*A. rhizogenes* が植物に感染した時の反応は、植物種や組織により異なる。

本報告のカラタチでは、茎切片を植物生長調節物質無添加の1/2濃度のMS培地で培養すると毛状根を形成した。通常、毛状根は植物生長調節物質無添加の培地で継代培養すると分岐しながら旺盛に生育するケースが多いが、その形態や生長は作物によって異なるものとされている。カラタチでは茎切片から発生した毛状根は、分岐することなく伸長するのみでその生育も緩慢であった。また、毛状根からの植物体再生はBA0.5mg/lを添加した培地で不定芽を形成して容易に行うことができ、伸長したシュートは切り取り、植物生長調節物質無添加の培地に移植すると発根し、完全な植物体を再生することができた。なお、本試験で用いた *A. rhizogenes* 1724株は非常に増殖が旺盛であり、2～3週間以上同一培地(500mg/lクラフォランを添加した1/2濃度のMS培地)で培養を継続すると、毛状根からのアグロバクテリウムの増殖が認められたため、短い間隔で5～6回継代して、菌の増殖を押さえて除菌を行う必要があった。

A. rhizogenes 野生株の感染により発生する毛状根、ならびに毛状根から再生した形質転換体は、オパインと呼ばれる特殊なアミノ酸を合成する。このオパイン合成酵素遺伝子は、真核細胞中で機能するプロモーターを持つためアグロバクテリウム中では転写されず、RiプラスミドのT-DNA領域が組み込まれた植物細胞でのみ転写されオパインを生産する。オパインは比較的簡易な濾紙電気泳動での検出法が開発されており(田中 1990)、*A. rhizogenes* 野生株による形質転換体であることを確認をする指標として用いられている。本報告で用いた1724株はオパインとしてミキモピンを生産する(Isogai et al. 1988)。このミキモピンは、毛状根から再生した植物体6個体のうち、わい化等の形態変化を示した5個体で検出された。また、ミキモピンを検出した5個体は、PCR分析でも *rol* 遺伝子が検出された。しかし、PCR分析は、非常に敏感なDNAの検出法であるため、完全にアグロバクテリウムが除菌されず、組織の中に残っている場合には、菌由来の *rol* 遺伝子が増幅される。そのため、形質転換体のDNAを鋳型としたPCR分析においては、検出されたバンドが菌由来でないことを確認する必要がある。一方、アグロバクテリウムのT-DNA領域が組み込まれた植物体では、TL-DNAの境界領域は欠落する。このことを利用して、TL-DNAの境界領域と、その近傍のTL-DNA内のORF1を認識して962bpを増幅するプライマーTL-B-ORF1を用いたPCR分析で、増幅バンドが認められなければ、除菌を確認できることが報告されている(清川ら 1992)。そこで、この手法により除菌の確認を行った。その結果、ミキモピンと *rol* 遺伝子を検出した5個体は、除菌も確認できたことから、形質転換体であると判断した。

一方、ミキモピン検出とPCR分析を行った6個体のうち、非形質転換体と同様の生育、外部形態を示した1個体については、ミキモピン、*rol* 遺伝子共に検出できなかった。清川ら(1992)は、タバコに *A. rhizogenes* 野生株を感染させ得られた毛状根から再生した植物体のうち、16～23%は形態的に未感染のコントロールと変わらず、PCR分析により *rol* 遺伝子が検出されなかったことを報告している。これは培養中に導入遺伝子が脱落し、その細胞から再分化が起こった、あるいは毛状根ではなく正常根から再分化が起こったことなどに起因すると考えられており、本報告において導入遺伝子が検出されなかった個体は、同様な理由による非形質転換体であると考えられる。以上のように、カラタチの実生の茎切片を用いて、*A. rhizogenes* 野生株により形質転換体を作成する手法を開発できた(図24)。本形質転換法により、アグロバクテリウム

感染から4～5カ月後には供試切片の約30%から野性株の T-DNA 領域が導入された形質転換植物体を得ることができる。

A. rhizogenes は、バイナリーベクター法による遺伝子導入の菌株としても活用が検討されている。メキヤベツ (Hosoki and Kigo 1994), トルコギキョウ (Handa 1996) などでは, *A. rhizogenes* にバイナリーベクターを導入した菌株の感染により, 毛状根を誘導し, 毛状根から再生した植物体において, バイナリーベクターの T-DNA 領域の存在を確認している。この手法により得られた形質転換体は, 毛状根を経由していることから *A. rhizogenes* の T-DNA 領域も導入されている。

カラタチは1724株の感染処理により, 茎切片の32.4%で毛状根を形成し, 高率で感染することが明らかになった。そこで, この菌株を用いて, カラタチへの有用遺伝子導入を行う形質転換系の開発を試みた。その結果, 供試した茎切片の10.6%から形質転換体を得られた。この形質転換効率は, 第1章, 第2節で開発した LBA4404株を用いたバイナリーベクター法による形質転換系よりも, やや低い値であった。また, 形質転換体の選抜を行う際, 植物生長調節物質無添加の培地で毛状根の形成を促すのではなく, 第1章, 第2節で開発した手法 (図10) である 5 mg/l BA+0.1mg/l NAA およびカナマイシン100mg/l を添加した培地で, 不定芽形成を促して選抜した。これは, バイナリーベクターの T-DNA 領域に存在する有用遺伝子のみを導入する形質転換系を開発しようと考えたためである。しかし, 1724/pBI121を用いて得られた形質転換体は, 毛状根を経由していないにもかかわらず, PCR 分析を行った8個体すべてで1724株の Ri プラスミドとバイナリーベクター pBI121の両方の T-DNA 領域が導入されていた。*A. rhizogenes* の T-DNA 領域が導入された植物は, *rol* 遺伝子の働きによりさまざまな形態変化を生じる。それを利用したわい化などの品種改良も試みられており, この形質転換系は *rol* 遺伝子と有用遺伝子を同時に付与する場合に有用である。しかし, 既存品種に耐病性, ストレス耐性など有用遺伝子のみを導入したいときには, *rol* 遺伝子は不要である。そのため, 有用遺伝子と共に *rol* 遺伝子が導入された形質転換体では, 交配などにより *rol* 遺伝子を除去する作業が必要となり, 果樹では非常に長い年月がかかる。このようなことから, カラタチへ有用遺伝子のみを導入したい場合には, 第1章, 第2節で開発した LBA4404株を用いたバイナリーベクター法が適していると考えられる。

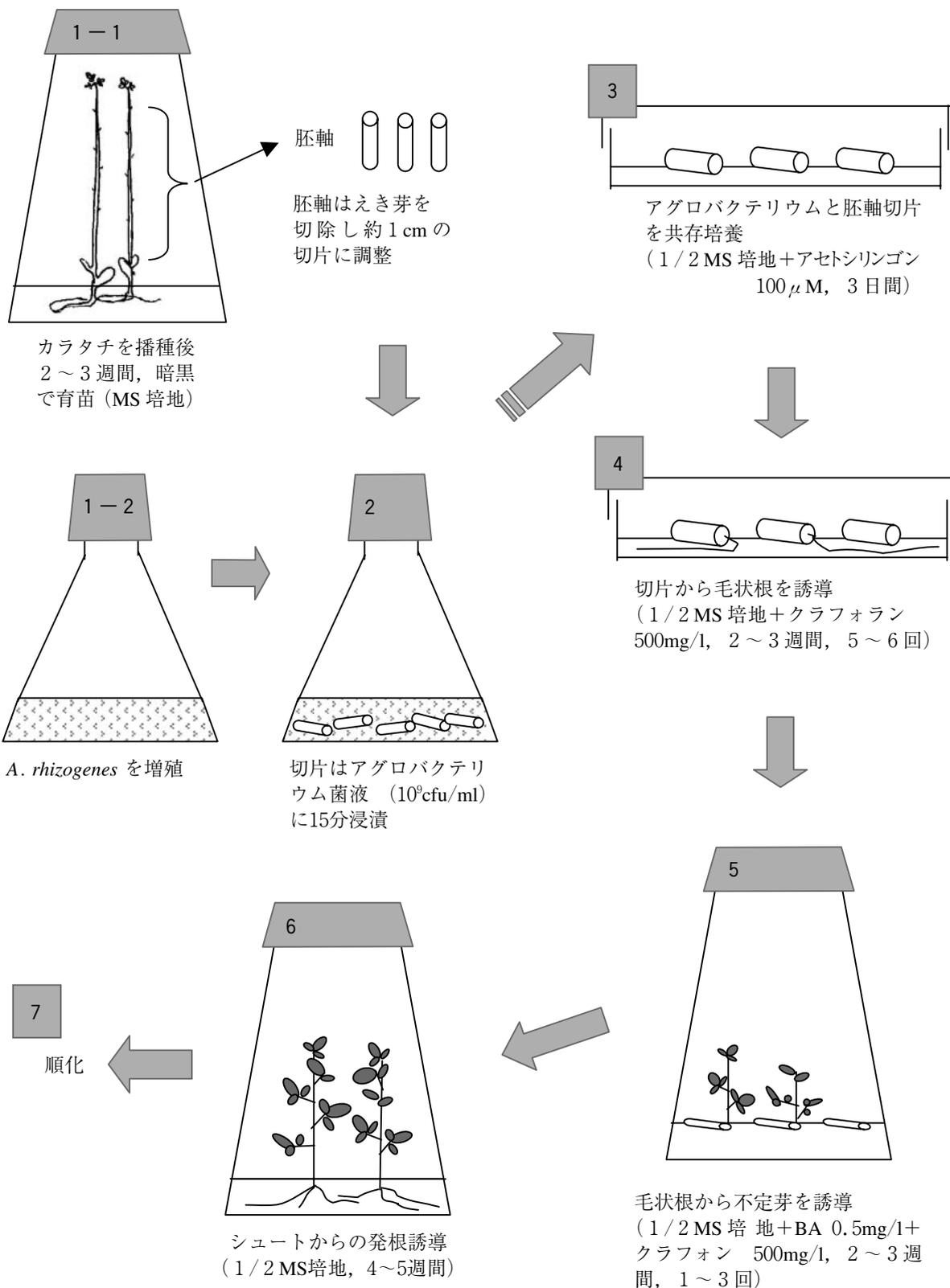


図24 *A. rhizogenes* 野生株によるカラタチ形質転換体作出法フロー

第2節 *rol* 遺伝子群を導入した形質転換体の特性

試験方法

1. 形質転換体のさし木による繁殖特性調査

カンキツの台木繁殖法としては、種子繁殖あるいはさし木繁殖が想定される。ここでは *A. rhizogenes* 野生株の感染により *rol* 遺伝子群を導入した、形質転換体のさし木による繁殖特性調査を行った。植物材料は第1節でオパイン分析及び PCR 分析により形質転換体であることを確認した5個体のうち、ロゼット化の個体を除いた4個体(個体 No. 2, 3, 4, 5)を用いた。対照は同樹齢の非形質転換カラタチとした。形質転換体はカラタチ実生(播種後暗所で2週間育苗)に接ぎ木して順化後、ガラス室で2年間育苗し、その苗木の当年枝から8月上旬にさし穂を採取した。さし穂は2~3葉をつけたまま約12cmの長さに調製し、基部にオキシベロン(IBA 0.5%含有)を塗布して、粒径5~6mmの鹿沼土にさし、ガラス室のバランス式ミスト条件下で管理した。さし穂は、さし木30日後に掘り上げ、発根率、発根数、最長根長および発根形態について調査した。なお、さし穂は1区当たり15~26本を供試した。

2. 形質転換体の形態特性調査

オパイン分析及び PCR 分析で形質転換体と確認した5個体の形態的特性調査を行った。形質転換体は試験管内のシュートのえき芽を、カラタチ実生(バーミキュライトに播種後暗所で2週間育苗)を台木として接ぎ木し、温度20~30℃、日長16時間、照度3000lux、底面給水条件下で育苗した。接ぎ木2カ月後、伸長した茎の中位の節間長、葉身長、接木部からの主幹長を測定した。調査は1系統3樹とした。

また、台木としての特性調査を行うため、上記の形態特性調査を行った5個体からわい化度の緩やかな3個体(T3, 4, 5)を選抜した。形質転換体は台木あるいは中間台木として活用することを想定して、自根(台木用)およびカラタチを台木として形質転換体を接ぎ木した苗木(中間台木用)を養成した。すなわち、台木用苗木は、順化後2年間育苗した形質転換体の春枝をさし木繁殖し、鉢上げ後2年間育苗して特性調査を行った。また中間台木用苗木は、順化後2年間育苗した形質転換体のえき芽を、暗黒下で2週間育苗したカラタチ実生に接ぎ木した後、2年間育苗して形態特性調査に供試した。いずれの苗木も培養土はUCソイル(Nauer et al. 1968)を用いて10リットルのポットで育苗を行い、年間施肥量は全窒素15g/ポットとした。育苗は冬季(12月中旬~3月中旬)最低温度2℃に加温したビニールハウスで行った。特性調査は形質転換体の主幹中位の節間長、主幹長および主幹径を測定した。調査は1系統5樹とした。

3. 形質転換体の中間台木としての特性調査

形質転換体の中間台木としての特性を明らかにするため、‘青島温州’を接ぎ木した苗木の特性調査を行った。形質転換体は2系統(形質転換体4, 5)を用い、順化後2年間育苗した形質転換体のえき芽を、カラタチ実生(暗黒下で播種後2週間育苗)を台木として接ぎ木した。

2年間育苗した後、形質転換体である中間台木の長さを25cmとして‘青島温州’を接ぎ木した。対照は非形質転換カラタチあるいはヒリュウを中間台木をとして‘青島温州’を接ぎ木し、同様に育苗した苗木とした。培養土はUCソイルを用いて25リットルのポットで育苗を行い、年間施肥量は全窒素40g/ポットとした。育苗は冬季（12月中旬～3月中旬）最低温度2℃に加温したビニールハウスで行った。調査は‘青島温州’接ぎ木2年後に主幹中位の節間長、主幹長、主幹径（‘青島温州’の接ぎ木部から3cm上部）、および中間台木の主幹径（中間台木の接ぎ木部から3cm上部）を測定した。調査は1系統あたり3樹とした。

結 果

1. 形質転換体のさし木による繁殖特性調査

さし木発根能力の調査結果を表15に示す。形質転換体4個体は、非形質転換体に比べ、いずれもさし木発根率が高かった。発根数は形質転換体T2とT5が多かった。一方、最長根長は、発根数の多い形質転換体T2、T5が長かった。また、図25に示すように、発根角度は形質転換体4個体は、いずれも非形質転換体に比べて地面に対して水平に近い角度で伸長する傾向がみられ、屈地性が弱まっていると考えられた。発根は非形質転換体ではさし穂の切り口のみから認められたのに対し、形質転換体は4個体すべてで、切り口に加え茎基部の側面からの発根が認められた。

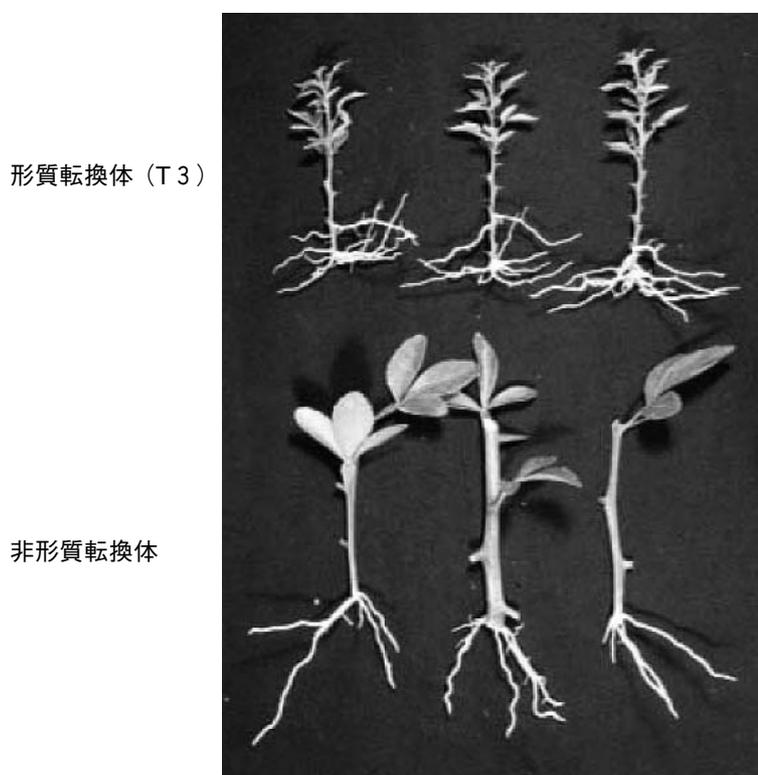


図25 *A. rhizogenes* による形質転換体のさし木発根状況

表15 *A. rhizogenes* 1724株による形質転換体の挿し木発根能力

系統 No.	節間長 ^z 比率 (%)	挿し穂数	発根 挿し穂数	同左率 (%)	発根数 (本)	最長根長 (mm)
形質転換体 (T2)	10.6	15	15	100.0	10.4±0.4 ^y	55.0±3.1 ^y
形質転換体 (T3)	21.2	26	22	84.6	6.8±0.9	38.0±4.8
形質転換体 (T4)	36.4	16	16	100.0	5.4±1.0	31.0±6.7
形質転換体 (T5)	71.2	18	15	83.3	13.2±0.7	53.0±4.8
非形質転換体	100.0	19	12	63.2	5.3±0.7	39.3±6.5

^z: 順化2カ月後に、主幹中位の節間長を測定し、非形質転換体を100として比較

^y: 数値は測定値±標準誤差

表16 *A. rhizogenes* 1724株による形質転換体のカラタチ台接ぎ木苗の形態特性
(接ぎ木2カ月後に調査)

系統 No.	節間長 (mm)	同左比 ^y (%)	葉身長 (mm)	主幹長 (mm)	備考
形質転換体 (T1)	0.7±0.0 ^z	10.6	9.2±0.4 ^z	15.8±1.8 ^z	葉が下に巻く
形質転換体 (T2)	1.4±0.1	21.2	10.0±0.3	19.4±0.4	
形質転換体 (T3)	2.4±0.2	36.4	9.2±0.4	19.2±3.1	
形質転換体 (T4)	4.7±0.5	71.2	14.0±0.5	27.1±1.1	
形質転換体 (T5)	5.4±0.5	81.8	15.1±0.8	33.2±3.3	
非形質転換体	6.6±0.7	100.0	14.7±0.5	47.6±4.7	

注) 各系統3樹を供試

^z: 数値は測定値±標準誤差

^y: 形質転換体の節間長/非形質転換体の節間長×100

2. 形質転換体の形態特性調査

試験管内の形質転換体のシュートは接ぎ木により順化を行い、2カ月間育苗して形態特性を調査した。その結果、形質転換体5個体は、非形質転換体に比べ、いずれも節間が短くわい化していた(表16)。その範囲は形質転換体の10.6~81.8%であり、個体による差が大きかった。また、節間長の短いものほど、葉身長、主幹長は短い傾向にあった。最もわい化程度の強い1個体(T1)は、葉が下に巻く奇形であった。

その後、2年間育苗した苗木の節間長は、中間台木用苗木では非形質転換体の11.4~17.1%であった(表17)。また、自根苗では非形質転換体の6.4~15.4%であった(表18)。いずれの苗木も著しくわい化していたが、最もわい化していたのは接ぎ木苗ではT3、自根苗ではT5であり、接ぎ木苗と自根苗ではわい化傾向は異なっていた(表17, 18)。

表17 *A. rhizogenes* 1724株による形質転換体のカラタチ台接ぎ木苗の形態特性
(接ぎ木2年後に調査)

系統 No.	節間長 (mm)	同左比 ^z (%)	主幹長 (mm)	主幹径 ^y (mm)
形質転換体 (T3)	3.6±0.7 ^x	11.4	21.4±2.8 ^x	5.3±0.9 ^x
形質転換体 (T4)	4.6±0.6	14.3	38.5±5.6	5.7±0.4
形質転換体 (T5)	6.2±0.8	17.1	26.6±4.2	6.4±0.4
非形質転換体	26.8±1.5	100.0	115.8±15.3	12.6±0.7

注) 各系統5樹を供試

^z: 形質転換体の節間長/非形質転換体の節間長×100

^y: 接ぎ木部から5cm上の主幹径を測定

^x: 数値は測定値±標準誤差

表18 *A. rhizogenes* 1724株によるカラタチ形質転換体の自根苗の形態特性
(さし木2年後に調査)

系統 No.	節間長 (mm)	同左比 ^z (%)	主幹長 (mm)	主幹径 ^y (mm)
形質転換体 (T3)	3.5±0.9 ^x	12.5	12.1±0.2 ^x	4.2±0.6 ^x
形質転換体 (T4)	4.0±0.9	15.0	12.7±2.7	3.0±0.1
形質転換体 (T5)	1.8±0.2	6.4	9.6±0.8	3.7±0.5
非形質転換体	28.1±1.3	100.0	61.1±1.6	7.8±0.4

注) 各系統5樹を供試

^z: 形質転換体の節間長/非形質転換体の節間長×100

^y: 地際部から5cm上の主幹径を測定

^x: 数値は測定値±標準誤差

3. 形質転換体の中間台木としての特性調査

A. rhizogenes により *rol* 遺伝子群を導入した形質転換体を中間台木とした‘青島温州’は、2系統共に非形質転換カラタチ、あるいはヒリュウを中間台木とした台木に比べ、主幹長、主幹径共に明らかに少なく、生育が劣っていた(表19, 図26)。また、ヒリュウを中間台木とした苗木は、非形質転換カラタチと節間長は同程度であったが主幹長は短かった。

表19 *A. rhizogenes* 1724株による形質転換体を中間台木とした‘青島温州’の形態特性

中間台木	中間台木の ^z わい化度	節間長 (mm)	葉身長 (mm)	葉幅長 (mm)	主幹長 (cm)	幹径(mm) ^y		
						台木	中間台木	青島
形質転換体 (T4)	14.3	17±1 ^x	88	45	51	12	14	6
形質転換体 (T5)	17.1	20±1	106	54	85	14	15	8
ヒリュウ	77.1	25±1	121	55	112	22	25	10
非形質転換体	100.0	25±1	125	52	184	23	22	15

注) 各系統3個体を供試し, ‘青島温州’を接ぎ木して2年後に調査。

^z: ‘青島温州’を接ぎ木する直前に調査した中間台木の節間長比

^y: 台木は地際部から3cm上, 中間台木はカラタチ台木への接ぎ木部から3cm上,
‘青島温州’は中間台木への接ぎ木部から3cm上の主幹径を測定

^x: 数値は測定値±標準誤差



図26 *A. r.* による形質転換体を中間台木とした‘青島温州’

1: 非形質転換体, 2, 3: 形質転換体

考 察

A. rhizogenes による形質転換体は, 節間の短縮, 分枝の増加, 根系の発達, 屈地性の喪失等の生理的变化を示している (Capone 1989, Handa 1992, 塩見ら 1987)。これまで外国および国内において, *A. rhizogenes* による形質転換には多くの菌株が用いられている。清川ら (1998) は, 外国産のアグロピン型 *A. rhizogenes* を用いて作出した形質転換体はわい化したが, 葉が波打つなど園芸学上好ましくない形質を示したのに対して, 国内産のミキモピン型1724株により得ら

れた形質転換体は、葉が波打たなかったことを報告している。さらに、清川ら（1998）はこの違いを DNA レベルで比較し、1724株の *rolA* 遺伝子の 5' 末端の塩基配列は、既知の菌株と比較して変異に富んでおり、1724株の *rol* 遺伝子の転写を調べたところ、*rolA* のみ mRNA の転写が見られず、このことが外国産の菌株と表現型が異なる要因であるとしている。Yazawa ら（1995）はキウイフルーツ、八木岡・秋濱（1996）はサクラにおいて1724株を用いた形質転換体を得ているが、いずれも葉の波打ちは認めていない。カラタチにおいても、1724株により *rol* 遺伝子群を導入した形質転換体は、節間の短縮、さし木繁殖力の向上、屈地性の低下等の特性を示したが、葉の波打ちは認められず、これまでの他作物の報告と同様な結果であり、園芸利用上有利な特性であると考えられる。

一方、第2章において *rol* 遺伝子のうち *rolC* のみをカラタチに導入した場合、節間の短縮、葉の小型化、さし木発根率の増加等の変化が起きた形質転換体を得ている。これらの特性は、1724株による形質転換体と非常に類似したものであった。しかし、そのわい化の度合いは、*rolC* のみを導入した形質転換体と比較して非常に強いものであった。自根苗では2年間の育苗の間、生育は非常に緩慢で枝の先端から枯れ込み、枯死する個体も認められた。このことから、1724株によるカラタチ形質転換体の自根苗の園芸上での利用は困難であると推察された。一方、カラタチに接ぎ木を行った形質転換体は、枝先端からの枯れ込みや枯死は少なかった。そこで、1724株による形質転換体は、中間台木としての活用を検討することにした。

判野ら（1997）は *A. rhizogenes* 野生株によりマルバカイドウの形質転換体を作成し、これを台木として‘ふじ’を接ぎ木したところ、非形質転換体を台木とした苗木に比べ、生育量が少ないことを報告している。本報告では中間台木として *A. rhizogenes* 野生株によるカラタチ形質転換体を用い、‘青島温州’を接ぎ木した苗木の調査を行った。その結果、‘青島温州’の主幹長は非形質転換体を中間台木とした苗木に比べ27.2~46.2%に短縮し、主幹径も約40%となり生育が劣っていた。このように、*A. rhizogenes* 野生株による形質転換体は、中間台木として用いた時、穂木品種の生育に影響を及ぼすことが明らかとなった。中間台木ではその挿入する長さにより、樹勢をコントロールすることが、リンゴ栽培では行われている。本報告では中間台木として形質転換体を25cm 挿入したが、その苗木のわい化度はヒリュウよりもかなり強い傾向にあり、中間台木として挿入する長さについては、今後目的にあわせて検討が必要である。

現在、形質転換体5個体は形質転換処置を行って8年目となるが未だ開花していない。カラタチは通常種子で台木繁殖が行われているが、本報告の *A. rhizogenes* 野生株によるカラタチ形質転換体は、さし木発根率が高いこと、中間台木として利用する場合は接ぎ木で繁殖することから、種子が得られなくても繁殖は可能であると考えられる。しかし、さし木繁殖については樹齢が進むほど発根率が低下することが知られており、今後、継続調査が必要である。本報告で作出した形質転換体のさし木繁殖におけるもう一つの特性の変化として、根の屈地性の弱まりがあった。さし木により発生した形質転換体の根は、地表面近くに多く分布していた。八木岡・秋濱（1996）も1724株によるサクラの形質転換体は、屈地性が低下したことを報告している。この特性はカラタチに *rolC* 遺伝子のみを導入した形質転換体は認められておらず、屈地性の弱まりは *rolC* 以外の *rol* 遺伝子の働きによるものと推察される。

A. rhizogenesis 野性株による形質転換体の作出は、果樹においてはカキ (Tao et al. 1994), キウイフルーツ (Yazawa et al. 1995) およびリンゴ (判野ら1997) において報告され、わい化、さし木発根性の向上など、果樹栽培において重要な形質の発現が報告されている。今後もこれらの形質転換体の活用や *rol* 遺伝子の機能解析が進展し、果樹の樹形改善に利用されるものと考ええる。

第3節 要約

国内で分離された野生株である *Agrobacterium rhizogenes*1724株を、カラタチの胚軸切片に感染させると、切り口から毛状根を形成した。毛状根は0.5mg/l BA を添加した培地で培養すると不定芽を形成した。伸長したシュートは植物生長調節物質無添加培地で容易に発根し、完全な植物体に再生した。再生した植物体はオパイン分析と *rol* 遺伝子を検出するプライマーを用いた PCR 分析により形質転換体であることを確認し、TL-DNA の境界配列をプライマーに用いた PCR 分析により1724株が除菌できていることを確認した。形質転換体は節間が詰まりわい化し、そのわい化程度は *rolC* 遺伝子のみを導入した形質転換体よりも著しかった。

また、形質転換体はさし木発根率が高まり、屈地性が弱い傾向にあった。さし木繁殖した形質転換体は自根のまま1～2年栽培すると枯れる個体もあった。そこで、カラタチに接ぎ木したところ順調に生育したため、中間台木としての活用を検討した。すなわちカラタチに形質転換体を接ぎ木して中間台木とし、それに‘青島温州’を接ぎ木すると、この苗木の生育は非形質転換体を中間台木とした苗木と比較して、節間が短く生育量も少なかった。このように *Agrobacterium rhizogenes*1724株による形質転換体の中間台木は、穂木品種の生育に影響を及ぼすことが明らかになった。

第4章 ナシ台木形質転換法の開発

ナシは本県において約200ha栽培され、中部台地の赤なしの協業経営、中北部の‘二十世紀’の産地直売等、特色ある産地を形成している。ナシ栽培において、台木は従来ニホンヤマナシの実生が用いられてきた。ニホンヤマナシを台木とした栽培では、‘二十世紀’のユズ肌病の発生が大きな問題となった。ユズ肌病とは、果面が凹凸となり果肉が硬化するため商品性を著しく損なう障害であり、その原因として果実発育中期の水分不足(林・脇坂 1956)、カルシウム不足(川俣 1978)等が報告されている。ユズ肌の発生は台木の種類により異なり、ニホンヤマナシに比べてマンシュウマメナシではユズ肌病の発生が少ないことが明らかにされている(林・田辺 1991)。

また、ナシ栽培において台木に求められる特性としては、ユズ肌病などの生理障害耐性と共に糸状菌病である白紋羽病に対する抵抗性がある。白紋羽病は薬剤による防除が困難であり、根部へ感染することからその発見と対策が遅れがちとなり、症状が認められた時には病害は進行している。荒木ら(1963)はナシの野生種と栽培種の30品種の実生苗木の白紋羽病に対する抵抗性を検定した結果、品種によって発病までの期間に差があることを明らかにしたが、白紋羽病菌の感染はすべての品種に生じており、免疫性の台木の存在は確認されていない。これらことから白紋羽病に免疫性あるいは強度の抵抗性を示す台木の探索、育成が強く望まれている。一方、糸状菌の細胞壁成分であるキチンを分解する酵素であるキチナーゼの遺伝子や、 β -1,3グルカン分解する酵素である β -1,3-エンドグルカナーゼの遺伝子をタバコ等に導入した形質転換体は、病害抵抗性が増強したことが報告されていた(Brogie et al. 1991, 西澤ら 1992, Yoshikawa et al. 1993)。そこで、ナシの病害抵抗性台木の育成を最終目的として、ユズ肌症等の生理障害に強いマンシュウマメナシを材料として、形質転換法を開発を目指した。研究を開始した1994年当時、ナシに関する形質転換系開発の事例は皆無で、果樹の中でも形質転換法の適用が困難な樹種とされていた。しかし、栽培樹では*A. tumefaciens*の感染による癌腫病が発生しており、ナシに感染しやすい系統が存在するものと考えられた。そこで、本研究ではナシの形質転換に適する国内産*A. tumefaciens*野生株の選抜から着手し、選抜した野生株を用いたバイナリーベクター法により、ナシ台木における形質転換法を開発を行った。

第1節 ナシ台木の形質転換に適した国内産 *Agrobacterium tumefaciens* 野生株の選抜

試験方法

1. 植物材料

マンシュウマメナシ (*Pyrus betulaefolia* Bunge) 青系12号の果実は11月下旬に収穫し、直ちに種子を採種した。種子は水洗後、1% 8-ヒドロキシキノリン硫酸塩溶液で20分間殺菌し、真空パック用袋に入れ4℃で保存した。試験に供試する際、種子は70%エタノールに数秒、1%次

亜塩素酸ナトリウム溶液に15分間それぞれ浸漬して滅菌した後、滅菌水で4回水洗した。その後、発芽する種子の胚軸側1/2をメスで削除し、種皮をはく皮した子葉を外植片として供試した。なお、マンシュウマメナシ青系12号は鳥取大学より分譲を受けた。

2. 子葉組織から植物体を再生する条件の検討

子葉から植物体を再生するのに適した植物生長調節物質の濃度、組成を明らかにするため、1/2濃度のMS培地に0.5, 1.0, 5.0mg/lのBAの添加区と、0, 0.1, 0.5mg/lのNAAの添加区を相互に組み合わせた9区を設定した。培地には3%ショ糖および0.8%寒天を添加し、pHは5.7に調製した。培地は9cmシャーレに15mlずつ分注し、調製した子葉を置床して、培養40日後に不定芽、不定根およびカルス形成状況を調査した。

3. マンシュウマメナシの形質転換に適する *Agrobacterium tumefaciens* 野生株の選抜

有用遺伝子の導入に活用することを目的として、マンシュウマメナシに感染しやすい *A. tumefaciens* の選抜を行った。 *A. tumefaciens* は Wabikoら(1989)が国内で分離した5菌株、AKE10, PyTE 1, PyTS 3, PO22, PO31, および強感染株として広く知られている C58C 1 (pTiB 6 S 3) を用い、マンシュウマメナシ子葉への感染力を調査した。AKE10, PyTE 1, PyTS 3, PO22, PO 31および C58C 1 (pTiB 6 S 3) は、LB培地で、各々温度28℃で一昼夜振とう培養して増殖させた。これらの細菌培養液を3500rpmで5分間遠心分離して集菌し、100 μ Mのアセトシリンゴンを含む植物生長調節物質無添加の1/2濃度のMS培地に5 \times 10⁸cfu/mlとなるように懸濁して接種に用いた。外植片への接種は、調製したアグロバクテリウム溶液に子葉外植片を15分間浸漬することによって行った。接種後、滅菌した濾紙上で余分な菌液を除去した。共存培養には100 μ Mアセトシリンゴンを含む1/2濃度の植物生長調節物質無添加のMS培地を用い、28℃、暗黒条件で3日間、外植片とアグロバクテリウムとの共存培養を行い感染を促した。次に500mg/lクラフォランを含む1/2濃度の植物生長調節物質無添加のMS培地に外植片を移植して培養し、40日後にカルス、不定芽および不定根形成状況を調査した。すべての過程において1/2濃度のMS培地のショ糖濃度は3%、寒天濃度は0.8%、pH5.7とし、培養条件は温度26℃、光条件16時間日長、照度3000luxとした。対照は同様に調製した子葉をいずれの *A. tumefaciens* にも感染させず、同組成の培地で培養した。なお、AKE10, PyTE 1, PyTS 3および PO22は秋田県立大学我彦広悦博士、C58C 1 (pTiB 6 S 3) は千葉大学石川恵子博士より分譲を受けた。

4. 子葉からの不定芽形成およびシュートの生育に及ぼす抗生物質の濃度と種類の影響

形質転換体の選抜を行うため、子葉からの不定芽形成における抗生物質の濃度と種類の影響を調査した。形質転換体を選抜するための抗生物質としてカナマイシン0, 5, 10, 20, 30, 40, 60 mg/l, あるいはハイグロマイシン0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5mg/lを5 mg/l BA+0.1mg/l NAAのMS培地に添加し、不定芽形成を阻害する濃度を検討した。また、アグロバクテリウムの除菌のために必要な抗生物質であるクラフォランを0, 500mg/lになるように同組成の培地

に添加し、不定芽形成に対する影響を調査した。また、シュートの生育に及ぼす抗生物質の影響を明らかにするため、約15mmに生育したシュートを子葉から切り取り、カナマイシン0, 10, 15, 20, 40mg/l, BA0.5mg/lおよびクラフォラン500mg/lを添加した1/2濃度のMS培地で培養して生育状況を調査した。

結 果

1. 子葉組織から植物体を再生する条件の検討

子葉から植物体を再生する最適な植物生長調節物質濃度を検討した。子葉は培養10日目頃から切り口にカルス、不定芽および不定根の形成が認められた(図27)。不定芽形成率はBA 5 mg/l+NAA 0~0.5mg/l添加区で高く72.5~77.5%であった(表20)。不定芽形成数はBA 5 mg/l+NAA0.1~0.5mg/l添加区で多く、1切片あたり3.8~4.1であった。この範囲の濃度では不定芽は増殖するのみで、シュートに生育するものはほとんどなかった。不定根形成はBA0.5~1.0 mg/l+NAA0.1~0.5mg/l, およびBA 5 mg/l+NAA0.5mg/l添加区で認められた。



図27 子葉切片からの不定芽形成

表20 マンシュウマメナシ子葉培養における植物生長調節物質濃度の影響

植物生長調節物質濃度 (mg/l)		不定芽形成 切片数	不定芽形成 切片率(%)	平均 不定芽数	不定根形成 切片数
BA	NAA				
0.5	0.0	0	0.0	0.0	0
	0.1	4	10.0	0.1	3
	0.5	1	2.5	0.0	10
1.0	0.0	1	2.5	0.0	0
	0.1	14	35.0	0.7	2
	0.5	21	52.5	1.3	3
5.0	0.0	29	72.5	2.8	0
	0.1	30	75.0	3.8	0
	0.5	31	77.5	4.1	5

注) 供試数は各処理区40切片

2. マンシュウマメナシの形質転換に適する *Agrobacterium tumefaciens* 野生株の選抜

マンシュウマメナシに *A. tumefaciens* を感染させたところ、子葉の切り口あるいは子葉表面から、カルス、不定根および不定芽を形成した(表21, 図28A, B)。供試した6菌株のうち、カルスを形成したのは AKE10, PyTE 1, PyTS 3, PO31, C58C 1 (pTiB 6 S 3) の5菌株であった。そのうちカルス形成率は、AKE10が最も高く、カルスの大きさも最も大きかった。不定根と不定芽の形成は AKE10でのみ認められ、特に不定芽形成率は73.7%と高く、この点で他の菌株と著しく相違していた。AKE10を接種した際認められた不定芽は、正常形態のシュートと、葉は細く展葉せず茎は平たく多数分岐して珊瑚礁のような異常形態となるシュートが混在していた。

表21 アグロバクテリウム野生株のマンシュウマメナシ子葉への感染状況^z

菌株名	由来	プラスミド数	供試切片数	カルス形成率(%)	不定根形成率(%)	不定芽形成率(%)
AKE10	リンゴ	3	19	68.4	5.3	73.7
PyTE 1	ナシ	3	22	31.8	0	0
PyTS 3	ナシ	4	19	10.5	0	0
PO22	ポプラ	3	20	0	0	0
PO31	ポプラ	4	18	5.5	0	0
C58C 1 (pTiB 6 S 3)	—	—	21	14.3	0	0
control ^y	—	—	21	0	0	0

^z: 1/2 MS, クラフォラン500mg/l添加培地で培養

^y: いずれの菌にも感染させずに培養

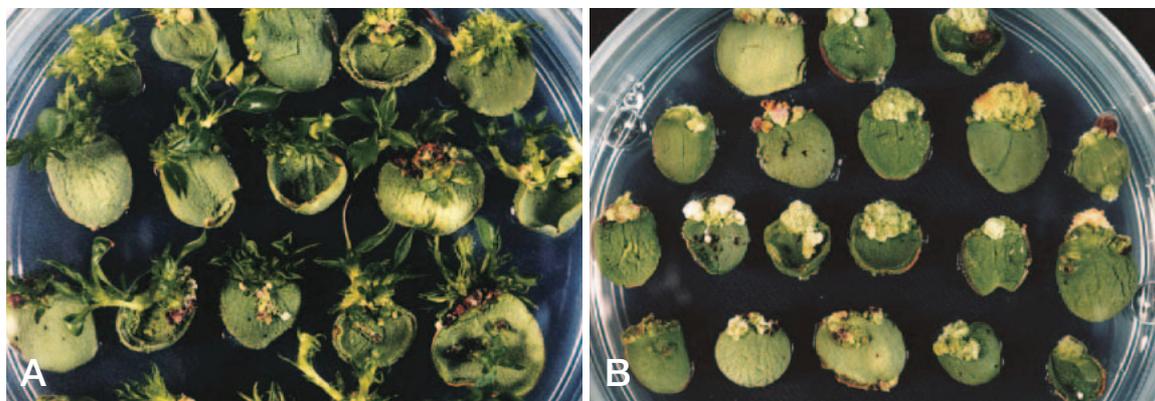


図28 子葉へのアグロバクテリウム野生株の感染状況

A: AKE10 が感染した子葉

B: PyTE 1 が感染した子葉

3. 子葉からの不定芽形成およびシュートの生育に及ぼす抗生物質の濃度と種類の影響

子葉をカナマイシン 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60mg/1 を添加した培地で培養したところ, 20 mg/1 で不定芽形成は完全に抑制され, 30mg/1 以上では黄化が著しかった (表22)。また, ハイグロマイシン 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5mg/1 を添加すると 5 mg で完全に不定芽形成は抑制され, すべての個体が褐変枯死した。また, シュートをカナマイシン 0, 10, 15, 20, 40mg/1 を添加した培地で培養すると40mg/1 ですべてのシュートの先端が黄化し, 81.1%が枯死した (表23)。以上の結果, 形質転換体の選抜は不定芽形成時にはカナマイシン20mg/1, シュート生育時にはカナマイシン40mg/1 以上が適当であると判断した。また, 培地へのクラフォラン500 mg/1 の添加は不定芽形成に影響を及ぼさなかった。

表22 子葉からの不定芽形成における抗生物質の濃度と種類の影響

抗生物質濃度 (mg/1)		供試 切片数	不定芽形成 切片率 (%)	平均 不定芽数	黄化程度*	褐変枯死率 (%)
カナマイシン	ハイグロマイシン					
0	0	10	70.0	2.9	—	0
5	0	10	40.0	1.2	+	0
10	0	10	40.0	0.6	+	0
20	0	10	0	0	+	0
30	0	10	0	0	++	0
40	0	10	0	0	+++	0
60	0	10	0	0	+++	0
0	2.5	20	25.0	0.4	—	70
0	5.0	20	0	0	—	100
0	7.5	20	0	0	—	100
0	10.0	20	0	0	—	100
0	12.5	20	0	0	—	100

* : — (無) ~ +++ (甚)

表23 シュート伸長における抗生物質濃度の影響

カナマイシン濃度 (mg/1)	供試 シュート数	シュート先端 黄化率 (%)	枯死率 (%)
0	17	0	0
10	18	0	0
15	17	11.8	0
20	20	40.0	10.0
40	16	100.0	81.1

考 察

アグロバクテリウムによる形質転換を行うには、植物組織からの効率的な再分化系が必要である。ナシでは植物組織からの再分化系としてニホンナシ栽培品種の培養シュートの葉片からの不定芽形成系(デイビットレーンら 1989), ニホンナシ栽培品種の子葉からの不定芽形成系(判野ら 1989)が報告されていたが、マンシュウマメナシ組織からの再分化系は開発されていなかった。そこで著者は、形質転換に用いる再分化系を選択するため、マンシュウマメナシの茎頂培養により得られたシュートの葉片培養、子葉および胚軸の培養を試みた。そのうち、葉片は不定芽形成率が非常に低く、胚軸は切り口が褐変して不定芽形成はまったく認められなかった。一方、子葉は旺盛な不定芽形成が認められた。子葉は実生の組織であり、遺伝的にはヘテロで親とは異なる形質を持つ。そのため、栽培品種では形質転換に実生組織を材料として用いることはできない。しかし、現在、ナシ栽培においては、台木は実生台木が用いられている。そのため、実生組織に有用遺伝子を導入し目的とする形質を発現する台木が得られ、その形質を固定しホモに持つ個体を育成すれば、台木として実用化できる可能性がある。そこで、高い不定芽形成能を持つ子葉を形質転換に用いることにした。

マンシュウマメナシ子葉からの不定芽形成に適する植物生長調節物質濃度は 5 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA であった。判野ら (1989) は、'二十世紀'、'幸水' および '豊水' において、子葉からの不定芽形成に適する植物生長調節物質の至適濃度は、BA 5 mg/l + NAA 0.1 ~ 0.5 mg/l であるとしており、本報告の結果とほぼ一致している。この条件において、子葉切片の切り口から多数の不定芽が形成されたことから、この培養系は形質転換体の作出に適した再分化系であると考えた。

本試験を開始した1994年当時、ナシの形質転換法の成功例はなく、ナシは形質転換が困難な樹種とされていた。しかし、我が国のナシ栽培では圃場において *A. tumefaciens* の感染樹が認められており、形質転換は可能であると考えられた。そこでまず、ナシ台木の形質転換に適する *A. tumefaciens* の菌株の選抜に着手した。Wabiko ら (1989) は秋田県に存在するリンゴ、ナシ、ポプラに生じたゴールを採取し、これから代表的な 5 菌株 (AKE10, PyTE 1, PyTS 3, PO22, PO31) を分離した。本報告においては、ナシ台木の形質転換に適する *A. tumefaciens* の菌株を選抜するため、この 5 菌株と強感染株であるいる C58C1 (pTiB 6 S 3) を用いて、マンシュウマメナシ子葉への感染を促した。その結果、AKE10のみ反応が異なっていた。すなわち、他の菌株はカルスを形成するのみであったのに対し、AKE10はカルス形成率が最も高いうえに、カルス形成と同時に不定芽も旺盛に形成した。Wabiko and Minemura (1996) は、AKE10の Ti プラスミド上にある 6b 遺伝子は、サイトカイニンあるいはオーキシン活性を調節する未知の働きを担うことを示唆している。さらに、Berres ら (1992) は pTiTm 4 の 6b 遺伝子は、ブドウにおいて形質転換効率を高めることを報告している。このように *A. tumefaciens* においては、6b 遺伝子が不定芽形成能などの形質転換体の獲得に好適な機能を持つ特異的な菌株が存在すると考えられる。以上のことから、マンシュウマメナシにおいては、AKE10は感染率が高く、感染処理を行った植物組織から不定芽を形成する形質転換に有効な菌株であると考えた。そこで、形質転

換系の開発には、AKE10にバイナリーベクターを導入した菌株を用いることにした。また、AKE10のゲノムDNAが形質転換に及ぼす影響を明らかにするため、C58株からプラスミドを除きAKE10のTiプラスミドであるpTiAKE10とバイナリーベクターを導入した菌株もあわせて形質転換系の開発に用いることにした。

本試験では形質転換体選抜のための抗生物質として、カナマイシンおよびハイグロマイシンを検討した。その感受性は抗生物質の種類により異なり、カナマイシンでは5 mg/1から子葉組織が黄化し始め、20mg/1で完全に不定芽形成が抑制された。一方、ハイグロマイシンでは5 mg/1ですべての切片が褐変枯死した。このように、ハイグロマイシンはナシ子葉に対し、低濃度でも非常に強いダメージを与えたことから、形質転換体の選抜にはハイグロマイシンよりもカナマイシンが適すると判断し、その濃度は不定芽形成を完全に抑制した20mg/1で選抜を試みることにした。

以上のことから、本節では形質転換に用いる植物材料の部位として子葉、再分化に適する植物生長調節物質の濃度として5 mg/1 BA+0.1mg/1 NAA、アグロバクテリウムとして秋田県で栽植されているリンゴから単離された野性株 AKE10、形質転換体の選抜、除菌に用いる抗生物質の濃度として20mg/1カナマイシン、500mg/1クラフォランが適当であることを明らかにでき、形質転換体を作成する上での基本条件を決定した。

第2節 国内産 *Agrobacterium tumefaciens* 野性株を用いた形質転換系の開発

試験方法

1. アグロバクテリウムの系統とベクター

形質転換にはバイナリーベクター pGA-GUS 1 を有する *A. tumefaciens* AKE 10 (Wabiko et al. 1989) または AKE10TC 1, バイナリーベクター pBI121 (Jefferson et al. 1987) または pTOK233 (Hiei et al. 1994) を有する *A. tumefaciens* LBA4404 (Hoekema et al. 1983) の4菌株を用いた。3つのプラスミドベクターのT-DNA領域の概略図は図29に示した。なお、AKE10TC 1はC58株からプラスミドを除きAKE10のTiプラスミドであるpTiAKE10を導入した菌株である。pGA-GUS 1とpBI121はT-DNA領域内にnosプロモーターに連結したNPTII遺伝子、CaMV35Sプロモーターに連結したGUS遺伝子を持つプラスミドで、カナマイシンによる形質転換体の選抜が可能である。pTOK233はT-DNA領域内にnosプロモーターに連結したNPTII遺伝子、CaMV35Sプロモーターに連結したイントロンを含むGUS遺伝子、CaMV35Sプロモーターに連結したhygromycin phosphotransferase (hpt)遺伝子を持ち、T-DNA領域の外側にvirB, virC, virG遺伝子を組み込んでvir遺伝子の発現誘導を強化し、通常はアグロバクテリウムに感染しないイネにも感染するように開発されたベクターであり、カナマイシンとハイグロマイシンによる形質転換体の選抜が可能である。

なお、pGA-GUS 1 を有する *A. tumefaciens* AKE 10 および AKE10TC 1 は秋田県立大学我彦広

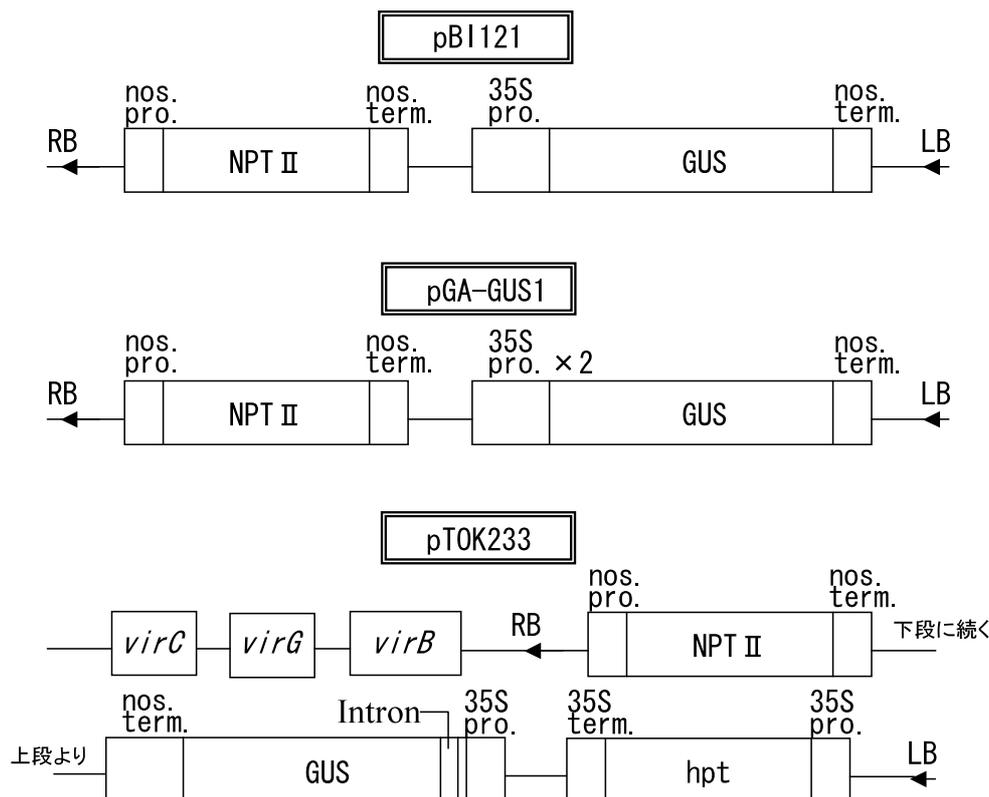


図29 形質転換に用いたプラスミド (pBI121, pGA-GUS 1, pTOK233)

RB : right border, LB : left border, 35 S pro. : CaMV 35 S promoter,
 35S term. : CaMV 35S terminator, nos. pro. : nopaline synthase gene promoter,
 nos. term. : nopaline synthase gene terminator, NPTII: neomycin phosphotransferase II
 gene, GUS : β -glucuronidase gene, hpt : hygromycin phosphotransferase gene,
virC, *virG*, *virB* : *Agrobacterium rhizogenes* virulence genes.

悦博士より, pTOK233を有する *A. tumefaciens* LBA 4404 は日本たばこ産業小鞠敏彦博士より分譲を受けた。

2. アグロバクテリウムの調製と胚軸外植片への接種

A. tumefaciens AKE10/pGA-GUS 1 および AKE10TC 1/pGA-GUS 1 は50mg/l カナマイシンを含む YEB 培地 (Sambrook et al, 1989) で, LBA4404/pBI121は50mg/l カナマイシン, 100mg/l ストレプトマイシン, 50mg/l リファンピシンを含む YEB 培地で, LBA4404/pTOK233は50mg/l ハイグロマイシンを含む YEB 培地で各々28℃で一昼夜振とう培養し, 増殖させた。これらの細菌培養液を1700×g で遠心分離して集菌し, 植物生長調節物質無添加の 1/2 濃度の MS 培地に懸濁した。再度, 1700×g で遠心分離して集菌し, 100 μ M のアセトシリンゴンを含む 1/2 濃度の MS 培地に懸濁し, 5 \times 10⁸個 cfu/ml となるように同培地で希釈調製し, 接種に用いた。子葉外植片への接種は, 調製したアグロバクテリウム溶液に子葉外植片を15分間浸漬することによって行った。接種後, 滅菌した濾紙上で余分な菌液を除去し, 100 μ M アセトシリンゴンを含む 1/2 濃度の MS 培地で3日間共存培養を行った。培養条件は25℃暗黒条件とした。

3. 形質転換体の選抜と植物体再生

共存培養後、形質転換体の選抜とアグロバクテリウムの除菌を行うため、20mg/l カナマイシン、500mg/l クラフォラン、5 mg/l BA+0.1mg/l NAA を含む 1/2 濃度の MS 培地に移植して培養した。培養条件は25℃、光条件16時間日長とした。3～4週間後、形成された不定芽を子葉から切り取り、同組成の培地に移植し培養を続けた。3～4週間後、生存した不定芽は50mg/l カナマイシン、500mg/l クラフォラン、0.5mg/l BA を含む 1/2 濃度の MS 培地に移植してシュートの伸長を促しながら形質転換体の選抜を行った。3～4週間間隔で2回程度選抜し、シュートが約10mm以上に伸びたものについて、50mg/l カナマイシンおよびNAA0.5mg/lを添加した1/2濃度のMS培地に置床して発根させた。順化は発根し完全植物体となった個体を、バーミキュライトに植える、あるいは10mm以上に伸びたシュートを、隔離温室で育苗中の2～3年生の台木に接ぎ木する方法により行った。

4. 組織化学的 GUS 染色による導入遺伝子の確認

再生した植物体から葉を採取し、Jefferson et al. (1987)の方法に従い、組織化学的 GUS 染色を行った。葉片を約100 μ lの50mM X-Gluc 溶液に浸漬し、37℃で一昼夜インキュベートした後、葉が青く染色されているか否かを肉眼または実体顕微鏡下で観察した。

5. PCR による導入遺伝子の確認

得られた再生植物の葉を、液体窒素中で粉砕し、SDS法(Honda and Hirai 1990)を用いてDNAを抽出した。GUS 遺伝子を検出するためのプライマーは、第2章、第1節に記載したGUS 遺伝子の1.1kbp断片を増幅するように設計したプライマーセットを用いた。6*b* 遺伝子を検出するためには、6*b* 遺伝子の540bp断片を増幅するように設計したプライマーセット(5'-AAATGACGGTTCCTACTTG-3', 5'-CCTCTTCCTCTTCCTCGTT-3')を用いた。PCR分析の反応液組成および反応条件は第2章、第1節に記載した方法で行った。

6. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

得られた再生植物の葉を、液体窒素中で粉砕し、ポリフェノールと多糖類を除去するために、5～10倍量の洗浄バッファー(100 mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid (HEPES, pH8.0), 0.1% polyvinylpyrrolidone, 2% 2-mercaptoethanol)に懸濁した後、14,000 \times g, 4℃で5分間遠心分離して沈殿とした。この洗浄処理を再度繰り返して得られた沈殿から、SDS法を用いて全DNAを抽出した。制限酵素処理はHindIIIで5 μ gのDNAを消化した。消化したDNAは0.8%アガロースゲルで電気泳動して分画した後、ナイロンメンブラン(GeneScreen Plus, NEN, Boston, Mass)に転写した。プローブには³²P- α -dCTPでラベルした274bpの*nptII* 遺伝子(Wabiko and Minemura 1996)を用い、メンブランは0.1 \times SSC, 0.5% SDS, 65℃で洗浄した。

結 果

1. 組織化学的 GUS 染色による導入遺伝子の確認

アグロバクテリウムを接種した外植片を不定芽形成選抜培地上で培養した。3～4週間後に外植片は白く変色したが、AKE10/pGA-GUS 1 と AKE10TC 1 /pGA-GUS 1 を接種した外植片の切断面からは緑色の不定芽が形成された(図30A)。この不定芽は外植片から切り離して同組成の培地で再度選抜した後、生存した不定芽をシュート伸長選抜培地に移植して生育するシュー

表24 アグロバクテリウムの違いと形質転換効率の関係

アグロバクテリウム /ベクター	供試 切片数	選抜培地での 生存 シュート数	生存 シュート率 (%)	生存シュートの形態		GUS(+) シュート が得られた 切片の率(%)
				正常	異常	
AKE10/pGA-GUS 1	321	3	0.9	3	0	0.9
AKE10TC 1 */pGA-GUS 1	404	10	2.5	9	1	2.5
LBA4404/pBI121	617	0	0	—	—	—
LBA4404/pTOK233	748	0	0	—	—	—

* : C58株から Ti プラスミドを除いた菌株に AKE10の Ti プラスミドを伝達した菌株

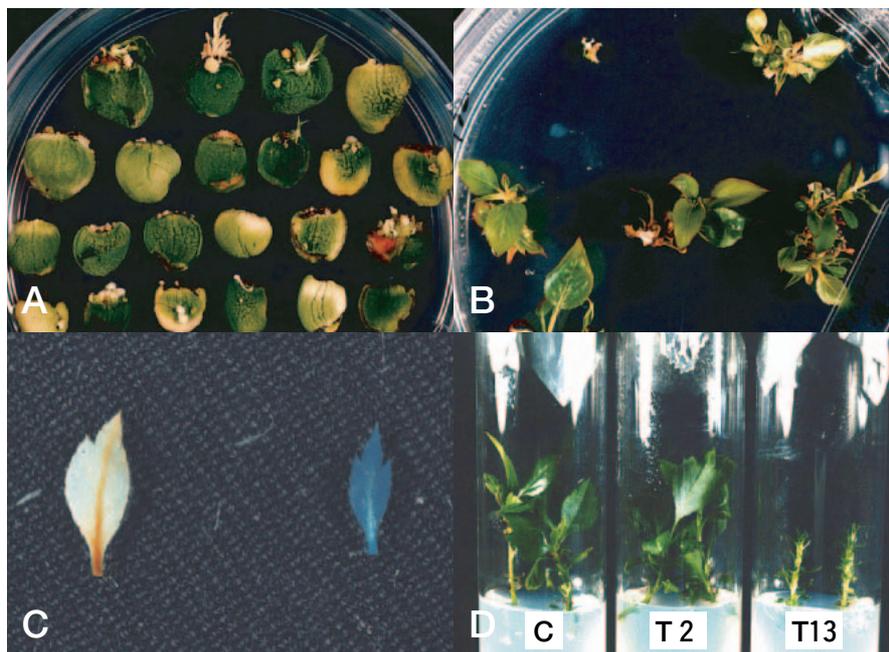


図30 AKE10TC 1 /pGA-GUS 1 による形質転換体の選抜状況

- A : 不定芽形成培地での初代選抜
- B : シュート形成培地での選抜
- C : 選抜個体での GUS 遺伝子の発現
左 ; 非形質転換体, 右 ; 形質転換体
- D : 発根培地での生育
C ; 非形質転換体, T 2 ; 正常形態の形質転換体,
T13 ; 異常形態の形質転換体

トを選抜した(図30B)。一方、不定芽形成は LBA4404/pBI121あるいは LBA4404/pTOK233を接種した場合、まったく認められなかった。また、接種を行っていない外植片からは不定芽は形成されなかった。選抜したシュートは葉を採取して組織化学的 GUS 染色を行ったところ、すべてのシュートが青く染色され GUS 遺伝子の発現が認められた(図30C)。また、非形質転換植物のシュートは全く染色されなかった。GUS (+)であったシュートの形態は、13個体中12個体が正常形態であり(図30D-T2), 1個体は葉が小さく展葉しない異常形態を示した(図30D-T13)。正常形態の GUS (+)のシュートは基部から切り取り、NAA0.5mg/l を添加した MS 培地に移植したところ、発根して完全な植物体に生育した。しかし、異常形態の形質転換体(T13)の GUS (+) のシュートはまったく発根しなかった。

形質転換効率 (GUS (+) のシュートが得られた子葉切片の率) は、AKE10/pGA-GUS 1 が 0.9%, AKE10TC 1 /pGA-GUS 1 が2.5%であり、LBA4404/pBI121と LBA4404/pTOK233ではまったく得られなかった(表24)。

2. PCR による導入遺伝子の確認

GUS 遺伝子および NPTII 遺伝子の導入を判定する目的で、AKE10/pGA-GUS 1 あるいは AKE10TC 1 /pGA-GUS 1 の接種によって得られた再分化シュート 6 個体について PCR 分析を

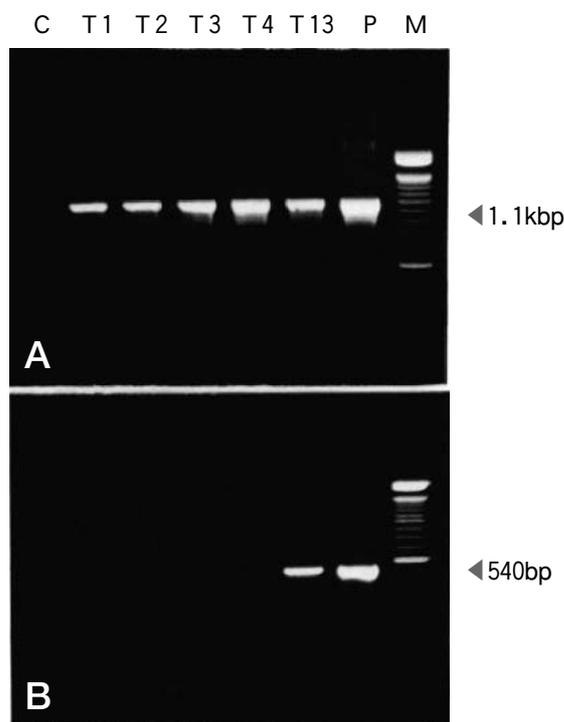


図31 PCR 分析による導入遺伝子の検出

A : GUS 遺伝子, B : AK-6*b* 遺伝子
 C : 非形質転換体, T 1-4 : 正常形態の形質転換体
 T 13 : 異常形態の形質転換体, P : プラスミド pGA-GUS 1
 M : DNA サイズマーカー, 100 bp ladder

行った。その結果、GUS(+)の5個体のシュートすべてで、1.1kbpのGUS遺伝子に相当するバンドが増幅され(図31A lanes T1~4, T13), GUS染色の結果と一致した。また、AKE10のTiプラスミド上の遺伝子である6*b*遺伝子の検出を行ったところ、正常形態の5個体(図31B lanes T1~4)では検出されず、異常形態の1個体(T13)でのみ検出された。非形質転換体のシュートではどちらのバンドも検出されなかった(図31A, B lane C)。シュートは0.5mg/1 BA, 50mg/1カナマイシンを添加した1/2濃度のMS培地で継代培養を行うと、正常形態と異常形態の形質転換体は、その形態は変化することなくいずれも旺盛に増殖した。正常形態の形質転換体は順化しP1レベルのガラス温室(17~30℃)で育苗したところ、非形質転換体と同様に生育した(図32)。

3. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

導入遺伝子が植物ゲノムに組み込まれていることを確認するために、2個体(T2, T3)についてサザンブロット分析を行った。順化後の植物体の葉から抽出したDNAをHindIIIで消化して検出した時、どちらの個体もハイブリダイズしたバンドが認められた。そのバンドサイズはT2では9.4kbの1本, T3では9.3kbpと5.2kbpの2本であった(図33 lanes T2, T3)。しかし、非形質転換体ではハイブリダイズするバンドは検出されなかった(図33 lane C)。



図32 形質転換体の閉鎖系温室での生育状況

C ; 非形質転換体, T2 ; 正常形態の形質転換体

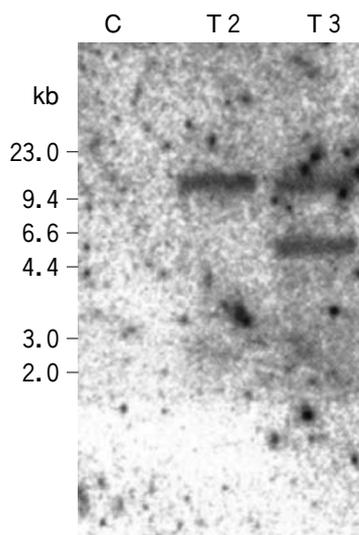


図33 サザンブロット分析による *npt* II 遺伝子の検出

C：非形質転換体，T2，T3：形質転換体
 プローブは³²P-α-dCTP でラベルした274bp の *npt* II 遺伝子

考 察

植物のアグロバクテリウム法による形質転換では、現在 LBA4404 系統が最も一般的に用いられている。しかし、植物の種類によっては LBA4404 では十分な感染が得られず、さらに高い感染力を持つ EHA101 系統 (Hood et al. 1986) 等の菌株、あるいは強感染性のバイナリーベクターが用いられている。本実験では、最も一般的に使用されているバイナリーベクター pBI121、またはスーパーバイナリーベクター pTOK233 を保持する LBA4404 系統を用いて実験を行った。しかし、マンシュウマメナシにおいては、LBA4404/pBI121、LBA4404/pTOK233 のどちらにおいても形質転換体は全く得られなかった。それに対しマンシュウマメナシにおいて、本章、第 1 節で高い腫瘍形成率と不定芽形成率を示した野生株 AKE10 にバイナリーベクターを導入し、形質転換に用いたところ形質転換体を得られた。また、C58 株のプラスミドを削除し、AKE10 の Ti プラスミドを導入した AKE10TC1 にバイナリーベクターを導入した菌株でも形質転換体を得られた。このことから、マンシュウマメナシの形質転換体を得られた要因は、AKE10 のゲノム DNA によるものではなく、AKE10 の Ti プラスミドが保有する遺伝子の働きによるものと考えられる。また、得られた形質転換体は非形質転換体と同様な正常形態の個体が 13 個体中 12 個体であった。この形質転換体の PCR 分析およびサザンハイブリダイゼーション分析により、正常形態の形質転換体は GUS 遺伝子あるいは NPT II 遺伝子が検出され、6*b* 遺伝子は検出されなかった。このことから、バイナリーベクター pGA-GUS1 の T-DNA が導入され、AKE10 の Ti プラスミド pTiAKE10 の T-DNA は導入されていない可能性が高いと考えられる。一方、異常形態の 1 個体は GUS 遺伝子、および 6*b* 遺伝子が検出されたことから、バイナリーベクター pGA-GUS1 と AKE10 の Ti プラスミド pTiAKE10 の T-DNA が、共に導入されたと考えられる。野生株の Ti プラスミドの T-DNA が植物のゲノムに組み込まれると、腫瘍形成等の形態変化が起

こるため、形質転換体を作成するには野生株の Ti プラスミドの T-DNA は導入されないことが望ましい。本報告第3章、第1節の *A. rhizogenes* 1724株を用いたバイナリーベクター法により得られたカラタチ形質転換体は、すべて野生株の Ti プラスミドの T-DNA とバイナリーベクターの T-DNA の両方が導入されていた。しかし、本節のマンシュウマメナシ形質転換体は、野生株の T-DNA が導入されず、目的とする遺伝子のみが導入できる確率が高い形質転換系であった。また、野生株の T-DNA が導入された形質転換体は、葉が短く展葉しない等の外部形態により識別することができ、有用遺伝子のみが導入された個体が容易に選抜できた。このように、マンシュウマメナシにおいて、野生株 AKE10の Ti プラスミドを持つ菌株にベクターを導入したアグロバクテリウムにより、目的の遺伝子のみが導入できる形質転換系を開発できた。この要因としては、AKE10の *vir* 遺伝子の活性の強さ、あるいは T-DNA 上のオーキシン合成遺伝子、サイトカイニン合成遺伝子、および *6b* 遺伝子の特異性等が考えられる。AKE10の Ti プラスミドの T-DNA 領域が導入された細胞は、それ自体は再分化しにくい、組み込まれた遺伝子の産物が周辺の細胞に作用し、バイナリーベクターのみの T-DNA 領域が導入された細胞からの不定芽形成を促進していることが想定される。また、AKE10の T-DNA は植物のゲノムに組み込まれなくても、一過的な発現により周辺の形質転換細胞の不定芽形成を促進する働きがあるのかもしれない。本報告でのマンシュウマメナシにおける形質転換の効率は0.9%あるいは2.5%であった。これは他の作物における、アグロバクテリウムによる形質転換法に比べ低い値である。今後は形質転換体の選抜法等の改善を行うことにより、形質転換率の向上を図る必要があると考える。

本形質転換法では、材料に子葉切片を用いているため、獲得した形質転換体は雑種由来のものとなってしまう、既存の品種に有用遺伝子を導入して得られた形質転換体をそのまま利用することはできない。しかし、ナシ台木育種の場面での利用が大いに期待される。ナシの台木については、耐湿性等の生理障害に強い台木や、紋羽病などの土壌病害に抵抗性の台木の開発が強く望まれており、今後、本形質転換法を利用することで、有用な台木品種を育成することができると考えられる。最後に、本試験において開発した、ナシのアグロバクテリウム法による形質転換の手順を図34に示した。本形質転換系では、貯蔵成熟種子の子葉をアグロバクテリウムの感染材料として用いているため、種子さえ貯蔵しておけば、ほぼ1年中形質転換実験を行うことが可能である。アグロバクテリウムは AKE10あるいは AKE10の Ti プラスミドを保有する菌株を用いて、菌密度を 5×10^8 cfu/ml に調製した細菌懸濁液に子葉外植片を約15分間浸漬した後、共存培養に供する。共存培養は、 $100 \mu\text{M}$ アセトシリンゴンを添加した 1/2 濃度の MS 培地を用い、 28°C 、暗黒条件で3日間行う。その後、 5 mg/l BA、 0.1 mg/l NAA、 20 mg/l カナマイシン、 500 mg/l クラフォランを含む 1/2 濃度の MS 培地で不定芽形成を促して形質転換体の選抜を行う。再生した不定芽は 50 mg/l カナマイシン、 500 mg/l クラフォラン、 0.5 mg/l BAを含む 1/2 濃度の MS 培地に移植しシュートの伸長、形質転換体の選抜を行う。伸長したシュートは基部から切り取り、 0.5 mg/l NAAを含む 1/2 濃度の MS 培地に移植して発根を促す。形質転換体の選抜から発根までの培養条件は 25°C 、16時間日長条件で行う。本形質転換法を用いることにより、5～6カ月後には形質転換体を得ることが出来る。

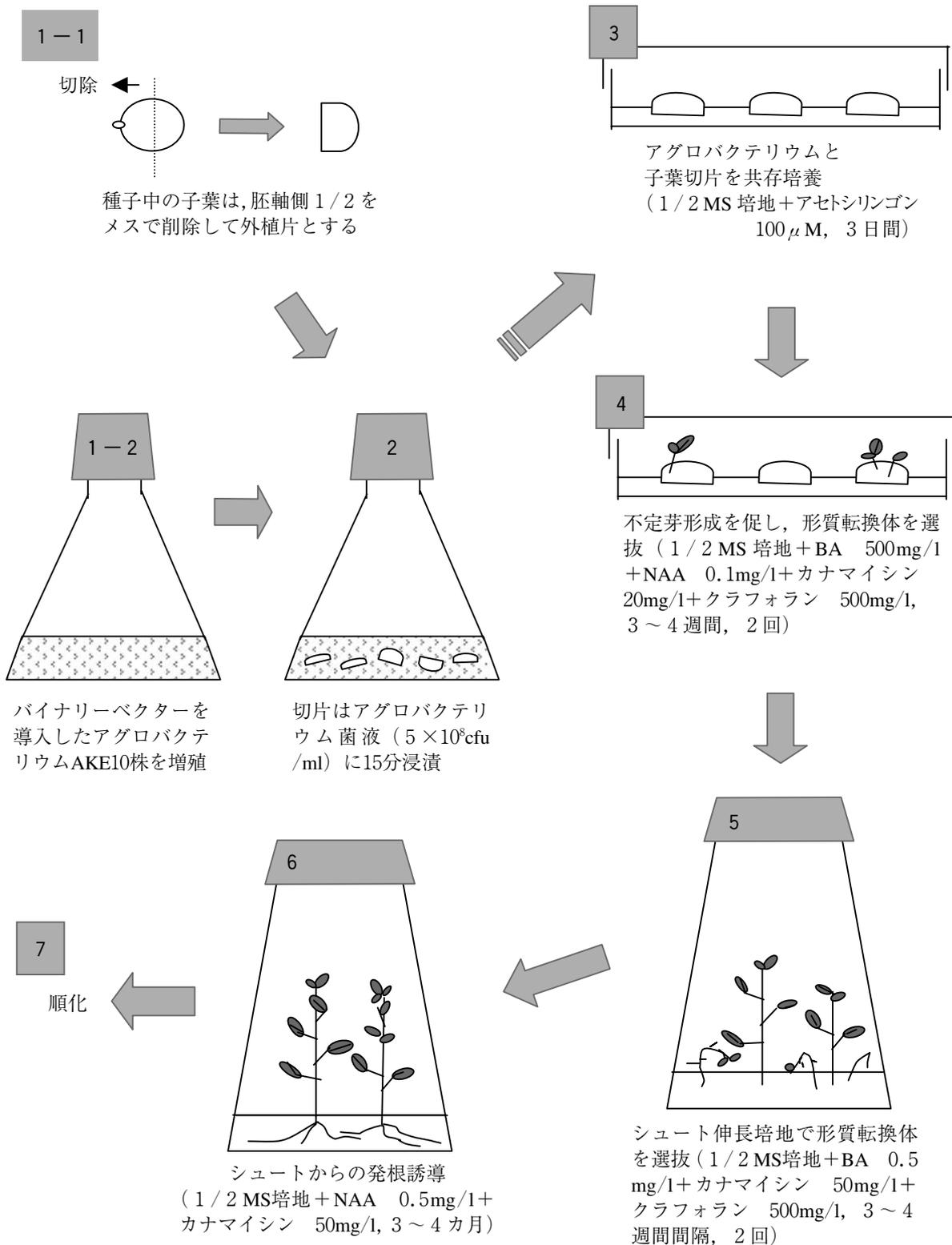


図34 マンシュウマメナシ子葉培養系を用いた形質転換体作出法フロー

第3節 要約

国内産の *Agrobacterium tumefaciens* 野性株の中から、マンシュウマメナシに感染力の強い菌株 AKE10を選抜した。AKE10には感染力が強だけでなく、形質転換に利用する際有利な点がもう一つあった。通常 *Agrobacterium tumefaciens* が感染した組織は腫瘍を形成するが、AKE10は不定芽を形成した。そのため、マンシュウマメナシの形質転換において、この菌株は感染組織からの不定芽形成を促進し、形質転換体を得られる可能性が高いと考えた。

そこで、この選抜株 AKE10にバイナリーベクター pGA-GUS 1を導入した菌株により、マンシュウマメナシの形質転換を試み、形質転換体を得ることに成功した。得られた形質転換体5個体のうち4個体はバイナリーベクターの T-DNA 領域が導入され、AKE10の T-DNA 領域は導入されていなかった。バイナリーベクターの T-DNA 領域のみが導入された形質転換体は、形態も非形質転換体と同様で正常であった。一方、AKE10とバイナリーベクターの両方の T-DNA 領域が導入された形質転換体は、葉が展葉しない、茎の分岐が多い等の異常形態を示し、肉眼で識別できた。このように、ナシ台木において国内産の *Agrobacterium tumefaciens* 野性株を用い、有用遺伝子だけを導入できる手法を確立した。

総合考察

本研究では、カンキツおよびナシの台木に適応できる形質転換法の開発を行い、その手法により有用遺伝子を導入して育種への活用を試みた。本章では、本研究で明らかになった点を総合的に考察し、その問題点と今後の展望を述べる。

果樹の育種において形質転換技術を活用するためには、形質転換に用いる植物組織からの効率的再分化系の開発、さらに、その再分化系を用いて多くの形質転換体を得ることのできる効率的な形質転換法の開発が必要である。しかし、果樹では植物組織からの再分化が困難なものが多く、このことが形質転換法を利用した分子育種が進展しない大きな原因となっている。一般に、組織培養は若い組織ほど再分化が容易であるが、果樹のような栄養繁殖性の永年作物、特に経済品種では誕生してから長い年月を経ているものが多く、成木の組織培養が困難な場合が多い。一方、実生組織は成木組織に比べて再分化能が高いが、遺伝的にヘテロであるため、親とは異なる形質となる。しかし、現在の果樹栽培はほとんどが実生台木で行われていることから、果樹の台木の改良においては、実生であっても有用な形質が付加され、その形質を固定すれば台木として活用できる可能性が高い。本研究で取り組んだカラタチ台木およびマンシュウマメナシ台木の組織培養においても、実生組織であるカラタチの胚軸およびマンシュウマメナシ子葉は高い再分化能を持つことが明らかになったため、これを材料に用いて形質転換技術の開発に取り組み、形質転換体の作出に成功した。しかし、ナシの実生台木は、その形質のばらつきが指摘されていることから、今後は優良系統が選抜され、選抜系統をさし木あるいは組織培養等によりクローン増殖した均一な台木が活用されることも想定される。そのような選抜系統の改良を行う場合には、成木組織を用いて遺伝子導入を行う技術開発も必要であると考えられる。

形質転換方法にはアグロバクテリウム菌を用いて間接的に遺伝子を導入する方法と、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール (PEG) 法、エレクトロポレーション法など遺伝子を直接細胞に導入する方法がある。このうちアグロバクテリウム法は、組織片からの再分化が可能で、*A. tumefaciens* に感染する植物であれば適用可能なため、植物の形質転換法として最も広く用いられており、果樹の形質転換においてもこの方法が広く用いられている。パーティクルガン法は、外来遺伝子を金属微粒子にコーティングし、植物の細胞や組織に打ち込んで導入する方法である。この方法は、細胞や組織から再分化が可能な植物であれば適用できるが、導入できる遺伝子の効率が低い。PEG 法、エレクトロポレーション法は、PEG 処理や電気的処理によりプロトプラストに直接遺伝子を導入させる方法であり、プロトプラストからの再分化系が確立されている必要があり、活用できる作物は限られている。

カンキツの珠心組織は体細胞であり、その組織由来の胚（珠心胚）あるいはカルスは親と同じ遺伝的形質を持ち、形質転換に好適な材料である。この珠心組織由来のカルスから胚様体の分化を促す培養系が開発され、珠心カルスを用いたプロトプラスト培養系も報告された (Vardi et al. 1982, Kobayashi et al. 1983)。カンキツは果樹の中では比較的早い時期に、このプロトプラスト培養系を用いて、PEG 法 (Kobayashi and Uchimiya 1989, Vardi et al. 1990)、エレクトロポ

レーション法 (Hidaka and Omura 1993) による形質転換系が開発された。さらに、珠心カルスを用いたアグロバクテリウム法による形質転換系も開発された (Hidaka et al. 1990)。しかし、珠心カルスが誘導でき、形質転換が可能な品種はトロビタオレンジ、ラフレモン等限られていた。一方、珠心胚実生の茎あるいは胚軸は高い再分化能を持つことが明らかになり (Burger 1981, Matsumoto and Yamaguchi 1983, Moore 1986)、茎あるいは胚軸組織の再分化系を用いた形質転換系が、近年多数報告されている (Bond and Roose 1998, Cervera et al. 1998a, 1998b, Gutierrez-E et al. 1997, Moore et al. 1992, Pena et al. 1995a, 1995b, 1997)。この手法は、珠心カルスの誘導が困難なカラタチ、ライム等の多胚性品種でも形質転換が可能で、形質転換効率も向上した。このようにカンキツでは分子生物学が進展した比較的早い時期から、再分化能のある細胞や組織の存在が明らかになり、プロトプラスト培養系も開発されたことから、いろいろな方法で形質転換が可能となった。多胚現象は、カンキツの再分化系開発およびそれを活用した様々な形質転換法が進展した大きな要因である。しかし、現在でも多胚性主要品種の中には、いずれの手法を用いても形質転換が不可能な品種もある。たとえば、我が国の主要品種であるウンシュウミカン、多胚性品種であり珠心カルスの誘導も可能であるが、未だに形質転換は困難である。また、珠心胚実生の胚軸培養においても、ウンシュウミカンは再分化率が非常に低く、未だ形質転換の成功例はない。ウンシュウミカン以外のマンダリンでは、Hidaka (1993) がポンカンにおいて珠心カルスを用いたアグロバクテリウム法により形質転換カルスが得られたことを報告しているが、他品種での報告例はなく、わが国の主要品種であるマンダリンは、再分化能が低く形質転換が困難な種類であると考えられる。また、単胚性品種は珠心カルスを誘導することはできず、実生は雑種となるため、実生組織は既存品種の改良には用いることができない。そのため成木組織を用いた形質転換系を開発する必要があるが、単胚性品種においては未だ成功例はない。カンキツの形質転換においては、このような品種間差異を打開し、幅広い品種で効率的な形質転換系を開発することが、今後の課題であると考えられる。

著者はわい性台木の育成を最終目標とし、我が国の主要台木であるカラタチの形質転換系の開発をめざした。カラタチでは珠心カルスの誘導は困難であったため、実生の胚軸を用いた培養系を開発し、この系を用いたアグロバクテリウム法による形質転換を試みた。開発した形質転換法は形質転換効率が高く、手法が簡便であり、形質転換体が得られるまでの期間が短く、珠心胚実生の胚軸を材料としていることから導入遺伝子以外の形質は変わらず、得られた形質転換体は珠心胚実生によりクローン増殖ができるといった利点があるため、現在、カラタチへの様々な有用遺伝子導入に活用されている (Kobayashi et al. 1996, 岩波ら 2000, 草場・Jackson 2001)。今後さらに詳細な形質転換体の特性調査、遺伝子組換え体の安全性調査が実施され、実用化へと進展することが期待される。また近年、ゲノム解析の急速な進展に伴い、カンキツ果実で発現している遺伝子の解析が行われ、現在、約7000クロンの cDNA について、その塩基配列が解読され、そのうち約半数は相同性解析の結果から機能が推定されている (藤井ら 2002)。これらの EST は遺伝子構造、遺伝子発現パターン、遺伝子地図への座乗、形質転換による機能解析等に用いられている。この遺伝子解析においてもカラタチの形質転換法は活用され、香気性成分であるモノテルペン合成酵素遺伝子 (島田ら 2002) や花芽形成関連遺伝子 (遠藤

2002) をカラタチに導入した形質転換体を用いて遺伝子の機能解明が行われている。今後、さらにゲノム研究が進展する中で、カラタチで開発したような効率の良い形質転換法は、遺伝子機能の解析のため重要な技術であると考えられる。

果樹栽培において樹体のわい化は、省力化、安全性、快適性といった面から非常に重要な課題であり、形質転換法を用いた樹形改良の試みは、多くの樹種でなされている。形質転換法による果樹のわい化については、リンゴにおいて最も多くの報告がある。*A. rhizogenes* を用いて *rol* 遺伝子をマルバカイドウ、M9, M26, M27に導入(増田ら1989, Lambert and Teofer 1992, 山下ら 1996), *A. rhizogenes* 由来の *rolA* 遺伝子を M26に導入(Holefors et al. 1998), アラビドプシス由来の phytochrome B 遺伝子を M26に導入(Holefors et al. 2000) および *A. rhizogenes* 由来の *rolC* 遺伝子をマルバカイドウに導入(齊藤ら 2001)した形質転換体のわい化が報告されている。ナシでは *rolC* 遺伝子を導入し、わい化した形質転換体が得られている(Bell et al. 1999, Scorza et al. 1998)。カキにおいても *rolC* 遺伝子の導入により、わい化した形質転換体を得られている(Koshita et al. 2002)。キウイフルーツでは *rolA*, *rolB*, *rolC* 遺伝子を同時に導入した結果、得られた形質転換体はわい化などいわゆる hairy root syndrome を示した(Rugini et al. 1991)。また、イネのホメオボックス遺伝子(OSH1)を導入したキウイフルーツも、わい化することが報告されている(Kusaba et al. 1999)。カンキツでは *rolC* 遺伝子をカラタチ、ラフレモン、福原オレンジに導入(國賀ら 2000), またリンゴの *gal* (GA-insensitive) 遺伝子をカラタチに導入した結果(草場・Jackson 2001), いずれもわい化した形質転換体を得られている。このように果樹においては、多くの樹種で各種の遺伝子を導入することにより、わい化効果が確認されている。本研究においては、カラタチに *rolC* 遺伝子を導入し、わい化した形質転換体を得た。形質転換体は個体によりわい化度が異なり、同じ遺伝子を導入しても植物ゲノムへの導入部位、導入遺伝子の数、および外来遺伝子の発現を調節するプロモーターの種類等により、導入遺伝子の発現程度が異なるものと考えられた。このように本研究では *rolC* 遺伝子を導入することにより、さまざまなわい化度を有するカラタチが得られることを明らかにした。品種の多様化が進む中、各品種に適合した樹勢調節が可能な台木が求められているが、そのような台木育成の手法として、形質転換法は有効な技術であることを示すことができた。近年、遺伝子の解析技術は急速に発展しており、新たなわい化遺伝子の単離や、種々のプロモーターの開発などが進み、形質転換法によるわい化植物の育成が進展するものと考えられる。

わい化植物の作出は果樹のような接ぎ木繁殖作物では、穂木品種にわい化遺伝子を導入する方法と、台木品種に導入する方法がある。穂木品種に導入した場合は、直接的な効果が期待できるが、目的とする品種ごとに遺伝子を導入する必要がある。一方、現在の果樹栽培ではほとんどの樹種で穂木品種は多様であっても、同じ種類の台木を用いて栽培される場合が多い。そのため、台木に遺伝子を導入することにより、複数の品種で適用できる汎用的な形質転換台木となる可能性がある。わい化遺伝子を導入した形質転換体を台木として用いた試験は、果樹ではリンゴで実施されており、*rolA* 遺伝子を M26に導入した形質転換台木によって穂木品種がわい化することが報告された(Zhu and Welander 1999)。また、判野ら(1997)は *A. rhizogenes* 野生株によりマルバカイドウの形質転換体を作成し、これに‘ふじ’を接ぎ木したところ、非

形質転換体を台木とした苗木に比べ、生育量が少なくなったことを報告している。本研究でも *A. rhizogenes* 1724株によるカラタチ形質転換体を中間台木として25cm 挿入し「青島温州」を接ぎ木したところ、その苗木はヒリュウを中間台木とした場合よりも強いわい化度を示した。このように *rol* 遺伝子群の一部あるいはすべてが導入されたわい性な形質転換体を台木あるいは中間台木とした時、穂木品種の生育に影響を及ぼすことが明らかになってきた。現在わい性台木として活用されているヒリュウは、苗木の初期生育はカラタチ台木と大差がないが、結実を始めるとほとんど樹冠が拡大しないことが知られており(小林ら 1994)、わい性台木の特性評価には長期間の栽培試験が必要である。今後は形質転換体を台木あるいは中間台木とした樹体の生育特性、果実品質等を調査し、その実用性を評価する必要がある。

果樹の台木において、その多くは実生で繁殖されているため遺伝的にヘテロであり、均一な台木育成のため、さし木繁殖可能な台木が求められている。外来遺伝子導入法による発根性の改善は、*A. rhizogenes* を用いて得られたマルバカイドウ、M9、M26、M27の形質転換体(Lambert and Teofer 1992, 増田ら 1989, 山下ら 1996)、*rolB* 遺伝子を導入したM26 (Holefors et al. 1998)で認められている。本研究においてもカラタチに *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体と、*A. rhizogenes* を用いて得られた形質転換体のいずれにおいても発根性の改善が認められた。このように、*rol* 遺伝子の導入は果樹においてもさし木発根能を高めることができると考えられるが、今後は根系の発達や根の機能等、形質転換台木が樹体の生育および果実生産に及ぼす影響を調査する必要がある。

形質転換技術を実際の育種に活用するためには、導入した遺伝子が安定して機能し、後代に安定して遺伝することが必要である。本研究で研究対象としたカラタチは多胚性品種であり、その珠心胚実生は親と同じ遺伝形質を持つ。本研究では、*rolC* 遺伝子を導入したカラタチ形質転換体が開花、結実して得られた種子を播種した実生において、導入した *rolC* 遺伝子は安定して保持されており、節間が短くわい化する形質も保持されていることを明らかにした。一方、タバコ属植物 (Balandin and Castresana 1997, Elmayan and Vaucheret 1996, Kunz et al. 1996) やトレンニア (間 1997) において、形質転換体が成長する過程で、GUS 遺伝子の発現が不活化する現象が報告されている。遺伝子発現の不活化はいくつかの異なったメカニズムにより起こり、どの植物でも起こりうる現象であることがわかってきた (Matzke and Matzke 1995, Meyer and Saedler 1996, Stam et al. 1997)。形質転換により有用遺伝子を導入、発現させる場合において、遺伝子発現の不活化は非常に不都合な現象である。特に果樹等の永年性作物では長期にわたり安定して発現することが必要であり、実際の育種の場面では、外来遺伝子の発現が不活化しない系統を選抜するなどの対策が必要である。

アグロバクテリウムを用いて遺伝子導入を行う際、アグロバクテリウムの種類によって形質転換効率に差が認められるため、それぞれの作物に適したアグロバクテリウム系統を用いる必要がある。現在、植物の形質転換には、LBA4404系統が最も一般的に用いられ、果樹においても、リンゴ、キウイフルーツ、ブドウなどで形質転換体が作出されている。第1章で述べたようにカラタチの形質転換においては、LBA4404系統を用いて高い効率で形質転換体を得られた。しかし、作物によってはLBA4404系統では十分な感染が得られず、さらに感染力の強いEHA

101系統 (Hood et al. 1986), EHA105系統 (Hood et al. 1993), C58 (pGV3850) 系統 (Zambryshi et al. 1983) などが用いられ, 形質転換体の作出が行われている。果樹でもカキ (Nakamura et al. 1998), カンキツ (Bond and Roose 1998) において, LBA4404系統では形質転換体を得られず, EHA101系統により形質転換体を得られたことが報告されている。また, アグロバクテリウムの感染が困難とされていた単子葉植物にも感染し, 形質転換体を得られるスーパーバイナリーベクターが開発されている (Hiei et al. 1994)。第4章においては, マンシュウマメナシの形質転換系を開発するため, LBA4404系統に pBI121あるいはスーパーバイナリーベクター pTOK233を導入した菌株により遺伝子の導入を試みましたが, 形質転換体を得ることができなかった。そこで日本産のアグロバクテリウム野性株から, マンシュウマメナシの子葉組織への感染において, 腫瘍形成率が高く, 不定芽を形成する AKE10を選抜した。この AKE10にバイナリーベクターを導入した菌株により, マンシュウマメナシの形質転換体を得ることができた。このように作物種に適したアグロバクテリウムの選定は, 形質転換法の開発において重要な要因である。AKE10は感染率が高く不定芽形成を促進する菌株であることから, ナシ以外でも形質転換が困難な作物, あるいは形質転換効率の低い作物において, 形質転換法の改善に活用できると考える。

ナシでは, これまでにセイヨウナシの葉片からの不定芽形成系を利用してアグロバクテリウム法により形質転換体の作出に成功している (Bell et al. 1999, 松田ら 2000, Merkulov et al. 1998, Mourgues et al. 1996, Mourgues and Chevreau 1997, Scorza et al. 1998)。また, 同様の方法で, 高ら (2000) はマンシュウマメナシの形質転換体を得ている。本研究では, 子葉からの不定芽形成系を用いたアグロバクテリウム法により, マンシュウマメナシの形質転換体の作出に成功したが, セイヨウナシでも同様な方法で形質転換体を得られている (高ら 2000)。現在のところ, ナシで形質転換に成功しているのは, この2つの培養系を用いて行われたセイヨウナシとマンシュウマメナシに限られており, 我が国で栽培の多いニホンナシについての成功例はなく, 今後の技術開発が望まれる。現在, 我が国のニホンナシの栽培は, マンシュウマメナシあるいはニホンヤマナシを台木として行われている。このうち, 形質転換法が開発されたマンシュウマメナシでは, それを用いた台木の改良が進められており, 林ら (2000) はイネのキチナーゼ遺伝子を導入し, 白紋羽病への抵抗性が增强された形質転換体を得られたことを報告している。このように病害抵抗性など, 近縁の植物では遺伝資源の探索が困難であった形質について, 現在, さまざまな生物から種々の有用遺伝子が単離されている。今後, ナシ台木の育種においても交雑では育成が困難な形質の獲得に, 形質転換法が活用されていくものと考えられる。

これまで述べてきたように, 形質転換による果樹台木の改良には以下のような特性がある。一つには手法開発の面において, 果樹では, 成木組織よりも実生組織で再分化が比較的容易な場合が多いが, 実生組織はヘテロであるため食用品種では利用できない。しかし, 現在の経済栽培では台木に実生が使われており, 実生組織を用いた形質転換体も導入形質の固定を行えば台木として活用でき, 効率的な形質転換系が開発できる可能性が高い。また, 食用品種では品種ごとに遺伝子導入を行う必要があるが, 台木は多くの食用品種で同じ種類の台木が用いられている樹種が多い。そのため, 有用な形質転換台木は幅広い品種に活用できるという利点がある。さらに, 近年, 台木による穂木品種の形質制御の可能性が示されている。Palauqui ら (1997)

はセンス遺伝子を過剰発現させて転写後のサイレンシングを起こしている形質転換タバコを台木として、過剰発現はしているがサイレンシングは起こしていない形質転換タバコを接ぎ木したところ、穂木の導入遺伝子も台木と同様にサイレンシングが誘導されることを示した。また、Imlau ら (1999) は伴細胞で特異的に発現するプロモーターを使って蛍光タンパクをシロイソナズナとタバコで発現させた結果、伴細胞で合成された蛍光タンパクが原形質連絡を通じて移行し、師部組織に達することを観察した。このようにタンパク質や mRNA が細胞間を移動することが可能であれば、形質転換が困難な品種の形質転換台木による形質制御が期待できる。以上のように台木の形質転換法による形質改良は、手法開発の可能性、多くの食用品種への汎用性、あるいは組換え体自体を食べないという PA (パブリック アクセプタンス) の面からも、実用的な形質転換体が育成される可能性が高い課題であると考えられる。しかし、現在、遺伝子組換え体の環境への影響や食品としての安全性に対する懸念は社会問題化している。今後は環境や食品へのリスクが極小な技術の使用が開発理念として定着し、現在よりも安全性が一層配慮された組換え体が商品化されると予想される。果樹台木の遺伝子組換えにおいても、根のみで発現するプロモーターの使用、抗生物質耐性遺伝子等のマーカー遺伝子が残存しない形質転換技術の活用等、さらに安全性の高い組換え体作出のための技術開発が必須である。

現在、我が国における形質転換体の安全性評価は3段階からなっている。研究段階では科学技術庁の「組換え DNA 実験指針」に基づいて、遺伝子組換え体の実験は行われ、非形質転換体と形質転換体との特性比較が行われる。その後、農林水産省の「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、形質転換体を野外の隔離圃場に移し、環境に対する安全性評価が行われる。さらに、食品として利用する場合は、厚生省の「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」に基づき、食品としての安全性評価が行われる。果樹は食品として利用されるため、この3段階の調査が必要となる。果樹の台木については、遺伝子を導入した台木そのものは食用とはならない。しかし、近年、前述のようにタンパク質や mRNA が細胞間を輸送されて作用する例が多く報告されている。そのため形質転換体を台木とした時、導入遺伝子から発現する mRNA やタンパク質が、穂木品種に移行することが推定され、今後、形質転換体の安全性評価を詳細に行う必要がある。

また、果樹は長期にわたって圃場で栽培が行われるため、長期的な安全性評価が必要と考えられる。果樹での安全性評価の事例は未だ数少ないが、米国で育成されたウイルス抵抗性の組換え体パイヤが、我が国においても農作物としての安全性評価を終えた段階にある。国内で育成された果樹の遺伝子組換え体では、*rolC* 遺伝子を導入したリンゴの台木用系統が、閉鎖系での安全性評価を終え、開放系での安全性評価の段階に入った。現在、果樹台木においては有用な形質転換体の作出がなされており、これらの安全性評価が積極的に行われるものと期待される。安全性評価を終えた形質転換体は、果樹栽培に利用されると共に、育種素材としても台木用品種育成の中で活用されるであろう。また、ゲノム解析は果樹においても急速に進展しており、多くの遺伝子の塩基配列が解読されている。このような遺伝子の機能解析のためにも、形質転換技術は今後ますます重要な役割を担うものと考えられる。

引用文献

- Abdul-Kader, A. M., J. L. Norelli, H. S. Aldwinckle, D. W. Bauer and S. V. Beer. 1999. Evaluation of the hrpN gene for increase resistance to fire blight in transgenic apple. *Acta Hort.* 489 : 247-250.
- 間竜太郎. 1997. トレニアの形質転換系の確立と有用形質の改善. 筑波大学審査学位 (博士) 論文. p.43-70.
- Aldwinckle, H. S. and S. K. Brown. 1996. Transformation of Gala apple with litic protein genes. *Acta Hort.* 411 : 411.
- 荒木隆男・町田 裕・鈴木直治. 1963. ナシ白紋羽病の主に台木に及ぼす影響. 農技研病理科 研究中間報告. 16 : 64-66.
- Balandin, T. and C. Castresana. 1997. Silencing of a β -1,3-glucanase transgene is overcome during seed formation. *Plant Mol. Biol.* 34 : 125-137.
- Baribault, T. J., K. G. M. Skene, P. A. Cain and N. S. Scott. 1990. Transgenic grapevines : regeneration of shoots expressing β -glucuronidase. *J. Exp. Bot.* 41 (229) : 1045-1049.
- 判野 潔・前田英博・田辺賢二・林真二. 1989. ニホンナシ子葉からの不定芽形成. 園学雑58 別1 : 162-163.
- 判野 潔・山口勝久・藤澤紀子・濱渦泰範. 1997. *Agrobacterium rhizogenes* によって形質転換したリンゴの台木及び栽培品種の特性. 園学雑66別2 : 104-105.
- Bell, R. L., R. Scorza, C. Srinivasan and K. Wsbb. 1999. Transformation of 'Beurre Bosc' pear with the *rolC* gene. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124 : 570-574.
- Berres, R., L. Otten, B. Tinland, E. Malgarini-Clog and B. Walter. 1992. Transformation of vitis tissue by different strains of *Agrobacterium tumefaciens* containing the T-6b gene. *Plant Cell Reports* 11 : 192-195.
- Bitters W. P., D. A. Cole and C. D. McCarty. 1979. Fact about dwarf citrus trees. *Citrograph* 64 : 54-56.
- Bolar, J. P., S. K. Brown, J. L. Norelli and H. S. Aidwinckle. 1999. Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 55 : 31-38.
- Bolar, J. P., J. L. Norelli, K. Wong, C. K. Hayes, G. E. Harmen and H. S. Aldwinckle. 2000. Expression of endochitinase from *Trichoderma harziarturrL* in transgenic apple increase resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* 90 : 72-77.
- Bond, J. E. and M. L. Roose. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Report* 18 : 229-234.
- Borejsza-Wysocka, E. E., J. L. Norelli, E. E., H. S. Aldwinckle and K. Ko. 1999. Transformation of authentic M.26 apple rootstock for enhanced resistance to fire blight. *Acta Hort.* 489: 259-266.
- Brogie, K., I. Chet, M. Holliday, R. Cressman, P. Biddle, S. Knowlton, C. J. Mauvais and R.

- Brogliè. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254 : 1194-1197.
- Burger D. W. 1981. Regeneration of buds and roots from several citrus tissues. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1 : 161-163.
- Cameron, J. W. and R. K. Soost. 1986. C35 and C32 : Citrange Rootstocks for Citrus. *Hortscience* 21 : 157-158.
- Capone, I., L. Spano, M. Cardarelli, D. Bellincampi, A. Petit and P. Costantino. 1989. Introduction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol. Biol.* 13 : 43-52.
- Castle, W. S. 1987. Rootstocks for fruits crops : (ed.) R. C. Rom and R. F. Carlson. A. Wiley - Interscience Pub. : p361-399.
- Cervera, M., J.A. Pina, J. Juarez, L. Navarro and L. Pena. 1998a. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange : factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports* 18 : 271-278.
- Cervera, M., J. Juarez, A. Navarro, J. A. Pina, N. Duran-Vila, L. Navarro and L. Pena. 1998b. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Research* 7 : 51-59.
- Cheng, Y.-H., J.-S. Yang and S.-D. Yeh. 1996. Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with carborunbum. *Plant Cell Reports* 16 : 127-132.
- Cheng, J., W. Li, X. Meng, Y. Tian, and K. Mang. 1998. Detecting the resistance of transgenic *in vitro* apple plantlets to pests. *China Fruits* 4 : 21.
- Chevreau, E 1998. Apple and pear biotechnology at INRA angers. *Tree Biotechnology : Towards the millennium* (Notttingham Univ. Press) 87-93.
- Chevreau, E., F. Mourgues, J. P. Reynoird and M. N. Brisset. 1999. Gene transfer for fire blight resistance pear. *Acta Hort.* 489 : 297-300.
- Chilton, M. D., D. Tepfer, A. Petit, C. David, F. Casse-Delbart and J. Tempe 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. *Nature* 295 : 432-434.
- Colby, S. M., A. M. Juncosa and C. P. Meredith. 1991. Cellular differences in *Agrobacterium* susceptibility and regenerative capacity restrict the development of transgenic grapevines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116 : 356-361.
- Da Camara Machado, A., H. Katinger and M. Laimer da Camara Machado. 1994. Coat protein-mediated protection against plum pox virus in herbaceous model plants and transformation of apricot and plum. *Euphytica* 77 : 129-134.
- デイビット レーン・林 建樹・池谷祐幸. 1989. ニホンナシ栽培品種の培養系における不定芽形成. *園学雑.* 58 (別2) 60-61.
- Elmayan, T. and H. Vaucheret. 1996. Expression of single copies of a strongly expressed 35S

- transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J.* 9 : 787-797.
- 遠藤朋子・島田武彦・藤井浩・大村三男. 2002. カンキツ EST データベース内にみられる花芽形成関連遺伝子の抽出と解析. 農林交流センターシンポジウム「果樹バイテク・ゲノム研究会—今後の展望を考える—」. 講演要旨 p 7.
- Fitch, M. M. M., R. M. Manshardt, D. Gonsalves, J. L. Slightom and J. C. Sanford. 1992. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology* 10 : 1466-1472.
- Frost, H. B. 1926. Polyembryony, heterozygosity and chimeras in citrus. *Hilgardia* 1 : 365-402.
- 藤井 浩・島田武彦・遠藤朋子・大村三男. 2002. 「カンキツ EST データベース」の利用と今後の課題. 農林交流センターシンポジウム「果樹バイテク・ゲノム研究会—今後の展望を考える—」. 講演要旨 p59-60.
- 福田博之. 1995. 果樹台木の特性と利用. 農文協 : p71-74.
- 高(Gao)M・, 山村秀樹・松田成美・五十鈴川寛司・佐藤 茂・仲野秀秋. 2000. 子葉を用いた西洋ナシの遺伝子導入系の開発および ACC 酸化酵素遺伝子の導入. 園学雑. 69 (別 2) : 134.
- Gö 1 les, R., R. Moser, H. Katinger, M. Laimer da Camara Machado, A. da Camara Machado, V. Tsolova and A. Bouquet. 1997. Transformation of somatic embryos of *Vitis* sp. with different constructs containing nucleotide sequences from nepovirus coat protein genes. *Acta Hort.* 447 : 265-272.
- Gutierrez-E, M. A., D. Luth and G. A. Moore. 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 16 : 745-753.
- Hammerschlag, F. A. and A. C. Smigocki. 1998. Growth and in vitro propagation of peach plants transformed with the shooty mutant strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *HortScience* 33 : 897-899.
- Handa, T. 1992. Regeneration and characterization of prairie gentian (*Eustoma grandiflorum*) plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Tissue Culture Letters* 9 : 10-14.
- Handa, T. 1996. Transformation of Prairie Gentian (*Eustoma grandiflorum*) with *Agrobacterium rhizogenes* harboring β -Glucuronidase (GUS) and neomycin phosphotransferase II (NPTII) genes. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64 : 913-918.
- Hanke, V. , K. Doring, J. L. Norelli and H. S. Aldwinckle. 1999. Transformation of apple cultivars with T 4-lysozyme-gene to increase fire blight resistance. *Acta Hort.* 489 : 253-256
- Hanke, V., I. Hiller, G. Klotzsche, K.. Winkler, J. Egerer, J. L. Norelli, H. S. Aldwinckle and K. Richter. 2000. Transformation in apple for increased disease resistance. *Acta Hort.* 538 : 611-616.
- Harst, M. B.-A. Bornhoff, E. Zyprian and R. Topfer. 2000. Influence of culture technique and genotype on the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos (*Vitis*

- vinifera*) and their conversion to transgenic plants. *Vitis* 39 : 99-102.
- 林 幹夫・佐久間文雄・高津康正・西澤洋子・霞 正一・眞部 徹・日比忠明. 2000. イネ・キチナーゼ遺伝子導入による白紋羽病抵抗性ナシ台木の作出. 園学雑. 69 (別2) : 293.
- 林 真二・脇坂隼雄. 1956. 二十世紀梨の袖肌病に関する研究(第2報)水分不足と袖肌発生. 園学雑. 25 : 116-124.
- 林 真二・田辺賢二. 1991. くだものつくりの基礎. 鳥取県果実連. 150-164.
- Herrera-Estrella, L., A. Depicker, M. V. Montagu and J. Schell. 1983. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303 : 209-213.
- Hidaka, T., M. Omura, M. Ugaki, M. Tomiyama, A. Kato, M. Ohshima and F. Motoyoshi. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of Citrus spp. from suspension cells. *Japan J. Breed.* 40 : 199-207.
- Hidaka, T. and M. Omura. 1993. Transformation of Citrus protoplasts by Electroporation. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 62 : 371-376.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6 : 271-282.
- Hirai, M., I. Kozaki and I. Kajiura. 1986. The rate of spontaneous inbreeding of trifoliolate orange and some characteristics of the inbred seedlings. *Jpn. J. Breed.* 36 : 138-146.
- Hoekema, A., P.R. Hirsch, P.J.J. Hooykaas and R.A. Schilperoort. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303 : 179-180.
- Holefors, A., Z. Xue and M. Welander. 1998. Transformation of the apple rootstock M26 with the rolA gene and its influence on growth. *Plant Sci.* 136 : 69-78.
- Holefors, A., Z. Xue, L. Zhu, and M. Welander. 2000. The *Arabidopsis* phytochrome B gene influences growth of the apple rootstock M26. *Plant Cell Reports* 19 : 1049-1056.
- Honda, H. and A. Hirai. 1990. A simple and efficient method for identification of hybrids using nonradioactive rDNA as probe. *Japan J. Breed.* 40 : 339-348.
- Hood, E. E., G. L. Helmer, R. T. Fraley and M.-D. Chilton. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168 : 1291-1301.
- Hood, E. E., S. B. Gelvin, L. S. Melchers and A. Hoekema. 1993. New *Agrobacterium* Helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2 : 208-218.
- Hosoki, T. and T. Kigo. 1994. Transformation of Brussels Sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* Zenk) *Agrobacterium* rhizogenes harboring a reporter, β -glucuronidase gene. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63 : 589-592.
- Imlau, A., E. Truernit and N. Sauer. 1999. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant*

Cell 11 : 309-322

- Isogai, A., N. Fukuchi, M. Hayashi, H. Kamada, H. Harada and A. Suzuki. 1988. Structure of a new opine, mikimopine, in hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes*. Agric. Biol. Chem. 52 : 3235-3237.
- 岩波 徹・平林利郎・清水徳朗. 2000, 温州萎縮ウイルス抵抗性関連遺伝子のカンキツへの導入, 農林交流センターシンポジウム「果樹のゲノム研究—今後の展望を考える—」講演要旨 p.21-32.
- James, D. J., A. J. Passey, D. J. Barbara and M. Bevan. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. Plant Cell Reports 7 : 658-661.
- James, D. J., A. J. Passey, A. D. Webster, D. J. Barbara, A. M. Dandekar, S. L. Uratsu and P. Viss. 1993. Transgenic apples and strawberries : advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants. Acta Hort. 336 : 179-184.
- Janssen, B.-J. and R. C. Gardner. 1993. The use of transient GUS expression to develop an *Agrobacterium*-mediated gene transfer system for kiwifruit. Plant Cell Reports 13 : 28-31.
- Jefferson, R. A., S. M. Burgess and D. Hirsh. 1986. t-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83 : 8447-8451.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987. GUS fusions : t-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6 (13) : 3901-3907.
- Kamada, H., N. Okamura, M. Satake, H. Harada, and K. Shimomura. 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant Cell Reports 5 : 239-242.
- 神沢恒夫, 平賀正英. 1937. 葡萄フィロキセラ試験研究成績・第3回報告. 山梨県農事試験場.
- 河瀬憲次. 1988. 果樹のわい化栽培[11]カンキツのわい化栽培. 農耕および園芸63 : 657-662.
- 川俣恵利. 1978. 日本ナシの硬化障害に関する研究 (第1報) 二十世紀果実のユズ肌発生程度と成分含量との関係. 園学雑. 46 : 449-456.
- Kikkert, J. R., G. S. Ali, M. J. Striem, M.-H. Martens, P. G. Wallace, L. Molino and B. I. Reisch. 1997. Genetic engineering of grapevine (*Vitis* sp.) for enhancement of disease resistance. Acta Hort. 447 : 273-279.
- 清川繁人・菊池泰弘・鎌田 博・原田 宏. 1992. PCR法による Ri プラスミド *rolC* 遺伝子の検出と形質転換確認への応用. 植物組織培養. 9 : 94-98.
- 清川繁人. 1998. *Agrobacterium rhizogenes* 保持する *rol* 遺伝子の解析と園芸分野への利用. 千葉大学審査学位 (博士) 論文
- Ko, K., S. K. Brown, J. L. Norelli, E. E. Borejsza-Wysocka, H. S. Aldwinckle and K. Doring. 1999. Effect of multiple transgenes on resistance to fire blight of 'Galaxy' apple. Acta Hort. 489 : 257.
- Kobayashi, S., H. Uchimiya and I. Ikeda. 1983. Plant regeneration from 'Trovita orange protoplast. Japan J. Breed. 33 : 119-122.
- Kobayashi, S. and H. Uchimiya. 1989. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus*

- sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. Japan J. Genet. 64 : 91-97.
- Kobayashi, S., A. Sakai, T. Ohgawara and Y. Nakamura. 1994. Stable maintenance of an integrated gene in nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) under storage in LN₂. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63 : 553-558.
- Kobayashi, S., Y. Nakamura, J. Kaneyoshi, H. Higo and K. Higo. 1996. Transformation of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) with a synthetic gene encoding the human epidermal growth factor (hEGF). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64 : 763-769.
- Kobayashi, S., C. K. Ding, Y. Nakamura, I. Nakajima and R. Matsumoto. 2000. Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). Plant Cell Reports 19 : 904-910.
- 小林康志・牧田好高・鹿野英士. 1994. 矮性台木「ヒリュウ」がウンシュウミカンの生育及び果実品質に及ぼす影響. 果樹課題別研究会資料 : p81-84.
- Koshita, Y., Y. Nakamura, S. Kobayashi and K. Morinaga. 2002. Introduction of *rolC* gene into genome of the Japanese persimmon causes dwarfism. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 71 : 529-531.
- Korte, A.-M., E. Maib and R. Casper. 1994. *Agrobacterium*-mediated gene transfer as a tool for the induction of resistance against plum pox virus (PPV) in plum (*Prunus domestica* L.). Acta Hort. 359 : 164-168.
- Krastanova, S., M. Perrin, P. Barbier, G. Demangeat, P. Cornuet, N. Bardonnet, L. Otten, L. Pinck and B. Walter. 1995. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. Plant Cell Reports 14 : 550-554.
- Krastanova, S., K. S. Ling, H. Y. Zhu, B. Xue, T. Burr and D. Gonsalves. 1998. Development of transgenic grape rootstocks with genes from grapevine fanleaf virus and grapevine leafroll associated closteroviruses 2 and 3. Phytopathology 88 : S49 (supl).
- 國賀 武・吉岡美加乃・小林省藏・松本亮司. 2000. カンキツ台木及び穂木品種へのわい化遺伝子 *rolC* の導入. 園学雑. 69別2 : 292.
- Kunz, C., H. Schöb, M. Stam, J. M. Kooter and F. Meins Jr. 1996. Developmentally regulated silencing and reactivation of tobacco chitinase transgene expression. Plant J. 10 : 437-450.
- Kurioka Y., Y. Suzuki, H. Kamada and H. Harada. 1992. Promotion of flowering and morphological alterations in *Atropa belladonna* transformed with a CaMV35S-*rolC* chimeric gene of the Ri plasmid. Plant Cell Reports 12 : 1-6.
- Kusaba, S., Y. Kano-Murakami, M. Matsuoka, N. Matsuta, T. Sakamoto and M. Fukumoto. 1999. Expression of the rice homeobox gene, OSH 1, causes morphological changes in transgenic kiwifruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68 : 482-486.
- 草場新之助・Stephen Jackson. 2001. *gal* 遺伝子の導入によるわい性カラタチ作出の試み. 園学雑70別2 : 126.
- Laimer da Camara Machado, M., A. da Camara Machado, V. Hanzer, H. Weiss, F. Regner, H. Steinkellner, D. Mattanovich, R. Plail, E. Knapp, B. Kalthoff and H. Katinger. 1992.

- Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of Plum Pox Virus. *Plant Cell Reports* 11 : 25-29.
- Lambert, C. and D. Tepfer. 1992. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. *Theor. Appl. Genet.* 85 : 105-109.
- Le Gall, O. L. Torregrosa, Y. Danglot, T. Candresse and A. Bouquet. 1994. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV). *Plant Sci.* 102 : 161-170.
- Lichtenstein, C. and J. Draper. 1985. Genetic engineering of plants. In : Glover, D. M. (eds). DNA cloning vol. II. p. 67-120. IRL Press, Oxford, England.
- Maheswaran, G., M. Welander, J. F. Hutchinson, M. W. Graham and D. Richards. 1992. Transformation of apple rootstock M26 with *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Plant Physiol.* 139 : 560-568.
- Malnoy, M., E. Chevreau, and J. P. Reynold. 2000. Preliminary evaluation of new gene transfer strategies for resistance to fire blight in pear. *Acta Hort.* 538 : 635-638.
- 増田哲夫・小森貞男・別所英雄・土屋七郎. 1989. リンゴにおける *A. rhizogenes* によって形成された hairy root からの植物体再生. *育雑.* 39 (別1) : 114-115.
- 松川 裕・阿部 薫・吉田雅夫. 1985. モモのネコブセンチュウ抵抗性台木の特性について. *園学雑誌*52別1 : 52-53.
- Matsuki, R., H. Onodera, T. Yamauchi and H. Uchimiya. 1989. Tissue-specific expression of the rolC promoter of the Ri plasmid in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* 220 : 12-16.
- Matsumoto, K. and H. Yamaguchi. 1983. Induction of adventitious buds globular embryoids on seedlings of Trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*). *Jpn. J. Breed.*, 33 : 123-129.
- Matsuta, N., H. Iketani and T. Hayashi. 1993. Transformation in grape and kiwifruit. In : Hayashi, T., M. Omura and N. S. Scott. (eds). *Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees.* Fruit Tree Research Station, Japan p. 184-192.
- 松田長生・山本俊哉・池谷祐幸. 1999. アグロバクテリウムによるモモへの遺伝子導入. *園学雑誌.* 68 (別1) : 139.
- 松田成美・五十鈴川寛司・高品 善・広野直芳・仲野秀秋. 2000. セイヨウナシのアグロバクテリウム法による遺伝子導入. 農林交流センターシンポジウム「果樹ゲノム研究会—今後の展望を考える—」. 講演要旨 p23.
- Matzke, M. A. and A. J. Matzke. 1995. How and why do plants inactivate homologous (trans) genes? *Plant Physiol.* 107 : 679-685.
- Mauro, M. C., S. Toutain, B. Walter, L. Pinck, L. Otten, P. Coutos-Thévenot. A. Deloire and P. Barbier. 1995. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Sci.* 112 : 97-106.
- Merkulov, S. M., I. V. Bartish, S. V. Dolgov, T. P. Pasternak and A. McHugen. 1998. Genetic

- transformation of pear *Pyrus communis* L. mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Genetika* 34 : 373-378.
- Meyer, P. and H. Saedler. 1996. Homology-dependent gene silencing in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 : 23-48.
- Moore G.A. 1986. In vitro propagation of Citrus rootstocks. *HortScience*. 21 : 300-301.
- Moore G.A., C.C. Jacano, J.I. Neidigh, S.D. Lawrence and K. Cline. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of Citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 11 : 238-242
- Mourgues, F., E. Chevreau, C. Lambert and A. de Bondt. 1996. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Reports* 16 : 245-249.
- Mourgues, F. and E. Chevreau. 1997. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear. *Acta Hort.* 447 : 355-359.
- Mullins, M. G., F. C. A. Tang and D. Facciotti. 1990. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines : transgenic plants of *vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L.. *Bio/Technology* 8 : 1041-1045.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 : 473-497
- Nakamura, T., T. Handa, Y. Oono, K. Kanaya, M. Michikawa and H. Uchimiya. 1988. Organ-specific mRNA in transgenic tobacco plants possessing T-DNA of Ri plasmids. *Plant Sci.* 56 : 213-218.
- Nakamura, Y., S. Kobayashi and I. Nakajima. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration from hypocotyl segments of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *Plant. Cell Reports* 17 : 435-440.
- Nakamura, Y., H. Sawada, S. Kobayashi, I. Nakajima and M. Yoshikawa. 1999. Expression of soybean β -1, 3-endoglucanase cDNA and effect on disease tolerance in kiwifruit plants. *Plant Cell Reports* 18 : 527-532.
- Nakajima, I., S. Kobayashi and K. Notsuka. 1998. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine embryogenic calli and regeneration of plantlets integrating the stilbene synthase gene. *J. Exp. Bot.* 49 : 19-20 (supl).
- 中谷宗一・池田 勇・小林省蔵. 1980. 多胚性カンキツ品種の雑種獲得の効率化に関する研究 II ウンシュウミカンの胚数の系統間差異について. *果樹試報* E3 : 15 - 23.
- Nauer, E. M., C. N. Roistacher, and C. K. Labanauskas. 1968. Growing citrus in modified UC potting mixtures. *Citrograph* 53 : 456-461.
- 西澤洋子・阿久津克己・日比忠明. 1992. 植物溶菌酵素遺伝子による病害抵抗性作物の作出. *植物防疫*. 46 : 22 - 28.
- Norelli, J. L., H. S. Aldwinckle, L. Destefano-Beltran and J. M. Jaynes. 1994. Transgenic 'Malling 26' apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwitia amylovora*. *Euphytica*

77 : 123-128.

- Norelli, J. L., J. P. Bolar, G. E. Harmen and H. S. Aldwinckle. 2000. Transgenic apple plants expressing chitinases from *Trichoderma* have increased resistance to SCAB (*Venturia inaequalis*) *Acta Hortic.* 538 : 617-618.
- 奥代直巳・生山 巖・高原利雄. 1981. 多胚性カンキツ類における雑種実生獲得率の向上に関する研究. I 品種, 系統間の胚数及び雑種実生獲得率の差異について. 果樹試報 D 3 : 9-21.
- Oono, Y., T. Handa, K. Kanaya and H. Uchimiya. 1987. The TL-DNA gene of Ri plasmids responsible for dwarfness of tobacco plants. *Jpn. J. Genet.* 62 : 501-505.
- Ozdemir, Z., K. W. Wong and H. S. Aldwinckle. 1998. In vitro evaluation of endochitinase transgenic royal gala apple lines for resistance to apple scab. *Phytopathology.* 88: S136 (su pl.).
- Palauqui, J. C., T. Elamayan, J. M. Pollien and H. Vaucheret. 1997. Systemic acquired silencing : transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* 16 : 4738-4745.
- Pei, D., Y. Tian, Q. Liu, B. Wu, S. Xi and K. Mang. 1996. Improvement of excised leaf regeneration and obtaining Bt toxin gene transformed plants of apple cultivars. *J. Hebei Agri. Univ.* 19: 23-27.
- Pena, L., M. Cervera, J. Juarez, C. Ortega, J.A. Pina, N. Duran-Vila and L. Navarro. 1995a. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Sci.* 104 : 183-191.
- Pena, L., M. Cervera, J. Juarez, A. Navarro, J.A. Pina, N. Duran-Vila and L. Navarro. 1995b. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 14 : 616-619.
- Pena, L., M. Cervera, J. Juarez, A. Navarro, J.A. Pina and L. Navarro. 1997. Genetic Transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing) : factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports* 16 : 731-737.
- Ravelonandro, M., R. Renaud, G. Salesses and R. Scorza. 1998. Transgenic plums resistant to plum pox virus infection and preliminary results of cross-hybridization. *Acta Hortic.* 478 : 67-70.
- Reynold, J. P. , F. Mourgues, E. Chevreau, M. N. Brisset and H. S. Aidwinckle. 1999 a. Expression of SB-37 gene in transgenic pears enhanced resistance to fire blight. *Acta Hortic.* 489 : 243-244.
- Reynold, J. P., F. Mourgues, E. Chevreau and M. N. Brisset. 1999b. First evidence for differences in fire blight resistance among transgenic pear clones expressing attacin E gene. *Acta Hortic.* 489 : 245~246.
- Reynold, J. P., F. Mourgues, J. Norelli, H. S. Aidwinckle, M. N. Brisset and E. Chevreau. 1999c. First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the attacin E gene from *Hyalophora cecropia*. *Plant Sci.* 149 : 23-31.
- Rogers, S.O. and A. J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology.* 5 : 69-76.
- Roose, M. L. 1986. The potential for dwarfing rootstocks citrus. *Citrograph* 71. 225-229.

- Rugini, E., A. Pellegrineschi, M. Mencuccini and D. Mariotti. 1991. Increase of rooting ability in the woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes. *Plant Cell Reports* 10 : 291-295.
- Rugini, E., G. Caricato, M. Muganu, C. Taratufolo, M. Camilli and C. Cammilli. 1997. Genetic stability and agronomic evaluation of six-year-old transgenic kiwi plants for *rolABC* and *rolB* genes. *Acta Hort.* 447 : 609-610.
- 榊 英雄. 1994. カンキツ台木研究の成果. 平成5年度果樹課題別研究会資料. 103-106.
- 齊藤 彰・五十嵐恵・初山慶道・小笠原博幸・鈴木正彦. 2001. *rolC* 遺伝子を導入したリングゴ台木 (マルバカイドウ) の特性. 園学雑70別2 : 124.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sawada, H., H. Ieki and I Matsuda. 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 828-831.
- Schmulling, T., J. Schell and A. Spena. 1988. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J.* 7 : 2621-2629.
- Scorza, R., J. M. Cordts, D. W. Ramming and R. L. Emershad. 1995a. Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 14 : 589-592.
- Scorza, R., L. Levy, V. Damsteegt, L. M. Yepes, J. Cordts, A. Hadidi, J. Slightom and D. Gonsalves. 1995b. Transformation of plum with the papaya ringspot virus coat protein gene and reaction of transgenic plants to plum pox virus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 12 : 943-952.
- Scorza, R., R. L. Bell, C. Srinivasan and K. Webb. 1998. Transformation of Bosc' pear (*Pyrus communis* L.) with the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes* and characterization of transgenic plants. *HortScience* 33 : 461 (Supl).
- 島田武彦・遠藤朋子・藤井 浩・上田高則・大村三男. 2002. モノテルペン合成酵素遺伝子によるカラタチ香気性成分の改変について. 農林交流センターシンポジウム「果樹バイオテク・ゲノム研究会—今後の展望を考える—」. 講演要旨 p16.
- 清水徳朗. 1998, カラタチの光化学系 I アンチセンス組換え体, 園学雑誌67別2 : 105
- 塩見敏樹・白川 隆・竹内昭士郎・大泉利勝・植松清次:1987. *Agrobacterium rhizogenes* biovar 1 によるメロン毛根病. 日植病報. 53 : 454-459.
- Slightom, J.L., M. Durand-Tardif, L. Jouanin and D. Tepfer. 1986. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. *J. Biol. Chem.* 261 : 108-121.
- Soejima, J., H. Bessho, S. Komori and S. Tuchiya. 1997. New apple rootstocks, ARM 1, ARM 7 and ARM8. *Abstr. EUCARPIA Sympo. Fruit Breed. & Genetics* 8. 9.
- Spena, A., T. Schmulling, C. Koncz and J. S. Schell. 1987. Independent and synergistic activity of *rol* A, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO. J.* 13 : 3891-3900.
- Spielmann, A., S. Krastanova, V. Douet-Orhant and P. Gugerli. 2000. Analysis of transgenic

- grapevine (*Vitis rupestris*) and *Nicotiana benthamiana* plants expressing an *Arabidopsis mosaic virus* coat protein gene. *Plant Sci.* 156 : 235-244.
- Stam, M., J. N. M. Mol and J. M. Kooter. 1997. The silence of genes in transgenic plants. *Anal. Bot.* 79 : 3-12.
- Sugaya, S., K. Hayakawa, K. Handa and H. Uchimiya. 1989. Cell-specific expression of the *rolC* gene of the TL-DNA of Ri plasmid in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* 30 : 649-653.
- 高原利雄・緒方達志・河瀬憲次・岩垣 功・松村 昇・小野祐幸・吉永勝一・廣瀬和榮・山田 彬・高辻豊二・内田 誠. 1994. 大谷伊予柑の生育と果実品質に及ぼす各種台木の影響. *果樹試報.* 26 : 39-60.
- Tanaka, N. and T. Matsumoto. 1993. Regenerants producing high amount of 20-hydroxyecdysone obtained from *Ajuga hairy* roots. *Plant Cell Reports* 13 : 87-90.
- 田中伸和. 1990. 濾紙電気泳動法によるオパインの検出法. *植物組織培養.* 7(1) : 45 - 47.
- Tao, R., T. Handa, M. Tamura and A. Sugiura. 1994. Genetic transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.) by *Agrobacterium rhizogenes* wild type strain A4. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63 : 283-289.
- Tao, R., A. M. Dandekar, S. L. Uratsu, P. V. Vail and J. S. Tebbets. 1997. Engineering genetic resistance against insects in Japanese persimmon using *cryIA (C)* gene of *Bacillus thuringiensis*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122 : 764-771.
- Taylor, B. H., F. F. White, E. W. Nester and M. P. Gordon. 1985. Transcription of *Agrobacterium rhizogenes* A 4 T-DNA. *Mol. Gen. Genet.* 201 : 546-553.
- Tennant, P. F., C. Gonsalves, K.-S. Ling, M. Fitch, R. Manshardt, J. L. Slightom and D. Gonsalves. 1994. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathology* 84 : 1359-1366.
- Toyoda H., Y. Hosoi, A. Yamamoto, T. Nishiguchi, K. Maeda, T. Takebayashi, T. Shiomi and S. Ouchi : 1991. Transformation of Melon (*Cucumis melo* L.) with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Tissue Culture Letters* 8 : 21-27.
- Uchimiya, H., T. Handa and D. S. Brar. 1989. Transgenic plants. *J. Biotechnol.* 12 : 1-20.
- Uematsu, C., M. Murase, H. Ichikawa and J. Imamura. 1991. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of kiwi fruit. *Plant Cell Reports* 10 : 286-290.
- Vardi, A., P. Spiegel-Roy and E. Galun. 1982. Plant regeneration from citrus protoplast : Variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor Appl Genet* 62 : 171-176.
- Vardi, A., S. Bleichman and D. Aviv. 1990. Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. *Plant Sci.* 69 : 199-206
- Vervliet, G., M. Holsters, H. Teuchy, M. Van Montagu and J. Schell. 1975. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *J. Gen. Virol.* 26 : 33-48.

- Wabiko, H., M. Kagaya, I. Komada, K. Matsuda, Y. Kodama, H. Yamamoto, Y. Shibano and H. Sano. 1989. Isolation and characterization of diverse nopaline type Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* from Japan. Arch. Microbiol. 152 : 119-124.
- Wabiko, H. and M. Minemura. 1996. Exogenous phytohormone-independent growth and regeneration of tobacco plants transgenic for the *6b* gene of *Agrobacterium tumefaciens* AKE10. Plant Physiol. 112 : 939-951.
- Xue, B., K. Ling, C. L. Reid, S. Krastanova, M. Sekiya, E. A. Momol, S. Sule, J. Mozsar, D. Gonsalves and T. J. Burr. 1999. Transformation of five grape rootstocks with plant virus genes and a *virE2* gene from *Agrobacterium tumefaciens*. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant 35 : 226-231.
- 八木岡武・秋濱友也1996. *Agrobacterium rhizogenes* MAFF03-01724株によるサクラの形質転換. 園学雑65別2 : 76-77.
- 山田員人・松本俊一・春木和久. 1987. カキ種子内胚軸部からの不定芽形成. 園学雑誌64 (別2) : 154 - 155.
- Yamakawa Y. and L.-H. Chen : 1996. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) by direct formation of adventitious buds. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64 : 741-747.
- Yamamoto, T. , H. Iketani, H. Ieki, Y. Nishizawa, K. Notsuka, T. Hibi, T. Hayashi and N. Matsuta. 2000. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. Plant Cell Reports 19 : 639-646.
- 山西久夫・木原 宏・吉田雅夫. 1985. モモ台木のネコブセンチュウ (*Meloidogyne mali*) 抵抗性について. 園学雑誌52別1 : 54-55.
- 山下裕之・増田哲男・羽生田忠敬. 1996. *Agrobacterium rhizogenes* リンゴ台木からの毛状根形成とその再分化個体の特性. 園学雑. 65(別1) : 80-81.
- Yao, J., D. Cohen, R. Atkinson, K. Richardson and B. Morris. 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. Plant Cell Reports 14 : 407-412.
- Yazawa, M., C. Suginuma, K. Ichikawa, H. Kamada and T. Akihama : 1995. Regeneration of transgenic plants from hairy root of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) induced by *Agrobacterium rhizogenes*. Breeding Sci. 45 : 241-244.
- 吉田雅夫・清家金嗣. 1981. ネコブセンチュウ抵抗性台木の育成 (第2報) 交雑による抵抗性台木の育種. 果樹試報 A 8 : 31-44.
- Yoshikawa, M., M. Tsuda and Y. Takeuchi. 1993. Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, from soybean. Naturwissenschaften 80 : 417-420.
- 湯浅哲信. 1997. 主幹形整枝とヒリュウ中間台によるウンシュウミカンの新栽培システム. 果樹種苗67 : 9-14.
- Zambryshi, P., H. Joos, C. Genetello, J. Leemans, M. Van Montagu and J. Schell. 1983. Ti plasmid

vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2 : 2143-2150.

Zhu. L. and M. Welander. 1999. Growth characteristics of apple cultivar Gravenstein plants grafted onto the transformed rootstock M26 with *rolA* and *rolB* genes under non-limiting nutrient conditions. *Plant Sci.* 147 : 75-80.

Development and Utilization of Genetic Transformation on Rootstock Breeding of Fruit Trees

Junko Kaneyoshi

Summary

Genetic transformation protocols on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) and Asian pear (*Pyrus betulaefolia* Bunge) were established. Using the method, the *rolC* or *rol* gene was introduced into trifoliolate orange for producing dwarf rootstock.

1. Development of genetic transformation protocol of trifoliolate orange

Adventitious buds were efficiently produced from internodal stem of trifoliolate orange, and a simple and efficient gene transfer system for trifoliolate orange was developed using the internodal stem segments. The segments were infected with *Agrobacterium* harboring the binary vector pBI121 or pBI101-O12-p1. Both vectors contained the neomycin phosphotransferase II (NPTII) and the β -glucuronidase (GUS) genes. In the plasmid pBI101-O12-p1, the GUS gene was directed to the promoter region of ORF12 (*rolC*) of the Ri plasmid. On a selection medium containing 100 μ g/ml kanamycin, adventitious shoots were formed from 21.7-44.6% of the segments. Histochemical GUS assay showed that 55.4-87.7% of the shoots expressed the GUS gene. The stable integration of this gene was also confirmed by polymerase chain reaction (PCR) analysis and by Southern blot analysis. When the pBI101-O12-p1 plasmid was used, the GUS activity was found to be located in the phloem cells of leaf, stem and root. More than 100 transformed plants were obtained using this method within 2-3 months.

2. Characteristics of transgenic trifoliolate orange possessing the *rolC* gene

Transgenic trifoliolate orange plants harbouring chimeric gene consisting of a promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S RNA and the *rolC* structural gene of the Ri plasmid (35S-*rolC*) or the promoter region (5' upstream of non-coding DNA) of *rolC* and the *rolC* structural gene (*rolC-rolC*), were obtained. The transformed plants showed dwarfism, but the degree of dwarfism differed among individual plants and between plants with 35S-*rolC* and those with *rolC-rolC*. The internodal length of the transformants with 35S-*rolC* was much shorter than that of non-transformed control plants, with 18 out of 20 showing a value less than 50% of the control. The internodal length of the plants with *rolC-rolC*, in contrast, ranged from 9.6-120% of the control. Almost all the transformants examined showed a higher rooting ability than the control.

3. Regeneration of transgenic plants from hairy root of trifoliolate orange induced by *Agrobacterium rhizogenes*

In this paper I described the successful development of trifoliolate orange transformants from hairy roots induced by *A. rhizogenes*. Epicotyls of trifoliolate orange seedlings inoculated with a domestic wild strain of *A. rhizogenes* 1724 (MAFF 301724) produced many Hairy roots, and gave rise to complete plants. The stable integration of the genes was confirmed by detection of mikimopine and PCR analysis that detected *rol* gene. PCR analysis with border sequences of T-DNA as primers showed that bacteriaDNA in the explants were not presence. These transformants developed shorter internodes ranged from 10.6-81.5% of control. The length of leaf blade and trunk were related to that of internodal, and apical dominance was reduced on the transformants. On cutting, all of the transformants examined showed higher rooting abilities than control, and geotropism was reduced on the transformants. These results suggest that transgenic trifoliolate oranges by *A. rhizogenes* 1724 could be utilized as dwarfing rootstock.

4. Development of genetic transformation protocol of an Asian pea pear

The Asian pea pear, *Pyrus betulaefolia* Bunge, is tolerant to several disorders in the fruit bodies caused by high humidity and dryness and is hence widely used as a rootstock for many pear plants suitable for food sources. We have now successfully transformed *P. betulaefolia* Bunge by an *Agrobacterium*-mediated gene transfer system. Among several wild-type *A. tumefaciens* strain examined, only AKE10 induced shoot-forming tumors at a high frequency on excised cotyledons of *P. betulaefolia* Bunge cultured on phytohormone-free medium. Both the *nptII* (kanamycin resistance) and GUS (β -glucuronidase) genes were introduced into the cotyledons by infection with AKE10 harboring a binary vector, and regenerated plants were obtained. Southern hybridization and polymerase chain reaction analyses and histochemical GUS assay indicated that morphologically normal transformed plants faithfully contained genes from the vector but not from wild-type oncogenic T-DNA. However, morphologically abnormal plants additionally possessed the *6b* gene (AK-6b) of AKE10. These results show that non-disarmed *A. tumefaciens* is adequate to transfer genes to the Asian pea pear.

Key words : citrus, trifoliolate orange, Asian pea pear, rootstock, breeding, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, dwarfing, *rolC*

謝 辞

本論文をとりまとめにあたり、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜った広島大学大学院生物圏科学研究科教授藤田耕之輔博士に深謝の意を表す。また、御校閲の労を賜り貴重な御助言をいただいた広島大学大学院生物圏科学研究科教授江坂宗春博士、同教授正岡淑邦博士、同総合科学部教授桜井直樹博士、同自然科学研究支援開発センター助教授田中伸和博士、同大学院生物圏科学研究科助教授実岡寛文博士に心からお礼申し上げる。

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所上席研究官小林省藏博士には、本研究の実施ととりまとめの全期間を通し、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜った。衷心より深謝の意を表す。本研究の実施ととりまとめに当たり、多大な御指導と御鞭撻をいただいた秋田県立大学生物資源科学部教授我彦広悦博士に深謝の意を表す。本論文のとりまとめに当たり終始、暖かい御激励と御懇篤な御指導をいただいた広島県立農業技術センター果樹研究所元所長藤原多見夫博士（現久米産業株式会社）に深謝の意を表す。分子育種の基礎技術習得、研究の推進方向について多大な御指導、御助言を賜った農業生物資源研究所放射線育種場元場長大山勝夫博士、農業生物資源研究所元課長榎本末男氏（現農林水産技術情報協会）に深謝の意を表す。

形質転換に用いる貴重なアグロバクテリウムを分譲いただき、有益な御助言をいただいた東京大学分子細胞生物学研究所教授内宮博文博士、日本原子力研究所先端基礎研究センター副主任研究員大野豊博士、日本たばこ産業株式会社植物イノベーションセンター開発部長小鞠敏彦博士、千葉大学元助手石川恵子博士（現日本園芸生産研究所主任研究員）に深謝の意を表す。また、アグロバクテリウム野性株による形質転換について懇切な御指導と御助言をいただいた岡山理科大学理学部講師猪口雅彦博士に深謝の意を表す。

研究の遂行に当たり多大な御助力、御助言をいただいた果樹研究所主任研究官中村ゆり博士、広島県立農業技術センター生物工学研究部副主任研究員重本直樹氏に深謝の意を表す。研究の遂行に当たり御激励と御指導を賜り、研究推進の便宜を図っていただいた広島県農林水産部元部長今井基氏、広島県立農業技術センター元所長上本哲氏、同元次長井本征史氏、同元生物工学研究所所長佐々木篤博士（故人）、同西田和男氏、同土居嘉明氏、同大友譲二氏、同元育種研究室長土屋隆生氏（現広島県農業改良普及センター専門技術監）、同元細胞工学研究室長酒井泰文博士、同生物工学研究部長古谷博氏に深謝の意を表す。さらに、研究の遂行に当たり終始御協力いただいた広島県立農業技術センター専任技術員福永やす子氏、同檜山大行氏、同主任技術員平田由紀氏、同技術員和田淳氏、同舛永昌子氏、同委託職員近藤由美氏に心から感謝の意を表す。また、このほか本研究の遂行、取りまとめにあたっては、広島県立農業技術センター生物工学研究部、果樹研究所および企画情報部等の多くの方々から御指導、御協力ならびに御鞭撻をいただいた。皆様に心から感謝申し上げます。

広島県立農業技術センター研究報告 第77号

平成16年 5月26日 印刷
平成16年 5月26日 発行

編集
発行 広島県立農業技術センター
〒739-0151 広島県東広島市八本松町原

印刷所 (株) 中 本 本 店
〒730-0004 広島市中区東白島町13-15
☎ (082) 221-9181

BULLETIN
OF THE
HIROSHIMA PREFECTURAL
AGRICULTURE RESEARCH CENTER
NO.77

Hiroshima Prefectural Agriculture Research Center
(Higashihiroshima, Hiroshima Prefecture, 739-0151 Japan)

Junko KANEYOSHI

Hiroshima Prefectural Agriculture Research Center
(Higashihiroshima, Hiroshima Prefecture, 739-0151 Japan)

May, 2004