

論文内容の要旨

申請者氏名 森本昌幸

本研究では、有用な熱帯樹木を環境保全に役立てることを目的とし、次の課題を設定した。第一は有効な繁殖法の確立、第二は組換え技術の確立、第三に付加価値の向上。いずれの課題も熱帯樹種での実施例はきわめて少ない。そのため、実験材料をコーキセンダン、およびコーヒーノキとし、以下の実験をおこなった。

コーキセンダンは、東南アジアに自生し、早い成長、優良な材質、アザディラクチンと呼ばれる殺虫成分の含有など、貴重な森林資源である。挿し木や実生苗などにより増殖されるが、生育環境や種の供給などに限度があり、大量繁殖はむずかしい。そこで本研究では、不定胚培養系の確立、人工種子封入条件の検討、さらに、形質転換法の確立を目指した。第一に、葉切片または不定胚からカルスを経由することなく、直接(二次)不定胚を誘導できる培養条件を確定した。第二に、継代培養で得られたハート型あるいは魚雷型不定胚の最適再分化条件を検討した。第三に、肥大化を抑制した不定胚誘導法と褐変防止法の確立を目標に、3 ヶ月間保存可能な人工種子封入条件を検討した。褐変防止にはシステイン塩酸塩(CH)が有効で、組織培養における CH の新しい使用方法を開発した。形質転換法の確立には、*GFP*, *GUS* 遺伝子、およびアグロバクテリウム法を用いた。その結果、*A. tumefaciens* の系統が重要であることが知られた。この知見に基づいて、実用化を目指した組換え体を作成した。抗菌ペプチドである *MsrA1* と除草剤耐性の *Bar* である。後者は、幼植物体にまで成長した。以上の研究から、コーキセンダンの簡便な培養系、遺伝子導入法が確立され、将来、ストレス耐性を付与した実用株作成の基礎を築いた。

経済価値の低い樹木は、植林の対象になりにくい。そこで、付加価値を高めるためカフェイン合成を抑えたカフェインレスコーヒーの作出を目指した。これまで市場の 25% を占める *Coffea canephora* (カネフォラ種) の形質転換には成功しているが、市場の 75% を占める *Coffea arabica* (アラビカ種) での報告はない。カフェインの合成を抑えるために RNA 干渉法 (RNAi 法) を用いた。アグロバクテリウムを用いて、アラビカ種の葉切片に導入、不定胚を誘導、選抜した。誘導した不定胚は、再分化させ、約 6 ヶ月後、鉢上げを行なった。樹高が 5 cm 以上になった植物体の葉 RNA の RT-PCR により、カフェイン合成に関わる遺伝子群の発現は野生株と比較して約 50% 減少していることがわかった。これらの結果は、カネフォラ種と同様であることから、葉内のカフェイン含量が減少していることは確かである。

以上、2 種類の熱帯樹種を用いて、大量繁殖法、および形質転換法を確立し、その応用例として、予備的ではあるが、除草剤耐性能、および付加価値の向上に取り組み成功した。これらの知見は他の熱帯樹種にも応用可能であり、今後、多様な分子育種の展開に役立つ。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 森本昌幸

熱帯雨林の再生には、経済価値の高い樹木を用いることが重要である。しかし、熱帯樹木には繁殖が困難な種が多い。これを解決するために、分子育種を用いた研究が行われているが、種はユーカリやアカシアなど、ごく一部に限定されている。本研究により、有用にもかかわらず、今まで研究されていなかった樹木でも、分子育種の対象になることが示唆された。

有用熱帯樹であるコーキセンダンをモデル材料として、不定胚培養系、および形質転換方法を検討した。その結果、現在までに報告されている培養系よりもはるかに簡便で、実用的な培養系を確立できた。また、人工種子として必須な小型化や褐変化防止を促すために、組織培養におけるアスコルビン酸やシステイン塩酸塩の利用法を開発した。この技術に基づいて、GFPおよびGUS遺伝子をマーカーとした組換え体を作成し、安定な導入遺伝子の発現を確認した。こうした基礎成果を利用して、実用しても有効である除草剤耐性形質を付与した。本研究の成果は、これまで例のない熱帯樹での技術開発に成功した、という意味ですでに高く評価されるべきだが、加えて、詳細な培養、および遺伝子導入条件を検討することが、熱帯樹一般の分子育種にいか

に大切かを示すものである。

現在、世界で行われている植林の大半は、外来の樹木を一種類だけ植林するモノカルチャーである。この植林方法では、土壌の枯渇、水源機能の低下、熱帯雨林の生態系の破壊、その結果、種の多様性の現象など、さまざまな問題が生ずる。本研究で得られた知見は、「現地に自生する樹木を改良し、植林に用いる」ための基礎となる。また、組織培養を用いた繁殖方法である人工種子は、膨大な研究にもかかわらず、実用化には至っていない。しかし、年間1500万ヘクタールも減少している熱帯雨林を再生させるためには、たいへん有効な技術である。本研究の成果は、その基礎技術の開発にも少なからず貢献した。

植林を成功させるためには、用いる樹木の経済価値の高さと現地住民の収入の確保が重要である。カフェインレスコーヒーの作出では、経済価値の高いアラビカ種を用いた。樹木の伐採ではなく、果実を採取して収入を得ることができるため、植林地の保持、管理が容易で、環境保全能力は高い。これまで、生物学的には考慮されていなかった経済性も視野にいった成果は、実用化にむけても貴重である。

以上のように、本論文は熱帯樹種の分子育種の基礎知識と技術を大きく前進させるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。