



Title	形質転換によるキュウリモザイクウイルス抵抗性メロンの作出と利用に関する研究
Author(s)	吉岡, 啓子; YOSHIOKA, Keiko
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 19(3), 333-375
Issue Date	1995-03-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12166
Type	departmental bulletin paper
File Information	19(3)_p333-375.pdf



形質転換によるキュウリモザイクウイルス抵抗性 メロンの作出と利用に関する研究*

吉岡 啓子

(北海道大学農学部園芸学講座)

(平成6年11月18日受理)

Study on the Production and Utilization of Cucumber Mosaic Virus-resistant Transgenic Melon Plant

Keiko YOSHIOKA

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

目 次

緒言	342
第1章 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> を用いたメロン形質転換法の開発	335
I. メロンの組織培養におけるカナマイシン感受性	335
1. 種子のカナマイシン感受性	335
2. シュートのカナマイシン感受性	336
3. 苗条原基のカナマイシン感受性	337
4. 不定胚のカナマイシン感受性	337
5. 不定芽のカナマイシン感受性	337
II. 苗条原基培養系を利用したメロンの形質転換	338
III. 不定胚培養系を利用したメロンの形質転換	340
IV. 不定芽培養系を利用したメロンの形質転換	340
V. 考察	341
第2章 キュウリモザイクウイルス外被タンパク質遺伝子をコードする植物発現ベクターの作成と <i>Agrobacterium tumefaciens</i> への導入	341
I. CMV 外被タンパク質遺伝子をコードする植物発現ベクターの作成	342
II. タバコ形質転換系による植物発現ベクターと <i>Agrobacterium tumefaciens</i> の機能の確認	342
III. 考察	343
第3章 キュウリモザイクウイルス外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出	345
I. 不定芽培養系を用いた CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出	345
II. カナマイシン耐性メロンにおける CMV 外被タンパク質遺伝子の検出	347
III. 免疫学的方法による CMV 外被タンパク質遺伝子の翻訳産物の検出	348
IV. 考察	349
第4章 キュウリモザイクウイルス外被タンパク質遺伝子導入メロンの CMV 抵抗性	349
I. 接種検定による形質転換メロンの CMV 抵抗性	349
II. 他品種との CMV 抵抗性の比較	350
III. 考察	351
第5章 キュウリモザイクウイルス外被タンパク質遺伝子導入メロンの自殖後代の特性	352
I. 自殖第1代における CMV 外被タンパク質遺伝子の検出とカナマイシン耐性	352
II. 形質転換体自殖第1代の CMV 抵抗性	353
1. 形質転換体自殖第1代におけるカナマイシン耐性個体の選抜と CMV 抵抗性	353
2. 形質転換体自殖第1代の親系統間による CMV 抵抗性の比較	354
3. 形質転換体自殖第1代の個体間における CMV 抵抗性の比較	355

*本報は北海道大学審査学位論文の一部である。

III. 形質転換体自殖第2代におけるカナマイシン耐性個体の選抜と CMV 抵抗性	356
IV. 考察	357
第6章 形質転換メロンと他品種との交雑後代の特性	358
I. 交雑後代の作出とその特性	358
II. 交雑後代におけるカナマイシン耐性の調査と CMV 外被タンパク質遺伝子の検出	359
III. 形質転換体の交雑後代における CMV 抵抗性	360
IV. 考察	362
第7章 総合考察	363
摘要	366
謝辞	369
引用文献	369

緒 言

ウイルスによる植物病害は農作物の収量や品質の低下を招き、時には壊滅的な被害をもたらして農業生産に多大な損害を与えている。1935年、STANLEY¹⁾によりタバコモザイクウイルス (TMV) が単離されて以来、多くの植物ウイルスが分離同定され、全世界において現在までに確認されているものは600種以上にのぼると言われている²⁾。我が国においても二百数十種の植物ウイルスの発生が確認されており、害を被る作物も多種多様である³⁾。

一方、ウイルス病に対する防除策は、主に罹病株の早抜きや媒介昆虫の駆除といった間接的な方法に頼っており、積極的な防除法は今のところ実用化に至っていない。この理由は、ウイルスが宿主細胞の代謝系を利用して増殖するため、宿主の正常な代謝を損なうことなくウイルス増殖のみを特異的に抑える抗ウイルス剤の開発が困難であるためである。そこで、ウイルス病対策として抵抗性品種の作出が期待され、長年にわたり育種、遺伝学的研究が重ねられた。その結果、トマトなど、一部の作物でウイルス病抵抗性品種の育成に成功しているが、未だ十分な成果をあげているとはいえない。育種上最も重要なウイルス病抵抗性の遺伝資源が不十分であること、またわずかな遺伝資源を用いた育種操作に多大な年月と労力が必要とされることが原因としてあげられる。タバコにおける TMV 抵抗性遺伝子 *N* のように特定の作物と特定のウイルスの組合せにおい

て同定され、研究が進められている例^{4,5)}もあるが、多くのウイルス病においてその抵抗性機構は複雑で、従来の方法によるウイルス病抵抗性品種の作出は困難である。

このような状況の中で、近年急速に発展しつつある植物バイオテクノロジーが、ウイルス病防除における新たな解決法として注目されている。そのうちの1つは、交配不可能なウイルス病抵抗性植物との細胞融合⁶⁾、であり、他の1つは遺伝子組換えである。

細胞融合は、注目されてから既に十数年が経過し、いくつかの成果も報告されているが⁷⁾、目的とするウイルス病抵抗性以外の諸形質も同時に付与されるなど、品種育成において、各種の困難を伴うことが明らかになってきた。そこで、現在最も期待されているのが遺伝子組換え技術によるウイルス病抵抗性植物の作出である。

遺伝子組換えは、1960年代に創出された微生物を対象とする分子生物学の領域において、生命現象を解明する研究手法として発展した技術である。この新しい知識と技術を基礎として、植物の研究領域においても遺伝子操作の手法が用いられ始めた。特に、1983年に ZANBRYSKI ら⁸⁾ によって Ti プラスミド (本文第1章参照) を用いた植物用ベクターが開発されて以来、植物研究における遺伝子組換え技術の有用性が認識され、その開発が急速に進んだ。

このような技術的側面での発展を背景として、ウイルス病抵抗性付与に対する全く新しいアプローチが、1986年、BEACHYの研究グループ⁹⁾によって報告された。彼らは、TMVの外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換タバコを作出し、それがTMVに対して抵抗性を示すことを確認した。これは、弱毒ウイルス¹⁰⁾に感染した植物がその後感染したウイルスに対し抵抗性を示す干渉効果 (cross protection)¹¹⁾といわれる現象のメカニズムの研究に端を発したもので、この現象がウイルスの外被タンパク質に関連しているという仮説¹²⁾に基づいたものである。その後、ゲノム構成及び形状などが異なる他のウイルスを用いて同様の実験が行われ、タバコでは外被タンパク質遺伝子の導入によってウイルス病抵抗性が付与されるという現象がTMVに限らず他のウイルスにも応用できるものであることが示唆された。現在、この抵抗性は coat protein mediated resistance と呼ばれている¹³⁾。

本研究では、これらの研究成果を実験植物として

のタバコにとどまらず、他の栽培植物に応用することを目的とし、特にメロンにおける利用を試みた。メロン (*Cucumis melo* L., 2n=24) はウリ科野菜に属し、世界各国で栽培される主要な栽培植物である。日本におけるメロン栽培は、1990年には作付け面積1万6千7百ヘクタール、生産量は37万9千7百トンである¹⁴⁾。作付け面積は1965年の約2倍に増加している¹⁵⁾。生産量の増加に伴い病害も増加しており、日本のメロンには現在までに8種類のウイルスの存在が報告されている³⁾。なかでもキュウリモザイクウイルス (CMV) 及びカボチャモザイクウイルス (WMV-2) の2種類が最も大きな被害をもたらしているが、これらに対する実用的な抵抗性品種はいまだ作出されていない。

本研究は、特に広い宿主領域をもち防除が不可能とされている CMV について、上述した外被タンパク質遺伝子による CMV 抵抗性メロンの作出と利用を目的として、(1)メロンの形質転換法の確立、(2)CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出、(3)形質転換メロンの CMV 抵抗性の確認、(4)形質転換メロンの後代の特性調査を行ったものである。

第1章 *Agrobacterium tumefaciens* を用いたメロンの形質転換法の開発

植物細胞への遺伝子導入技術は、各種の方法が考案されている。そのうち一般的な方法は、①Ti 及び Ri プラスミドを用いる方法^{8,16)}、②エレクトロポレーション法¹⁷⁾、③パーティクルガンを用いる方法¹⁸⁾の3種であり、特に双子葉植物の遺伝子組換えを前進させたのは、*Agrobacterium tumefaciens* の

持つ Ti プラスミドを利用した植物用ベクターの開発であった。本実験においてもこの Ti プラスミドを利用したバイナリーベクターと *A. tumefaciens* LBA4404 株²⁰⁾ を用いた。

このほか植物の形質転換の成否を左右する要因として、形質転換に適した培養法の有無がある。上述の形質転換法のいずれを用いるとしても、形質転換体を得るための第一段階は形質転換のための植物体再生系の確立である。*A. tumefaciens* を用いた形質転換のための再生系として必要な条件は、再生率が高いこと、キメラ個体の出現頻度の低いこと、さらに大量に処理する事を考慮して、培養期間が短く簡便であることの3点が重要である。この条件を満たし、形質転換に使用されている一般的な再生系はリーフディスクからの不定芽再生系である。しかし、メロンの場合、リーフディスク法²¹⁾は再生率が低く、必ずしも形質転換に適した系とはいえない。

本章では、安定したメロンの形質転換法を確立するために、形質転換に適した植物体再生系について検討すると共に、カナマイシン耐性遺伝子の選抜マーカーとしての有効性について検討した。

I. メロンの組織培養におけるカナマイシン感受性

形質転換個体を効率よく選抜するためには、選抜法の確立が必要である。現在、一般的に使用されている選抜マーカー遺伝子は、カナマイシン耐性遺伝子 (*npt II*; neomycin phosphotransferase II)²²⁾ のほか、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hpt*; hygromycin phosphotransferase)²³⁾ や除草剤耐性遺伝子

Table 1-1 Effect of kanamycin concentration on germination of *Cucumis melo* seeds^x.

Cultivar	Km conc. (mg/ℓ)	Plant height(cm)	Hypocotyl length(cm)	Cotyledon color ^y	True leaf ^z	No. of roots	Root length(cm)
Green Pearl	0	11.0	7.0	G	++	20.0	28.0
	50	8.7	3.8	G	++	20.0	20.7
	100	2.3	0.5	GY	+	2.0	1.3
	150	2.3	1.3	W	+	1.0	1.3
	200	1.0	0.5	W	-	0.3	1.0
Prince	0	21.0	8.7	GY	++	20.0	26.7
	50	30.0	7.0	GY	++	20.0	10.0
	100	14.3	6.0	Y	+	1.3	1.5
	150	1.6	1.0	Y	-	0.3	0.3
	200	0.5	0.5	W	-	0.7	0.7

^x After 6 weeks. Data are expressed as the average obtain from five plants.

^y G: green, GY: yellowish green, Y: yellow, W: white. ^z ++: many, +: 1 or 2, -: 0.

(*bar*)²⁴⁾ などである。双子葉植物ではカナマイシン耐性遺伝子が一般的に使用されており、本実験でもこの遺伝子を用いた。まず、耐性遺伝子導入前のメロンのカナマイシン感受性について調査した。

1. 種子のカナマイシン感受性

1) 材料及び方法

品種‘プリンスメロン’(サカタのタネ), ‘グリーンパール’(トキタ種苗), ‘アンデス’並びに‘アムス’(サカタのタネ)の種子を用いた。まず種皮を剥ぎ, 70% エタノールに10秒浸漬した。1%次亜塩素酸ナトリウムで10分程殺菌し, 滅菌水で洗浄した後, 滅菌水を2時間吸水させた。その後, スクロース 30 g/l + カナマイシン 0~200 mg/l を含む MURASHIGE and SKOOG (MS) 培地²⁵⁾ の固形培地 (以下全て pH 5.8, ゲルライト 0.2%) 上で培養した。以下培養条件は全て 25°C, 3,000 lx, 16 時間日長とした。

2) 結果

置床 6 週間後に芽生えの草丈, 胚軸長, 子葉の色,

本葉の発生, 根数及び根長の 6 項目について調査した (Table 1-1)。100 mg/l 以上のカナマイシンを添加した区では, 子葉の退色や胚軸の伸長抑制などカナマイシンの影響が観察された。特に発根抑制や根の伸長抑制など地下部への影響が著しかった (Fig. 1-1)。この感受性は健全な状態の種子のものであるので, *A. tumefaciens* の感染処理を行った外植片に対してこの結果をそのまま適用できるわけではない。しかし, 地下部の観察を中心として, 100 mg/l 前後のカナマイシンを添加した培地での選抜が基本であることが示唆された。

2. シュートのカナマイシン感受性

1) 材料及び方法

品種‘グリーンパール’(トキタ種苗), ‘プリンスメロン’, ‘アンデス’(サカタのタネ), 並びに‘サンデー秋’(横浜植木)の種子を無菌播種し, 無機物の濃度を全て 2 分の 1 に調整した MS 培地 (1/2 MS 培地) + スクロース 30 g/l の固形培地上で 2 週間培養した。その後, 伸長した茎の成長点から第 1 節までを切り取り, 1/2 MS 培地 + スクロース 30 g/l + カナマイシン 0~200 mg/l の固形培地上で培養した。

Table 1-2 Kanamycin sensitivity of shoot in melon^w

Cultivar	Km conc. (mg/l)	Leaf color ^x	Shoot elongation ^y	Root formation ^z
Green pearl	0	GG	++	++
	50	GG	++	+
	100	GY	++	-
	150	YG	-	-
	200	GY	-	-
Prince	0	GG	++	++
	50	GG	++	+
	100	GY	++	-
	150	YG	+	-
	200	Y	-	-

^w The experiments were scored 2 weeks after culture initiation.

The data given represent the average of five plants.

^x GG : green, GY : yellowish green, YG : greenish yellow, Y : yellow.

^y ++ : well growth, + : slightly growth, - : no growth.

^z ++ : >3, + : 1 or 2, - : 0.

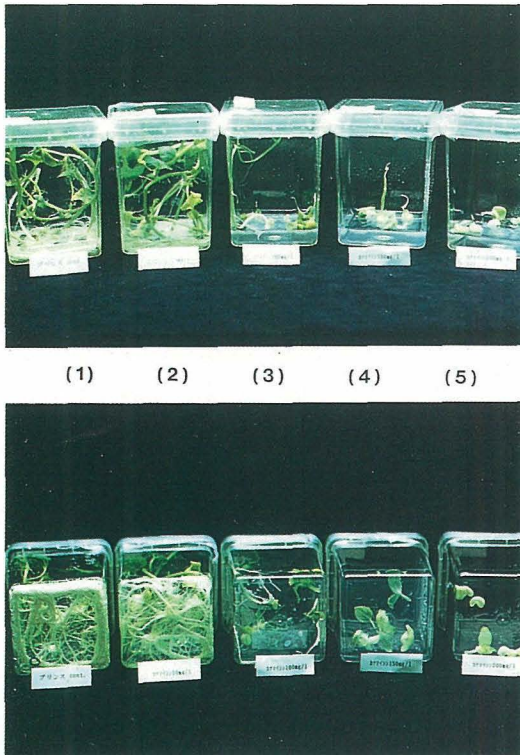


Fig. 1-1 Effect of kanamycin on germination of melon seeds. [Upper] Shoot elongation. [Lower] Root formation.

2) 結果

培養開始2週間後、シュートの伸長、発根の有無、葉の黄化を調査した (Table 1-2)。シュートの伸長抑制及び葉の黄化は 100~150 mg/l のカナマイシンを添加した培地上で観察されたが、その変化は明確ではなく、地上部の影響は選抜の基準としては不十分であった。一方、発根については 50 mg/l のカナマイシンを添加した培地と 100 mg/l のカナマイシンを添加した培地の間で著しい違いが観察され、若干の品種間差が観察されたものの 100 mg/l のカナマイシンを添加した培地で発根が抑制された。また、'プリンスメロン' ではカナマイシン 50 mg/l を添加した培地においても無添加区と異なる発根形態を示し、カナマイシンの感受性を区別することが可能であった。

3. 苗条原基のカナマイシン感受性

苗条原基は茎頂から誘導されるコンペイトウ状の集塊で、高い植物体再生能を有しており²⁶⁾、各種の栽培植物において苗条原基の誘導が報告されている²⁷⁾。メロンにおいても 1989 年に永井ら²⁸⁾により苗条原基の誘導条件が明らかにされ、苗条原基からの植物体再生系が確立した。植物体再生率が高く安定していること、遺伝変異が少ないことなど、形質転換に使用する培養系として有利な点が多い。本実験では、苗条原基を用いた形質転換系を想定して、苗条原基のカナマイシン感受性を調査した。

1) 材料及び方法

苗条原基の誘導は永井らの報告に準じた。誘導し

Table 1-3 Kanamycin sensitivity of shoot primordia of melon^w.

Km conc. (mg/l)	Color ^x	Growth degree ^y	Root formation ^z
0	GG	++	++
25	GG	++	++
50	GY	+	+
100	YG	+	-
150	YG	-	-

^w The data were scored 8 weeks after culture initiation. cv. : Prince melon.

The data given represent the average of five plants.

^x GG : green, GY : yellowish green, YG : Greenish yellow.

^y ++ : well growth, + : slightly growth, - : no growth. ^z ++ : >3, + : 1 or 2, - : 0.

た苗条原基は、ピンセットによって分割し、MS 培地+N6-ベンジルアデニン (BA) 0.2 mg/l+スクロース 30 g/l+カナマイシン 0~150 mg/l の固形培地上で培養した。

2) 結果

誘導した苗条原基を液体培地からカナマイシンを添加した固形培地に移植し、培養した。約8週間後に、苗化部の色、苗化度、発根の有無について調査した (Table 1-3)。100 mg/l 以上のカナマイシンを添加した区において、顕著な成長の抑制が観察され、特に根の成長は著しく抑制された。

以上の結果から、カナマイシン濃度による苗条原基の分化程度の差異が明らかとなり、苗条原基の分化過程においてカナマイシンによる選抜が可能であることが示唆された。

4. 不定胚のカナマイシン感受性

メロンの不定胚誘導は、1986年、折館と大澤²⁹⁾により初めて報告され、その後改良を重ねてかなり安定した植物体再生系となっている³⁰⁾。本実験ではこの不定胚による再生系の形質転換への利用を想定し、不定胚誘導時のカナマイシン感受性を調査した。

1) 材料及び方法

品種'プリンスメロン'(サカタのタネ)、'サンデー秋'(横浜植木)、並びに'EG360'(味の素東海シード)の種子を用いた。まず、種皮を剥ぎ、殺菌洗浄した後、滅菌水中に2時間浸漬して吸水させた。その後胚軸部を切断し、MS培地+スクロース 30 g/l+BA 0.1 mg/l+2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D) 1 mg/l+ナフタレン酢酸(NAA) 2 mg/l+カナマイシン 0~200 mg/l の固形培地で培養した。3週間後、不定胚形成について調査した。

2) 結果

'プリンスメロン'及び'サンデー秋'ではカナマイシン無添加の区でのみ不定胚形成が観察された。カナマイシンを添加した区では濃度に関係なく不定胚形成は観察されなかった (Table 1-4)。「EG360」ではカナマイシン 150 mg/l を添加した区まで不定胚形成が観察された。他の品種ではカナマイシン添加区では不定胚形成は観察されなかった。このことから「EG360」を除く他の品種では、不定胚形成時でのカナマイシンの影響が大きいので、選抜のために不定胚誘導培地に添加するカナマイシン濃度は低く抑えるか、不定胚誘導後に選抜することが望ましいと考

Table 1-4 Effect of kanamycin on somatic embryogenesis in melon^v

Kanamycin conc. (mg/l)	Total no. of explants tested			No. of explants with embryogenesis			No. of somatic embryos		
	P ^w	S ^x	EG ^y	P	S	EG	P	S	EG
0	11	10	9	4(36) ^z	5(50)	6(66)	40	46	110
50	16	6	10	0	0	2(20)	0	0	12
100	10	10	10	0	0	1(10)	0	0	1
150	5	14	10	0	0	1(10)	0	0	2
200	11	10	10	0	0	0	0	0	0

^v The experiments were scored 2 weeks after culture initiation.

^w P: cv. Prince.

^x S: cv. Sunday Aki.

^y EG: cv. EG360.

^z Numbers in parentheses are % embryo formation (=No. of explants with embryos/Total no. of explants × 100)

Table 1-5 Effect of kanamycin on shoot regeneration of cotyledon explants^v

Kanamycin conc. (mg/l)	Total no. of explants			No. of explants with shoot regeneration		
	P ^w	S ^x	GP ^y	P	S	GP
0	30	63	36	28(93.3) ^z	60(95.2)	32(88.9)
50	32	65	42	17(53.1)	35(53.8)	28(66.7)
100	30	72	36	3(10.0)	12(16.7)	8(22.2)
150	30	65	40	3(10.0)	7(1.1)	3(7.5)
200	29	60	42	1(3.4)	0(0.0)	0(0.0)

^v The experiments were scored 3 weeks after culture initiation.

^w P: cv. Prince.

^x S: cv. Sunday Aki.

^y GP: cv. Green pearl.

^z Numbers in parentheses are % shoot regeneration(=No. of explants with shoot regeneration/Total no. of explants × 100).

えられた。

5. 不定芽のカナマイシン感受性

完熟種子子葉部からの不定芽形成を経由した植物体再生系は、1989年、DIRKSら³¹⁾によって報告された。これはリーフディスク法に類似した方法で、再生率が高く、簡便であり形質転換に適していると考えられる。そこでこの再分化系の利用を想定し、不定芽形成時のカナマイシン感受性を調査した。

1) 材料及び方法

品種‘プリンスメロン’(サカタのタネ)、『サンデー秋’(横浜植木)』並びに‘グリーンパール’(トキタ種苗)の種子を用いた。種皮を剥ぎ、常法により次亜塩素酸ナトリウムで殺菌、洗浄した後滅菌水に2時間吸水させた。その後、子葉部を表裏6片ずつ計12

片に切り分け、MS培地+スクロース 30 g/l+BA 1 mg/l+カナマイシン 0~200 mg/lの固形培地で培養した。3週間後不定芽形成を調査した。

2) 結果

全ての品種において100 mg/l以上のカナマイシンを添加した区において不定芽形成が阻害された(Table 1-5)。また、50 mg/lのカナマイシンを添加した区での不定芽形成は、無添加区の約50%に抑制された。

以上の結果から、不定芽形成時においてもカナマイシンの影響を受けること、また、カナマイシン濃度により影響の程度に差が認められ、不定芽形成時のカナマイシンによる選抜が可能であることが示唆された。

II. 苗条原基培養系を利用したメロンの形質転換

調査した苗条原基のカナマイシン感受性を指標として苗条原基による形質転換を行った。

1. 材料及び方法

レポーター遺伝子として、検出の容易な β -グルクロニダーゼ (Gus) 遺伝子³²⁾ を持つ pBI121 (クロンテック社)³³⁾ を用いた。苗条原基の誘導は永井らの報告に準じた。誘導した苗条原基をピンセットで分割し、MS 培地+スクロース 30 g/l + BA 1 mg/l の液体培地 (pH 5.8) 中で pBI121 を持つ *A. tumefaciens* と 2 日～4 日間共存培養を行った。培養は、小型傾斜回転培養器で毎分 2 回転の回転培養とした。その後、滅菌水で数回洗浄し、MS 培地+スクロース 30 g/l + BA 0.2 mg/l + クラフォラン (セファム系除菌用抗生物質、ヘキストジャパン社) 500 mg/l の苗化促進用固形培地へ移植し培養した。移植後 5～7 日の間に、シュート伸長中の苗条原基を無作為に抽出し、Gus 活性を測定した。測定法は蛍光法 (fluorometric assay) と組織化学的方法 (histochemical assay) の 2 種類の方法を用いた。

約 4 週間後伸長したシュートを切り取り、MS 培地+スクロース 30 g/l + カナマイシン 100 mg/l + クラフォラン 500 mg/l の選抜培地に置床した。その後選抜培地上で発根したカナマイシン耐性個体から、DNA を抽出した。これを Gus 遺伝子の特異的配列より DNA 合成装置を用いて作成した 20 塩基のプライマー (5'-GTAGAAACCCCAACCCGTGA-3', 5'-TGATACGTACACTTTTCCCG-3') を使って PCR 法 (第 3 章参照) による DNA の増幅を行った。また、再生個体の Gus 活性も上記の 2 種の方法で測定した。

2. 結果

共存培養 2 日の区でも、4 日の区でもカナマイシン耐性個体を得た。100 mg/l のカナマイシンを添加した培地において、耐性個体と対照区の感受性個体の地上部との間には著しい違いは認められなかった。しかし、地下部については、対照区でほとんど発根しなかったのに対し、耐性個体では旺盛な発根を示した。*A. tumefaciens* との共存培養を数日行った後、苗条原基を取り出し、蛍光法によって Gus 活性を測定した結果、対照区では観察されない蛍光値

の増大が観察された。さらに組織化学的方法で Gus 活性を測定したところ、青色の発色が多数みられ、Gus 遺伝子の発現が明らかとなった。しかし、その後完全な植物体に再生した個体では Gus 活性を確認することができなかった。この原因は、①挿入した遺伝子が、組み込まれず、苗条原基の細胞中で一過的に発現していたに過ぎなかった、②導入した遺伝子が再生した植物体の細胞に組み込まれてはいたが、均一な発現をしておらず、測定に供試した部位において発現していなかった、③再生個体が導入した遺伝子に関してキメラになっており、検出に用いた部位には遺伝子が組み込まれていなかった、の 3 点が考えられる。まず、①の原因に関しては、*A. tumefaciens* が遺伝子を染色体へ組み込む積極的な機構をもつこと¹⁹⁾ から、一過的な発現である可能性は低いと考えられる。次に②の原因であるが、Gus 遺伝子の発現のために用いた CaMV35S プロモーターが強い発現能力を持つこと、また発現が組織特異性を持たないこと⁶⁾ を考慮すると、これも可能性は低いと考えられた。最後に③の可能性について考察すると、*A. tumefaciens* の溶液に浸漬した苗条原基は、他の再生系で用いた外植片に比べ分化の進んだ組織であり、再生した植物体が導入した遺伝子に関してキメラとなる可能性は十分に考えられる。以

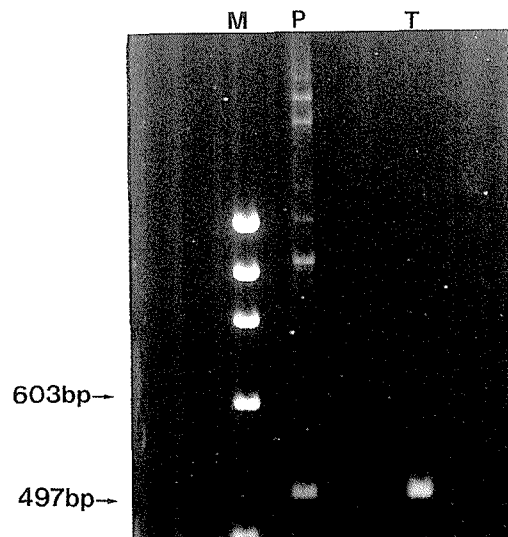


Fig. 1-2 Detection of β -glucuronidase gene by polymerase chain reaction system.
P: pBI121. T: Transgenic plans,
M: Molecular size marker. λ /Hind III

上の考察により、Gus 活性の結果は、再生個体がキメラであったことが原因ではないかと推定した。

再生植物体の Gus 遺伝子を PCR 法で検出した結果、予想される DNA 断片が確認され (Fig. 1-2)、Gus 遺伝子が導入されていることが証明された。しかし、上記の Gus 活性の測定結果を考慮すると、植物体全体の細胞に外来遺伝子が挿入されているかどうか不明であった。

以上のように、苗条原基の再生系を用いて形質転換体を得ることができたが、導入した遺伝子の発現に関しては不均一であるという結果を得た。

III. 不定胚培養系を利用したメロンの形質転換

1. 材料及び方法

品種‘サンデー秋’ (横浜植木) の種子の種皮を剥ぎ、常法により殺菌、洗浄した後、滅菌水に約6時間浸漬して吸水させた。その後、胚軸部を pBI121 を持つ *A. tumefaciens* の培養液に10分間浸漬した。余分な培養液は濾紙で吸い取り、MS 培地+スクロース 30 g/l+BA 0.1 mg/l+NAA 2 mg/l+2,4-D 1 mg/l 液体培地 (pH 5.8) 中で半日~5日間共存培養を行った。共存培養後、MS 培地+スクロース 30 g/l+BA 0.1 mg/l+NAA 2 mg/l+2,4-D 1 mg/l+クラフオラン 500 mg/l の固形培地で培養した。約3週間後、形成された不定胚を MS 培地+スクロース 30 g/l+カナマイシン 50 mg/l+クラフオラン 300 mg/l の固形培地に移植した。伸長してきた不定胚は、地下部を切断してカナマイシン 100 mg/l を添加した成長調節物質を含まない MS 培地へ移植した。再生したカナマイシン耐性個体の

Gus 活性を第2節の蛍光法によって調査した。

2. 結果

共存培養半日~1日の区で不定胚形成が観察されたが、2日以上区では観察されなかった (Table 1-6)。この原因は、本来の不定胚誘導系にない処理、すなわち *A. tumefaciens* との共存培養が誘導率に影響し、その期間が長期になるほど不定胚の形成率を低下させたと考えられる。また、不定胚が形成された区においても、外植片数に対する不定胚の形成率は低く、形質転換のためのバクテリア処理が影響していると考えられた。再生したカナマイシン耐性植物体の Gus 活性を測定したところ蛍光値の増大が認められ、再生率は低いものの形質転換体を得ることができた。

以上の結果から、不定胚を経由する植物体再生系を用いて形質転換体を作出できることが明らかとなった。また、再生率は比較的低く、改良を必要とすると考えられた。

IV. 不定芽培養系を利用したメロンの形質転換

1. 材料及び方法

品種‘サンデー秋’ (横浜植木)、及び‘プリンスメロン’ (サカタのタネ) の種子の種皮を剥ぎ、常法により次亜塩素酸ナトリウムで殺菌、洗浄した。滅菌水に1~2時間浸漬して吸水させたのち、胚軸部分を切り取り MS 培地+スクロース 30 g/l の液体培地 (pH 5.8) 中で *A. tumefaciens* と1~5日間の共存培養を行った。共存培養後滅菌水で数回洗浄し、MS 培地+スクロース 30 g/l+BA 1 mg/l+クラフオラン 500 mg/l の再分化培地で培養した。約3週間後、再生したシュート塊を MS 培地+スクロース 30 g/l+クラフオラン 300 mg/l+カナマイシン 100 mg/l の固形培地へ移植して選抜を行った。その後伸長してきたシュートを順次1本ずつ切り取り、MS 培地+スクロース 30 g/l+クラフオラン 300 mg/l+カナマイシン 100 mg/l の固形培地上で培養し発根を観察した。発根したカナマイシン耐性個体は、Gus 活性を測定した。

2. 結果

共存培養を4日以上行った区では、バクテリアによる外植片の損傷が激しく、白色化して枯死した。共存培養1日、2日、並びに3日の区では外植片が

Table 1-6 Effect of co-culture period on embryogenesis^y

co-culture period(days)	Total no. of explants	No. of explants with embryogenesis	No. of embryos ^z
0.5	10	3	8
1	10	4	10
2	10	0	0
3	10	0	0
4	10	0	0
5	10	0	0

^y The experiments were scored 3 weeks after culture initiation.

cv. Sunday Aki.

^z Total no. of embryos in all explants.

Table 1-7 Comparison of three regeneration systems available in transformation of melon.

	Regeneration system ^w		
	SP	SE	AS
Regeneration efficiency	++ ^x	-	++
Uniformity of transformants	- ^y	+	+
Treatment of transformation	++ ^z	+	+

^w SP: Transformation by shoot primordia-regeneration system, SE: Transformation by somatic embryo-regeneration system, AS: Transformation by adventitious shoot-regeneration system.

^x ++: High, -: Low.

^y ++: Chimera formation was not observed, +: Chimera formation was rarely observed.

-: Chimera formation was observed.

^z ++: Very simple, +: Simple.

ら不定芽が分化した。また、不定芽の再分化率そのものは共存培養の期間に影響されなかった。しかし、再分化率はカナマイシンを添加していないにもかかわらず、共存培養を行っていない対照区より低い値となった。これは、共存培養中の処理が再分化率を低下させたものと考えられる。カナマイシンを添加した固形培地へシュート塊を移植し耐性個体を選抜すると、共存培養を2日間行った区で最も多くのカナマイシン耐性シュートを得ることができた。カナマイシン耐性個体のGus活性を蛍光法によって測定した結果、蛍光値の増大が観察され、これらの個体が形質転換体であることが確認された。

以上の結果から、完熟種子子葉部からの不定芽を経由した植物体再生系を用いて、形質転換体を作成できることが明らかとなった。また、*A. tumefaciens*との共存培養は2日間が最適であることが判明した。

V. 考 察

メロンにおける3つの安定した植物体再生系、すなわち苗条原基による再生系、不定胚による再生系、不定芽による再生系を用いて形質転換を試みた。安定した形質転換のための培養系として重要視した事項は、再生率の高さ、キメラ個体の出現頻度の低さ、形質転換の簡便さと培養期間の短さの3つであり、検討結果をTable 1-7にまとめた。結果的に全ての再生系で形質転換体を得ることが出来たが、3つの再生系はそれぞれ特色を持ち、形質転換系に用いる培養系として長所と短所の両面を持ち合わせていた。苗条原基は、植物体再生率が安定していること、遺伝変異が起きにくいこと、維持や形質転換の処理

が極めて簡便であることなどの事項に対し満足すべき結果が得られたが、Gus活性の調査結果からキメラ個体の発生が唯一の問題点として残った。一方、不定胚による再生系は、不定胚が単細胞から発生するため、キメラ個体の発現率が低く押さえられたが、苗条原基や不定芽の系に比べ、外植片当たりの不定胚形成率が低く、また、外植片当りのシュート再生数も劣るものであった。また、比較的再生個体を得るまでの培養期間が長いことも克服しなければならない問題点であり、この事項に対して、改良の余地があると考えられた。これに対し、完熟種子子葉部からの不定芽再生系は、いわゆるリーフディスク法に類似し、再生効率も高く、キメラ個体の出現頻度も苗条原基からの再生に比べ低いと考えられた。さらに、形質転換率を高めるために改良を必要とするが、上述した3種の事項については安定した再現性を持ち、本章で用いた再生系の中では最も形質転換に適すると考えられた。そこで、CMV外被タンパク質遺伝子の導入には不定芽による再生系を用いることにした。

第2章 キュウリモザイクウイルス外被タンパク質遺伝子をコードする植物発現ベクターの作成と *Agrobacterium tumefaciens* への導入

キュウリモザイクウイルス (CMV) は、穀類、野菜類、果樹など67科、470種にのぼる植物を宿主とする直径30 nmの小球形ウイルスでクモウイルス群に属する³⁵⁾。CMVのゲノム構造は、1本鎖プラス鎖RNA型であり、またゲノム構成は、分子量の大きい方からRNA 1, RNA 2, RNA 3と呼ばれる

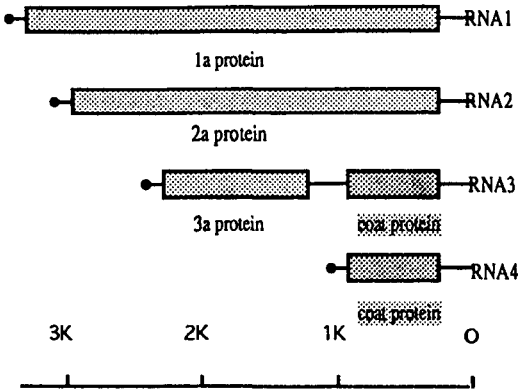


Fig. 2-1 Genome structure of Cucumber mosaic virus.
 □ : Open reading frame.
 ●— : Cap structure.

RNA と、RNA 3 から派生するサブゲノム RNA 4 からなる (Fig. 2-1)³⁶⁾。RNA 1 は 1a タンパク質と呼ばれるウイルスのヘリカーゼを、RNA 2 は 2a タンパク質と呼ばれるウイルスの複製酵素をそれぞれコードしている。RNA 3 には 3a タンパク質と呼ばれるウイルスの細胞間移行に関与するタンパク質と外被タンパク質の 2 つがコードされている³⁷⁾。RNA 4 は RNA 3 の外被タンパク質部分のみをコードしている。CMV の外被タンパク質は、RNA 4 から翻訳され、分子量約 25,000 の 1 成分のタンパク質のみで構成されている。CMV は数多くの分離株が知られている。本実験ではこのうち、日本のメロンに多発し、強毒系である Y 系の外被タンパク質遺伝子の cDNA を用いることにした。本章では、この CMV 外被タンパク質遺伝子の cDNA をコードする植物発現ベクターを持つ *A. tumefaciens* を用いたタバコの形質転換について述べる。

I. CMV 外被タンパク質遺伝子をコードする植物発現ベクターの作成

本実験では pBI121 を改変して目的の遺伝子を持つ植物発現用ベクターを作成した。pBI121 は Ti プラスミドの T-DNA 領域を特徴づけるライトボーダー、レフトボーダーの 25 塩基対の反復配列を持ち、その間にノバリン合成酵素遺伝子のプロモーターに制御される選抜マーカー遺伝子 (カナマイシン耐性遺伝子)、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターに制御されるレポーター遺伝子 (Gus 遺伝子) をコードするプラスミドである。

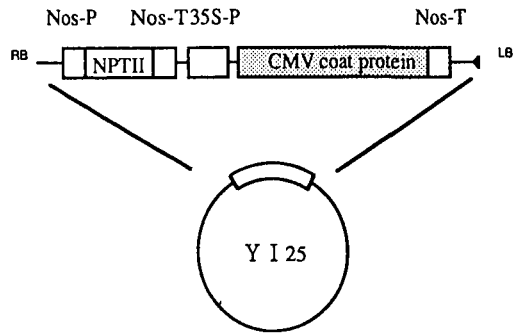


Fig. 2-2 Construction of Y I 25 plasmid.
 RB: Right border for T-DNA transfer.
 LB: Left border for T-DNA transfer.
 Nos-P: Nopaline synthase promoter.
 35S-P: Cauliflower mosaic virus 35S promoter.
 Nos-T: Nopaline synthase polyadenylation signals.
 NPT II: Kanamycin resistance gene.

1. 材料及び方法

CMV 外被タンパク質遺伝子の cDNA は我が国のタバコから分離された CMV-Y 系 (黄斑系) からクローニングしたものを用いた³⁸⁾。この cDNA は CMV の RNA 4 の 5' 末端非翻訳領域の一部のみを欠くもので、外被タンパク質遺伝子の全翻訳領域をカバーするものであった。作成したベクターを制限酵素 BamHI で処理した後、臭化エチジウム 1 μg/ml を加えた 1% アガロースゲルで電気泳動し、紫外線照射下で DNA 断片を検出した。さらに、確認のため CMV 外被タンパク質遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション³⁹⁾を行った。サザンハイブリダイゼーションは非放射性プローブキットである、ECL システム (Amersham 社) を用い、そのプロトコルに従った。

2. 結果

サザンハイブリダイゼーションの結果、期待通り pBI121 の Gus 遺伝子配列が CMV 外被タンパク質遺伝子の cDNA で置き換えられたことが確認された。作成した植物発現ベクターを YI25 プラスミド (Fig. 2-2) として以下の実験に供試した。

II. タバコ形質転換系による植物発現ベクターと Agrobacterium tumefaciens の機能の確認

本節では第 1 節において作成した YI25 プラスミドを導入した *A. tumefaciens* が正常に機能して植

物の形質転換を担い得るか否かを調査した。

中心となる問題点は、①*A. tumefaciens* のバクテリアとしての感染能力、②*A. tumefaciens* が保持するもう1つの重要なプラスミド pAL4404 の形質転換能力、③作成した YI25 プラスミドの植物体内での発現、の3つである。この3つの問題点は、それぞれ直接的に確認することが困難であるため、既に確立されているタバコの形質転換系による実験を行い、タバコの形質転換体を得ることによって、それを傍証としてその確認とすることにした。タバコの形質転換は既に確立されているリーフディスク法⁴⁰⁾を用いた。

1. 材料及び方法

タバコ (*Nicotiana tabacum*) の品種 Petit Havana SR-1 の種子を常法により表面殺菌、洗浄した後、1/2 MS 培地+スクロース 30 g/l の固形培地上に播種し培養した。成長した植物体の本葉を 1 cm 平方の大きさにカットして外植片とした。28°C で一晩培養した *A. tumefaciens* (YI25 プラスミドを組み込んだもの) と、対照区として pBI121 プラスミドをもつもの(2種類) の培養液にこの外植片を 10 分~20 分浸した。その後、余分な *A. tumefaciens* を濾紙上で除去し、MS 培地+スクロース 30 g/l+NAA 0.1 mg/l+BA 1 mg/l の固形培地上で 2 日間共存培養を行った。共存培養後、MS 培地+スクロース 30 g/l+NAA 0.1 mg/l+BA 1 mg/l+クラフォラン 500 mg/l+カナマイシン 100 mg/l の固形培地上に移植し、耐性個体の選抜を行った。再生したシュートは MS 培地+スクロース 30 g/l+クラフォラン 500 mg/l+カナマイシン 100 mg/l の固形培地に移植し選抜を続けた。選抜したカナマイシン耐性植物

Table 2-1 Shoot formation from tobacco leaf explants on the medium containing 100mg/l kanamycin

Plasmid	Total no. of explants	No. of explants with shoot formation
YI25	13	13 (100) ^y
pBI121	12	12 (100)
Control ^z	12	0 (0)

^y Numbers in parentheses are % shoot formation(=No. of explants with shoot formation/Total no. of explants×100)

^z Uninoculated with *Agrobacterium*.

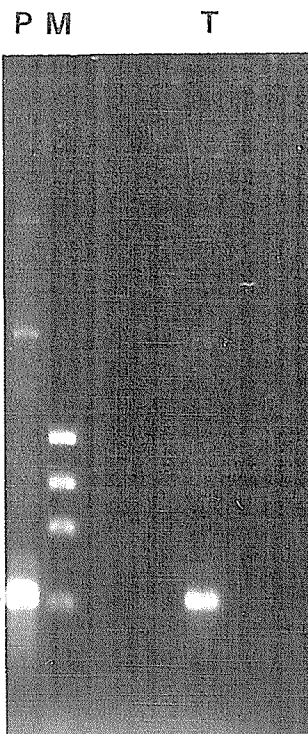


Fig. 2-3 Detection of CMV coat protein gene by electrophoresis of PCR product.

P: YI25 plasmid. M: Molecular size marker, (Φ x174/HaeIII). T: Transformant.

の葉から DNA を抽出し、PCR 法を用いて外被タンパク質遺伝子を検出した。

2. 結 果

形質転換処理を行った全ての外植片から、多数のカナマイシン耐性シュートが再分化し、対照区の外植片からは全く再分化しなかった(**Table 2-1**)。再生したカナマイシン耐性個体から DNA を抽出し、PCR 法(第3章参照)により CMV 外被タンパク質遺伝子の確認を行ったところ、予想した DNA 断片が検出され、形質転換体であることが確認された(**Fig. 2-3**)。

以上の結果から、作成した *A. tumefaciens* を用いて、YI25 プラスミド上の遺伝子が発現している形質転換体の作出が可能であることが明らかとなった。

III. 考 察

形質転換に用いるベクターの設計は、導入する遺伝子をいかなる目的でいかに発現させるかという、形質転換体を作成する根本的な部分を支えるものである。ウイルスの外被タンパク質遺伝子によるウイルス病抵抗性を植物に付与するためのベクターの作成については、現在までの研究報告から考察し、①外被タンパク質遺伝子のプロモーター、②導入する外被タンパク質遺伝子の3',5'非翻訳領域、③翻訳開始部位の配列、の3つについて注意点があると考えられた。

まず、プロモーターについては、形質転換体を用いる全ての実験で最も注目すべき問題点である。タバコを中心とする外被タンパク質遺伝子導入の初期の一連の報告の場合、用いられたプロモーターのほとんどが本実験と同じCaMV35Sプロモーターであり、他に数例CaMV19Sプロモーターの例があるに過ぎない⁴¹⁾。これは、実験に着手した時期が1980年代後半に集中しており、その時点では、植物体で発現するプロモーターは十分には単離されていなかったこと、このプロモーターが強い発現能力を有していること、恒常的に働くこと等に帰因すると考えられる。また、これらの実験の目的が、抵抗性植物の育種への応用を想定したものでなかったことも大きな要因であろう。本研究の目的は、緒言でも述べたとおり、栽培植物であるメロンを用いることで、育種現場への形質転換体の利用を問うものである。従って、本来ならば外被タンパク質遺伝子の発現量、発現時期、発現部位などについて、最も理想的なプロモーターを選択すべきであった。しかし、本実験は上述のタバコでの実験とほぼ同じ1989年に着手しており、植物体で発現するプロモーターについての研究蓄積が現在ほどなかったこと、CaMV35Sプロモーターが強い発現能力を持つこと、入手が容易であったことなどを背景にCaMV35Sプロモーターを使用した。現在では35Sプロモーターにエンハンサーを接続したり⁴²⁾、あるいはコア領域を反復させることで発現量を高める報告などがある⁴³⁾。しかし、外被タンパク質遺伝子が付与するウイルス病抵抗性は、必ずしもこの遺伝子の発現量に比例するものではないという報告もある⁴⁴⁾。従って、一概に高い発現量を求めることが最善かどうかという問題に対する結論は、今後の報告を待たねばならない。

同様のことが発現時期や発現部位に関してもいえる。発現に関しては最近、エチレン誘導性のプロモーターを使用することで、ウイルス感染に伴うエチレンの発生に応じた外被タンパク質遺伝子の発現誘導を計画した報告があった⁴⁵⁾。誘導から発現にいたるまでの時間的問題点を解決する必要があると考えられるが、発現について積極的に改良を試みる報告であった。発現部位に関しては、形質転換体の農作物としての利用が目前となり、食用部での外来遺伝子の発現が議論されている。果実などにおいて発現しない特異的な発現プロモーターの利用も今後の課題である。目的に応じた理想的な発現がいかなるものであるか、また、それを満足させるプロモーターが単離されているかといった点についての研究の蓄積を期待したい。

次に、②の外被タンパク質遺伝子の5'及び3'非翻訳領域についてであるが、本実験で用いた外被タンパク質遺伝子部位は、クローニングしたRNA4の5'端を一部欠失した程度であり、その大半はそのままopen reading frame(タンパク質をコードする読み取り枠)とともに組み込まれた。この部位は、目的の遺伝子の転写産物や翻訳産物である外被タンパク質の生産に影響するといわれており⁴⁶⁾、TMVの場合3'非翻訳領域のない方が、外被タンパク質の生産量が高いという報告もある⁴⁷⁾。しかしその一方で、ダイズモザイクウイルスの場合ではこの領域はそれほど関与しないという結果が報告されており⁴⁸⁾、いずれのウイルスにおいても同じ結果であるとはいえない。本実験の場合、非翻訳領域を除いたベクターを作成して比較検討したわけではないので、CMVでこの問題を論議できないが、作出した形質転換体のCMV抵抗性については第4章において述べるように、抵抗性のある個体を得ているので、この部位の存在が特に否定的に働いたとは考えられない。

最後に、③に関してはKOZAKら⁴⁹⁾により報告された'A(あるいはT)XXAUGXC'(Xはいずれの塩基でも良い、またAUGは翻訳開始コドン)という配列は、真核生物遺伝子の翻訳開始点においてしばしば認められる。これは発現量を増加させると報告があったが、本実験では翻訳開始部を改変するには到らなかった。しかし、CMV外被タンパク質遺伝子の発現量の向上も報告されており⁴⁴⁾、その後行ったWMVやズッキーニ黄斑モザイクウイルス(ZYMV)の外被タンパク質遺伝子を用いた実験では、この配

列に一致するよう改変した^{50,51)}。

以上のように、今後さらに実用的な形質転換体を作成するために問題となるいくつかの点について、本実験で得た結果から考察した。

第3章 キュウリモザイクウイルス外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出

I. 不定芽培養系を用いたCMV外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出

Gus 遺伝子によるモデル実験の結果より、不定芽による植物体再生系は、現時点で最もメロンの形質転換に適すと考えられた。この再生系を基本として、前培養期間、共存培養の培地、選抜法などの諸条件についてさらに検討を加え、CMV 外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換メロンの作出を試みた。

1. 材料及び方法

品種‘プリンスメロン’(サカタのタネ)、『グリーンパール’(トキタ種苗)並びに‘サンデー秋’(横浜植木)の完熟種子の種皮を剥ぎ、次亜塩素酸ナトリウムを用い常法に従って殺菌、洗浄を行った。蒸留水に1~2時間吸水させた後、子葉部をMS培地+スクロス 30 g/lの固形培地上で0~5日間前培養を行った。その後、この子葉部を表裏6片ずつ計12片に切り、MS培地+BA 1 mg/l+アセトシリゴン 200 μMにスクロス 30 gを単独に添加した培地、スクロス 8 g+D-グルコース 8 gを添加した培地、またはグルコース 15 gを単独で添加した固形培地上で、YI25プラスミドを組み込んだ*A. tumefaciens* 2日間の共存培養を行った。共存培養後滅菌水で数回洗浄し、MS培地+スクロス 30 g/l+BA 1 mg/l+クラフォラン 300 mg/l+カナマイシン 0~100 mg/lの固形培地上でシュートの再生を試みた。約3週間後、再生したシュート塊をMS培地+スクロス 30 g/l+クラフォラン 500 mg/l+カナマイシン 0~100 mg/lの固形培地へ移植してカナマイシン耐性シュートを分化させた。1カ月間にわたって、カナマイシンを添加した培地上で伸長したシュートを順次1本ずつ切り取り、個体識別してMS培地+スクロス 30 g/l+クラフォラン 300 mg/l+カナマイシン 0~100 mg/lの培地上で培養し、発根を指標にして選抜を行った。

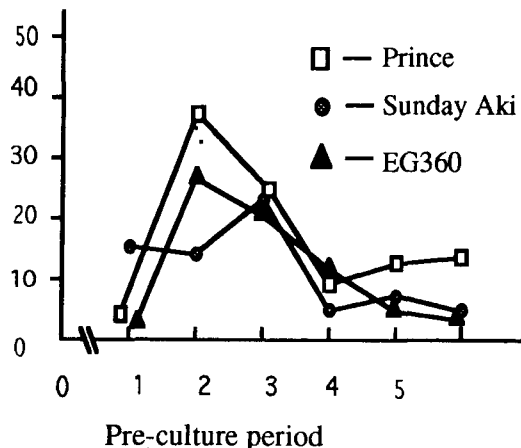


Fig. 3-1 Effect of pre-culture period on shoot regeneration in melon explants. Medium containing 50mg/l kanamycin. *; (No. of explants with shoot regeneration/Total no. of explants)×100

2. 結 果

品種‘プリンスメロン’を用いた場合、カナマイシン耐性シュートの再生率は前培養を2日間行った区で最も高く、3日以上行った区では著しく低下する傾向にあった (Fig. 3-1)。この結果は、2日間の前培養が形質転換効率を向上させたことを示している。TiプラスミドからのT-DNA領域の切り出しには*vir*遺伝子の活性化が必要であり、その活性化には植物細胞の存在⁵²⁾や、細胞が放出するシグナル物質が深く関与していることが報告されている⁵³⁾。つまり、外植片がシグナル物質を放出できるような生理状態にあるか否かは、形質転換効率を左右する重要な要因であると考えられる。この点において本実験で使用した植物体再生系の外植片である完熟種子は、葉片等に比べ代謝活性が低く、そのまま使用したのでは*vir*遺伝子を活性化するような物質の放出量は少ないと考えられた。そこで*A. tumefaciens*と共存培養する以前に、外植片である完熟種子を前培養し、その代謝活性の活発化を試みた。この予想は上述の結果と一致し、用いた品種全てにおいて前培養を行わない区よりも前培養を1~2日間行った区の方が、カナマイシン耐性シュートの再分化率が高まった。3日以降再分化率が低下する原因は、メロンにおけるリーフディスク法の場合の再分化率が低い原因と同様、個体の成長段階が進むに伴い、細胞の再分化能が低下するのではないかと考えてい

る。FANG らが報告したメロンの形質転換⁵⁴⁾では、発芽後5日目の展開した子葉を外植片として使用することにより、*vir* 遺伝子の活性化の問題を克服している。しかし、発芽率による損失や発芽後の子葉を外植片とすることによる再分化率の低下を考慮すれば、再分化率の高い完熟種子子葉部を用い前培養を行う方が効率的であろう。

カナマイシンによる効果的な選抜手順は要約すると次のようになる。

- 第1次選抜：シュート再生用培地+カナマイシン
50 mg/l
- 第2次選抜：シュート伸長用培地+カナマイシン
100 mg/l
- 第3次選抜：発根用培地+カナマイシン
75~100 mg/l

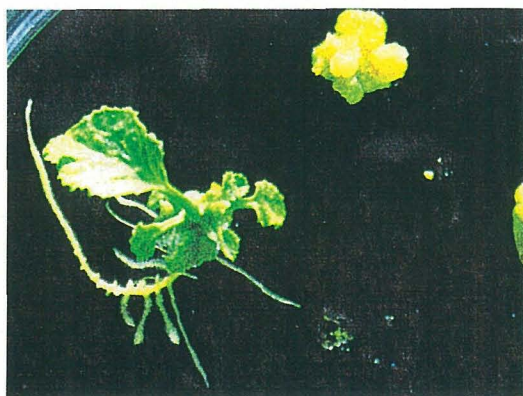


Fig. 3-2 Selection of kanamycin resistant plant in the medium containing 100mg/l kanamycin.

形質転換処理を行った外植片は、*A. tumefaciens* のバクテリアとしての影響や除菌のための抗生物質の影響を受け、健全な外植片とは異なるカナマイシン感受性を持つと考えられる。*A. tumefaciens* と共

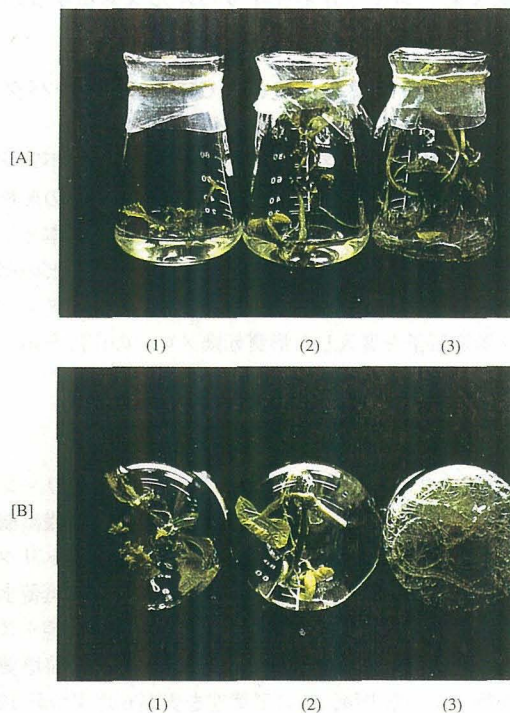


Fig. 3-4 [A] Shoot elongation on the medium containing 100mg/l kanamycin. [B] Rooting in the medium containing 100mg/l kanamycin. (1) Control(Non-transformant). (2) Escaping(Non-transformant). (3) Transformant.

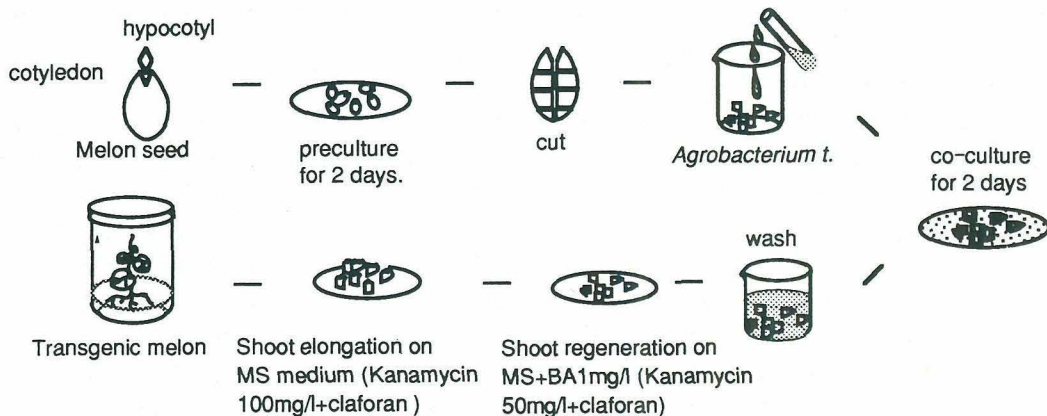


Fig. 3-3 Protocol of transformation in melon.

存培養した直後では、カナマイシン濃度を 50 mg/l に抑えても第 1 次選抜として十分な効果が得られた。これを 100 mg/l とする実験も行ったが、50 mg/l よりも全体として得られるカナマイシン耐性シュートの数は減少することから、この時点で強い選抜圧をかける必要はないと考えられた。第 2 次選抜では地上部がカナマイシンに比較的敏感でないことを考慮し、選抜圧を強めることが重要であった。第 3 次選抜は発根の有無という明確な選抜基準で行った (Fig. 3-2)。切り取ったシュートの発根時におけるカナマイシン感受性は 50~100 mg/l (第 3 章参照) であったが、50 mg/l でも移植後速やかに発根するものは形質転換植物であった。しかし、大量に繰り返して行う形質転換実験では 75~100 mg/l のカナマイシン濃度が最も適当であった。

以上の結果、本実験で用いた品種‘プリンスメロン’での最も効率的な形質転換方法を Fig. 3-3 にまとめる。この方法を用いて形質転換処理約 3 カ月後に‘プリンスメロン’のカナマイシン耐性個体を 21 個体得た (Fig. 3-4)。「グリーンパール」では得られた形質転換体が数個体と少なく、上述のような効率のよい形質転換法を確立するに到らなかった。また、‘サンデー秋’では形質転換体を得ることができなかった。

II. カナマイシン耐性メロンにおける CMV 外被タンパク質遺伝子の検出

得られたカナマイシン耐性植物の DNA を抽出し、ゲノム中に CMV 外被タンパク質遺伝子が組み込まれていることを PCR 法⁵⁾とサザンハイブリダイゼーション法を用いて確認した。

1. 材料及び方法

得られたカナマイシン耐性個体の葉と対照区の葉を採取し、生重を測定した。植物体からの DNA 抽出は、Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) を用いた方法⁵⁾に従った。RNA 分解酵素で処理した後、蛍光分光光度計で紫外線吸光度を測定し、DNA の濃度を換算した。この DNA 試料を用いて PCR 法による増幅を行った。CMV 外被タンパク質遺伝子の特定領域配列の 5' 側と 3' 側に相補的な、25 塩基の 2 種のオリゴヌクレオチドプライマー (3' 側用と 5' 側用) を DNA 合成機 (ABI 社) で合成した。反応液は、エッペンドルフチューブ (0.5 ml 用) 中

で以下の様に調製した。

DNA 試料	0.1 μg
プライマー	最終濃度各 1 μM
4 種のデオキシヌクレオチド	最終濃度各 200 μM
10×反作用緩衝液	4 μl
酵素 (Taq polymerase)	1 単位~4 単位

最終容量を 40 μl になるように水を加え調整

混合後、反応中の蒸発を防ぐため混合液の上にミネラルオイル 20 μl を重層した。

本実験のプライマー配列は、

CMV 5 : 5'-CTTTCGCGACTTAACAAGACGTTAG-3'

CMV 6 : 5'-CTTCAGACAGTTTATAGCAGAACTG-3'

を用いた。Tm 値は $4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$ として近似されるので、この式に従って計算したところ 63°C となった。この点を考慮して 52°C、48°C 並びに 44°C の予備的な実験を行ったところ、48°C で予想される DNA 断片のみが増幅され、非特異的な DNA 断片の増幅が観察されなかったため、反応条件を以下のように設定した。

① Denature	92°C	2 分間
② Annealing	48°C	2 分間
③ Extention reaction	72°C	3 分間

以上の反応を 25 サイクル行った。反応が終了した後、表面のミネラルオイルを除去し、1 μg/ml 臭化エチジウムを加えた 1.5% 低融点アガロースゲルで電気泳動を行った。その後紫外線照射下で DNA 断片を確認後、このゲルを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。

2. 結 果

PCR による増幅の結果、カナマイシン耐性個体の DNA を鋳型とした 4 個体の試料から、2 つのプライマー間で特異的に増幅される 620 塩基対の DNA 断片が確認された (Fig. 3-5)。非形質転換体の試料では、増幅された DNA 断片は確認されなかった。また、DNA の代わりに蒸留水を分注した試料でも DNA 断片は検出されず、試料の混入の可能性も否定することができた。従って、この 620 塩基対の DNA 断片は CMV 外被タンパク質遺伝子の増幅による産物と考えられ、DNA 断片が検出された個体での CMV 外被タンパク質遺伝子の組み込みが確認

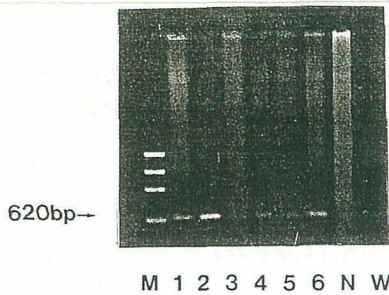


Fig. 3-5 Detection of CMV coat protein gene by electrophoresis of PCR-DNA.
M: Molecular size marker, Φ x174/HaeIII.
1-6: Transformants.
N: Non-transformant.
W: Water.

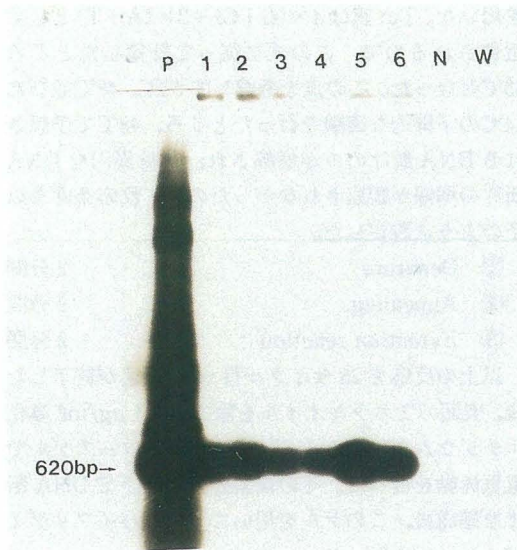


Fig. 3-6 Detection of CMV coat protein gene by Southern hybridization. 1-6: Transformant. N: Non-transformant. W: Water.

された。DNA断片が紫外線照射下で検出されなかった残りの2つの試料については、サザンハイブリダイゼーションの結果、他の形質転換体と同様のシグナルが検出された (**Fig. 3-6**)。非形質転換体及びDNAの代わりに蒸留水をいれた試料からはシグナルは確認されなかった。また、シグナルは、620塩基対の1本のみで、これからPCR法によって検出されたDNA断片が、CMV外被タンパク質遺伝子の増幅されたものであることが確認された。

以上の結果から供試した全てのカナマイシン耐性個体にCMV外被タンパク質遺伝子が組み込まれていることが明らかになった。

III. 免疫学的方法によるCMV外被タンパク質遺伝子の翻訳産物の検出

導入した遺伝子の植物体中での発現をDot-immuno binding Assay (DIBA) 法^{57,58)}により調査した。この方法は、現在、植物ウイルスの定量的検出法として広く普及している酵素抗体法であるエライザ法 (ELISA: enzyme-linked immuno sorbent assay, 第6章参照)の反応原理に従って開発された簡便な抗原タンパク質検出法である。

1. 材料及び方法

DIBA法の手順は以下の通りである。

- 1) 形質転換体及び非形質転換体の葉0.1gを、同量の緩衝液 (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8, グリセロール 10%, メルカプトエタノール 5%, ラウリル硫酸ナトリウム 0.1%, pH 6.8) で摩砕する。
- 2) 摩砕液を5分間煮沸する。
- 3) 高速微量遠心機を用い 15,000 rpm, 10分間遠心する。
- 4) 上清をTE緩衝液で10倍段階で希釈し、予めTBS緩衝液 (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, 塩化ナトリウム 500 mM, pH 7.5) に浸漬しておいたニトロセルロースメンブレンに2 μ lずつスポットし、風乾する。
- 5) このメンブレンを2%の仔ウシ血清アルブミン (BSA), 2%のPVP溶液でブロッキングし、試料をメンブレンに固着させる。
- 6) 一次抗体であるCMV外被タンパク質のポリクローナル抗体 (ウサギ) を反応させ、ブロッキングに用いた緩衝液で洗浄する。
- 7) 2次抗体であるアルカリ性ホスファターゼで標識した抗ウサギ・イムノグロブリン (IgG, シグマ社) を反応させ、最後に発色剤 (ニトロブルーテトラゾリウム 0.33 mg/l, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate-p-toluidine salt 0.17 mg/l) を用いて処理する。

陽性対照の基準値として同様に10倍段階で希釈した純化CMVを同様の手順で反応させた。

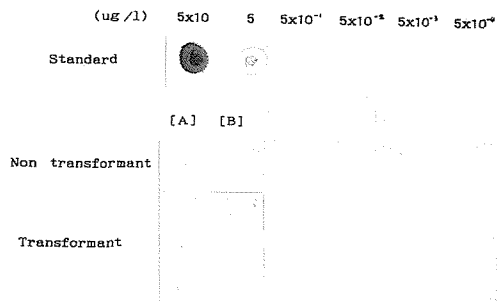


Fig. 3-7 Detection of CMV coat protein by Dot-immuno binding assay. Standard: purified CMV. [A]: Undiluted solution. [B]: 10-fold diluted solution. $2\mu\ell$ per spot.

2. 結 果

検出結果を Fig. 3-7 に示した。非形質転換体では観察されない発色点が形質転換体の試料から検出され、植物体内で外被タンパク質が生産されていることが判明した。このことから導入した遺伝子がメロンの細胞中で翻訳されていることが明らかとなった。また、メンブレン上の発色点の大きさや強度に個体間で差があり、発現量に差があることが判明した。これは、外来遺伝子の染色体上の組み込み位置による差異、いわゆる位置効果 (position effect)⁵⁹⁾ である可能性も考えられる。この点に関しては導入された遺伝子の染色体上の組み込み位置の構造を明らかにするなどの更に詳細な検討が必要である。

IV. 考 察

本章では CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出について、効率の良い培養及び検出の 2 つの点を中心に述べた。すなわち、第 1 章では形質転換のための植物体再生系として不定芽培養系が最適であることを述べたが、本章ではこれを更に改良し、効率の良いものとした。具体的な改良については第 1 節の考察の通りであるが、メロンにおける形質転換体の作出は全体として精細な観察を必要とした。現在多くの栽培植物において形質転換体が作出されているが、いずれも熟練した培養研究者の手によるものであるか、あるいは協力によるものであるといえる。

本研究で確立した方法は、品種「プリンスメロン」に最適なものであって、必ずしも他の品種に適すとは限らないことが判明し、成長調節物質や抗生物

質に対する感受性が品種間で異なることが明らかになった。

作出した形質転換体の DNA レベルでの解析に用いた、PCR-サザンハイブリダイゼーション法は、多くの研究で外来遺伝子の検出に用いられており、その簡便さから主流になりつつある。しかし、PCR 法には、ゲノムに組み込まれた遺伝子のコピー数が決定できないという大きな問題点がある。コピー数の決定を行い、1 コピーの個体を選抜しなければ、後代における遺伝解析が困難になることは事実であるが、解析の難易度と引き換えに、1 コピーにこだわり抵抗性の弱い個体を研究に用いることは本来的な目的からそれることになる。本研究の結果から、多くの形質転換体を作成して 1 コピーで抵抗性の強い個体を選抜し、あるいは多コピーの個体と比較することで遺伝的な解析を行うのが望ましいと考えている。

以上のように、完熟種子子葉部からの不定芽再生系を用いて効率の良いメロンの形質転換系を開発すると共に、CMV 外被タンパク質遺伝子を発現する形質転換メロンを作成した。

第 4 章 キュウリモザイクウイルス外被タンパク質遺伝子導入メロンの CMV 抵抗性

ウイルスの外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換体のウイルス病抵抗性はいくつかのウイルス種について報告されており、多くの場合、接種葉における 1 次感染の抑制が観察されている⁶⁰⁾。また、接種葉で感染が成立しウイルスが増殖した場合でも、ウイルスの細胞間移行や組織間移行が阻害され、全身感染が抑制される例も報告されている⁶¹⁾。しかしながら、これらのウイルス病抵抗性が形質転換体に必ずしも付与されるとは限らない。この原因は導入した外被タンパク質遺伝子の発現にあるという報告もあるが⁶²⁾、外被タンパク質遺伝子によるウイルス病抵抗性の機構が解明されていないため、未だ結論を得ていない。本研究で作出した CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンでは、導入した遺伝子が発現し、外被タンパク質が生産されていることを第 3 章において確認した。本章ではこの形質転換体の CMV 抵抗性について調査した。

I. 接種検定による形質転換メロンの CMV 抵抗性

自然状態下での CMV の感染は主に媒介昆虫であるアブラムシによるものであり⁶³⁾, 実質的な CMV 抵抗性を検定するには, 作出した形質転換体を野外の圃場において対照区と比較調査することが理想的である。形質転換植物を用いた実験が日本よりも先行して行われているアメリカ合衆国では, 既に外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換体の野外試験が行われている。例えば, ジャガイモウイルス X (PVX), ジャガイモウイルス Y (PVY) の外被タンパク質遺伝子を導入したトマトでは, アブラムシ伝搬による圃場でのウイルス抵抗性が報告されている^{64,65)}。また, CMV については形質転換キュウリを用いた野外での試験が行われ, 対照区に比べ高い CMV 抵抗性が報告されている⁶⁶⁾。一方, 日本においては形質転換体の野外栽培は段階的な実験を経た後でなければ認められていない。また, ウイルスの発病は接種条件に大きく左右されるので, 第一段階としては温度などの諸条件の安定した閉鎖系実験施設内で, 形質転換メロンの CMV 抵抗性を調査した。

1. 材料及び方法

作出した形質転換体のうち M4, M5, M6, M7, 及び M8 を, また対照区として非形質転換体を鉢上げし, 地上部をビニールなどで覆って, 隔離温室 (25°C, 自然日長) において馴化した。根が活着した頃にビニールを取り, 葉数が 5~8 枚前後になった段階で純化した CMV-Y 系を 1 µg/ml, 及び 10 µg/ml の 2 段階の濃度でカーボラダムを用いて人工接種した。

接種後, 接種葉の黄化, 上葉のモザイクの発現, 並びに葉脈透過症状などを発病の指標として, 発病の推移を調査した。

2. 結果

発病の推移についての調査結果を Table 4-1 に示した。CMV 濃度が 1 µg/ml の場合, 非形質転換体では接種後 3 日目から発病したのに対し, 形質転換体では全ての株で 20 日目まで発病が抑制された。CMV 濃度を 10 µg/ml に高めた場合では, 非形質転換体が 3 日目から発病したのに対し, M6 で 1 日の, また M4, M5 及び M8 で 2 日の発病の遅延が観察された。

Table 4-1 Development of symptoms after inoculation with CMV in primary transformants.

Plant /line ^y	CMV (µg/ml)	Symptom development ^z				
		Days after inoculation				
		3	4	5	20	46
C1	1	+	+	+	+	+
M4	1	-	-	-	-	-
M5	1	-	-	-	-	-
M6	1	-	-	-	-	-
M7	1	-	-	-	-	+
M8	1	-	-	-	-	-
C2	10	+	+	+	+	+
M4	10	-	-	+	+	+
M5	10	-	-	+	+	+
M6	10	-	+	+	+	+
M7	10				NT	
M8	-	-	+	+	+	+

^y C: Non-transformant, M: Transformant.

^z + : Symptom developed, - : No symptoms.

以上の結果から, CMV 外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換メロンに CMV 抵抗性が付与されたこと, 接種濃度を高めても発病が遅延すること, 抵抗性の程度には個体差があることなどが判明した。

II. 他品種との CMV 抵抗性の比較

形質転換体の CMV 抵抗性の程度を, ウイルス病抵抗性の育種母本として用いられている品種や, 市販品種などの持つウイルス病抵抗性の程度と比較した。これらの結果から形質転換体の圃場での抵抗性を推定するとともに, 育種母本としての利用の可能性を探る一助とすることにした。

1. 材料及び方法

形質転換体は前節の接種検定で CMV 抵抗性を示した M5 系統を用いた。ウイルス病抵抗性育種母本としては, 日本で長年ウイルス病抵抗性育種素材として用いられてきた 'ミータンカン', その 'ミータンカン' より農林水産省野菜茶業試験場において育成されたウイルス病抵抗性素材の中間母本である '安濃 1号' 及び '安濃 3号', 並びに福島県の在来品種でウイルス病抵抗性を持つといわれている '山都瓜' の 4 品種を用いた。市販品種としては, 形質転換体と

同じ‘プリンスメロン’ (サカタのタネ)、ネットメロンである‘グリーンパール’ (トキタ種苗) 並びにアールスフェボリット系の‘サンデー秋’ (横浜植木) を用いた。形質転換体は前節と同様の方法で鉢上げし、他の品種は播種して、両者が同程度の生育段階となった苗 (本葉5~8枚程度) に純化 CMV-Y 系をカーボラダムを用いて人工接種した。接種濃度は $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ とし、栽培は隔離温室において、 25°C 、自然日長下で行った。接種後 30 日目に上葉のモザイク症状や葉脈透過などを発病の指標として調査した。

2. 結 果

発病調査の結果を Table 4-2 に示した。接種後 30 日目において発病しなかったのは、形質転換体 M5 系統と‘ミータンカン’のみであった。その他のウイルス病抵抗性品種及び市販品種は、発病程度に差がみられ、市販品種に比べ、ウイルス病抵抗性品種、とくに‘山都瓜’の病徴は軽いものであった。しかし、30 日目の観察では全てが発病した。M5 系統と共に

発病しなかった抵抗性品種‘ミータンカン’は、その形態からもわかるように他の品種とは遺伝的に著しく異なるものと考えられる。‘ミータンカン’は 1967 年、金沢ら⁶⁷⁾によって見出されたウイルス病抵抗性品種で、中国から導入されたものである。その後、高田ら⁶⁸⁾によって、そのウイルス病抵抗性が他の品種との F1 において不完全優性に現れ、複数の同義遺伝子で支配されていること、低温下では罹病品種との抵抗性の差が不明瞭になることなどが報告されている。圃場ではかなり強いウイルス病抵抗性を示すと報告されている。‘安濃 1 号’及び‘安濃 3 号’はこの‘ミータンカン’を片親として高田ら⁶⁹⁾が十数年を経て育成したウイルス病抵抗性の中間母本である。外観、肉質、糖度とも一定の良形質を保持しており、一部の品種で片親として利用されている。しかし、今回の実験では形質転換体 M5 系統に比べ抵抗性は低い結果となった。

以上のことから、形質転換体 M5 系統の持つ CMV 抵抗性は、ウイルス病抵抗性育種の現場において用いられている中間母本、‘安濃 1 号’、‘安濃 3 号’や市販品種に比べ高いものであることが判明し、育種母本としての利用が可能であることが実証された。

Table 4-2 Comparison of symptoms after inoculation with CMV^y

Cultivar/Plant line	Plant Symptom ^z no.		
Non-transformant C1(cv. prince)	1 +		
	2 +		
Transformant M5(cv. prince)	1 -		
	2 -		
Virus resistant cv. Mitankan	1 -		
	2 -		
	Ano-ichigo	1 +	
		2 +	
	Ano-sango	1 +	
		2 +	
	Yamatouri	1 +	
		2 +	
	Commercial cv. Prince	1 +	
		2 +	
		Green pearl	1 +
			2 +
Sunday Aki		1 +	
		2 +	

^y Symptoms were scored 30 days after inoculation with CMV.

Concentration of CMV solution was $1 \mu\text{g}/\text{ml}$.

^z + : Symptoms developed., - : No symptoms.

III. 考 察

本章では、CMV 外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換メロンの CMV 抵抗性の確認とその他品種との比較調査を行った。本実験に用いた形質転換体の CMV 抵抗性程度は、ウイルスの接種濃度により左右されたが、非形質転換体に比べ有意な差を示した。前述した通り、このような外被タンパク質によるウイルス病抵抗性は、TMV、CMV などウイルス種を問わず報告されている。しかし、抵抗性が導入遺伝子の翻訳産物である外被タンパク質由来であるという報告⁴²⁾や、外被タンパク質そのものではなく、転写産物の RNA ではないかという報告⁷⁰⁾など違いがあり、抵抗性の機構はウイルス種により異なると考えられる。

接種濃度による抵抗性の差異は、CMV とは異なるウイルスグループの TMV や、アルファルファモザイクウイルス (AIMV)、PVX などの外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換タバコ⁷¹⁾においても報告されている。しかし、本研究と同じ CMV の外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換タバコで

は、接種濃度を $5 \mu\text{g/ml}$ から $25 \mu\text{g/ml}$ へと高めた場合、抵抗性程度がほとんど変化しなかったと報告されている⁷²⁾。この結果の差異は、供試した材料や接種濃度が異なるので比較することは難しいが、ウイルス濃度に対する供試材料の感受性の差や、あるいは接種条件や栽培温度などの違いであると考えられる。また、本実験において形質転換体の系統によるウイルス病抵抗性の差異が確認され、他の報告においても同様の現象が確認されている。この差異は発現している外被タンパク質量と相関があるという報告⁷³⁾や無関係であるという報告⁴⁴⁾があり、現時点では結論を得ていない。

次に、確認した CMV 抵抗性が実際の抵抗性育種に応用される可能性を推定するため、市販されている品種や CMV 抵抗性品種の持つ本来の抵抗性と比較調査した。その結果、形質転換体は極めて強い抵抗性を持つといわれる‘ミータンカン’を除く全ての供試品種に比べ抵抗性を示した。従来からあるウイルス病抵抗性品種と、外被タンパク質遺伝子の導入によるウイルス病抵抗性とをこのように比較した報告は、ほとんどないが、唯一 GONSALVES ら⁶⁹⁾が、CMV 外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換キュウリと抵抗性品種のキュウリを用いて比較調査を行った報告があり、その報告の中で形質転換体が抵抗性品種を上回るウイルス病抵抗性を示したと述べている。本実験において作出したメロンは、ウイルス病抵抗性については‘ミータンカン’のそれと同程度であったが、他の形質において明らかに優れている‘プリンスメロン’であり、その育種上の有用性は高いものと考えられる。

以上の結果から、CMV 外被タンパク質遺伝子を持つ形質転換体メロンが非形質転換体よりも強い CMV 抵抗性を持つこと、また、従来から育種に用いられてきたウイルス病抵抗性品種と同等あるいはそれ以上の CMV 抵抗性を持つことが明らかとなり、形質転換体の持つ CMV 抵抗性が育種母本として実用化に耐え得るものと考えられた。

第5章 キュウリモザイクウイルス外被タンパク質遺伝子導入メロンの自殖後代の特性

導入した外来遺伝子の遺伝とその発現の遺伝は、あらゆる形質転換体において、育種への応用の可能性を左右する問題である。既に、タバコの形質転換体の後代で、導入した遺伝子がメンデルの遺伝法則

に従うと報告されている⁷⁴⁾。しかし、その発現については、後代において抑制されるという報告⁷⁵⁾や発現量が当代と一致しないという報告⁷⁶⁾などもあり不明な点が多い。ここでは作出した形質転換体の自殖後代を作出し、導入した遺伝子の検出、カナマイシン耐性並びに CMV 抵抗性について検討した。

I. 自殖第1代における CMV 外被タンパク質遺伝子の検出とカナマイシン耐性

1. 材料及び方法

形質転換体当代を隔離温室 (25°C , 自然日長下) 栽培し、人工受粉して果実を得た。この果実の種子を次亜塩素酸ナトリウムを用いて常法により殺菌、洗浄し、 $1/2$ MS 培地+スクロース 30 g/l の固形培地に無菌播種した。播種後 10 日前後で発芽率を調査した後、それぞれを個体識別し、節部を培養してクローンを数個体ずつ作出した。その中の 1 クローンは、カナマイシン耐性を調査するため、 $1/2$ MS 培地+スクロース 30 g/l +カナマイシン 100 mg/l の固形培地に地上部のみを切り取って移植した。移植後 2 週間にわたって発根の有無や地上部の黄化を調査した。また、他のクローンからは DNA を抽出し、PCR 法とサザンハイブリダイゼーション法を用い

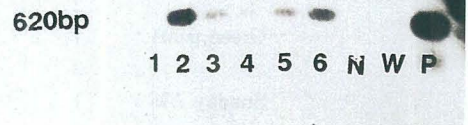


Fig. 5-1 Detection of CMV coat protein gene by PCR-Southern hybridization.
1-6: Transformant.
N: Non-transformant.
P: YI25 plasmid. W: Water.

Table 5-1 Segregations of transgenes in progenies after self-pollination of transgenic melon plants.

Plant line ^x	No. of plants tested	Kanamycin resistance ^y		CMV coat protein gene ^z			
		R	S	P	N	χ^2	3:1
M4	10	5	5	8	2	0.13	(0.5 < P < 0.75)
M5	12	6	6	10	2	0.44	(0.5 < P < 0.75)
M6	7		NT	5	2	0.04	(0.75 < P < 0.90)
C	6	0	6	0	6	2.0	(P < 0.01)

^x M: Progenies of transformants, C: Progeny of non-transformant.

^y R: Resistance to kanamycin(100mg/ℓ), S: Sensitive to kanamycin(100mg/ℓ).

^z P: Positive (CMV coat protein gene sequence was detected), N: Negative (CMV coat protein gene sequence was not detected).

てCMV外被タンパク質遺伝子の検出を行った。

2. 結 果

形質転換体当時は、形態、生育特性、開花特性、着花特性などが非形質転換体とほとんど差異はなかった。花粉稔性も正常で、通常の植物体と同様に、受粉後約40日前後で種子のある果実を着生した⁷⁾。CMV外被タンパク質遺伝子は、形質転換体M4系統で10個体中8個体に、M5系統で12個体中10個体に、M6系統で7個体中5個体に検出された(Fig. 5-1, Table 5-1)。供試個体数が少数であるが、外被タンパク質遺伝子が検出された個体と検出されなかった個体との比は3:1と見なし得る値であり、導入した遺伝子は1遺伝子座に挿入されたと推察された(Table 5-1)。

カナマイシン耐性調査の結果、M4系統で10個体中5個体が、M5系統で12個体中6個体がカナマイシン耐性を示した。M4及びM5系統ではいずれも、外被タンパク質遺伝子が検出されているにもかかわらずカナマイシン耐性を示さない個体が観察された(Table 5-1)。この原因は①減数分裂時における組換えなどの原因で、カナマイシン耐性遺伝子のみ脱落した後代が出現した、②カナマイシン耐性遺伝子も外被タンパク質遺伝子同様、存在しているが、発現が抑制されている、という2つの可能性が考えられる。この2つの原因は、双方とも十分起こり得ると考えられる。

①が原因であるとすれば、同時に、同一箇所に導入した2つの遺伝子が、ある確率で分離することになる。これは、形質転換体の実用化への支障と考えられている選抜マーカー遺伝子の除去という問題を、自殖後代において解決できる可能性を示唆して

いると言えよう。②が原因であるとすれば、カナマイシン耐性遺伝子と、外被タンパク質遺伝子のプロモーターとが異なることなども要因としてあげられる。しかし、この問題の解明にはさらに詳細な研究が必要であろう。

以上の結果から、*A. tumefaciens*によって導入した遺伝子が、形質転換体の自殖後代にも存在するとともに、且つ発現していることが明らかとなった。また、大半の個体において、外来遺伝子の有無はカナマイシン耐性の発現と一致するが、発現の抑制されている個体が少数ながら出現することも明らかになった。

II. 形質転換体自殖第1代のCMV抵抗性

1. 形質転換体自殖第1代におけるカナマイシン耐性個体の選抜とCMV抵抗性

1) 材料及び方法

前節で作出した形質転換体M5, M6, 並びにM7の自殖第1代の種子を無作為にとりだし、1/2MS培地+スクロース30g/ℓを基本としカナマイシン100mg/ℓ添加または、無添加の2種の固形培地上で発芽させ、選抜を行う区、行わない区の2区を設けた。その後、これら形質転換体の自殖後代と非形質転換体の自殖後代の幼植物体を鉢上げし、隔離温室で馴化した。葉数が5枚前後になった時点で、純化CMV-Y系2μg/mlをカーボランダムを用いて人工接種した。接種後、隔離温室(25°C, 自然日長下)において接種葉の黄化や上葉のモザイク症状、葉脈透過症状などを指標として、発病推移を調査した。

2) 結果

カナマイシン耐性を示した個体は通常の個体と同様に発芽し発根した。接種検定の結果、非形質転換

Table 5-2 Development of symptoms after inoculation with CMV in the progenies after self-pollination of transgenic melon plants.

Plant ^x line	Screening ^y	Total no. of plants tested	No. of plants with symptoms			
			Days after inoculation ^z			
			3	5	7	10
C1	—	5	4	5	5	5
C2	—	7	2	7	7	7
M5	—	5	0	2	2	2
M6	—	6	1	5	5	5
M7	—	5	4	4	4	5
M5	+	3	0	0	0	0
M7	+	5	1	3	3	4

^x C: Non-transformant, M: Transformant.

^y —: Without screening, +: With screening of kanamycin resistance on the medium containing 100mg/l kanamycin.

^z Concentration of CMV solution was 2 μ g/ml.



Fig. 5-2 Symptoms after inoculation with a solution of 2 μ g/ml of CMV in progeny after self-pollination of transformant.

[A]: Progeny after self-pollination of non-transformant. [B]: Progeny after self-pollination of transformant(M5).

体の自殖後代が5日以内に発病したのに対し、形質転換体の自殖後代では病徴発現が遅延したり、抑制されたりする個体が観察された(**Table 5-2**)。カナマイシン耐性調査で遺伝子の発現を予備的に確認した区では、しなかった区よりも病徴の抑制される個体が増加した。特に M5 系統では、選抜を行わなかった区において5個体中2個体が発病したのに対し、選抜を行った区においては、供試した3個体全てが接種後16日目の最終調査日まで発病しなかった(**Fig. 5-2**)。また、自殖第1代のCMV抵抗性は、親株である形質転換体の個体間の場合と同様、系統間

で差異が認められた。

以上の結果から、CMV外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換メロンの自殖第1代に対照区以上のCMV抵抗性が付与されたこと、カナマイシン耐性遺伝子が発現している個体では、CMV抵抗性を持つ可能性が高く、カナマイシン耐性の「予備」的調査でCMV抵抗性個体を効果的に選抜できることが明らかとなった。

2. 形質転換体自殖第1代の親系統間によるCMV抵抗性の比較

自殖後代の系統間におけるCMV抵抗性の差異をさらに明確にし、抵抗性の強い系統を選抜するため、接種検定の供試個体数を増やして抵抗性の調査を行った。

1) 材料及び方法

CMV抵抗性を確認した形質転換体M4, M5, 並びにM9系統の自殖第1代と非形質転換体自殖第1代の種子を無作為に20粒とりだし、1/2 MS培地+スクロース30g/l+カナマイシン100mg/lの固形培地上で発芽させ、カナマイシン耐性を調査した。カナマイシン耐性を示した個体は、鉢上げ・馴化し、隔離温室(25°C, 自然日長下)において栽培した。葉数が5~8枚前後になった時点で、純化CMV-Y系2 μ g/mlをカーボランダムを用いて人工接種した。その後、接種葉の黄化や上葉のモザイク症状、葉脈透過症状などを指標として発病の推移を調査した。

Table 5-3 Segregations of transgenes in progenies after self-pollination of transgenic melon plants.

Plant line ^y	Total no. of plants tested	Kanamycin resistance ^z			
		R	S	χ^2	3:1
M4	23	20	3	1.75	(0.10 < P < 0.25)
M5	20	1	4	0.3	(0.5 < P < 0.75)
M9	50	39	11	0.24	(0.5 < P < 0.75)
C	20	0	20	—	—

^y M: Progenies of transformants, C: Progeny of non-transformant.

^z R: Resistance to kanamycin (100mg/l), S: Sensitive to kanamycin(100mg/l).

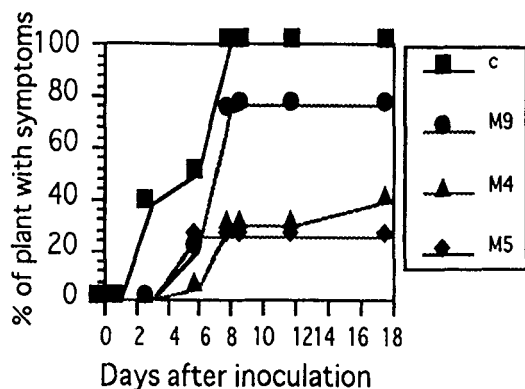


Fig. 5-3 Development of symptoms in progenies after self-pollination of transgenic and non-transgenic melon plants after inoculation with 2 μ g/ml CMV. C: control(non-transformant). M: transformant.

2) 結果

各系統間におけるカナマイシン耐性について

Table 5-3 にまとめた。M5 及び M9 系統では 75% 前後の個体がカナマイシン耐性を示し、耐性個体と感受性個体の分離比がほぼ 3:1 に近似する結果となった。また、M4 系統については、本調査ではこの比からやや逸れており、前節における調査では外被タンパク質遺伝子の分離比が 3:1 に一致していた。この原因については明らかではない。

選抜したカナマイシン耐性個体の発病の推移を **Fig. 5-3** に示した。対照区の非形質転換体後代は、接種後 3 日目から発病し始め、8 日目には全ての個体が発病した。これに対し形質転換体の後代は 3 日目では発病する個体は全く観察されず、接種後 6 日目

になって発病し始めた。しかし、M4 及び M5 系統の後代では 8 日目以降発病する個体が増加せず、接種後 18 日目でもそれぞれ 33%、25% と低い発病率を示した。

一方、形質転換体 M9 系統の後代では、カナマイシン耐性個体であるにもかかわらず、最終的に 74% の発病率であった。M9 の当代の CMV 抵抗性は他の系統に著しく劣るものではなかったため、後代においてカナマイシン耐性遺伝子の発現とは無関係に、外被タンパク質遺伝子の発現のみが抑制されている個体が出現した可能性もあると考えられた。

以上の結果から、本節 1. で示唆された後代における系統間の抵抗性程度の違いが明らかとなった。

3. 形質転換体自殖第 1 代の個体間における CMV 抵抗性の比較

抵抗性が比較的強かった M4 及び M5 系統の後代を個体識別して、その CMV 抵抗性を比較検討し、抵抗性の強い個体の選抜を試みた。

1) 材料及び方法

形質転換体 M4 及び M5、並びに非形質転換体の自殖第 1 代の種子を無作為に抽出し、1/2 MS 培地+スクロース 30 g/l+カナマイシン 100 mg/l の固形培地上で発芽させ、カナマイシン耐性を調査した。その後、それぞれを個体識別して、節部培養によりクローンを 10 個体前後作出した。そのうち 6~8 個体を鉢上げ・馴化し、隔離温室 (25°C, 自然日長下) において栽培した。葉数が 5~8 枚前後になった時点で純化 CMV-Y 系 2 μ g/ml をカーボランダムを用いて人工接種した。接種後、接種葉の黄化や上葉のモザイク症状、葉脈透過症状などを指標として発病の推移を調査した。

2) 結果

調査した個体のうちカナマイシン耐性を示した M4-1, M4-5, M4-11, M5-14, M5-27, 及び M5-39 と、対照区として用いたカナマイシン感受性を示した M5-35 並びに非形質転換体の自殖後代についての結果を **Fig. 5-4** に示した。非形質転換体及びカナマイシン感受性個体である M5-35 は、接種後それぞれ 4 日目、6 日目まで全てのクローンが発病した。これに対し、カナマイシン耐性を示した個体では発病が抑制され、特に M5-39 及び M5-14 では接種後 13 日目まで 0~25% と低い発病率であった。抵抗性については個体間で差が認められたが、全体的な傾向

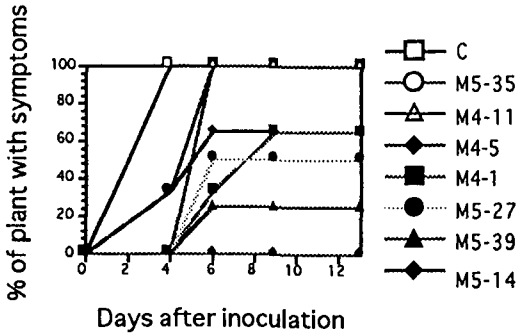


Fig. 5-4 Development of symptoms in progenies after self-pollination of transgenic and non-transgenic melon plants after inoculation with $2\mu\text{g}/\text{ml}$ CMV. C: control(non-transformant). M: transformant.

としては、M5系統の抵抗性がM4系統より強い結果となった。抵抗性がM5-14に次いで強い抵抗性を示したM5-39について再調査し、さらに長い期間、発病の推移を観察した。その結果、徐々に発病するクローンが増え、接種後31日目に72%まで増加した。M5-14は13日以後も発病するクローンが増加することはなかった。

以上の結果から、M5-14のクローンが、調査期間中1個体も発病せず、調査した個体中では最も強い抵抗性をもつことが明らかとなった。また、全体的にはM4系統の後代よりもM5系統の後代の方が強い抵抗性をもつことが示唆された。さらに、カナマイシン耐性を示さなかったM5-39が非形質転換体と類似した発病の推移を辿ったことから、本章第2節で示したカナマイシン耐性の発現とCMV抵抗性の発現との同調性を、本実験においては、逆の組合せにより再確認した。

III. 形質転換体自殖第2代におけるカナマイシン耐性個体の選抜とCMV抵抗性

自殖第2代におけるCMV外被タンパク質遺伝子の検出、カナマイシン耐性、さらにCMV抵抗性について調査するとともに、その安定性について検討した。

1) 材料及び方法

形質転換体M5の自殖第1代であるM5-16, M5-17及びM5-18の自殖によって得たそれぞれの後代の種子と、非形質転換体の自殖後代の種子から無作為に20粒から30粒をとりだし、1/2 MS培地+ス

Table 5-4 Segregations of kanamycin resistance in R2 progenies after self-pollination of transgenic melon plants.

Plant line	No. of plants tested	Kanamycin resistance ²		
		R	S	χ^2 3:1
M5-16	20	2	18	— (P<0.01)
M6-17	30	24	6	0.4 (0.50<P<0.75)
M5-18	20	14	6	0.26 (0.50<P<0.75)

² R: Resistance to kanamycin(100mg/l), S: Sensitive to kanamycin(100mg/l).

クロス 30 g/l+カナマイシン 100 mg/lの固形培地上で発芽させ、カナマイシン耐性を調査した。その後、これらの個体を鉢上げ・馴化を行い、隔離温室 (25°C, 自然日長下) において生育させた。葉数が5~8枚前後になった時点で、純化CMV-Y系2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ をカーボラダムを用いて人工接種した。接種後、接種葉の黄化や上葉のモザイク症状、葉脈透過症状などを指標として発病の推移を調査した。

2) 結果

カナマイシン耐性の調査結果をTable 5-4に示す。それぞれの系統においてカナマイシン耐性は差異が認められ、特にM5-16の後代ではカナマイシン耐性を示す個体が10%と低く、予想された1:1あるいは3:1の比から大きく離れる値であった。一方、M5-17及びM5-18では、カナマイシン耐性個体が75%前後観察され、ほぼ3:1の比に一致した。供試した個体の親株である自殖第1代のM5-16, M5-17並びにM5-18では、いずれも外被タンパク質遺伝子の検出とCMV抵抗性の調査が終了しており、導入遺伝子に関してホモ個体であるかヘテロ個体であるかのいずれかであることが判明していた。さらにこのカナマイシン耐性調査により、いずれもヘテロ個体であるものと推定された。また、M5-16の場合のみカナマイシン抵抗性を示す個体が少なく、導入した遺伝子の抑制が示唆された。この原因は、M9系統の自殖後代が低いCMV抵抗性を示し、外被タンパク質遺伝子の発現抑制が示唆された場合と同様ではないかと推察された。

CMV接種検定の結果をFig. 5-5に示した。非形質転換体の後代では接種後3日目から発病個体が現れ、8日目には全ての個体が発病した。これに対し、M5-18の後代では、12日目までに発病した個体が27%であり、発病の抑制が観察され、以後もこの値

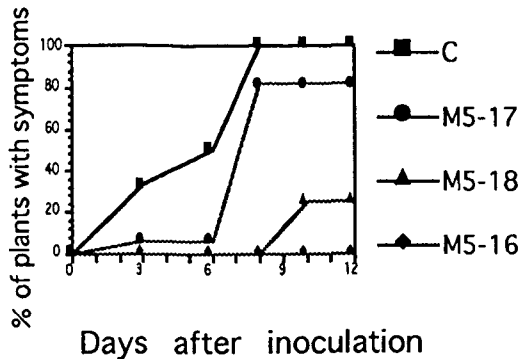


Fig. 5-5 Development of symptoms in R2 progenies after self-pollination of transgenic and non-transgenic melon plants after inoculation with 2 µg/ml CMV. C: control(non-transformant). M: transformant.

は増加しなかった。M5-17の後代は、結果的に83%の個体で発病したが、接種後8日目まで発病が抑制されていた。M5-16の後代はカナマイシン耐性個体が2個体と少なかったが、この2個体は調査期間中、発病が完全に抑制された。また、自殖第2代の形態はいずれも第1代同様、非形質転換体の自殖第2代とほとんど差異の無い正常な形態であった。

以上の結果から、形質転換体自殖第2代においても、第1代同様、カナマイシン耐性及びCMV抵抗性が現れることが明らかとなった。

IV. 考 察

本章において、作出した外被タンパク質遺伝子導入メロンの自殖後代における外被タンパク質遺伝子の確認とカナマイシン耐性の調査及びCMV抵抗性について明らかにした。*A. tumefaciens*を用いて植物体に導入した外来遺伝子の後代における検出と分離比については、すでにメンデルの遺伝法則に従うという報告がなされている。本研究で作出した形質転換メロンについては、外来遺伝子の検出と発現に関してほぼ3:1に分離したことから、導入した遺伝子が1コピーか、あるいは複数コピーの場合でも、染色体の1遺伝子座に挿入され、メンデルの遺伝法則に従うことが示唆された。

導入した遺伝子の発現については、カナマイシン耐性とCMV抵抗性という2種の生物学的検定法によって検証した。その結果、調査対象となったほとんどの個体では導入遺伝子が発現し、カナマイシン

耐性を示していたが、少数ながらカナマイシン感受性の個体が現れた。このことは導入遺伝子が親株で発現していても後代では発現しない個体が生じたか、あるいは同時に導入した2つの遺伝子が分離し、一方が脱落する可能性があることを示唆している。導入した外被タンパク質遺伝子の後代における発現量に関しては、形質転換タバコを用いた報告があり⁷⁶⁾、後代における発現量が当代と一致せず、個体間で変異のあることを示している。本実験においても、外来遺伝子の発現量に変異があり、発現量が低いためカナマイシン感受性と判断された個体があるものと推察された。

外来遺伝子の発現についての調査は、ノーザンブロット法によるmRNAの検出や、ウエスタンブロット法による外被タンパク質の検出といった直接的な方法を用いれば、さらに厳密な結果が得られるものと推測される。しかし、全ての検定個体について、カナマイシン耐性、CMV抵抗性の調査を行うことに加えて、それらの検定もを反復して行うことは困難であった。そこで、第一目的であったCMV抵抗性の検出に重点をおいて調査した。自殖第1代においては、カナマイシン耐性とCMV抵抗性は同様に現れたことから、同時に挿入した2つの遺伝子(カナマイシン耐性遺伝子及び外被タンパク質遺伝子)は同調的に発現することが明らかになった。従って、予めカナマイシン耐性を調査することにより外被タンパク質遺伝子の発現個体を選抜することが出来た。この点については、メロンの形質転換体で同時に挿入したカナマイシン耐性遺伝子とGus遺伝子の発現について調査した報告があり⁷⁸⁾、ほぼ同程度の発現率であるとされている。しかし、クローンを作出し全く同一の検定集団を用いた本研究のような調査ではないので、個々の個体の発現について2つの遺伝子が同じように発現しているかどうかは明らかではなかった。

CMV抵抗性は、親株間での抵抗性の違いと関係があるものと考えられた。このような抵抗性の系統間差が生じる原因については、発現している外被タンパク質量の違いによるか、または、導入した遺伝子の位置効果によるのではないかという議論があるが、外被タンパク質による抵抗性の機構が解明されていないために明らかになっていない。抵抗性の発現機構については、最近TMVにおいて、感染したウイルス粒子の増殖の第1段階である脱外被(un-

coating) とそれに続く複製 (この場合, cotranslational disassembly) を形質転換体中の外被タンパク質が阻害しているという報告があり⁷⁹⁾, CMV においても抵抗性機構の解明が待たれるところである。

本研究では自殖第2代において, 第1代同様外被タンパク質遺伝子の検出やカナマイシン耐性の確認を行ったところ, M5-16 系統でカナマイシン耐性個体が少数認められたが, 第1代で確認した分離比から大きく逸れるものであった。このほか, 外来遺伝子の発現が抑制されるという他の報告⁸⁰⁾があるが, これは未知の原因による同様の現象であるとも考えられ, その原因を明らかにするには, 圃場におけるさらに多くの個体を用いた遺伝解析が必要であろう。

以上のように, 本章においては, 形質転換体の自殖第1代及び第2代の後代において, 外被タンパク質遺伝子が発現することを確認し, それに伴って CMV 抵抗性も発現することを明らかにした。

第6章 形質転換メロンと他品種との交雑後代の特性

本章では形質転換体の育種素材としての調査をさらに進める目的で, 形質転換メロンと通常の栽培メロンなどとの交雑後代を作出し, この交雑後代の特性, 特にウイルス抵抗性について調査を行った。

I. 交雑後代の作出とその特性

1. 材料及び方法

形質転換体 M5 及びその自殖第1代である M5-14 並びに非形質転換体を花粉親として用いた。形質転換体 M5 は, 作出した形質転換体の中では強い CMV 抵抗性が認められた個体である。また, M5-14 は M5 と同様に, 形態的特性及び生育特性ともに非形質転換体の後代と著しい差異はなく, 形質転換体 M5 の自殖後代の中から選抜した強い CMV 抵抗性を持つものである。交雑に用いたウイルス抵抗性品種は, ‘ミータンカン’, ‘安濃1号’, ‘安濃3号’ 並びに ‘山都瓜’ である。また市販品種としては, 形質転換体と同じ ‘プリンスメロン’ (サカタのタネ), ネット系の ‘グリーンパール’ (トキタ種苗) 並びにアールスメロリット系の ‘サンデー秋’ (横浜植木) を用いた。M5 及び M5-14 は, 無菌培養していたクローン

芽させ, 隔離温室内で, 25°C, 自然日長下で生育させて実験に用いた。交配は, 開花前日に両性花を除雄し, 当日開花した M5, M5-14 並びに非形質転換体の花粉を午前中に人工受粉した。交配によって得た果実から種子を採種し, 種皮を剥いで常法により殺菌, 洗浄した。その後 1/2 MS 培地+スクロース 30 g/l の固形培地に播種して, 発芽率を調査した。この交雑後代は鉢上げ・馴化し, 隔離温室 (25°C, 自然日長下) において形態及び生育特性を観察した。

2. 結 果

M5 及び M5-14 のいずれも非形質転換体と著しい違いのない正常な生育を示し, 開花特性にも差異は認められなかった。また, 稔性についても, M5, M5-14 とも対照区の非形質転換体と比べ差異はなかった。形質転換体の花粉を交配して得た果実は, 非形質転換体の花粉を用いた対照区の果実と同様の発育を続け, 交配後約 40 日程度で収穫することがで

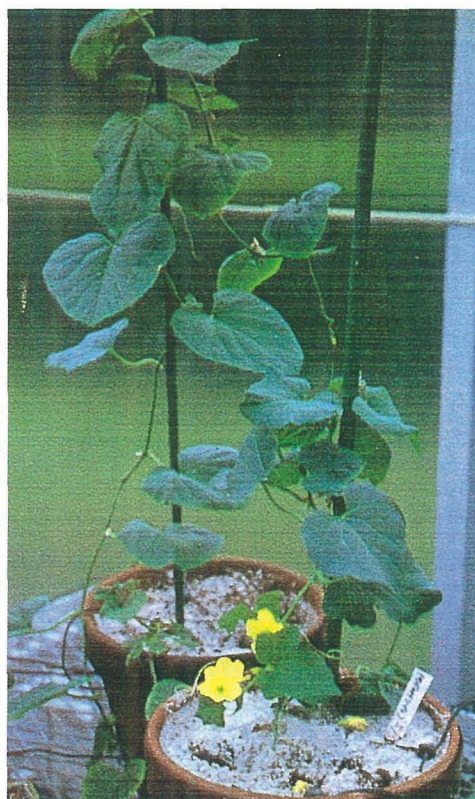


Fig. 6-1 Progenies of cross-pollination of transformant in isolation greenhouse.

きた。果実からは、交配組み合わせに関係なく、種子を得ることができた。発芽率を調査したところ、対照区と同程度の88~100%の発芽率を示した。これら交雑後代は、形態的特性及び生育特性に関しては非形質転換体と交雑後代に著しい違いは観察されなかった (Fig. 6-1)。

以上のことから、形質転換体と通常の栽培品種との交雑においては、特に支障となる問題点がないこと、また、非形質転換体と通常の栽培品種との交雑で得た後代と著しい違いのない交雑後代の作出が可能であることが明らかになった。

II. 交雑後代におけるカナマイシン耐性の調査とCMV外被タンパク質遺伝子の検出

本節では、前節で述べた形質転換メロンと通常の栽培メロンとの交雑後代におけるCMV外被タンパク質遺伝子の検出とカナマイシン耐性について調査した。

1. 材料及び方法

前節において述べた交雑後代の種子を無作為に10~20個抽出し、次亜塩素酸ナトリウムを用いて殺菌し、洗浄を行った。その後1/2 MS培地+スクロース

30 g/ℓの固形培地に無菌播種した。その後、それぞれを個体識別し、節部培養で数個体ずつクローンを作成した。その中から1つのクローンを選んでその地上部を切り取り、1/2 MS培地+スクロース30 g/ℓ+カナマイシン100 mg/ℓの固形培地に移植して、カナマイシン耐性について調査した。他のクローンからはDNAを抽出し、PCR法とサザンハイブリダイゼーション法を用いてCMV外被タンパク質遺伝子の検出を行った。

2. 結 果

カナマイシン耐性及びCMV外被タンパク質遺伝子の検出結果をTable 6-1にまとめた。カナマイシン耐性を調査した結果、M5及びM5-14と交雑した後代には、対照区にはないカナマイシン耐性個体が観察された。M5を花粉親とした場合、カナマイシン耐性個体と感受性個体の比は、'ミータンカン'との組み合わせを除く全ての組み合わせにおいて、予想された1:1の比にほぼ一致した。M5-14は、外被タンパク質遺伝子に関してホモ個体であるかヘテロ個体であるか判明していなかったが、カナマイシン耐性を示す交雑後代の比は1:1で観察されたため、ヘテロ個体であると推察された。

Table 6-1 Detection of kanamycin resistance and CMV coat protein gene in progenies after cross-pollination of transgenic melon plants.

Cross combination/ Cultivar ^x	Total no. of plants tested	Kanamycin resistance ^y		CMV coat protein gene ^z	
		R	S	P	N
Ano-sango×M5	19	11	8	13	6
Mitankan×M5	25	18	7		NT
Prince melon×M5-14	10	5	5	6	4
Green pearl×M5-14	9	4	5	5	4
Sunday Aki×M5-14	10	5	5	5	5
Yamatouri×M5-14	9	5	4	5	4
Ano-sango	12	0	12	0	12
Mitankan	6	5	1	0	6
Prince melon	13	0	13	0	13
Green pearl	3	0	3	0	3
Sunday Aki	2	0	2	0	2
Yamatouri	3	0	3	0	3

^x M5: transformant(cv. Prince melon), M5-14: Progeny of M5.

^y Kanamycin resistance was scored 3 weeks after culture initiation on the medium containing 100mg/ℓ kanamycin.

R: Resistance to kanamycin(100mg/ℓ), S: Sensitive to kanamycin(100mg/ℓ).

^z P: Positive (CMV coat protein gene sequence was detected), N: Negative (CMV coat protein gene sequence was not detected).

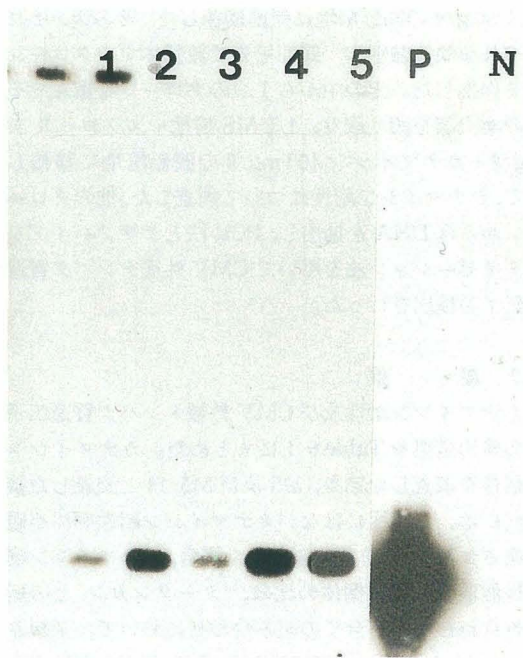


Fig. 6-2 Detection of CMV coat protein gene in progenies after cross-pollination of transformants by PCR-Southern hybridization. 1-5; Progenies after cross-pollination of transformants. N; Progeny after cross-pollination of non-transformants. P; YI25 plasmid.

また、交雑後代のCMV外被タンパク質遺伝子の検出の結果、予想されたDNA断片が検出される個体が得られた(Fig. 6-2)。検出個体と非検出個体の比は、M5-14を花粉親に用いた場合、1:1の比に一致した。M5を花粉親に用いた場合は、予想された1:1の比から離れたが、この仮説を棄却するほどの値ではなく、供試した抽出個体の偏りによるものではないかと考えられる。

‘ミータンカン’を用いた交雑後代において、カナマイシン耐性個体が明らかに多く観察されたことは、‘ミータンカン’のカナマイシン感受性が他の品種と著しく異なることが原因であった。‘ミータンカン’のカナマイシン感受性を調査した結果、200~250 mg/l カナマイシン添加培地において発根が抑制された。従って、ミータンカンとの交雑後代では、プリンスメロンに比べ高いカナマイシン濃度、すなわち200~250 mg/lの濃度で選抜する必要があることが判明した。

カナマイシン耐性と外被タンパク質遺伝子の検出の結果、カナマイシン耐性とCMV抵抗性はほとんどの個体で一致したが、少数ながら一致しない個体が観察された。この現象は、自殖後代でも観察されており、後代における外来遺伝子の発現の抑制によるものかあるいはカナマイシン耐性遺伝子のみ脱落によるものであると推定している。

以上の結果から、形質転換体を花粉親として用いた交雑後代は自殖後代と同様、外被タンパク質遺伝子を保持していることが明らかとなり、またその発現の可能性も示唆された。

III. 形質転換体の交雑後代におけるCMV抵抗性

1. 材料及び方法

形質転換体の交雑後代の種子及び非形質転換体J1R2との交雑後代の種子を、20~30粒無作為に抽出し、種皮を剥いて常法により殺菌、洗浄した。その後、1/2 MS培地+スクロース30 g/lの固形培地に無菌播種して個体識別した。クローンを作成し、その中の1個体の地上部を切り取って、1/2 MS培地+スクロース30 g/l+カナマイシン100 mg/lの固形培地に置床してカナマイシン耐性を調査した。また、他のクローン2~3個体を鉢上げ・馴化した。葉数が5~8枚程度の幼苗となった時点で、純化CMV-Y系を2 µg/mlの濃度でカーボランダムを用いて人工接種した。接種後、接種葉の黄化、上葉のモザイク症状、並びに葉脈透過症状などを指標として、発病の推移を観察した。また、接種後12日目に接種葉及び上葉のウイルス増殖をエライザ法⁸¹⁾によって調査した。エライザの結果は、同一試料につき3反復して、その平均値を測定値として用いた。

2. 結 果

形質転換体M5とウイルス抵抗性品種‘安濃3号’との交雑後代における発病の推移についての調査結果をTable 6-2に示した。対照区である‘安濃3号’及び非形質転換体J1R2を花粉親に用いた‘安濃3号×J1R2’においては、接種後5日目で全ての個体が発病した。これに対してカナマイシン耐性を示した‘安濃3号×M5’の交雑後代のうち、個体番号7番、8番、11番並びに12番では、明らかに病徴発現の抑制や遅延が観察された。特に個体番号7番及び11番では供試した2クローン共に発病せず、病徴の

Table 6-2 Development of symptoms after inoculation with CMV in progenies after cross-pollination of transgenic melon plants^x.

cv. ^y	Km ^z	Total no. of tested plants.	No. of plants with symptoms						
			Days after inoculation						
			1	3	5	7	9	11	20
Ano-sango	-	2	0	0	2	2	2	2	2
Ano-sango×J1R2	-	2	0	0	2	2	2	2	2
(Ano-sango×M5)-5	-	2	0	0	2	2	2	2	2
(Ano-sango×M5)-6	-	2	0	0	1	2	2	2	2
(Ano-sango×M5)-7	+	2	0	0	0	0	0	0	0
(Ano-sango×M5)-8	+	2	0	0	0	1	1	1	1
(Ano-sango×M5)-11	+	2	0	0	0	0	0	0	0
(Ano-sango×M5)-12	+	2	0	0	0	1	1	1	1

^x Concentration of CMV solution was 2 μ g/ml.

^y J1R2: Non transformant, M5: Transformant, M5-14: Progeny after self-pollination of M5.

^z + : Resistant to kanamycin(100mg/l), - : Sensitive to kanamycin(100mg/l).

Table 6-3 Virus concentration after inoculation with CMV in progenies after cross-pollination of transgenic melon plant^v.

cv. ^w	Km ^x	Tested leaf ^y		Mosaic symptoms ^z
		I	U	
Ano-sango	-	>2.0	>2.0	+
(Ano-sango×M5)-5	-	>2.0	>2.0	+
(Ano-sango×M5)-6	-	1.44	0.84	+
(Ano-sango×M5)-7	+	0.07	0.00	-
(Ano-sango×M5)-8	+	0.76	0.10	-
(Ano-sango×M5)-11	+	0.22	0.00	-
(Ano-sango×M5)-12	+	0.76	0.20	-

^v Concentration of CMV solution was 2 μ g/ml.

After 12 days, 10-fold diluted sample was tested. Data was expressed by ELISA value as the average of 3 replications.

^w M5: Transformant.

^x + : Resistant to kanamycin(100mg/l),

- : Sensitive to kanamycin(100mg/l).

^y I: Inoculated leaf, U: Upper leaf.

^z + : Symptoms developed.,

- : No symptoms.

抑制が観察された。一方、カナマイシン耐性を示さなかった5番、6番は対照区と差異のない病徴発現が観察された。これは第4章で確認されたと同様に、カナマイシン耐性が発現している個体が、CMV抵抗性を持つことを示している。これらの個体のエライザ法による検定結果をTable 6-3に示した。その結果、病徴発現の調査と同様に、非形質転換体では

接種葉、上葉共に検出上限である2.0を超える高い値を示し、ウイルスの増殖が確認された。また、カナマイシン耐性を示さなかった個体番号5番及び6番では対照区と同様のウイルス増殖が認められた。これに対し、7番、8番、11番並びに12番では接種葉、上葉と共にエライザ値は低く、これらの個体におけるウイルス増殖の抑制がエライザ法の検出によっても確認された。形質転換体自殖後代M5-14と通常の栽培メロンとの交雑後代における発病の推移をTable 6-4に示した。市販品種である‘グリーンパール’、‘サンデー秋’ではいずれも接種後3日目から発病個体が観察され、5日目には全ての個体で発病した。これに対し、市販品種と形質転換体との交雑後代では明らかな発病の遅延及び抑制が観察され特に‘サンデー秋×M5-14’の個体番号1番では、供試したクローン3個体全てにおいて発病が抑制された。また、‘グリーンパール×M5-14’の8番では、接種葉の黄化は観察されるものの、上葉のモザイク症状が観察されず、全身感染の抑制が認められた。‘山都瓜’は、市販品種に比べると抵抗性があり、対照区の個体全てが発病したのは、接種後11日目であった。しかし、形質転換体自殖後代M5-14と‘山都瓜’との交雑後代は、さらに病徴発現の遅延や抑制が観察された。これら交雑後代のエライザ法による検定結果をTable 6-5に示した。病徴による検定結果と同様に、対照区である‘グリーンパール’、‘サンデー秋’並びに‘山都瓜’では検出上限を越える高い値を示し、ウイルスの増殖が確認された。これに対し形

Table 6-4 Development of symptoms after inoculation with CMV in progenies after cross-pollination of transgenic melon plants^x.

cv. ^y	Total no. of tested plants.	No. of plants with symptoms						
		Days after inoculation						
		1	3	5	7	9	11	20
Green pearl	3	0	2	3	3	3	3	3
(Green pearl×M5-14)-4	3	0	0	0	0	1	1	1
(Green pearl×M5-14)-8	2	0	0	0	0 ^z	0 ^z	0 ^z	0 ^z
Sunday Aki	2	0	2	2	2	2	2	2
(Sunday Aki×M5-14)-1	3	0	0	0	0	0	0	0
(Sunday Aki×M5-14)-5	3	0	0	0	1	1	1	1
Yamatouri	2	0	0	1	1	1	2	2
(Yamatouri×M5-14)-3	2	0	0	0	1	1	1	1
(Yamatouri×M5-14)-6	2	0	0	0	0	0	0	0
(Yamatouri×M5-14)-8	2	0	0	0	0	0	1	1

^x Concentration of CMV solution (2 μ g/ml).

^y M5-14: Progeny after self-pollination of transformant M5.

^z Inoculated leaves showed yellowing. No mosaic symptoms.

Table 6-5 Virus concentration after inoculation with CMV in progenies after cross-pollination of transgenic melon plant^x.

cv. ^y	Tested leaf ^z	
	I	U
Green pearl	>2.0	>2.0
(Green pearl×M5-14)-4	0.19	0.02
(Green pearl×M5-14)-8	1.34	0.08
Sunday Aki	>2.0	>2.0
(Sunday Aki×M5-14)-1	0.09	0.15
Yamatouri	>2.0	>2.0
(Yamatouri×M5-14)-3	0.17	0.15
(Yamatouri×M5-14)-6	0.07	0.0

^x Concentration of CMV was 2 μ g/ml. After 12 days, 10-fold diluted. Sample was tested.

Data was expressed by ELISA value as the average of 3 replications.

^y M5-14: Progeny after self-pollination of M5.

^z I: Inoculated leaf,

U: Upper leaf.

質転換体との交雑後代は0.01~0.2と低い値を示し、ウイルス増殖の抑制が認められた。また、病徴の観察において上葉のモザイク症状が観察されなかった‘グリーンパール×M5-14’の個体番号8番では、接種葉のエライザ値が1.34と高い値であるのに対し、上葉では0.08と低く、エライザ法による検定

によっても全身感染の抑制が示唆された。

以上の結果から、形質転換体の交雑後代にも対照区には見られないCMV抵抗性が付与されていることが確認され、形質転換体の育種母本としての利用が期待される。

IV. 考 察

本章においては、形質転換体と通常の栽培品種などとの交雑後代の諸特性、特にCMV抵抗性について明らかにした。形質転換体の後代に関する研究は、外被タンパク質遺伝子以外の遺伝子を用いた研究においても報告されており、それらには共通した論点がある。すなわち、①形質転換体の後代における外来遺伝子による形質発現以外の諸特性の変化、②形質転換体の後代における外来遺伝子の分離比、③形質転換体の後代における外来遺伝子の発現、の3つである。

①の点に関しては、作出した形質転換体の花卉の数が増加し、後代にも遺伝したという報告⁸²⁾など、形態的变化に関しての報告がいくつかある。しかし、いずれの形質転換体も組織培養によって作出されているので、外来遺伝子の挿入自体によって引き起こされた変異であると結論づけるためには、さらに詳細な研究を必要とする。本研究においては、自殖後代、交雑後代のいずれにおいても著しい形態的变化や生理、生態的变化は確認されなかった。

次に②の点については、多くの研究報告があり、いくつかの例外的個体を除き、そのほとんどにおいてメンデルの遺伝法則に従うことが確認されている。本研究においても、前章の自殖後代、本章の交雑後代において導入した外被タンパク質遺伝子を検出した結果、いずれにおいても同様のことが示唆された。

最後に③の点については、いろいろな報告がなされ、複雑な結果となっている。中心的課題は、後代における発現が、いずれの個体においても当代から予想される発現と一致するか否かである。本研究のように、形質転換体を利用することを目的とした研究においては、この点は最も重要である。第4章及び第5章において、本研究の結果と共に、いくつかの報告例について言及したが、それらをまとめると、①後代の発現は、その様式及び量において当代の発現と一致する、②後代の発現は当代の発現と一致せず、個体間に相違が認められる⁸⁰⁾、③複数コピーになると発現の抑制 (co-suppression) が認められる⁷⁶⁾、の3つが注目される結果である。①と②の結果は矛盾するが、いずれもいくつかの研究によって確認されている。それらは自殖後代についての報告であるが、このような相反する結果が多いことは、すなわち組換え体の後代に関する研究が着手されたばかりであることを示しているといえよう。本研究では自殖後代、交雑後代共に、個体間におけるCMV抵抗性の差異が認められ、②の報告と一致する結果が得られた。この現象が直接外被タンパク質遺伝子の発現量の差異に結び付くか否かは、今後の研究を待たねばならない。

一方、交雑後代を扱った研究は、現在までのところ、ほとんど報告されていない。基本的には自殖後代の結果と一致すると考えられるが、形質転換体と同じ品種を戻し交雑した報告以外は研究蓄積は皆無といってよい。そこで、本研究では4品種のウイルス抵抗性品種と3品種の市販品種との交雑後代を作出し、その特性について調査した。その結果、いずれの組合せにおいても、外来遺伝子をもつ個体が確認され、カナマイシン耐性の調査によりその発現も実証された。また、外来遺伝子の分離比はほぼ1:1となり、メンデルの遺伝法則に従うことが示唆された。さらに、この交雑後代のウイルス抵抗性を、交雑した元の品種や非形質転換体との交雑後代と比較した。その結果、形質転換体との交雑後代は、他の

個体よりも病徴の発現やウイルスの増殖が抑制され、形質転換体との交雑による効果を確認することができた。抵抗性の程度については上述した通り個体間差が観察されたが、強いCMV抵抗性個体を選抜することは可能であると考えられる。

以上のように、自殖後代に続き、交雑後代についても導入遺伝子の検出と発現を確認し、そのCMV抵抗性が付与されていることを明らかにした。さらに、CMV抵抗性以外の特性については、形質転換体と非形質転換体との間に著しい差異のないことを明らかにした。これらのことから、形質転換体の育種への応用の可能性がさらに拡大することが実証された。

第7章 総合考察

外被タンパク質遺伝子を用いたウイルス病抵抗性に関する研究は、1980年代後半から盛んに行われ、現在そのメカニズムの解明と、栽培植物への応用との2方向へ発展しつつある。メカニズムの解明は、植物病理学の領域を中心に精力的に行われている。特にTMVに関しては、第3章で述べたように形質転換体の生産する外被タンパク質が、侵入したウイルスの脱外被を阻害することが明らかになり、TMV外被タンパク質遺伝子の付与する抵抗性のメカニズムの全容が解明される日も近いと思われる。栽培植物への応用は、病理学の領域と育種学の領域との協力により進められている。本研究におけるメロンのほか、トマト、パレイショ、イネ、キュウリ、アルファルファ及びパパイヤなどについての報告^{13,83)}があり、今後も多くの栽培植物に関する研究が進むものと考えられる。このような状況の中で、栽培植物への応用という視点から、本研究の内容を中心に植物の形質転換について考察することにする。

I. CMV外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出

本研究では、(1)メロンの形質転換手法の確立とCMV外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出、(2)形質転換メロンのウイルス病抵抗性、(3)形質転換メロンの後代の特性という3つの課題を中心に検討した。その結果、メロンにおける効率的な形質転換法を開発し、CMV抵抗性メロンを作出した。更に、この自殖及び交雑後代を作出して、外来遺伝子の遺伝

とその特性, 特に CMV 抵抗性を中心に調査し, 導入した外被タンパク質遺伝子が後代においても確認され, この遺伝子によるウイルス病抵抗性の発現も明らかにした。従って, 基本的には上記の3つの目的を概略達成することができたが, 得られた成果に基づいて更に研究を進展させるために考慮すべきいくつかの点に触れながら, それぞれの課題について考察する。

初めに, (1)のメロンの形質転換手法の確立と CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出について考察する。本研究では, 実験結果が先行して得られた‘プリンスメロン’を中心に形質転換法の確立を行った。現在, メロンの形質転換に関する報告は, *Agrobacterium tumefaciens* を利用して Gus 遺伝子を導入した報告が2編^{54,78)}, 同じく, *Agrobacterium rhizogenes* を利用して Gus 遺伝子を導入した報告が1編⁸⁴⁾ がある。更に, 1993年に, ZYMV の外被タンパク質遺伝子の導入が報告され⁸⁵⁾, メロンの形質転換がようやく軌道に乗り始めたといえるが, このような報告は未だ少数である。本研究においてマクワ系メロンであるプリンスメロンの効率的な形質転換法を開発したが, ネット系メロンに関しても同様の安定した手法の開発が期待される。

次に, (2)の CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの CMV 抵抗性について考察する。本研究で得られた形質転換メロンでは対照区に比べ, 高い CMV 抵抗性が観察された。従って, メロンのウイルス病に対する外被タンパク質遺伝子の有効性を明らかにすることができた。そこで, 次の研究の課題となるのは, 更に強い抵抗性をもつ個体を作成すること, 並びに数種のウイルスに対して抵抗性を持つ複合抵抗性個体を作成することであろう。

まず, 強い抵抗性個体の作出に関しては, 2つの方向があると考えられる。第一は遺伝子工学的手法を用いて植物の改良を行う方法である。前述のように, 外被タンパク質遺伝子のもたらすウイルス病抵抗性のメカニズムでは TMV 以外のウイルスに関しては未だ不明な点が多い。しかし, メカニズムの解明が進み, 理想的な外被タンパク質遺伝子の発現様式が解明されれば, それに応じたプロモーターの改変など, より高度な抵抗性付与のための改良が可能となる。更に考慮したい問題点は, 宿主植物の染色体や遺伝子に関する情報である。*Agrobacterium tumefaciens* を用いた遺伝子組換えでは, 外来遺伝

子が挿入される染色体上の位置が偶然によって決定されている。挿入位置の違いによる外来遺伝子の発現量の相違を位置効果と呼んでいることは第2章において既に述べたが, もし抵抗性の差異が位置効果によるものであれば, これを克服する手法も必要となる。現在, Matrix attachment region と呼ばれる DNA 断片を外来遺伝子に接続することで, 位置効果による発現抑制を回避する研究も試みられている⁸⁶⁾。しかし, このような試みにとどまらず, 宿主染色体についての情報を持ち, 目的とする位置へ外来遺伝子を導入することは, 遺伝子工学的手法を用いて植物の改良を行う場合の重要な課題となるであろう。現在行われている栽培植物の染色体に関する研究は, イネ, ムギなど主要穀類に限られている。野菜類では, トマトやキュウリなどについて研究されつつあるが⁸⁷⁾, 全体として立ち遅れている。目的の遺伝子を染色体の標的部位に挿入すること, つまり他の形質を変えることなく目的の形質のみを導入するという理想的な遺伝子組換えには, この分野の発展が必要となるであろう。

第二の方向として考えられるのは, 従来からの育種方法と結び付き, 強い抵抗性個体の選抜を行う方向である。本研究においても形質転換体の個体間に抵抗性の差異が観察された。従って, 多数の形質転換体を作成し, 圃場において選抜すれば, 更に強い抵抗性個体を得ることが可能になるものと考えられる。事実, TMV の外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換トマトでは, 259 個体の中から強い抵抗性を持つ 15 個体を選抜することに成功している⁸⁸⁾。遺伝子工学的手法を限定的で, 決定的な技術としてではなく, 変異の拡大のための新しい育種技術として利用することが, 今後の育種法の開発に貢献するものと思われる。以上のように, 強い抵抗性個体の作出に関する, 2つの研究方向について述べた。2つの方向を進展させ融合させることが, 実際の育種において形質転換を活用する最良の方法であると考えられる。次に, 複合抵抗性に関して考察すると, 1種類のウイルスの外被タンパク質遺伝子を導入した場合, その抵抗性が複数のウイルスに対して有効である例はいくつか報告されている⁴⁴⁾。しかし, いずれも導入した外被タンパク質と侵入したウイルスの外被タンパク質との間に血清型的一致やアミノ酸配列の相同性が不可欠であり, 異なるウイルス種での効果は低いと結論している。この対策として考えられ

るのは、異なるウイルスの外被タンパク質遺伝子を持つ形質転換体の作出である。これについては現在までのところ報告がなく、異なる複数のウイルスの外被タンパク質を生産させることにより複合抵抗性が付与されるか否かは確認されていない。著者らは本研究の延長として、CMVとは異なるウイルスグループであるポチウイルスに属するZYMV及びWMVの外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換メロンを既に作出しており、そのウイルス病抵抗性を確認している^{50,51}。今後、このような個体と本研究で作出したCMV抵抗性個体とを交雑することにより、複数種の外被タンパク質遺伝子を持つメロンを作出し、その複合抵抗性について明らかにすることは極めて有意義であると考えている。

最後に、形質転換体の後代について考察する。すなわち、本研究において、CMV外被タンパク質遺伝子導入メロンの自殖及び交雑後代の特性について明らかにしたが、後代は対照植物に比べ高いCMV抵抗性を示し、また、抵抗性以外の形態的、生理的特性についても対照区との間に著しい変異は観察されなかった。これは、実際の育種への応用の可能性を示唆するものである。次の課題としては、後代における外来遺伝子の発現の安定性である。本研究においても個体間における抵抗性の差異が観察され、少数ながら外来遺伝子の発現が抑制される可能性が示唆された。他の研究においても同様の結果が報告されており、その原因の究明は形質転換植物の実用化にとって不可避である。また、同時に導入した2つの遺伝子(カナマイシン耐性遺伝子とCMV外被タンパク質遺伝子)の後代における分離も示唆され、この現象の究明と育種への積極的な利用も重要な課題である。

今後この領域に関する研究が進展し、外被タンパク質遺伝子導入技術が多くの栽培植物に応用されることを期待したい。

II. 形質転換植物の安全性評価

組換えDNA技術は、自然界では起こり得ない、あるいは起こるとしても極端に低い確率であるような事象を可能にする方法であるため、現在まで法的または、倫理的規制を受けてきた。形質転換植物の野外栽培に関しても、その自然界への影響を考慮して安全性を評価することが義務づけられている。現在、組換え植物の野外試験は、世界的には約1,000件以

上あるといわれているが、日本では1990年、TMVの外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換トマトが初めて野外栽培を許可された例であり⁸⁹、その後イネ縞葉枯れウイルスの外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換イネ⁹⁰などが続いている。

日本においては、野外栽培が許可されるまで、閉鎖系温室、非閉鎖系温室、模擬的環境の各段階での形質転換体の安全性評価が義務づけられている。しかし、この評価は野外栽培のためのものであり、現在のところ食品としての安全性に関する評価は行われていない。形質転換体を野外で栽培し、食品化する上で現在最も問題とされているのは、選抜マーカー遺伝子である。一般的に使用されているカナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などは抗生物質耐性遺伝子であり、その使用に対してはいろいろな懸念がある。抗生物質耐性遺伝子を持つ形質転換体を野外栽培する場合の問題点としては、①抗生物質耐性遺伝子を持つ形質転換体が雑草化し、生態系を乱すことはないか、②抗生物質耐性遺伝子を持つ形質転換体が枯死して土壤に還元された場合、抗生物質耐性遺伝子が未知の機構を介して土壤微生物に導入され、微生物が抗生物質耐性を獲得することはないか、③抗生物質耐性遺伝子が交配などにより近縁野生種にまで拡散することはないか、④形質転換体である栽培植物が抗生物質耐性であることを利用して、抗生物質を除草剤の代わりに使用する例が増加することがないか、の4つがあげられる。また、抗生物質耐性遺伝子を持つ形質転換体を食品あるいは飼料として利用した場合に懸念されている問題点としては、①抗生物質耐性遺伝子及びその産物自体が、人体あるいは家畜に毒性を持つことはないか、②抗生物質耐性遺伝子が人間および家畜の消化管に存在している微生物に導入され、耐性を獲得した微生物が増加して抗生物質を医療に使用できなくなることはないか、の2つがあげられている。これらの疑問について、最も多く使用されているカナマイシン耐性遺伝子を例にあげて、合理的にその安全性を述べている報告がある⁹¹。

しかし、上記の問題点以外にも未知の問題が起こる可能性も考えられるし、食品化に関しては、科学的根拠のみでは解決できない心理的な問題等もあり、抗生物質耐性遺伝子の存在が議論的となることは明らかである。本実験でも上記のカナマイシン耐性遺伝子を使用していることから、この遺伝子に関

する安全性評価や一般社会の同意などの動きが注目される場所である。積極的に選抜マーカーを変更するという研究や選抜マーカー遺伝子と目的の遺伝子を別々のプラスミドで導入し、後代において選抜マーカー遺伝子の分離を試みるという研究もなされているようであるが、現在のところ一般的ではない。本研究で作出した形質転換体の後代において得られたような選抜マーカー遺伝子の発現していない個体の中に、この遺伝子が分離、脱落した個体があれば、この点に関する解決策の1つとして利用できるであろう。

以上のように、形質転換体の安全性評価について述べたが、今後栽培植物への形質転換法の応用が盛んになり、上記のような問題点を克服する道も拓かれるものと考えられる。

III. 形質転換植物の農業への利用

現在までのところ、形質転換植物は、新しい有用植物の育種を目的とした研究よりも、単離した新たな遺伝子の諸性質を明らかにするという目的に使用される例が圧倒的に多い。これは、育種目標に適合した形質発現のメカニズムが解明されておらず、その形質を支配する遺伝子が単離されていないということが原因の1つである。ウイルス病抵抗性のみでなく、各種病害抵抗性、耐乾性、耐塩性、耐冷性、更に品質の向上など栽培植物の改良目的は数え上げると際限のないものであるが、現在までのところ、これらの諸形質のうちの1つでも導入できた形質転換体についての報告は極端に少ない。しかし、ここ数年来の研究が実り、ウイルス病抵抗性を中心に、このような形質転換体作出についての報告例が徐々に増えている。本研究では、ノーネット系メロンであるプリンスメロンにCMV外被タンパク質遺伝子を導入して、ウイルス病抵抗性を付与したが、この形質転換体と通常の栽培種または育種素材とを交雑することにより、ネットメロンにウイルス病抵抗性を導入し得ることを明らかにした。これらの素材が、メロンの品種改良の片親として使用され得ると考えられる。

外被タンパク質遺伝子以外の例として、育種学的に意義深いと考えられるのは、形質転換による雄性不稔ナタネの作出である⁹²⁾。これは、葯のタペート組織で特異的に発現するプロモーターの下流にRNA分解酵素をコードする遺伝子をつなぎ、ナタネに導

入したものであった⁹³⁾。更にこのRNA分解酵素を不活化するタンパク質の遺伝子を導入した形質転換体も作出し、この個体と雄性不稔の形質転換体とを交雑することにより稔性の回復に成功した⁹³⁾。このほか、イネのキチナーゼ遺伝子を導入して糸状菌による病害に対して抵抗性となった形質転換タバコ⁹⁴⁾、T4ファージのリゾチーム遺伝子を導入してバクテリアによる病害に耐性となったバレイショなど、病害抵抗性に関する報告もあり⁹⁵⁾、形質転換法による新品種の育成が期待されている。

現在までに報告されたいくつかの研究をあげて、形質転換体の農業への利用について述べたが、生理、生化学的研究が進み、上述の育種目標の形質を発現するメカニズムが解明できれば、いろいろな形質転換植物が有用な新品種として作出される日も遠くないものと予想される。

植物の遺伝子組換えが初めて報告されてからほぼ10年が経過し、基礎的研究から応用へ進む段階に差し掛かっているといえるが、本研究の成果が、これまで行われてきた長い歴史を持つ育種技術と融合し、農業の新たな発展に結びつくことを期待したい。

摘 要

本研究は、広い宿主領域をもち農業生産に多大な被害を与えているキュウリモザイクウイルス(CMV)の防除を目的として、CMV外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換メロンを作出し、そのCMV抵抗性について検討したものである。研究内容は、1. メロンの形質転換法の確立、2. CMV外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出、3. CMV外被タンパク質遺伝子導入メロンのCMV抵抗性の確認、ならびに4. CMV外被タンパク質遺伝子導入メロンの後代の特性調査の4事項に要約される。

1. メロンの形質転換法の確立

多くの植物で形質転換が報告されているが、メロンにおいては安定した形質転換法が確立していないので、研究を行うにあたり形質転換に用いる植物体再生系の決定と、形質転換体を選抜するためのメロンのカナマイシン感受性について調査した。

(1) メロンのカナマイシン感受性

1) 種子発芽時のカナマイシン感受性を調査した結果、カナマイシン100 mg/lを添加した培地において、成長、特に発根と根の伸長が抑制されるこ

とが明らかになった。

- 2) 苗条原基のカナマイシン感受性を調査し、カナマイシン 100 mg/l 以上を添加した培地において、成長の抑制が観察され、特に根の成長は著しく抑制されることが明らかになった。
- 3) 不定胚のカナマイシン感受性を調査した結果、品種 'EG360' において品種間差が認められたが、他の品種ではカナマイシンの影響が大きく、カナマイシン 50 mg/l 以上を添加した培地上での不定胚形成は困難であることがわかった。
- 4) 不定芽のカナマイシン感受性について調査し、カナマイシン 100 mg/l 以上の添加区において不定芽の再分化が阻害されることを明らかにした。

(2) 形質転換に適した植物体再生系の検討

3つの安定した植物体再生系、すなわち苗条原基による再生系、不定胚による再生系、不定芽による再生系を用いて *Agrobacterium tumefaciens* を利用した形質転換を試み、形質転換に最も適した植物体再生系の検討を行った。導入にはレポーター遺伝子である β -グルクロニダーゼ遺伝子をもつプラスミド pBI121 を使用した。その結果、全ての植物体再生系で形質転換体を得ることができるが、①再生率の高さ、②キメラ個体の出現頻度の低さ、③形質転換処理の簡便さの3つの事項を考慮すると、不定芽培養系が形質転換に最も適していることを明らかにした。

2. CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出

不定芽培養系を利用した形質転換に関する諸条件を検討するとともに、CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの作出を試みた。

- (1) 不定芽培養系を利用した形質転換における前培養の効果を検討した結果、成長調節物質を含まない MS 培地で2日間の前培養を行うと、最も効率的にカナマイシン耐性シュートが形成されることを明らかにした。
- (2) 不定芽培養系を利用した形質転換での *Agrobacterium tumefaciens* との共存培養時における糖類の効果を検討した結果、スクロース 3% MS 培地上で最も効率的にカナマイシン耐性シュートが形成されることを確認した。
- (3) 不定芽培養系を利用した形質転換でのカナマイシンによる選抜手順を検討した結果、①第1次選抜：シュート再生用培地+カナマイシン 50

mg/l, ②第2次選抜：シュート伸長用培地+カナマイシン 100 mg/l, ③第3次選抜：発根用培地+カナマイシン 75~100 mg/l の順で3段階の選抜を行うことが最も効率的な形質転換体の選抜法であることを明らかにした。

- (4) カナマイシン耐性個体の DNA を抽出して、Polymerase Chain Reaction 法を用いて CMV 外被タンパク質遺伝子を検出し、これらが CMV 外被タンパク質遺伝子を導入した形質転換体であることを実証した。
- (5) CMV 外被タンパク質遺伝子の導入を確認した個体において、Dot-immunobinding Assay 法を用いて CMV 外被タンパク質を検出し、導入した外被タンパク質遺伝子が植物体中で発現していることを確認した。

3. CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの CMV 抵抗性の確認

作出した CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの CMV 抵抗性の接種検定を行った。

- (1) 純化 CMV 1 μ g/ml を人工接種した場合、検定したほとんどの形質転換体で、病徴発現の抑制が観察され、CMV 抵抗性があることを確認した。
- (2) 純化 CMV 10 μ g/ml を人工接種した場合、検定したほとんどの形質転換体で病徴が発現したが、明らかに対照区よりも発現が遅延し、高濃度の CMV を接種の場合においても、抵抗性が付与されていることを確認した。
- (3) 形質転換体のもつ CMV 抵抗性は、作出した形質転換体により個体差のあることがわかった。
- (4) 形質転換体の CMV 抵抗性程度を、市販品種や、従来からウイルス病抵抗性品種の育成に使用されていたウイルス病抵抗性の育種母本などのもつ CMV 抵抗性程度と比較した結果、形質転換体と高いウイルス抵抗性を有する品種 'ミータンカン' のみで病徴が抑制され、他の全ての品種で病徴が発現した。このことから、形質転換体のもつウイルス病抵抗性が実用的利用に耐えうるものであることを明らかにした。

4. CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの後代の特性

作出した形質転換体の自殖後代及び交雑後代を作出し、その特性、特に CMV 抵抗性を中心に調査し

た。

(1) 自殖後代の特性

- 1) CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの自殖後代を作出し、形態、開花特性などを調査し、非形質転換体の自殖後代と著しい差異がないことを確認した。
- 2) CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの自殖後代を作出し、DNA を抽出して CMV 外被タンパク質遺伝子の確認を行った結果、導入した遺伝子を検出し、導入した外被タンパク質遺伝子が次代へ遺伝したことを確認した。
- 3) 形質転換体自殖後代における CMV 外被タンパク質遺伝子の検出比は、ほぼ 3:1 に一致したことにより、供試した形質転換体に導入された CMV 外被タンパク質遺伝子は 1 コピーであるか、あるいは複数コピーであっても染色体の 1 箇所に挿入されたことが示唆された。
- 4) 形質転換体自殖後代のカナマイシン耐性を調査した結果、当代と同じカナマイシン 100 mg/l の培地において耐性を示す個体が出現し、形質転換体の後代においても導入した外来遺伝子が発現していることを確認した。
- 5) 形質転換体自殖後代における外来遺伝子の存在とカナマイシン耐性とはほぼ一致したが、いくつかの個体でカナマイシン耐性を示さないものを確認し、導入した遺伝子が自殖後代において必ずしも発現しないことがあるか、または組換えなどにより一部が脱落する可能性のあることが示唆された。
- 6) 純化 CMV 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を人工接種して形質転換体の自殖後代の CMV 抵抗性を調査した結果、非形質転換体の自殖後代に比べて病徴発現の遅延及び抑制が観察され、形質転換体自殖後代に CMV 抵抗性があることを確認した。
- 7) 形質転換体自殖後代の CMV 抵抗性はカナマイシン耐性とほぼ同調的に発現することを明らかにした。
- 8) 形質転換体自殖後代の CMV 抵抗性を親系統ごとに調査した結果、抵抗性の程度は親系統により左右されることが明らかになった。
- 9) 形質転換体自殖後代の CMV 抵抗性を個体ごとに比較することにより個体間の差異が明らかになり、最も強い抵抗性をもつ自殖後代 M5-14 を選抜することができた。

(2) 形質転換体交雑後代の特性

形質転換体当代 M5 及びその自殖後代 M5-14 と、市販品種（‘プリンス’、‘グリーンパール’、‘サンデー秋’）及びウイルス病抵抗性品種（‘ミータンカン’、‘安濃 1 号’、‘安濃 3 号’、‘山都瓜’）との交雑後代を作出し、その特性を調査した。

- 1) CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの交雑後代を作出し、形態、開花特性などを調査した結果、非形質転換体との交雑後代との間に著しい差異のないものであることを確認した。
- 2) CMV 外被タンパク質遺伝子導入メロンの交雑後代から DNA を抽出して、CMV 外被タンパク質遺伝子の確認を行った結果、導入した外来遺伝子が存在しており、これが交雑後代へ遺伝したことを確認した。
- 3) 形質転換体交雑後代の CMV 外被タンパク質遺伝子の検出比はほぼ 1:1 に一致したことから、供試した形質転換体自殖後代 M5-14 に導入された CMV 外被タンパク質遺伝子は 1 コピーであるか、あるいは複数コピーであっても染色体の 1 箇所に挿入されたことが明らかになった。
- 4) 形質転換体交雑後代のカナマイシン耐性を調査した結果、当代と同じカナマイシン 100 mg/l の培地において耐性を示す個体があることから、形質転換体の後代においても導入した遺伝子が発現していることを確認した。
- 5) 品種‘ミータンカン’との交雑後代では、‘ミータンカン’のカナマイシン感受性を受け継いでおり、カナマイシン 100 mg/l の濃度では選抜することができないことを明らかにした。
- 6) 形質転換体交雑後代における外来遺伝子の存在とカナマイシン耐性とはほぼ一致したが、いくつかの個体でカナマイシン耐性を示さないものを確認し、導入した遺伝子が交雑後代において必ずしも発現しないことがあるか、または組換えなどにより一部が脱落する可能性があることが示唆された。
- 7) 純化 CMV 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を人工接種して形質転換体交雑後代の CMV 抵抗性を調査した結果、非形質転換体との交雑後代やもとの品種に比べて病徴発現の遅延及び抑制が観察され、形質転換体交雑後代に CMV 抵抗性があることを確認した。
- 8) 形質転換体交雑後代の CMV 抵抗性は、カナマイシン耐性とほぼ同調的に発現することを明らか

にした。

以上のように本研究は、メロンの形質転換体を作成し、それがウイルス病抵抗性を有しており、栽培面においても利用し得る可能性を実証するとともに、これら技術を発展させる場合の基礎となる知見を示したものである。

謝 辞

本論文の作成にあたり、北海道大学農学部教授原田隆博士、同教授木下俊郎博士、同教授木村郁夫博士および同教授三上哲夫博士からは懇切なる御指導と御校閲を賜りました。また、北海道大学名誉教授八畝利郎博士には懇篤なる御指導と激励を賜りました。ここに慎んで深甚なる感謝の意を表します。本研究を遂行した5年間に渡り、茨城県生物工学研究所所長大澤勝次博士には、終始懇篤なる御指導と御配慮を賜りました。また、九州農業試験場ウイルス病研究室長花田薫博士には多大なる御指導と御支援を賜りました。ここに深い感謝の意を表します。

最後になりましたが、日々の研究を支えていただきました尾身ゆり子氏、北海道大学農学部農学科果樹蔬菜園芸学教室の皆様、その他本研究を遂行するにあたり暖かい支援を賜りました全ての方々にここに慎んで深い感謝の意を表します。

なお、文部省科学研究費の補助を受け、日本学術振興会の特別研究員として本研究に専心することができ、ここに御厚志に対する感謝の意を表します。

引用文献

- STANLEY, W. M.: Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science*. **81**: 644. 1935
- 與良清・斉藤康夫・土居養二・井上忠男・都丸敬一：植物ウイルス辞典，朝倉書店，2. 1988
- 大木理：‘日本に発生する植物ウイルス一覽’，植物防疫特別 増刊号日本植物防疫協会編，1992
- HOLMES, F. O.: Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco. *Phytopathology*. **28**: 553-561. 1938
- SOOST, R. K.: Hybrid tomato resistant to tobacco mosaic virus. *J. Heredity*. **54**: 241-244. 1963
- CARLSON, P. S., H. SMITH and R. D. DEARING.: Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **69**: 2292. 1972
- THACH, N. Q., U. FREI, and G. WENZEL.: Somatic fusion for combining virus resistances in *Solanum tuberosum* L. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 863-867. 1993
- ZAMBRYSKI, P., H. JOOS, C. GENETELLO, J. LEEMANS and J. VAN.: Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regenerative capacity. *EMBO J.* **2**: 2143-2150. 1983
- POWELL-ABEL, P., R. S. NELSON, D. BARUN, N. HOFFMAN, S. G. ROGERS, R. T. FRANLEY and R. N. BEACHY.: Delay of disease development in transgenic plants that express the TMV coat protein gene. *Science*. **232**: 738-743. 1986
- 花田薫：植物ウイルス病の弱毒ウイルスによる防除，バイオインダストリー 4(5)：13-19, 1987
- De ZOETEN, G. A. and R. W. FULTON.: Understanding generates possibilities. *Phytopathology*. **65**: 221-222. 1975
- WILSON, T. M. A. and P. A. C. WATKINS.: Influence of exogenous viral coat protein on the co-translational disassembly of Tobacco mosaic virus particles *in vitro*. *Virology*. **149**: 132-135. 1986
- BEACHY, R. N., S. LOESCH-FRIES and N. E. TUMER.: Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**: 451-474. 1990
- ‘平成3年度野菜生産出荷統計’農林水産省統計情報部：34-35. 1993
- ‘平成3年度農業白書付属統計表’農林統計協会：97. 1993
- CHILTON, M. D., D. A. TEPFER., A. PETIT., C. DAVID, F. CASSE-BELBART and J. TEMPE.: *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*. **295**: 432-435. 1982
- FROMM, M., L. P. TAYLOR and V. WALBOT.: Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electro poration. *Proc. Natl. Sci. USA*. **82**: 5824-5828. 1985
- KLEIN, T. M., T. GRADZIEL, M. E. FROMM and J. C. SANFORD.: Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity microprojectiles. *Bio/Technology*. **6**: 559-563. 1988
- STCHEL, S. E., E. MESSENS, M. Van MONTAGU and P. ZAMBRYSKI.: The genetic end transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*.

- 318: 624-630. 1985
20. OOMS, G., P. J. J. HOOYKAAS, G. MOOLENAAR and R. A. SCHILPEROORT.: Crown gall plant tumors of abnormal morphology induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti-plasmids analysis of T-DNA function. *Gene*. **14**: 33-50. 1981
 21. KATHAL, R., S. P. BHATNAGAR and S. S. BHOJWANI.: Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* cv. PUSA SHARBATI. *Plant Cell Reports*. **7**: 449-451. 1988
 22. BECK, E., G. LUDWIG, E. A. AUERSWALD, B. REISS and H. SCHALLER.: Nucleotide sequence and exact localization on the neomycin phosphotransferase gene from transposon *Tn5*. *Gene*. **19**: 327-336. 1982
 23. PETER, J. M., E. VAN DEN, J. TOWNSEND, K. Y. LEE and J. R. BEDBROOK.: A chimeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Molecular Biology*. **5**: 299-302. 1985
 24. De BLOCK, M., J. BOTTERMAN, M. VANDEWIELE, J. DOCKX, C. THOEN, V. GOSSELE, N. RAO MOVVA, C. THOMPSON, M. Van MONTAGU and J. LEEMANS.: Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* **6**(9): 2513-2518. 1987
 25. MURASHIGE, T. and F. SKOOG.: A revised medium for growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant*. **15**: 473-497. 1962
 26. TANAKA, R. and H. IKEDA.: Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* ($2n=4$) by shoot tip cloning. *Jpn. J. Genet.* **58**: 65-70. 1983
 27. '苗条原基と大量増殖' バイオホルティナー6 農耕と園芸編集部 誠文堂新光社. 1990
 28. 永井輝行・野村幸雄・大澤勝次: メロンの苗条原基誘導と植物再生. 園芸学会誌 **58**(別1): 208-209. 1989
 29. ORIDATE, T. and OOSAWA, K.: Somatic embryogenesis and regeneration from suspension culture in melon. *Jpn. J. Breed.* **36**: 424-428. 1989
 30. ARZANI, A. S., K. SHIMONISI, Y. ASANO and K. OOSAWA.: Somatic embryogenesis and organogenesis from *in vitro* seed culture of melon. *Jpn. J. Breed.* **39**(suppl. 2): 108-109. 1989
 31. DIRKS, R. and M. Van BUGGENUM.: *In vitro* plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. *Plant Cell Rep.* **7**: 626-627. 1989
 32. Jefferson, R. A., S. M. Burgess and D. HIRSH.: β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 8447-8451. 1986
 33. JEFFERSON, R. A., T. A. KAVANAGH and M. W. BEVAN.: Gus fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**(13): 3901-3907. 1987
 34. BENFEY, P. N. and N.-H. CHUA.: Regulated genes in transgenic plants. *Science*. **244**: 174-181. 1989
 35. 都丸敬一: 'ウイルスの分類'. 植物ウイルス学: 23. 1988
 36. KEPER, J. M., H. E. WATERWORTH.: "Handbook of Plant Virus Infection and Comparative Diagnosis": 257. 1981
 37. HAYAKAWA, T., M. MIZUKAMI, M. NAKAJIMA and M. SUZUKI.: Complete nucleotide sequence of RNA 3 from cucumber mosaic virus (CMV) strain O: Comparative study of nucleotide sequence and amino acid sequences among CMV strains O, Q, D and Y. *J. Gen. Vior.* **70**: 499. 1989
 38. 花田薫・美部侑三: キュウリモザイクウイルス RNA のクローニング: 黄斑系 (CMV-Y). 日本植物病理学会報 (53): 65. 1987
 39. SOUTHERN, E. M.: DETECTION of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517. 1975
 40. HORSCH, R. B., R. T. FRALEY, S. G. ROGERS, P. R. SANDERS, A. LIPOYD and N. HOFFMANN.: Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*. **223**: 496-498. 1984
 41. LOESCH-FRISE, L. S., D. MERLO, T. ZINNEN, L. BURHOP, K. HILL, K. KRAHN and N. JARVIO.: Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plant confers virus resistance. *EMBO J.* **6**: 1845-1851. 1987
 42. GALLIE, D. R. and C. I. KADO.: A translational enhancer derived from tobacco mosaic virus is functionally equivalent to a Shine-Dalgarno sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 129-132. 1989
 43. KAY, R., A. CHAN, M. DALY and J. MCPHERSON.: Duplication of CaMV35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*. **236**: 1299-1302. 1987
 44. NAMBA, S., K. LING, C. GONSALVES, D. GONSALVES and J. L. SLIGHTOM.: Expression of the gene encoding the coat protein of cucumber mosaic virus (CMV) strain WL appears to provide protection to tobacco plants against infection by several different CMV strains. *Genes*. **107**: 181-188. 1991

45. ATTLA FEHER, K. G. SKRYABIN, E. BALAZS, J. PREZNER, O. A. SHULGA, V. M. ZALCHARYEV and D. DUDITS.: Expression of PVX coat protein gene under the control of extensin-gene promoter confers virus resistance on transgenic potato plants. *Plant cell reports*. **11**: 48-52. 1992
46. BEACHY, R. N.: Virus cross-protection in transgenic plants. In: *plant gene research. Temporal and spatial regulation of plant genes*. Verma D.P. S. and R. B. Goldberg. (eds.) New York: Springer-Verlag.: 312-327. 1988
47. POWELL-ABEL, P. A., P. R. SANDERS, N. TUMER, R. T. FRALEY and R. N. BEACHY.: Protein against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Viriology*. **175**: 124-130. 1990
48. STARK, D. M.: Coat-Protein mediated protection against potyviruses in transgenic plants. PhD thesis. Washington Univ. St. Louis, MO. 1989
49. KOZAK, M.: Point mutations close to the AUG initiator codons affect the efficiency of translation of rat preproinsulin *in vivo*. *Nature*. **308**: 241-246. 1984
50. 吉岡啓子・花田薫・寺見文宏・藤澤一郎・原田隆・肥後健一・西村繁雄・大澤勝次：ズッキーニ黄斑モザイクウイルス外被タンパク質遺伝子を導入したトランスジェニックメロンの作出。日本植物病理学会報。 **59** : 303. 1993
51. 吉岡啓子・花田薫・野田千代一・肥後健一・八畝利朗・藤澤一郎・大澤勝次：カボチャモザイクウイルス(WMV-2)外被タンパク質遺伝子のクローニングと塩基配列の決定、及び植物発現ベクターの構築。日本植物病理学会報。 **58** : 591. 1992
52. YANOFSKY, M. F., S. G. PORTER, C. YOUNG, L. M. ALBRIGHT, M. P. GORDON and E. W. NESTER.: The *VirD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a sitespecific endonuclease. *Cell*. **47**: 471-477. 1986
53. SHIMODA, N., A. TOYODA-YAMAMOTO, J. NAGAMINE, S. USAMI, M. KATAYAMA, Y. SAKAGAMI and Y. MACHIDE.: Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 6684-6688. 1990
54. FANG, G. and R. GRUMET.: *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. *Plant Cell Report*. **9**: 160-164. 1990
55. SAIKI, R., S. SCHALF, F. FALOONA, K. MULLIS, G. HORM, H. A. ERLICH.: Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligo-nucleotide probes. *Nature*. **324**: 163-166. 1986
56. 渡辺格・杉浦昌弘：「クローニングとシークエンス」農村文化社。1989
57. Hawkes, R., E. Niday and J. Gordon.: A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical Biochemistry*. **119**: 142-147. 1982
58. HIBI, T. and Y. SAITO.: A dot immunobinding assay for the detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. *J. Gen. Virol*. **66**: 1191-1194. 1985
59. ODELL, J. T., F. NAGY and N.-H. CHUA.: *Nature*. **313**: 810. 1985
60. NELSON, R. S., P. POWELL-ABEL and R. N. BEACHY.: Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus. *Virology*. **158**: 126-132. 1987
61. HEMENWAY, C., R.-X. FANG and W. K. KANIEWSKI.: Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J*. **1**(5): 1273-1280. 1988
62. QUEMADA, H. D., D. GONSALVES and J. L. SLIGHTOM.: Expression of coat protein gene from cucumber mosaic virus strain C in tobacco: protection against infection by CMV strains transmitted mechanically or by aphids. *Phytopathology*. **81**(7): 794-802. 1991
63. 四方英四朗：「媒介昆虫」。植物ウイルス学。養軒堂：199. 1988
64. JONGEDIJK, E., A. A. J. M. de SCHUTTER, T. STOLTE., P. J. M. van de ELZEN and B. J. C. CORNELISSEN.: Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Bio/Technology*. **10**: 422-429. 1992
65. KANIEWSKI, W., C. LAWSON, B. SAMMONS, L. HALEY, J. HART, X. DELANNEY and N. E. TUMER.: Field resistance of transgenic russet BURBANK potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. *Bio/Technology*. **8**: 751-754. 1990
66. GONSALVES, D., P. CHEE, R. PROVVIDENTI, R. SEEM and J. L. SLIGHTOM.: Comparison of coat protein-mediated and genetically derived resistance in

- cucumbers to infection by cucumer mosaic virus under field conditions with natural challenge inoculations by vectors. *Bio/Technology*. **10**: 1562-1570. 1993
67. 金沢幸三・高田勝也・高塚克己：*Cucumis melo* L. のモザイク病耐病性比較試験 園試蔬菜花き年報昭41：26-29. 1967
68. 高田勝也：メロンの病害性育種の現状と問題点. 農業及び園芸. **50**：1113-1117. 1975
69. 高田勝也：病害複合抵抗性メロン‘安濃1号・同2号・同3号’の育成と特性. 野菜試報. **A11**：1-22. 1983
70. FARINELLI L. and P. MALNOE.: Coat protein gene-mediated resistance to Potato virus Y in tobacco: examination of the resistance mechanismsis the transgenic coat protein required for protection? *Mol. Plant-Microbe Interaction*. **6**(3): 284-292. 1993
71. TUMER, N. E., K. M. O'CONNELL, R. S. NELSON, P. R. SANDERS and R. N. BEACHY.: Expression of Alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO J.* **6**: 1181-1188. 1987
72. CUZZO, M., K. M. O'CONNELL, W. KANIEWSKI, R.-X. FANG, N.-H. CHUA and N. E. TUMER.: Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Tecnology*. **6**: 549-545. 1988
73. HOEKEMA, A., M. J. HUISMAN, L. MOLENDIJK, P. J. M. van de ELZEN and B. J. C. CORNELISSEN.: The genetic engineering of two commercial Potato virus X. *Bio/Technology*. **7**: 273-278. 1989
74. OTTEN, L., De GREVE, H., HERNALSTEENS, J. P., M. Van MONTAGU, O. SCHIEDER, J. STAUB and J. SCHELL.: 1981 Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* **183**: 209-213.
75. MATZKE, M. A., M. PRIMIG., J. TRNOVSKY and A. J. M. MATZKE.: Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J.* **8**(3): 634-649. 1989
76. HOBBS, S. L. A., P. KPODAR and C. M. O. DELONG.: The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol. Biol.* **15**: 851-864. 1990
77. 吉岡啓子・花田薫・田部井豊・原田隆・大澤勝次：CMVCP 遺伝子導入メロンの閉鎖系温室内における生育特性と花粉拡散について 育種学雑誌. **42**(別2). 1992
78. DONG, J.-Z., M.-H. YANG, S.-R. JIA and N.-H. CHUA.: Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the califlower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. *Bio/Technology*. **9**: 858-863. 1991
79. WU, X., R. N. BEACHY, T. M. A. WILSON and J. G. SHAW.: Inhibition of uncoating of tobacco mosaic virus particles in protoplasts from transgenic tobacco plants that express the viral coat protein gene. *Virology*. **179**(2): 893-895. 1990
80. JONES, J. D. G., D. E. GILBERT, K. L. GRADY and R. A. JONGENSEN.: T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens*, C58 derivatives. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 478-485. 1987
81. CLARK, M. F. and A. N. ADAMS.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immuno-sorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**: 475-483. 1977
82. KOMAI, T.: Genetic characterization of a double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. *Theor. Appl. Genet.* **80**: 167-171. 1990
83. LOESCH-FRIES, L. S., D. MERLO, T. ZINNEN, L. BURHOP, K. HILL, K. KRAHN and N. JARVIO.: Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plant confers virus resistance. *EMBO J.* **6**: 1845-1851. 1987
84. TOYODA, H., Y. HOSOI, A. YAMAMOTO, T. NISHIGUCHI, K. MAEDA, T. TAKEBAYASHI, T. SHIOMI and S. OUCHI.: Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Tissue Culture Letters*. **8**(1): 21-27. 1991
85. FANG, G. and R. GRUMET.: Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from the Zucchini yellow mosaic virus coat protein gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **6**: 358-367. 1993
86. GASSER S. M. and U. K. LAEMMLI.: A glimpse at chromosomal order TIG. **3**: 16-22. 1987
87. S. D. TANKSLEY.: Linkage map of tomato (*Lycopersicon esculentum*) genetic maps. *ocus maps of cumplex genomes 6 edition*. 6.39. S. J. O'Brin editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1992
88. SATO, T., F. FUKUMOTO, K. HANADA, F. TERAMI, T. IMAI and M. HIRAI.: Viral protection in transgenic

- tomato plants with CMV-CP gene. Japan J. Breed. 43(Supple. 1): 107. 1993
89. 組換えトマト安全性評価グループ, '遺伝子組換えによって TMV 抵抗性を付与したトマトの生態系に対する安全性評価' 農環研報第 8 号 138. 1992
90. KIMURA, Y., S. TORIYAMA and T. HAYAKAWA.: Biosafety test of transgenic rice plants under closed and semi-closed greenhouse conditions. Mitsubishi Kasei R & D Review. 7(2): 25-33. 1993
91. NAP, J.-P., J. BIJVOET and W. J. STIEKEMA.: Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. Transgenic Research. 1: 239-249. 1992
92. MARIANI, C., M. De BEUCKELEER, J. TRUETTNER, J. LEEMANS and R. B. GOLDBERG.: Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. Nature. 347(25): 737-741. 1990
93. MARIANI, C., V. GOSSELE, M. De BEUCKELEER, M. De BLOCK, R. B. GOLDBERG, W. De GREEF and J. LEEMANS.: A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. Nature. 357(4): 384-387. 1992
94. 西澤洋子・阿久津克巳・日比忠明: 植物溶菌酵素遺伝子の導入による菌類抵抗性植物の作出. 植物防疫, 46(13): 500-506. 1992
95. DURING, K., M. FLADUNG and H. LORZ.: Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. Plant J. 3(4): 587-598. 1993

Summary

Plant disease caused by virus is one of the most serious problems hindering agricultural productivity, resulting in loss of quality. So far, no efficient agents have been found for virus control in plants and there are only two ways of enhancing the resistance of plants to viruses. One method is cross-breeding, and the other is cross-protection. Cross-breeding of virus-resistance takes a long time and involves considerable effort. Therefore, cross-protection with a mild strain is an attractive alternative. However, virus disease control by inoculation carries risks when used under open field conditions, as a mild strain may undergo mutation and become virulent during replication.

Recently molecular techniques have been applied for developing virus-resistant plants. POWELL ABELL (1986) introduced the TMV coat protein gene into tobacco cells via *Agrobacterium tumefaciens* and obtained transgenic plants expressing the gene prod-

uct. The progeny of the transgenic plants showed delayed response to the virulent strain, and in some cases were totally resistant. Using a similar procedure, several research groups have confirmed that coat protein inhibits other homologous virulent viruses including alfalfa mosaic virus (AIMV) (LOESCH-FRIES *et al.*, 1987, TUMER *et al.*, 1987, CEES *et al.*, 1988a), tobacco rattle virus (TRV) (CESS *et al.* 1988b), potato virus X (PVX) (HEMENWAY *et al.*, 1988). and others (NELSON *et al.* 1990).

The intention of this study is to apply the above findings to practical agriculture. One of the goals is to develop a stable resistant variety of *Cucumis melo* against cucumber mosaic virus (CMV) by introducing the coat protein gene of CMV. CMV has a wide host range and causes serious economic damage, especially in the family Cucurbitaceae.

In this articles, the condition under which transformation via *Agrobacterium tumefaciens* in *C. melo* take place and the inheritance of introduced gene in transgenic melon plants are reported.

I. Determination of the condition for transformation.

1. Kanamycin tolerance of *Cucumis melo*.

In order to determine the sensitivity to kanamycin for each culture stage of *Cucumis melo*, several kinds of explants were culture on the MS medium containing 0-200 mg/l kanamycin.

Kanamycin above 100 mg/l inhibited the rooting of seedlings and Kanamycin levels 75-100 mg/l inhibited shoot regeneration in all types of explants.

These concentrations of kanamycin were, therefore, used for selection of transformed kanamycin-tolerant.

2. Introducing GUS gene (reporter gene) into *Cucumis melo* via *Agrobacterium tumefaciens*.

One of the most important problems in plant transformation is finding the plant regeneration systems suitable for transformation. In order to determine the most suitable system for transformation via *Agrobacterium tumefaciens*, transformation was tried in *C. melo* using GUS gene by several plant regeneration systems.

There are three different kinds of regeneration systems in *C. melo*. These are a; via somatic embryogenesis from hypocotyl explants (ORIDATE and OOSAWA, 1989), b; via shoot primordia from meristem explants (NAGAI *et al.* 1989) and c; via shoot organogenesis from cotyledon explants (DIRKS *et al.*,

1989).

The results showed that transgenic melon plants were obtainable using all systems. The transformation using shoot primordia achieved the highest regeneration frequency, but it resulted in chimera formation (YOSHIOKA *et al.* 1989). In the system using shoot organogenesis, more regenerated shoots were obtained than through the systems using somatic embryogenesis, and it was relatively easy.

Therefore, shoot organogenesis was the best transformation method via *Agrobacterium tumefaciens* in *C. melo* and this was used for introducing the gene for coat protein.

II. Development of transgenic melon plants that express the gene for coat protein of CMV.

1. Determination of the detailed conditions of transformation using shoot organogenesis, in *C. melo*.

The detailed conditions for transformation using shoot organogenesis were determined.

The pre-culture on hormone-free MS medium was attempted for mature seed explants. When pre-cultured for 1-2 days, the highest percentage of kanamycin-tolerant shoot regeneration was observed.

Kanamycin selection was repeated three times. The selection procedure giving the highest efficiency was as follows. Explants were placed on regeneration medium containing 50 mg/l kanamycin as the first selection. The regenerated mass of shoots was cut and then placed on MS medium containing 100 mg/l kanamycin as the second selection. After this, developed shoots were transferred to hormone-free MS medium containing 100 mg/l kanamycin as final selection. This procedure was most effective for obtaining kanamycin-tolerant plants.

2. Introduction of the gene for coat protein of CMV in to *C. melo*.

Plasmid YI25 containing the gene for coat protein of CMV was constructed. This plasmid was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 (a binary vector strain). After that the bacterium was used for transformation. Following the treatments for transformation, many Kanamycin-tolerant plants were obtained. Introduced gene was detected in kanamycin-tolerant plants by PCR system. Moreover, in order to define the expression of introduced gene in transgenic plants, coat protein of CMV was immunologically detected by dot immuno binding assay

(DIBA).

III. Virus resistance in transgenic melon plants that express the cucumber mosaic virus coat protein gene.

1. Virus resistance in transgenic melon plants.

After inoculation with a suspension containing 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ purified CMV, some transgenic melon plants did not develop symptoms for 46 days of observation. When these transgenic melon plants were inoculated with CMV at a higher concentration (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), there was a delay in the development of symptoms, as compared to the non-transformant.

2. Comparison of resistance to CMV with that of other cultivars.

In order to evaluate the extent of viral resistance in the transgenic plants, the resistance was compared among transgenic non-transgenic plant of the same cultivar, as transgenic plant, virus resistant cultivars and commercial cultivars. The results indicated that transgenic melon plants M5 and virus resistant cv. 'Miitankan' did not develop the symptoms. Other virus-resistant cvs. and all commercial cvs. showed visible symptoms. These results indicate that the transgenic M5 is more resistant to CMV than normal virus-resistant cv.

IV. Characterization of the transgenic progenies.

1. Characterization of the progenies after self-pollination of transgenic melon plants.

The coat protein gene was detected from progenies after self-pollination by PCR system and the introduced gene was transmitted as a single dominant factor with Mendelian segregation ratio.

The progeny was indistinguishable from the non-transformants, as judged by growth rate and morphological properties.

After inoculation with a suspension containing 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CMV, symptoms were delayed or not developed at all in these progenies. It was, therefore, confirmed that the coat protein-mediated resistance was inherited in the progenies of the transgenic melon plants.

2. Characterization of the progenies after cross-pollination of transgenic melon plants.

To evaluate the possibility of using the transgenic melon plants as parental line for breeding, cross pollination was performed between the transgenic melon plants and commercial or virus resistant cv.

The introduced gene was also detected in about fifty percent of the progenies after cross-pollination. No difference in the physical appearance was detected as compared with the progenies of nontransgenic melon plant.

After inoculation with a suspension containing 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CMV, the delay or inhibition of symptom development was shown in the progenies after cross-pollination of transgenic melon plants.

This study has demonstrated the most effective conditions for transformation through *Agrobacterium tumefaciens* and the effectiveness of coat protein-mediated resistance in transgenic melon plants. In addition, the inheritance of the introduced gene in progenies was investigated, and the result may be of importance in breeding for resistance in *C. melo* using transgenic plants.