

論文

林木における不定胚による植物体再生系と遺伝子組換え系の 開発に関する基礎的研究

谷口 亨⁽¹⁾

Toru Taniguchi⁽¹⁾

Somatic embryogenesis and genetic transformation in forest tree species

要旨：育種においては交雑により有用な遺伝子を集積する必要がある。しかし、林木は開花までの期間や成長期間が長いので交雑育種を行うことは長い年月を要する。一方、遺伝子組換えには他の形質に影響を及ぼすことなく短期間で目標形質を林木に付与することができる。したがって、遺伝子組換え技術を利用すれば林木の育種を短期間で行なうことができると考える。しかし、我が国の林木では遺伝子組換え技術が確立されている樹種はない。そこで、本研究では遺伝子組換え系を開発し、我が国の林木の「遺伝子組換え育種」に資することを目的とした。

遺伝子組換え系を開発するためには、効率の良い植物体再生系が必要となるので、まず不定胚分化を経て植物体を再生させる方法について検討した。材料は、ヒノキ、スギおよびクヌギの精英樹の未成熟種子とコシアブラの成熟種子とした。これらの材料からembryogenic tissueやembryogenic callusなどを誘導し、それらを増殖させた後に不定胚を誘導する条件を明らかにした。また、不定胚を発芽させて植物体を再生し、それらを順化させる方法も開発した。これらのことより、遺伝子組換えに必要な植物体の再生系が開発された。

次に、不定胚による植物体再生系を利用してヒノキの遺伝子組換え体の作出方法について検討した。まず、パーティクルガンによりクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子をヒノキなどの林木の細胞に導入した。GFP 遺伝子が導入されたこれらの細胞は緑色蛍光を発することが確認されたので、GFP遺伝子は遺伝子組換えの成否を判定するレポーター遺伝子として利用できることが明らかとなった。続いて、GFP遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を保持させたアグロバクテリウムをヒノキのembryogenic tissueに感染させた。その後、カナマイシンで選抜を行なったところGFPの緑色蛍光を発するembryogenic tissueが得られた。これらから不定胚分化を経て遺伝子組換えヒノキを再生させることができた。これらのことより、ヒノキの遺伝子組換え系が開発された。この系を我が国の林木の遺伝子組換えのモデルと考えることができる。

以上本研究で得られた知見は、病虫害抵抗性や雄花形成抑制などの実用形質に関与する遺伝子を林木へ導入することにより新たな林木品種を創出する「遺伝子組換え育種」に寄与する。

(1) 林木育種センター

〒319-1301 茨城県日立市十王町伊師3809-1

Forest Tree Breeding Center

3809-1 Ishi, Juo, Hitachi, Ibaraki 319-1301 Japan

*本論文は九州大学学位（博士（農学））請求論文である。

目 次

1 序論	67
1.1 研究の背景	67
1.1.1 我が国の林木育種の現状と遺伝子組換え技術導入の必要性	67
1.1.2 遺伝子組換えの利点とその研究・利用の現状	67
1.2 研究目的と本論文の構成	69
2 林木の不定胚による植物体再生	69
2.1 緒言	69
2.2 ヒノキにおける不定胚誘導と植物体再生系の開発	71
2.2.1 はじめに	71
2.2.2 材料と方法	71
2.2.2.1 材料	71
2.2.2.2 培地と培養条件	72
2.2.2.3 embryogenic tissueの誘導と継代培養	73
2.2.2.4 不定胚誘導	73
2.2.2.5 発芽と順化	73
2.2.3 結果と考察	73
2.2.3.1 embryogenic tissueの誘導と継代培養	73
2.2.3.2 不定胚誘導	75
2.2.3.3 発芽と順化	77
2.2.4 まとめ	78
2.3 スギにおける不定胚誘導と植物体再生系の開発	78
2.3.1 はじめに	78
2.3.2 材料と方法	79
2.3.2.1 材料	79
2.3.2.2 培地と培養条件	79
2.3.2.3 embryogenic tissueの誘導と継代培養	79
2.3.2.4 不定胚誘導	79
2.3.2.5 発芽と順化	80
2.3.3 結果と考察	80
2.3.3.1 embryogenic tissueの誘導と継代培養	80
2.3.3.2 不定胚誘導	81
2.3.3.3 発芽と順化	82
2.3.4 まとめ	82

2.4 クヌギにおける不定胚誘導と植物体再生系の開発	83
2.4.1 はじめに	83
2.4.2 材料と方法	83
2.4.2.1 材料	83
2.4.2.2 培地と培養条件	83
2.4.2.3 初代培養	84
2.4.2.4 embryogenic callusの誘導と不定胚形成	84
2.4.2.5 発芽と順化	84
2.4.3 結果と考察	85
2.4.3.1 初代培養	85
2.4.3.2 embryogenic callusの誘導と不定胚形成	86
2.4.3.3 発芽と順化	86
2.4.4 まとめ	87
2.5 コシアブラにおける不定胚誘導と植物体再生系の開発	87
2.5.1 はじめに	87
2.5.2 材料と方法	87
2.5.2.1 材料	87
2.5.2.2 培地と培養条件	87
2.5.2.3 初代培養	88
2.5.2.4 不定胚形成	88
2.5.2.5 発芽と順化	88
2.5.3 結果と考察	88
2.5.3.1 初代培養	88
2.5.3.2 不定胚形成	90
2.5.3.3 発芽と順化	90
2.5.4 まとめ	91
2.6 結論	91
3 林木における遺伝子組換え系の開発	92
3.1 緒言	92
3.2 林木におけるGFP遺伝子のレポーター遺伝子としての有効性の検討	93
3.2.1 はじめに	93
3.2.2 材料と方法	93
3.2.2.1 材料	93
3.2.2.2 プラスミドDNA	94
3.2.2.3 パーティクルガンによる遺伝子導入	94

3.2.2.4	GFP遺伝子の発現の観察	94
3.2.3	結果と考察	94
3.2.3.1	樹木の細胞へのGFP遺伝子の導入と発現	94
3.2.3.2	高浸透圧処理と前培養がGFPの発現に及ぼす影響	96
3.2.4	まとめ	96
3.3	アグロバクテリウム法によるヒノキの遺伝子組換え系の開発	98
3.3.1	はじめに	98
3.3.2	材料と方法	98
3.3.2.1	材料	98
3.3.2.2	使用したアグロバクテリウムの系統とその培養法	98
3.3.2.3	embryogenic tissueへの遺伝子導入	100
3.3.2.4	遺伝子組換え体の再生	100
3.3.2.5	GFP遺伝子の発現の観察	100
3.3.2.6	サザンハイブリダイゼーション解析	100
3.3.3	結果と考察	101
3.3.3.1	embryogenic tissueへの遺伝子組換え効率と遺伝子組換え体の再生	101
3.3.3.2	GFP遺伝子の発現	102
3.3.3.3	サザンハイブリダイゼーション解析	104
3.3.4	まとめ	105
3.4	結論	105
4	総合考察	105
4.1	緒言	105
4.2	我が国の林木の不定胚による植物体再生系について	106
4.3	我が国の林木の遺伝子組換え系について	108
4.4	我が国の林木における「遺伝子組換え育種」に対する提言	110
	摘要	111
	謝辞	112
	引用文献	112

1 序 論

1.1 研究の背景

1.1.1 我が国の林木育種の現状と遺伝子組換え技術導入の必要性

我が国の林木育種事業は、森林生産力増強を主目的として1957年に始まった。以来、スギ、ヒノキ、マツなどの主要造林樹種において、成長や樹幹の形状に優れた精英樹や病虫害に対する抵抗性を持った個体などが多く選抜され、これらの接木クローンにより採種園や採穂園が造成された。その結果、2003年度のデータによるとこれらの採種園や採穂園に由来する育種苗木の造林用苗木に対する割合は、スギで63%、ヒノキで77%となっている（林木育種センター 2005）。このように木材生産の場としての森林の遺伝的改良が図られ、林業にもたらした林木育種の成果は大きい。また、林木育種事業が始まって50年近くを経た現在では、次代検定林の調査結果などに基づいて精英樹などの特性の評価も進んでおり、さらにそれらの遺伝母数や遺伝様式も明らかになりつつある。そこで、これまでの成果をもとにさらに優れた精英樹や病虫害に対してより高い抵抗性を持つ個体を創出するため、これまでの精英樹や抵抗性個体の相互間で交雑し、次世代の精英樹や抵抗性個体を選抜するための母集団の育成が進められている。

一方、社会情勢の変化や林業の低迷により、森林に対する主要なニーズはこれまでの木材生産一辺倒から環境保全やアメニティといった公益的機能を発揮することへと変化してきた。このような状況のもと林木育種に対しても、これまでの木材の生産性や品質向上に対応した育種に加えて、花粉症対策、二酸化炭素固定能力の向上、施業の省力化など様々な目標に対応した育種をしかも短期間で行うことが求められている。

しかしながら、林木には交雑により次世代を得るまでに長い期間を必要とすることや樹体が巨大である等の他の植物にはない特徴がある。また、林木の多くは遺伝的に不均一な他殖性植物であるため交雑により形質が次世代で分離する。そこで次世代の優良個体を得るためには、交雑によって得た子供群から優れた形質をもつ個体を選抜しなければならない。また、林木の各種形質を見極めるには長い年月が必要とされる。これらは、優れた形質を持った林木を交雑によって創出するためには多くの制約があることを示唆するものである。例えば、成長が良い品種と病虫害に強い品種を交雑し、両方の形質をあわせ持つスギ品種を開発するためには、まず、人工交雑を行って後代の苗木を養成し、形質を評価するための試験林を作らなくてはならない。このため、多大な労力と経費、広大なフィールドが必要となり、さらに、形質を見極めるために長い調査年月が必要となる。その期間は最低でも成長形質で伐期の約半分（栗延・戸田 2000）、材質で20年以上（太田 1972）といわれている。

近年の林木の育種に求められる多様な目標に対し、選抜と交雑を主体としたこれまでの手法で対応した場合、少なくとも時間的な制約を解決することは難しい。そこで、多様な品種を短期間で開発するためには従来の林木育種の手法に加えて新たな育種法を模索する必要がある。後代における形質の分離と後代の形質の評価に必要な時間的制約を解決するための最も期待できる手法として遺伝子組換え技術がある。その根拠となる遺伝子組換え技術の利点について次項で述べる。

1.1.2 遺伝子組換えの利点とその研究・利用の現状

前項において、交雑を中心とした林木の育種には制約があり、それを解決するための可能性として遺伝子組換え技術の導入をあげた。遺伝子組換えでは交雑にはないいくつかの利点がある。それは第一に、新たな形質を備

えた個体を短期間で創出することができることである。第二に、形質の分離をおこすことなく目標となる形質を付与することができることである。第三に、動植物を問わずいかなる生物の遺伝子でも植物に組込むことができることである。

農作物は林木よりも交雑がはるかに容易であり、しかも多くは自殖性植物であるため、後代で形質の分離が起こりにくい。それでも遺伝子組換えの利点を生かした農作物の育種が進められ、アメリカ、アルゼンチン等では既に大規模な遺伝子組換え農作物の商業栽培が行われている。

遺伝子組換え農作物が初めて販売されたのは1994年のフレーバー・セーバー・トマトと呼ばれる日持ちの良いトマトであった。1996年には本格的に販売されるようになり、全世界における遺伝子組換え農作物の栽培面積は170万haに達した。以後、遺伝子組換え農作物の栽培面積は年々増加し、2003年には6670万haと日本の農作物の総作付面積の約14倍に相当するに至った（農林水産先端技術産業振興センター 2004）。現在の主要な遺伝子組換え農作物は、除草剤耐性ダイズ、虫害耐性トウモロコシ、除草剤耐性ナタネなどの生産性の向上に寄与する形質が付与された農作物である。現在も各種農作物の品種が開発されており、今後は耐乾燥性や耐塩性などの不良環境に強く、耕作地の拡大に寄与する組換え農作物やインスリン分泌促進イネや花粉症緩和イネなどのヒトの健康維持につながる組換え農作物など新たなタイプの組換え農作物が実用化されると考えられる。

林木に比較して交雑育種の容易な農作物においてすらこのように遺伝子組換えを育種に取り入れて効果を上げている。したがって、交雑育種が困難な林木の育種に遺伝子組換えを有効に活用することができれば、その効果は絶大なものとなることが期待できる。

林木では有用形質に関与する遺伝子の解析やそれらを組込んだ組換え林木作出の研究例は多数見られる。パルプ製造の際の廃棄物となるリグニンの含量や組成を改変するためにリグニンの生合成制御遺伝子をポプラに導入する研究がなされている（Hu *et al.* 1999）。鱗翅目害虫の食害に対する耐虫性付与のためのBt遺伝子のポプラへの組換え（Schuler *et al.* 1998）や糸状菌に起因する病気に対する耐病性付与のためのキチナーゼ遺伝子のシダレカンバへの組換え（Pappinen *et al.* 2002）といった病虫害抵抗性を目的とした研究も行なわれている（Giri *et al.* 2004）。また、成長促進を目指した研究としては遺伝子組換えによりジベレリン合成遺伝子を過剰発現させたポプラも報告されている（Eriksson *et al.* 2000）。シダレカンバでは、花器官形成に関与する遺伝子の発現調節領域の下流にRNA分解酵素遺伝子をつないだ遺伝子を組込めば、花の形成が抑制されることが確認された（Lannenpaa *et al.* 2005）。スギにおいても、雄花や雌花の形成を抑えたスギ個体を遺伝子組換えにより開発するために花器官形成遺伝子の単離、解析が進められている（Fukui *et al.* 2001; 栗田ら 2005）。また、花器官形成を制御する組換えポプラの野外試験がアメリカで行われている（Oregon State University 2004）。我が国では、耐塩性のユーカリ（Yamada-watanabe *et al.* 2003）を用いて初めての組換え林木の野外試験が2005年10月に開始された。

このように、林木においても研究は進展し、林木育種の目標となる形質に関与するいくつかの遺伝子は利用可能となっている。さらに有用な形質に関わる新たな遺伝子の単離、解析に関する研究も行われ（Fukui *et al.* 2001; 栗田ら 2005; Nanjo *et al.* 2004）、それらの遺伝子を林木に組込めば林木育種に大きな効果をもたらすものと考えられる。

しかし、これらの遺伝子のもつ形質を付与できる林木は少ない。それは、遺伝子組換え林木を作る効率的な手法が確立している樹種はポプラ等のごく少数の樹種に限られているからである。我が国の林木育種の対象となる

重要造林樹種においてはこれらの手法が確立されているものは皆無と言える。そこで、遺伝子組換え技術を我が国の林木育種に活用し、新たな形質を付与した遺伝子組換え林木を作出するためのモデルを示すために、本研究を行った。

1.2 研究目的と本論文の構成

前節に述べたように交雑による林木の育種には多くの制約があり、それを補うための遺伝子組換え技術を林木育種に取り込み活用する必要がある。遺伝子組換えを林木育種に活用するには、目的とする形質を支配する遺伝子を植物の細胞に組み込み、その細胞から植物体を再生させる一連の方法、すなわち「遺伝子組換え系」が開発されていなければならない。しかし、我が国の重要な造林樹種ではこの遺伝子組換え系が確立されている樹種は皆無である。

そこで、本研究では遺伝子組換え系を確立するための基礎研究を行い、その成果に基づき遺伝子組換えを活用した林木育種のモデルを示すことを目的とする。

遺伝子組換え系を開発するためには効率よく単細胞から植物体を再生させる方法、すなわち「植物体再生系」が開発されている必要がある。増殖効率がよく、遺伝子組換えに応用できる植物体再生系として不定胚を経た植物体再生系があげられる。そこで、まず不定胚を経た植物体再生系を第2章で開発した。対象樹種としては、より多くの林木において遺伝子組換えが育種に利用可能となるように広範囲の樹種を使用した。すなわち、針葉樹については代表的な造林樹種であるヒノキとスギを、広葉樹についてはシイタケ栽培のほだ木として重要な樹種であるクヌギと特用樹としての利用価値が高いウコギ科の落葉高木であるコシアブラを選んだ。

遺伝子組換え系を開発するためには遺伝子組換えの成否を判断するためにレポーター遺伝子を使用する。そこで第3章では、まず林木における緑色蛍光タンパク質（GFP, Green Fluorescent Protein）遺伝子のレポーター遺伝子として有効性を検証した。ここではパーティクルガンで林木の細胞にGFP遺伝子を導入し、GFPの発現を調査した。次に第2章で開発した不定胚による植物体再生系を利用して遺伝子組換え系を開発した。対象樹種としては最も重要な造林樹種であるヒノキを用い、アグロバクテリウム法によりGFP遺伝子を組込んだ遺伝子組換え林木を再生させた。

第4章では本論文で開発した方法について総合的に討論し、我が国の林木の遺伝子組換えのモデルを提示するとともに遺伝子組換えによる新品種開発について提言した。

2 林木の不定胚による植物体再生

2.1 緒言

遺伝子組換え系を開発するためには効率の良い植物体の再生系が必要である。しかし、我が国の林木においては、効率良く、安定して植物体を再生させる方法が確立されている樹種はない。そこで、本章では不定胚による植物体再生系を開発した。

不定胚とは体細胞から無性的に発生する胚のことで、受精卵から発生する種子胚とは区別される。自然条件下の不定胚分化としては、カンキツ類において見られる珠心細胞から分化する珠心胚（nucellar embryo）の分化が知られているが植物界では珍しい（Sharma and Thorpe 1995）。組織培養により人為的に体細胞から分化させる不定胚は体細胞不定胚（somatic embryo）と呼ばれる。不定胚は種子胚と類似の形態および過程を経て分

化し、発芽により1個の植物体になることができる。

培養細胞からの不定胚分化は、ニンジン¹⁾の体細胞を材料としてReinert (1958) およびStewardら (1958) によって初めて発見されて以来、現在までに多数の植物種において不定胚分化が報告されている。木本植物ではジャクダン科に属するサンダルウッドで初めて報告された (Rao 1965)。針葉樹ではドイツトウヒでの報告 (Hakman *et al.* 1985; Chalupa 1985) が初めてである。不定胚分化がなされた木本植物の樹種数は1995年の総説によると約150樹種とされ (Dunstan *et al.* 1995)、その数は現在も増加しているが、効率的に植物体を再生できる樹種はそれほど多くはない。我が国の林木における不定胚を経た植物体再生については、針葉樹については造林用樹種であるスギ (Maruyama *et al.* 2000; Igasaki *et al.* 2003; 谷口ら 2004)、ヒノキ (Maruyama *et al.* 2005b)、サワラ (Maruyama *et al.* 2002)、カラマツ (Ogita *et al.* 1999; Kim *et al.* 1999; 谷口ら 2001)、クロマツ (Taniguchi 2001; Maruyama *et al.* 2005a)、アカマツ (Taniguchi 2001) や絶滅危惧種であるヤクタネゴヨウ (Hosoi and Ishii 2001) で報告されている。広葉樹ではコナラ (Ishii *et al.* 1999)、クヌギ (Sasaki *et al.* 1988; 原口 1988; 香西・戸田 1990; Kim *et al.* 1994; Kim *et al.* 1997)、タラノキ (小山 1992; 原口 1993; Moon and youn 1999) などがある。しかし、誘導できる不定胚の数がごく少数であったり、不定胚から植物体への再生が困難であったり、材料の遺伝子型によりその成否が左右されるなど、解決されなければならない問題は多い。

体細胞からの不定胚分化系は人工的に制御された環境のもと、胚発生²⁾の形態学的、生理学的、分子生物学的基礎研究のための実験系として用いることができる。草本植物ではニンジンが胚形成のモデル植物となっていることは良く知られている。木本植物ではドイツトウヒ (von Arnold *et al.* 1995) が不定胚分化の容易さからモデル植物として多くの研究者に利用されている。一方、不定胚による植物体再生系は林業や林木育種といった実用面へ応用することができる。第一には、遺伝的に優れた個体から増殖効率の高い植物体再生系を確立すれば、優良種苗の大量増殖につながる。バイオリアクターや人工種子の技術を組み合わせればその効果はさらに向上する。第二には、本論文の目的である遺伝子組換えによる新品種開発への利用があげられる。

組織培養による植物体再生系には不定胚形成によるもの以外に不定芽形成、プロトプラスト培養、腋芽培養によるものが知られている。これらのうち、不定芽形成はポプラの場合は遺伝子組換えに有効な植物体再生系であるが、本章で取り上げるヒノキ、スギ、クヌギ、コシアブラでは、不定芽誘導は困難であり、効率的な方法の報告はない。プロトプラストはエレクトロポレーション法による遺伝子導入に用いることができるが、プロトプラスト培養によって効率的に植物体を再生することは、ポプラにおいてすら容易ではない。また、腋芽培養は多細胞からなる成長点を伸長させて植物体再生を行う技術であるために、遺伝子組換え体がキメラとなる危険性があるので遺伝子組換えには不適当な技術である。一方、不定胚は増殖率が高い効率的な植物体再生系であり、針葉樹を中心とした多くの樹種 (Tang and Newton 2003の総説) で遺伝子組換えに用いられている。そこで、本章で取り上げる樹種 (ヒノキ、スギ、クヌギ、コシアブラ) で遺伝子組換えを行うには不定胚を経る植物体再生系を利用することが最善と考え、これらの樹種の不定胚経路による植物体再生方法について検討した。次節では、まずヒノキの不定胚経路による植物体再生について述べる。

2.2 ヒノキにおける不定胚誘導と植物体再生系の開発

2.2.1 はじめに

ヒノキの材は強度性能や保存性に優れ、見た目にも美しいので日本で最も好まれる建築用材の一つである。総ヒノキ作りの家屋は関西地方を中心として憧れの対象となっている。材価格もスギやマツに比較して高い。これらの理由により、近年は年間の造林面積がスギを抜いて第一位となった(林木育種センター 2005)。一方、ヒノキにはヒノキ樹脂脂枯病やヒノキカワモグリガなどの重要な病虫害があり、またスギと同じくヒノキ花粉による花粉症が大きな問題となっている。これらに対する対策として遺伝子組換えにより新しい品種を創出することは意義深いと考えられる。

ヒノキ属における不定胚による植物体の再生については、サワラの報告がある (Maruyama *et al.* 2002)。ヒノキの不定胚による植物体の再生については、ごく最近になって報告 (Maruyama *et al.* 2005b) がなされたが、それまでは不定芽による再生の報告 (Ishii 1986など) のみであった。ヒノキの不定芽による植物体再生系は増殖率が低く、遺伝子組換えには不適當であり、不定胚による植物体の再生系を開発する必要があった。そこで、ヒノキ精英樹を供試材料とし、未成熟胚から不定胚経由の植物体再生について検討した。

2.2.2 材料と方法

2.2.2.1 材料

林木育種センター本所の交配園(茨城県日立市)のヒノキ精英樹10クローン(表-2-2-1)からクローン別に採取した未成熟球果を供試材料とした。これらを2002年と2003年の7月初旬に採取した。

表-2-2-1 ヒノキの家系別の不定胚を経た植物体再生の頻度

家系名	供試外植体数	embryogenic tissue形成数 (%*)		不定胚形成系 統数 (%**)		発芽系統数 (%***)	
札郷 3	25	8	(32)	6	(24)	5	(20)
恵那 3	25	9	(36)	5	(20)	5	(20)
大滝102	25	6	(24)	3	(12)	3	(12)
三保 5	25	8	(32)	3	(12)	3	(12)
伊豆 5	25	8	(32)	3	(12)	2	(8)
鬼泪 4	25	7	(28)	2	(8)	1	(4)
小坂 3	25	7	(28)	2	(8)	1	(4)
富士 3	25	10	(40)	1	(4)	1	(4)
丹沢 8	20	5	(25)	1	(5)	0	(0)
平 2	25	2	(8)	0	(0)	0	(0)
合計	245	70	(28.6)	26	(10.6)	21	(8.6)

*100×embryogenic tissueを形成した外植体数/供試外植体数

**100×不定胚を形成した系統数/供試外植体数

***100×不定胚が発芽した系統数/供試外植体数

採取した球果は流水で10分間水洗いした後、70%エタノールに10分間浸漬して表面殺菌した。その後、滅菌水で3回すすいで、エタノールを除去した。滅菌済み球果から種子を取り出し、これらを70%エタノールに1分、6%過酸化水素水に5分間浸漬して表面を殺菌した。実態顕微鏡下で滅菌済み種子から雌性配偶体ごと摘出し、外植体とした。この雌性配偶体には、子葉を分化する前の分化段階にある未成熟な種子胚(ステージ6-11; Nagmani *et al.* 1995) が内包されており、その胚の細胞が培地上で分裂を繰り返すことによりembryogenic tissue (胚性の細胞とそれに付随するサスペンダー細胞からなる細胞塊) が誘導されることが多くの針葉樹で示されている (Becwar *et al.* 1990; Gupta and Grob 1995; Gupta *et al.* 1995; Keinonen-Mettälä *et al.* 1996)。

2.2.2.2 培地と培養条件

本節で用いた培地を表-2-2-2にそれらを示す。不定胚誘導までの段階に用いた培地は、Smith (1996) がラジアータマツの不定胚誘導の培地に適すると報告した培地に改変を加えた培地である。発芽には林木の組織培養にしばしば用いられるWoody Plant Medium (Lloyd and McCown 1980) を改変したWPG培地を用いた。培地の調製方法は一般的な方法に準じたが、ビタミン類、アミノ酸類およびアブシジン酸 (ABA) はフィルター濾過により滅菌し、これらをオートクレーブ処理 (121℃, 15分) した培地に加えた。培地のpHは5.75~5.85に調製した。培養は初代培養から不定胚誘導までは25℃・暗所で、発芽は25℃・蛍光灯照明 (約100μmol m⁻² s⁻¹) による16時間日長で行った。

表-2-2-2 ヒノキの不定胚誘導と植物体再生に用いた培地の一覧

培地の名称	SM1	SM2	SM3	SM4	WPG
無機成分	SM1	SM2	SM3	SM3	WPM
ビタミン類及 びアミノ酸類	SM1	SM2	SM3	SM3	WPM
糖	10g/l サッカロース	30g/l サッカロース	30g/l サッカロース*	30g/l マルトース	20g/l サッカロース
培地支持体	8g/l 寒天	8g/l 寒天	3g/l ゲルライト*	3g/l ゲルライト	5g/l ゲルライト
植物ホルモン	なし	なし	なし*	100 M ABA	なし
その他	2g/l 活性炭	なし	なし*	150 g/l PEG 2g/l 活性炭	2g/l 活性炭

SM1: Smith Standard Embryonic Tissue Captur medium (Smith 1996)

SM2: Smith Standard Embryogenesis medium (Smith 1996)

SM3: Smith Embryo Develop medium (Smith 1996)

WPM: Woody Plant Medium (Lloyd and McCown 1980)

*ヒノキの不定胚誘導に適した培地を探索する実験での組成は本文参照のこと。

2.2.2.3 embryogenic tissueの誘導と継代培養

外植体をSM1培地に置床した。4週間後に外植体から誘導されたembryogenic tissueをSM2培地に移植し、4週間培養した。その後、SM3培地で2～3週間毎に移植を繰り返し、継代培養を行った。

2.2.2.4 不定胚誘導

ABA、ポリエチレングリコール4000 (PEG) およびゲルライトの濃度、さらに糖の種類と濃度の違いが不定胚形成に及ぼす影響を調べ、不定胚誘導に最適と考えられる培地組成を4系統（三保5-1-3、三保5-1-4、三保5-3-2並びに恵那3-1-1）のembryogenic tissueを供試して探索した。次に最適と考えられた培地に精英樹10クローンの未成熟種子から誘導された合計70系統のembryogenic tissueを培養して家系による不定胚形成頻度の違いを調査した。

2.2.2.5 発芽と順化

成熟した不定胚をWPG培地に移して培養した。発根し、初生葉が出現した個体を発芽個体と定義し、培養1ヶ月後に発芽個体数を計数した。また、2cm以上に伸長した発芽個体をピートモスとパーミキュライト（1:1）を加えたポットに移植し、温室内で順化させた。

2.2.3 結果と考察

2.2.3.1 embryogenic tissueの誘導と継代培養

外植体をSM1培地で培養を開始してから2～3週間以内にembryogenic tissueが雌性配偶体の珠孔側（図－2-2-1のA）またはメスで切られた切れ込み部分から誘導された。

本研究で供した7月初旬における種子胚は子葉が分化する前の非常に未熟な分化段階（ステージ6-11; Nagmani *et al.* 1995）にあったが、7月中旬には子葉の分化開始（ステージ12; Nagmani *et al.* 1995）から子葉伸長開始（ステージ13; Nagmani *et al.* 1995）の分化段階にあり、これらの種子胚を供試材料とした場合にはembryogenic tissueは誘導されなかった。

外植体から誘導したembryogenic tissueの増殖のためにSM2培地、次にSM3培地で培養を続けた（図－2-2-1のB）。増殖スピードは系統により様々で、培養開始から10週間後には最大で直径1cmの大きさの塊になっていた。SM3培地で継代培養すると、embryogenic tissueは3週間毎に最大で約3倍の大きさに増殖した。初代培養開始10週間後に、家系毎のembryogenic tissue誘導頻度を求めた。表－2-2-1に示すように2003年に供試した10家系すべてにおいてembryogenic tissueは誘導され、家系を込みにしたembryogenic tissueの誘導頻度は28.6%であった。家系毎の誘導頻度は平2の8%から富士3の40%まで大きなバラツキが認められた。Maruyamaら（2005b）のヒノキの報告では、供試した7家系のうち5家系でembryogenic tissueが誘導され、全供試数に対するembryogenic tissueの誘導頻度は15.9%であった。家系毎の誘導頻度についてMaruyamaら（2005b）は報告していない。本論文の家系を込みにした誘導頻度を他の針葉樹と比較すると、ヒノキ属のサワラの33.3%（Maruyama *et al.* 2002）と同程度であるが、テーダマツの1.4%（Becwar *et al.* 1990）やストロブマツの15.3%（Garin *et al.* 1998）よりも高く、シロトウヒの53.1%（Park *et al.* 1993）よりも低い値であった。

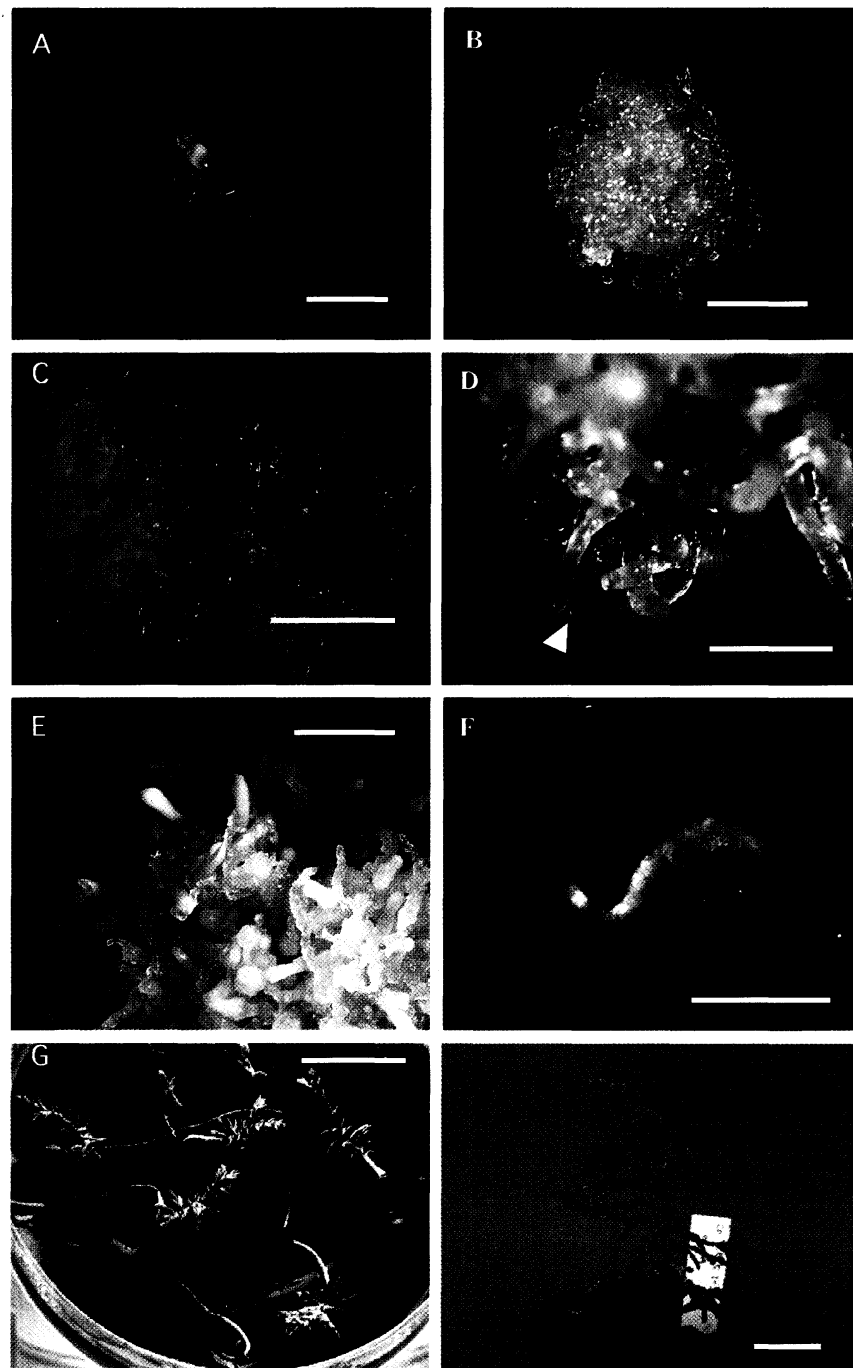


図-2-2-1 ヒノキにおける未成熟種子からの不定胚誘導を経た植物体再生

A: 外植体から誘導されたembryogenic tissue, B: SM3培地で継代培養中のembryogenic tissue, C: 不定胚誘導培地で3週間培養後にembryogenic tissueから形成したサスペンサー領域, D: 4週間目にサスペンサー領域の先端部に形成された胚性領域 (arrowheads), E: 培養8週目の子葉構造を有する成熟した不定胚, F: 発芽培地における不定胚の発芽, G: 2ヶ月間発芽培地で培養した幼植物体, H: 順化後の再生植物体。Bars: 2 mm (A, D), 4 mm (B, C, E, F), 2 cm (G, H)。

2.2.3.2 不定胚誘導

培養2週間後には不定胚誘導培地でembryogenic tissueの表面から多数のサスペンサー領域が突出し（図-2-2-1のC）、4週間目にはサスペンサー領域の先端部に胚性領域が出現した（図-2-2-1のD）。5週目には胚性領域に子葉の原基が形成し始め、8週目には胚軸部分と子葉部分が明確に区別できる成熟した不定胚が分化していた（図-2-2-1のE）。

本研究では4系統のembryogenic tissueを用いて不定胚誘導に適した培地組成を検索した。そのうち3系統（三保5-1-3、三保5-1-4並びに恵那3-1-1）で成熟不定胚の形成が見られたので以下に結果を示す。

最初に糖の種類（サッカロースとマルトース）とPEGの濃度（75, 150 g/l）の影響を調査した。その結果、図-2-2-2に示すように糖としてマルトースを用い、PEG濃度を150 g/lとした培地のみで3系統ともに不定胚が誘導されたが、その他の培地では不定胚はどの系統においても誘導されなかった。このことより、糖はマルトースが適し、PEGの濃度は150 g/lが適することが明らかとなった。針葉樹の不定胚誘導において培地の浸透圧を上げるためにPEGを用いる（Gupta and Grob 1995）が、75 g/lではヒノキの不定胚誘導のためには浸透圧が低すぎると推測された。一方、糖としてマルトースが適することに対する原因は定かでないが、サワラ（Maruyama *et al.* 2002）やモミ属（Nørgaard 1997）などの多くの針葉樹で同様の結果が報告されている。

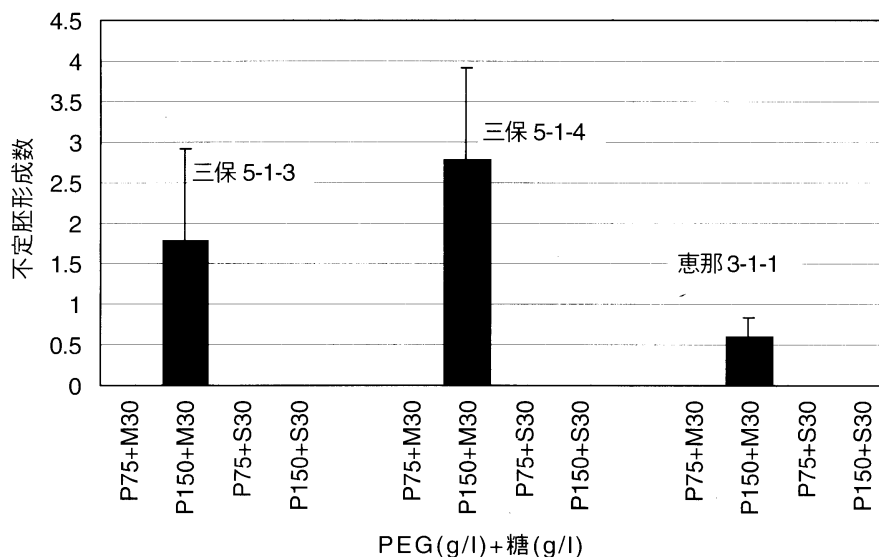


図-2-2-2 不定胚形成に及ぼすPEGと糖の影響

SM3培地に2 g/l 活性炭, 100μM ABA, 4.5 g/l ゲルライトを加えた培地を用いた。不定胚形成数は、約50mgのembryogenic tissueに形成された平均の成熟不定胚数を示す。P: PEG, M: マルトース, S: サッカロース。図中のバーは標準誤差を示す。供試数は各培地当たり5個以上とした。

次に、培地支持体として用いるゲルライトの濃度（1.5, 3.0, 4.5 g/l）の影響を調査した。三保5-1-4並びに恵那3-1-1では3.0 g/lが、三保5-1-3では3.0または4.5 g/lが適した結果となった（図-2-2-3）。これらのことよ

母の不定胚誘導にはゲルライトの濃度を3.0 g/lとするのが良いと判断した。サワラではゲルライトの濃度を5.0 g/lとしている（Maruyama *et al.* 2002）が、それより低い濃度での結果は示されていない。テーダマツでは、2.5 g/lが適する（Pullman *et al.* 2003）とされている。ゲルライトの濃度が高すぎると培地中のマグネシウム、カルシウム、亜鉛、マンガンの植物細胞への取込みが阻害される（Van Winkle *et al.* 2003）ので、ゲルライトの濃度を必要以上に高めることは不定胚誘導を抑制すると推測された。

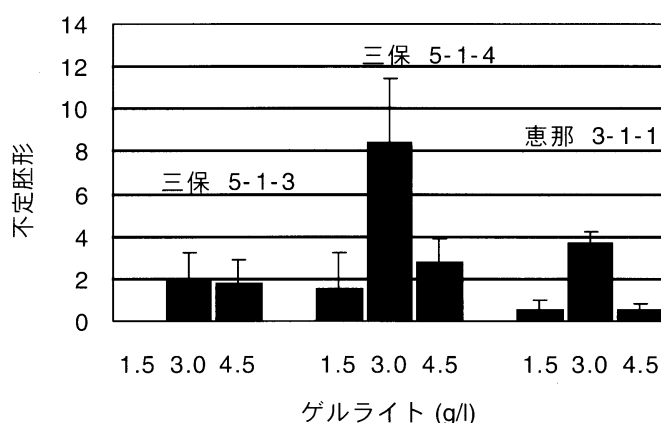


図-2-2-3 不定胚形成に及ぼすゲルライトの濃度の影響

SM3培地に2 g/l 活性炭, 100μM ABA, 30 g/l マルトースを加えた培地を用いた。不定胚形成数は、約50mgのembryogenic tissueに形成された平均の成熟不定胚数を示す。図中のバーは標準誤差を示す。供試数は各培地当たり5個以上とした。

さらに培地に加えるABA（10, 100, 300μM）とマルトース（30, 60 g/l）の濃度の影響についても検討した。不定胚誘導頻度が最も高いABA濃度は系統やマルトースの濃度により異なっていた（図-2-2-4）のでABAの最適濃度についての明確な結論をだすには至らなかったものの、10~100μMの濃度で3系統すべてにおいて不定胚が誘導されたことより、ABA濃度は10~100μMが適すると判断した。一方、マルトースの濃度については、30 g/lではすべての系統で不定胚が形成されたが60 g/lでは恵那3-1-1のみしか不定胚は形成されなかった。このことよりマルトース濃度は30 g/lが適すると判断した。針葉樹の不定胚誘導に適したマルトースの濃度は、樹種によって異なることが報告されている。ヨーロッパクロマツでは90 g/l（Salajova *et al.* 1999）とヒノキより高く、モミ属では30~40 g/l（Nørgaard 1997）とヒノキとほぼ同様である。

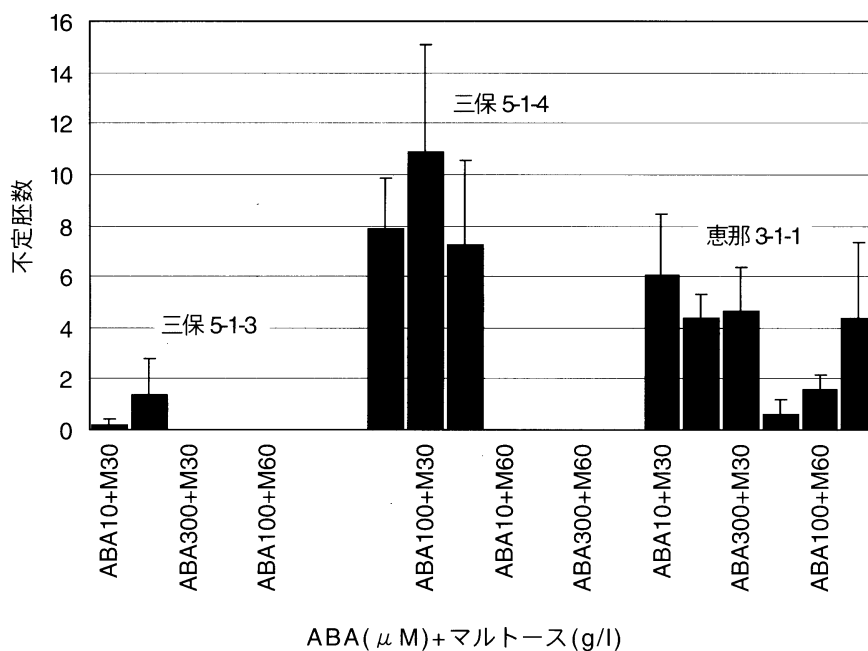


図-2-2-4 不定胚形成に及ぼすABAとマルトースの濃度の影響

SM3培地に2 g/l 活性炭, 150 g/l PEG, 3 g/l ゲルライトを加えた培地を用いた。不定胚形成数は、約50mgのembryogenic tissueに形成された平均の成熟不定胚数を示す。M: マルトース。図中のバーは標準誤差を示す。供試数は各培地当たり5個以上とした。

以上の実験により、ヒノキの不定胚誘導には以下の培地が適すると考えられた。

2 g/l の活性炭, 150 g/l のPEG, 30 g/l のマルトース, 100 μ MのABA, 3.0 g/l のゲルライトを加えたSM3培地；以下この培地をSM4培地とする。

次にSM4培地に精英樹10クローンから誘導された合計70系統のembryogenic tissueを培養した。その結果, 9家系合計26系統で成熟不定胚が誘導された(表-2-2-1)。不定胚形成が認められた9家系のうち, 家系別の不定胚誘導系統数の割合は最大で札幌3の24%で, 最小は富士3の4%であった。

2.2.3.3 発芽と順化

成熟不定胚をWPG培地で培養して1週間以内に根, 胚軸と子葉の伸長が開始した(図-2-2-1のF)。初生葉が出て発根しなかった個体も多く見られた。活性炭を加えない培地でも発芽率は同程度であったが, 発芽個体の生育は劣っていたので, 活性炭は発芽個体の成長に何らかの効果があるので発芽培地に加えるべきであると判断した。9家系, 合計26系統の不定胚を発芽培地で培養したところ8家系, 21系統で不定胚が発芽した(表-2-2-1)。発芽が認められた8家系における家系別の発芽系統数の割合の最大値は札幌3と恵那3の20%, 最小値は鬼泪4, 小坂3, 富士3の4%であった。合計202個の不定胚を発芽培地で培養した際の発芽率は40.1% (81/202) であった。発芽培地で培養2ヶ月後に2cm程度に伸長成長した個体(図-2-2-1のG)の順化を試みたところ, ほぼ全ての個体は順化し, 温室内で成長を続けた(図-2-2-1のH)。

2.2.4 まとめ

本研究により、ヒノキにおいて以下の方法により不定胚経由で植物体を再生できることが明らかになった。

- ①子葉が分化する前の分化段階の種子胚を内包する雌性配偶体をSM1培地で培養することによりembryogenic tissueを誘導し、続いてSM2培地、SM3培地で順次培養することにより、embryogenic tissueを増殖させる。
- ②embryogenic tissueをSM4培地で培養して不定胚を誘導する。
- ③不定胚をWPG培地で培養すると発芽し、再生植物体が得られる。

不定胚誘導には培地の浸透圧を高めるために高濃度のPEG (150 g/l) を加えることと糖として30 g/lのマルトースを用いることが重要な要因であった。この方法をヒノキ精英樹10クローンに適用したところ、8クローンの未成熟胚に由来する系統で不定胚を経由して植物体が再生した。このことより、本研究で開発した方法は多数の精英樹に適用可能な汎用性の高い植物体の再生方法と考えられた。また、embryogenic tissue形成、不定胚形成、不定胚発芽の頻度には家系による差が見られ、不定胚を経た植物体再生能力の高い家系選抜の可能性が示唆された。

本節に示したヒノキの植物体再生で得られた知見を生かし、次節ではスギの植物体再生系の開発を行った。また、このヒノキの植物体再生系を利用した遺伝子組換え系の開発については第3章第3節で述べる。

2.3 スギにおける不定胚誘導と植物体再生系の開発

2.3.1 はじめに

スギは我が国を代表する造林樹種であり、内装材や構造材として広く利用され、古くから日本人の生活に深く関わってきた。第二次世界大戦による戦災地の復興に資するための拡大造林によって急激にスギの造林面積は増加し、現在その面積は森林面積の約20%を占めている。現在、スギ花粉症は国民病といわれるほど大きな問題となっているが、林業を取巻く厳しい状況の中、伐期を迎えたスギ林が放置されることもその一因と言われている。したがって、スギの育種において花粉症対策は、避けることのできない重要な課題になっており、遺伝子組換えによりスギ花粉症対策品種を創ることは意義深いと考える。

スギの組織培養の研究は、腋芽培養（佐藤 1989; 谷口・近藤 1997）や不定芽誘導（佐藤 1986）による個体再生が報告されている。また、不定胚誘導についても針葉樹のなかで最も早くから実験が行なわれ、その結果、embryogenic tissue誘導方法が明らかにされた（Taniguchi and Kondo 1998; Taniguchi and Kondo 2000）が、不定胚の分化には至らなかった。これに対し、Maruyamaら（2000）は不定胚形成による植物体再生を初めて報告し、その後、Igasakiら（2003）も報告した。しかし、再現性の確認がなされていなく、用いた材料も明らかにされていないので、多数のスギ品種に適用可能かどうかは明らかにされていない。また、それらの方法を用いた効率の良い遺伝子組換え系も報告されていない。

そこで、スギ精英樹の遺伝子組換えに利用できる不定胚による植物体再生系を確立する必要性を認め、前節に示したヒノキの不定胚による植物体再生系で明らかにした知見に基づき、スギ精英樹の未成熟胚から不定胚経由による植物体再生系を開発した。

2.3.2 材料と方法

2.3.2.1 材料

林木育種センター本所の交配園（茨城県日立市）のスギの精英樹6クローン（表-2-3-1）から採取した未成熟球果を主な供試材料とした。これらを1998年から2003年の7月初旬から中旬に採取した。

表-2-3-1 スギの家系別の不定胚を経た植物体再生の頻度

家系名	供試外 植体数	embryogenic tissue 形成数 (%*)	不定胚形成系統数 (%**)	発芽系統数 (%***)
久慈6	25	7 (28)	5 (20)	5 (20)
西多摩6	25	7 (28)	4 (16)	4 (16)
周南1	25	8 (32)	4 (16)	3 (12)
西多摩19	20	8 (40)	2 (10)	1 (5)
郷台1	25	8 (32)	1 (4)	0 (0)
大田原1	25	1 (4)	1 (4)	0 (0)
合計	145	39 (26.9)	17 (11.7)	13 (9.0)

*100×embryogenic tissueを形成した外植体数/供試外植体数

**100×不定胚を形成した系統数/供試外植体数

***100×不定胚が発芽した系統数/供試外植体数

球果と種子の表面殺菌の方法はヒノキに準じた。7月初旬ではヒノキと同様に子葉が分化する前のステージ6-11 (Nagmani *et al.* 1995) の種子胚を内包する雌性配偶体を外植体（タイプ1の外植体）とし、7月中旬では子葉構造が分化したステージ12-13 (Nagmani *et al.* 1995) の種子胚を摘出して外植体（タイプ2の外植体）とした。

2.3.2.2 培地と培養条件

本節で使用した培地を表-2-3-2に示す。培地調製法と培養条件は前節のヒノキに準じた。

2.3.2.3 embryogenic tissueの誘導と継代培養

予備実験によりスギのembryogenic tissueの誘導に適することが明らかとなっていたMD1培地に外植体を置床し、4週間培養した。その後、外植体から誘導されたembryogenic tissueをMD2培地に移植し、2～3週間毎に継代培養を行った。

2.3.2.4 不定胚誘導

表-2-3-2-2に示したヒノキの不定胚誘導用に開発したSM4培地（2.0 g/lの活性炭, 150 g/l PEG, 30 g/l マルトース, 100μM ABA, 3.0 g/l ゲルライトを加えたSM3培地）にMD2培地で継代培養したembryogenic tissueを移植した。ここでは、まずスギ精英樹周南1の未成熟胚から誘導したSN1-9系統を供試して不定胚が分化することを確認し、次に精英樹6クローンから誘導された合計39系統のembryogenic tissueを供試して家系による不定胚形成頻度の違いを調査した。

表-2-3-2 スギの不定胚誘導と植物体再生に用いた培地の一覧

培地の名称	MD1	MD2	SM4	GD
無機成分	1/2MS	1/2mMS	SM3	mGD
ビタミン類及 びアミノ酸類	1/2MS	1/2MS+0.5g/lグルタミン +1g/lカゼイン加水分解物	SM3	mGD
糖	30g/l サッカロース	30g/l サッカロース	30g/l マルトース	10g/l サッカロース
培地支持体	8g/l 寒天	4.5g/l ゲルライト	3g/l ゲルライト	5g/l ゲルライト
植物ホルモン	10 μ M 2,4-D	2 μ M 2,4-D	100 μ M ABA	なし
その他	なし	なし	150g/l PEG 2g/l 活性炭	なし

1/2MS: Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog 1962)の濃度を半分にした培

1/2mMS: 1/2MS培地中のNH₄NO₃とKNO₃の濃度を1/2(各々412.5 mg/l, 475 mg/l)とした培

SM3: Smith Embryo Develop medium (Smith 1996)

mGD: Modified Gresshoff and Doy medium (Okamura and Kondo 1995)

2.3.2.5 発芽と順化

前節に準じた。ただし、予備実験の結果に従い、GD培地を発芽培地として用いた。

2.3.3 結果と考察

2.3.3.1 embryogenic tissueの誘導と継代培養

タイプ1の外植体からは、ヒノキと同様に2~3週間以内にembryogenic tissueが誘導された(図-2-3-1のAとB)。タイプ2の外植体からは、主に胚軸部分からembryogenic tissueが誘導され、子葉部分からは淡い黄色を呈する胚形成能を持たない細胞群が誘導された。タイプ1の外植体からのembryogenic tissueの誘導効率は26.9%であった。一方、タイプ2の外植体からの誘導効率は45.6%と高い値であったが、胚形成能を持たない細胞群が多かったので不定胚誘導実験には使用しなかった。不定胚誘導実験には、ヒノキの場合と同様に、分化段階が子葉を分化する前の種子胚(タイプ1の外植体)から誘導されたembryogenic tissueを材料とした。

初代培養開始10週間後に家系毎のembryogenic tissue誘導頻度を求めた(表-2-3-1)。6家系すべてにおいてembryogenic tissueは誘導され、家系を込みにしたembryogenic tissueの誘導頻度は26.9%とヒノキの場合とほぼ同じ値であった。また、ヒノキと同様に家系毎の誘導頻度にはバラツキが認められ、最大で西多摩19の40%、最小では大田原1の4%であった。Maruyamaら(2000)の報告では3家系を供試した結果、家系毎の誘導頻度は10~15%であり、本研究のような大きなバラツキは認められない。Igasakiら(2003)の報告では10家系を供試し、全供試材料に対するembryogenic tissue誘導頻度は約7%であったが、家系毎の誘導頻度は報告されていない。

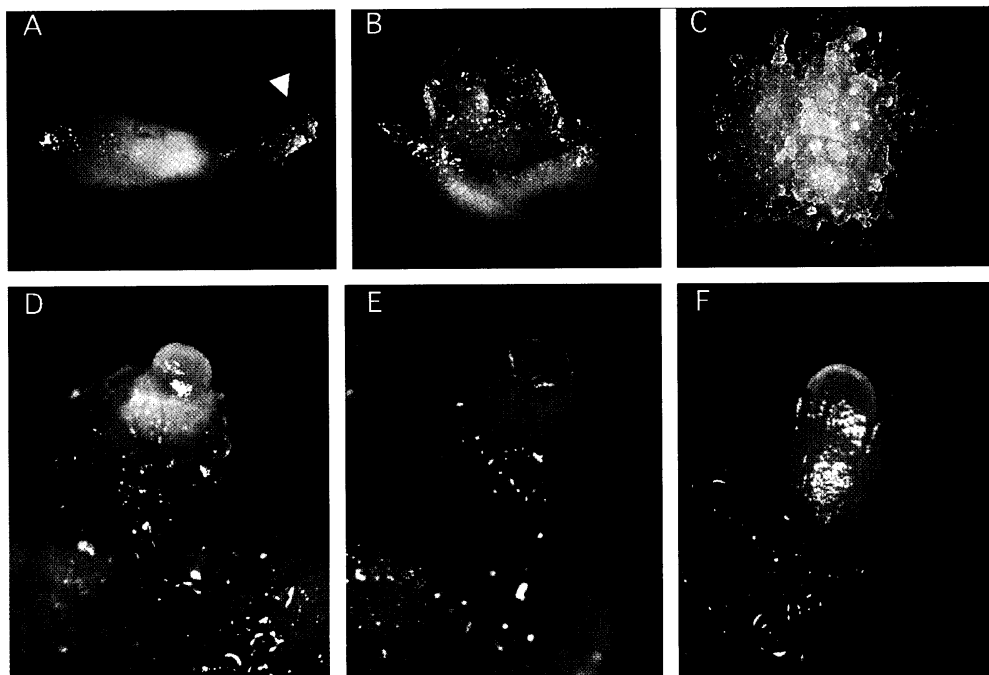


図-2-3-1 スギにおける未成熟種子からの不定胚誘導

A: 雌性配偶体の珠孔側に誘導されたembryogenic tissue (arrowhead), B: 雌性配偶体の切り込みに誘導されたembryogenic tissue, C: 不定胚誘導培地で2週間培養後のembryogenic tissue, D: 3週間にサスペンサー領域の先端部に形成された胚性領域, E: 培養4週目に胚性領域に形成された子葉の原基, F: 培養5週目の子葉と胚軸が伸び始めた不定胚。

2.3.3.2 不定胚誘導

SN1-9を用いた実験によるとSM4培地でスギのembryogenic tissueからはヒノキの場合と同様の過程を経て成熟した不定胚が誘導された。しかし、サスペンサー領域の突出はあまり見られず(図-2-3-1のC)、ヒノキよりも幾分透明感のあるembryogenic tissueの表面にサスペンサー部分が少し盛り上がり、その先端に胚性の領域が現れ(図-2-3-1のD)、やがてその部位から子葉構造が分化した(図-2-3-1のEとF)。スギでは、ヒノキよりも1週間程度成熟不定胚分化に要する時間は短く、不定胚誘導培地で培養すると7週目には成熟不定胚が現れた(図-2-3-2のA)。SN1-9系統ではembryogenic tissue 50mg当たりの不定胚数の平均値は約12.8個であった。PEG, ゲルライト, 糖の種類の影響についても調査したが、最適と考えられる組成はヒノキと同じであった。

次に精英樹6クローンから誘導された合計39系統のembryogenic tissueをSN1-9系統と同様にSM4培地で培養した。その結果、6家系、合計17系統で成熟不定胚が誘導された(表-2-3-1)。家系毎の不定胚誘導系統の割合は、郷台1と大田原1の4%から久慈6の20%となり、ヒノキと同程度のバラツキが認められた。Maruyamaら(2000)やIgasakiら(2003)は、不定胚が誘導できた家系や系統の割合については言及しておらず、これらの知見は本研究において初めて明らかにされたものである。

2.3.3.3 発芽と順化

GD培地で成熟不定胚を培養すると胚軸が伸長し、次に子葉が展開し、やがて初生葉が現れた。根が出るのはほとんどの場合その後であった。発芽、即ち初生葉が出現し、根が出る（図-2-3-2のB）のに要する期間は約6週間とヒノキより2週間ほど長い期間を要した。6家系、合計17系統の不定胚を発芽培地で培養したところ4家系、13系統の不定胚が発芽した（表-2-3-1）。発芽が認められた4家系のうち、発芽系統数の割合が最大であった家系は久慈6で、最小であった家系は西多摩6であり、各々のその値は20%と5%であった。合計949個の不定胚を発芽培地で培養した際の発芽率は32.6% (309/949) とヒノキよりやや低い値であった。ヒノキと同様の方法により順化は容易に行うことができた（図-2-3-2のC）。

2.3.4 まとめ

本研究の結果より、以下の方法によりスギは不定胚経由で植物体を再生することが明らかになった。

- ①子葉を分化する前の種子胚を内包する雌性配偶体をMD1培地で培養することにより、embryogenic tissueを誘導し、続いてMD2培地で培養することにより、embryogenic tissueの増殖を行なう。
- ②embryogenic tissueをヒノキの不定胚誘導に用いた培地と同組成のSM4培地で培養すると不定胚が誘導できる。
- ③GD培地で培養すると不定胚は発芽し、再生個体を得られる。

この方法をスギ精英樹6クローンに適用したところ、4クローンの未成熟胚に由来する系統で不定胚を経由して植物体が再生した。ヒノキの不定胚誘導に開発した培地においてスギの不定胚を誘導することができたことは、類縁関係が比較的近い種であれば同じ培地を使うことが可能であることを示唆する。また、ヒノキと同様に不定胚を経て植物体を再生する能力には家系による差が認められたので、再



図-2-3-2 スギにおける不定胚を経た植物体の再生

A：培養6週目の子葉構造を持つ成熟した不定胚

B：発芽培地で培養6週間後の幼植物体

C：順化後の再生植物体

生能力の高い家系を選抜することができる可能性があることが示唆された。

2.4 クヌギにおける不定胚誘導と植物体再生系の開発

2.4.1 はじめに

クヌギはしいたけ栽培のほだ木として利用されている重要な樹種であり、しいたけ原木育種事業により280本の精英樹が選ばれている(林木育種センター 2005)。しかし、さし木の困難性とつぎ木の不親和性が大きな問題となっていることもあり(橋詰・尾崎 1979)、クローン採種園の造成は進んでいない。クヌギにおいて不定胚を経て植物体を効率的に増殖することができれば優良種苗の生産に利用することができる。また、遺伝子組換えにより、高いさし木発根能力を精英樹に付与することができる可能性もある。

クヌギでは腋芽培養による増殖法が報告されている(井出・山本 1988; 伊東 1989)が、増殖率や発根率が低いために有効な増殖法とはなっていない。また、不定胚誘導についても報告されている(Sasaki *et al.* 1988; 原口 1988; 香西・戸田 1990; Kim *et al.* 1994; Kim *et al.* 1997)が、増殖率や植物体再生率が悪く、遺伝子組換えを行うには新たな手法の開発が必要である。

そこで、より増殖効率が高く、遺伝子組換えに利用することが可能な方法の確立を目指して、embryogenic callusを経て不定胚を誘導し、そこから植物体を再生する方法を開発した。

2.4.2 材料と方法

2.4.2.1 材料

茨城県林業技術センターの保存園(茨城県那珂市)のクヌギの精英樹3クローン(大子3, 北茨城2, 筑波2)から採取した堅果を供試材料とした。これらを1995年の8月16日, 8月30日および11月10日に採取した。8月30日に採取した堅果は殻斗にほぼ覆われ、黄緑色を呈し、直径は10-13mmであった。胚軸部分(胚から子葉を除いた部分)の長さは3~4mmであった。8月16日に採取した堅果や胚軸部分の大きさは8月30日よりわずかに小さかった。11月10日に採取した成熟堅果の大きさは直径20~25mmで、茶色を呈し、胚軸部分の長さは5~6mmであった。

採取した堅果から果皮と種皮を取除き、種子胚を摘出した。次に、70%エタノールに1分、6%過酸化水素水に15分間浸漬し、種子胚の表面殺菌を行った。その後、滅菌水で3回すすいだ。次に滅菌済みの種子胚を子葉部分と胚軸部分に分割し、各々を子葉外植体、胚軸外植体とした。各処理当たり5個の堅果を用いた。

2.4.2.2 培地と培養条件

本節では、MS培地(Murashige and Skoog 1962)を基本培地として用いた。また、サッカロース濃度は30 g/lとし、培地支持体としては8.0 g/lの寒天を使用した。培養条件は25℃、蛍光灯照明(約100μmol m⁻² s⁻¹)による16時間日長とした。継代培養は1ヶ月毎に行った。

2.4.2.3 初代培養

外植体を表-2-4-1に示す3種類の植物ホルモン条件（植物ホルモン無添加, 5 μ M BAPおよび5 μ M BAP + 5 μ M IBA）の培地で培養した。

表-2-4-1 クヌギの胚軸外植体から胚様体分化に及ぼす植物ホルモン, 外植体採取日, 家系の影響
(各処理毎に5外植体を培養し, 培養2ヶ月後の結果を示す)

家系	植物ホルモン(μ M)								
	なし			BAP 5			BAP 5 + IBA 5		
	16 Aug/ *	30 Aug/	10 Nov/ *	16 Aug/ *	30 Aug/ *	10 Nov/ *	16 Aug/ *	30 Aug/ *	10 Nov/ *
大子 3	0	0	0	1	2	0	1	2	0
北茨城 2	0	1	0	0	2	0	2	4	0
筑波 2	1	2	0	1	4	0	2	5	0
合計 **	1/15	3/15	0/15	2/15	8/15	0/15	5/15	11/15	0/15

* 外植体の採取日

** 胚様体を分化した外植体数/培養した外植体数

2.4.2.4 embryogenic callusの誘導と不定胚形成

BAPとIBAを加えた初代培養培地で2ヶ月間培養した後に胚軸外植体に形成された胚様体を4個に分割し, 表-2-4-2に示す4種類の植物ホルモン条件(5 μ M 2,4-D, 5 μ M 2,4-D + 5 μ M BAP, 10 μ M 2,4-D, 10 μ M 2,4-D + 5 μ M BAP) の培地で培養し, embryogenic callusの誘導を行った。

次に不定胚を誘導するために, 5 μ M 2,4-Dを添加した培地で誘導されたembryogenic callusを植物ホルモン無添加培地で培養した。

表-2-4-2 クヌギの胚様体からのembryogenic callus誘導に及ぼす植物ホルモンと家系の影響
(各処理毎に3片の胚様体を培養し, 培養2ヶ月後の結果を示す)

家系	植物ホルモン(μ M)			
	2,4-D 5	2,4-D 5 + BAP 5	2,4-D 10	2,4-D 10 + BAP 5
大子 3	1	0	0	0
北茨城 2	3	0	1	0
筑波 2	3	0	3	0
合計 *	7/9	0/9	4/9	0/9

* エンブリオジェニックカルスを形成した胚様体数/培養した胚様体数

2.4.2.5 発芽と順化

不定胚を発芽させるために子葉が分化した不定胚を1/2MS培地で培養した。1/2MS培地で発根し, シュートが伸長した幼植物体をパーミキュライトとピートモス(1:1)の入ったポットに移植し, 温室内で順化させた。

2.4.3 結果と考察

2.4.3.1 初代培養

培養開始2ヶ月後には、胚軸外植体に胚様体が誘導された（図-2-4-1のA）。この胚様体はカルス化を経ずに外植体から直接誘導された不定胚と考えられるが、正常な形態の不定胚は見当たらなかった。胚様体の誘導頻度が最も高かったのは、8月30日に採取した未成熟な堅果から調製した胚軸外植体をBAPとIBAを加えた培地で培養した場合であり、その頻度は73.3%（11/15）であった（表-2-4-1）。子葉外植体や11月10日に採取した成熟堅果の胚軸外植体からは胚様体は誘導されなかった。クヌギの成熟胚からの不定胚誘導については既に報告されている（Sasaki *et al.* 1988；原口 1988）が、その誘導頻度は低い。本研究により未成熟な胚軸外植体は成熟胚よりも胚様体誘導に適した外植体であることが明らかになった。Kim ら（1994）はクヌギにおいて、Bueno ら（1992）はコルクガンにおいて胚様体誘導には未成熟胚が適すると報告している。本研究の結果はこれらを支持するものである。

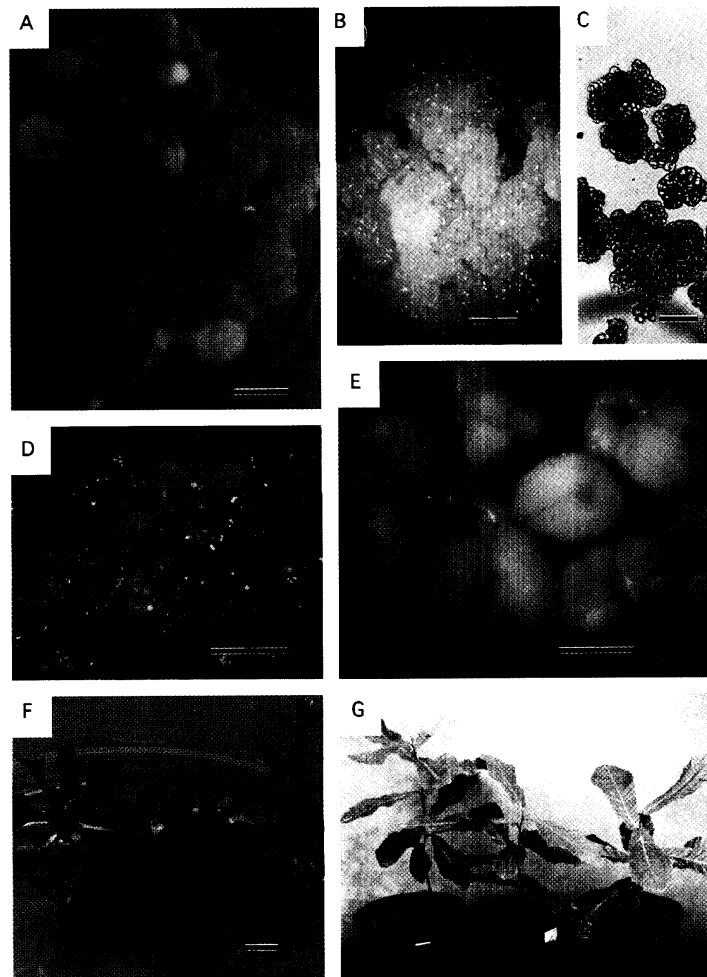


図-2-4-1 クヌギにおける未成熟胚からの不定胚を経た植物体再生

A：胚軸外植体に形成された胚様体，B：胚様体から誘導されたembryogenic callus，C：embryogenic callusの顕微鏡観察像，D：embryogenic callusから分化した球状胚，E：子葉期の不定胚，F：子葉期の不定胚を発芽培地で1ヶ月培養後の幼植物体，G：順化後の再生植物体。Bars: 0.5cm (A, D, E, F), 0.2 cm (B), 100 μ m (C), Gのポットの直径は12cm。

誘導効率において、ヒノキやスギの場合と同じく家系による差が認められ、筑波2が最も誘導効率の高い家系であった。BAPとIBAを加えた培地では、8月30日に採取した筑波2の胚軸外植体からの胚様体誘導効率は100%であった（表-2-4-1）。

2.4.3.2 embryogenic callusの誘導と不定胚形成

胚様体をembryogenic callus誘導培地に移植してから2ヶ月後に淡黄色を呈する胚性細胞の小塊からなるembryogenic callusが誘導された（図-2-4-1のBとC）。embryogenic callusはどの家系においてもBAPを添加した培地では誘導されなかった（表-2-4-2）。2,4-Dの濃度は大子3と北茨城2では5 μ Mの方が適していた。筑波2が最も誘導効率が高く、2,4-D濃度が5 μ M、10 μ Mとしたいずれの培地でもすべての胚様体からembryogenic callusが誘導された。

植物ホルモンを添加した培地ではカルスは増殖を続けるが不定胚の分化は見られなかった。植物ホルモン無添加の培地に移植すると供試した7系統（大子3の1系統、北茨城2の3系統、筑波2の3系統）すべてのembryogenic callusから、2ヶ月以内に球状胚（図-2-4-1のD）が、続いて子葉期胚（図-2-4-1のE）が分化した。植物ホルモン無添加の培地で継代培養を行うと二次不定胚形成により不定胚が増殖した。

クヌギのembryogenic callusの誘導にはオーキシンである2,4-Dが必要であるが、サイトカイニンであるBAPは阻害的であることが示唆された（表-2-4-2）。embryogenic callus誘導に必要とされる植物ホルモンの濃度や組み合わせは、植物の種や外植体の種類、時には系統によっても異なる。サンダルウッド (Rao and Bapat 1995)、タラノキ (Moon and Youn 1999) や多くのイネ科に属する種 (Vasil 1985) では、クヌギと同様にembryogenic callus誘導には2,4-Dのみが必要とされる。しかし、バラ属の多くの種や品種ではオーキシンとサイトカイニンの両方が必要である (Roberts *et al.* 1995)。2,4-Dを含む培地でembryogenic callusから不定胚が誘導されなかったことより、クヌギのembryogenic callusからの不定胚誘導には2,4-Dは阻害的と考えられる。クヌギの不定胚誘導に及ぼす植物ホルモンの効果（すなわち、embryogenic callus誘導には2,4-Dが必要であるが、embryogenic callusからの不定胚誘導には2,4-Dが阻害的である）は、胚形成のモデル植物として利用されているニンジン (Nomura and Komamine 1995) の場合によく似ている。

これまでのクヌギの不定胚形成に関する報告 (Sasaki *et al.* 1988; 原口, 1988; Kim *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1997) ではembryogenic callusの形成とそれからの不定胚誘導については示されていない。embryogenic callusは増殖性に優れているので、サンダルウッドの報告 (Bapat *et al.* 1990) のようにバイオリクターを利用した大量増殖の可能性が示唆された。

2.4.3.3 発芽と順化

1/2MS培地で培養すると不定胚の子葉が緑色になった。2ヶ月後には発芽し、上胚軸が伸長した（図-2-4-1のF）。コナラ属の不定胚の発芽は困難で、BAPやGA3などの植物ホルモン添加 (Kim *et al.* 1994) や低温処理 (Kim *et al.* 1997) が試みられているが、効果的な方法は見いだされていない。本研究では塩濃度を薄めた1/2MS培地で培養を繰り返すことにより発芽個体が得られた。発芽培地で旺盛に成育を続ける再生個体は順化も容易で、温室で成育を続けた（図-2-4-1のG）。

2.4.4 まとめ

以下の方法に従えば、クヌギは不定胚経由で植物体を再生することが明らかになった。

- ①8月下旬の胚軸外植体を5 μ M BAPと5 μ M IBAを加えた培地で培養して胚様体を誘導する。
- ②胚様体から5 μ M 2,4-Dを加えたMS培地でembryogenic callusを誘導する。
- ③embryogenic callusをMS培地で培養すると不定胚が分化しする。
- ④1/2MS培地で不定胚を培養し、発芽させる。

この方法により供試した精英樹3家系のうち2家系で植物体を再生させることができた。クヌギにおけるembryogenic callusを経由する不定胚誘導は本研究が初めての報告であり、他の報告よりも増殖効率が低い。この方法を利用すれば、クヌギにおける遺伝子組換え系が開発できると考えられた。

2.5 コシアブラにおける不定胚誘導と植物体再生系の開発

2.5.1 はじめに

コシアブラはウコギ科に属する落葉高木であり、その若芽は山菜として重宝がられている。しかし、若芽の安定した供給方法がないために市場に出回る量はごく限られている。ウコギ科にはチョウセンニンジンやエゾウコギなどの薬効成分を持つ種が多く、コシアブラにも血圧降下の作用のあるイソクエルチトリンが含まれるとされている（伊沢 1992）。また、マンガンを植物体内に非常に多く集積する（小畑ら 未発表）ためにマンガンで汚染された土壌からマンガンを回収することにより土壌の浄化とマンガン再利用に貢献できる可能性がある。この様なことからコシアブラは今後一層有用性の増加が期待できる樹種であると考えられる。しかし、コシアブラは種子の休眠性のために有効な発芽促進手法がなく、さし木やつぎ木による無性繁殖法も未だ確立していない。不定胚による効率的な植物体再生系はコシアブラの苗木生産に利用できるとともに、遺伝子組換え系が確立されればコシアブラのマンガン高集積能力の分子生物学的解明にも寄与できるものと考えられる。

コシアブラの組織培養の研究は引田と千葉（1993）により頂芽の培養が報告されているが増殖率は悪い。そこで、有効な増殖技術であり、遺伝子組換えにも応用可能な不定胚による植物体の再生系を開発した。

2.5.2 材料と方法

2.5.2.1 材料

旧大子営林署（現茨城森林管理署）管内の造林地（茨城県常陸太田市）の林縁部に自生するコシアブラ1個体（胸高直径20cm, 樹高12m）より採取した成熟液果を供試材料とした。これらを1993年11月に採取した。

液果から取出した種子を1時間流水で水洗し、70%エタノールに3分間、6%過酸化水素水に20分間浸漬して種子の表面殺菌を行った。その後、滅菌水で種子を3回すすいだ。次に胚乳の約2/3程度の部分を切除し、残りの種子胚が内包される部分（長さ約1mm）を外植体とした。

2.5.2.2 培地と培養条件

前節のクヌギの方法に準じた。

2.5.2.3 初代培養

BAPと2,4-Dを0, 0.5, 2および10 mg/lで組み合わせた16種類の培地で外植体を培養した。各培地当たり15外植体を供した。

2.5.2.4 不定胚形成

4ヶ月後、外植体から現れた膨張した胚を0.5 mg/l 2,4-Dを加えた培地に移植して、不定胚誘導を行った。

外植体から誘導されたカルスは2 mg/l 2,4-Dと2 mg/l BAPを加えた培地に移植して増殖させ、その後、不定胚を誘導するために1 mg/l 2,4-Dと1 mg/l BAPを加えた培地で培養した。

誘導された不定胚は0.5 mg/l 2,4-Dを加えた培地で培養して二次不定胚の誘導を行った。

2.5.2.5 発芽と順化

発芽のために不定胚をNAA (0, 0.1 mg/l) とGA3 (0, 0.01 mg/l) を加えた培地、および植物ホルモン無添加の1/2MS培地で培養した。発根し、初生葉が展開した再生個体を1/2MS無機塩または1000倍希釈のハイポネックスと滅菌済みパーミキュライトを加えた培養瓶に移植した。1週間後、瓶のキャップをゆるめて順化を行った。2ヶ月後にピートモスとパーミキュライト (1:1) を入れたポットに移植し、温室で成育させた。

2.5.3 結果と考察

2.5.3.1 初代培養

初代培養4ヶ月後には外植体から膨張した胚が出現していた (図-2-5-1のA)。この現象は2,4-DとBAPの無添加もしくは0.5 mg/l以下の低濃度で加えた培地において高頻度で見られた (図-2-5-2)。2 mg/l BAPと10 mg/l 2,4-Dを加えた培地と10 mg/l BAPと2 mg/l 2,4-Dを加えた培地では、膨張した胚からカルスの形成も見られ (図-2-5-1のB)、カルス形成頻度は6.7%と低頻度であった。コシアブラと同じウコギ科のエゾウコギでも膨張した胚からカルス形成が2,4-DとBAPを加えた培地で観察されている (Gui *et al.* 1991)。

コシアブラの種子中の胚は未成熟な休眠性の胚で、種子の発芽には1年以上の後熟期間を要する。外植体からの胚の膨張やカルス形成に4ヶ月にもおよぶ長期間を要したのは、胚が休眠していたものと推測される。このことから、発芽促進処理である低温と高温を繰り返す変温処理等によって休眠を打破すれば、初代培養期間を短縮できる可能性がある。

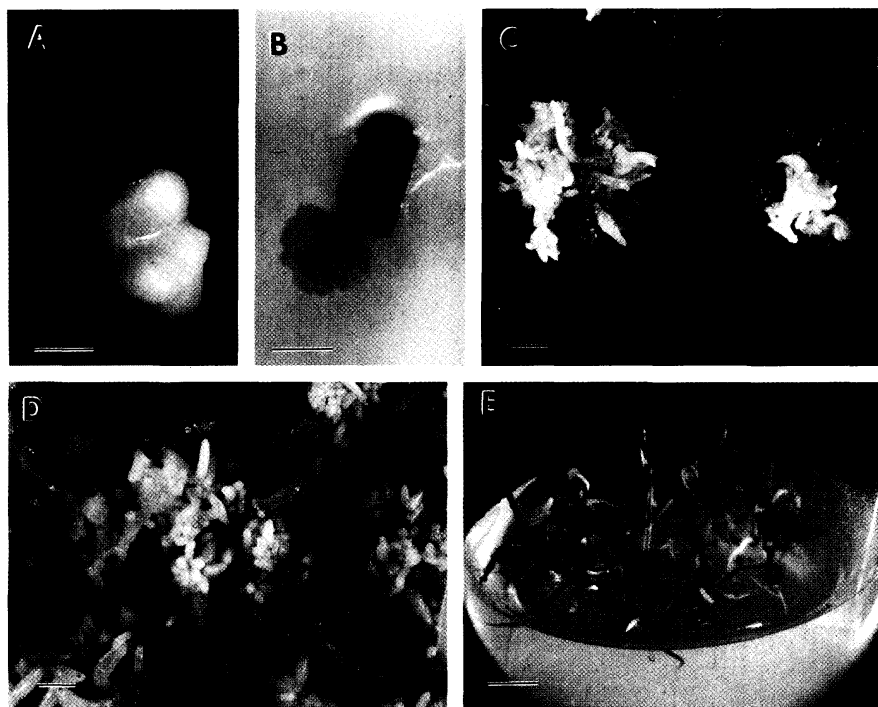


図-2-5-1 コシアブラの種子胚からの不定胚誘導と植物体再生

A: 外植体から誘導された膨張した胚, B: 外植体から誘導されたカルス, C: カルスから誘導された不定胚, D: 二次胚形成による不定胚の増殖, E: 不定胚の発芽。Bars: 1mm (A, B), 2mm (C, D), 1cm(E)。

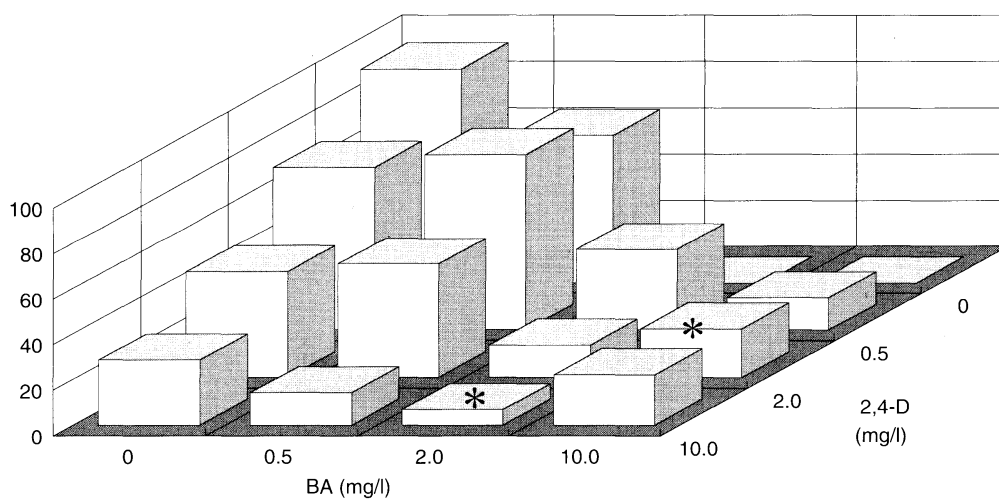


図-2-5-2 初代培養における膨張した胚の形成に及ぼす植物ホルモンの影響

各培地で15外植体を4ヶ月間培養した。*を付した植物ホルモン組成の培地ではカルスも形成した(形成率6.7%)。

2.5.3.2 不定胚形成

初代培養で得られた膨張した胚を0.5 mg/l 2,4-Dを加えた培地で培養すると膨張した胚の表面から不定胚が誘導された。表-2-5-1に示すように初代培養培地中の植物ホルモン組成で不定胚誘導効率は異なり、初代培養を0.5 mg/l 2,4-Dで行った場合の不定胚誘導効率は100%であった。エゾウコギでも同様の報告がなされている (Gui *et al.* 1991)。1 mg/l 2,4-Dと1 mg/l BAPを加えた培地でカルスを培養すると、1~2ヶ月後には不定胚が誘導された (図-2-5-1のC)。

不定胚を0.5 mg/l 2,4-Dを加えた培地に移植すると二次不定胚形成により不定胚が増殖した (図-2-5-1のD)。

表-2-5-1 コシアブラの膨張した胚からの不定胚形成に及ぼす初代培養培地中の植物ホルモン濃度の影響

2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	培養した 外植体数	枯死した 外植体数	不定胚を形成 した外植体数	不定胚形成率 (%*)
0	0	11	3	6	54.5
0	0.5	4	1	3	75.0
0.5	0	7	0	7	100.0
0.5	0.5	10	0	6	60.0
0.5	2.0	6	0	4	66.7
2.0	0	6	0	5	83.3
2.0	0.5	5	2	2	40.0

図-2-5-2に示す16種類の初代培養培地のうち、上記の7種類の培地で形成された膨張胚を0.5 mg/l 2,4-Dを含む培地で1ヶ月間培養して不定胚を誘導した。

*100×不定胚を形成した外植体数/培養した外植体数

2.5.3.3 発芽と順化

NAAとGA3を加えた培地での発芽率は低く、発芽個体は育成せず、胚軸部分などから新たな不定胚形成が見られた。一方、植物ホルモン無添加の1/2MS培地では全ての不定胚は10日以内に発根し (図-2-5-1のE)、その後も成長を続けた。また、順化後の生存率は87.5%で、そのうちの約半分が新しい葉を展開し (表-2-5-2)、成長を続けた (図-2-5-3)。

表-2-5-2 不定胚を経て再生したコシアブラの順化後の生存率

不定胚分化の経路	供試数	生存植物体(%)	新葉展開植物体 (%)
膨張胚	44	88.6	38.6
カルス	60	86.7	55.0
合計	104	87.5	48.1

ピートモスとバーミキュライト混合土 (1:1) に移植してから3ヶ月経過した時点での結果を示す。



図-2-5-3 コシアブラの不定胚を経て再生した植物体の順化後の様子
ポットの直径は6cm

2.5.4 まとめ

以下の方法に従えば、コシアブラは不定胚経由で植物体が再生することが明らかになった。

- ①成熟種子をBAPと2,4-Dを0～2 mg/l加えた培地で培養する。
- ②得られた膨張胚を0.5 mg/l 2,4-Dを加えた培地で培養して不定胚を誘導する。
- ③膨張胚に形成されたカルスからも1 mg/l 2,4-DとBAPを加えた培地で不定胚は誘導される。
- ④1/2MS培地で不定胚は容易に発芽する。

ここに示した方法はコシアブラの効率的な増殖法としての初めての方法であり、大量増殖や遺伝子組換えに利用できると考えられる。初代培養での膨張胚の誘導には4ヶ月もの長い期間を必要としたが、これは種子胚の休眠によるものと推測された。この期間の短縮のためには胚の休眠打破処理が必要であると考えられた。

2.6 結論

本章では、遺伝子組換え系開発のために必要な不定胚を経た植物体再生について検討した。その結果、針葉樹ではヒノキとスギにおいて、広葉樹ではクヌギとコシアブラにおいて、種子胚から不定胚を経て植物体を再生させる系を開発することができた。これら系を利用すれば、遺伝子組換えによる林木育種を行うために必須である遺伝子組換え系の開発を行うことができると考えられた。また、不定胚形成率や植物体再生率は家系による差があることが示唆されたので、効率的に植物体を再生する家系の選抜が可能であると考えられた。

本章で取り上げた4樹種からヒノキを選び、次章では遺伝子組換え系の開発を行った。ヒノキを選んだ理由は、①ヒノキは我が国の林木のうち最も重要な樹種であり、遺伝子組換えによる有用品種開発の意義が大きい、②不定胚による植物体再生系の開発の際と同様に、ヒノキで遺伝子組換え系を開発すればその知見をスギや他の樹種にも応用できる可能性があると考えられるからである。

3 林木における遺伝子組換え系の開発

3.1 緒言

前章では、遺伝子組換え系の開発のために必要とされる不定胚による植物体再生について検討し、針葉樹2樹種、広葉樹2樹種において植物体再生系を開発した。本章では、まず遺伝子組換えの成否の判定に用いるGFP遺伝子の林木の細胞内での発現を調査し、次に前章で開発したヒノキの植物体再生系を利用したGFP遺伝子組換えヒノキの作出法について述べる。

植物への遺伝子組換えには主に2つの手法がある。一つはアグロバクテリウム法と呼ばれる土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* を利用する方法である。この細菌は植物に感染すると自身の遺伝子であるTiプラスミドのT-DNA領域を植物のゲノムDNAに組み込み、植物細胞内でT-DNA領域にコードされている植物ホルモン合成遺伝子などを発現させることにより、根頭癌腫病を発病させる。すなわち本細菌は自然界で植物に遺伝子組換えを行っているのである。このT-DNA領域の発病に関係する遺伝子を取り除き、その代わりに我々が導入したい遺伝子と入れ換えたアグロバクテリウムを植物に感染させればアグロバクテリウムを介して遺伝子組換えを行うことができる。この手法が適用できる場合は確実に遺伝子組換えができるが、アグロバクテリウムに感染しない場合は遺伝子組換えを行うことができない。

もう一つの方法は遺伝子を直接物理的に導入するパーティクルガン法である。パーティクルガン法は遺伝子を金属の微粒子に貼付け、それをヘリウムガスの圧力などにより物理的に細胞内に打ち込む方法である。この手法によれば生きた細胞であればいかなる植物にも遺伝子導入が比較的容易に行えるので、アグロバクテリウム法が適用困難な場合には有効である。しかし、遺伝子が細胞に導入されてもゲノムDNAに遺伝子が組み込まれる可能性は低いので、遺伝子組換え体が得られる効率が悪い。一方、遺伝子の細胞内への導入が容易であり、遺伝子の発現の解析のためには非常に優れた手法となる。

1983年にZambryskiらがアグロバクテリウム法によるタバコの遺伝子組換えについて報告したのが植物における遺伝子組換えの初めての例である。それ以来、多くの植物種において遺伝子組換えが報告されている。林木における初めての組換え体作出は、アグロバクテリウム法によるポプラの報告 (Fillatti *et al.* 1987) である。パーティクルガン法による初めての報告もポプラを用いたものである (McCown *et al.* 1991)。針葉樹ではHuangら (1991) によるヨーロッパカラマツの報告が最初であるが、これはアグロバクテリウム属の *Agrobacterium rhizogenes* を用いたもので、矮化などの形態異常を伴うものであった。その後、パーティクルガン法によりシロトウヒ (Ellis *et al.* 1993) で、また、アグロバクテリウム法では雑種カラマツ (Levéé *et al.* 1997) で報告された。我が国の林木ではパーティクルガン法による遺伝子組換え体の作出が、スギ (Maruyama *et al.* 2000)、ヒノキ (Ishii 2002)、グイマツ (Lin *et al.* 2005) で報告されているが、再現性の確認がなされておらず、効率が低いなどの問題が残されている。アグロバクテリウム法ではシラカンバ (Mohri *et al.* 1997) で報告されている。

本章では我が国の林木の遺伝子組換え系を開発するために、まずGFP遺伝子が我が国の林木においても有効なレポーター遺伝子であるかどうかを検討した。次にGFP遺伝子をレポーター遺伝子として用い、前章に示した植物体再生系を利用して、アグロバクテリウム法によるヒノキの遺伝子組換え系を開発した。

3.2 林木におけるGFP遺伝子のレポーター遺伝子としての有効性の検討

3.2.1 はじめに

遺伝子組換え系の開発の際には、遺伝子組換え細胞を選抜するために抗生物質耐性を付与するマーカー遺伝子と遺伝子導入の成否を視覚的に判断するためのレポーター遺伝子を用いる。マーカー遺伝子としてはカナマイシン耐性を付与するネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子やハイグロマイシン耐性を付与するハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子が有効なマーカー遺伝子としてよく用いられる。一方、レポーター遺伝子としてはホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子や大腸菌由来の β -グルクロニダーゼ遺伝子が用いられてきた。近年、オワンクラゲに由来するGFP遺伝子が他のレポーター遺伝子より効果的であると考えられるようになってきた。それは、440～480 nmの波長の青色光を照射すれば簡便にGFP遺伝子の発現を検出できるので、蛍光顕微鏡を用いて観察すると遺伝子組換えの成否を容易に判定できるためである。さらに、65番目のアミノ酸であるセリンをスレオニンに置き換えた改変型のGFPであるsGFP (S65T) は、通常のGFPのおよそ100倍もの強度の蛍光を発することが報告されており (Chiu *et al.* 1996; Niwa 2003)、レポーター遺伝子としての利便性がさらに向上している。

我が国の林木へのGFP遺伝子の導入は少ない (Lin *et al.* 2005)。そこで、樹木6種の細胞にパーティクルガン法によりGFP遺伝子を導入してその発現を観察し、GFP遺伝子のレポーター遺伝子としての有効性を検討した。また、GFPの発現量を高める方法についても検討した。

3.2.2 材料と方法

3.2.2.1 材料

本研究において、6種の林木の細胞への遺伝子導入を行った。以下に材料の調製法について列記する。

ヒノキ精英樹 (恵那3) の子葉から Ishii (2002) の方法に準じ、0.3 μ M NAAと10 μ M BAPを加えたCD培地 (Campbell and Durzan 1975) で誘導した苗条原基を1 μ M zeatinを加えたCD培地で培養した。直径1cm程の苗条原基10個を0.5 Mサッカロースを追加した前記の培地に置床して、4時間高浸透圧処理を行った。高浸透圧処理を行わない対照区も設けた。

スギ精英樹 (大野2, 中6) の成熟種子を3日間給水させ、70%エタノールに2分、10%過酸化水素水に10分間浸漬して表面殺菌を行い、滅菌水で3回すすいだ。滅菌種子から胚を取出し、30 g/l サッカロースと3 g/l のゲルライトを加えたWPM培地 (Lloyd and McCown, 1980) で4日間培養した。この培地に浸透圧調整剤として0.4M サッカロースを追加した培地に胚を置床し、高浸透圧処理して4時間後にパーティクルガンで遺伝子導入を行った。供試胚数は大野2で40個、中6で8個である。高浸透圧処理を行わない胚も対照として供試した。

2章5節の方法で誘導したコシアブラの不定胚を、0.01 mg/l 2,4-Dを含むMS培地 (Murashige and Skoog, 1962) に0.5M サッカロースを追加した培地で24時間高浸透圧処理を行った。高浸透圧処理を行わない不定胚も供した。

カラマツ精英樹 (南佐久12) の未成熟種子から誘導した不定胚を改変CD培地 (谷口ら 2001) に浸透圧調整剤 (0.4M サッカロース, 0.4M マルトース, 0.2M ソルビトール + 0.2M マンニトール) を加えた培地で5時間培養し、遺伝子導入を行った。処理当たりの供試不定胚数は10または20である。

マツノザイセンチュウ抵抗性アカマツ 須崎27とマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ 大瀬戸12のembryogenic tissueを子葉期に達する前の未成熟種子から誘導した (Taniguchi 2001)。カラマツの精英樹 (南佐久12)

のembryogenic tissueも子葉期に達する前の未成熟種子から誘導した（谷口ら 2001）。これらのembryogenic tissue約500mgを液体培地に懸濁し、直径5.5cmのろ紙をセットした濾過器に流し込んだ。真空ポンプで吸引し、ろ紙にembryogenic tissueを捕捉した。このembryogenic tissueを継代培養培地で遺伝子導入前（1～2日間）に前培養処理を行った。処理当たりの供試数は3または4である。

3.2.2.2 プラスミドDNA

プラスミドCaMV35S Ω -sGFP(S65T)-nos3' (Niwa 2003) からHindIII-EcoRIで切り出したCaMV35S-sGFP(S65T)-nos3'断片をpRT99ベクター (Töpfer *et al.* 1993) のマルチクローニングサイトに挿入することにより、プラスミドpRT99sGFPを調製した。このプラスミドにおいてGFP遺伝子の発現はCaMV35Sプロモーターにより調節される。

3.2.2.3 パーティクルガンによる遺伝子導入

定法 (Sanford *et al.* 1993) に従い、プラスミドpRT99sGFPを金粒子にコーティングした。パーティクルガン (PDS-1000/He; Bio-Rad) を用いて前記の材料の項に示した植物組織に遺伝子導入を行った。遺伝子導入条件としては、チャンバー内圧力を28インチ水銀、ヘリウムガス圧を1100, 1350 または 1500 psi, ターゲットディスタンスを6または9cm, 金粒子径を1.0 または1.6 μ mとした。

3.2.2.4 GFP遺伝子の発現の観察

遺伝子導入した植物組織におけるGFPの発現による緑色蛍光をGFP Plusフィルターシステム（励起フィルター：480/40 nm, 吸収フィルター：510 nm）を取り付けた蛍光実態顕微鏡 (MZ FLIII; ライカマイクロシステムズ) で観察した。遺伝子導入24時間後にターゲット組織におけるGFPの発現を観察し、デジタルカメラシステム (DC 300F; ライカマイクロシステムズ) を用いて写真撮影した。

3.2.3 結果と考察

3.2.3.1 林木の細胞へのGFP遺伝子の導入とその発現

遺伝子導入24時間後には、供試した全ての樹種（ヒノキ、スギ、カラマツ、クロマツ、アカマツ、コシアブラ）で緑色蛍光が観察された（図-3-2-1のA～G）ことより、GFP遺伝子はこれらの林木の細胞内に導入され、発現することが明らかになった。このことより、GFP遺伝子はこれらの樹種においても遺伝子組換え体作出法の開発の際にマーカー遺伝子として使用することができることが明らかになった。一方、Mohriら(2000)は β -グルクロニダーゼ遺伝子はアカマツとクロマツの胚では発現するがスギでは発現を確認できなかったと報告している。このことはスギでは β -グルクロニダーゼ遺伝子がレポーター遺伝子として利用できない可能性を示唆する。

なお、遺伝子導入条件（ヘリウムガス圧; 1100, 1350, 1500 psi, ターゲットディスタンス; 6, 8 cm, 金粒子径; 1.0, 1.6 μ m）によるGFP発現の明確な差異は認められなかった。

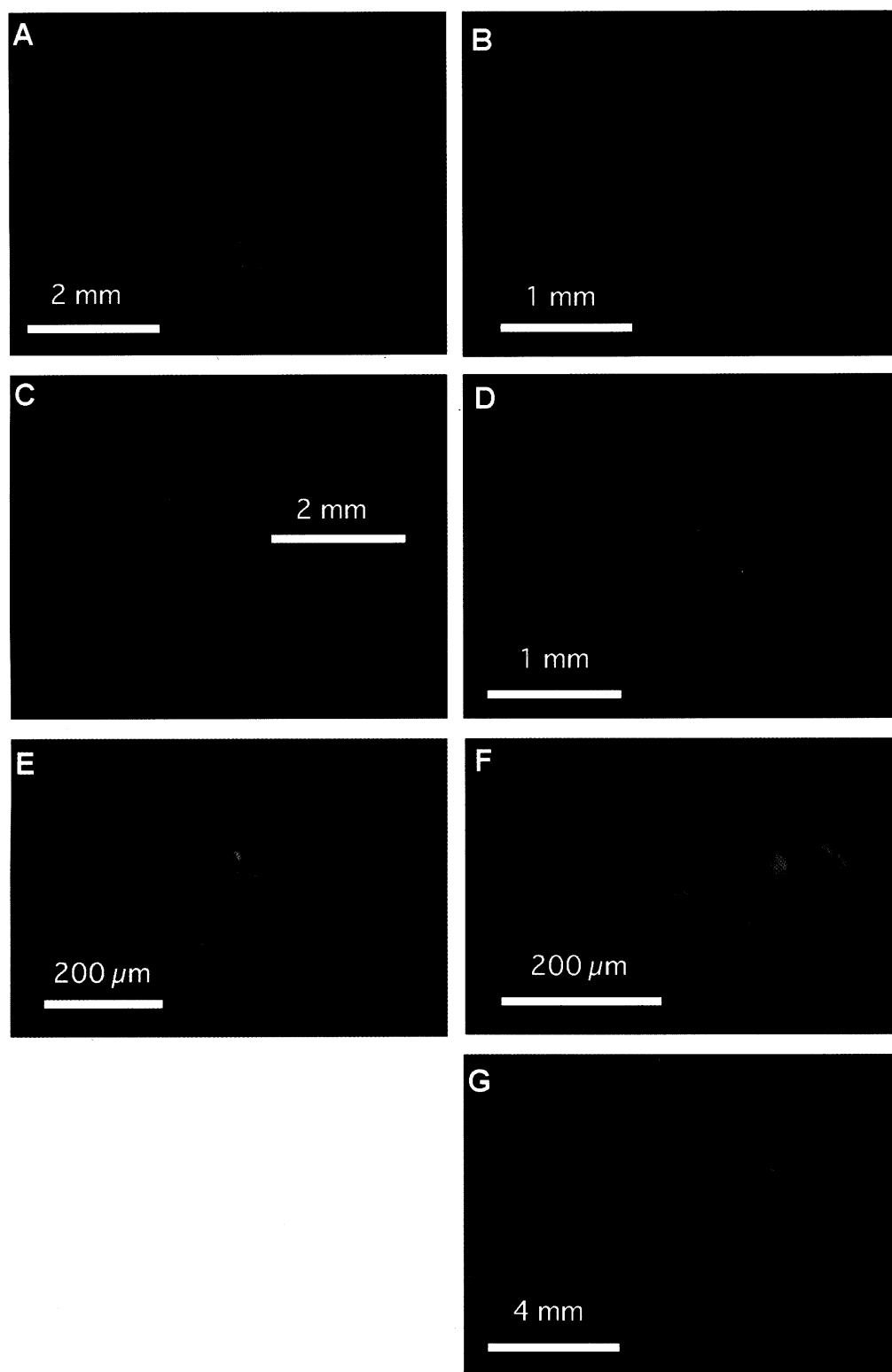


図-3-2-1 蛍光実態顕微鏡で観察したGFP遺伝子の発現による緑色蛍光

A: スギの種子胚, B: カラマツの不定胚, C: コシアブラの不定胚, D: ヒノキの苗条原基, E: カラマツのembryogenic tissueの1個の細胞, F: アカマツのembryogenic tissueの2個の細胞, G: クロマツのembryogenic tissue

3.2.3.2 高浸透圧処理と前培養がGFPの発現に及ぼす影響

高浸透圧処理のGFPの発現に及ぼす影響について調べた。スギの種子胚におけるGFP遺伝子の発現細胞数は0.4 M サッカロースによる高浸透圧処理により大野2では16.8倍に、中6では19.6倍に増加した(図-3-2-2)。ヒノキの苗条原基やコシアブラの不定胚においても高浸透圧処理によりGFP遺伝子の発現細胞数は増加した。浸透圧調整剤の組成の影響をカラマツの不定胚で調べた(図-3-2-3)。マルトースはサッカロースと同様にGFP遺伝子の発現に効果的であった。ソルビトールとマンニトールの混合物はクロトウヒの不定胚への遺伝子導入の際に浸透圧調整剤として使用されている(Tian *et al.* 2000)が、カラマツではこれらの混合物はマルトースやサッカロースよりも浸透圧調整剤としての効果は低かった。ドイツトウヒの場合もカラマツと同様にソルビトールとマルトースの混合物は浸透圧調整剤としての効果は低かった(Clapham *et al.* 1995)。

次に、前培養のGFPの発現に及ぼす影響についてアカマツ、クロマツ、カラマツのembryogenic tissueを用いて調べた。前培養しなかったembryogenic tissueに遺伝子を導入した場合は、シャーレ1枚当たりのGFP遺伝子発現細胞数はアカマツ、クロマツ、カラマツで各々67-78個、19-35個、1-5個であった。前培養処理を行ったカラマツのembryogenic tissueでのGFP発現細胞数は、処理期間1日で47-71個、2日では95-136個と増加した。アカマツ、クロマツでも同様に発現細胞数は増加した。前培養によりembryogenic tissueの細胞の生理活性が高くなり、この様な細胞内では導入遺伝子は発現し易くなると考えられている(Tang and Newton 2003)。

3.2.4 まとめ

パーティクルガンにより導入したGFP遺伝子は、供試した全ての樹種(ヒノキ、スギ、カラマツ、アカマツ、クロマツおよびコシアブラ)において発現した。また、遺伝子導入のターゲットとなる組織の高浸透圧処理や前培養はGFP 遺伝子の発現効率を高める効果があった。したがって、GFP 遺伝子は前述の6樹種においてレポーター遺伝子として利用できることが明らかになった。このことよりGFP遺伝子をレポーター遺伝子として用いると遺伝子組換え系の開発を効率よく行うことができると考えられた。

次節ではヒノキを我が国の林木の遺伝子組換え系のモデル系とする目的で、GFP遺伝子をレポーター遺伝子として使用してアグロバクテリウム法による遺伝子組換えを行った。

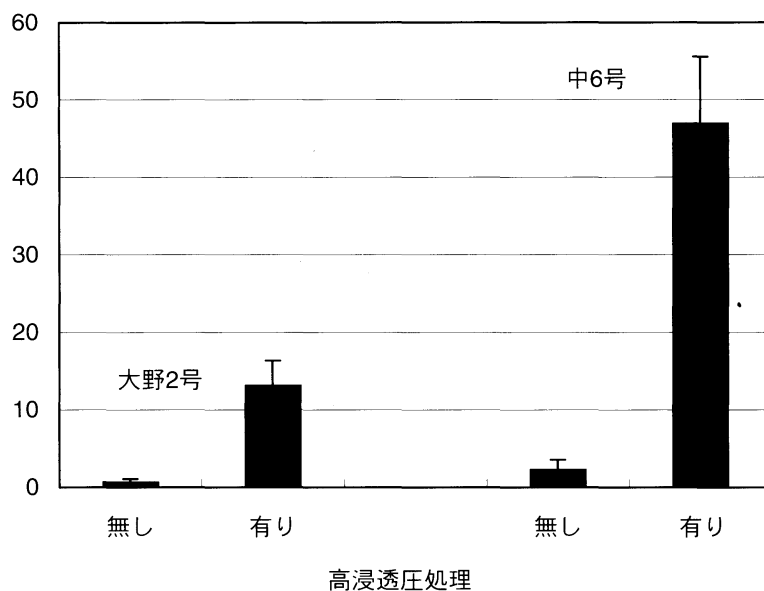


図-3-2-2 スギの種子胚におけるGFP遺伝子の発現に及ぼす高浸透圧処理の影響

高浸透圧処理「有り」の場合は、サッカロース0.4Mを追加した培地で4時間培養後にパーティクルガンで遺伝子導入を行った。供試数は大野2では40個、中6では8個とした。遺伝子導入1日後に緑色蛍光を発する細胞数を数えた。図中のバーは標準誤差を示す。

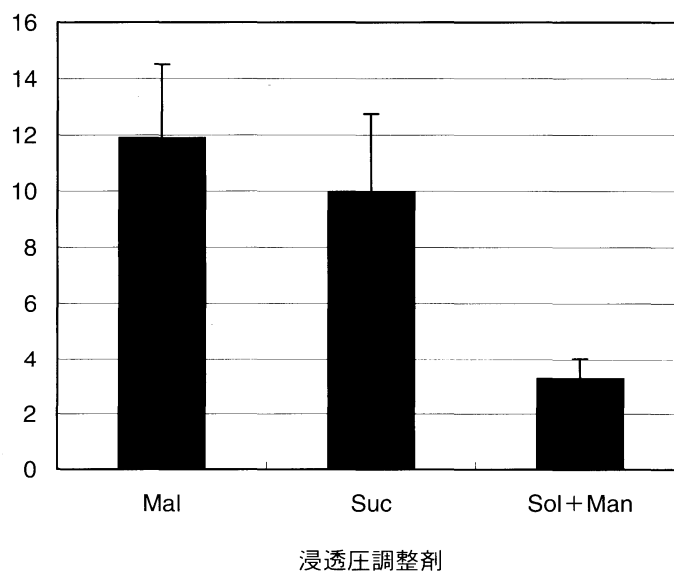


図-3-2-3 カラマツの不定胚におけるGFP遺伝子の発現に及ぼす浸透圧処理剤の種類の影響

高浸透圧処理剤として0.4M マルトース(Mal), 0.4 Mサッカロース(Suc), 0.2Mソルビトールと0.2Mマンニトールの混合物(Sol + Man)を用いた。各々の高浸透圧培地で5時間処理後にパーティクルガンで遺伝子導入を行った。供試数は10?20個とした。遺伝子導入1日後に緑色蛍光を発する細胞数を数えた。図中のバーは標準誤差を示す。

3.3 アグロバクテリウム法によるヒノキの遺伝子組換え系の開発

3.3.1 はじめに

第2章においてヒノキ精英樹の未成熟種子胚からembryogenic tissueを経る植物体再生系を開発した。また、前節でGFP遺伝子がヒノキにおいてレポーター遺伝子として使用できることを明らかにし、これらの成果をもとに本節ではヒノキの遺伝子組換え系を開発した。

Tang and Newtonの総説(2003)で述べられているように、以前は針葉樹の遺伝子組換えはパーティクルガン法による報告が主流であり、トウヒ属(Walter *et al.* 1999; Clapham *et al.* 2000; Ellis *et al.* 1993; Charest *et al.* 1996; Tian *et al.* 2000)、カラマツ属(Klimaszewska *et al.* 1997)、マツ属(Walter *et al.* 1998)で既に遺伝子組換えが行われている。その理由は*Agrobacterium tumefaciens*が針葉樹に感染しないと考えられていたからである。しかし、パーティクルガン法による遺伝子組換えは効率が悪く、再現性が低く、材料の養成に熟練したテクニックが求められる場合が多い。一方、アグロバクテリウムから植物ゲノムへのT-DNAの組込みに関するメカニズムが徐々に明らかとなり(Zupan *et al.* 2000)、遺伝子組換えに使用されるアグロバクテリウムにも改良が加えられた。そのような状況の中、1997年にLevéeらにより*Agrobacterium tumefaciens*を用いた雑種カラマツへの遺伝子の導入と遺伝子組換え植物の再生が報告された(Levée *et al.* 1997)。その後、2つの報告(Levée *et al.* 1999; Le *et al.* 2001)がなされ、近年にはKlimaszewskaら(2001a)によりアグロバクテリウム法による非常に効率の良い方法がトウヒ属3種において報告された。この報告では1シャーレ当たり数十系統の遺伝子組換え系統が得られている。これに対して、パーティクルガン法による針葉樹のembryogenic tissueへの遺伝子組換え効率は1シャーレ当たり1系統に満たない。

ヒノキの遺伝子組換えについては、唯一Ishii(2002)によりパーティクルガン法による苗条原基への β -グルクロニダーゼ遺伝子の導入と組換え植物の再生が報告されている。この報告に従い、ヒノキ精英樹より誘導した苗条原基にGFP遺伝子を導入したが、組換え植物の再生には至らなかった(Taniguchi *et al.* 2004b)。このことよりこの方法は再現性が低い上、材料としている苗条原基の誘導に時間がかかることが問題であると考えられた。そこでヒノキの遺伝子組換えによる新品種開発のためには新たな組換え系の開発が必要となり、前章で開発した植物体再生系を利用し、アグロバクテリウム法によるGFP遺伝子の導入と遺伝子組換え植物の再生について検討した。

3.3.2 材料と方法

3.3.2.1 材料

第2章第2節においてヒノキ精英樹の恵那3から誘導されたembryogenic tissueである恵那3-1-1系統を材料とした。

3.3.2.2 使用したアグロバクテリウムの系統とその培養法

本研究ではアグロバクテリウムとしてC58/pMP90系統(=GV3101/pMP90; Koncz and Schell 1986)を用いた。このアグロバクテリウムにバイナリーベクターpBin19-sgfpをトリペアレンタルメイティング法(Wolk *et al.* 1984)により導入した。バイナリーベクターpBin19-sgfpは、レポーター遺伝子として改変型GFP遺伝子であるsGFP(S65T)遺伝子(Chiu *et al.* 1996; Niwa 2003)を、選抜マーカー遺伝子としてカナマイシン耐性を付与す

るネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ (NPTII) 遺伝子をもつ。sGFP(S65T)遺伝子とNPTII遺伝子は、それぞれCaMV35SプロモーターとNOSプロモーターにより発現が制御されている (図-3-3-1C)。

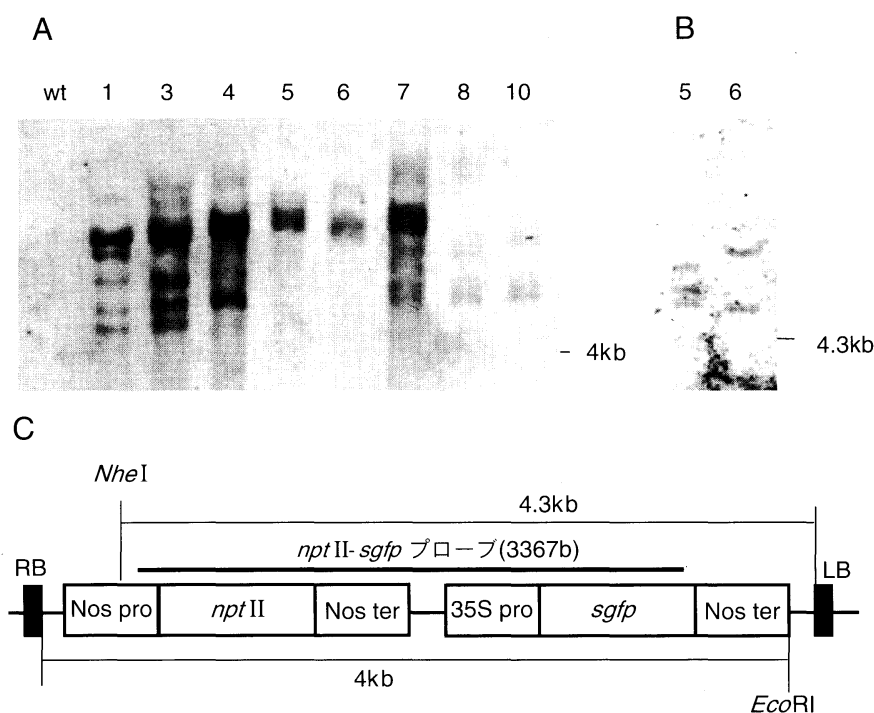


図-3-3-1 ヒノキの遺伝子組換え植物の葉から抽出したゲノムDNAの
サザンハイブリダイゼーション解析

A: ゲノムDNAをEcoRIで切断後にnptII-sgfpプローブでハイブリダイゼーションを行った(非組換え植物: wt, 組換え植物: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10)。

B: ゲノムDNAをNheIで切断後にnptII-sgfpプローブでハイブリダイゼーションを行った(5, 6共に組換え植物)。

C: バイナリーベクターのT-DNA領域。制限酵素 (EcoRIとNheI) 切断部位とプローブの位置と示す。Nos pro; NOSプロモーター, Nos ter; NOSターミネーター, 35S pro; CaMV35Sプロモーター, nptII; ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子, sgfp; sGFP(S65T)遺伝子, RB; ライトボーダー, LB; レフトボーダー。

50 mg/l カナマイシン, 50 mg/l ジェンタマイシンおよび50 mg/l リファンピシンを加えたYEB培地 (5 g/l Bacto beef extract, 5 g/l Peptone, 1 g/l Bacto yeast extract, 2 mM MgSO₄·H₂O, 5 g/l sucrose, pH 7.2) に懸濁したアグロバクテリウムを200rpm, 28℃の巡回型培養器で培養した。一晚培養後, 旺盛に成育を続けるアグロバクテリウムを遠心分離 (5000rpm, 5分) により沈殿させ, 50μMのアセトシリングンを加えたSM3液体培地 (表-2-2-2のSM3培地より培地支持体を除いた培地) にOD600が0.3になるように再懸濁した。

3.3.2.3 embryogenic tissueへの遺伝子導入

容量50mlのチューブに入れた前記のアグロバクテリウム懸濁液 (20ml) にSM3培地で2週間培養したembryogenic tissue (生重量1g) を懸濁した。このチューブを25℃・暗所で巡回振とう (100 rpm) した。振とう時間の遺伝子組換え効率に及ぼす影響を調べるために振とう時間を20分と5時間の2処理とした。振とう後、約0.25gのembryogenic tissueを含む懸濁液5mlを濾過器 (ミリポア) にセットした直径5.5cmの滅菌済みろ紙 (Whatman no. 2) に注ぎ、真空ポンプで吸引して液体を除くことによりろ紙にembryogenic tissueを保持させた。次に、50 μ M アセトシリンゴンを加えたSM3培地 (共存培養培地) 上にembryogenic tissueを保持させたろ紙を置き、25℃・暗所にて2日間共存培養を行った。

共存培養後、4枚のろ紙からembryogenic tissue約1gをスパーテルでかき取り、40mlの洗浄液 (除菌用の抗生物質であるセフォタキシム (300 mg/l) を添加したSM3液体培地) の入ったチューブにいれ、150 rpmの巡回振とうを20分間行った後、ろ紙上にembryogenic tissueを回収した。この洗浄操作を3回繰り返した。最後の洗浄操作後、約0.25gのembryogenic tissueを保持させたろ紙を300 mg/l セフォタキシムを加えたSM3培地 (除菌培地) にのせて、4日間培養を行った。その後、遺伝子組換え細胞を選抜するために除菌培地に選抜用抗生物質であるカナマイシンを25または50 mg/lの濃度で加えた培地 (選抜培地) に移植した。その後は3週間毎に選抜培地への移植を2回行った。6週間後にろ紙上に形成されたコロニーを単離し、同組成の選抜培地に3週間毎に移植し、継代培養を行った。

3.3.2.4 遺伝子組換え体の再生

2章2節でヒノキの不定胚誘導用に開発したSM4培地 (表-2-2-2) に25 mg/l カナマイシンを加えた不定胚誘導培地にembryogenic tissueを移植して、不定胚を誘導した。さらに不定胚を発芽させるためにWPG培地 (表-2-2-2) に25 mg/l カナマイシンを加えた発芽培地に不定胚を置床した。再分化した組換え植物は2章2節の方法に従って順化した。ただし、組換え植物育成用の閉鎖系温室内で順化を行った。

3.3.2.5 GFP遺伝子の発現の観察

embryogenic tissue, 不定胚, 再生した植物体でのGFP遺伝子の発現による緑色蛍光は3章2節に示した蛍光実態顕微鏡を用いて観察した。ただし、葉緑体の赤色自家蛍光を除くためにGFP Plantフィルターシステム (励起フィルター: 470/40 nm, 吸収フィルター: 525/50 nm) も併用した。写真撮影にはデジタルカメラシステム (DC 300F; ライカマイクロシステムズ) を用いた。

3.3.2.6 サザンハイブリダイゼーション解析

組換え植物および非組換え植物の葉からゲノムDNAをDNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。制限酵素EcoRIまたはNheIで切断したDNA 10 μ gを0.7%アガロースゲルで電気泳動し、Hybond N+ nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech UK) にブロッティングした。プローブの作成はプライマー対 (5'-CTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3', 5'-CCCCTCGGTATCCAATTAGAG-3') を用いてバイナリーベクターpBin19-sgfpからPCRにより増幅させた*nptII-sgfp*断片 (図-3-3-1のC) をdigoxigeninでラベルすることにより行った。次にDIG Easy Hybバッファー (Roche) 中でハイブリダイゼーションを行い、CDP-star (Roche) によりシ

グナルの検出を行った。

3.3.3 結果と考察

3.3.3.1 embryogenic tissueへの遺伝子組換え効率と遺伝子組換え体の再生

アグロバクテリウムとの2日間の共存培養後にろ紙からスパーテルでかき集めたembryogenic tissueは、アグロバクテリウムの増殖によりクリーム状になっていた。特にアグロバクテリウム懸濁液中での振とう時間を5時間とした場合に著しかった。洗浄操作を省略した場合や不十分の場合、除菌培地や選抜培地でアグロバクテリウムが増殖し、embryogenic tissueはすべて枯死した。したがって、洗浄操作はアグロバクテリウム法によるヒノキへの遺伝子導入の成否に関係する非常に重要な操作であると考えられた。同様の報告はトウヒ属でもあり (Klimaszewska *et al.* 2001a)、本研究で得た成果と一致するものである。

選抜培地で培養3～4週間後にembryogenic tissueの再増殖が認められた。その2～3週間後には、直径約1mmのコロニーに成長した。12枚のシャーレから合計197個のコロニーを分離し、選抜培地に移植した（以後、1個のコロニーに由来する培養物を1系統の培養物とする）。その2ヶ月後には、増殖しないコロニーやGFPを発現しない合計52系統（26.4%）を遺伝子組換えが行なわれていないものと判断して廃棄した。残りの145系統を遺伝子組換え系統として選抜した。表-3-3-1に4通りの処理における遺伝子組換え効率を示す。どの処理でも遺伝子組換え系統は得られたがその効率は処理間で有意な差が認められた。処理A（アグロバクテリウム懸濁液中での振とう時間が5時間、選抜培地に加えるカナマイシン濃度が25 mg/l）による遺伝子組換え効率は1シャーレ当たり22.5系統と最も高かった。振とう時間を20分と短くした処理Cでは、遺伝子組換え効率は半減した。カナマイシンの濃度を50 mg/lと高濃度にした処理Bおよび処理Dの遺伝子組換え効率は1シャーレ当たり5.5系統と低い値であった。

表-3-3-1 ヒノキのembryogenic tissueにおける遺伝子組換え効率（感染2ヶ月後の結果を示す）

処理*	(A)	(B)	(C)	(D)
シャーレ1枚当たりの 遺伝子組換え系統数	22.5a** (16-32) ***	5.5b (2-11)	11a, b (10-12)	5.5b (5-6)

*アグロバクテリウム液中での振とう時間と選抜培地に加えるカナマイシン濃度を (A) では5時間と25 mg/l, (B) では5時間と50 mg/l, (C) では20分と25 mg/l (D) では20分と50 mg/lとした。

**選抜培地で成長し、GFPを発現する遺伝子組換えembryogenic tissueのシャーレ1枚当たりの系統数を示す。1枚のシャーレ当たり250mgのembryogenic tissueをアグロバクテリウムに感染させた。異なったアルファベットを付した数字は5%水準で有意差有り (Kruskal-Wallis検定)。

***カッコ内には最小値と最大値を示す。供試シャーレ数は (A) と (B) では4枚, (C) と (D) では2枚とした。

12系統の遺伝子組換えembryogenic tissueを不定胚誘導培地で培養すると8週間後には8系統で不定胚が誘導された(図-3-3-2のB)。不定胚を発芽培地で培養すると正常に発芽し(図-3-3-2のD-1)、8系統の組換え植物を得ることができた。発芽率は57%であった。閉鎖系温室で順化させた組換え植物は、非組換え植物と形態的に明確な差は認められなかった(図-3-3-3)。

本研究ではアグロバクテリウムとしてC58/pMP90系統を用い、表-3-3-1に示す様に高い効率でヒノキの遺伝子組換えを行うことに成功した。C58/pMP90系統は、雑種カラマツ(Levée *et al.* 1997; Lelu and Pilate 2000)、ストローブマツ(Levée *et al.* 1999)、シロトウヒ、クロトウヒ、ドイツトウヒ(Klimaszewska *et al.* 2001a)などの多くの針葉樹の遺伝子組換えにも用いられている。このことより、C58/pMP90系統は針葉樹の遺伝子組換えに適したアグロバクテリウムと考えられる。他のアグロバクテリウムの系統としてはEHA 105 (pToK 47)がドイツトウヒ(Wenck *et al.* 1999)、シロトウヒ(Le *et al.* 2001)で用いられているが、遺伝子導入効率は低い。ラジアータマツではLBA4404系統が用いられているが、組換え植物は得られていない(Cerda *et al.* 2002)。

3.3.3.2 GFP遺伝子の発現

蛍光実態顕微鏡観察において、2日間の共存培養後にはシャーレ1枚当たり2ないし3個のGFP発現細胞が見られた。しかし、薄い緑色蛍光であったためにその発現量は低いと考えられた。選抜培地で培養を続けるとGFPを発現する細胞塊の数は増加したが、緑色蛍光は弱いものから強いものまでバラツキが見られた。コロニーを単離したときには約半数のコロニーは蛍光を発しなかったが、コロニーが増殖するとともに蛍光を発するコロニー数は増加した。図-3-3-2のA-1の左上に非常に発現の弱い系統を、右に強く発現する2系統を示す(図-3-3-2のA-2)。左下のものは非組換え系統で、緑色蛍光を発さなかった。成熟した不定胚では、弱い蛍光が胚軸部分に見られた(図-3-3-2のC-2)。また、GFP Plusフィルターを用いると葉緑体の自家蛍光による赤色蛍光が子葉部分に見られた(図-3-3-2のC-3)。発芽直後では、GFP Plantフィルターを用いると緑色蛍光は組換え体の根で見られた(図-3-3-2のD-2)が、非組換え体でも根の胚軸に近い部分に薄い緑色の自家蛍光が見られた。GFP Plusフィルターを用いると非組換え体の緑色自家蛍光は無くなり(図-3-3-2のD-3の下)、組換え体と非組換え体を区別することができた。順化した組換え植物では、若い葉の先端に弱い緑色蛍光がGFP Plantフィルターにより観察された(図-3-3-2のE-2)。GFP Plusフィルターでは、GFPの発現は葉緑体の赤色蛍光と重なって黄緑色であった(図-3-3-2のE-3)。

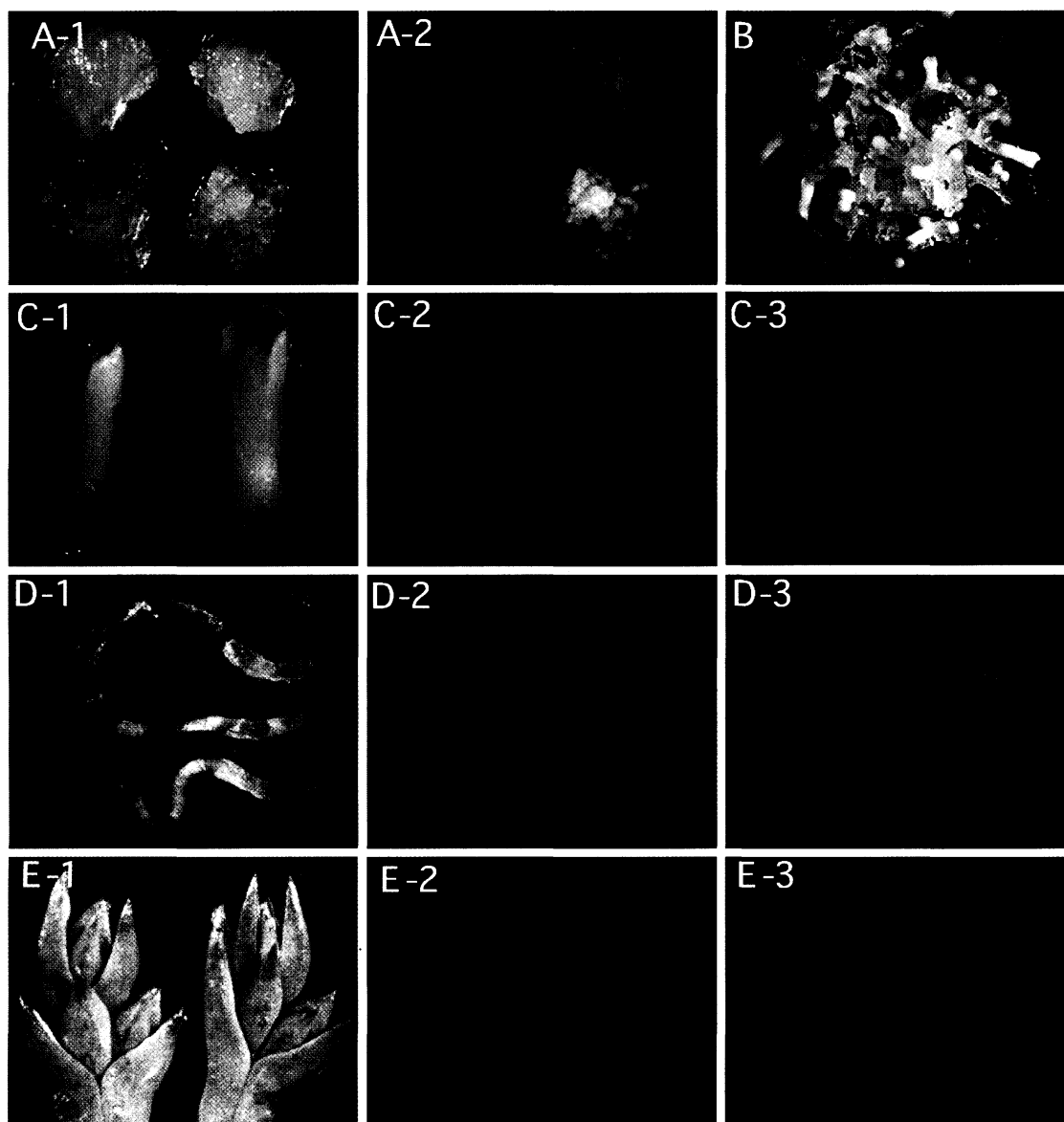


図-3-3-2 ヒノキにおけるアグロバクテリウム法によるembryogenic tissueへの遺伝子組換えとGFP遺伝子の発現
 A-1: 3系統の遺伝子組換えされたembryogenic tissue (左上と右) と1系統の非遺伝子組換えembryogenic tissue (左下), A-2: A-1の蛍光実態顕微鏡観察像 (励起フィルター: 480/40 nm, 吸収フィルター: 510 nm), B: 遺伝子組換えされたembryogenic tissueから分化した不定胚, C-1: 遺伝子組換え不定胚 (右) と非遺伝子組換え不定胚 (左), C-2: C-1の蛍光実態顕微鏡観察像 (励起フィルター: 470/40 nm, 吸収フィルター: 525/50 nm), C-3: C-1の蛍光実態顕微鏡観察像 (励起フィルター: 480/40 nm, 吸収フィルター: 510 nm), D-1: 不定胚の発芽 (上と中央は遺伝子組換え体, 下は非組換え体), D-2: D-1の蛍光実態顕微鏡観察像 (励起フィルター: 470/40 nm, 吸収フィルター: 525/50 nm), D-3: D-1の蛍光実態顕微鏡観察像 (励起フィルター: 480/40 nm, 吸収フィルター: 510 nm), E-1: 順化した植物体のシュートの先端部 (左は遺伝子組換え体, 右は非組換え体), E-2: E-1の蛍光実態顕微鏡観察像 (励起フィルター: 470/40 nm, 吸収フィルター: 525/50 nm), E-3: E-1の蛍光実態顕微鏡観察像 (励起フィルター: 480/40 nm, 吸収フィルター: 510 nm)。Bars: 5 mm (A, B, D), 2 mm (C, E)

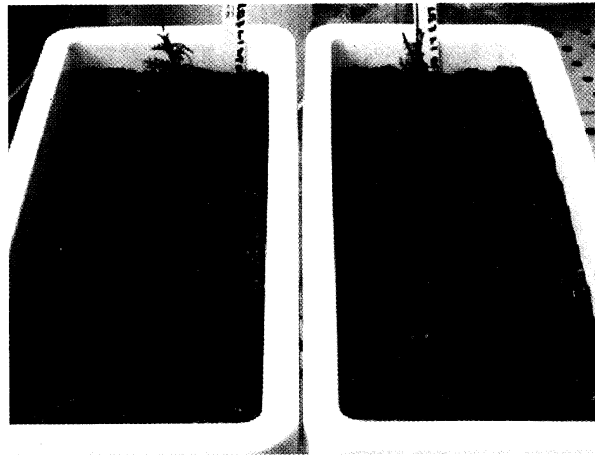


図-3-3-3 ヒノキにおけるアグロバクテリウム法によるembryogenic tissueへの遺伝子組換えにより再生した遺伝子組換え植物（右）と非遺伝子組換え植物（左）
プランターの幅は25cm

本研究では多くの場合、組換えヒノキにおけるGFPの蛍光は弱かった。その理由としてGFP遺伝子の発現を制御するCaMV35Sプロモーターの活性がヒノキにおいて弱い可能性があげられる。より活性の強いプロモーターを用いれば、GFP遺伝子はより強く発現する可能性がある。トウモロコシ由来のユビキチンプロモーターはCaMV35Sプロモーターの12から16倍も β -グルクロニダーゼを高発現させるとドイツトウヒのembryogenic tissueで報告されている(Clapham *et al.* 2000)。ヒマワリ由来のユビキチンプロモーターもCaMV35Sプロモーターより高活性であると報告されている(Clapham *et al.* 1995)。また、本研究では、根では全ての系統でGFPが発現していたが、葉でのGFPの発現はほとんど確認できなかった。ヒノキでは、器官によってCaMV35Sプロモーターの活性に差がある可能性がある。ヒノキと同様の現象がシダレカンバで報告されており、CaMV35Sプロモーターの葉での活性は根の場合の17分の1であった(Lemmetyinen *et al.* 1998)。

3.3.3.3 サザンハイブリダイゼーション解析

8系統の組換え植物と非組換え植物の葉から抽出したゲノムDNAをEcoRIで制限酵素処理してからサザンハイブリダイゼーションを行った(図-3-3-1のA)。非組換え植物からはシグナルは検出されなかった。一方、組換え植物ではすべての系統においてシグナルが検出され、GFP遺伝子がヒノキのゲノムに組込まれていることが確認された。また、各々の系統のシグナルは異なったパターンを示したことより各系統は別々の遺伝子組換え細胞に由来することが確認できた。EcoRIでゲノムDNAを切断すると、系統5以外の7系統では複数のシグナルが検出された(図-3-3-1のA)が、系統5では1本のシグナルしか検出されなかった。しかし、NheIで切断した場合、系統5のゲノムDNAからは3本のシグナルが検出された(図-3-3-1のB)。これらのことから8系統のすべての組換え体において複数コピーのGFP遺伝子が組込まれたことが明らかになった。

3.3.4 まとめ

本研究では以下のようにアグロバクテリウム法によりヒノキにGFP遺伝子を導入した組換え体を作成する方法を開発した。第2章に示した方法によりヒノキ精英樹の未成熟種子から誘導し、増殖させたembryogenic tissueにレポーター遺伝子としてGFP遺伝子を、マーカー遺伝子としてネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子を保持させたアグロバクテリウムC58/pMP90系統を感染させた。その後、アグロバクテリウム菌の除菌を行い、カナマイシンを添加した選抜培地で生育し、かつGFPの緑色蛍光を発する遺伝子組換えembryogenic tissueを選抜した。遺伝子組換え効率はカナマイシン濃度を25 mg/lとした場合に1シャーレ当たり22.5系統と高かった。遺伝子組換えされたembryogenic tissueをカナマイシンを添加したSM4培地で培養すると不定胚が誘導された。不定胚をWPG培地で発芽させることにより遺伝子組換えヒノキが再生した。これらの遺伝子組換えヒノキの順化を行った。また、遺伝子組換え体におけるGFP遺伝子のゲノムDNAへの組み込みとその発現を確認した。

ここで確立された遺伝子組換え系を用いて有用形質に関与する遺伝子をヒノキに導入すれば、有用形質が付与された遺伝子組換えヒノキを作成できると考える。

3.4 結論

本章では、遺伝子組換え技術を育種に利用するために必要な遺伝子組換え系を開発した。まず、GFP遺伝子がヒノキ、スギ、カラマツ、クロマツ、アカマツ、コシアブラの細胞内で発現することが確認され、これらの林木の遺伝子組換え系の開発の際にレポーター遺伝子として使用することができることを明らかにした。次にヒノキにおいてGFP遺伝子をレポーター遺伝子として用い、アグロバクテリウム法による遺伝子組換え体を作成する方法をはじめて明らかにした。

ここで開発したヒノキの遺伝子組換え系を林木の遺伝子組換えのモデル系とすれば、スギ等の他の林木においても遺伝子組換え系を効果的に開発することができ、有用な遺伝子組換え林木を創出することが可能になると考えられた。

4 総合考察

4.1 緒言

我が国の近年の林木育種に課せられている諸問題を解決し、林木育種を効果的に推進するための有効な手段として遺伝子組換え技術の活用をあげた。これを実現するためには効率の良い植物体再生系の開発とそれを利用した遺伝子組換え系の開発が必要である。そこで、まず第2章では我が国の主要な造林樹種を対象とし不定胚による植物体再生系について検討し、針葉樹ではヒノキとスギで、広葉樹ではクヌギとコシアブラで不定胚による植物体再生系を開発した。次に第3章では遺伝子組換え体を作成する方法について検討し、ヒノキの遺伝子組換え系を開発した。

本章では不定胚による植物体再生系と遺伝子組換え系について各々考察を加える。最後に我が国の林木育種に遺伝子組換え技術を利用するためのモデルを示し、「遺伝子組換え育種」について提言を行う。

4.2 我が国の林木の不定胚による植物体再生系について

我が国の林木の組織培養に関する研究は、1980年代の中頃から本格的に実施され、多くの成果が報告されている（林木育種センター 1995）。一方、1987年以降、海外ではトウヒ属、マツ属、カラマツ属の造林用針葉樹において不定胚による植物体再生に関する報告（Hakman *et al.* 1985; Chalupa 1985; Keinonen-Mettälä *et al.* 1996; Klimaszewska *et al.* 1997; Percy RE *et al.* 2000; Klimaszewska *et al.* 2001b など）がなされた。しかし、我が国の林木では不定胚による植物体再生系の研究は近年までほとんどなされておらず、遺伝子組換え技術を我が国の林木育種に利用するためには不定胚による植物体再生系を開発する必要性があった。そこで、本論文では不定胚を経た植物体再生系の研究を行い、その結果、針葉樹ではヒノキとスギで、また、広葉樹ではクヌギとコシアブラで不定胚誘導による植物体再生系を開発した。

本研究で開発したものも含めた我が国の重要な林木の不定胚による植物体再生の報告を表-4-2-1にまとめた。針葉樹では6樹種、広葉樹では3樹種となっている。近年、針葉樹での報告が増えていることより我が国の林木においても今後遺伝子組換えが可能となる針葉樹が増えると予想される。

表-4-2-1 我が国の林木における不定胚による植物体再生の報告例

樹種	引用文献
<針葉樹>	
ヒノキ	Taniguchi <i>et al.</i> 2004a; Maruyama <i>et al.</i> 2005b
スギ	Maruyama <i>et al.</i> 2000; Igasaki <i>et al.</i> 2003; 谷口ら 2004
サワラ	Maruyama <i>et al.</i> 2002
カラマツ	Ogita <i>et al.</i> 1999; Kim <i>et al.</i> 1999; 谷口ら 2001
クロマツ	Taniguchi 2001; Maruyama <i>et al.</i> 2005a
アカマツ	Taniguchi 2001
<広葉樹>	
クヌギ	Sasaki <i>et al.</i> 1988; 原口 1988; 香西・戸田 1990; Kim <i>et al.</i> 1994; Kim <i>et al.</i> 1997; Okamura <i>et al.</i> 2001
コナラ	Ishii <i>et al.</i> 1999
コシアブラ	Taniguchi <i>et al.</i> 1996

表-4-2-1の報告のうち、クヌギの2つの報告（Sasaki *et al.* 1988; 原口 1988）を除けば、すべての報告において未成熟胚から不定胚を誘導している。このことより多くの林木において不定胚誘導の材料として未成熟胚が適することが強く示唆された。一方、Sasakiら（1988）や原口（1988）は不定胚を成熟胚から誘導したと報告しているが、第2章の第4節で述べたように本研究では成熟胚から胚様体を誘導することはできなかった。このことはクヌギでは材料の遺伝子型により不定胚形成能力に差があり、成熟胚からでも不定胚が誘導できる個体が存在することを示唆している。

また、第2章の第2節と第3節に示したようにヒノキやスギにおいてもembryogenic tissueの形成頻度、不定胚形成頻度、不定胚の発芽頻度には家系によるバラツキが認められた。これらのことより、不定胚による植物体再生能力には遺伝的に差があると推測され、再生能力の高いものを精英樹などの優良個体から選抜すれば、遺伝子組換えを効率的に行うことができると考えられた。

本研究ではまずヒノキの不定胚誘導に適する培地を開発し、次にその培地を用いてスギにおいても不定胚を誘導することができた。このことより、分類学的に比較的近い種であれば、類似あるいは同様の手法により不定胚を誘導できる可能性があることが示唆された。このことは、不定胚誘導の効率を改善する際にはある種について手法を改良し、その成果を近縁の他の種に用いればよいということを意味する。また、本論文に示したヒノキの遺伝子組換えで得られた知見を利用してスギの遺伝子組換え体が得られている（大宮ら 2005）ことより、遺伝子組換えについても同様のことがあてはまる可能性があると考えられた。

本論文で示したように我が国の主要な造林樹種において精英樹の未成熟種子胚からの不定胚誘導が可能となった。このことより、精英樹間の交雑種子に由来する遺伝的に優れた不定胚等の「母材料」に遺伝子を組込むことが可能となった。一方、遺伝的に優れた「母材料」に遺伝子組換えを行えばより高い育種効果が得られると期待できる。そこで、図-4-2-1の方法によれば遺伝的に優れた「母材料」を選抜することができると考えられる。

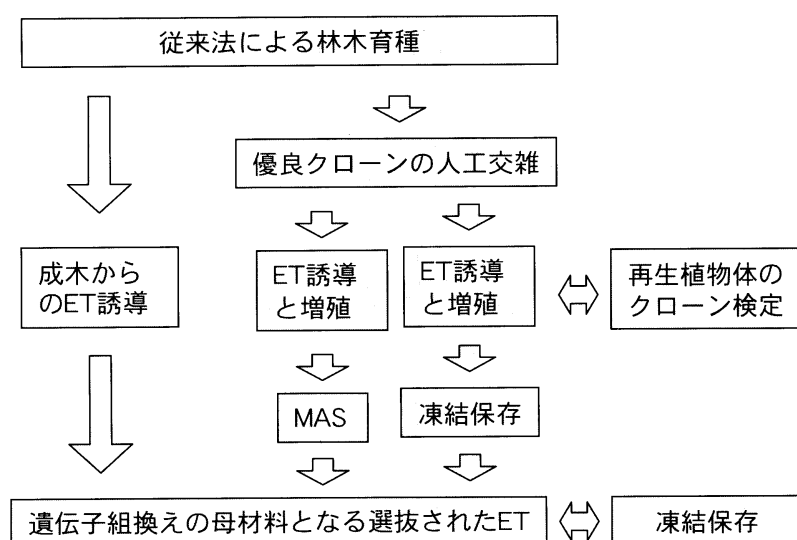


図-4-2-1 遺伝的に優れた遺伝子組換えの「母材料」を選抜するための方法
(ET; embryogenic tissue, MAS; marker assisted selection)

そのための第一の方法として、遺伝的に優れた特性を持つことが確認された成木から不定胚を誘導することをあげることができる。成木からの不定胚誘導の報告は少ないが、パツラマツ (*Pinus patula*) (Malabadi and van Staden 2005)の報告に従い、低温ストレス処理を行う方法を本論文で示した不定胚誘導方法に組込むことにより、我が国の林木でも成木からの不定胚誘導をおこなうことができる可能性があると考えられる。

第二の方法として、優良品種相互の交雑により得られた未成熟種子に由来する培養物から遺伝的に優れた系統を選抜することをあげることができる。その方法はさらに二つに分けられる。一つは、液体窒素中での超低温保存とクローン検定を組み合わせる方法である。この手法をとる場合は、培養物の保存技術の開発が必要となるが、液体窒素中での保存については既にいくつかの報告がなされている (Cyr *et al.* 1994; Häggman *et al.* 1998; Hargreaves *et al.* 2002)。我が国の林木においてもヒノキ (谷口ら 2005) とコシアブラ (谷口 2002) で液体窒素中での保存に成功している。しかし、クローン検定の期間をどの程度まで短くすることができるかが問題とな

る。もう一つの方法は、マーカー選抜（MAS, Marker Assisted Selection）による方法である。MASの実用化を目指して、高密度連鎖地図の作成（Hayashi *et al.* 2001）やQTL解析（Kuramoto *et al.* 2000）に関する研究が我が国の林木でも行われている。

これらの方法により遺伝的に優れた遺伝子組換えのための「母材料」となる培養物を獲得することができると考えられる。しかし、長期におよぶ継代培養により培養物の植物体再生能力は低下することが知られているので、これらの方法により得られる「母材料」を凍結保存することが重要である。

4.3 我が国の林木の遺伝子組換え系について

第2章で不定胚による植物体再生系を開発し、それを利用して第3章ではアグロバクテリウム法を用いてレポーター遺伝子であるGFP遺伝子を導入した遺伝子組換えヒノキを作出する方法を開発した。

ヒノキで遺伝子組換え系を開発することができた理由として以下の三点をあげることができる。第一点は、遺伝子組換えに適した不定胚培養系をあらかじめ開発したことである。第二点は、遺伝子組換えのための手法としてアグロバクテリウム法を用いたことである。第三点はレポーター遺伝子としてGFP遺伝子を使用したことである。ヒノキの遺伝子組換え系開発の際に得られたこれらの知見を利用すれば他の樹種においても遺伝子組換え系が開発できると考えられた。そこでこれらの知見を利用し、スギとクヌギで遺伝子組換え体の作出を試みたところ、GFP遺伝子を導入した遺伝子組換え体の再生に成功した（大宮ら 2005; Taniguchi *et al.* 2003）。これらのことよりヒノキの遺伝子組換え系が我が国の林木の遺伝子組換えのモデル系と成り得ることが示唆された。

一方、より短時間に多くの遺伝子組換え体を再生することができるようにするために遺伝子組換え系の改良が求められている。現時点では、ヒノキの場合、アグロバクテリウムを感染させてから順化可能な大きさの組換え植物を得るのに必要な期間は最短で約10ヶ月であり、これに対して、ポプラでは5ヶ月以下である。遺伝子組換え系において改良すべき具体的な課題は、不定胚誘導の効率化、組換え系統の選抜期間の短縮、植物体再生に要する期間の短縮である。これらについてヒノキの組換え系を改良することができれば、その改良された系を他の樹種にも応用することが可能であると考えられる。

我が国の林木における遺伝子組換え体作出の報告例を表-4-3-1にまとめた。これらの多くは再現性や効率において改良されなければならない点が多いと考えられる。先に示したヒノキの遺伝子組換え系における知見を利用すれば、多くの樹種で効率の良い遺伝子組換え系が確立され、それを利用すれば有用遺伝子の導入による実用的な遺伝子組換え林木の創出が可能となると考える。

表-4-3-1 我が国の林木における遺伝子組換え体の作出例

樹種	植物体再生法	引用文献
＜アグロバクテリウム法によるもの＞		
ヒノキ	不定胚	Taniguchi <i>et al.</i> 2005
スギ	不定胚	大宮ら 2005
クヌギ	不定胚	Taniguchi <i>et al.</i> 2003
シラカンバ	不定芽	Mohri <i>et al.</i> 1997
＜パーティクルガン法によるもの＞		
ヒノキ	苗条原基	Ishii 2002
スギ	不定芽	Maruyama <i>et al.</i> 2000
グイマツ	不定芽	Lin <i>et al.</i> 2005

次に我が国の林木にとって重要な育種目標となっている形質に關与する遺伝子の開発状況について例示する。

農作物で研究開発が進められている遺伝子のなかにも林木に導入すれば有用な遺伝子組換え体の創出につながる遺伝子は多いと考えられる。溶菌酵素であるキチナーゼの遺伝子はそのうちの一つである。この遺伝子を高発現させた組換え体では糸状菌による病気が抑制されることが知られている(西澤ら 1999)。林木でもシダレカンバでは斑点病抵抗性付与を目的に研究が進められている(Pappinen *et al.* 2002)。我が国においても糸状菌によって引き起こされる重要な林木の病気は多数あり、ヒノキの樹脂胴枯病や漏脂病、スギの赤枯病・溝腐病はその代表である。現在はこれらの病気に対する抵抗性品種や有効な防除手段はない。しかし、キチナーゼ遺伝子の導入により抵抗性ヒノキ個体やスギ個体を創出できる可能性がある。また、土壌細菌の一種 *Bacillus thuringiensis* の Bt 遺伝子を組込んだ植物は、鱗翅目昆虫に特異的に殺虫効果を示すことが良く知られている。すでに商業栽培されているアワノメイガ抵抗性のトウモロコシにはこの遺伝子が導入されている。Bt 遺伝子の導入によりヒノキカワモグリガやコウモリガなどの鱗翅目害虫に対する抵抗性をもったヒノキやスギ個体を作出することができる可能性がある。

一方、新たな遺伝子の単離、解析も進められている。スギでは他の植物の雄花形成遺伝子の塩基配列情報を利用して、雄花形成のキー遺伝子の候補がすでにいくつか単離され、解析が進められている (Fukui *et al.* 2001; 栗田ら 2005)。雄花形成のキーとなる遺伝子が見つかれば、RNA 干渉法を用いてその遺伝子の働きを抑えることにより、雄花形成を抑制することができると考えられる。あるいは、その遺伝子の発現調節領域を単離し、それに RNA 分解酵素を連結した遺伝子を導入すると、雄花形成時期になると雄花形成部位で RNA が分解され、雄花が形成されなくなると考えられる。これら方法により雄花を形成しない形質をスギ精英樹に付与すれば、花粉症対策に有効でかつ実用的な林業用スギ品種を創出することができると考える。

本節で述べたように不定胚による効率の良い植物体再生系をまず開発し、GFP 遺伝子をレポーター遺伝子として用いてアグロバクテリウム法による遺伝子導入を行えば、ヒノキ以外の樹種でも効率的に遺伝子組換え体を作出することができると考える。また、林木の育種にとって有用である形質に關与する遺伝子はすでにいくつかあり、また、新たな遺伝子の単離も進められている。それらを GFP 遺伝子に置き換えて、組換え系と個体再生系が開発された樹種に組込めば有用な遺伝子組換え林木を作出できると考える。

4.4 我が国の林木における「遺伝子組換え育種」に対する提言

本研究の成果であるヒノキの遺伝子組換え系は、遺伝子組換え技術を林木育種に活用するためのモデル系と考えることができる(図-4-4-1)。例えば前節に例示したキチナーゼ遺伝子やBt遺伝子を成長に優れる精英樹に組込めば病害や虫害に対し抵抗性をもち、成長に優れる組換え林木を短時間で作出できる。さらに、花形成を抑制する遺伝子を同時に組込めば、花粉症対策に寄与し、かつ病虫害抵抗性も合わせもつ精英樹を創出することができる。

このモデル系を利用すれば、遺伝子組換えを利用した新品種開発、すなわち「遺伝子組換え育種」が可能となる。以下に我が国の林木における「遺伝子組換え育種」について提言する。

1. 優良品種の交雑により得られた未成熟種子から遺伝子導入を行うための不定胚等の「母材料」を誘導し、アグロバクテリウム法で遺伝子組換えを行う。図-4-2-1に示す方法により遺伝的に優れた「母材料」を獲得し、それに遺伝子組換えを行えば「遺伝子組換え育種」の効果はさらに向上する。また、「母材料」の不定胚分化能力の低下を抑えるためには凍結保存を行う必要がある。
2. 病虫害抵抗性等に関与する遺伝子は、すでに農作物で研究され、利用されている。これらの遺伝子の中から、林木にとって有用と思われる遺伝子を選択し、林木の「遺伝子組換え育種」に活用するべきである。また、花粉症対策として花形成を抑制する遺伝子の導入も重要である。別々の遺伝子を保持した複数のアグロバクテリウムを同時に感染させるなどの方法により、異なる形質を支配する複数遺伝子を同時に導入すれば「遺伝子組換え育種」の効果はさらに向上する。
3. 遺伝子組換え林木を実用化するためには、遺伝子組換え林木に対する国民の理解を十分に得なければならない。そのためには花粉飛散による導入遺伝子の拡散による環境影響を抑えるために花形成抑制遺伝子の林木への導入が必要と考える。また、遺伝子組換え林木が環境に悪影響を及ぼす物質を産出しないことを確認しなくてはならない。これらのことにより遺伝子組換え林木の安全性を社会に広く示す必要がある。さらに、社会ニーズに適応した組換え林木を創出することにより組換え林木の有用性を広くアピールする必要がある。

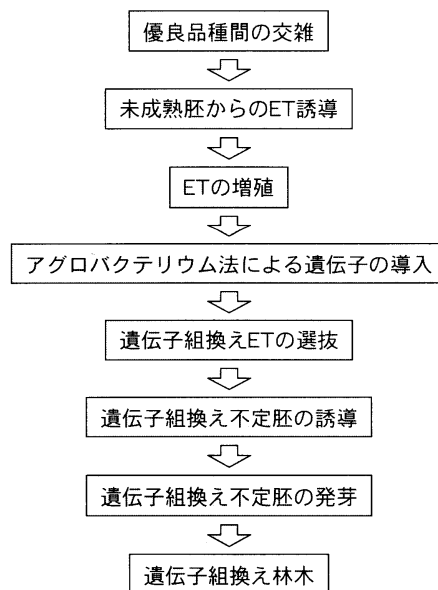


図-4-4-1 我が国の林木の遺伝子組換え系のモデルとなるヒノキにおける不定胚をへた遺伝子組換え林木の作出の基本的な流れ (ET; embryogenic tissue)

摘 要

近年の社会情勢の変化により森林に求められるニーズは変化し、それに伴い林木育種に対しては多様な品種を短時間で開発することが求められるようになった。しかし、交雑により林木の育種を行うことは長い時間を要するなど困難な点が多い。それを補うための新たな林木育種の手法として、遺伝子組換え技術の導入に大いなる可能性を見いだした。そこで、本研究では、まず我が国の林木における不定胚による植物体再生系を開発した。次に、それを利用した遺伝子組換え系の開発を行った。本研究で得られた成果は以下のとおりである。

1. 遺伝子組換え系の開発を行うためには効率の良い植物体再生系が開発されていることが前提となる。そこで、我が国の林木から重要な4樹種を選び、不定胚による植物体再生系を開発した。

(1) 針葉樹からは重要な造林樹種であるヒノキとスギを選んだ。両樹種とも子葉が分化する前の段階（7月初旬）の種子胚を内包する雌性配偶体からembryogenic tissueを誘導し、増殖させたembryogenic tissueを100 μ M ABAと150 g/l PEGを加え、糖として30 g/lのマルトースを用い、3 g/lゲルライトでゲル化させた培地で不定胚を誘導した。不定胚は発芽し、順化させることができた。ヒノキ精英樹10家系を供試したところ、8家系の未成熟胚に由来する系統で不定胚を経由して植物体が再生した。スギでは、6家系の精英樹を用いたところ4家系で植物体が再生した。また、両樹種とも不定胚分化や植物体再生能力には家系間で差があることが示唆された。

(2) 広葉樹からはしいたけ栽培のほだ木として用いられるクヌギと特用樹として重要なコシアブラを選択した。クヌギでは8月下旬に採取した未成熟胚の胚軸外植体から5 μ M BAPと5 μ M IBAを加えた培地で胚様体を誘導し、続いて5 μ M 2,4-Dを加えた培地でembryogenic callusを誘導した。embryogenic callusを植物ホルモン無添加培地で培養すると不定胚が分化し、成分を1/2に希釈した培地で不定胚を培養すると発芽個体が得られた。この方法により供試した精英樹3家系のうち2家系で植物体を再生させることができた。コシアブラでは、11月に採取した成熟種子をBAPと2,4-Dを0~2 mg/l加えた培地で培養したところ膨張胚が高頻度で得られた。その膨張胚を0.5 mg/l 2,4-Dを加えた培地で培養して不定胚を誘導した。成分を1/2に希釈した培地で不定胚は容易に発芽した。

2. 次に遺伝子組換え林木の作出について検討した。まず遺伝子組換え系の開発に向けた基礎的な実験としてGFP遺伝子の林木細胞での発現を調査し、その後にアグロバクテリウム法によるヒノキの遺伝子組換え系を開発した。

(1) パーティクルガン法によりGFP遺伝子を、ヒノキ、スギ、カラマツ、クロマツ、アカマツ、コシアブラの細胞に導入し、その発現を確認した。このことより、これらの樹種においてGFP遺伝子は有効なレポーター遺伝子であり、遺伝子組換え系を開発する際に利用できることが明らかとなった。

(2) アグロバクテリウム法によりGFP遺伝子をヒノキのembryogenic tissueに導入した。その遺伝子導入効率はシャーレ1枚当たり22.5と高い値であった。遺伝子導入されたembryogenic tissueから不定胚を経由して組換え植物を再生させた。GFP遺伝子がヒノキのゲノムに組込まれ、発現していることを再生組換え植物体で確認した。

本論文では、不定胚による植物体再生方法とそれを利用したアグロバクテリウム法による遺伝子組換え林木作出方法を開発した。これにより、我が国の林木における「遺伝子組換え育種」の基礎が確立できたと考える。す

なわち、今回用いたGFP遺伝子を有用形質に関与する他の遺伝子に置き代えて導入すれば、有用形質を付与した組換え林木の作出が可能となると考える。

謝 辞

本論文を取りまとめるに際し、九州大学大学院農学研究院教授白石 進博士、同近藤隆一郎博士、同吉田茂二郎博士には、懇篤なるご助言、ご指導をいただき、校閲の労を賜り、深くお礼申し上げます。

林木育種センター育種部育種工学課長近藤禎二博士には本研究に着手するきっかけをいただくとともに、終始ご助言、ご指導ならびに激励をいただきましたことに深く感謝いたします。林木育種センター九州育種場育種課長藤澤義武博士には、本論文の作成の際に、終始懇切なるご指導と励ましをいただきましたことに深く感謝いたします。

クヌギの実験の遂行においては林木育種センター九州育種場の岡村政則前育種研究室長にお世話になり、深謝いたします。果樹研究所松田長生博士には、遺伝子組換え実験の基本操作をご指導いただきましたことに感謝いたします。ベクター作成とサザンハイブリダイゼーションの際には林木育種センター育種部育種工学課遺伝子組換え研究室の大宮泰徳博士ならびに同栗田 学博士にお世話になり、感謝いたします。培地作成等の実験補助をしていただきました伊佐見邦子さんならびに佐藤克江さんには深く感謝いたします。

茨城県森林技術センターならびに太子宮林署(現茨城県森林管理署)の各位には材料採取に際しましてご助力をいただきましたことにお礼申し上げます。

栄花 茂前育種部長、田島啓正育種部長、宮田増男遺伝資源部長、板鼻直榮前育種工学課長、下堂健次九州育種場長をはじめとする林木育種センターならびに同九州育種場の皆様には研究の遂行および論文の作成にあたり、お心遣いをいただきましたことに厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Bapat VA, Fulzele DP, Rao PS, Heble MR (1990) Production of somatic embryos of sandalwood (*Santalum album* L.) in bioreactors. *Curr Sci* 59: 746-748
- Becwar MR, Nagmani R, Wann SR (1990) Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can J For Res* 20:810-817
- Bueno, M, Astorga, R, Manzanera J (1992) Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiol Plant* 85: 30-34
- Campbell RA, Durzan DJ (1975) Induction of multiple buds and needles in tissue culture of *Picea glauca*. *Can J Bot* 53: 1652-1657
- Cerda F, Aquea F, Gebauer M, Medina C, Arce-Johnson P (2002) Stable transformation of *Pinus radiata* embryogenic tissue by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 70: 251-257
- Chalupa V (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Communi Inst For Cech* 14: 57-63
- Charest P, Devantier Y, Lachance D (1996) Stable genetic transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment. *In Vitro Cell Dev Bio Plant* 32: 91-99

- Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* 6: 325-330
- Clapham D, Demel P, Elfstrand M, Koop H-U, Sabala I, von Arnold S (2000) Gene transfer by particle bombardment to embryogenic cultures of *Picea abies* and production of transgenic plantlets. *Scand J For Res* 15:151-160
- Clapham D, Manders G, Yibrah HS, von Arnold S (1995) Enhancement of short- and medium- term expression of transgenes in embryogenic suspensions of *Picea abies* (L.) Karst. *J Exp Bot* 46: 655-662
- Cyr DR, Lazaroff WR, Grimes SMA, Quan G, Bethune TD, Dunstan DI, Roberts DR (1994) Cryopreservation of interior spruce (*Picea glauca engelmanni* complex) embryogenic cultures. *Plant Cell Rep* 13: 574-577
- Dunstan DI, Tautorius TE, Thorpe TA (1995) Somatic embryogenesis in woody plant. In: Thorpe TA (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer, Dordrecht, pp471-538
- Ellis DD, McCabe DE, McInnis S, Ramachandran R, Russell DR, Wallace KM, Martinell BJ, Roberts DR, Raffa KF, McCown BH (1993) Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Bio/Technology* 11: 84-89
- Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T (2000) Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nature Biotechnol* 18: 784-788
- Fillatti JJ, Sellmer J, McCown B, Haissig B, Comai L (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol Gen Genet* 206: 192-199
- Fukui M, Futamura N, Mukai Y, Wang Y, Nagao A, Shinohara K (2001) Ancestral MADS box genes in sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don (Taxodiaceae), homologous to the B function genes in angiosperms. *Plant Cell physiol* 42: 566-575
- Garin E, Isabel N, Plourde A (1998) Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos. *Plant Cell Rep*: 18: 37-43
- Giri CC, Shyamkumar B, Anjaneyulu C (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and application of biotechnology to trees: an overview. *Trees* 18: 115-135
- Gui Y, Guo Z, Ke S, Skirvin RM (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopanax senticosus*. *Plant Cell Rep* 9: 514-516
- Gupta PK, Grob JA (1995) Somatic embryogenesis in conifer. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol. 1. Kluwer, Dordrecht, pp 81-98
- Gupta PK, Timmis R, Timmis KA, Carlson WC, Welty EDE (1995) Somatic embryogenesis in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol. 3. Kluwer, Dordrecht, pp 303-313
- Hakman I, Fowke LC, von Arnold S (1985) The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Sci* 38: 53-59
- 原口雅人 (1988) クヌギの子葉切片の培養によって誘導された不定胚からの植物体再生. *日林誌* 70: 411-416
- 原口雅人 (1993) タラノキの葉・葉柄からの不定胚形成と再生した植物の特性. *日林講* 104: 601-602
- Hargreaves CL, Grace LJ, Holden DG (2002) Nurse culture for efficient recovery of cryopreserved *Pinus radiata* D. Don embryogenic cell lines. *Plant Cell Rep* 21: 40-45
- 橋詰隼人, 尾崎栄一 (1979) クヌギおよびコナラの果実の発達と成熟. *取大農研報* 31: 189-195

- Hayashi E, Kondo T, Terada K, Kuramoto N, Goto Y, Okamura N, Kawasaki H (2001) Linkage map of Japanese black pine based on AFLP and RAPD markers including markers linked to resistance against the pine needle gall midge. *Theor Appl Genet* 102: 871-875
- 引田裕之, 千葉 太(1993) コシアブラの冬芽の組織培養による幼植物体の再生—各種糖類と冬芽の採取時期, および 1-ナフチルアセトアミドの影響. *日林誌* 75: 245-249
- Hosoi Y, Ishii K (2001) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Pinus armandii* var. *amamiana*. In: Morohoshi N & Komamine K (eds) *Molecular Breeding of Woody Plants*. Elsevier Science, Amsterdam, pp 313-318
- Hu WJ, Harding SA, Lung J, Popko JL, Ralph J, Stokke D, Tsai CJ, Chiang VL (1999) Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnol* 17: 808-812
- Huang Y, Diner AM, Karnosky DF (1991) *Agrobacterium rhizogenesis*-mediated genetic transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua*. *In Vitro Cell Dev Biol* 27: 201-207
- Häggman HM, Ryyänänen LA, Aronen TS, Krajnakova J (1998) Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. *Plant Cell Tiss Org Cult* 54: 45-53
- 井出雄二, 山本茂弘 (1988) クヌギ成木の萌芽枝の培養による幼植物体再生. *日林論* 99: 457-458
- Igasaki T, Sato T, Akashi N, Mohri T, Maruyama E, Kinoshita I, Walter C, Shinohara K (2003) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Plant Cell Rep* 22: 239-243
- Ishii K (1986) In vitro plantlet formation from adventitious buds on juvenile seedlings of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 7: 247-255
- Ishii K (2002) Liquid culture and transformation of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.). *J For Res* 7: 99-104
- Ishii K, Thakur R, Jain Mohan (1999) Somatic embryogenesis and evaluation of variability in somatic somatic seedlings of *Quercus serrata* by RAPD markers. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol. 4. Kluwer, Dordrecht, pp 403-414
- 伊東祐道 (1989) クヌギの組織培養による増殖(II)シュートの発根に対するオーキシン要求度のクローン間差. *日林論* 100: 501-503
- 伊沢一男 (1992) 葉草カラー図鑑3 (第4版). 主婦の友社. pp246
- Keinonen-Mettälä K, Jalonen P, Euroala P, von Arnold S, von Weissenberg K (1996) Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris*. *Scand J For Res* 11:242-250
- Kim YW, Lee BC, Lee SK, Jang SS (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Quercus acutissima*, *Plant Cell Rep* 13: 315-318
- Kim YW, Youn Y, Noh ER, Kim JC (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*, *Plant Cell Rep* 16: 869-873
- Kim YW, Youn Y, Noh ER, Kim JC (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant cell Tiss Org Cult* 55: 95-101
- Klimaszewska K, Devantier Y, Lachance D, Lelu MA, Charest PJ (1997) *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. *Can J For Res* 27:538-550

- Klimaszewska K, Lachance D, Pelletier G, Lelu M-A, Séguin A (2001a) Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. In Vitro Cell Dev Biol Plant 37:748-755
- Klimaszewska K, Park YS, Overton C, Maceacheron I, Bonga JM (2001b) Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobes* L. In Vitro Cell Dev Biol Plant 37: 392-399
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of T₁-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol Gen Genet 204: 383-396
- 香西 護, 戸田義宏 (1990) クスギの組織培養による不定胚形成. 日林講 101: 479-480
- 小山真澄 (1992) トゲナシタラノキの組織培養. 林木の育種 103: 4-8
- Kuramoto N, kondo T, Fuzisawa Y, Nakada R, Hayashi E, Goto Y (2000) Detection of quantitative trait loci for wood strength in *Cryptomeria japonica*. Can J For Res 30: 1525-1533
- 栗延 晋, 戸田忠雄 (2000) 3箇所のさしき検定林におけるスギ精英樹クローンの直径成長パターンの変異. 日林九支論 53: 63-64
- 栗田 学, 大宮泰徳, 谷口 亨, 坪村美代子, 近藤禎二 (2005) スギの花芽で発現するMADS box遺伝子の機能解析. 日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム要旨集 23: 211
- Lannenpaa M, Hassinen M, Ranki A, Holttä-Vuori M, Lemmetyinen J, Keinonen K, Sopanen T (2005) Prevention of flower development in birch and other plants using a BpFULL::BARNASE construct. Plant Cell Rep 24: 69-78
- Le VQ, Belles-Isles J, Dusabenyagasani M, Tremblay FM (2001) An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. J Exp Bot 52:2089-2095
- Lelu M-A, Pilate G (2000) Transgenic in *Larix*. In: Jain SM, Minocha SC (eds) Molecular Biology of Woody Plants, Vol 2. Kluwer, Dordrecht, pp 119-134
- Lemmetyinen J, Keinonen-Mettälä, Lannenpää M, von Weissenberg K, Sopanen T (1998) Activity of the CaMV 35S promoter in various parts of transgenic early flowering birch clones. Plant Cell Rep 18: 243-248
- Levéé V, Garin E, Klimaszewska K, Séguin A (1999) Stable transformation of white pine (*Pinus strobes* L.) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Breeding 5:429-440
- Levéé V, Lelu MA, Jouanin L, Cornu D, Pilate G (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* x *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. Plant Cell Rep 16: 680-685
- Lin X, Zhang W1, Takechi K, Takio S, Ono K, Takano H (2005) Stable genetic transformation of *Larix gmelinii* L. by particle bombardment of zygotic embryos. Plant Cell Rep 24: 418-425
- Lloyd G, McCown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc Int Plant Propagation Soc 30: 421-427
- Malabadi RB, van Staden J (2005) Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. Tree Physiol 25: 11-16
- Maruyama E, Hosoi Y, Ishii K (2002) Somatic embryogenesis in Sawara Cypress (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. et Zucc.) for stable and efficient plant regeneration, propagation and protoplast culture. J For Res 7:23-34
- Maruyama E, Hosoi Y, Ishii K (2005a) Somatic embryo production and plant regeneration of Japanese black pine (*Pinus*

- thunbergii*). J For Res 10: 403-407
- Maruyama E, Ishii K, Hosoi Y (2005b) Efficient plant regeneration of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) via somatic embryogenesis. J For Res 10: 73-77
- Maruyama E, Tanaka T, Hosoi Y, Ishii K, Morohoshi N (2000) Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). Plant Biotechnol 17: 281-296
- McCown BH, McCabe DE, Russell DR, Robinson DJ, Barton KA, Raffa KF (1991) Stable transformation of *populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. Plant Cell Rep 9: 590-594
- Mohri T, Igasaki T, Sato T, Shinohara K (2000) Expression of genes for β -glucuronidase and luciferase in three species of Japanese conifer (*Pinus thunbergii*, *P. densiflora* and *Cryptomeria japonica*) after transfer of DNA by microprojectile bombardment. Plant Biotechnol 17: 49-54
- Mohri T, Mukai Y, Shinohara K (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japanese birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*). Plant Sci 127: 53-60
- Moon H, Youn Y (1999) Somatic embryogenesis from winter buds of 10-year-old *Aralia elata*. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 5. Kluwer, Dordrecht, pp 129-134
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol plant 15: 473-497
- Nagmani R, Diner AM, Carton S, Zipf AE (1995) Anatomical comparison of somatic and zygotic embryogeny in conifers. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 1. Kluwer, Dordrecht, pp 23-48
- Nanjo T, Futamura N, Nishiguchi M, Igasaki T, Shinozaki K, Shinohara K (2004) Characterization of full-length enriched expressed sequence tags of stress-treated poplar leaves. Plant Cell Physiol 45: 1738-1748
- 西澤洋子, 鈴木 匡, 日比忠明 (1999) 病害抵抗性トランスジェニック植物の開発はどこまで進んだか(上). 化学と生物 37: 295-305
- Niwa Y (2003) A synthetic green fluorescent protein gene for plant biotechnology. Plant Biotechnol 20: 1-11
- Nomura K, Komamine A (1995) Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro* embryogenesis in plants Kluwer, Dordrecht, pp 249-265
- 農林水産先端技術産業振興センター (2004) 遺伝子組換えハンドブック「バイオテク小事典」. pp 126
- Nørgaard JV (1997) Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. Plant Sci 124:211-221
- Ogita S, Sasamoto H, Kubo T (1999) Maturation and plant recovery from embryogenic cells of Japanese larch: Effect of abscisic acid in relation to their morphology. J For Res 4: 241-244
- 大宮泰徳, 谷口 亨, 栗田 学, 坪村美代子, 近藤禎二 (2005) スギ不定胚再生系を用いた形質転換体の作出. 日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム要旨集 23: 92
- 太田貞明 (1972) スギ・ヒノキ樹幹内における未成熟材の力学特性に関する基礎的研究. 九大演報 45: 1-80
- Okamura M, Kondo T (1995) Manual for tissue culture of pine. Bull National For Tree Breed Center 13: 139-143

- Okamura M, Taniguchi T, Kondo T (2001) Efficient embryogenic callus induction and plant regeneration from embryogenic axis explants in *Quercus acutissima*. J For Res 6: 63-66
- Oregon State University (2004) Tree biosafety & genomics research cooperative 2004 annual report. pp 36
- Pappinen A, Degefu Y, Syrjälä, Keinonen K, von Weissenberg K (2002) Transgenic silver birch (*Betula pendula*) expressing sugarbeet chitinase 4 shows enhanced resistance to *Pyrenopeziza betulicola*. Plant Cell Rep 20: 1046-1051
- Park YS, Pond SE, Bonga JM. (1993) Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implication for tree breeding. Theor Appl Genet 86:427-436
- Percy RE, Klimaszewska K, Cyr DR (2000) Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. Can J For Res 30: 1867-1876
- Pullman GS, Johnson S, Peter G, Cairney J, Xu N (2003) Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. Plant Cell Rep 21:747-758
- Rao PS (1965) In vitro induction of embryonal proliferation in *Santalum album* (L.). Phytomorphology 15: 175-179
- Rao P, Bapat V (1995) Somatic embryogenesis in sandalwood (*Santalum album* L. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 2. Kluwer, Dordrecht, pp 153-170
- Reinert J (1958) Morphogenese und ihre kontrolle an Gewebekultures aus carotten. Naturwissenschaften 45: 344-345
- 林木育種センター (1995) 組織培養技術実用化プロジェクト実施報告. 林育研報 13. pp 165
- 林木育種センター (2005) 林木育種の実施状況および統計 (平成15年度) .pp 81
- Roberts A, Yokoya K, Walker S, Mottley J (1995) Somatic embryogenesis in *Rosa* spp. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 2. Kluwer, Dordrecht, pp 277-289.
- Salajova T, Salaj J, Kormutak A (1999) Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. Plant Sci 145:33-40
- Sanford JC, Smith FD, Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. Meth Enzymol 217: 483-509
- Sasaki Y, Shoyama Y, Nishioka I, Suzuki T (1988) Clonal propagation of *Quercus acutissima* Carruch by somatic embryogenesis from embryonic axes. J Fac Agr Kyushu Univ 33: 95-101
- 佐藤 亨 (1986) スギの稚苗の組織片からの不定芽誘導による植物体の再生. 日林誌 68: 389-392
- 佐藤 亨 (1989) スギ. (木本植物の増殖と育種. 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編, 農業図書, 東京), pp 80-85
- Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR, Denholm I (1998) Insect-resistant transgenic plants. Trends Biotechnol 16: 168-175
- Sharma KK, Thorpe T (1995) Asexual embryogenesis in vascular plants in nature. In: Thorpe TA (ed) *In vitro* embryogenesis in plants Kluwer, Dordrecht, pp 17-72
- Smith DR (1996) Growth medium. US Patent no. 5,565,355
- Steward FC, Mapes MO, Mears K (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspend cells. Amer J Bot 45: 705-708
- Tang W, Newton RJ (2003) Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. Plant Cell Rep 22:1-15
- Taniguchi T (2001) Plant regeneration from somatic embryos in *Pinus thunbergii* (Japanese black pine) and *Pinus*

- densiflora* (Japanese red pine). In: Morohoshi N, Komamine K (eds) Molecular Breeding of Woody Plants. Elsevier Science, Amsterdam, pp 319-324
- 谷口 亨 (2002) コシアブラの不定胚の乾燥耐性誘導と液体室素中での保存. 日林講 113: 648
- 谷口 亨, 林 英司, 板鼻直榮 (2001) カラマツの未成熟胚から誘導した不定胚の成熟・発芽に及ぼすABAの影響. 日林講 112: 659
- 谷口 亨, 近藤禎二 (1997) スギの当年枝の培養によるクローン増殖. 日林誌 79: 246-248
- Taniguchi T, Kondo T (1998) Initiation of embryogenic tissues from immature and mature embryos in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). Abstract book for "8th meeting of The conifer biotechnology working group, June 7-11, 1998, USA"
- Taniguchi T, Kondo T (2000) Difference in the ability of initiation and maintenance of embryogenic cultures among sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) seed families. Plant Biotechnology 17: 159-162
- Taniguchi T, Kurita M, Itahana N, Kondo T (2004a) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.) Plant Cell Rep 23: 26-31
- 谷口 亨, 栗田 学, 大宮泰徳, 近藤禎二 (2004) スギ未熟種子からの不定胚を経由した植物体再生. 日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム要旨集 22: 86
- Taniguchi T, Kurita M, Ohmiya Y, Kondo T (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic tissue and transgenic plant regeneration in *Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc. Plant Cell Rep 23: 796-802
- 谷口 亨, 栗田 学, 大宮泰徳, 近藤禎二 (2005) ヒノキのembryogenic tissueの超低温保存技術の開発. 日本森林学会大会講演要旨集 116: 2A01
- Taniguchi T, Ohmiya Y, Kurita M, Kondo T (2004b) Transient expression of the green fluorescent protein gene in *Cryptomeria japonica*, *Chamaecyparis obtusa*, *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii*, *Larix kaempferi* and *Acanthopanax sciadophylloides* following particle bombardment. Bull Forest Tree Breeding Center 20: 1-8
- Taniguchi T, Ohmiya Y, Kurita M, Okamura M, Kondo T (2003) *Agrobacterium* mediated genetic transformation of sawtooth oak (*Quercus acutissima*) somatic embryo. Abstract for "Tree Biotechnology 2003" June 7-12 Umeå, Sweden S2.26
- Taniguchi T, Tabuchi K, Yamaguchi Y, Fuzisawa Y (1996) Somatic Embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopanax sciadophylloides*. J For Res 1:51-55
- Tian L-N, Charest PJ, Séguin A, Rutledge RG (2000) Hygromycin resistance is effective selectable marker for biolistic transformation of black spruce (*Picea mariana*). Plant Cell Rep 19: 358-362
- Töpfer R, Mass C, Grandpierre CH, Shell J, Steiniss HH (1993) Expression vectors for high-level gene expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants. Meth Enzymol 217: 66-78
- Van Winkle SC, Johnson S, Pullman GS (2003) The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. Plant Cell Rep 21:1175-1182
- Vasil I (1985) Somatic embryogenesis and its consequences in Gramineae. In: Henke R, Hughes K, Constantin M, Hollaender A (eds) Tissue culture in forestry and agriculture. Plenum press, pp 31-47
- von Arnold S, Egertsdotter U, Ekberg I, Gupta P, Mo H, Nörsgaard J (1995) Somatic embryogenesis in Norway spruce

- (*Picea abies*). In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 3. Kluwer, Dordrecht, pp 17–36
- Walter C, Grace LJ, Donaldson SS (1999) An efficient biolistic transformation protocol for *Picea abies* embryogenic tissue and regeneration of transgenic plants. Can J For Res 29:1539–1546
- Walter C, Grace LJ, Wagner A, White DWR, Walden AR, Donaldson SS, Hinton H, Gardner RC, Smith DR (1998) Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. Plant Cell Rep 17, 460–469
- Wenck AR, Quinn M, Whetten RW, Pullman G, Sederoff R (1999) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). Plant Mol Biol 39:407–416
- Wolk CP, Vonshak A, Elhai J (1984) Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1561–1565
- Yamada-Watanabe K, Kawaoka A, Matsunaga E, Nanto K, Sugita K, Endo S, Ebinuma H, Nurata N (2003) Moreuclar breeding of *Eucalyptus* analysis of salt stress tolerance of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* that overexpress choline oxidase gene (cod A). Abstract for "Tree Biotechnology 2003" June 7-12 Umeå, Sweden S7.9
- Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Van Montagu M, Schell J (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J 2: 2143-2150
- Zupan John, Muth TR, Draper O, Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. Plant J 23: 11-28