

学 位 論 文 要 旨

氏 名	井上 公一
題 目	生物工学的的手法による日本産アイリスとチャシヨウブの種間雑種の作出に関する研究 (Studies on production of interspecific hybrids between Japanese irises and <i>Iris fulva</i> by means of biotechnology)
<p>ルイジアナアイリスに属するチャシヨウブ(<i>Iris fulva</i> $2n=2x=42$)の茶色や赤茶色の花色をハナシヨウブ(<i>I. ensata</i>, $2n=2x=24$)およびカキツバタ(<i>I. laevigata</i>, $2n=2x=32$)の日本産アイリスに導入するには、両者の高い種間交雑不和合性を克服することが必要である。そこで、このような交雑不和合性を胚培養および細胞融合といった生物工学的的手法により克服し、種間雑種を獲得するために本研究を実施した。</p> <p>まず、embryogenic callus(EC)懸濁培養系を確立するため、チャシヨウブおよびハナシヨウブの未熟胚培養を行った。チャシヨウブ二倍体野生系統では $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,4-D および $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ カイネチンを含む MS 培地で、またハナシヨウブ品種「明治 7」では $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,4-D および $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 6-ベンジルアミノプリンを含む MS 培地で誘導された EC を液体 N6 培地に移し、振盪培養することで懸濁培養系を確立した。</p> <p>得られた懸濁培養系よりチャシヨウブおよびハナシヨウブのプロトプラストをそれぞれ単離、培養した。両種のプロトプラストの分裂およびコロニーの成長には、チャシヨウブでは 0.3M グルコース、またハナシヨウブでは 0.4M グルコースが効果的であった。Flow cytometry(FCM)解析の結果、両種の体細胞多倍数性を検出するとともに、再生植物体の 59%(チャシヨウブ)および 53%(ハナシヨウブ)が倍数体であった。このように、両種のプロトプラスト培養は効率的に倍数体を作成することが明らかになった。</p> <p>チャシヨウブ(2x、野生系統および 4x、プロトプラスト培養由来)とカキツバタとの正逆交雑では、チャシヨウブ(4x)×カキツバタでのみ、胚培養により実生 6 個体を獲得した。得られた 6 個体の雑種性を FCM、分子生物学的および細胞遺伝学的に解析したところ、これらの個体は全て種間雑種であると同定された。</p> <p>一方、ハナシヨウブとチャシヨウブ(2x、4x)との正逆交雑では、いずれの組み合わせでも種間雑種が得られなかったため、ヨードアセトアミド処理をしたハナシヨウブのプロトプラストと再分化能を失ったチャシヨウブのプロトプラスト間で、電気融合を行い 9 個体の再生植物体を得た。これら 9 個体の核 DNA 含量を測定したところ、2 個体が体細胞雑種と推定された。さらに、これら 2 個体の雑種性を分子生物学的および細胞遺伝学的に解析したところ、1 個体($2n=68$)がハナシヨウブ由来の染色体 24 本とミトコンドリア、チャシヨウブ由来の染色体 44 本と葉緑体を有する種間体細胞雑種(異数体)であると同定された。</p> <p>以上の結果、本研究ではチャシヨウブと日本産アイリスとの種間交雑不和合性を胚培養または細胞融合により克服し、最初の種間雑種の獲得に成功した。これらの雑種は、日本産アイリスの種間交雑育種に大いに貢献するものである。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Kouichi Inoue
題 目	<p>Studies on production of interspecific hybrids between Japanese irises and <i>Iris fulva</i> by means of biotechnology (生物工学的手法による日本産アイリスとチャショウブの種間雑種の作出に関する研究)</p>
<p>The Louisiana iris species, <i>Iris fulva</i> has unique brown and red-brown colors that are useful traits for flower color breeding of Japanese irises, <i>I. ensata</i> and <i>I. laevigata</i>. However, no hybrids between these species and <i>I. fulva</i> have so far been obtained because of high interspecific cross-incompatibility. The objective of this study was to overcome the cross-incompatibility by means of biotechnology such as embryo culture and cell fusion.</p> <p>To induce embryogenic calli, immature embryos of <i>I. fulva</i> and <i>I. ensata</i> were cultured on MS medium supplemented with $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 2, 4-D + $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kinetin and $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 2, 4-D + $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 6-benzylaminopurine, respectively. Embryogenic calli of both species were transferred to liquid N6 medium for induction of callus suspension. One month later, embryogenic callus suspensions suitable for protoplast isolation were established in <i>I. fulva</i> and <i>I. ensata</i>.</p> <p>Protoplasts of <i>I. fulva</i> and <i>I. ensata</i> were isolated enzymatically from their suspension calli and 0.3 M (<i>I. fulva</i>) and 0.4 M (<i>I. ensata</i>) glucose were found suitable for protoplast division and colony growth. Flow cytometric (FCM) analysis revealed that leaf tissues and suspension calli of <i>I. fulva</i> and <i>I. ensata</i> consisted of 2C, 4C and 6C cells. Therefore, these species were recognized as polysomatic species for the first time. Moreover, polyploid plants were regenerated with high frequency from protoplast culture of <i>I. fulva</i> (59%) and <i>I. ensata</i> (53%).</p> <p>Reciprocal crosses between <i>I. fulva</i> (diploid wild line or tetraploids regenerated from protoplast culture) and <i>I. laevigata</i> were conducted. Of the reciprocal crosses, only the tetraploid <i>I. fulva</i> x <i>I. laevigata</i> produced 6 seedlings through embryo culture. These seedlings were identified as interspecific hybrids between tetraploid <i>I. fulva</i> and <i>I. laevigata</i> by analyses of FCM, random amplified polymorphic DNA (RAPD), chromosome counting and genomic <i>in situ</i> hybridization (GISH).</p> <p>As no hybrid plants were obtained from reciprocal crosses between <i>I. fulva</i> (diploid wild line or tetraploids regenerated from protoplast culture) and <i>I. ensata</i>, protoplast fusion between <i>I. ensata</i> (treated by iodoacetamide) and <i>I. fulva</i> (with no cell division ability) was attempted. After protoplast culture, 9 plants were regenerated and 2 of them were screened as putative somatic hybrids by FCM analysis. Hybridity analyses with RAPD, cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS), chromosome counting and GISH revealed that one of two putative hybrids was an interspecific somatic hybrid between <i>I. ensata</i> and <i>I. fulva</i> which had 24 chromosomes and mitochondria of <i>I. ensata</i> and 44 chromosomes and chloroplasts of <i>I. fulva</i>.</p>	

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	井 上 公 一
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 藪 谷 勤
	副査 宮崎 大学 教授 國 武 久 登
	副査 鹿兒島 大学 教授 坂 田 祐 介
	副査 宮崎 大学 教授 辰 巳 保 夫
	副査 佐賀 大学 助教授 石 丸 幹 二
審査協力者	
題 目	<p>生物工学的手法による日本産アイリスとチャショウブの種間雑種の作出に関する研究</p> <p>(Studies on production of interspecific hybrids between Japanese irises and <i>Iris fulva</i> by means of biotechnology)</p>
<p>ルイジアナアイリスの一種であるチャショウブ(<i>Iris fulva</i>, $2n=2x=42$)は、その花色が特徴的な茶色または赤茶色であり、これらの形質がハナショウブ(<i>I. ensata</i>, $2n=2x=24$)やカキツバタ(<i>I. laevigata</i>, $2n=2x=32$)といった日本産アイリスに導入できれば、その花色育種が飛躍的に進むものと期待されている。しかしながら、高い種間交雑不和合性が存在するため、日本産アイリスとチャショウブとの間で雑種が得られたという報告はない。そこで、このような交雑不和合性を胚培養および細胞融合といった生物工学的手法により克服し、種間雑種を獲得するために本研究を実施した。本研究で得られた成果を要約すれば以下の通りである。</p> <p>1. Embryogenic callus (EC) 懸濁培養系を確立するため、チャショウブおよびハナショウブの未熟胚培養を行った。その結果、チャショウブ二倍体野生系統では$1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 2,4-Dおよび$1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ カイネチンを含むMS培地で、またハナショウブ品種「明治7」では$5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 2,4-Dおよび$5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 6-ベンジルアミノプリンを含むMS培地で誘導されたECを液体N6培地に移し、振盪培養することで懸濁培養系を確立した。</p>	

2. チャシヨウブおよびハナシヨウブの EC 懸濁培養細胞系より単離したプロトプラストの分裂およびコロニー形成に及ぼす糖の種類および濃度を検討したところ、前者においては 0.4 M グルコース、また後者においては 0.3 M グルコースが適当であった。形成されたコロニーを MS 培地に移植すると、両種とも体細胞胚を経た植物体の再生に成功した。Flow cytometry (FCM)解析により核 DNA 含量を測定したところ、チャシヨウブおよびハナシヨウブに体細胞多倍数性が検出され、また再生植物体の 59%(チャシヨウブ)および 53%(ハナシヨウブ)が倍数体であった。このように、両種のプロトプラスト培養は効率的に倍数体を作成することが明らかになった。さらに、チャシヨウブのプロトプラスト培養由来四倍体の花は、二倍体の花と比較して内、外両花被のサイズが大きくなり、花容も垂咲きから受け咲きへと変化しており、注目された。

3. チャシヨウブの野生系統(2x)またはプロトプラスト培養由来個体(4x)とカキツバタとの正逆交雑では、チャシヨウブ(4x) × カキツバタでのみ、胚培養により実生 6 個体を獲得した。得られた 6 個体の雑種性を FCM、random amplified polymorphic DNA (RAPD)、genomic *in situ* hybridization (GISH) 解析および染色体観察により検定したところ、これらの個体はすべて種間雑種であると同定された。

4. ハナシヨウブとチャシヨウブ(2x、4x)との正逆交雑では、いずれの組み合わせでも種間雑種が得られなかったため、ヨードアセトアミド処理をしたハナシヨウブのプロトプラストと再分化能を失ったチャシヨウブのプロトプラスト間で、電気融合を行い 9 個体の再生植物体を得た。これら 9 個体のうち、2 個体が FCM 解析により体細胞雑種であると推定されたので、その雑種性を RAPD、cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)、GISH 解析および染色体観察により検定した。その結果、1 個体(2n=68)がハナシヨウブ由来の染色体 24 本とミトコンドリア、チャシヨウブ由来の染色体 44 本と葉緑体を有する種間体細胞雑種(異数体)であると同定された。また、ハナシヨウブ由来の染色体 24 本のうち、1 本の両端にチャシヨウブ由来の染色体の転座が認められた。

以上のように、本研究では、日本産アイリスとチャシヨウブの高い種間交雑不和合性を生物工学的手法により克服するために実施し、ハナシヨウブおよびチャシヨウブの EC 懸濁培養細胞系ならびにプロトプラスト培養系の確立、胚培養によるチャシヨウブとカキツバタの種間雑種の獲得、さらに細胞融合によるチャシヨウブとハナシヨウブの種間体細胞雑種の獲得に成功した。このような研究成果は、学術的に価値があり、本研究論文は学位論文として十分価値のあるものと判断した。

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	井上公一		
審査委員	主査	宮崎 大学 教授	藪谷 勤
	副査	宮崎 大学 教授	國武 久登
	副査	鹿兒島 大学 教授	坂田 祐介
	副査	宮崎 大学 教授	辰巳 保夫
	副査	佐賀 大学 助教授	石丸 幹二
審査協力者			
実施年月日	平成 19 年 1 月 8 日		
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）		<input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成 19 年 1 月 8 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>			

学位申請者 氏 名	井 上 公 一
[質問 1]	チャショウブの花色をどのように育種に利用するのか？
[回答 1]	チャショウブの茶色花色はデルフィニジン系アントシアニン(Dp 3pCRG5G)とカロチノイド系色素により発現されている。従って、チャショウブのカロチノイド色素をハナショウブおよびカキツバタに導入し、デルフィニジン系アントシアニンとともに発現させることで、茶色花を作出できるものと思われる。
[質問 2]	Embryogenic callus の誘導条件(2,4-D と BA 添加)が、品種「明治7」のみに有効であった理由は？ また、このことと「明治7」の育種的背景は関係あるのか？
[回答 2]	ハナショウブの品種は種内交雑で育成されているため、品種間に embryogenic callus の誘導に関する遺伝的な差異が生じているためと思われる。
[質問 3]	Embryogenic callus を定義するためには、カルスの形状だけでなく、体細胞胚を経由して再生することの証明が必要と思われるが、本研究ではどのように定義しているのか？
[回答 3]	<i>Iris</i> 属植物の体細胞胚や接合胚は白色であり、黄色の embryogenic callus との識別が容易にでき、また体細胞胚からの植物体再生の経過は、接合胚からの植物体形成経過と良く似ている。この形質をもとに embryogenic callus と判断したが、組織学的な証明も必要と思われる。
[質問 4]	Embryogenic callus でも体細胞多倍数性が観察されているが、カルスの起源は栄養組織ではなく、未熟胚と考えて良いのか？
[回答 4]	未熟胚を摘出する際、周辺の胚乳組織とは容易に分離することができるので、カルスの起源は未熟胚と言える。
[質問 5]	プロトプラスト培養で、グルコース濃度が高いほど分裂は促進されるが、コロニー形成は抑制された。これは単に浸透圧が原因なのか？ 分裂後、一定期間で、培養液を低濃度グルコースに置き換えれば、より効率的にコロニー形成ができるのではないか？
[回答 5]	指摘されたように、浸透圧が原因していると思われるが、一定期間後のグルコース濃度を低濃度へ変えることで、より効率的なコロニー形成が得られる可能性はある。

- [質問 6] 何故、*Iris* 属ではプロトプラスト由来植物の倍数性が二倍体ではなく、倍数体が多く出現したのか？ また、プロトプラスト由来植物では体細胞多倍数性は観察されなかったのか？
- [回答 6] *Iris* 属植物のみならず、プロトプラスト培養由来再生個体に倍数体が多く出現したという報告は、アルファルファやメロンであり、両種はともに体細胞多倍数性植物であるため、体細胞多倍数性が倍数体出現に関与していると思われる。また、予備実験の段階ではあるが、プロトプラスト培養由来再生個体においても体細胞多倍数性が観察されているので、今後、詳細な調査を行う予定である。
- [質問 7] プロトプラスト由来植物体の中で、四倍体個体が多くなった原因として、二倍体よりも四倍体の細胞の方がプロトプラスト培養に適していたとの考察であったが、プロトプラスト培養自体を経由したことで染色体倍加が起きたとは考えられないか？
- [回答 7] 指摘されたように、細胞壁の無いプロトプラストは培養中に 2,4-D 等の影響を受けやすく、染色体倍加が起きやすい可能性があると思われる。
- [質問 8] チャシヨウブの倍数体のアントシアニンは分析しているが、カロチノイド系色素の分析は？ また、ハナシヨウブの倍数体も作出しているが、アントシアニンを分析していない理由は？
- [回答 8] 今後、チャシヨウブの倍数体におけるカロチノイド系色素の分析を行う予定である。また、ハナシヨウブの倍数体は開花に至っていないので、分析することができなかった。
- [質問 9] 体細胞多倍数性のメカニズムを考える際、サイクリン依存キナーゼ(CDK) 活性の低下やオーキシンとの関わりの観点から考察されているが、わかりやすく説明せよ。
- [回答 9] 細胞周期を司るタンパク質の一つサイクリンは CDK と複合体を形成することで、有糸分裂における分裂中期から後期への移行を促進する。CDK が抑制されることで有糸分裂が停止し、その結果、細胞核の倍加が生じる。また、オーキシンによる細胞倍加は培養細胞で報告されているが、その詳細なメカニズムや CDK との関係は解明されていないのが現状である。
- [質問10] ハナシヨウブのプロトプラストへの iodoacetamide (IOA) 処理が不十分であった理由は？ また、その改良方法はあるのか？

[回答 10] IOA 処理したハナショウブのプロトプラストを単独で培養した試験区では、コロニーの形成が認められなかった。そのため、本実験で IOA 処理が不十分になった原因は、細胞融合時における電気刺激で細胞が活性化したため、IOA 処理が不十分になったものと思われる。従って、IOA 処理の濃度および時間の更なる検討が必要である。

[質問 11] 本研究の体細胞雑種でアピールする点は何か？ また、体細胞雑種の葉緑体ゲノムはチャショウブ由来で、ミトコンドリアゲノムがハナショウブ由来になったことは、細胞融合ではよくある事例なのか？さらに、このようになった理由は？

[回答 11] 本研究で得られた体細胞雑種は、ハナショウブとチャショウブの両種間において得られた最初の種間雑種であり、ハナショウブの茶色花色育種への利用が期待される。また、体細胞雑種ではハナショウブ由来染色体の 1 本の両端にチャショウブ由来染色体からの転座が認められ、さらに体細胞雑種はオルガネラゲノムの由来が異なる非常に稀な事例である。ミトコンドリアゲノムがハナショウブ由来になった理由として、まず IOA 処理が不十分であった点が挙げられる。本研究のように、体細胞雑種におけるオルガネラゲノムの由来が異なるといった事例は、近縁種間での体細胞雑種では見られるとの報告があるので、本研究で得られた体細胞雑種もハナショウブとチャショウブが近縁であったことも関連しているものと思われる。

[質問 12] 胚培養や細胞融合を通して幾つかの種間雑種が育成されている。今後、この雑種の直接的な利用を含めて、どのような育種的展開が期待されるのか？

[回答 12] 本研究で得られた種間雑種については、開花次第、外花被含有アントシアニンの分析や花粉ならびに種子稔性等を調査する必要がある。その結果、雑種の園芸的価値が特に優れていれば、そのまま雑種品種としての利用が期待される。また、園芸品種として育成できなくても、雑種をハナショウブまたはカキツバタとの戻交雑育種における母本として利用する予定である。