

	ちょう しゅんぶん
<b>氏 名</b>	<b>張 春 芬</b>
本籍（国籍）	中国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第591号
学位授与年月日	平成25年3月31日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
<b>学位論文題目</b>	リンゴの葯培養による半数体獲得に関する研究 (Induction of haploid plantlets by anther culture in apple ( <i>Malus x domestica</i> Borkh.))
学位審査委員	主査 教授 壽松木 章 副査 准教授 小森 貞男 副査 教授 荒川 修 副査 教授 平 智

### 論文の内容の要旨

約中の花粉から植物体を作成する技術で、得られた植物体は染色体数が半数であることから半数体植物となる。この半数体植物を倍加処理すると純系三倍体植物が得られ、遺伝解析の有効な材料になる。特に、遺伝的雑種性が強い果樹等の木本植物での遺伝解析には有効な手段であるが、技術的に多くの問題があり、成功例は極めて少ない。そこで、リンゴの約培養によるH王様体作出に影響を及ぼす諸要因の検討、~15様体からシュート再生条件、再生した個体の倍数性、ゲノム構成について研究を行った。

第一章伍様体作出に関与する培養諸条件の検討 葯培養用の試料は中心花紅管期の花叢を4月下旬~5月上旬に回場樹から採取し、4つの実験を行った。実験に共通する目玉様体誘導の基本条件は、基本培地の組成がN6にNAA0.5 μM、BAP10 μM、シヨ糖5%、活性炭0.3%、BactoAgar0.75%、低温処理日数が25日である。

目玉様体形成率の品種間差違(実験1.1)について、2009~2011年に‘祝’、‘王林¥‘紅玉’、eさんさ¥‘千秋’、‘つがる’、‘ふじ’、‘8tarkingDelicious’(‘8 D’、)‘Wijeiピの9品種を用いて検討した。その結果、e祝’の目玉様体形成率が他の8品種より有意に高かった。3年間で目玉様体形成率は大きく変動したが、品種による形成率の優劣は基本的に同様であった。次に、約培養に最適な花粉ステージを明らかにするために‘千秋’の各花蕾ステージの約を用いて花粉ステージを確認しながら葯培養を行った(実験1.2)。その結果、25日間の低温処理後に一核後期から二核前期までの花粉ステージに達している葯に高い目玉様体形成能力があることが推定された。また、低温処理中に花粉のステージは0~2段階進むことから、採取時に一核中期と後期ステージの花粉を多く含む花蕾を収集することが重要と判明した。

高い阪様体形成率を確保し、コンタミネーションを少なく維持できる低温処理日数は20日から36日の間と推定された(実験1.3)0~15様体形成とカノレス形成の関係では、カノレス形成率は低温処理開始後15日頃まで上昇し、15~20日目から減少した。一方、脹様体形成

率はカノレス形成率が低下し始める時期の20日以降から向上し始めることが明らかとなった。このことからカルスと目玉様体は同程度の分裂能を有する細胞に起源することが推定され、低温処理日数が増加すると応様体に再分化することが考えられる。

培地組成が脹様体形成に及ぼす影響(実験1.4)について6品種の中心花紅菅期の約を用いて、NAA ( $0 \sim 1.0 \mu\text{M}$ ) とBAP ( $10, 15 \mu\text{M}$ ) の組み合わせについて検討した。その結果、すべての品種で最も安定してs15様体およびカルスを形成する培地は、NAA  $0.5 \mu\text{M}$ -BAP  $10 \mu\text{M}$ 区であった。スクロース5%の培地で腔様体形成率、カルス形成率ともに最も高く、0.75%Bact agarを凝固剤に用いた培地で目玉様体形成率が最も高くなった。以上の実験結果から、リンゴにおける蔚培養の最適培養プロトコルを作成できた。

第二章H胚様体からのシュート誘導条件の検討約培養で作成した目玉様体からシュートを再生するためには、目玉様体を植物成長調節物質無添加の休眠培地で低温処理することが必要であるが、その後のシュート誘導には、s'E様体の発根の有無や培地の組成等の条件設定が重要になる。そこで、低温処理後、発根した脹様体と発根しない目玉様体を分けて、それぞれ別々に、シュート誘導培地に置床し、以下の実験を行った。

まず、休眠培地のスクロース(Suc)濃度が腔様体の発根に及ぼす影響についてSuc1.50% (0.04M) +マノレトース2.50% (0.07M) 区、Suc4.13% (0.11M) 区、Suc3.00% (0.08M) 区、Suc2.25% (0.06M) 区及びSuc1.50% (0.04M) 区の5区の培地で脹様体の発根率を調査した結果、最も低いSuc濃度(1.50%)がR'E様体の発根に有効であることが判明した(実験2.1)。次に、低温処理後にs'E様体からシュート誘導条件として、MS培地の濃度(MS、1/2MS)、BAP (1mg/L)、GA ( $5 \mu\text{M}$ ) の添却の有無、スクロース濃度(15mg/L、30mg/L) を組み合わせた処理区で検討し、発根応様体からのシュート再生にはホルモンフリー1/2MSの培地、非発根路様体からシュートの再生には1I2MS+ BAP 1mg/Lスクロース15g/Lの培地が適することL発根怪様体は非発根R'E様体より明らかにシュート再生率が高いこと、目玉様体からのシュートの再生には品種間差が認められることが認められた(実験2.2)。さらにシュート誘導後の増殖と馴化については3年間で'千秋'と'SD'は各143シュートを獲得した(実験2.3)。そのうち'千秋'は56個体がinvitroで増殖でき、25個体は馴化後順調に生育した。'SD'では18個体は増殖でき、1個体が馴化できた。'祝¥ 'つがる'とgさんさ'の個体は増殖できず、すべての個体が枯死した。このことからシュート再生後の馴化過程でも個体の遺伝子組成が影響する事が推定された。

第三章蔚培養由来個体の倍数性・ゲノム構成の分析作出した個体の倍数性およびゲノム構成を確認するため、SSRマーカーによるゲノム構成の分析(実験3.1)とフローサイトメトリーによる倍数性の調査(実験3.2)を行った。まず、SSRマーカーで同質性の確認を行った結果。調査した'千秋'由来の60個体と'SD'由来の42個体全てが親の2本のバンドのうち、一方だけを持っていたことから、調査した個体は全て、花粉由来の個体であることが判明した。次に、フローサイトメトリーを用いた調査の結果、'千秋'では、供試17個体中12個体が二倍体、1個体が四倍体、2個体が半数と二倍体のキメラ、2個体が二培地と四倍体のキメラであった。'SD'では供試14個体中12個体が二倍体、2個体が二培地と四倍体のキメラであった。'千秋'と'SD'ともに半数体個体が確認されなかった。以上の結果から、リンゴの蔚培養では培養中に植物体が自然倍加することが判明した。

以上の研究成果により、リンゴの約培養を効率的に行うプロトコルが確立し、果樹育種研

究に大きく貢献する知見が得られた。

### 論文審査の結果の要旨

Difructose anhydride (DFA) IIIはイヌリンを原料に酵素合成によって製造されるフラクトースが2分子結合したオリゴ糖である。DFA IIIは高等動物の消化酵素で分解されず、主要な腸内微生物によっても資化されない難消化性オリゴ糖である。これまでラットやヒトなど単胃動物を対象とした研究で、DFA IIIが腸管の上皮細胞間の密着結合 (tight junction) に作用し、細胞間通路 (paracellular pathway) を介したミネラル、特にカルシウム(Ca)の吸収を亢進する作用を有することが見出されている。

本研究は、DFA IIIを反芻胃を持つ乳牛に給与し、その効果を検討した初めての取り組みであり、まず分娩時低Ca血症に対する改善効果を明らかにした。さらに、搾乳牛の産乳、乳房炎、蹄疾患および繁殖に対する効果や新生子牛の免疫グロブリン(IgG)吸収に対する効果についても検討し、それぞれにおいて有益な効果を確認した。

DFA IIIの効果を反芻動物である乳牛で検討するに当たり、はじめに第一胃微生物によるDFA IIIの分解性と、消化管内におけるDFA IIIの動態を調査した。その結果、DFA IIIは第一胃微生物に分解されにくく、牛の十二指腸に到達することを示した。牛の消化管内での動態は液相の移動パターンに近似し、摂取後1時間で十二指腸に出現し、十二指腸内容液中のDFA III濃度ピークは1~3時間の間にあると考えられた。9時間後でも第一胃から十二指腸へDFA IIIは流入しており、糞中には9および12時間後で認められたことから、DFA IIIは腸管に12時間以上滞留するものと考えられた。これまでラットの腸管を用いたin vitro試験で、DFA IIIのミネラル吸収亢進効果が報告されていることから、ラットと同様、ウシにおいてもDFA IIIは小腸におけるミネラル吸収を亢進するものと考えられた。

DFA IIIを乾乳後期の乳牛に給与した結果、分娩時の血中Ca濃度低下が抑制され、その後の回復も早かった。また、酸化マグネシウム(Mg)をDFA IIIと一緒に給与することで血中Mg濃度は増加し、DFA IIIは低Ca血症だけでなく、低Mg血症にも有効であると考えられた。酪農家の乾乳牛にDFA IIIを給与した結果、低Ca血症が大きく影響する乳熱とダウン症候群や、低Ca血症が影響する可能性の高い胎盤停滞、第四胃変位、ケトーシス、脂肪肝の発生はDFA IIIを給与しなかった年よりも給与した年で減少し、乾乳期のDFA III給与は周産期疾病対策としても有効であることが示された。

DFA IIIの新たな効果について検討するため、搾乳牛と新生子牛を用いた試験を実施した。搾乳牛にDFA IIIを給与した結果、DFA IIIの給与により乳に移行するCaとMg量が増加し、乳量が増加する可能性が示された。また、DFA IIIを給与された搾乳牛では乳房炎に罹患した分房数、乳房炎の治療回数、乳廃棄日数が減少し、蹄質が影響する蹄疾患にもかかりにくく、健康改善に対してDFA IIIは有効であると考えられた。繁殖成績に顕著な差異は認められなかったが、DFA III給与牛は全20頭受胎したのに対し、DFA IIIを給与しなかった牛では11頭中2頭が未受胎のため廃用になった。新生子牛では初乳に含まれるIgGの吸収に対する効果を検討した。一般に新生子牛では、IgGは上皮細胞に取り込まれて吸収される(トランスサイトosis)といわれている。本研究ではDFA IIIがIgGの吸収亢進効果を有することを確認するとともに、

新生子牛の免疫抗体吸収は上皮細胞の間隙でも行われている可能性を初めて示した。

審査員 4 名は、本論文の成果は学位授与に相応しい内容であると判断した。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

##### 1. 主論文

- 1) **Sato, T.**, M. Hanada, M. Ohtani, T. Nakai, M. Teramura, H. Sadoya, T. Takahashi, A. Hongo, Effect of Diffructose Anhydride III on Serum Immunoglobulin G Concentration in Newborn Calves, *Journal of Dairy Science (in press)*
- 2) **佐藤忠**, 中井朋一, 佐渡谷裕朗, 大谷昌之, 花田正明, 岡本明治 (2007) 乳牛の分娩時低カルシウム血症に及ぼす Diffructose Anhydride III の効果, *日本畜産学会報*, 78:37-43.
- 3) **佐藤忠**, 大谷昌之, 中井朋一, 佐渡谷裕朗, 花田正明, 岡本明治 (2007) 乳牛の分娩前後へのカルシウムと Diffructose Anhydride (DFA III) 給与が血中カルシウム濃度と周産期疾病の発生に与える影響, *日本家畜臨床学会誌*, 30:31-38.
- 4) **佐藤忠**, 菊地裕人, 中井朋一, 佐渡谷裕朗, 花田正明, 岡本明治 (2006) 第一胃微生物による Diffructose Anhydride III の分解性, *日本畜産学会報*, 77:395-399.

##### 2. 参考論文

- 1) Takagi M., H. Hasunuma, D. Matsumoto, T. Obi, K. Takase, M. Ohtani, **T. Sato**, U. Watanabe, K. Okamoto, T. Tanaka, C. Tshering, E. Deguchi (2011) Effects of Daily Oral Administration of Diffructose Anhydride III on Health Status, Blood Parameters and Faecal Shedding of Coliform Bacteria of Japanese Black Calves during the Pre-weaning Period, *Animal Nutrition and Feed Technology*, 11:147-158.
- 2) Matsumoto D., M. Takagi, H. Hasunuma, Y. Fushimi, M. Ohtani, **T. Sato**, K. Okamoto, F. Shahada, T. Tanaka, E. Deguchi (2009) Effects of Oral Administration of Diffructose Anhydride III on Selected Health and Blood Parameters of Group-housed Japanese Black Calves during the Prewaning Period, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22:1640-1647.
- 3) 中井朋一, 菊地裕人, **佐藤忠**, 佐渡谷裕朗, 大谷昌之, 村田暁, 花田正明, 岡本明治 (2007) 去勢牛に給与した Diffructose Anhydride III の十二指腸内容物中における検出, *日本畜産学会報*, 78:57-61.
- 4) **佐藤忠**, 佐渡谷裕朗, 田中勝三郎, 岡本明治 (1993) 羊による国産ビートパルプと輸入ビートパルプの栄養価と糞性状の比較, *日本畜産学会報*, 64:1208-1213.