

放射線によるニホンナシの自家和合性突然変異体の獲得 —すべての品種を結実させられる花粉側自家和合性品種 育成を目指して—



間瀬 誠子

Mase Nobuko

(国研)農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センター 放射線育種場)

1 はじめに：自家和合性突然変異体の必要性

バラ科果樹には、ナシ・リンゴ・サクランボ等、正常な花粉と花柱（雌しべ）を持っていても自分の花粉による受粉（自家受粉）では受精・結実せず、他品種の花粉による受粉（他花受粉）時のみ結実する自家不和合性を示す種が多い。自家不和合性の果樹を安定生産するためには、相互に受精可能な2品種以上を栽培する必要があり、受粉用の蜂を飼育して虫媒受粉を促進するか、人工受粉を行うことが推奨されている。しかし、これらの対策には多大な労力がかかるため、経営規模拡大の妨げや生産コスト増加の一因となっている。この問題を、自分の花粉で結実できる自家和合性品種の開発・普及により解決することを目的に、バラ科果樹の自家不和合性システムについての研究が進められている。研究には希少な自家和合性の自然突然変異品種及び人為的に獲得された突然変異体が用いられ、関連遺伝子群の同定に貢献すると共に、自家和合性品種の開発のための交配親として活用されてきた。本稿では、農研機構が新たなニホンナシの自家和合性突然変異体として発表した、 γ 線照射による花粉側自家和合性突然変異系統の原因遺伝子及び育種素材としての利用可能性について紹介する。

2 ニホンナシの自家不和合性機構と既存の花柱側自家和合性突然変異品種

ニホンナシの自家不和合性認識機構は、 S 遺伝子座上に座乗する花柱側因子 S -RNase と花粉側因子 F -box タンパク質遺伝子の種類により制御されている。一般的なニホンナシは2倍体であるため、 S 遺伝子型は対立遺伝子 ($S_1 \cdot S_2$ 等) 2個で表され（‘二十世紀’は $S_2 S_4$ 、‘幸水’は $S_4 S_5$ ）、花粉はその半分である1個の S 対立遺伝子を持っている（例：‘二十世紀’の花柱は S_2 遺伝子と S_4 遺伝子両方を持ち、花粉は S_2 遺伝子・ S_4 遺伝子のどちらか1個を持つ）。花粉が花柱には存在しない（非自己） S 対立遺伝子を持っている時のみ、花粉 F -box タンパク質が花柱 S -RNase を分解することができるため、花粉管が伸長して受精に至る。しかし‘二十世紀’の自家受粉では、 S_4 花粉は、 S_2 遺伝子と S_4 遺伝子両方を持つ花柱の S_4 -RNase による花粉管伸長阻害を受け、不和合性となると考えられている¹⁾。

これまでに発見された唯一のニホンナシの自家和合性突然変異品種‘おさ二十世紀’は、 S_4 遺伝子領域の一部約 236 kb が欠失しており、元品種‘二十世紀’が持っていた S_4 -RNase 遺伝子を喪失したため、花柱が自己 (S_4) 花粉も受精できる性質を獲得したことが明らかになっている²⁾。このような突然変異を『花柱側自家和合性』という。‘おさ二十世紀’は人工受粉を行わなくても果実を安定生産できると

して普及したほか、育種素材としても利用され、花柱側自家和合性形質を受け継いだ品種が発表されている。

3 サクランボの自家不和合性機構とX線による自家和合性突然変異体獲得成功事例

果樹における人為的な自家和合性突然変異体の獲得の試みは1940年代にイギリスのJohn Innes研究所のLewisらによって始められ、蕾を付けたサクランボの枝にX線を照射し、開花後に採取した花粉を同一S遺伝子型品種の花柱へ交雑する試験が行われた。同一S遺伝子型品種間の交雑では、通常は不和合性反応のため受精には至らず種子は形成されないが、花粉に自家和合性突然変異が生じた場合のみ受精し種子を形成すると考えられ、得られた後代は自家和合性を示す可能性が高いと期待された。照射条件の検討の結果、線量率110R*/分(約57Gy/h)、総線量800R(約7Gy)で、花粉形成段階、特に第一減数分裂中期の蕾に照射を行った時に、体細胞分裂期や成熟花粉に照射した時よりも高い結実率を示し、自家和合性突然変異率が高いと考察された^{3,4)}。獲得された変異体の多くは、花粉が自家受精能力を獲得した『花粉側自家和合性』を示すことが明らかになり、育種素材として利用されて、世界初の自家和合性サクランボ品種‘Stella’(ステラ)の育成に貢献した⁵⁾。‘Stella’は後年の遺伝子解析の結果、S_r対立遺伝子伝子の花粉F-box遺伝子配列中に4塩基の欠失が同定され⁶⁾、花粉F-boxタンパク質が同一S対立遺伝子(自己)のS_r-RNaseを活性化する機能が喪失したために自家和合性になったと考察されている⁷⁾。

*R:レントゲン(1Rは約8.7mGyに相当)

4 新規自家和合性突然変異体の育成経過と特性

新たなニホンナシの自家和合性突然変異体の獲得を目的に、農業生物資源研究所放射線育種場(現農研機構次世代作物開発研究センター放射線育種場)のガンマーフィールドに1962年より植栽されていたニホンナシ樹を用い、その花粉を無照射の同一品種又は同一S遺伝子型品種の花柱への交雑する手法が試みられた。⁶⁰Co線源から77mの距離(線

表1 415-1の花柱側・花粉側自家和合性

花柱側品種 (S遺伝子型)	花粉側品種 (S遺伝子型)	結実率 (%)	和合性の判定
415-1 (S _r S _s S _s)	× 415-1 (S _r S _s S _s)	74.4	自家和合性
415-1 (S _r S _s S _s)	× 王秋 (S _r S _s)	0	花柱側 自家不和合性
王秋 (S _r S _s)	× 415-1 (S _r S _s S _s)	76.2	花粉側 自家和合性



図1 花粉側自家和合性突然変異体415-1の花と果実

量率約 3×10^{-3} Gy/h)に位置する‘幸水’から1993年に採取した花粉を、1994年に果樹試験場(現農研機構果樹茶業研究部門)の‘幸水’の花450個の花柱に交雑した試験で、結実した2個の果実から種子2粒が得られた。翌1995年、実生1系統(系統名415-1)のみが生育し、2000年より自家受粉試験を開始したところ、自家和合性であることが明らかになった。S-RNaseマーカー解析によりS_r-RNase及びS_s-RNase遺伝子が検出されたことから、S遺伝子型は当初S_rS_sと推定された。同一S遺伝子型の自家不和合性品種‘秀玉’との相互交配試験を行ったところ、415-1は花粉に自家和合性機能を獲得した花粉側自家和合性変異体であることが明らかになった(表1)⁸⁾。415-1は‘幸水’が花粉側自家和合性に変異したものではなく、‘幸水’の自殖によって生じた系統で、樹勢は弱く、花は小さい。開花は‘幸水’より1週間から10日遅く、花粉はやや少ない。果実は‘幸水’より小さく、果皮色が黄緑色の青ナシである(図1)。

5 415-1系統の花粉側自家和合性変異の原因

415-1の花粉側自家和合性の原因を解明するため、415-1(S_rS_s)とはS遺伝子型が全く異なる品種‘新高’(S_sS_s)に交雑し、得られた実生103個体のS遺伝子型を解析した。その結果、3種類のS対立遺伝子

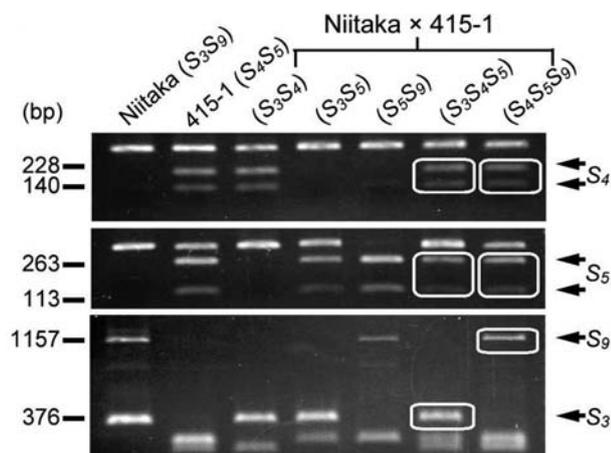


図2 415-1の交雑実生におけるS遺伝子型の分離
S対立遺伝子を2種類持つ系統と3種類(白枠)持つ系統(右側2個体)が生じた

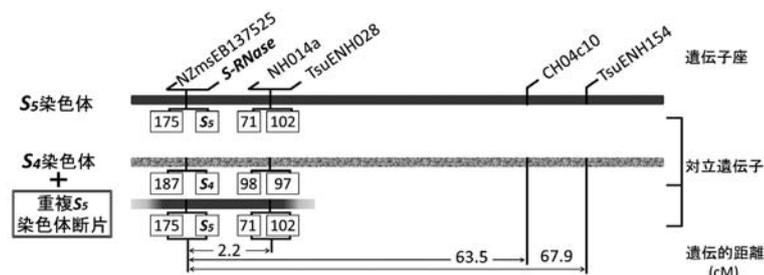


図3 415-1 後代の遺伝子型から推定した415-1のS遺伝子を含む染色体
重複S5染色体断片がS4染色体に付加されている

($S_3S_4S_5$, $S_4S_5S_9$) を持つ実生が約 13% 存在することが明らかになった(図2)。しかし、フローサイトメータを用いた細胞1個当たりのDNA量調査の結果、415-1は3倍体ではなく2倍体であることが判明した。そこで、S遺伝子座のみの重複(増加)を疑い、S遺伝子以外のDNAマーカーも用いて遺伝解析を行ったところ、3種類のS対立遺伝子を持つ415-1後代個体からは、S遺伝子座に近いSSRマーカー遺伝子座の重複も検出され、 S_5 複染色体側の一部の領域が S_4 対立遺伝子を含む染色体と共に遺伝していた。すなわち、重複 S_5 遺伝子を含む領域は S_4 対立遺伝子を含む染色体のいずれかの場所に付加されている可能性が示唆された(図3)。結論として、415-1のDNA量は一般の2倍体品種とほとんど同じだが、S対立遺伝子は3個に増加しているということになり、正確なS遺伝子型は $S_4S_5S_5$ であることが明らかになった⁹⁾。花粉側S遺伝子を喪失した自家和合性突然変異体とは異なり、S対立遺伝子の重複により花粉F-boxタンパク質の種類が増加し花粉側自家和合性となったと考えられる突然変異体は、

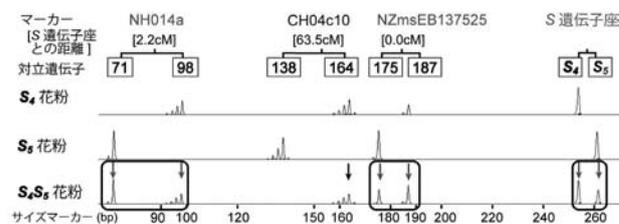


図4 単一花粉PCRによるS遺伝子およびSSRマーカー対立遺伝子の検出
 S_4S_5 花粉では、重複している遺伝子座のマーカーについて2個の対立遺伝子が検出された(黒枠)

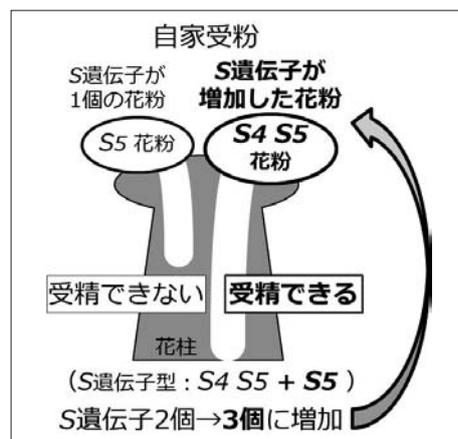


図5 415-1の花粉側自家和合性の仕組み

これまでになす科のタバコとペチュニアで見つけていたが、実を収穫する自家不和合性作物では初めての獲得例である。

続いて、415-1の花粉を1粒ずつ単離してS遺伝子型の解析を行ったところ、S対立遺伝子を2個(S_4 と S_5)持つ花粉を16%、1個(S_4 又は S_5)持つ花粉を84%作っていることが明らかになった(図4)¹⁰⁾。415-1の自家受粉時には、後者の花粉は不和合性のままだが、前者の花粉は2種類(S_4 と S_5)の花粉F-boxタンパク質が花柱の S_4 -RNaseと S_5 -RNase両方を分解することが可能になり、他家花粉と同様に受精できると考えられる(図5)。

6 おわりに：今後の予定と期待

415-1は樹の生育が遅い、果実が小さいなど、複数の欠点を持っているため、新品種としての登録は予定されていない。また、開花時期が主要なニホンシ品種より遅く、花粉量も少ないため、自家不和合性の栽培品種へ和合性の花粉を供給する受粉樹と

して直接利用することも難しい。しかし、415-1を交配親として使うことで、人工受粉をしなくても果実を着ける花粉側自家和合性品種や、すべてのナシを結実させる和合性花粉を大量に作る受粉用花粉生産専用品種の育成が可能となった（図6）。415-1の諸形質を改良し、実用的な品種が育成されるまでには、今後数世代の選抜を経る必要があると考えられるが、省力的なニホンナシ栽培体系構築のための選択肢として提供できるよう、本系統の利用を進めていきたい。

また、本試験では、 γ 線照射した花粉を不和合性の花柱に交雑することで、無数の不和合性花粉の中に存在していた極わずかな自家和合性突然変異花粉を選抜し、和合性実生として獲得することに成功している。果樹の突然変異育種では、通常、変異処理した枝から千本以上の苗木を育成し、それらの特性を調査して体細胞突然変異体（枝変り）を選抜するという、莫大な労力を要する方法が用いられてきた。しかし、自家和合性形質に関しては、本研究と同様の手法を用いることで、リンゴなど他の自家不和合性果樹でも、従来より小規模な試験で突然変異体が得られる可能性がある。バラ科果樹の自家不和合性機構はまだ完全には解明されていないことから、多くの変異体を獲得することによって、自家和合性・不和合性反応にはどのような遺伝子群が関与しているのかが明らかになることを期待したい。

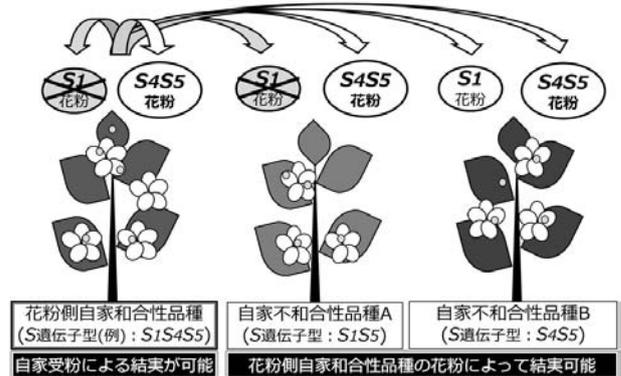


図6 花粉側自家和合性品種利用のイメージ

【謝辞】

本研究の一部は、原子力委員会の評価に基づき、文部科学省原子力試験研究費により実施されたものである。

参考文献

- 1) Sassa, *Breed Sci.*, **1**, 116–121 (2016)
- 2) Okada, *et al.*, *Plant Mol Biol.*, **66**, 389–400 (2008)
- 3) Lewis, *Heredity*, **3**, 339–355 (1949)
- 4) Lewis, *et al.*, *Heredity*, **8**, 357–363 (1954)
- 5) Lapins, *Can J Plant Sci.*, **51**, 252–253 (1971)
- 6) Ushijima, *et al.*, *Plant J.*, **39**, 573–586 (2004)
- 7) Tao, *et al.*, *Sci Hortic.*, **124**, 423–433 (2010)
- 8) 澤村, 他, 2013年の果樹研究所研究成果情報 (2014)
- 9) 間瀬, 他, 2015年農林水産研究成果10大トピックス (2015)
- 10) 間瀬, 他, 2014年の果樹研究所研究成果情報 (2015)