

令和元年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07584

研究課題名(和文) 同一ゲノムを重複させたハスカップの同質遺伝子倍数体作出による倍数性育種基盤の構築

研究課題名(英文) Development of polyploidy breeding by producing isogenic polyploids having duplicated same genome in Haskap

研究代表者

星野 洋一郎 (HOSHINO, Yoichiro)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：50301875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ハスカップはスイカズラ科の小果樹で、ブルーベリーに似た果実をつける。北海道にはハスカップの野生遺伝資源が広く分布し、二倍体(染色体数18本)と四倍体(染色体数36本)が分布している。二倍体は、北海道東部に局在していることを報告してきた。ハスカップの栽培には四倍体が用いられている。四倍体をもとに、果実の大型化を目的に高次倍数体の作出を行なったが、果実サイズと倍数体に顕著な関係性を見出すことができなかった。育成した高次倍数体はそれぞれ遺伝子型が異なることがその要因であると考え、本研究では、同一ゲノムを重複させた同質遺伝子倍数体の育成方法を開発し、ハスカップの倍数性育種の新たな基盤構築を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハスカップの効果的な育種手法として、倍数性育種に着目した。倍数性育種がハスカップの形質に及ぼす影響に関する知見を蓄積するために、同一のゲノムを重複させたハスカップの倍数体作出手法を考案した。現在、ハスカップの栽培に用いられているのは4倍体である。本研究では、ハスカップの野生遺伝資源の2倍体の育種素材の可能性にも焦点を当て、倍数体作出の材料に用いることで、今後の倍数性育種の基盤構築に資する新たな知見を提示した。

研究成果の概要(英文)：Haskap is belonged to Caprifoliaceae. This plant has edible blueberry-like fruits. In Hokkaido, the wild genetic resources of Haskap are widely distributed, and diploid ($2n = 18$) and tetraploid ($2n = 4x = 36$) are found. Diploids have been reported to be localized in eastern Hokkaido. Tetraploids are used for commercial production of Haskap fruits. Polyploid plants of Haskap had been produced for bigger fruits, but no significant relationship was found between fruit size and ploidy levels. Hence, We tried to develop a method for producing isogenic polyploids having duplicated same genome to construct polyploidy breeding in Haskap.

研究分野：園芸学

キーワード：ハスカップ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ハスカップ(和名:クロミノウゲイスカグラ)は日本では主に北海道に自生し、近年では、北海道特産の小果樹として営利生産が行われ、千歳、厚真、美唄等で産地形成がなされている。しかし、ハスカップの生産量のピークは平成4年の172トンで、その後、平成23年には80トンまで低下している。その要因として、急な出荷量の増加による価格下落と優良品種の開発の遅れが指摘されている。果実は一粒1g程度と小さく、果皮が破れやすいため貯蔵性が悪いことも営利栽培上の問題となっている。近年、ハスカップは、ポリフェノール等を多く含むことからその機能が着目されている。また、北海道特産としての魅力から多くの加工品が開発され、需要が高まっている現状にある。このような現況において、ハスカップの優良品種(大粒で果皮が固いもの)の開発が切望されている。

これまでの申請者らの研究で、北海道に自生するハスカップは染色体数が異なる二つのグループ[2倍体(染色体数18)と4倍体(染色体数36)]があることを明らかにしてきた(Miyashita et al. 2011)。この二つのグループは厳密に棲み分けされており、2倍体は釧路湿原と別寒辺牛湿原にのみ分布している(過去には霧多布湿原にも分布)。これらの2倍体と4倍体から倍数体間交雑により5倍体、6倍体、8倍体の育成を行った(Miyashita and Hoshino, 2015)。一般的に、倍数性が上がると組織や器官の巨大化等が起こり、これらを積極的に利用した倍数性育種により、リンゴやブドウなどで優良品種が育成されている。ハスカップにおいても、倍数性が上がることによって果実の巨大化や果皮の硬化が期待されたが、これまでの研究結果では果実の巨大化や硬さに顕著な差は見られなかった。

なぜ、倍数化はハスカップ果実の大きさや硬さに影響を及ぼさなかったのでしょうか？

倍数化による組織・器官の肥大は、ゲノム量の増加に伴う遺伝子発現量の増加、さらにはそれに起因するタンパク質量と代謝産物の増大によると考えられている(del Pozo and Ramirez-Parra 2015)。また、外来遺伝子の導入実験から細胞内の遺伝子発現量に閾値があり、恒常的に発現するプロモーターで発現させても転写後に制御を受ける事例が知られている(Rajeevkumar et al. 2015)。これらを勘案すると、これまで育成したハスカップの倍数体ではゲノム量の増大がタンパク質量の増加に繋がっていない可能性がある。また、ハスカップは自家不和合性であり、各個体のヘテロ接合性が高く、遺伝的不均一性のために各個体の表現型のばらつきは大きい。コルヒチン処理によって育成した倍数体は種子を用いていることから、採種した親と単純に比較することができないという問題が考えられる。

倍数体間交雑により得た個体と両親も遺伝子型が異なるため、倍数性の影響よりも遺伝子型の差が大きく表現型に影響していることが考えられる。このように、ヘテロ接合性の高い本種の場合、比較対照の倍数体はそれぞれ異なる遺伝子型を持つことから、純粋な倍数性の影響を正しく評価できていない可能性がある。

倍数性育種は多くの果樹で応用されており、果実の巨大化が期待できる魅力的な育種手法である。ハスカップにこの倍数性育種を適用するためには、倍数化の影響(効果)を正確に系統毎に評価し、その効果が高い系統を選抜することが必要であると考えられる。そこで、本研究では、ゲノム重複による遺伝的なバックグラウンドを同一にした倍数体(便宜的に“同質遺伝子倍数体

(isogenic polyploid)”と呼ぶ)を育成し、ゲノムの倍数化が表現型にどのように影響を及ぼすかを解析する。倍数化が表現型に及ぼす影響を推測するために、メタボローム解析を用いて、倍数化が強く現れるメカニズムについて考察を行う予定である。

2. 研究の目的

これまでの研究でハスカップの果実の大型化等を目的に倍数性シリーズ(2倍体、3倍体、4倍体、5倍体、6倍体、8倍体)を作出してきた。しかし、倍数性の増加に伴う顕著な形質の変化は見られなかった。これらの倍数性シリーズは、倍数体間交雑によって作出しており、得られた倍数体は異なる遺伝子型を保持する。このため、倍数体間の遺伝的なばらつきが大きく、倍数性の影響を正しく評価できていない可能性が考えられた。そこで本研究では、2倍体を起点に遺伝的背景を同一にした倍数体系統を複数作出し、ゲノムの倍数化が表現型に及ぼす影響を解析する研究を立案した。育種的に有用な系統を選抜するとともに、メタボローム解析を利用して倍数体間の代謝産物の解析から倍加の影響を受けやすい系統を選ぶ手法について追究する。

3. 研究の方法

本研究では2倍体のハスカップの種子から実生を得て、本葉展開後に一部分の腋芽のみにコルヒチンを処理することにより、一部のシュートで倍加を誘起させる実験を考案する。倍数体作出の起点を2倍体に求め、2倍体の野生遺伝資源がある北海道東部の2倍体の分布調査を行う。採取許可後、2倍体ハスカップの種子を採取し、コルヒチン処理の材料とした。

コルヒチン処理後、フローサイトメーターによって真性の(キメラではない)4倍性であることを確認後、そのシュートを切り離して挿し木を行って全く同一の遺伝的背景を持つ2倍体と4倍体(同質遺伝子倍数体)の育成条件の検討を行なった。

4. 研究成果

北海道の野生のハスカップの多くは4倍体であり、2倍体は北海道東部の一部にのみ分布していることをこれまでの研究で報告してきた(Miyashita et al. 2011)。倍数体誘導の起点となるハスカップの2倍体の材料を求め、北海道東部の2倍体分布状況を調査した。北海道東部、厚岸町のチライカリベツ川流域のハスカップの自生地を調査し、ハスカップの個体ごとにGPS(global positioning system: Oregon 450TC, Garmin)で自生地点を記録した。記録した個体から数枚の葉を採取し、フローサイトメーター(Ploidy Analyzer PA)で倍数性の判定を行った。また、花サイズ、果実サイズ、果実のBrix、果実のpH、種子数を調査した。チライカリベツ川流域のハスカップの倍数性を調査したところ、全ての個体が2倍体だった。さらに北海道東部の別集団を探索したところ、ハスカップの2倍体個体群の中に少数の4倍体が含まれる集団もあった。花の各器官のサイズ、果実サイズのデータから、その多様性を解析した。2倍体果実の平均果実重は新鮮重で約0.28gだった。この値は、北海道大学・北方生物圏フィールド

科学センター・生物生産研究農場(札幌市)で栽培したハスカップの4倍体の平均果実重約1.41gよりも小さな値であった。チライカリベツ川流域から採取した1果実の平均種子数は7.49だった。個体ごとの種子を識別し、ゲランガムで固化した1/2MS培地に無菌播種を行い、コルヒチン処理のための材料に供試した。

ハスカップの実生へのコルヒチン処理について予備的な実験を行なったところ、実生全体をコルヒチン液に浸して処理を行うと、コルヒチンの影響が根に顕著に現れ、根が褐変して、のちに植物体が枯死してしまう問題点が浮かび上がった。そこで、根を保護しつつコルヒチンをシュートの成長点に作用させる処理方法について検討を行なった。無菌播種して得た実生の根をゲランガムで固化した培地中に挿して根をコルヒチンの影響から遠ざけ、培地上にコルヒチン液を入れてシュート部にコルヒチン进行处理する手法を検討した。コルヒチン処理に用いる実生のステージについても検討を行なった。実生が最初の本葉を展開したところでその本葉を切り取り、子葉基部の脇芽を誘導した。ゲランガムで固化した1/2MS培地を直径6cmの無菌プラスチックシャーレに調整した後に、シャーレの周縁部に本葉を切除して脇芽を誘導した実生を植え付けた。その後、0.4%コルヒチンをシャーレから溢れない程度の量である5ml加え、シャーレの蓋をしてパラフィルムで封をした。そのシャーレを回転振盪機の上に置き、エアレーションとコルヒチン液の脇芽の成長点への接触機会を増やすようにした。24時間から48時間、コルヒチン処理を継続した後に、コルヒチンを取り除き、新しい1/2培地にコルヒチン処理を行なった実生を移植した。腋芽が成長したものから、腋芽ごとに識別してフローサイトメーターで倍数性を判定した。その結果、2倍性、2倍性と4倍性のキメラ、4倍性のシュートが得られた。同一実生から得られた2倍性のシュートと4倍性のシュートを継代することで、数系統の同質遺伝子倍数体を作成することができた。現在、系統ごとに本実験で得られた“同質遺伝子倍数体(isogenic polyploid)”を育成中である。今後、倍数化の影響が顕著に表現される系統の選抜を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

津村美悠・星野洋一郎

根室半島における四倍体ハスカップの自生と北海道東部の倍数体混在集団の特徴

園芸学研究 第18号別冊1号(2019)

津村美悠・星野洋一郎

北海道東部におけるハスカップの倍数性分布と形質評価

園芸学研究 第17号別冊1号(2018)

津村美悠・星野洋一郎

北海道東部におけるハスカップの二倍体自生地域における四倍体の探索とフローサイトメトリによるDNA含量の解析

6 . 研究組織

(1)研究分担者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。