

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580005

研究課題名（和文） バレイショにおける倍数性の科学（異質 6 倍体ゲノムの分解）

研究課題名（英文） Science of polyploidy in potato (Genome dissection of allohexaploid)

研究代表者

保坂 和良 (HOSAKA KAZUYOSHI)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：60222428

研究成果の概要：

野生 6 倍体バレイショ *Solanum demissum* と普通バレイショ（4 倍体）の雑種（5 倍体）に普通バレイショを交雑すると染色体数は 4 倍体に収束していくことから、両種は同質のゲノムを持つと考えられ、野生 6 倍種が異種ゲノムを持つとは考えられなかった。また、どちらを母親にするかによって雑種子の大きさは異なり、得られた正逆 F₁ 雑種の花粉 DNA は、少なくとも核 DNA の組成は同じと考えられ、違いは DNA のメチル化にあることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,200,000	0	2,200,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	390,000	3,890,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：育種学・遺伝学・バレイショ・ゲノム・倍数性

1. 研究開始当初の背景

バレイショに近縁な野生 6 倍種 *Solanum demissum* Lindl. ($2n=6x=72$) は、ジャガイモ疫病抵抗性遺伝子を始め青枯病にも抵抗性を示すことから育種上極めて有用な野生種の一つである。また、自然界で放任していても高い稔性を持ち多くの種子をつけることから、倍数種として成功した種の一つと考えられる。本種の減数分裂第一分裂中期 (Metaphase-I) で 2 価染色体のみを規則的に形成することから異質 6 倍体と考えられ、ゲノム構成は A⁴DD^dD^d で表されている (Matsubayashi 1991)。しかし、D ゲノムの

供与親が存在しないことから、同祖ゲノム間の染色体対合が遺伝的に抑制されているとも考えられている (Dvořák 1983)。

バレイショの種間交雑における成否は、倍数性に関わらずその種固有の胚乳形成因子 (Endosperm Balance Number, EBN) に依存しており、2 種間の EBN 値が同じだと正常種子が得られることが知られている (Johnston et al. 1980)。普通バレイショ *S. tuberosum* L. ($2n=4x=48$ 、ゲノム構成 AAA^tA^t) と *S. demissum* は倍数性を異にするが同じ 4EBN 値を持つため交雑が可能で、*S. demissum* を母親とし、*S. tuberosum* を花粉親として交雑す

ると容易に種子が得られるが、逆交雑では非常に困難であることが知られている (Dionne 1961)。

2. 研究の目的

S. demissum と *S. tuberosum* の交雑によって5倍雑種種子を採ることができ、さらに *S. tuberosum* を戻し交雑すると *S. demissum* の持つ3種類のゲノムは分解され、さまざまな程度の *S. demissum* 遺伝質を持つ異数体系統を BC₁ 世代で育成することができる。本研究は、*S. demissum* と *S. tuberosum* で正逆交雑を行い、さらに正逆 F₁ 雑種の両親種への戻し交雑や、これによって育成された異数体系統群を用いて、一側性交雑親和性をもたらす遺伝的機構を明らかにしようとした。また、これら育成系統の細胞遺伝学的観察を行うことにより、両種間のゲノムの親和性および染色体対合に関する遺伝的制御機構に対する知見を深めることを目的として行った。

3. 研究の方法

S. demissum (系統名 5H109-5、PI 186551) と *S. tuberosum* (長系 126 号) の正逆交雑により得られた F₁ 雑種系統群 (6H37 および 6H38) とこれら正逆 F₁ 雑種個体 (6H37-6 および 6H38-19) に長系 126 号を戻し交雑して得た BC₁ 集団 (それぞれ 7H1L と 7H1S 系統群、7H2L と 7H2S 系統群)、および BC₁ 個体 7H2L-47 (2*n*=52)、7H1L-42 (2*n*=52)、7H1L-29 (2*n*=53)、7H1S-27 (2*n*=52) および 7H1L-19 (2*n*=52) にそれぞれ長系 126 号を交雑した BC₂ 集団 (それぞれ 8H9、8H10、8H11、8H12 および 8H16 系統群) を育成した。

さまざまな交雑組合せにおける交雑成功率 (果実数/授粉花数) (%)、果実当たり種子数および種子の平均一粒重 (mg) を調査するとともに、花柱内における花粉管伸長を観察した。

メチル化感受性制限酵素 (*Hpa*II と *Msp*I) を Amplified Fragment Length Polymorphism 法に導入した Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) 法によって、*S. tuberosum* と *S. demissum* の正逆 F₁ 雑種の花粉 DNA の差異および DNA メチル化の違いを検出した。

正逆 F₁ 雑種および BC₁ 集団の染色花粉率 (%)、Metapase-I における染色体の対合頻度、および体細胞染色体数を観察した。

4. 研究成果

(1) 一側性交雑親和性をもたらす遺伝的機構の解明に向けて

① *S. demissum* (以下 *dms* で表す) 25 系統群から育成した 110 個体を母親とし、*S. tuberosum* (以下 *tbr* で表す) を花粉親にした交雑では、授粉花総数 488 花のうち 109 個

体から 395 果実が得られ、平均交雑率は 81.2% と高い値となった。一方、232 花の逆交雑を行うと平均交雑率は 18.7% と正交雑に比べ明らかに低い値を示し一側性交雑親和性が確認された。

② 得られた正逆 F₁ 雑種の花粉を 102 花の *tbr* に授粉したが全く種子を得ることができなかった。しかし、*dms* を母親にして、79 花に F₁ (*tbr* × *dms*) の花粉を授粉すると 39 果実が得られ、103 花に F₁ (*dms* × *tbr*) の花粉を授粉すると 7 果実が得られた。したがって、正逆 F₁ 雑種が *tbr* に花粉親として交雑できないのは、細胞質雄性不稔に起因するものではなく、また、花粉管は胚珠まで到達していることが観察されたので、受精後の障害によるものと考えられた。

③ *tbr* × *dms* で得られた果実の平均種子数は 113.2、種子の平均一粒重は 0.39 mg であったが、*dms* × *tbr* より得られた種子数は明らかに少なく (34.0)、巨大な種子 (0.93 mg) が得られた。Ehlenfeldt and Hanneman (1988) によると、胚乳の発育に関わる精核の遺伝的因子 (EBN) が極核の EBN に比べやや大きい、あるいは Nishiyama and Yabuno (1978) によると、雄核の活性力 (AV) が雌核の反応力 (RV) に比べやや大きいと巨大種子になることが知られている。したがって、*dms* の EBN ないし AV/RV 値は *tbr* に比べやや小さいと考えられる。

④ F₁ (*tbr* × *dms*) と F₁ (*dms* × *tbr*) の産出する花粉は、*dms* に対して明らかに受精能力が異なるので (交雑率はそれぞれ 38.3% と 7.6%) 精核の AV 値が異なると考えられ、自家授粉 (144 花) させたが全く果実を付けないし、52 花の兄弟交雑を試みたが 1 個の果実を付けたにすぎなかったため極核の RV 値もその個体が持つ AV 値と異なっていると推測される。

⑤ F₁ (*tbr* × *dms*) と F₁ (*dms* × *tbr*) にそれぞれ *tbr* を交雑して得た BC₁ 集団は、自殖 (それぞれ 37.5% と 11.0%) および兄弟交雑 (それぞれ 23.0% と 15.7%) が可能となり、さらに *tbr* を母親としても種子が得られた (それぞれ 15.7% と 1.4%)。このように *tbr* へ戻し交雑を行うと交雑能力が改善されることから、EBN ないし AV/RV 値で表される交雑能力を支配する因子は核遺伝子に支配され、その不均衡によって一側性交雑親和性が生じているものと考えられる。

⑥ F₁ (*tbr* × *dms*) と F₁ (*dms* × *tbr*) のそれぞれから複数個体を取り、それぞれの花粉 DNA を混合して正逆交雑を比較するサンプルとした。これを *Msp*I/*Eco*RI ないし *Hpa*II/*Eco*RI

で二重制限消化し、MSAP 法を行ったところ、63 のプライマーペアすべてからバンドを検出することができた。総バンド数は正逆交雑サンプルで等しく、*MspI/EcoRI* 制限消化した花粉 DNA では 6560 本で、そのうち *HpaII/EcoRI* で二重制限消化したものと比較して異なるバンド（メチル化感受性バンド）の数は 1037 本であった。一方、*HpaII/EcoRI* で二重制限消化した花粉 DNA では 5677 本のバンドが検出され、メチル化感受性バンドは 189 本であった。葉の DNA についても同様の分析を行い、*MspI/EcoRI* 制限消化した葉 DNA では 6557-6558 本で、そのうちメチル化感受性バンドの数は 1034-1037 本であった。一方、*HpaII/EcoRI* で二重制限消化した葉 DNA では 5677-5674 本のバンドが検出され、メチル化感受性バンドは 188-189 本であった。したがって、花粉 DNA と葉 DNA のメチル化率はそれぞれ 10.02% と 9.99-10.02% となり、植物体とそれが生産する雄性配偶子の DNA は同じメチル化程度であることを明らかにした。

⑦ 混合花粉 DNA を用いた場合、正逆 F_1 雑種で異なるバンドは 28 本見つかった。これらを個別別に見てみると、正逆交雑で異なるが個体間では共通に見られるバンドは 4 本で、バンドの濃さなどから判断して葉緑体やミトコンドリア DNA に由来するものではなく、また、いずれもメチル化感受性バンドとして検出された。したがって、正逆 F_1 雑種の少なくとも核 DNA の組成は同じと考えられ、違いは DNA のメチル化にあることが明らかとなった。DNA のメチル化は遺伝子発現制御に関わっていることが知られており、本研究で見出された 4 つの DNA メチル化の違いが正逆 F_1 雑種で異なる遺伝子発現をし、花粉の交雑能力に差異をもたらしているのかもしれない。今後、これらメチル化感受性バンドと遺伝子発現の関係性を明らかにすることにより、種間交雑における種子形成の遺伝的機構を明らかにすることができるものと期待される。

(2) 戻し交雑過程における野生 6 倍種ゲノムの分解と伝達

① *dms* (7H16-9) と *tbr* の正逆 F_1 雑種 6H37-6 および 6H38-19 はいずれも 5 倍体 ($2n=60$) で、これらに *tbr* を戻し交雑した 7H1L 系統群では 49 個体について体細胞染色体を観察したところ 49 本から 57 本の変異が見られ、平均は 53.1 本 (標準偏差=1.65) であった。同様に 7H1S 系統群では 51 個体について 49 本から 60 本の変異が見られ、平均は 54.5 本 (標準偏差=1.95)、7H2L 系統群は 52 個体について 49 本から 56 本の変異が見られ、平均は 53.3 本 (標準偏差=1.78)、および 7H2S 系統群は 53 個体について 49 本から 59 本の変

異が見られ、平均は 53.7 本 (標準偏差=2.14) であった。いずれの系統群も 4 倍体レベルの 48 本から 5 倍体レベルの 60 本の間で正規分布を示し、全 205 個体中で 48 本以下や 61 本以上の染色体を有する個体は観察されなかった。この染色体数の変異は、親である種間雑種 2 系統の平均染色体対合頻度 $0.42IV + 5.00III + 17.50II + 8.38I$ で示される 1 価染色体および 3 価染色体の両極への無作為な分配到起因するものと考えられ、種間雑種のゲノム構成が AAA³DD⁴であることを考慮すると、A ゲノムが分解されることによって 1 ゲノム分に相当する染色体数の変異を生じているものと類推された。

② 親系統の *dms* (7H16-9) の染色花粉率は 98.1% で、*tbr* のそれは 72.3% であった。正逆 F_1 雑種の染色花粉率は 60.2% から 79.0% の間で変異し、いずれも比較的高い染色花粉率を示した。染色花粉率に基づく戻し交雑集団 (BC₁ 集団) の花粉稔性は、低稔性から高稔性まで連続的に分布し、染色体数との間に相関は見られなかった ($r=0.036$)。

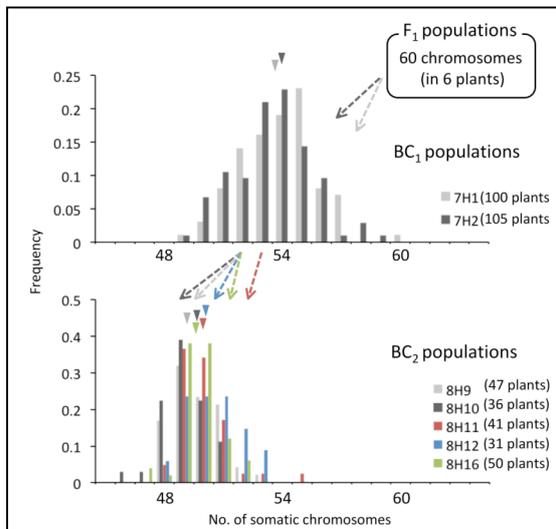
③ BC₁ 集団のうち、比較的高染色花粉率を示す 7H2L-3 (染色花粉率 74.2%, $2n=56$)、7H2L-4 (65.9%, $2n=56$) および 7H2L-28 (63.4%, $2n=54$) と、比較的低染色花粉率を示す 7H1L-49 (5.4%, $2n=55$)、7H2S-24 (11.6%, $2n=53$) および 7H2L-18 (13.8%, $2n=55$) の Metaphase-I における染色体対合を観察した。平均対合頻度は、7H2L-3 で $0.50IV + 7.50III + 15.00II + 3.50I$ ($n=5$)、7H2L-4 で $0.73IV + 6.91III + 13.09II + 6.18I$ ($n=11$)、7H2L-28 で $1.42IV + 6.25III + 12.67II + 4.42I$ ($n=12$)、7H1L-49 で $0.25IV + 6.75III + 12.00II + 9.83I$ ($n=12$)、7H2S-24 で $0.92VI + 6.08III + 13.75II + 3.58I$ ($n=12$) および 7H2L-18 で $1.25IV + 7.00III + 12.50II + 4.00I$ ($n=4$) となった。5 価染色体は観察されなかったが、4 価染色体は平均して 7H1L-49 の 0.25 本から 7H2L-28 の 1.42 本となり、正逆 F_1 雑種のそれよりも比較的高い値を示した。全染色体に占める 2 価染色体の割合は 7H1L-49 の 43.6% から 7H2L-3 の 53.6% となり、これらに大差は見られなかったことから、BC₁ 集団に見られた花粉稔性の高低には染色体対合後の複雑な要因が関わっているものと考えられた。

④ BC₁ 集団のうち大きい種子より育成した個体群 (7H1L および 7H2L) と小さい種子より育成した個体群 (7H1S および 7H2S) 2 群に分けて染色体数の分布を比較したところ、両者に約 1 本分の差異が見られた。このことから、胚乳の発達に関与する Endosperm Balance Number (EBN) のアンバランスによって生ず

る種子の大きさの違い (Ehlenfeldt and Hanneman, 1988) が、特定の染色体の有無を反映したものと類推される。

(3) 連携研究者

⑤ *dms* と *tbr* の種間雑種の持つゲノム構成を AAA^dDD^d とし、*tbr* を 2 回連続戻し交雑すると、想定される染色体数の変異は、48 本を中心として大きな変異幅が期待される。BC₁ 個体 7H2L-47 (2*n*=52)、7H1L-42 (2*n*=52)、7H1L-29 (2*n*=53)、7H1S-27 (2*n*=52) および 7H1L-19 (2*n*=52) にそれぞれ *tbr* を交雑した BC₂ 集団 (それぞれ 8H9、8H10、8H11、8H12 および 8H16 系統群) の染色体数は下の図に示すように、むしろ変異の幅が減少し、平均が 4 倍体に相当する 48 本に近づいていることから、戻し交雑過程を経るごとに集団の染色体数は 4 倍体レベルに収束するものと推察される。したがって、本研究結果からは、両種は同質のゲノムを持つと考えられ、野生 6 倍種 *dms* が異種ゲノム (D および D^d ゲノム) を持つことを支持することはできなかった。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

實友玲奈・小野聖二郎・保坂和良、普通バレイシヨに対する 6 倍性野生バレイシヨ *Solanum demissum* の一側性交雑親和性の再検討、日本育種学会第 113 回講演会、2008 年 3 月 29 日、明治大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保坂和良 (HOSAKA KAZUYOSHI)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：6 0 2 2 2 4 2 8

(2) 研究分担者