

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780016

研究課題名(和文) 胚乳由来の3倍体育成法の確立とインプリント遺伝子の解析による胚乳分化機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of plant regeneration system from endosperm-derived cultures and analysis for endosperm development and regeneration by analyzing imprinting genes

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・助教

研究者番号：50301875

研究成果の概要(和文):クロミノウグイスカグラ(ハスカップ)の胚乳を培養することにより、植物体再生法を開発することができた。得られた植物体は、胚乳と同じ倍数性を持つことが分かった。この研究により、胚乳が植物体再生能を保持することが明らかとなった。『胚乳の植物体再生能』のメカニズムを明らかにするために、ゲノムインプリンティングに着目し、胚乳で発現する *fertilization independent endosperm (FIE)* 遺伝子のクローニングを行った。胚乳培養過程のインプリント遺伝子の発現解析により、胚乳の植物体再生のメカニズムが明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文): In this study, the novel culture procedure using endosperm has been developed in *Lonicera caerulea*. The cultured endosperm could regenerate into plantlets. The regenerated plants showed same ploidy level with endosperm. This means that endosperm culture is novel procedure for producing polyploid plants. To analyze regeneration ability from endosperm, genome imprinting has been focused. In this study, one of imprint genes, *fertilization independent endosperm (FIE)* was sequenced in the endosperm of *L. caerulea*. The regeneration machinery might be clarified by analyzing expression patterns of imprint genes during endosperm culture.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	1,110,000	4,160,000

研究分野：園芸学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：クロミノウグイスカグラ、ハスカップ、胚乳、インプリント遺伝子、倍数性、培養

1. 研究開始当初の背景

極核と精細胞の融合によって形成される胚乳は、栄養貯蔵のために高度にその機能が分化し、その役割を果たすと植物体になることなく崩壊する運命にあるユニークな組織である。極核を擁する中央細胞は、卵細胞と

同じ大孢子母細胞に起源を持ち、減数分裂後に残存する単一細胞に由来することから遺伝的背景は同一である。しかしながら、配偶子形成の過程で、二つの核(極核)を持つことから倍数性が異なる。一方、雄性配偶子である精細胞も雄原細胞の体細胞分裂によ

て形成されることから、遺伝的には同一である。このように、遺伝的に同一なもの同士の融合である重複受精の現象が、卵細胞と精細胞の融合は胚を経由して植物体になるのに対し、中央細胞の極核との融合産物は胚を支えるための貯蔵器官に分化するのみである。

最初の疑問は、接合子と遺伝的に同一な胚乳に植物体再生能力があるのではないかとということである。そこで、最初に取り組んだのがハスカップの胚乳培養である。ハスカップの果実の大型化を狙って育成していた倍数性育種の過程で、4倍体に組織の肥厚と生育遅延が見られたことから、倍数性レベルを下げるために2倍体と4倍体との交雑による3倍体の育成を計画していた。その中で、倍数体育成に時間のかかる果樹において、胚乳培養の利点があると着想した。

2倍体の植物の胚乳が3倍性の組織であることに着目し、胚乳の植物体再生能を探るための胚乳培養の研究を、新たな3倍体育成方法として育種的に意義付けた。これまでの研究で開発した生殖細胞の操作技術を応用し、デンブンを蓄積する以前の微小な胚乳のみを摘出して培養を行ったところ、カルスを経由して植物体に再生させることができた。従来、栄養貯蔵器官のみにしか分化しないと考えられていた胚乳が遺伝的な可塑性を持ち、もう一つの受精によって得られる胚と同様に植物体になる能力を保持していることを明らかにした。そこで、この研究成果をもとに、胚乳培養による植物体再生の効率化や他の植物種への応用のため、植物体再生能を切り口に胚乳形成のメカニズムを明らかにすることを目的に本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

(1) 胚乳からの植物体再生系の効率化

これまでに開発したハスカップの胚乳培養系は再生率が低く、他植物の応用や胚からの植物体再生機構の解析のために高頻度で胚乳から再生する培養系が不可欠である。植物成長調節物質については、IBAとBAPが有効であることが分かっているので、本研究では胚乳の発達過程に着目し、発達ステージと植物体再生能の関係を明らかにする実験を行う。

また、胚乳機能の分化にはショ糖の急激な転流が引き金になっているのではないかと考え、培地に添加する炭素源としての糖の影響を調査する。

(2) 種間交雑由来の胚乳からの植物体再生条件の検討 (ゲノム比の異なる雑種育成方法に関する実験)

種間交雑由来の胚乳から植物体を再生させた事例はない。ハスカップの胚乳培養系を用い、近縁のウグイスカグラとの相互交雑に由来する胚乳を培養して種間の3倍体を作成

する培養系の開発を検討する。通常の種間雑種は両親のゲノムを1:1で持つが、この手法では母親2:父親1のゲノム組成を持つため、母親に比重を置いた形質を持つ新しい育種手法として期待できる。

(3) 胚乳形成に関与するインプリント遺伝子のクローニングと発現解析

胚乳形成に関与するインプリント遺伝子オースログをクローニングについて検討する。

3. 研究の方法

(1) 胚乳からの植物体再生系の確立

これまでのハスカップの胚乳培養の結果から、胚乳からの不定芽再生には植物成長調節物質としてIBAとBAPを組み合わせて添加することが有効であることが分かった。そこで、胚乳摘出時期の検討を行った。

重複受精の後、胚乳は高度に時空間制御され、分裂を繰り返して栄養貯蔵器官としての機能を帯び、胚の成長をサポートする役割を果たすと崩壊する経路をたどる。このプロセスから離脱させ、植物体再生の方向に転換させるためには、栄養貯蔵器官としての機能が未発達の段階で培養を開始する必要があると考えられる。胚乳の発達過程を組織学的に明らかにするために、組織切片を作成してその形態変化の整理を行った。この情報をもとに、受精直後の中央細胞と分裂過程の胚乳を経時的に摘出し、培養を開始することで、胚乳発達の段階が植物体再生能に及ぼす影響を調査した。

発達初期の胚乳の摘出には、これまでに開発した雌性配偶子単離技術を用い、酵素処理・マイクロキャピラリー・ガラス針・ナノスポイト・倒立顕微鏡を利用した組織解剖手技を利用した。

(2) 種間交雑由来の胚乳からの植物体再生の検討

ハスカップの培養系を利用し、ウグイスカグラおよびミヤマウグイスカグラとの交雑由来の胚乳を培養し、ゲノム比の異なる植物体を育成する手法を検討した。通常の種間交雑では、両親のゲノムを1:1で併せ持った後代が得られるが、この手法では母親2:父親1のゲノム組成を持つため、母親の遺伝子量を多く持った後代を一代で育成することができる。この実験は、母親の遺伝形質に比重を置いた新しい育種手法につながると期待できる。また、胚乳培養時に母親の珠心組織が胚乳に付着して母親由来の植物体が再生される可能性を否定するため、ゲノムが異なる交配組み合わせで胚乳を培養することにより、後代の雑種判定にも用いることができる。

(3) 胚乳形成に関与するインプリント遺伝子のクローニング

植物では胚乳のみでゲノムインプリンティングの現象が見つかっており、インプリント遺伝子としてシロイヌナズナから *FWA*、*MEDEA*、*FIS2* (*fertilization independent seed 2*) が単離されている。これらの遺伝子は、母親由来のゲノムのみで活性化され、胚乳形成に深く関わっていると考えられる。

FWA、*MEDEA*、*FIS2* 遺伝子の胚乳における発現パターンについて、既報をもとに情報を整理した。この情報に、組織切片で得たハスカップの胚乳発達過程の形態学的変化を照合した。これらの情報をもとに、各ステージの胚乳から RNA を抽出し、RT-PCR およびインプリント遺伝子のシーケンス情報 (シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシを利用) から作成した特異的プライマーを用いて RACE 法によりインプリント遺伝子のクローニングについて検討を行った。

4. 研究成果

これまでの研究でクロミノウグイスカグラ (ハスカップ) の胚乳を組織培養することにより、植物体を再生させる手法を開発することができた (第 1 図)。発達段階にある胚乳を摘出し、ベンジルアミノプリン (BAP) とインドール酪酸 (IBA) を培地に添加することが重要であることが分かった (Miyashita et al. 2009)。本研究で用いた母株は 4 倍性のものであり、この植物体が持つ胚乳は 6 倍性となる。再生した植物体は、胚乳の倍数性と同じ 6 倍性であることが分かった。このことは、胚乳培養が新たな倍数性育種法になることを示すものである。またこの研究により、胚乳が植物体再生能を保持することが明らかとなった。

さらに胚乳の持つ再生能を検証するために、胚乳の培養条件の検討を行った。クロミノウグイスカグラ (ハスカップ) とミヤマウグイスカグラの種間交雑に由来する胚乳を培養行った。カルスを経由



第 1 図 胚乳から再生した植物体

不定根の再生が観察された。現在までのところ、植物体の再生には至っていないが、種間交雑に由来する胚乳においても、形態形成能を保持することが明らかとなった。この研究により、胚乳が遺伝的可塑性を持ち、従来考えられていた栄養貯蔵器官にのみ分化するのではなく、植物体再生能を保持すること明らかとなった。

この『胚乳の植物体再生能』のメカニズムを明らかにするために、植物体再生は、胚乳が本来持つ分化プログラムが培養条件によって書き換えられることによって生じると仮定した。胚乳を高度に特異化させている現象としてゲノムインプリンティングに着目した。他の植物種でクローニングされているインプリント遺伝子のうち、胚乳で発現する *FIE* (*fertilization independent endosperm*) 遺伝子に着目し、ハスカップの *FIE* 遺伝子のクローニングを試みた。RACE 法により、*FIE* 遺伝子の全長をクローニングすることができた。今後、胚乳培養過程のインプリント遺伝子の発現解析により、胚乳の植物体再生のメカニズムが明らかになることが期待される。

また、胚乳は雌性配偶子と雄性配偶子が 2:1 で受精して生じることから、胚乳で起きる分化プログラムにおける雄性配偶子側の寄与についても解析を進めた。単子葉植で 2 細胞性花粉を形成するアルストロメリアとキルタンサスを用い、*in vitro* の花粉培養の過程で雄性配偶子である精細胞の形成できる様子を細胞的に解析した。フローサイトメトリーを用いて花粉培養の過程をトレースすると、核相の変化から精細胞形成のタイミングを明らかにすることができた (Hirano and Hoshino, 2009, 2010)。このような過程で形成される精細胞 (雄性配偶子) の胚乳形成への寄与について検討中である。

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)

[雑誌論文] (計 10 件)

(1) Kashiwara Y, Shinoda K, Murata N, Araki H, Hoshino Y, Evaluation of the horticultural traits of genus *Alstroemeria* L. and genus *Bomarea* Mirb. (Alstroemeriaceae). Turkish Journal of Botany 35: 239-245 (2011) (査読有)

(2) Miyashita T, Araki H, Hoshino Y, Ploidy distribution and DNA content variations of *Lonicera caerulea* (Caprifoliaceae) in Japan. Journal of Plant Research 124: 1-9 (2011) (査読有)

機関リポジトリアドレス：
<http://hdl.handle.net/2115/44725>

(3) Hirano T, Hoshino Y, Capture of male gamete

dynamics in pollen tubes. In: Pollen: Structure, Types and Effects. Editors: Benjamin J. Kaiser. Nova Science Publishers, Inc. pp. 127-134 (2010) (査読有)

(4) Miyashita T, Hoshino Y, Interspecific hybridization in *Lonicera caerulea* and *Lonicera gracillipes*: The occurrence of green / albino plants by reciprocal crossing. *Scientia Horticulturae* 125: 692-699 (2010) (査読有)
機関リポジトリアドレス：
<http://hdl.handle.net/2115/43307>

(5) Hirano T, Hoshino Y, Sperm dimorphism in terms of nuclear shape and microtubule accumulation in *Cyrtanthus mackenii*. *Sexual Plant Reproduction* 23: 153-162 (2010) (査読有)
機関リポジトリアドレス：
<http://hdl.handle.net/2115/44961>

(6) Kashihara Y, Hirano T, Murata N, Shinoda K, Araki H, Hoshino Y, Evaluation of pre-fertilization barriers by observation of pollen tube growth and attempts for overcoming post-fertilization barriers in intergeneric hybridization between *Alstroemeria* and *Bomarea* by ovule Culture. *Acta Horticulturae* 855: 159-164 (2010) (査読有)
機関リポジトリアドレス：
<http://hdl.handle.net/2115/44887>

(7) Miyashita T, Ohashi T, Shibata F, Araki H, Hoshino Y, Plant regeneration with maintenance of the endosperm ploidy level by endosperm culture in *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98: 291-301 (2009) (査読有)
機関リポジトリアドレス：
<http://hdl.handle.net/2115/44168>

(8) Hirano T, Hoshino Y, Detection of changes in the nuclear phase and evaluation of male germ units by flow cytometry during *in vitro* pollen tube growth in *Alstroemeria aurea*. *Journal of Plant Research* 122: 225-234 (2009) (査読有)
機関リポジトリアドレス：
<http://hdl.handle.net/2115/36650>

(9) Hoshino Y, Kashihara Y, Hirano T, Murata N, Shinoda K, Plant regeneration from suspension cells induced from hypocotyls derived from interspecific cross *Alstroemeria pelegrina* × *A. magenta* and transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94: 45-54 (2008) (査読有)
機関リポジトリアドレス：
<http://hdl.handle.net/2115/38770>

(10) Hoshino Y, *Advances in Alstroemeria biotechnology*. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. Volume 5. Edited by Jaime A. Teixeira da Silva. Global Science Books, Middlesex, United Kingdom, pp.540-547 (2008) (査読有)
機関リポジトリアドレス：
<http://hdl.handle.net/2115/34118>

[学会発表] (計 4 件)

(1) 宮下朋美・柴田 洋・桐山和也・荒木肇・星野洋一郎：国内に自生するクロミノウグイスカグラの地理的分布およびその倍数性変異について
園芸学研究 第 8 巻別冊 1 号 p. 42 (2009 年 3 月 19 日) (東京・明治大学)

(2) 平野智也・星野洋一郎：キルタンサスにおける花粉管伸長過程での精細胞の異型化
園芸学研究 第 9 巻別冊 1 号 (2010 年 3 月 22 日) (神奈川・日本大学)

(3) Hoshino Y, and Miyashita T.: Exploitation of wild *Lonicera caerulea* in Japan: ploidy distribution and DNA content variations. 28th International Horticultural Congress. Lisbon, Portugal, August 22 - 27, 2010 (ポルトガル・リスボン)

(4) 宮下朋美・中野英樹・高虫慧子・高橋太郎・堀 廣孝・星野洋一郎：ハスカップにおける倍数体シリーズの作出
園芸学研究 第 9 巻別冊 2 号 p. 412 (2010 年 9 月 20 日) (大分・大分大学)

6. 研究組織

(1) 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・助教

研究者番号：50301875

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし