

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580029

研究課題名(和文) 胚乳の植物体再生系を利用した新規倍数性育種法の開発

研究課題名(英文) Development of novel breeding procedure by using plant regeneration system from endosperm culture

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ハスカップの胚乳を供試して組織培養をすることにより、胚乳の倍数性を保持した植物体が再生されることを明らかにした。この培養系を利用した倍数性育種を展開するために、胚乳から植物体が再生する機構について解析を進めた。胚乳で特異的に発現するfertilization independent endosperm (FIE)遺伝子ホモログのクローニングをハスカップで行い、全長をシーケンスした。さらに、胚乳形成過程と胚乳培養過程におけるFIE遺伝子の発現解析を行い、発現パターンの差異について考察を行った。

研究成果の概要(英文)：Plant regeneration system from endosperm culture has been developed in Haskap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*). The plants derived from endosperm showed same ploidy level with endosperm. This means that endosperm culture is useful for novel breeding procedure. To analyze process of endosperm culture, full length of fertilization independent endosperm (FIE) homolog was sequenced in Haskap. Expression pattern of FIE homolog was analyzed by real-time PCR during endosperm development in vivo and endosperm culture in vitro. The process of endosperm culture was discussed in expression pattern of FIE homolog.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、園芸学・造園学

キーワード：胚乳 ハスカップ

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、植物の受精・胚発生の仕組みを明らかにするための手法として、単離した生殖細胞を融合させる試験管内受精の研究に取り組み、生殖細胞を操作する技術を開発してきた (Hoshino et al. 2004, 2006)。その過程で、植物特有の重複受精の持つ複雑さ、特異性、そのメカニズムに興味を引かれるようになった。特に極核と精細胞の融合によって形成される胚乳は、栄養貯蔵のために機能分化し、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。

接合子と遺伝的に同一な胚乳組織の特異性が受精後のどの時点で決定されるのかという疑問に答えるひとつの手段として、申請者はハスカップの発生初期の胚乳を培養し、その分化全能性、すなわち植物体再生能力について調査した。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、微小な胚乳のみを摘出して培養を行ったところ、カルスを經由して植物体に再生させることができた (Miyashita et al. 2009)。この結果は、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、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ものであり、胚乳が分化能を持たないというこれまでの概念を改めるものである。

本申請計画では、これまでに確立した胚乳からの植物体再生系を利用し、2つの観点で研究を展開させる。一つは、新規倍数性育種法への応用である。胚乳が親の1.5倍のゲノム量を持つことを利用し、迅速に倍数性シリーズを作出する方法を開発することである。

また、胚乳培養を利用し、種間交雑からゲノム比の異なる雑種を1代で作出する手法もあわせて開発する。

もう一つの研究課題は、胚乳分化のメカニズムの解明である。近年、胚乳はゲノムインプリンティングの制御を受けることが明らかになってきた。花粉由来のゲノムと胚珠由来のゲノムが異なる遺伝子発現の制御を受けており、おそらくこの事象は胚乳を特徴づける重要な鍵になっていると予想される。そこで本研究では、これまでに確立した胚乳からの植物体再生系と、ゲノムインプリンティングの解析を組み合わせ、胚乳分化のメカニズムを明らかにする。胚乳分化の可逆的時点を知ることにより、胚乳からの植物体再生系の再現性向上、効率化、他の植物種への胚乳培養の応用の際に有用な情報が得られると期待できる。

## 2. 研究の目的

これまでに確立した胚乳からの植物体再生系をもとに、新規倍数性育種法の開発に関する以下の研究を展開する。また、胚乳からの植物体再生のメカニズムを解明し、再現性向上・効率化を目指す研究を行う。

(1) 胚乳培養により、2倍体個体から3倍体、4倍体個体から6倍体をダイレクトに作出する。さらに、コルヒチン処理による倍数体作出と組み合わせる異なる倍数体間の交雑実験を行い、倍数性シリーズを短時間に育成するモデルを構築する。

(2) ハスカップとミヤマウグイスカグラを供試し、種間交雑後の胚乳から植物体再生を試みる。また、比較対照としてハスカップのミヤマウグイスカグラの種間雑種を育成し、その評価を行う。

(3) 胚乳培養時に生じる遺伝子発現パターン (インプリント遺伝子に着目) の変化から、胚乳分化の決定要因について解析を行う。

## 3. 研究の方法

#### (1) 胚乳からの植物体再生系の効率化

重複受精の後、胚乳は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しながら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。これまでの研究で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てきた。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する。

また、ハスカップとミヤマウグイスカグラの種間交雑を行い、種間交雑後の胚乳からの植物体再生を試みる。

#### (2) 胚乳形成に關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 fertilization independent endosperm (*FIE*)、*FWA*、*MEDEA*、*FIS2* (*fertilization independent seed 2*) 等が単離されている。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。

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を行う。

#### (3) 胚乳培養時のインプリント遺伝子の発現解析

in vivo における胚乳発達過程と胚乳培養時におけるインプリント遺伝子の発現解析を

行い、発現パターンの比較を行う。発現パターンの比較から、培養時における胚乳の脱分化のタイミングと再生時におけるインプリント遺伝子の関与について解析を行う。

#### 4. 研究成果

植物の受精・胚発生の仕組みを明らかにするための手法として、単離した生殖細胞を融合させる試験管内受精の研究に取り組み、生殖細胞を操作する技術を開発してきた。高等植物の重複受精の産物である胚乳は栄養貯蔵のために機能分化し、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。

接合子と遺伝的に同一な胚乳組織の特異性が受精後のどの時点で決定されるのかという疑問に答えるひとつの手段としてハスカップの発生初期の胚乳を培養し、その分化全能性、すなわち植物体再生能力について調査した。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、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。この結果は、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、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ものである。

しかしながら、ハスカップとミヤマウグイスカグラの種間交雑後の胚乳からはカルスは誘導されたものの、植物体再生には至らなかった。

胚乳からの植物体再生系の解析のために、胚乳分化のメカニズムの解明を試みた。近年、胚乳はゲノムインプリンティングの制御を受けることが明らかになってきた。花粉由来のゲノムと胚珠由来のゲノムが異なる遺伝

子発現の制御を受けており、おそらくこの事象は胚乳を特徴づける重要な鍵になっていると予想される。そこで本研究では、これまでに確立した胚乳からの植物体再生系と、ゲノムインプリンティングの解析を組み合わせて、胚乳分化のメカニズムを明らかにしようとした。

ハスカップからゲノムインプリンティング遺伝子の一つである fertilization independent endosperm (*FIE*) 遺伝子ホモログのクローニングを行い、全長をシーケンした。ハスカップの *FIE* ホモログを用いて、胚乳培養過程における *FIE* 遺伝子の発現解析を行った。受粉後 0、1、3、5、7、14、21、28 日の胚乳（胚乳形成過程）および受粉後 21 日または 28 日後の胚乳を培養し 1～8 週後の胚乳由来カルス（胚乳培養過程）から RNA 抽出を行い、cDNA を合成して real-time PCR を用いて発現解析を行った。アクチンの発現量を標準として比較定量を行ったところ、受粉後 21 日の胚乳では培養 1 週目と比べ 3 週目に *FIE* の発現は約 5 倍に増加した後、5～6 週目で徐々に減少し、7～8 週目には増加前の値と同等の発現で一定となった。受粉後 28 日の胚乳では培養 3 週目までは発現に変動がないが、4 週目に 2 倍に増加した後、5～6 週目に再び増加前の発現量となり、7 週目に再び 2 倍に増加した。受粉後 21 日および 28 日由来の胚乳において、培養後 3～4 週間で *FIE* の発現が一過的に上昇することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Miyashita T., Hoshino Y., Interploid and intraploid hybridizations to produce polyploid Haskap (*Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx*) plants. *Euphytica* 査読有 Accepted (DOI: 10.1007/s10681-014-1159-4)

Hoshino Y., Miyashita T., Thomas T.D., (2011) In vitro culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploidy breeding. *Scientia Horticulturae* 130: 1-8 査読有  
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.041>)  
(<http://hdl.handle.net/2115/46941>)

〔学会発表〕(計 3 件)

石山知美・下田真明・小野寺康之・青木宣明・叶玉紅・霍俊偉・孔徳剛・翁海竜・星野洋一郎：中国および日本のハスカップ倍數性レベル、DNA 含量変異および AFLP による多様性解析 園芸学会 東京農工大学 2013 年 3 月 23 日～3 月 24 日

下田真明・中野英樹・高橋太郎・堀廣孝・星野洋一郎：ハスカップとミヤマウグイスカグラの種間雑種の育成：GC/MS 分析を利用した果実成分の評価 園芸学会 大阪府立大学 2012 年 3 月 28 日～3 月 29 日

下田真明・中野英樹・高虫慧子・高橋太郎・堀廣孝・河合孝雄・星野洋一郎：ハスカップとミヤマウグイスカグラの種間雑種の育成：雑種個体の花および果実の特徴 園芸学会 岡山大学 2011 年 9 月 24 日～26 日

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.fsc.hokudai.ac.jp/farm/>

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・准教授  
研究者番号：50301875