

(3) 中課題「生殖系におけるストレス耐性果樹作出のための分子育種技術の開発
小課題「遺伝子導入系の開発と雌ずい発現性耐冷性関与遺伝子を導入した組換え体の作出」

1. 研究の背景とねらい

オウトウは山形県の特産果樹であり、全国生産量の80%を占める。オウトウの芽は4月初旬から中旬にかけ動き始めるが、この時期は晩霜害に遭遇しやすく、強い霜に曝されると特に雌ずいが褐変・枯死する。その結果、霜害を受けた花芽は結実することなく収穫量の減少が引き起こされ、甚大な被害を被る。従来対策として、霜の降りる夜間に園地内に火を焚く、温風を送風する、防霜ファンで空気を循環させるなどを行っているが、このような栽培の管理、労力、設備投資は生産者にとっては大きな負担となる。また、二酸化炭素の発生を促すことにもなり、環境への負担も懸念されている。これらの被害や問題を回避するために、霜害に強い品種の登場が強く望まれている。しかし、既存品種の中に霜害に強い耐冷性品種はなく、従来通りの交雑による育種での耐冷性品種作出は困難であった。

そこで本課題では、遺伝子組換え技術を用いて、耐冷性遺伝子が雌ずいで働くように設計した導入遺伝子をオウトウに導入した耐冷性オウトウ品種の作出を試みた。そのために、(1)オウトウの再分化培養系（個体を再生させる実験系）・遺伝子導入系の開発、(2)耐冷性関与遺伝子の開発、(3)耐冷性関与遺伝子を雌ずいで働かせるために必要である雌ずい発現性プロモーターの開発、の3つが重要課題として設定した（図1）。これらの課題を通し、(2)及び(3)での研究成果に基づいて雌ずい発現性耐冷性遺伝子を構築し、この遺伝子を(1)で開発する技術によりオウトウへ遺伝子導入し、組換え体を作成する（図1）。また上記の3課題以外に、(4)温度計測による低温障害現象の解析、(5)既存遺伝子を導入した雌ずい耐冷性モデル植物の解析、(6)ESR計測装置による耐冷性評価法の開発、の課題も設け、図に示すように耐冷性オウトウの評価に向け計画をした（図1）。以上のような戦略を立て、本課題に取り組んだ。

なおフェーズ3以降は、雌ずい発現性の耐冷性遺伝子を導入した組換えオウトウから有望系統を選抜する一方、遺伝子組換え作物に係る安全性を評価し、さらに進んで有望系統の頒布用苗木の繁殖へと展開させていくこととした。

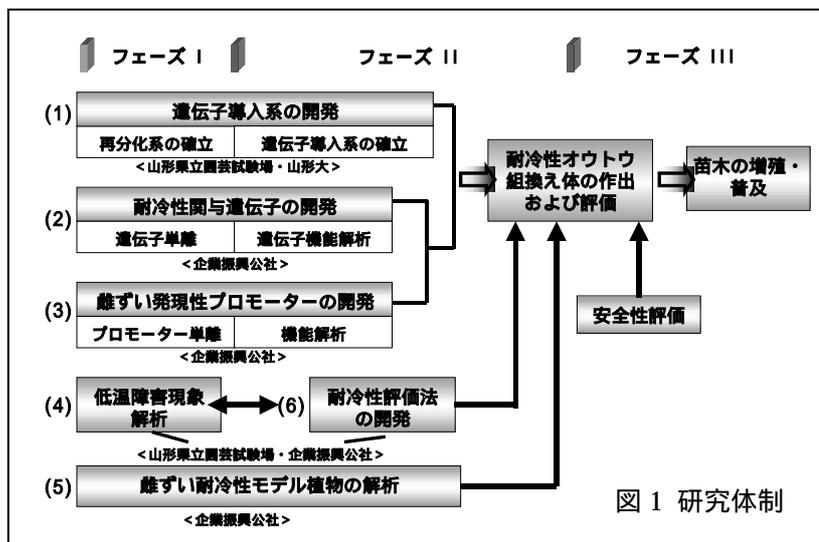


図1 研究体制

共同研究の体制と役割分担

耐例性オウトウの作出のため、以下の課題を計画、分担し、共同研究体制を設定した。

- i 再分化培養系・遺伝子導入系の開発（山形県立園芸試験場，山形大学）
- ii 耐冷性関与遺伝子の開発（山形県企業振興公社）
- iii 耐冷性関与遺伝子を雌ずいで発現させるためのプロモーターの開発（山形県企業振興公社）
- iv 温度計測による低温障害現象の解明（山形県立園芸試験場，山形県企業振興公社）
- v 既存遺伝子を導入した雌ずい耐冷性モデル植物の解析（山形県企業振興公社）
- vi ESR計測装置による耐冷性評価法の開発（山形県企業振興公社）

なお、については生命活動センシンググループと本小課題担当の果樹分子育種グループとの共同研究課題であり、以降の詳細な成果については生命活動センシンググループが報告する。

研究の経過

（フェーズⅠ段階）

オウトウの再分化培養系の開発及び遺伝子導入系の検討、耐冷性関与遺伝子及び雌ずい発現性プロモーターの単離を達成目標とした。

では主要栽培品種の再分化培養系を確立し、では候補となる耐冷性関与遺伝子を、では候補となる雌ずい発現性プロモーターを独自にオウトウより単離した。従って、目標にほぼ達した。

また、研究を進めていく中で、以下の基礎的研究にも取り組んだ。オウトウ雌ずいの低温による障害発生と凍結の関係を明らかにした。さらに、耐冷性を雌ずいに付与するという戦略が有効であるかを検討するため、供試材料となる雌ずい耐冷性遺伝子組換えモデル植物を作出した。

（フェーズⅡ段階）

オウトウの遺伝子導入系の開発、候補の耐冷性関与遺伝子の機能解析、雌ずい発現性プロモーターの機能解析、さらにとの遺伝子を連結した雌ずい発現性耐冷性遺伝子を導入した組換えオウトウの作出とその評価を達成目標とした。

ではモニター遺伝子が導入されたシュートが得られ、組換え体は得られていないものの、遺伝子導入系の確立に向けめどが立った。及びの各遺伝子においては、モデル植物を用いて各々の機能を解析したのち、2つを連結した導入遺伝子を構築した。さらに、オウトウ花芽の生育ステージと雌ずい褐変被害との関係を明らかにした。また、フェーズで作出した雌ずい耐冷性組換えモデル植物の解析により、雌ずい発現性耐冷性遺伝子を導入することで、耐冷性を高められることを示した。

成果とその意義

(フェーズ)

- i 甘果オウトウの主要栽培品種（佐藤錦、紅秀峰など）において、世界で初めて葉片および冬芽からの高効率な再分化培養系を確立し（表 1, 図 1c） 特許を出願した。
- ii 葉片および腋芽を材料にアグロバクテリウム法による遺伝子導入系を検討し、組換えシュートにおいてモニター遺伝子の発現を確認した（図 1）。

<意義>

高効率な再分化培養系の確立により、その後続く遺伝子導入系の開発のための基盤技術が整備された。この再分化培養系は日本だけに留まらず、アメリカ・カナダなどで栽培されている海外主要品種にも応用できる。

オウトウの遺伝子導入系は世界中でいまだ確立していない。本技術が確立した際には世界レベルでの遺伝子組換えによる品種改良が予想され、技術開発の先駆性（アドバンテージ）は非常に重要な意味を持つ。

- iii 耐冷性関与遺伝子を雌ずいで発現させるための新規プロモーターの候補を単離した。

(フェーズ)

- i 耐冷性関与遺伝子の単離および機能解析
 - ・オウトウから耐冷性関与遺伝子の候補として、低温馴化関与転写因子遺伝子(CIG と命名)を単離した。これは木本植物からは初めてのことであり、この遺伝子について特許を出願した。
 - ・CIG を導入したモデル植物において、CIG は低温耐性を有していることが確認された（図 2A）。また同時に耐塩性も有していることを確認した（図 2B）。

<意義>

当該遺伝子は耐冷性付与能力を持つことが証明され、これにより耐冷性オウトウの作出に利用が可能となる。また、リンゴ・ナシ等の果樹に加えて、木本植物の品種作出に広く貢献が期待される。さらに、低温のみならず、塩害地域での生育が可能なオウトウ・その他木本植物の作出も期待できる。

- ii 雌ずい発現性プロモーターの単離と機能解析
 - ・オウトウから雌ずい発現性プロモーターの候補として、自家不和合性関与遺伝子のプロモーターを単離し、特許を出願した。
 - ・このプロモーターを導入したモデル植物において、プロモーターはほぼ雌ずいのみで機能し、さらに若い花芽ステージの雌ずいで機能することを明らかにした（図 3）。
 - ・ の耐冷性関与遺伝子と連結して、雌ずい発現性耐冷性遺伝子を構築した（図 4）。

<意義>

当該プロモーターにより、霜害の弱い雌ずいで上記の耐冷性関与遺伝子を働かせることができ、雌ずいの耐冷性を高めることが期待できる。また組織特異的に、さらに時期限定で働かせることが出来るため、食用部分への遺伝子産物の残留性についての一般消費者がもつ不安を解消できる。さらに、該プロモーターを利用することで、耐冷性関与遺伝子に限らず、あらゆる機能遺伝子を雌ずいで発現させることが可能ある。

iii 低温障害現象の解明

- ・ オウトウ雌ずいにおける低温感受性は、雌ずい長(生育ステージ)によって異なり、特に発蕾期で高いことを明らかにした(図5)。
- ・ 低温障害は花芽の凍結に起因すると認められたが、感受性の高いステージでは凍結によらない障害の発生も示唆された。

<意義>

- ・ 雌ずいが低温障害を被りやすい生育ステージ、また被害と凍結との関係が明らかになり、得られたデータは晩霜害の機構の解明に寄与することが期待される。

v 雌ずい耐冷性モデル植物

- ・ シロイヌナズナ由来の既存の耐冷性遺伝子およびカブ由来の雌ずい発現性プロモーターを導入した遺伝子組換えモデル植物を解析した結果、雌ずいの耐冷性が高まった(図6)。

<意義>

- ・ 本研究により、 でオウトウから新規に単離した遺伝子・プロモーターを導入した組換えオウトウにおいても、遺伝子組換えモデル植物と同様に、雌ずいの耐冷性が高まることが期待される。

v その他

耐冷性オウトウを作出し、それを市場に普及させることは、生産の安定、霜害対策に費やす労力・設備費の軽減、寒冷地帯への産地拡大など、栽培及び経済面に効果をもたらすと期待される。さらに、オウトウ以外にリンゴ、ナシなどの主要果樹でも、霜害に悩まされているため、本課題研究はこれらの樹種の耐冷性付与に対しても重要な意義を持つ。また霜害は、栽培上世界的にも解決すべき主要な気象災害問題の一つであり、そのための技術は本県のみならず、世界的にニーズが高い。

今後の研究展開

本課題において、オウトウへ導入する遺伝子の構築及び遺伝子導入系の開発における再分化培養技術の開発は、ほぼ完了した。遺伝子導入技術については、遺伝子組換えシユ

トを得ることに成功しており、残る重要課題は組換えシュートの選抜条件を検討することによる効率の良い系の確立である。オウトウの遺伝子導入は今後の山形県特産果樹研究において、基盤となる重要な技術である。従って、今後速やかに遺伝子導入技術を確立し、雌ずい発現性耐冷性遺伝子を導入した組換え耐冷性オウトウを作出していく。さらに、その組換えオウトウの耐冷性評価、有望個体の選抜、そして苗木の頒布へとつなげていく。

また、本課題で開発された技術は様々な分野への応用が期待できる。遺伝子導入技術が確立されれば、あらゆる有用遺伝子（高機能性、耐病性の付与など）をオウトウへ導入でき、新有用品種が作出できる。さらに、単離した耐冷性関与遺伝子や雌ずい発現性プロモーターについても、同じ問題を抱えているリンゴなどの他の植物への利用が可能であり、また耐冷性や塩耐性、自家結実性などの目的に応用が期待できる。以上のように、これらの基盤技術を新品種・新素材の開発などに利用し、山形県の農業や食品業と連携を図りながら、地域COE形成を目指す。

成果を表す具体的な図表

表1 培養葉片および冬芽幼葉からの不定芽分化率

品種	不定芽分化率* (%)	
	培養葉片	冬芽幼葉
紅秀峰	7.7	5.9
紅てまり	7.1	3.3
佐藤錦	3.0	1.9
紅さやか	2.0	1.1
ナポレオン	—	4.2
セネカ	—	1.1
高砂	—	1.9
マザード	—	6.8

* 不定芽分化率 = 不定芽分化葉片数 / 培養葉片数



図1 オウトウの再分化シュートおよび遺伝子が導入された葉
A: 葉片からの不定芽分化, B: シュートの伸長, C: 組換えオウトウ葉 (で囲った青い部分が導入遺伝子の発現部位)

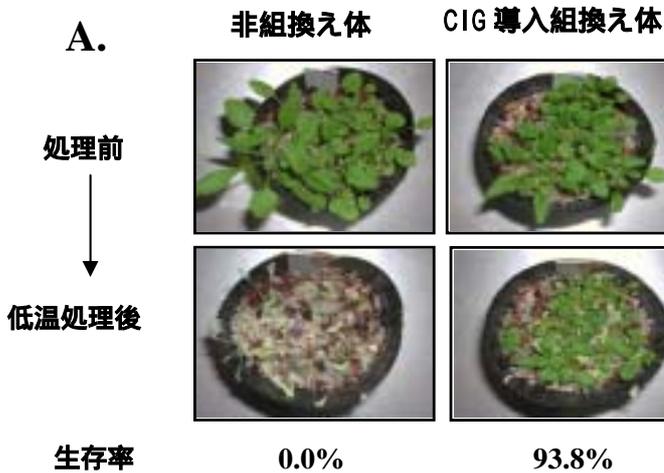
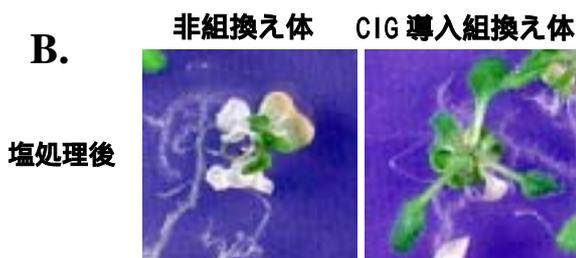


図2 CIG導入シロイヌナズナにおける低温ストレス耐性の評価

オウトウより単離したCIG遺伝子をシロイヌナズナ(モデル植物)に導入したところ、耐冷性を獲得した。22℃, 40日育成後の個体に-6℃, 6日間遭遇させ、その後22℃で10日間育成させた。



B. CIG遺伝子導入シロイヌナズナは耐塩性も獲得した(22℃, 10日育成後の個体に200mM NaClを4日間処理し、その後NaClのない培地で1週間育成させた)

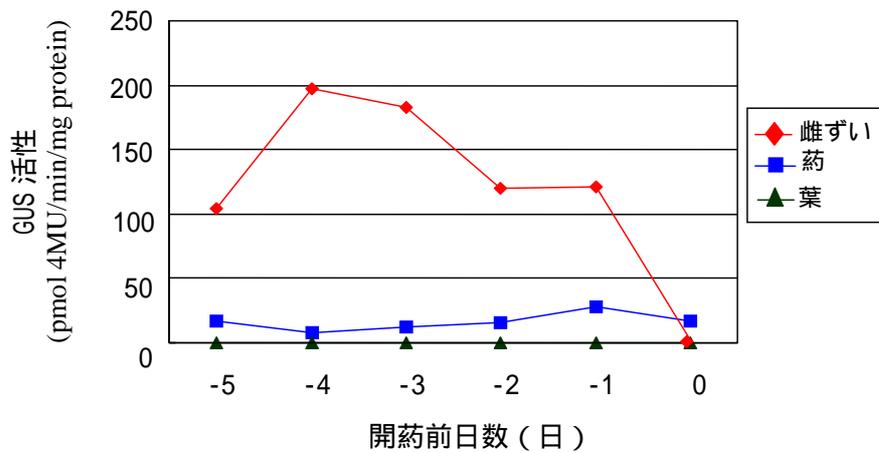


図3 組換えタバコ*を用いた自家不和合性関与遺伝子プロモーターの評価．開葯1～5日前の雌ずいにおいて高いプロモーター活性があった．(*：自家不和合性関与遺伝子プロモーターにGUS遺伝子を連結した遺伝子を導入．)



図4 雌ずい発現性耐冷性遺伝子の構造図

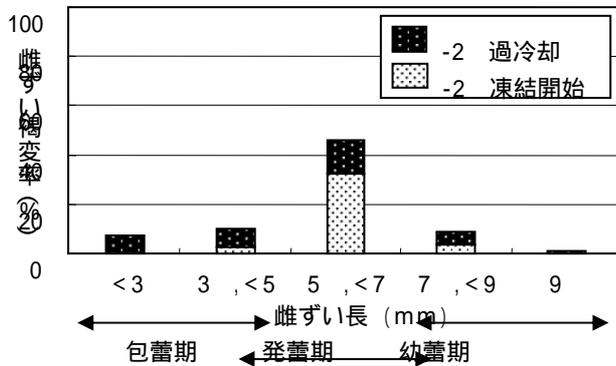


図5 温度測定花芽の雌ずい長期障害発生率

発蕾期の花芽は低温感受性が高く、雌ずいの障害発生率が高かった。また雌ずいの障害発生は、凍結によると考えられたが、凍結していない過冷却による障害の発生も観察された。

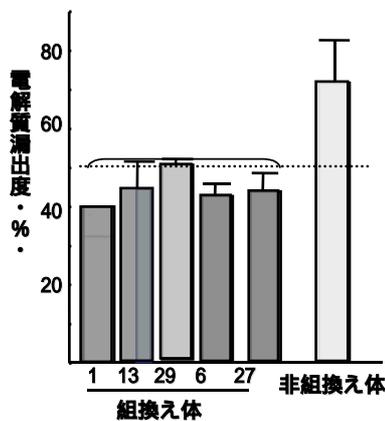


図6 雌ずい発現性耐冷性タバコモデル植物の雌ずいにおける耐冷性。

-2 の温度処理において、非組換え体の若いステージにおける雌ずいは低温による被害度を表す電解質漏出度が高いのに対し、組換え体では被害度が顕著に軽減されている。