

研究成果

サブテーマ名：② 有用アグリリソースの高効率生産・利用技術の開発 小テーマ名：②-1 多機能性果樹台木の大量増殖技術の開発
サブテーマリーダー：(雇) 教授 佐伯和弘 ^{1,2} 研究従事者：(雇) 主査研究員 花田裕美 ¹ (小テーマリーダー) <①-2、①-3兼務> (雇) 塚本達也 ¹ (雇) 高居恵愛 ¹ (雇) ウォンチャオチャン・シャマル ¹ (雇) 橋本広祐 ¹ <①-2兼務> (雇) 副主査研究員 根来圭一 ^{1,7} (雇) 副主査研究員 林 恭平 ^{1,7} (共) 准教授 田尾龍太郎 ⁷ (共) 主任研究員 藤本欣司 ^{1,6} (共) 主任研究員 和中学 ^{1,6} (共) 主査研究員 岩橋信博 ^{1,6} (共) 総括主任研究員 山東英幸 ^{2,1} (共) センター長 芝 晃丞 ^{2,7} (共) センター長 平田行正 ^{2,7} (共) 代表 小坂憲史郎 ^{2,8}
研究の概要、新規性及び目標 ①研究の概要／ 地球温暖化等による環境ストレス下で特異的に発現する遺伝子とプロテオームを同時に解析して選抜バイオマーカーを作成し、有望台木の低コスト大量増殖法を確立する。また、今後、遺伝子組換えを用いたストレス耐性の付与は不可欠であるため、ウメの形質転換系を確立し、遺伝子組換え台木の安全性を調査する。 ②研究の独自性・新規性／ ウメの台木研究や網羅的な遺伝子発現とプロテオーム解析を組み合わせたバイオマーカー開発は他では行われていない。県は全国一のウメ、カキの産地であり、改植などにより毎年3万本の苗木が必要とされる。そこで、優良台木を低コストで大量増殖できる体制を確立することは、県果樹産業の発展に不可欠である。 ③研究の目標 <フェーズⅠ> ・ウメとカキから優良系統台木を選抜する。 ・小テーマ①-2と連携して環境ストレス時に特異的に発現するプロテオームと遺伝子を同時に解析する。 ・上記のバイオマーカーを利用するために、ウメの遺伝子地図を作成する。 ・カキやウメの大量増殖技術を開発し、さらにウメの形質転換系を開発する。 <フェーズⅡ> ・フェーズⅠで選抜した品種の樹体内成分とストレス耐性の関連を調査する。 ・プロテオーム解析結果と遺伝子解析結果の相同性検索を行い、それぞれの機能解析を行う。 ・大量増殖技術を用い、有望系統の増殖を行い、穂木との親和性を調査する。 ・遺伝子組換え台木に非遺伝子組換え穂木を接ぎ木した場合の果実特性を調査する。 <フェーズⅢ> ・穂木との親和性が高かったストレス耐性台木について、現地適応性試験を行う。 ・耐乾燥、耐湿、耐塩など、それぞれの圃場に適応した優良台木の生産、配布を行う。
研究の進め方及び進捗状況 (目標と対比して) ウメでは、「二青」が乾燥・塩ストレス耐性を有する品種であり、台木として有望であった。プロテオーム解析及び遺伝子解析の結果、耐塩、耐乾燥性の「二青」で特異発現をするタンパク質を発見し、DNA マーカーの作成 (出願済) と ASR の含有量を測定できる方法を開発した (出願準備中)。ASR の遺伝子座は8番染色体に座乗していた。また、初期培養で生存率の高い培養条件で3cm以上の培養個体を材料にするとダイレクトルーティングが可能となった。無病化技術については、モデル植物としてペチュニア及びキクを用いて開発を行っている。ウメの形質転換では、超音波処理による方法で感染率は著しく増加した (出願済)。 カキでは、非還元配偶子と組織培養技術を利用した高倍数体の作出方法を確立した。それらの個体について挿し木増殖を試みた結果、「藤原御所」×「晩御所」が6倍体、9倍体とも発根し、台木利用の可能性が示唆された。 組換え台木の安全性調査では、接ぎ木したカキの葉と果実での遺伝子発現の調査及び接ぎ木した苗木由来の果実における導入遺伝子産物であるソルビトールと糖の調査及び果実の食品分析調査を行った。
主な成果 具体的な成果内容 ・「二青」は環境ストレス耐性が強く有望台木品種である。 ・低温ストレスに関与している樹体内成分を発見した。 ・20℃の床熟を用いた休眠徒長枝挿しでは、増殖が容易であった。マルチを用いた露地休眠徒長枝挿しでは、発根しにくい「南高」で40%程度の活着が認められ実用化の可能性を見出した。 ・プロテオーム解析と遺伝子解析から乾燥、塩ストレス耐性に関与するタンパク質 (ASR) を同定し、耐ストレス品種のアイソフォームを検出するDNA マーカーを開発した (出願済)。また、ASR タンパク質の発現量を免疫抗体反応で検出する方法を開発した (出願準備中)。カキでも塩ストレス処理で ASR 量が増加したため、果樹では、ASR が環境ストレス耐性に関与する可能性が示唆された。

- ・「二青」×「南高」F1のASRの分離を調査した結果、ストレス耐性に関するASRアイソフォームは8番染色体にヘテロで座乗しているのを確認した。
- ・ウメの初期培養は、冬芽茎頂組織と腋芽組織を供試材料にWPM培地にグルコース3%、BA 1ppmを加え、支持体にはゲランガム0.2%もしくはアガー0.8%を用い、継代培養では、WPM培地にグルコース3%、BA 1ppm、IBA 0.5ppm、アガー0.8%の条件で行い、生育が良好な3cm以上の培養個体の基部にIBA 500mg/Lを漬けた後、滅菌したパーミキュライトへ植付けるとダイレクトルーティングできることがわかった。
- ・TMVに感染した斑入りペチュニアを斑入りのままウイルスフリー化し、CSVdに高濃度に感染したキクを低濃度にする事ができた（出願準備中）。
- ・1.2~2.5万Luxの強光、高湿度、二酸化炭素付加水耕条件下では、明暗周期を変えることで照度を落とすことなく直接発根を誘導することができる迅速発根誘導装置を作成した（出願済）。
- ・ウメの未熟子葉から不定胚の再分化、不定胚の継代培養、発芽誘導及びシュートの育成、発根誘導、馴化までの培養方法を確立した（特許公開）。不定胚再分化培養系を利用し、アグロバクテリウム法による安定かつ効率的な形質転換法を開発した（特許公開）。
- ・S6PDH遺伝子を導入したカキ台木に非形質転換を接ぎ木し、苗木の葉で導入遺伝子の有無をPCR法で調査したが、導入遺伝子は確認されなかった。同じく果実でも導入遺伝子産物であるソルビトールは検出されず、糖含量や品質では非形質転換と比べ有意差が見られなかった。食品分析の結果も同様に有意差は認められず、形質転換体を台木としても導入遺伝子産物が非形質転換穂木へ転移されていなかった。
- ・倍数性変異個体の作出に利用できる非還元雄性配偶子の発生頻度は、低温で促進された。低温で誘導した非還元配偶子を用いて倍数性変異個体の作出を行った。「藤原御所」は高率で非還元雌性配偶子を形成したため、「藤原御所」の未熟胚培養を行い、倍数性変異個体を得て圃場定植した。
- ・高倍数体のカキは生育良好であったため、台木に利用できる可能性が示唆された。
- ・産地において強勢・矮性個体を選抜した10系統を組織培養により増殖した。

特許件数：国内5件 論文数：9件 口頭発表件数：62件

研究成果に関する評価

- ①国内外における水準との対比／ 核果類の安定した形質転換系の報告は世界的に本研究が初めてであり、今後、様々なバラ科果樹への応用が可能である。また、果樹の環境ストレス耐性に直接関与している遺伝子の同定例はなく、実際に利用可能な耐環境ストレス個体選抜に利用可能なDNAマーカーの開発は世界的に初めてである。
- ②実用化に向けた波及効果／ 本研究で開発したDNAマーカーはストレス耐性を有する台木選抜に利用できる、交雑実生に利用できる。「二青」実生では、ストレス耐性個体と非耐性個体が1：1で出現するので、本法で選抜して苗木販売することは実際に可能である。

残された課題と対応方針について

単離したストレス耐性のASR遺伝子をアラビドプシスへ導入し解析を行っている。今後、県でこの研究を進める予定である。また、本研究で選抜、育成した台木品種、系統は、県において果実が着果するまで調査を継続し、果実特性を調査した後、実用化を図る予定である。

	JST負担分（千円）							地域負担分（千円）							合計
	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	
人件費	951	12,065	10,785	10,194	11,798	5,476	51,269	3,261	11,761	16,638	20,620	18,439	13,962	84,681	135,950
設備費	6,366	7,277	8,201	10,299	8,858	5,463	46,464	0	0	0	0	0	0	0	46,464
その他研究費	5,781	12,937	13,440	12,169	9,574	5,045	58,947	7,998	2,165	1,147	1,794	1,365	1,000	15,469	74,416
旅費	76	1,184	1,955	927	865	553	5,560	0	0	0	0	0	0	0	5,560
その他	46	631	673	707	673	593	3,323	0	0	0	640	0	0	640	3,963
小計	13,220	34,094	35,053	34,297	31,769	17,130	165,563	11,259	13,926	17,785	23,054	19,804	14,962	100,790	266,353

代表的な設備名と仕様〔既存（事業開始前）の設備含む〕

JST負担による設備：プレハブ式植物育成庫、PRISMジェネティックアナライザ、UVリンブル撮影装置
地域負担による設備：

※研究員氏名中の（雇）は雇用研究員、（共）は共同研究員、（技）は雇用技術員を示す。また、数字は、所属を示す。別表を参照。

※表中、その他研究費は、消耗品費、材料費等。