

# 植物の受精・発生過程の解析と 野生遺伝資源を利用した形質改良の試み

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター

星 野 洋 一 郎

## まえがき

私は1998年に千葉大学大学院博士課程を修了しました。在学中は三位正洋先生に師事し、バイオテクノロジーを利用した園芸作物の育種に関する研究を行ってきました。その後、北海道大学農学部附属農場に赴任し、現在は、同大学北方生物圏フィールド科学センターに勤務しています。現在取り組んでいる植物の受精・発生過程の解析に関する研究の概要とそれらを利用した野生植物遺伝資源を利用した形質改良の試みについて本稿で紹介したいと思います。

## イントロダクション

交配育種において大きな問題となるのが、交雑不親和です。一般に植物の類縁関係において遠縁になると交雑しても後代を得られないことが知られています。大学院でも取り組んでいた遺伝子組換え技術は、目的形質だけを特定の品種に導入できる非常に有用な方法ですが、北海道では条例により遺伝子組換え作物の栽培が規制されるなど、研究面でも逆風を感じていました。附属農場に勤務し、現場に近い研究課題に取り組みたいと思っていましたので、北大では遺伝子組換え技術とは異なるアプローチで研究を進めることにしました。

交雑しても種子ができない「交雑不和合性・交雑不親和性」について、この問題を克服し、交配育種の可能性を広げることができれば、現在未利用の膨大な植物遺伝資源を使った形質改良が可能になると考えられます。そこで、不和合性を引き起こす柱頭や花柱の組織を取り除き、単離した生殖細胞どうしを融合させる技術「試験管内受精 (in vitro fertilization)」について研究を進めています。この研究が進めば、従来できなかった交雑組み合わせでも雑種を作ることができ、未

利用の膨大な植物の遺伝資源を利用して、食料生産やバイオマス生産などに関連した研究開発に貢献できると考えています。

試験管内受精を成功させるためには、卵細胞と精細胞を生きのまま単離する手法を確立し、植物の受精と胚発生がどのように形成されるかを詳細に調べる必要があります。また、受精の前段階として、配偶子形成・生殖細胞形成に関する課題にも取り組んでいます。加えて、被子植物特有の重複受精に生じる“胚乳”にも着目し、胚乳から植物体を再生させる技術の開発を行っています。これは、2倍体の植物が3倍性の胚乳を形成させることから着想し、胚乳と同じ倍数性の植物を短期間に育成する新たな倍数性育種法につながる可能性があります。重複受精の産物である胚乳は、栄養貯蔵器官としての機能を持つと捉えられています。組織培養による胚乳からの植物体再生系を利用して胚乳がどのように発生過程で分化するのかを探る研究に応用できるものであると考え、解析を進めています。

本稿ははじめに本稿に関連する受精・発生研究の概要について解説します。後半では、より具体的な形質改良の事例として、北海道地域の遺伝資源を利用した形質改良の試みを、ハスカップ、キイチゴ（ラズベリー）を題材に前半の受精の基礎的研究と関連させて記述したいと思います。

## 植物の生殖細胞を単離する研究

試験管内受精を成功させるためには、生殖細胞を生きのまま取り出すことが必要です。しかし、植物ではこれが難しいことが知られています。雌性配偶子である卵細胞は、胚のう内に位置し、その胚のうは珠心組織に取り囲まれ、さらに珠心組織は内珠皮、外珠皮に包まれて胚珠となっています。その胚珠は子房内に存在するので、卵細胞にたどり着くためにはこれら多く

の組織を取り除き、さらに卵細胞を同定する必要があります。卵細胞は一つの胚珠に一つしかありませんので、子房内の胚珠の数しか卵細胞がないことになりません。実験を効率的に進めるためには、一つの子房に多くの胚珠を持つものが有利かもしれません。卵細胞を単離する研究は、固定した組織を利用して行われました。胚珠を構成する膨大な細胞群からたった一つの卵細胞を単離するためには、はじめにそれを正しく捉える必要があります。胚珠内部の構造は非常に多様で、植物種ごとに胚珠の構造や内部形態は大きく異なります。卵細胞識別のために、胚珠内の胚のうの位置および形態、卵細胞の大きさや細胞学的特徴（核や核小体、液胞の特徴など）、卵装置 [卵細胞と二つの助細胞のセットを指して卵装置 (egg apparatus) と呼ばれています] の構造や助細胞特有の繊形装置（細胞壁が肥厚したものの）の性状を把握するための形態学的・組織学的観察が行われました。

三位先生のもとで行った研究でナデシコ属植物を扱った経験から、固定した胚珠を安息香酸ベンジルとフタル酸ジブチルの混合液に置換して組織を透明化させ、ノマルスキー式微分干渉顕微鏡による観察によって組織切片を作らずに胚珠内部形態を立体的に把握する手法が非常に有効であることが分かっています。これらの情報を踏まえた上で、酵素で細胞壁を消化し先端を鋭く尖らせて加工したガラス針を用いて解剖することにより卵細胞のみを取り出すことが可能となっています。これまで園芸作物のペチュニア、キンギョソウ、ユリ、アルストロメリア等で卵細胞単離の成功が報告されています。また、特徴的な胚珠構造を持つ植物種を選び、効率的に卵細胞単離を試みる研究もなされています。ルリマツリの胚のうは助細胞を持たないことから、卵細胞の識別が容易であると考えられ、また助細胞の機能について研究するよい材料であることから、この特徴を利用した卵細胞の単離が報告されています。また、トレニアでは、胚のうが珠孔部分から突出し、卵装置が露出した構造を持つことから、酵素処理によって簡単に卵細胞を単離できることが示され、またこの特徴を利用して重複受精を直接観察した研究がなされています。配偶子単離の研究材料として、トウモロコシにおいて活性のある卵細胞を効率よく単離する手法が開発され、試験管内受精を利用した研究が進んでいます。

一方、雄性配偶子は花粉内にあり、数も多く、卵細胞のように多くの組織を取り除いて取り出す手間も少ないため比較的容易であると考えられます。浸透圧ショックにより花粉を破裂させて精細胞のみを回収する手法が考案されています。また、酵素処理を組み合わせ、花粉をホモジナイザーで潰して精細胞を取り出す手法も報告されていますが、現在では、再現性、精細胞の収量および活性の点から浸透圧を利用した手法が多く用いられるようになりました。花粉には、成熟した時に2つの核を含むタイプ [2細胞性/2核性花粉 (雄原細胞と栄養細胞)] と3つの核を含むタイプ [3細胞性/3核性花粉 (2つの精細胞と1つの栄養細胞)] があります。2細胞性花粉の場合、花粉が発芽し花粉管を伸長することにより花粉管内で雄原細胞から精細胞が形成されるので、精細胞形成には花粉管を伸長させる必要があります。アルストロメリアを用いた私達の研究では、2細胞性花粉を液体の人工培地内で発芽させ、フローサイトメーター (DNA 含量を測定する実験機器で、核相の変化を捉えることができる) を用いて精細胞形成のタイミングを明らかにしました。この手法により、2細胞性花粉でも液体花粉発芽培地を利用することにより、容易に精細胞を捉えることができるようになりました。

### 単離した生殖細胞の融合：試験管内受精

活性のある卵細胞と精細胞が単離されるようになると、培養条件下における融合実験 (試験管内受精) が試みられるようになりました。卵細胞単離の研究が進んでいるトウモロコシを用いて、ポリエチレングリコール (PEG) やカルシウムを添加した溶液を用いて自然に融合を促す手法と電気融合を用いた手法などが試みられています。そして、Kranz の研究グループは電気融合により、単離した単一の卵細胞と精細胞を受精させ、胚発生を経由して植物体まで生育させることに成功しました。また、Holm らは受精直後のオオムギの卵細胞を単離し、同様に植物体を再生させたことを報告しています。植物の胚発生は胚珠内で進行するので、通常は発生過程を直接観察することはできませんでした。これまでの膨大な発生研究は経時的に作成した組織切片を丹念に観察して得られています。試験管内受精では受精直後から直接観察することができるので、胚発生の研究に非常に有用であると考えられます。こ

の試験管内受精の実験系を用いて、単離した配偶子および接合子の発生過程で発現する遺伝子の解析、間接蛍光抗体法による微小管の配向パターンの解析などに応用されています。

試験管内受精は、遠縁交雑の可能性を広げると同時に、雌性配偶子からの半数体育成の可能性も示唆しています。また、受精直後に単離した卵細胞や試験管内受精後の接合子へ‘マイクロインジェクション’により遺伝子の導入が可能となれば、抗生物質耐性等のマーカーを使わない形質転換系を確立することができます。植物の受精機構を解き明かす手段としての応用も考えられ、細胞どうしの認識、受精における助細胞・中央細胞の役割、重複受精のメカニズム、精細胞の細胞質ゲノムの排除の仕組み、配偶子で特異的に発現する遺伝子の解析などが進められています。試験管内受精を基盤にした研究展開により、植物の受精のメカニズムの理解を深め、発生・分化の人為的制御による植物育種技術全般への応用が期待されています。

## アルストロメリアの研究

アルストロメリア（写真1）は、切り花や鉢花として利用される花卉園芸作物として重要な品目であり、特



写真1 研究材料の一つ *Alstroemeria aurea*

に北海道の気候条件が栽培に向いていることから北海道での生産が増えています。しかしながら、有力な外国品種の栽培には多大なパテント料を支払う必要があり、農業経営の問題点となっています。このため、オリジナル品種の開発が必要とされており、そのための育種として種間交配が行われていますが、種間で不和合性反応を示す組み合わせがあります。試験管内受精が適用できれば、広範な種間で雑種を作ることが可能となり、品種育成の強力な技術となりえます。

アルストロメリアは、胚珠サイズが比較的大きく、また、野生種15種で交雑親和性が詳細に記録されていることから、雑種育成を念頭においた人工受精研究に適した材料と考えて研究を進めています。私達の研究室では、アルストロメリアの生殖細胞を単離する実験系を開発するために、単一の細胞を吸入できる微動ポンプ付きのマイクロキャピラリーやスライディングステージを備えた倒立顕微鏡を整備してきました。これらの装置を使用し、胚珠の部分切除と酵素処理、ガラス針を用いた解剖により生きた状態の卵細胞の回収が可能となりました。さらに、胚珠への花粉管侵入を確認後に酵素処理を行い、接合子も単離ができるようになりました。精細胞の単離に関しては、先述のようにアルストロメリアは2細胞性の花粉を持つことから、同調的な花粉発芽を促す液体培地を開発し、精細胞形成のタイミングを明らかにすることができました。この研究から、花粉管内で3つの核が連携して挙動するmale germ unitを形成することを明らかにしています。これらの成果を踏まえ、単離した生殖細胞を応用した研究を進めていきたいと考えています。

また、アルストロメリア科には、アルストロメリア属のほかに観賞価値の高いボマレア属、レオントキール属があります。アルストロメリアの変異拡大のために、現在、アルストロメリアとボマレア属、レオントキール属植物との属間交雑を試みています。ボマレア属植物との交雑では、低頻度ながら胚珠への花粉管侵入が認められました。しかし、胚の成長が途中で止まってしまうことが確認されています。胚珠培養により属間交雑後の胚を培養したところ、培養器内で小植物体は得られたものの順化に至る個体は得られていません。どのようにすれば正常な個体を育成することができるか、この課題に取り組んでいるところです。

## 北海道に自生する植物・ハスカップの育種

ハスカップ(写真2)は北海道に自生し、アイヌの人は不老長寿の妙薬として利用してきました。現在では、北海道の特産として菓子類、ジャム、果実酒などに利用され、栽培が広がっています。しかしながら、品種改良の歴史は浅く、野生株を栽培して生産されているのが現状です。最近では、ハスカップの抽出成分が眼の機能改善に効果があることが発表され、この成分を向上させた品種の育成や、食味の改善、果実の巨大化は、生産者および消費者にとって非常にメリットのあるものと考えられます。また、ハスカップの果実は1粒が1g程度と小さく、また果皮が破れやすいため、収穫に手間がかかり、貯蔵性が悪いことが問題になっています。そこで『皮が固い大きな果実を作る』ことと『味の良いものを作る』の二つの育種目標を設定しました。

ハスカップは北海道各地に自生していますので、これらの野生の植物を集めることから研究をスタートさせました。苫小牧の勇払湿原、函館近郊の横津岳、北海道東部の釧路湿原、別寒辺牛湿原、霧多布湿原、標津湿原などに探索に出かけました。私は山岳部で地形図を読んだり、植生を見たりすることに親しんでいた



写真2 ハスカップの果実

こともあり、野生のハスカップを探すフィールド調査を楽しんでやっています。

こうして集めたハスカップを調べてみると面白いことが分かってきました。ハスカップの野生集団には2倍体(染色体数18本)と4倍体(染色体数36本)のグループがあることが分かったのです。2倍体は北海道東部の一部(釧路湿原や別寒辺牛湿原など)にしかありませんが、ほかの地域では4倍体が広がっていました。どのようにしてこのような分布になっているのかは謎ですが、各地域のハスカップがどのように違うかを現在、DNA配列の違いを調べて研究しているところです。

2倍体と4倍体があることが分かりましたが、品種改良を行う上でこれは重要な意味を持っていると考えられます。一般的に、染色体数が増えると植物の組織や器官が大きくなることが期待できます。ハスカップの果実を大きくするために、倍数性育種(さまざまな倍数体を作る研究)を開始しました。そこで注目したのが、植物の胚乳です。胚乳の倍数性は重複受精によって、他の組織の1.5倍の染色体数を持っています。ハスカップの場合、2倍体の胚乳は3倍性(染色体数27本)、4倍体の胚乳は6倍性(染色体数54本)になります。そこで、胚乳のみを取り出して組織培養を行い、植物体にすることができれば、倍数性育種の新たな方法を確立できると考えました。胚乳は栄養貯蔵に特化した組織なので、これまでは植物にはならないと考えられてきました。それでは、栄養貯蔵を行う前のもっと若い段階の胚乳を使えばどうでしょうか。数千個の胚乳を培養し、植物生長調節物質の組み合わせを詳細に検討しました。すると数ヶ月経って数個の植物が再生してきました。植物の胚乳が植物体再生能を持つことが分かったのです。染色体数を調べると胚乳と同じ6倍体でした。新たな倍数性育種法の基本技術を開発したと考えられます。

現在までに交雑育種と組み合わせ、2、3、4、5、6、8倍体まで作ることができました。さて、こうしてできた倍数体の果実は大きくなるでしょうか。ハスカップは果実がなるまでに数年かかるので、現在、木が大きくなるのを待っているところです。

『味の良いものを作る』という育種目標のためには、甘くて味の良いハスカップの近縁野生種、ウグイスカグラ、ミヤマウグイスカグラとの交雑を進めています。



写真3 ハスカップとミヤマウグイスカグラの種間雑種の果実

この両種は濃紫色の果実をつけるハスカップとは異なり、きれいな赤色の果実をつけ、ハスカップよりも苦みがなく、甘みも感じやすい特徴を持っています。この近縁種を用いた種間交雑により、植物体を得ることができました(写真3)。1昨年からようやく果実をつけるようになっていきます。果実は、より洗練された甘

みとほどよい酸味があります。雑種個体は系統によりさまざまな形、味を示すことから、この中から品種候補となるものを選抜している段階です。

### 北海道産キイチゴを利用したラズベリーの育種

ラズベリー(キイチゴ)は洋菓子の素材として急速に需要が伸びていますが、日本では2008年に440t以上輸入されているにも関わらず、国内の生産はわずかに4.5t程度に留まっています。これは欧米で育成された品種が日本の気候風土に合わず、収穫期の高温多湿で果実が傷み、生産性が極めて悪いことが主因となっています。一方、北海道にはラズベリーに近縁のキイチゴ属野生遺伝資源(ウラジロエゾイチゴ、エビガライチゴ等)が多く存在しています。これらは北海道の気候でも病気にかかることなく良質な果実を实らせますが、小型で見栄えが悪く、そのままでは生産性や商品価値は低いことが欠点となっています。そこで、私達は欧米の主要な品種群(大果で生産性が高いが、病気に弱い)と北海道産のキイチゴ(小型だが北海道の気候に適している)を交雑し、北海道での生産に適した高付加価値の新規ラズベリーを開発することを目的として研究を進めています。現在、雑種1代目から生産性が高く、果実の形がよい系統を選抜し、北海道内2カ所で生産性試験を始めました(写真4)。このようなアプローチから、日本産の遺伝資源を有効利用するモデルとしても、研究を発展させていきたいと考えています。



写真4 ラズベリー品種とウラジロエゾイチゴの交雑雑種の果実