

氏 名	は ぶ つよし 羽 生 剛
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2670 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	ウメの自家和合性 S^f ハプロタイプの同定および分子マーカーとしての 利用に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 山 田 利 昭 教 授 谷 坂 隆 俊 教 授 米 森 敬 三

論 文 内 容 の 要 旨

ウメには、自らの花粉では結実しない自家不和合性という形質をもつ品種と自らの花粉でも結実する自家和合性の品種の両方が存在するが、我が国の主要経済品種のほとんどは自家不和合性の品種である。自家和合性品種は、結実のために受粉樹の混植を必要としない、結実が安定する、といった栽培上の利点があるため、栽培現場では豊産性で優良な果実品質をもつ自家和合性新品种の育成が強く望まれている。しかし、自家和合性の形質は実生が開花結実に至るまで調査できないことに加え、結果が環境の影響を強く受けるため単年での評価が難しく、選抜には多大な労力と時間を要する。そこで本研究では、自家和合性個体の早期選抜マーカーの開発を試みた。

1. ウメや同じ *Prunus* 属果樹であるカンカオウトウ、ニホンスモモなどは単一の複対立遺伝子 (S 遺伝子) によって配される配偶体型自家不和合性を示す。この S 遺伝子座上には花粉側 S 遺伝子 (S^F 遺伝子) と花柱側 S 遺伝子 ($S-RNase$ 遺伝子) の少なくとも 2 つの遺伝子 (この 2 遺伝子の組み合わせを S ハプロタイプと呼ぶ) が密接に連鎖して座乗しており、これら 2 つの遺伝子産物の相互作用によって自己花粉の認識・拒絶が行われる。この 2 遺伝子は自家不和合反応に必要な不可欠であり、カンカオウトウの S^f やニホンナシの S^{4sm} のように花粉側もしくは花柱側 S 遺伝子に変異が起きれば、その S ハプロタイプをもつ個体は自家和合性を示すことが報告されている。そこで、ウメの自家和合性 S ハプロタイプを同定するため、これまでに得られている他の *Prunus* 属果樹の $S-RNase$ に関する知見を利用した PCR 分析および DNA ゲルプロット分析を行った。さらに、PCR 産物についてはクローニングを行い、塩基配列を決定した。その結果、ウメの自家和合性品種が共通の $S-RNase$ ($S^f-RNase$) 遺伝子をもつことが明らかになり、 $S^f-RNase$ 遺伝子が自家和合性個体判別のための分子マーカーとして利用可能であることが示唆された。

2. 次に $S^f-RNase$ 遺伝子が自家和合性の形質と密接に連鎖して後代へ遺伝するかどうかを調査するため 6 種類の交雑後代について $S^f-RNase$ 遺伝子の遺伝様式と自家和合性形質との関係について調査した。その結果、 $S^f-RNase$ 遺伝子も他の $S-RNase$ 遺伝子と同じ遺伝子座に座乗する対立遺伝子の 1 つであること、 $S^f-RNase$ 遺伝子をもつ個体の自家和合性は S ハプロタイプ特異的であり、 $S^f-RNase$ は S^f ハプロタイプをもつ花粉のみを認識・拒絶できないことが示された。さらに、自家結実率が調査されている交雑後代を用い、このマーカーの有効性を調査した結果、1 個体 (1K0-26) を除いた全ての自家結実性を示した個体で $S^f-RNase$ 遺伝子が検出された。以上のことから、 $S^f-RNase$ 遺伝子は自家和合性個体の判別に非常に有効なマーカーであることが示された。また、 $S^f-RNase$ 遺伝子をもたない自家和合性個体 1K0-26 も新たに発見された。

3. 遺伝様式に関する結果から、 $S^f-RNase$ 遺伝子もしくはそれと非常に強く連鎖している遺伝子の変異がウメの自家和合性の原因となっている可能性が高いことが示された。そこで、 $S^f-RNase$ 遺伝子の全長配列のクローニングや発現解析を行い、 $S^f-RNase$ 遺伝子に自家和合性の原因となるような変異が起きているかどうかを調査した。その結果、 $S^f-RNase$ 遺伝子の配列や転写・翻訳において特に自家和合性の原因となるような変異を見出すことはできなかった。このことから、ウ

メの自家和合性は S^f -RNase 遺伝子自体ではなく密接に連鎖した別の遺伝子が原因であることが示唆された。

4. 最後に、本研究で同定した自家和合性 S^f ハプロタイプを利用した自家和合性個体選抜法の開発を行った。まず、 S^f -RNase 遺伝子特異的なプライマーセットによる PCR 増幅を試みた結果、今回設計したプライマー Ken2 と PM-R によって S^f -RNase 遺伝子の特異的な増幅が可能であり、電気泳動でのバンドの有無で S^f -RNase 遺伝子の有無を判定できた。次に、近年開発された新しい遺伝子増幅技術である LAMP 法を用いて SFB^f 遺伝子の特異的な増幅を試みた結果、今回設計したプライマーで 90 分間反応させれば、自家和合性品種特異的な増幅産物が得られ、しかもそれは目視で確認できることが示された。さらに、LAMP 法と簡易 DNA 抽出法を組み合わせることにより、非常に簡単かつ短時間で自家和合性個体を判別することが可能であった。

本研究により、ウメの多くの品種の自家和合性が S^f ハプロタイプによるものであり、それを分子マーカーとして利用することで後代の自家和合性個体を選抜可能であることを明らかにした。本研究で同定したこれら自家和合性 S^f ハプロタイプに関する知見やそれを利用した自家和合性個体選抜法は今後のウメ自家和合性新品種育成において非常に有用なものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

我が国のウメの主要経済品種のほとんどが示す自家不和合性という欠点を改善するため、栽培現場では豊産性で優良な果実品質をもつ自家和合性新品種の育成が強く望まれている。しかし、自家和合性の形質は実生が開花結実に至るまで調査できないことに加え、結果が環境の影響を強く受けるため、単年での評価が難しく、選抜には多大な労力と時間を要する。そこで本論文は、自家和合性個体の早期選抜マーカーの開発を試みたものである。評価できる点は以下のとおりである。

1. ウメの自家和合性 S ハプロタイプを同定するため、これまでに得られている他の *Prunus* 属果樹の S -RNase に関する知見を利用した PCR 分析、DNA ゲルプロット分析およびクローニングを行い、ウメの S -RNase の塩基配列を決定した結果、ウメの自家和合性品種が共通の S -RNase (S^f -RNase) 遺伝子をもつことを明らかにし、 S^f -RNase 遺伝子が自家和合性個体判別のための分子マーカーとして利用可能であることを示した。

2. 次に、 S^f -RNase 遺伝子の遺伝様式と自家和合性形質との関係について調査した結果、 S^f -RNase 遺伝子も他の S -RNase 遺伝子と同じ遺伝子座に座乗する対立遺伝子の 1 つであること、 S^f -RNase 遺伝子をもつ個体の自家和合性は S ハプロタイプ特異的なものであり、 S^f -RNase は S^f ハプロタイプをもつ花粉のみを認識・拒絶できないことを明らかにした。さらに、 S^f -RNase 遺伝子は自家和合性個体の判別に非常に有効なマーカーであることを示した。また、 S^f -RNase 遺伝子をもたない自家和合性個体 1K0-26 も新たに発見した。

3. 遺伝様式に関する結果から、 S^f -RNase 遺伝子もしくはそれと非常に強く連鎖している遺伝子の変異がウメの自家和合性の原因となっている可能性が高いことを示した。さらに、 S^f -RNase 遺伝子の全長配列のクローニングや発現解析を行った結果、 S^f -RNase 遺伝子の配列や転写・翻訳において特に自家和合性の原因となる変異は見られなかった。このことから、ウメの自家和合性は S^f -RNase 遺伝子自体ではなく密接に連鎖した別の遺伝子が原因であると考えられた。

4. 最後に、本研究で同定した自家和合性 S^f ハプロタイプを利用した自家和合性個体選抜法の開発を行った。まず、今回設計したプライマーによって S^f -RNase 遺伝子の特異的な増幅が可能であり、電気泳動でのバンドの有無で S^f -RNase 遺伝子の有無を判定できることを明らかにした。次に、近年開発された新しい遺伝子増幅技術である LAMP 法を用いて SFB^f 遺伝子の特異的な増幅を試み、今回設計したプライマーで 90 分間反応させれば、自家和合性品種特異的な増幅産物が得られ、しかもそれは目視で確認できることを示した。さらに、LAMP 法と簡易 DNA 抽出法を組み合わせることにより、非常に簡単かつ短時間で自家和合性個体を判別することが可能であることを示した。

以上のように、本論文はウメの自家和合性品種の育種の進展に貢献するとともに、*Prunus* 属果樹の自家不和合性機構の解明に新たな知見を加えたものであり、植物生産管理学、果樹園芸学および果樹育種学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 20 年 2 月 14 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。