

論文の内容の要旨

花卉の花色およびバレイショの塊茎色の突然変異育種に関する研究

岡村正愛

植物では 3,000 以上の突然変異品種が育成されているが、ほとんどがガンマ線照射や化学変異原によるものである。1980 年代に発見されたソマクローナル変異、1990 年代に生物研究の進んだイオンビーム照射突然変異、及び細胞組織培養とイオンビーム育種の併用効果について総合的に研究した事例は極少ない。多様化した突然変異育種技術について各々の特長と欠点を明確にし、各技術を実用化レベルで有効活用する指針を与える研究例はない。また突然変異はランダムに起こり研究の究極の目標は変異の方向性の制御であるとされるが、この研究例は極少ない。本研究では、多様な突然変異育種技術の特長と欠点を明らかにし各技術活用の指針を示すこと、及び突然変異において変異の方向性を制御することを試みた。

1. 細胞・組織培養系の開発によるソマクローナル変異利用育種

プロトプラスト培養系の開発は細胞生物学、生理学などの基礎面、また育種学など応用面ともに重要である。筆者はキク科植物の葉プロトプラスト培養においてアンモニウムイオンが阻害的な効果を及ぼすことを発見し、MS 培地等で 1% 程度であった細胞分裂頻度を、培地からアンモニウムイオンを除去することで 50% 以上にまで向上させることに成功した。また細胞壁分解酵素処理前に材料とする葉組織・細胞の生理状態を調節し細胞分裂活性を高めておくことで、プロトプラストからの細胞分裂頻度を向上させる手法を発見し、その応用によりキクやバレイショの葉プロトプラストからの効率的な植物体再分化系を開発した。この培養系を用いて変異を調査した結果、バレイショではプロトクローナル変異によりコロニー形成率および植物体再分化率が 4 倍以上になる変異を発見した。更にプロトクローナル変異による世界最初の実用化例となるバレイショ新品種「ジャガキッズ」の育成に成功した。

次にキク栽培品種で花色の培養変異を調査した。葉プロトクローンで様々な花色・花形変異体が出現したが草丈が低く実用的なものは得られなかった。一方、葉ソマクローンでは親と同等の栽培特性を持つ花色・花形の変異体が多数得られた。また花色の自然突然変異がほとんど出現しない濃紫桃品種「ローズクイーン」で、葉ソマクローンでは淡紫桃変異しか出現しなかったのに対し、管状花ソマクローンの中に鮮紫桃色に底白が入る新規覆輪が得られ、新品種「ロイヤルウェディング」を育成した。同様な手法をポットカーネーションに応用し新花色 2 品種を育成し、ソマクローン育種の有効性を実証した。またペチュニアプロトプラストからの植物体再分化系に X 線照射を併用し、交雑育種や放射線照射単独では得られなかった匍匐性赤色ペチュニアを世界に先駆けて育成した。

植物細胞は組織培養の過程で培地成分、脱分化、再分化などのストレスにさらされ、染色体や DNA 配列の変化、トランスポゾン活性化などの遺伝的変化に加え、DNA メチル化やクロモゾームリモデリングなどのエピジェネティックな変化を生む。本研究で実用化されたキク、バレイショに関して形質の安定性を調査した。バレイショプロトクローン品種は 20 年以上にわたり販売され続け安定した形質を示し、キク、カーネーション品種は 5 年以上に渡り 100 万本以上の切花・鉢花が市販されたが変異形質は安定していた。これはソマクローナル変異が安定した遺伝的変異を生む実用的な技術であることを事業化レベルで実証した貴重な例となった。

2. イオンビーム育種系の開発によるカーネーション花色変異の創製

イオンビームは、X線やガンマ線などの低 LET（線エネルギー付与）放射線と比較し高い生物効果をもち局所的に高エネルギーを付与するため、DNA 鎖の切断などの修復し難い変異を誘導する。しかし原子力機構 TIARA の炭素イオンビームの組織透過性は 2 mm である。筆者はカーネーションの葉表層から 0.5 mm の深さの組織細胞から植物体を再生する培養系を確立することでイオンビーム照射組織からの効率的な突然変異体獲得技術を開発し、炭素イオンビームはガンマ線に比べ 4 倍生物効果が高く、幅広い花色変異を生み出せることを実証した。また親品種の耐病性・早生性を維持しつつ花の形質が丸弁、覆輪、赤、桃などに变化したカーネーション品種シリーズを育成した。これはその後著しい発展を示すイオンビーム育種の先駆的研究となった。次にイオンビーム照射及びガンマ線急照射・緩照射による花色変異の幅と頻度を調査し、花色変異のスペクトルはイオンビーム照射 > ガンマ線緩照射 > ガンマ線急照射の順に広いことを示した。またイオンビーム照射、ガンマ線緩照射で得た黄色の花色素変異体は *CHI* と *DFR* 色素遺伝子の変異体であることを確認した。これらはイオンビーム育種研究会の発足と発展、その後のイオンビーム育種研究の広範な展開の基盤となった研究として注目される。

次に新規花色の創製にイオンビーム育種を応用した。カーネーションは、通常リンゴ酸でアシル化された 4 種のアントシアニンを主要アントシアニンとし各アントシアニンに対応した赤色、桃色、暗赤色および紫色を基本花色として発色する。一方、カーネーションには液胞内にアントシアニンの凝集体(AVIs)をもつ暗紫色花卉の特殊花色系統がある。筆者は特殊花色系統のメンデル遺伝様式を調査し特殊花色の発現はアシル化されていないアントシアニンからなる AVIs 形成による劣性形質であることを明らかにし、交配育種により青紫色の輝き花色系統を作出した。更にイオンビーム照射により赤紫、銅赤、赤の輝き花色系統を育成した。色素の同定及び花卉細胞の観察により青紫輝き花色系統及び赤紫輝き花色系統のアントシアニンは pelargonidin 3, 5-diglucoside (Pg3,5dG) であるのに対し銅赤輝き花色系統と赤輝き花色系統のアントシアニンは pelargonidin 3-glucoside (Pg3G)であった。また色素の凝集性が異なると花色の明るさに違いが出た。RT-PCR 遺伝子解析により、青紫輝き花色系統はアントシアニンの結合糖にリンゴ酸を転位する酵素遺伝子 *AMaIT* の発現がないことを解明した。つまりチェリー桃花色を示すアントシアニンのアシル基が欠落し Pg3,5dG へと変異し液胞内に凝集体が出現することで青紫輝き花色が発現したと考えられた。本研究により *AMaIT* の欠失が色素凝集を誘導し輝き花色を誘導することが明確にされた。またイオンビーム照射によりアン

トシアニンの 5 位の配糖化酵素遺伝子 *AA5GT* が欠失しアントシアニンが Pg3G へと変異し銅赤輝き及び赤輝き花色が発現すること、花卉の背軸側表皮細胞液胞内アントシアニンの凝集性が弱まる変異により明るい色調の輝き花色が生じることを各々明らかにした。新たな色調をつくるのは難しいとされていたカーネーションでイオンビーム照射により色素構造の変化、色素凝集の程度や色素量の変化を誘導し新たな輝き色調カーネーションを育成できることを示した。

イオンビーム育種により筆者が育成したカーネーション 5 品種は安定した形質を示し 10 年間以上継続販売され、経済効果は市場卸値レベルで国内外あわせ 60 億円以上となる。以上の事実はイオンビーム育種が、1) 変異の誘発率が高い、2) 変異のスペクトルが広く新奇変異が得られる、3) 変異する箇所は少なく不要な変異を伴わない変異体を得られる、という特長をもつことを品種育成・事業化レベルで実証した。

3. 花色突然変異の頻度およびスペクトルを意図的に向上させる試み

突然変異により特定の形質を狙ってその形質が変化した変異体を効率的に作出できれば画期的な技術となる。ソマクローナル変異では材料とする組織により得られる変異が異なると推定されていた。そこで放射線を照射される植物の生理状態が出現する突然変異の頻度と変異幅に影響するかについて、花色を指標として検討した。

キクは世界最大の生産量をもつ高次倍数性栄養繁殖花きであり、優良品種での花色幅拡大は重要な経済効果をもつため突然変異育種に適した植物と言える。実用品種育成では不要な変異を併発せずに目的変異を効率よく得ることが課題となる。キク栽培品種ヨミステリー（紫花色）を用いて、花色変異体の平均草丈が親品種の 90% 以上を維持し、かつ十分な花色変異頻度が得られる照射量で花と葉からイオンビーム照射クローンを作成し、花と葉からのソマクローンとあわせ総計 7,258 個体を調査した結果、1) 花色突然変異の出現頻度は葉ソマクロンの 2.01% ($\sigma=0.26$) に対し花ソマクローンでは 2.91% ($\sigma=0.55$) と材料組織による有意な差があること、2) イオンビーム照射した場合、花組織では 6.47% ($\sigma=0.77$)、葉組織では 3.89% ($\sigma=0.52$) となり組織特異的な変異出現率が高まること、3) またイオンビーム区でのみ濃赤、茶の花色突然変異体が発見することが各々わかった。この研究は、花色突然変異出現頻度が花組織と葉組織とで異なること、また花色突然変異頻度とスペクトラムはイオンビーム照射により顕著に高まることを示した最初の例である。

次に意図的に材料の生理状態を変化させることで突然変異の頻度や幅に差が出るかを試験した。ペチュニア（青紫花色）の実生を 3% ショ糖で処理すると茎頂等に色素が劇的に蓄積される。この茎頂に炭素イオンビームを照射し M2 系統を得た。葉緑素変異の出現頻度はショ糖処理区と無処理区とで同等であったが、花色の突然変異出現頻度はショ糖処理区が無処理区に比較して有意に高く、かつ無処理区では得られなかったピコティ、紫バイン、薄紫、白などの花色変異がショ糖処理区でのみ出現した。これは放射線を照射する細胞の状態を意図的に変化させてイオンビームを照射することで花色変異の頻度が向上しスペクトルが広がることを示す初めての例となった。

以上、本研究は、ソマクローナル変異育種及びイオンビーム育種での新たな知見獲得と技術を利用する際の指針を得るとともに、世界に先駆けた品種登録・事業化に至り、その後の産業応用の先駆的事例となった。カーネーションでは従来にない輝き花色の育成と関与遺伝子を確定した。さらに花色の突然変異スペクトルを意図的に拡大する手法について方向性を示し、今日の突然変異育種の課題に関する重要な知見となった。