



# 交配とS-Rnase解析に基づくセイヨウナシのS遺伝子型に関する研究

守谷, 友紀

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Date of Publication)

2010-12-03

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3971

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003971>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

交配と*S-RNase*解析に基づく  
セイヨウナシの*S*遺伝子型に関する研究

平成19年1月

神戸大学大学院自然科学研究科

守谷友紀

## 目次

序論	1
第1章 交配による不和合・和合の判定方法の確立	13
第2章 日本の栽培品種の <i>S</i> 遺伝子型推定と 10種類の <i>S</i> 対立遺伝子を識別するCAPSマーカーシステムの開発	29
第3章 国外の栽培品種の <i>S</i> 遺伝子型推定と 17種類の <i>S</i> 対立遺伝子を識別するCAPSマーカーシステムの確立の確立	69
第4章 三倍体品種の <i>S</i> 遺伝子型推定	139
第5章 ‘グランド・チャンピオン (Grand Champion)’ の部分的自家和合性	161
総合考察	183
謝辞	193
参考文献	195

## 序 論

### 自家不和合性および S 遺伝子型の研究の背景

植物の自家不和合性は、自殖を回避して他殖を促すことから、種の遺伝的な多様性を維持するしくみであると理解されている (de Nettancourt 2001). 日本における自家不和合性の研究は遺伝育種分野を中心に進み、近年、機構解明に関する分子生物学的研究が進展している (日向ら 2001). 育種では、自家不和合性を示す植物は自殖による形質の分離や遺伝的な固定が困難であるので、集団選抜育種や組み合わせ能力に基づく一代雑種育種が行なわれる (日向ら 2000). また、果樹生産では、自家不和合性は結実を支配する要因であり、結実の安定および生産性、さらには果実の品質に大きく関わっている. 果樹の中で、バラ科果樹の大部分、すなわちナシ亜科のリンゴ、ナシ類、サクラ亜科のオウトウ、ウメ、アンズ、スモモ、アーモンドなどは、ほとんどの品種が自家不和合性を有し、栽培における結実管理が必須である (杉浦ら 1991).

リンゴやセイヨウナシにおいては、結実不良の原因究明が行なわれ、古くから自家不和合性の存在が知られていた (Knight 1917; Dorsey 1923). 菊池 (1929)は、わが国の在来果樹であるニホンナシについて、黒斑病抵抗性などを目的とした交雑育種に取り組み、自家不和合性ととも品種間の交雑不和合性を見出している. また、自家不和合性の遺伝様式について、雑種後代の遺伝分析から偏父不和合性を明らかにしている. 偏父不和合性は、East (1925)がタバコの自家不和合性の遺伝解析において雌ずいと花粉の S (Sterile)遺伝子の作用について提起した離反因子説に基づくもので、交雑親が S 遺伝子を 1 つ共有する場合、後代の半数が花粉親と不和合となる性質である. 菊池はニホンナシで明らかにした偏父不和合性をこの離反因子説で説明した. その後、ニホンナシでは、交雑不和合性と偏父不和合性に基づいて、S1~S7 の対立遺伝子が同定され、23 品種が 10 種類の S 遺伝子型に分類された (寺見ら 1946). また、これら S 遺伝子型が明らかかな品種群との交雑不和合・和合の関係に基づいて品種の S 遺伝子型を決定する方法が確立され、栽培における受粉樹の選定や育種における交配関係の指標として用いられてきた.

リンゴでは、ドイツの Kobel et al. (1939)が、花柱内での花粉管伸長の観察に基づいて品種間に 11 個の S 対立遺伝子を同定するとともに、24 品種を 21 種類の S 遺伝子型に分類した. しかし、S 遺伝子型が推定された品種は当時のヨーロッパにおける栽培品種に限られていたので、その後の改良品種やアメリカで育成された品種、さらにそれらを導入した日本の栽培品種の S 遺伝子型の推定には適用できなかった. また、セイヨウナシにおいても、品種の自家不和合性およ

び品種間の交雑不和合性が調査されたが、交雑不和合を示す組み合わせが少なかったことから、*S* 遺伝子型の決定には至らなかった (Kobel et al. 1939; Crane and Lewis 1942; Griggs and Iwakiri 1954; Lewis and Modlibowska 1942; Modlibowska 1945; Rawes 1933). 交配によって *S* 遺伝子型を決定する場合には、交雑後代における *S* 対立遺伝子の分離比や広範な品種の交雑不和合・和合関係に基づいて対立遺伝子を同定し、*S* 遺伝子型の種類ごとにテスター品種を選定する必要がある。しかしながら、果樹では、交雑後代の実生樹の養成および開花に年数を要すること、交配実験においては受粉の労力や品種間における開花時期の不一致が問題となること、品種・系統の維持管理に多大な労力および広大な土地などが必要となることから、生産や育種計画における重要性にも関わらず、*S* 遺伝子の同定と品種の *S* 遺伝子型の決定は極めて困難であった。

### ***S* 遺伝子型研究の展開**

自家不和合性の研究は、遺伝様式の解析からメカニズムの解明へと発展し、花粉管の伸長の生理学的研究 (Linskens, 1967) から雌しべ側および花粉側 *S* 遺伝子産物の同定へと進歩してきた。アブラナ科、ナス科、バラ科、ゴマノハグサ科の自家不和合性では、*S* 遺伝子座に雌しべ側および花粉側の *S* 遺伝子が座乗し、*S* 対立遺伝子として配偶子に遺伝する。近年では、*S* 遺伝子を雌しべ側と花粉側 *S* 遺伝子の組として捉え、*S* 対立遺伝子の代わりに *S* ハプロタイプという用語を使用するようになってきている (McCubbin and Kao 2000)。胞子体型自家不和合性では、花粉の表現型は親植物 (胞子体) のハプロタイプにより決定され、花粉側および雌しべ側の両方に優性、劣性、共優性が存在する。遺伝子型 *S1S2* の親個体に由来する花粉が共優性の場合、花粉は *S1* と *S2* の両方の表現型を示すが、*S1* が *S2* に対して優性である場合、花粉の表現型は全て *S1* となり、どちらも花粉の表現型と同じハプロタイプを持つ雌しべに拒絶される (図 0-1)。一方、配偶体型では、花粉の表現型は花粉 (配偶体) のハプロタイプにより決定され、雌しべ側は共優性である。遺伝子型 *S1S2* の親個体に由来する花粉の表現型は *S1* または *S2* のどちらかであり、花粉と同じハプロタイプを持つ雌しべに拒絶される (図 0-1)。

対立遺伝子特異的な *S* 遺伝子産物の探索により、1977 年に胞子体型自家不和合性を示すアブラナ科植物の雌しべから、*S* 複対立遺伝子に特異的な *S* 糖タンパク質が初めて見出された (Nishio and Hinata 1977)。一方、配偶体型自家不和合性では、1986 年になってナス科のタバコの雌しべから、*S* 遺伝子に特異的な塩基性糖タンパク質が見出されるとともに (Anderson et al. 1986)、RNase 活性を有することが明らかにされ、*S*-RNase と呼ばれるようになった (McClure et al. 1989)。ニホンナシでも、2D-PAGE により *S1*~*S7* 遺伝子に対応する *S1*~*S7*-RNase が同定された

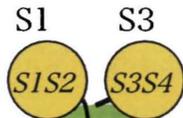
胞子体型自家不和合性

配偶体型自家不和合性

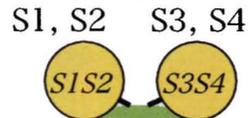
花粉側の優劣  
 $S1 > S2, S3 > S4$

花粉側の優劣  
 $S1 = S2, S3 = S4$

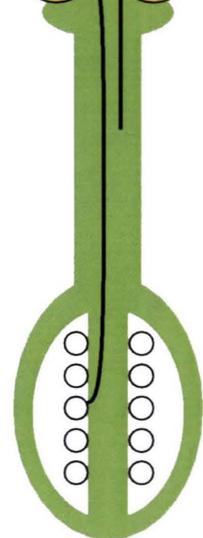
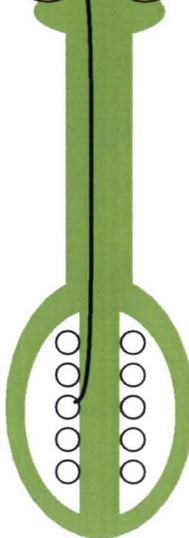
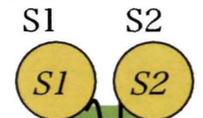
花粉の表現型



花粉の表現型



花粉の表現型



雌しべ側  
 $S2S3$

雌しべ側  
 $S2S3$

雌しべ側  
 $S2S3$

図0-1 胞子体型および配偶体型自家不和合性の模式図.  
 (雌しべ側に優劣がない場合)

(Sassa et al. 1993, 1994, 1996; Ishimizu et al. 1996). ニホンナシにおいて、これらの S-RNase は自家不和合性が発現し始める開花 3~1 日前から急増する (Ishimizu et al. 1996). また、自家和合性品種の‘おさ二十世紀’ (S2S4<sup>ms</sup>) では、花柱タンパク質中に S4-RNase が検出されず (Ishimizu et al. 1996), その原因は S4-RNase 遺伝子の欠失によることが示され (Sassa et al. 1997), ニホンナシにおける自家不和合性の雌しべ側の S 遺伝子産物が明らかになるとともに、その分子的な研究が開始された.

Norioka et al. (1996) はニホンナシの花柱から S-RNase をコードする cDNA をクローニングし、それらの塩基配列を決定している. 各 S-RNase の推定アミノ酸配列には N 末端に 22~27 残基のシグナルペプチドが認められ、RNase 活性に必須な 2 つのヒスチジン残基、立体構造に関わる 8 つのシステイン残基が保存されている. 推定アミノ酸配列の比較から、S-RNase には 5 つの保存領域 (C1, C2, C3, RC4, C5) とアミノ酸配列の変化に富んだ 1 つの超可変領域 (HV 領域) が同定されている (図 0-2). HV 領域の推定アミノ酸配列は S 対立遺伝子特異的であり、花粉との自他認識に関与すると推測されている (Norioka et al. 1996; Sassa et al. 1996; Ishimizu et al. 1998).

ニホンナシでは、この S-RNase の塩基配列情報に基づいて、ゲノミック PCR を利用した S 遺伝子型の推定方法が検討された. S-RNase 特異的なコンセンサスプライマーを用いたゲノミック PCR により約 350~1300 bp の断片 (HV 領域とイントロンを含む) を増幅し、6 種類の制限酵素で S 対立遺伝子特異的に切断する方法が考案された (Ishimizu et al. 1999). Castillo et al. (2002) は、この S-RNase の塩基配列に基づく CAPS マーカーシステムによりニホンナシ品種の既知 S 遺伝子型を再検討するとともに、未確定の品種の S 遺伝子型を推定した. ‘赤徳’など既知の S 遺伝子型との不一致が見出された 4 品種の S 遺伝子型については、交配実験の結果に基づき S 遺伝子型を修正するとともに、新たに推定された‘早生幸蔵’と‘真鍮’の S 遺伝子型についても、交配による検証を行ない、S-RNase に基づく CAPS マーカーシステムによる推定方法の信頼性を確認した. また、近年の育成品種には S1~S7-RNase 以外の新規の S 遺伝子が存在したことから、新たに S8-および S9-RNase がクローニングされ、S1~S9-RNase を増幅できるコンセンサスプライマーを用いたゲノミック PCR と 9 種類の制限酵素処理からなる CAPS マーカーシステムが確立された (Castillo et al. 2002; Takasaki et al. 2004). この CAPS マーカーシステムと交配により、ニホンナシの栽培品種全体の S 遺伝子型推定が可能になっている.

ニホンナシにおける S-RNase に基づいた遺伝子型推定システムの開発に続いて、リンゴにおいても S 遺伝子型の推定方法が開発された. 小森ら (1998a, b) は、わが国で栽培されているリンゴ品種で知られてきた交雑不和合・和合関係から 6 種類の S 対立遺伝子を同定するとともに、主



要 11 品種を 7 種類の *S* 遺伝子型に分類した。また、*S-RNase* に基づく *S* 遺伝子型推定がヨーロッパ、アメリカ、日本で進められた (Janssens et al. 1995; Matsumoto et al. 1999a, b; Sakurai et al. 2000; Broothaerts 2003)。これらの研究から、*S-RNase* 対立遺伝子に特異的なプライマーセットを用いたゲノミック PCR により約 200~920 bp の *S-RNase* 断片 (これら断片は必ずしも HV 領域およびイントロンを含まない)を増幅し、その後の追加的な制限酵素処理と併せて、*S-RNase* 対立遺伝子を識別し、品種の遺伝子型推定を可能にするシステムが構築された。したがって、リングでは *S* 遺伝子型が未確定な品種の推定には、すべての *S* 遺伝子特異的プライマーセットを用いたゲノミック PCR が必要である。

これらシステムにより推定された品種の *S* 遺伝子型は交配により確認される必要がある。ニホンナシにおいては、交配により決定された *S* 遺伝子型を持つテスター品種が存在し、交雑不和合・和合の判定により確認できる。また、新規 *S* 遺伝子の同定には、*S-RNase* の雌しべにおける特異的発現、および、対立性検定としての後代検定が必須とされ、交配による不和合・和合の機能性の確認を行なってシステムに対する信頼性を確認する必要がある (Castillo et al. 2002; Takasaki et al. 2004)。しかしながら、必ずしも同じ *S* 遺伝子型を持つ品種が存在するとは限らず、交配により全ての *S* 遺伝子型を確認できないことから、推定システム自体の信頼性を高める必要がある。

## セイヨウナシの栽培品種群

セイヨウナシ (*Pyrus communis* L.)はリンゴ (*Malus × domestica* Borkh.)やニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai)と同じバラ科ナシ亜科の落葉果樹である。ナシ亜科植物の原生地はヒマラヤ山脈北側から天山山脈にわたる地域とされ、各樹種の祖先種はそこから東西に伝播しつつ種分化を遂げている。ナシ属 (*Pyrus*)のうち、東へ伝播したグループは、チュウゴクナシ (*Pyrus ussuriensis* Maxim)やニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai)を含むアジア種群を形成している。また西部ユーラシアから中央アジア方面で種分化したグループからは、種間交雑により現在のセイヨウナシ (*Pyrus communis*)の祖先種が成立し、栽培種として中央アジア、小アジア、アフリカさらにヨーロッパへと広まったと推測されている (Janick Fruit Breeding 1996)。

セイヨウナシの栽培の歴史は極めて古く、約3000年前の古代ギリシャ時代には既に栽培が始まり、ローマ時代の文献には41品種が紹介されている (Janick Fruit Breeding 1996)。16~17世紀にはベルギー、フランス、イギリスなどの王侯貴族の下で栽培が盛んになり、1750~1850年代はセイヨウナシ育種の黄金期として、現在に伝わる多くの品種が育成された。‘Flemish Beauty’、

‘Winter Nelis’, ‘Beurré d’Anjou’, ‘Beurré Bosc’などはベルギーの育種家達が育成した品種で、Buttery と呼ばれるセイヨウナシ特有の優れた肉質が選抜されている。イギリスにはセイヨウナシは自生していなかったが、ローマ人の遠征以前には持ち込まれており、1770年に野生のナシから発見された‘Williams (Bartlett)’や 1860年頃に育成された‘Conference’は、現在、世界的な経済品種となっている。The Pears of New York (Hedrick 1921)には 2927品種が掲載されており、その後もヨーロッパや北米を中心に活発な育種が行なわれていることから、品種数は3000を超えると予想される。

現在、落葉果樹の中でブドウ、リンゴに次ぐ生産量を持つナシ類は、世界 82ヶ国で生産されており、そのうちセイヨウナシは、ヨーロッパと南北アメリカ、南アフリカ、オセアニアでの生産が多い(岩堀 2002)。生産の多くは自国消費であるが、アルゼンチンとチリではそれぞれ生産量の 75%および 50%が輸出されている (Sanchez 2002)。ヨーロッパ諸国における栽培は長い歴史を持ち、国内消費を主体としていることから、品種構成に地域的な特色が認められる(表 0-1)。「Williams (Bartlett)」はフランス、オーストリア、ルクセンブルクで、「Conference」はイギリス、オランダ、ベルギー、ドイツでそれぞれ首位を占めている。また、イタリアでは‘Abbé fetal’、スペインは‘Blanquilla’、ポルトガルは‘Rocha’がそれぞれ主要品種であり、さらにイタリアの‘Coscia’、フランスの‘Docteur Jules Guyot (Precoc)’および‘Doyenné du Comice’、ベルギーの‘Durondeau’、スウェーデンおよびデンマークの‘Clara Frijs’なども栽培品種として取り上げられている。アメリカなどヨーロッパ以外の地域においては、「Bartlett (Williams)」が国内向けとして、「Beurré d’Anjou’, ‘Beurré Bosc’, ‘Packam’s Triumph」などが輸出用として栽培されている。世界的にみると、セイヨウナシの生産は増加傾向にあり、新品種の導入による栽培適地の拡大が図られている。病虫害抵抗性や栽培特性などの重要な育種目標は、広範な品種を基盤とする交配・選抜により育成されようとしているが(岩堀 2002)、一方で、果実特性や生産性の改良に関しては、主要品種同士や主要品種の後代を用いて交配が行なわれる場合が多く、新品種に占める特定品種の後代の割合が増加している (Sanzol et al. 2002)。

日本では、在来果樹のニホンナシがナシ類栽培の主体となってきた。セイヨウナシは、リンゴやブドウなど同様、明治のはじめにアメリカやフランスから導入されて栽培が始まった(梶浦 農業技術体系 1983)。導入品種の多くは、わが国の高温多湿の気候条件に適応しなかったが、開花期に雨の少ない東北地方や長野県などの一部地域には定着し、小規模の栽培で推移した。昭和 40年代には、園芸振興策に沿って‘パートレット’が缶詰用として奨励され、栽培面積も 1,900 ha までに増加したが、その後は加工産業の衰退により約 700 ha 程度に減少した(果実日本

表0-1 セイヨウナシ主要栽培国における生産量と主要品種

国名	生産量 (t) <sup>2</sup>	主要栽培品種 <sup>3</sup>
イタリア	844,551	Abate Fetel, William's (Bartlett), Conference, Doyenne du Comice, Beurré Bosc, Coscia
アメリカ	773,810	William's (Bartlett), Doyenne du Comice, Beurré Anjou, Red Anjou, Red Clapp's, Seckel, Forelle
スペイン	679,400	Blanquilla, Coscia, Conference, Ercolini, Docteur Jules Guyot
アルゼンチン	509,749	William's (Bartlett), Packham's Triumph, Beurré Anjou
ドイツ	400,000	Alexandra Lucas, William's (Bartlett), Conference, Louise Bonne d'Avranches
南アフリカ	342,928	Packham's Triumph, Beurré Bosc, William's (Bartlett), Forelle
トルコ	340,000	Akca, Ankara, Santa Maria, William's (Bartlett)
フランス	279,000	William's (Bartlett), Docteur Jules Guyot, Conference, Doyenne du Comice, Passe Crassane
ベルギー	231,000	Conference, Doyenne du Comice, Durondeau, Triomphe de Vienne, Beurre Hardy, Concorde
チリ	212,000	Packham's Triumph, Beurré Bosc, William's (Bartlett)
オランダ	208,000	Conference, Doyenne du Comice, Triomphe de Vienne, Alexandra Lucas
インド	200,000	William's (Bartlett), Conference, Early China, Max Red Bartlett, Starkrimson, Flemish Beauty
ポルトガル	131,000	Rocha, Clapp's Favourite, Passe Crassane
オーストラリア	130,000	Packham's Triumph, Beurré Bosc, William's (Bartlett), Joséphine de Malines
オーストリア	125,000	William's (Bartlett), Beurré Bosc, Louise Bonne d'Avranches

生産量の多い国のうち、品種に関する文献がみられた国を掲載した。品種は概ね生産量の多い順に記載した。

<sup>2</sup>: 国連食糧農業機関 2005年統計。

<sup>3</sup>: Eurostat統計 2006, 岩堀 2002, USDA/FAS 2006, Australian Bureau of Statistics 2006, Sharma et al. 2002, Karadeniz 1997.

1999).

近年の予冷・追熟技術の進歩や、山形、新潟、長野などを中心とした産地における栽培技術の向上努力により、セイヨウナシの果実品質は著しく向上している。特に芳香、食感、食味に優れた‘ラ・フランス’は評価の高まりとともに生食用果実としての需要が増加している。また、‘ラ・フランス’の消費拡大に伴い、セイヨウナシ自体の認知度・評価も高まり、多様な品種が市場に流通するようになってきている。その結果、セイヨウナシ全体の栽培面積（約 1,750 ha）および生産量（32,200 t）はともに回復してきている（農林水産統計 2006）。栽培品種は、‘ラ・フランス’が栽培面積の 62.4%を占め、以下‘パートレット’（7.6%）、‘ル・レクチュエ’（6.5%）、‘シルバー・ベル’（‘ラ・フランス’の自然交雑実生）（4.0%）、‘ゼネラル・レクラーク’（3.7%）と続く。早生優良品種として‘オーロラ’（3.0%）、中生優良品種として‘マルゲリット・マリーラ’（2.8%）も栽培面積が増加している（表0-2、図0-3）。この他に、生産量は少量であるが、18品種が栽培品種として取り上げられており、古くからの品種として、‘アレクサンドリン・デュイヤール’、‘ウィンター・ネリス’、‘コンファレンス’、‘グランド・チャンピオン’、‘セニョール・デスペラン’、‘ドワイエネ・デュ・コムス’、‘プレコース’、‘フレミッシュ・ビューティー’、‘マックス・レッド・パートレット’、‘パス・クラサン’、新品種あるいは新規の導入品種として、‘エル・ドラド’、‘カリフォルニア’、‘スタークリームソン’、‘デポー’、‘ポートヌ’、‘ミクルマス・ネリス’、‘越さやか’、‘バラード’が挙げられ、総計は 25 品種に及んでいる。これらの中には、新潟県の‘ル・レクチュエ’、青森県の‘ゼネラル・レクラーク’、山形県の‘シルバー・ベル’など各地域の特産品種となっている品種もある。したがって、セイヨウナシは日本においても、他の樹種に比べて品種構成に地域性があり、世界における生産の状況と同様の傾向にある。

日本のセイヨウナシ栽培は、導入の経緯や栽培適地に関して、同様に北部温帯果樹として定着したオウトウとの類似点が多い。オウトウは、導入品種である‘ナポレオン’の品質向上が優先的に行なわれ、市場に定着した。‘佐藤錦’が育成された 1912 年以降は、品質的に優れた新品種が育成され、アメリカからの輸入チェリーと競合しつつも需要と生産を活性化させてきた。‘ラ・フランス’によって生食用果樹としての定着を成し遂げたセイヨウナシについても、今後の需要と生産の規模拡大の観点から‘ラ・フランス’中心の品種構成の見直しが検討されてきた。特に、出荷量の 71%を占める‘ラ・フランス’が晩生品種であることから、早生および中生品種の出荷量を増やすことにより需要拡大と宣伝効果をもたらされると期待されている。そのため、‘ラ・フランス’より早い時期に収穫できる優良品種の育成が最も重視され、‘パートレット’と‘ラ・フランス’の雑種後代から中生品種の‘越さやか’と‘バラード’が選抜・育成されている。

表0-2 日本におけるセイヨウナシ品種別栽培割合 (2004年)

品種	品種別割合 (%) <sup>z</sup>	栽培面積 (ha) <sup>y</sup>
ラ・フランス	62.4	1196.8
パートレット	7.6	146.5
ル・レクチェ	6.5	124.9
シルバー・ベル	4.0	76.9
ゼネラル・レクラーク	3.7	70.2
オーロラ	3.0	57.6
マルゲリット・マリーラ	2.8	54.1
フレミッシュ・ビューティー	2.0	38.8
セニョール・デスペラン	1.7	33.5
プレコース	1.3	24.2
マックス・レッド・パートレット	1.0	19.8
バラード	1.0	18.7
その他	2.9	55.3

<sup>z</sup>: 耕地及び作付面積統計 2005に基づき, 2004年の栽培総面積を 1917.3 haとして算出した.

<sup>y</sup>: 栽培面積は特産果樹生産動態等調査 2004に基づいた.

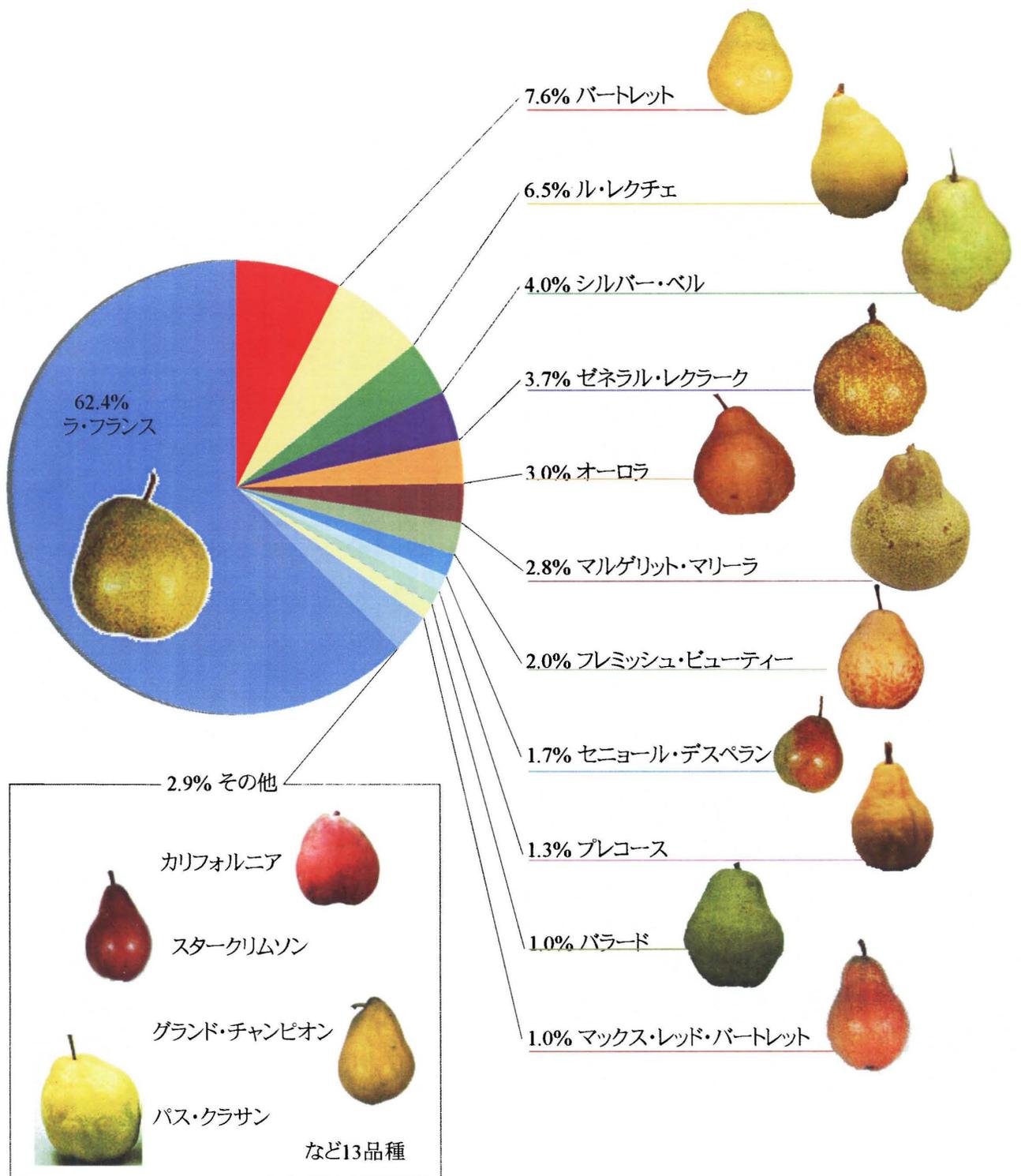


図0-3 日本におけるセイヨウナシ品種別栽培割合

平成16年の作付総面積を1917.3 haとし、各品種の栽培面積は「平成16年産特産果樹生産動態等調査 西洋なし」に基づいた。

他の果樹に比べて生産国や地域ごとの栽培品種の構成に差があるセイヨウナシにおいては、結実に関する研究にはその地域で主に栽培されている特定品種を供試する 경우가多く、この状況はセイヨウナシの結実管理に大きく影響する自家不和合性や単為結果性についての研究でも同様である (Brown and Childs 1929; Griggs and Iwakiri 1954; Westwood and Grim 1962; Ruiz 1977; Marcucci and Visser 1983). しかしながら、これら研究は、気象および土壌条件、栽培方法などの環境条件が異なる上、実験方法が統一されていないことから、結果を比較して議論することができない場合が多い。それぞれの結果は、その地域の栽培現場への応用など農学的側面では非常に有益であるが、セイヨウナシの結実に関与する自家不和合性や単為結果性の理解という生物学的側面では、品種と地域が限定された知見にとどまっている。したがって、セイヨウナシの結実安定性を議論する上では、同じ環境条件下で多数の品種を扱った実験による知見、および、異なる環境下における実験結果の比較を可能にする方法が必要である。

本研究では、セイヨウナシの生産と育種の両方に関連する自家不和合性を取り上げ、セイヨウナシ品種の交雑不和合・和合関係を明らかにすることを目的とした。交配実験においては、セイヨウナシの単為結果性を考慮した交配による不和合・和合の判定方法を確立し、異なる調査地・調査年における自家不和合性の評価を可能にした (第 1 章)。一方で、セイヨウナシにおいても雌しべ側 *S* 遺伝子産物は *S-RNase* であるという仮定に基づき、*S-RNase* の同定により日本および世界的な栽培品種の *S* 遺伝子型を推定した。対立遺伝子特異性の認識の分子的機構が未解明である点を考慮に入れて、*S-RNase* 対立遺伝子のクローニングにおいては完全長塩基配列を決定するとともに、*S-RNase* の多型性に基づく *S* 遺伝子型の推定システムを構築した (第 2, 3, 4 章)。さらに、自家不和合性を有するバラ科果樹の生産および育種や学問的研究において重要な自家和合性について、*S-RNase* を基にした解析を行なった (第 5 章)。

## 第 1 章

### 交配による不和合・和合の判定方法の確立

#### <摘要>

セイヨウナシの自家および交雑不和合性は結実率や種子数により判定されてきたが、それらの評価は明確ではない。本章では交配による不和合・和合の判定方法を確立するため、セイヨウナシ 10 品種を用いて 1 花そう 1 花の除雄無受粉、自家受粉、他家受粉を行ない、各品種の単為結果性、自家不和合性、品種間の交雑不和合性を調査した。供試したすべての品種が単為結果性を有していたことから、結実率では不和合・和合を識別できなかった。しかし、新たに提案した SI (Self-Incompatibility) index [(評価対象の交配における交配花数当たりの充実種子数)/(和合交配における交配花数当たりの充実種子数)×100]により不和合・和合の判定が可能になった。その結果、‘グランド・チャンピオン’は部分的自家和合であり、他の品種は自家不和合であると判定された。有種子果実の品質は単為結果果実よりも優れており、単為結果性を有するセイヨウナシでも安定的な良質果実の生産には和合花粉の受粉が必要であることが明らかになった。‘フレミッシュ・ビューティー’と‘スタークリームソン’および‘パートレット’と‘セニョール・デスペラン’の 2 つの組み合わせが交雑不和合を示した。

#### <緒言>

セイヨウナシにおける品種の自家不和合性および品種間の交雑不和合性は、和合受粉に対する不和合受粉の結実率や種子数を指標として調査されている (Crane and Lewis 1942; Griggs and Iwakiri 1954; Lewis and Modlibowska 1942; Modlibowska 1945; Rawes 1933)。二倍体の‘Fertility’は部分的自家不和合、四倍体の‘Fertility’および‘パートレット’は完全な自家和合であるが、その他のほとんどのセイヨウナシ二倍体品種および三倍体品種は自家不和合と報告されている (Crane and Thomas 1939)。自家不和合品種において結実を確保するには、ニホンナシやリンゴと同様に S 遺伝子型に基づいた受粉樹の混植が必要とされる。しかし、Modlibowska (1945)が挙げた 7 種類の品種組み合わせ、‘Belle Lucrative (セニョール・デスペラン)’×‘Louise Bonne de Jersey (Loise Bonne d’Avranches)’、‘Belle Lucrative’×‘Seckel’, ‘Louise Bonne de Jersey’×‘Seckel’, ‘Louise

Bonne de Jersey'×'William's Bon Chrétien (パートレット)', 'William's Bon Chrétien'×'Seckel', 'Beurré d'Amanlis (3x)'×'Conference (2x)', 'Fertility (4x)'×'Fertility (2x)'以外に、交雑不和合の組み合わせを見出せなかったことから、セイヨウナシのS遺伝子型は決定されていない。

セイヨウナシには、種子が形成されなくても結実する単為結果性を持つ品種が多いが (Nyéki et al. 1994), 上記の初期報告では、結実率に対する単為結果性の影響が考慮されていない。単為結果性能力の高い品種を交配親とした場合、不和合受粉でも多くの果実を結実することから、不和合を和合と誤って判定している可能性も考えられる。また、和合受粉は不和合・和合の判定においてコントロールとして用いられるため、100%に近い安定した結実率が求められるが、結実率4.0%以上を和合と判定している Rawes (1933)の実験など、低い結実率ながら和合とされている交配も数多く記載されている。その要因として、生理落果による結実数の減少が考えられるが、果実数に影響すると予想される1花そうあたりの交配花数や結実数の調査時期は言及されていない。

セイヨウナシにおいて、結実率に基づく不和合・和合の判定には課題が多く存在したことから、Sanzol and Herrero (2002)は花粉管伸長試験を行ない、胚珠に到達した花粉管数から不和合・和合を判定する方法を開発し、'パートレット', 'Coscia', および、'パートレット'×'Coscia'の交雑後代に4種類のS対立遺伝子を見出し、6品種のS遺伝子型を推定している。この方法は不和合・和合を明確に判定できるが、花器官を必要とするため交雑後代のS遺伝子型を早期に推定することができない。一方、ニホンナシとリンゴでは結実率や種子数を指標とする不和合・和合の判定方法が取り入れられている。ニホンナシでは1花そう2花で交配を行ない、結実率30%以上を和合、30%未満を不和合とみなしている (佐藤ら 1992)。リンゴでは1花そう1花で交配し、結実率30%以上を和合、15%以上30%未満を混合領域、15%未満を不和合とし、果実当たり種子数3.0個以上を和合、1.5個以上3.0個未満を混合領域、1.5個未満を不和合とし、2年間の交配結果から判定している (小森ら 1998a)。また、どちらにおいても和合受粉の結実率と充実種子数により花粉および雌性組織の稔性が確認されている。したがって、セイヨウナシでも結実率や種子数を指標とする不和合・和合の判定方法を確立することが望まれる。

そこで、本章では、結実率や種子数を指標とするセイヨウナシの不和合・和合の判定方法を検討するために、日本の栽培品種10品種に対して除雄無受粉、自家受粉、他家受粉を行ない、着果率、結実率、果実中の充実種子数を調査した。その結果から、品種の単為結果性と自家不和合性、および、品種間の交雑不和合性を評価し、交配によるセイヨウナシの不和合・和合の判定方法を考案した。また、無種子果実 (単為結果果実)と有種子果実の形質を比較し、セイヨウナシ

においても和合他家受粉が必要であることを検証した。

## ＜材料および方法＞

### 材料

弘前大学農学生命科学部生物共生教育研究センター藤崎農場（青森県藤崎町）および長野県果樹試験場（長野県須坂市）に栽植されているセイヨウナシ 10 品種、‘ラ・フランス’、‘グランド・チャンピオン’、‘パートレット’、‘プレコース’、‘フレミッシュ・ビューティー’、‘コンファレンス’、‘スタークリームソン’、‘セニョール・デスペラン’、‘パス・クラサン’、‘ル・レクチェ’を実験に供した。供試した樹はいずれも変則主幹形もしくは遅延開心形仕立ての成木（樹齢不明）で、樹冠下を清耕、樹間を草生とする部分草生により圃場管理がなされ、慣行法により栽培されている。

### 方法

#### 交配実験

2000 年 5 月 7～12 日、2001 年 5 月 1～7 日、2002 年 4 月 21～26 日にかけて弘前大学藤崎農場において、2001 年 4 月 21～26 日、2002 年 4 月 13～17 日にかけて長野県果樹試験場において交配を行なった。交配前日にバルーンステージの蕾から採薬し、白熱灯下で開薬させて花粉を採取した。短果枝に着花したバルーンステージの 3～5 番花の蕾を除雄した後、リップブラシを用いて柱頭に受粉した。交配後に他の花粉が混入するのを防ぐため、パラフィン紙で作製した小袋を被せた。自家受粉と他家受粉は 1 花そう 1 花または 2 花で行なった。除雄無受粉はバルーンステージの蕾を 1 花そう 1 花に調整して除雄した後、パラフィン紙製の小袋を被せた。

#### 着果・結実数調査

交配約 4 週間後（June drop 前）に着果数を調査して着果率を算出するとともに、パラフィン紙製の小袋をニホンナシ用果実袋（大袋）に付け替えた。また、交配約 10 週間後（June drop 後）に果実を収穫して結実数から結実率を算出するとともに、これらの果実に含まれる充実種子数、未熟種子数、種子総数を調査した。

#### 果実形質の比較

2002 年に行なった除雄無受粉および和合他家受粉により結実した無種子果実および有種子

果実を適期に収穫した。‘パートレット’9月4日(弘前),‘コンファレンス’9月9日(長野),‘フレミッシュ・ビューティー’,および‘グランド・チャンピオン’10月1日(弘前),‘ラ・フランス’10月16日(長野),‘ル・レクチェ’,および‘パス・クラサン’10月19日(長野)に収穫を行ない,果実重量,縦径,横径を測定した。4℃で7~10日間予冷した後,室温で追熟させ,可溶性固形成分含量(糖含量)と有機酸含量を測定した。糖含量は屈折糖度計(株エルマ)により測定した。有機酸含量は滴定により測定した。測定の前に,1gのフェノールフタレインを100mlの50%エタノールに溶解し(50mlの100%エタノールに溶解後,50mlの蒸留水で定量),フェノールフタレイン指示薬を作製した。また,0.1NのNaOH(4gの特級NaOHを脱塩水に溶かして1000mlに定量)10mlを0.1N(0.05M)のシュウ酸で滴定し,滴定量(ml)/10mlをfactorとした。果実の赤道部の果肉をガーゼによって絞り,フェノールフタレイン指示薬を2,3滴添加し,標定済みの0.1NのNaOHで滴定した。セイヨウナシの主要な有機酸はリンゴ酸であるので,果実の有機酸含量(リンゴ酸g/100ml)= $0.0067 \text{ g} \times (\text{滴定量 ml}) \times 100 / (\text{果汁量 ml}) \times \text{factor}$ の計算式で算出した。

## <結果および考察>

### 花そう当たりの交配花数が結実に与える影響

国内でも日本の栽培品種を用いた交配実験が行なわれ,結実率や種子数を指標としたセイヨウナシの自家および交雑不和合・和合性の調査が行なわれている。小野田ら(1987)は1花そう2花で交配し,交配後2ヶ月後に結実調査を,久保ら(1989)は1花そう3花で交配し,交配後1ヶ月後に結実調査を行なっている。和合と判定された交配では,果実当たり平均4~9個の充実種子が含まれているにもかかわらず,‘パートレット’,‘フレミッシュ・ビューティー’,‘ル・レクチェ’の結実率は50%以下を示している。

2000年に弘前大学藤崎農場において,セイヨウナシ5品種に対して1花そう2花で他家受粉を行ない,着果率と結実率を調査した(表1-1)。「フレミッシュ・ビューティー」の着果率は71.7%と低く,「グランド・チャンピオン」と「ラ・フランス」は90.0%と86.7%の着果率を示したものの,結実率は75%以下になった。セイヨウナシの和合受粉における結実率の低さは幼果間の養分競合による生理落果に起因すると考え,2001年に弘前大学藤崎農場および長野県果樹試験場に栽植されている日本の栽培品種10品種に対して1花そう1花または2花で他家受粉を行ない,着果率と結実率を調査した(表1-1,-2)。2000年の結果をふまえて,「グランド・チャンピオン」,「フレ

表1-1 1花そう1花または2花の自家および他家受粉による結実数と充実種子数 (弘前大学藤崎農場)

種子親	調査年	花粉親	花そう		着果率 (%)	結実率 (%)	Seeds /Fruit	Seeds /Flower	SI index
			あたり交配花数	交配花数					
パートレット	2000	フレミッシュ・ビューティー	2	58	93.3	91.4	6.2	5.7 <sup>2</sup>	
		パートレット	2	30	10.0	3.3	1.0	0.1	0.1
	2001	フレミッシュ・ビューティー	2	30	96.7	96.7	4.1	4.0 <sup>2</sup>	
		パートレット	2	30	36.7	36.7	0.0	0.0	0.0
	2002	グランド・チャンピオン	2	30	100.0	83.3	8.1	6.8	
			1	30	100.0	100.0	6.5	6.5 <sup>2</sup>	
		パートレット	1	30	46.7	40.0	0.4	0.2	3.1
		セニョール・デスペラン	1	30	33.3	26.7	0.0	0.0	0.0
フレミッシュ・ビューティー	2000	スタークリムソン	1	10	100.0	100.0	6.3	6.3	
		ラ・フランス	2	60	71.7	61.7	3.5	2.2	
	2001	フレミッシュ・ビューティー	2	30	66.7	50.0	0.0	0.0	
		ラ・フランス	1	28	100.0	96.4	7.4	6.9 <sup>2</sup>	
	2002	フレミッシュ・ビューティー	1	29	93.3	93.1	0.0	0.0	0.0
		ラ・フランス	2	28	100.0	75.0	7.2	5.4	
			1	28	100.0	96.4	7.4	6.9 <sup>2</sup>	
		フレミッシュ・ビューティー	1	27	93.3	88.9	0.0	0.0	0.0
グランド・チャンピオン	2000	スタークリムソン	1	30	73.3	65.5	0.0	0.0	0.0
		セニョール・デスペラン	1	10	100.0	100.0	9.1	9.1	
	2001	パートレット	2	30	90.0	73.3	4.4	3.2	
		グランド・チャンピオン	2	28	85.7	78.6	2.7	2.1	
	2002	パートレット	1	15	100.0	100.0	6.9	6.9 <sup>2</sup>	
		グランド・チャンピオン	1	30	96.7	96.7	4.1	4.1	59.4
	2001	パートレット	1	15	100.0	100.0	6.9	6.9 <sup>2</sup>	
		グランド・チャンピオン	1	30	96.7	96.7	4.1	4.1	59.4
ラ・フランス	2000	パートレット	1	58	100.0	96.6	6.3	6.1 <sup>2</sup>	
		グランド・チャンピオン	1	69	94.3	85.5	1.2	1.0	16.4
	2001	フレミッシュ・ビューティー	2	60	86.7	75.0	4.2	3.1	
		ラ・フランス	2	28	64.3	25.0	0.0	0.0	
	2002	フレミッシュ・ビューティー	1	29	100.0	82.8	4.6	3.8 <sup>2</sup>	
		ラ・フランス	1	28	100.0	57.1	0.0	0.0	0.0
	2001	グランド・チャンピオン	1	10	100.0	80.0	8.3	6.6 <sup>2</sup>	
		ラ・フランス	1	29	100.0	58.6	0.0	0.0	0.0
プレコース	2000	フレミッシュ・ビューティー	2	60	98.3	95.0	5.7	5.4 <sup>2</sup>	
		プレコース	2	30	36.7	26.7	0.4	0.1	1.9
	2001	グランド・チャンピオン	2	30	100.0	100.0	7.5	7.5 <sup>2</sup>	
		プレコース	2	28	43.3	25.0	0.0	0.0	0.0
	2002	フレミッシュ・ビューティー	2	30	100.0	80.0	3.8	3.0	
			1	30	100.0	86.7	4.8	4.0 <sup>2</sup>	
		プレコース	1	40	82.5	27.5	0.3	0.1	2.5

<sup>2</sup> SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

表1-2 1花そう1花または2花の自家および他家受粉による結実数と充実種子数（長野県果樹試験場）

種子親	調査年	花粉親	花そう				結実率 (%)	Seeds /Fruit	Seeds /Flower	SI index
			あたり交配花数	交配花数	着果率 (%)	交配率 (%)				
コンファレンス	2001	パス・クラサン	2	30	76.7	36.7	1.5	0.6		
		コンファレンス	2	30	90.0	10.0	0.0	0.0		
	2002	スタークリームソン	2	30	93.3	83.3	3.4	2.6		
			1	49	98.0	93.9	3.2	3.0 <sup>z</sup>		
		コンファレンス	1	28	82.1	35.7	0.0	0.0	0.0	
ラ・フランス	2001	パス・クラサン	1	30	93.3	93.3	4.0	3.8 <sup>z</sup>		
		ラ・フランス	1	30	96.7	86.7	0.0	0.0	0.0	
	2002	パス・クラサン	2	30	100.0	100.0	8.0	8.0		
			1	58	98.3	98.3	7.9	8.1 <sup>z</sup>		
		ラ・フランス	1	27	100.0	92.6	0.0	0.0	0.0	
ル・レクチェ	2001	パス・クラサン	2	30	83.3	56.7	2.1	0.8		
		ル・レクチェ	2	30	50.0	33.3	0.0	0.0		
	2002	パス・クラサン	2	30	90.0	83.3	7.3	6.1		
			1	59	98.3	93.2	6.8	6.6 <sup>z</sup>		
		ル・レクチェ	1	28	71.4	64.3	0.0	0.0	0.0	
パス・クラサン	2001	ラ・フランス	2	30	66.7	26.7	0.6	0.2		
		パス・クラサン	2	30	40.0	20.0	0.0	0.0		
	2002	ラ・フランス	2	26	100.0	69.2	7.3	5.1		
			1	58	98.3	86.2	7.6	6.5 <sup>z</sup>		
		パス・クラサン	1	29	89.7	79.3	0.0	0.0	0.0	
セニョール・デスペラン	2001	ラ・フランス	2	28	92.9	39.3	0.7	0.3		
		セニョール・デスペラン	2	30	93.3	26.7	0.0	0.0		
	2002	ラ・フランス	2	30	100.0	96.7	4.2	4.1		
			1	31	100.0	100.0	7.7	7.7 <sup>z</sup>		
		セニョール・デスペラン	1	30	73.3	70.0	0.0	0.0	0.0	
スタークリームソン	2001	ラ・フランス	2	30	46.7	46.7	2.1	1.0		
		スタークリームソン	2	30	3.3	3.3	0.0	0.0		
	2002	ラ・フランス	2	30	93.3	93.3	7.5	7.0		
			1	29	96.7	96.6	8.8	8.5 <sup>z</sup>		
		スタークリームソン	1	30	43.3	40.0	0.0	0.0	0.0	

<sup>z</sup> SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

ミッシュー・ビューティー’、‘ラ・フランス’の3品種に対しては1花そう1花で、それ以外の品種は1花そう2花で交配した。1花そう2花で受粉した品種のうち、‘プレコース’、‘コンファレンス’、‘ル・レクチュ’、‘パス・クラサン’、‘セニョール・デスペラン’、‘スタークリムソン’の着果率は43.3～92.9%であったが、6～7月の著しい生理落果により結実率は25.0～56.7%となった。‘パートレット’は着果率が36.7%と低かったが、その後の生理落果はなく、結実率も36.7%となった。一方、1花そう1花で受粉した‘グランド・チャンピオン’、‘フレミッシュー・ビューティー’、‘ラ・フランス’の着果率と結実率はともに80%以上となり、生理落果はほとんど観察されなかった。

2002年には弘前大学藤崎農場および長野県果樹試験場で、1花そう1花と2花で他家受粉を行ない、着果率と結実率を調査し、比較した(表1-1, -2)。1花そう2花の交配により、‘パス・クラサン’と‘フレミッシュー・ビューティー’以外の8品種は80%以上の高い結実率を示した。‘パス・クラサン’と‘フレミッシュー・ビューティー’は着果率こそ100.0%と高かったが、6～7月の生理落果によりそれぞれ69.2%と75.0%の結実率になった。これら2品種では幼果間の養分競合によるとみられる生理落果が起こりやすいと考えられた。一方、1花そう1花交配は‘パス・クラサン’と‘フレミッシュー・ビューティー’においても86.2%と96.4%の結実率を与え、すべての品種に安定した結実率をもたらした。

1花そう1花で交配することにより、和合受粉における幼果の生理落果を防ぐことができた。交配による不和合性の評価においては、和合受粉における結実率や種子数をコントロールとして用いることにより、評価対象の受粉の不和合・和合が判定されることから、和合受粉には安定した高い結実率が要求される。よって、セイヨウナシの不和合・和合の判定は1花そう1花での交配により行なうことが適当である。

## 単為結果性の評価

2000年に弘前大学藤崎農場で行なった自家受粉において、‘グランド・チャンピオン’から充実種子を含む果実が得られたが、‘パートレット’、‘フレミッシュー・ビューティー’、‘プレコース’、‘ラ・フランス’からは無種子果実が得られた。小野田ら(1987)は‘ラ・フランス’と‘シルバー・ベル’の、久保ら(1989)は‘フレミッシュー・ビューティー’の除雄無受粉によりそれぞれ92.2%、38.9%、25.8%の割合で無種子果実(単為結果果実)が得られたことを報告している。

結実率を左右すると考えられる単為結果性の影響を調査するため、2001年と2002年に弘前大学藤崎農場と長野県果樹試験場のセイヨウナシ10品種、‘パートレット’、‘フレミッシュー・ビューティー’、‘グランド・チャンピオン’、‘プレコース’、‘ラ・フランス’、‘ル・レクチュ’、‘セニョール・

デスペラン’, ‘コンファレンス’, ‘パス・クラサン’, ‘スタークリームソン’に対して1花そう1花で除雄無受粉を行ない, 着果率と結実率を調査した(表1-3). ‘スタークリームソン’以外の9品種は単為結果果実を結実した. ‘フレミッシュ・ビューティー’と‘グランド・チャンピオン’は, 2001年にそれぞれ43.3%と6.7%の低い結実率を示したが, 2002年には90.0%と71.4%の高い結実率を示した. 2年間の‘ラ・フランス’の結実率は, 弘前では46.7%(2001年), 24.1%(2002年)であったのに対し, 長野では86.2%(2001年), 96.7%(2002年)と弘前の2倍以上を示した. これらの結果から, 自動的単為結果性の程度は品種により異なるとともに, 各樹の生育状態や年次や場所といった環境要因に強く左右されることが明らかになった.

2001年と2002年の自家受粉により‘スタークリームソン’を含むすべての品種が結実したが, ‘グランド・チャンピオン’以外の果実はほとんど無種子結実であった. ‘グランド・チャンピオン’以外の9品種について除雄無授粉と自家受粉の結実率を比較したところ, 2001年の‘フレミッシュ・ビューティー’, ‘ラ・フランス’(弘前), 2002年の‘ラ・フランス’(弘前), ‘プレコース’, ‘ル・レクチェ’, ‘パス・クラサン’, ‘スタークリームソン’は自家受粉における結実率が除雄無授粉時より高くなる傾向があり, これら品種では受粉刺激により単為結果性が強まる可能性が示唆された(表1-1, -2, -3).

自動的および受粉刺激による他動的単為結果性の程度は品種により異なるとともに, 各樹の生育状態や年次や場所といった環境要因に強く左右された. よって, 各品種の単為結果性の程度を品種特性としてとらえることは難しく, 単為結果性に影響されない不和合・和合の判定指標が必要であることが示された.

また, 6月から7月(June Drop期)にかけて, ‘グランド・チャンピオン’, ‘プレコース’, ‘コンファレンス’, ‘ル・レクチェ’, ‘パス・クラサン’の単為結果した幼果が数多く落果したことから(表1-1, -2, -3), セイヨウナシの不和合・和合を判定する時期はJune Drop期を過ぎた交配約10週間後が適当であると考えられた.

### 自家不和合・和合の判定基準

多くのセイヨウナシ品種が単為結果性を有することから, 結実率を指標とした不和合・和合の判定は容易ではない. 2002年の1花そう1花交配における結実率を比較してみると, ‘ラ・フランス’, ‘フレミッシュ・ビューティー’, ‘グランド・チャンピオン’, ‘セニョール・デスペラン’, ‘パス・クラサン’の自家受粉と他家受粉の結実率はほぼ同じであり, 結実率だけでセイヨウナシの不和合・和合を区別することは困難であることが分かった.

表1-3 セイヨウナシ10品種の単為結果性の評価

調査地	品種	調査年	処理 花数	着果率 (%)	結実率 (%)
弘前大学藤崎農場	パートレット	2002	30	46.7	40.0
	フレミッシュ・ビューティー	2001	30	43.3	43.3
		2002	30	90.0	90.0
	グランド・チャンピオン	2001	15	13.3	6.7
		2002	56	90.0	71.4
	ラ・フランス	2001	29	63.3	46.7
		2002	29	100.0	24.1
	プレコース	2002	56	100.0	17.9
長野県果樹試験場	コンファレンス	2002	45	100.0	46.7
	ラ・フランス	2001	29	86.2	86.2
		2002	61	98.4	96.7
	ル・レクチェ	2002	59	49.1	40.7
	パス・クラサン	2002	55	76.3	58.2
	セニョール・デスペラン	2002	29	69.0	65.5
	スタークリムゾン	2002	30	0.0	0.0

配偶体型自家不和合性のセイヨウナシでは、不和合花粉の花粉管は花柱の途中で伸長を停止するのに対し、和合花粉の花粉管は胚珠に到達して受精し、種子を形成する (Sanzol and Herrero 2002). 充実種子数を利用した指標は不和合・和合の判定に適していると考えられ、1 果実当たりの充実種子数を表す Seeds/Fruit を指標にした判定がセイヨウナシでも行なわれている (Crane and Thomas 1939; Crane and Lewis 1942; Modlibowska 1945; Griggs and Iwakiri 1954; 小野田ら 1987; Nyéki et al. 1994; Nyéki and Soltsz 1998). そこで、1 花そう 1 花交配の自家受粉と他家受粉における Seeds/Fruit を算出し、比較した (表 1-1, -2). ‘フレミッシュ・ビューティー’, ‘ラ・フランス’, ‘ル・レクチュ’, ‘セニョール・デスペラン’, ‘コンファレンス’, ‘パス・クラサン’, ‘スタークリームソン’の7品種では自家受粉により得られた果実に充実種子は含まれておらず、自家受粉の Seeds/Fruit は0と算出された. ‘グランド・チャンピオン’の自家受粉によるすべての果実は複数の充実種子数を含んでいたが、‘パートレット’と‘プレコース’の種子を含む果実はわずかであり、ほとんどは無種子果実であった. これら3品種の自家受粉における Seeds/Fruit は、‘グランド・チャンピオン’で1.2 (2001年)および4.1 (2002年), ‘パートレット’で0.4, ‘プレコース’で0.3と算出された. 他家受粉の Seeds/Fruit は、‘グランド・チャンピオン’を含む10品種において3.2~8.8となった. 一見すると、Seeds/Fruit はセイヨウナシの不和合・和合の判定に適した指標と思われるが、(1) 2000年の‘パートレット’の自家受粉のように、生理落果した幼果の数が含まれないために結実率が低い品種の Seeds/Fruit が過大評価されてしまう、(2) 単為結果により生じた無種子果実が含まれるために単為結果性の強い品種の Seeds/Fruit が過小評価されてしまう、という2つの問題が生じる.

Zuccherelli et al. (2002)は交配した花数に対してどれだけの充実種子が得られたかを示す Seeds/Flower を指標として、セイヨウナシの和合・不和合の判定している. Seeds/Flower は交配する花数を固定することで充実種子数を直接その値に反映させる指標であるので、生理落果や単為結果性による結実数の変動を排除でき、上記の問題を解決できる. ‘グランド・チャンピオン’以外の9品種の自家受粉の Seeds/Flower は0~0.2, 他家受粉の Seeds/Flower は3.0~8.5と算出された (表 1-1, -2). よって、自家受粉と他家受粉における Seeds/Flower を比較することでセイヨウナシの不和合・和合の判定が可能であると考えられた.

しかし、2002年の‘グランド・チャンピオン’, ‘パートレット’, ‘プレコース’における自家受粉の Seeds/Flower はそれぞれ1.0, 0.2, 0.1と算出された. これら品種の他家受粉の Seeds/Flower は6.1, 6.5, 4.0であり、種子形成の難易にも品種間差があることが分かった. そのため、自家受粉の Seeds/Flower の単純な比較から、‘グランド・チャンピオン’が部分的和合か不和合であるのか

を判定できなかった。そこで、自家受粉の Seeds/Flower を他家受粉の Seeds/Flower で割り、100をかけて算出した SI (Self-Incompatibility) index を新たな判定基準として導入した。他家受粉の Seeds/Flower は‘ラ・フランス’で 3.8 (2001 年長野), 8.1(2002 年長野), 3.8 (2001 年弘前), 6.6 (2002 年弘前)と算出されたことから、他家受粉における種子形成数は場所および年次により変化することが明らかになった。そこで、同じ調査年の同じ調査地における Seeds/Flower を用いて SI index を算出することで、年次や場所による結実率および種子形成数の変動を補正できると考えた。‘コンファレンス’, ‘フレミッシュ・ビューティー’, ‘ラ・フランス’, ‘ル・レクチェ’, ‘パス・クラサン’, ‘セニョール・デスペラン’は SI index が 0 であったことから、自家不和合と判定された。自家受粉により充実種子を含む果実が得られた 3 品種の SI index は、‘グランド・チャンピオン’で 59.4 (2001 年)と 16.4 (2002 年), ‘パートレット’で 3.1 (2002 年), ‘プレコース’ (2002 年)で 2.5 と算出された。この値の比較から、‘グランド・チャンピオン’は自家受粉によっても充実種子が形成されるが、他家受粉の種子数に比べて十分ではないと判断し、部分的自家和合性に分類した。一方、‘パートレット’と‘プレコース’の自家受粉による種子形成は他家受粉に比べ十分少ないことから、両品種を自家不和合性に分類した。したがって、供試 10 品種中、‘グランド・チャンピオン’以外は自家不和合性を持つことが示された。

以上のことから、1 花そう 1 花で調査対象の交配および和合他家受粉の交配を行ない、交配約 10 週間後 (June Drop 終了後)に果実に含まれる充実種子数を調査し、両交配の Seeds/Flower から算出した SI index を用いることで、セイヨウナシの不和合・和合を判定することができると結論づけた。SI index を用いた判定方法により、他にも部分的自家和合性に分類される品種が見つかるかもしれない。

### 無種子果実と有種子果実間における果実形質の比較

多くの品種が自家不和合性を有するとともに、単為結果性を持つことが示された。そこで、除雄無受粉処理により単為結果した無種子果実と和合他家受粉により結実した有種子果実の果実形質を比較した (表 1-4) 。‘ラ・フランス’と‘パス・クラサン’の無種子果実と有種子果実の大きさには有意な差は認められなかったが、‘パートレット’, ‘フレミッシュ・ビューティー’, ‘コンファレンス’, ‘ル・レクチェ’の有種子果実は無種子果実より大きかった (図 1-1) 。また、有種子果実でも、充実種子が多いほど果実重量が重くなる傾向がみられた (図 1-2) 。無種子果実の多くは有種子果実より縦長で、果形に歪みがみられた。

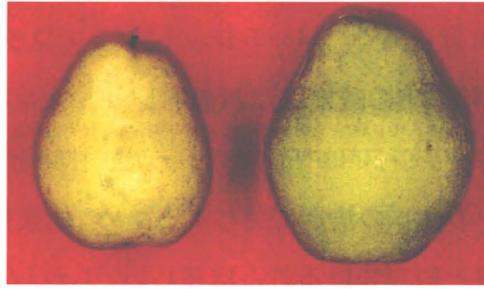
追熟後の糖度と酸度は適切に追熟できた果実のみを用いた。他家受粉果実の糖度は、‘フレミ

表1-4 無種子果実と有種子果実の追熟前の形質比較

品種	交配処理	果実数 <sup>2</sup>	果実 あたり 種子数	果実 重量 (g)	果実 縦径 (cm)	果実 横径 (cm)	縦径 /横径	追熟後	
								糖度 (Brix)	酸度(リンゴ酸) (g/100ml)
パートレット	除雄無受粉	7 (7)	0.0	178.4a <sup>3</sup>	9.1a	6.2a	1.45	10.3a	0.23a
	他家受粉 (× グランド・チャンピオン)	12 (12)	8.2±0.3	251.5b	9.8a	7.5b	1.31	11.1a	0.24b
コンファレンス	除雄無受粉	9 (9)	0.4	188.9a	9.7a	6.6a	1.48	16.0a	0.17a
	他家受粉 (× スタークリームソン)	18 (14)	2.1±0.5	237.1b	10.4a	7.4b	1.42	15.8a	0.12b
フレミッシュ・ビューティー	除雄無受粉	8 (8)	0.0	306.1a	9.4a	8.2a	1.15	10.4a	0.11a
	他家受粉 (× ラ・フランス)	12 (12)	7.3±0.4	443.7b	10.5b	9.2b	1.28	11.2b	0.13b
ラ・フランス	除雄無受粉	28 (4)	0.0	468.9a	97.8a	99.3a	0.98	16.5	0.26
	他家受粉 (× パス・クラサン)	26 (6)	7.9±0.5	500.2a	95.3a	101.7a	0.94	17.5	0.30
ル・レクチェ	除雄無受粉	8 (8)	0.0	334.3a	11.3a	8.3a	1.36	17.5a	0.23a
	他家受粉 (× パス・クラサン)	24 (22)	7.4±0.3	436.3b	11.0a	9.5b	1.16	17.9a	0.22a
パス・クラサン	除雄無受粉	10 (3)	0.0	441.2a	9.6a	9.5a	1.01	15.9	0.41
	他家受粉 (× ラ・フランス)	18 (13)	6.6±0.4	480.2a	9.9a	9.9a	1.00	12.7	0.26

<sup>2</sup>: ()内は追熟後の糖度および酸度の計測に用いた果実の数。追熟中に輪紋病や内部褐変などのため適正に追熟できなかった果実は除外して計測を行なった。‘ラ・フランス’と‘パス・クラサン’については、除雄無受粉果実が少なかったため統計処理を行っていない。

<sup>3</sup> 異なる文字は単為結果果実と他家受粉果実間でおこなったt検定 (5%水準, 両側検定)において有意差ありを示す。



無種子果実

有種子果実

図1-1 種子の有無による果実サイズの違い  
(‘フレミッシュ・ビューティー’)

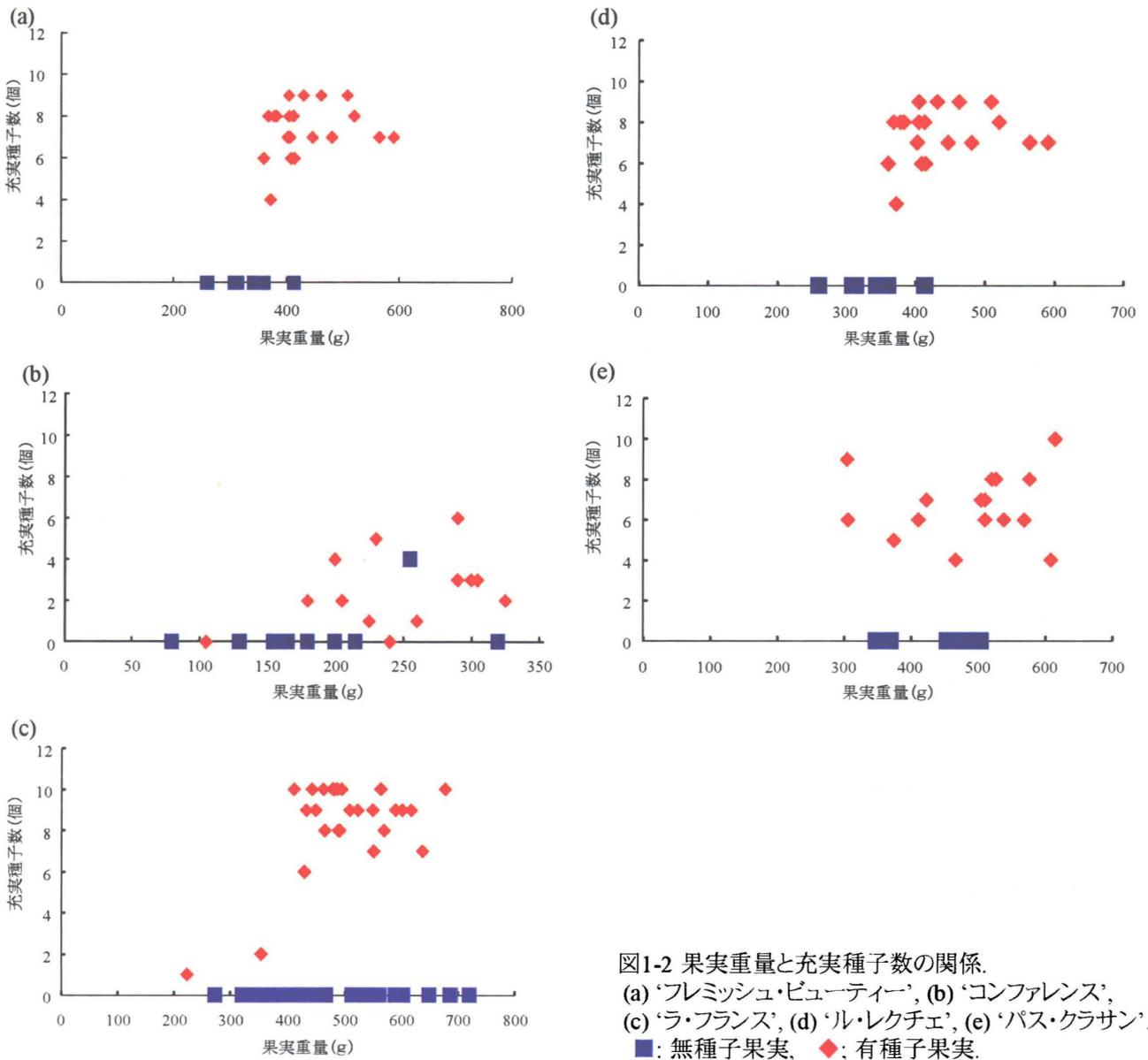


図1-2 果実重量と充実種子数の関係。  
(a) ‘フレミッシュ・ビューティー’, (b) ‘コンファレンス’,  
(c) ‘ラ・フランス’, (d) ‘ル・レクチュエ’, (e) ‘パス・クラサン’。  
■: 無種子果実, ◆; 有種子果実.

ツシュ・ビューティー’で有意に高く、‘パートレット’、‘ラ・フランス’、‘ル・レクチェ’でも高くなる傾向にあった。他家受粉果実の酸度は、‘パートレット’と‘フレミッシュ・ビューティー’で有意に高く、反対に‘コンファレンス’は有意に低かった。甘味と酸味は、含有量だけでなく両者のバランスもセイヨウナシの食味の決定に関与するため、他家受粉果実と自家受粉果実における酸度の違いを一概に品質と結びつけることは難しい。しかしながら、果樹全体として糖度の高い果実が求められる傾向があることから、糖度の高い有種子果実は無種子果実よりも品質が優れていると考えられる。また、他家受粉により果形の整った大玉果実が得られることも生産上の利点になると考えられる。

‘グランド・チャンピオン’については、除雄無受粉による無種子果実、開花自家受粉による有種子果実、他家受粉による有種子果実の間で果実形質に有意差は見られなかった(表 1-5)。種子の有無は果実品質に影響しなかったが、単為結果性の弱い‘グランド・チャンピオン’では結実に種子形成が必要である。和合花粉の受粉による種子形成は当然であるが、開花自家受粉における部分的自家和合性による種子形成によっても十分結実が安定し、良質な果実が生産できると考えられる。

日本では、セイヨウナシ=‘ラ・フランス’と思われるほど生産・消費に占める‘ラ・フランス’の割合が高い。山形県では‘ラ・フランス’の単植化が進み、単為結果果実が市場に流通することも多い。本実験では‘ラ・フランス’の無種子果実と有種子果実の大きさ・糖度には有意な差は認められなかったが、山形県農業総合研究センターにおける 2002 年の調査では、充実種子が多いほど糖度が高くなる傾向があり、10 個の充実種子が含まれる果実でもっとも食味が良いことが報告されている。また、‘パートレット’でも無種子果実は品質が劣ることが報告されている(Janick Fruit Breeding 1996)。本章では、この 2 品種以外の‘フレミッシュ・ビューティー’、‘コンファレンス’、‘ル・レクチェ’、‘パス・クラサン’について充実種子と果実品質の関係を始めて調査し、いずれも有種子果実の品質が無種子果実よりも優れる傾向があることを明らかにした。したがって、単為結果性を有するセイヨウナシにおいても、良質果実の安定的な生産のために和合花粉の受粉による種子形成が必要である。

## 交雑不和合性

セイヨウナシ品種間で交雑不和合を示す組み合わせはほとんど見出されていなかったが(Crane and Lewis 1942; Griggs and Iwakiri 1954; Lewis and Modlibowska 1942; Modlibowska 1945; Rawes 1933), 供試した 10 品種間の交雑不和合性を 2001 年に各組み合わせに対して 5 花を用い

表1-5 'グランド・チャンピオン'の除雄無受粉, 開花自家受粉, 他家受粉による果実の形質比較

品種	交配処理	果実数 (個)	果実	果実	果実	果実	縦径 /横径	糖度 (Brix)
			あたり 種子数	重量 (g)	縦径 (cm)	横径 (cm)		
グランド・チャンピオン	除雄無受粉	10	0.0	228.0a <sup>2</sup>	10.7a	6.9a	1.55	13.2a
	開花自家受粉	15	2.0±0.3	241.7a	10.7a	7.0a	1.52	12.7a
	他家受粉 (× パートレット)	7	5.7±0.4	295.2a	11.4a	7.7a	1.48	13.4a

<sup>2</sup>同じ文字は除雄無受粉, 開花自家受粉, 他家受粉による果実間の分散分析 (5%水準)において有意差なしを示す.

て調査した (データ省略). この結果に基づいた 2002 年の再調査の結果, ‘バートレット’×‘セニョール・デスペラン’と‘フレミッシュ・ビューティー’×‘スタークリームソン’の他家受粉の Seeds/Flower および SI index は 0 となった (表 1-1). ‘セニョール・デスペラン’と‘スタークリームソン’の花粉は‘フレミッシュ・ビューティー’と‘バートレット’に対して多くの充実種子を形成したことから (表 1-1), 両品種の花粉稔性が確認された. したがって, ‘バートレット’と‘セニョール・デスペラン’, および, ‘フレミッシュ・ビューティー’と‘スタークリームソン’が交雑不和合の関係にあることが明らかになった.

近年, 新品種の育成に伴い, 新品種が花粉親品種と交雑不和合を示すことが報告されている (阿部ら 1996 ; Sanzol and Herrero 2002). ‘バラード’は山形県園芸試験場で‘バートレット’×‘ラ・フランス’の交雑後代から選抜・育成された品種で, ‘ラ・フランス’と交雑不和合性を示す. 一方, ‘バートレット’と‘セニョール・デスペラン’, ‘フレミッシュ・ビューティー’と‘スタークリームソン’の間には親子関係は存在しない. これら品種のように親子関係にない品種間でも交雑不和合となる品種組み合わせが多く存在する可能性があり, 本章で確立した交配による不和合・和合の判定方法を用いることにより見出されるかもしれない.

Tomimoto et al. (1996)はセイヨウナシの花柱タンパク質を二次元電気泳動 (2D-PAGE)により解析し, 検出された S-RNase のスポットから‘バートレット’と‘フレミッシュ・ビューティー’の遺伝子型を SSS6 と推定している. しかしながら, 2000 年と 2001 年に, ‘バートレット’×‘フレミッシュ・ビューティー’の交配を行なったところ, 1 花そう 2 花の交配ではあったが結実率 90% 以上, Seeds/Flower は 4.0 および 5.7 となり (表 1-1), ‘フレミッシュ・ビューティー’と‘バートレット’は交雑和合と判定された. 推定 S 遺伝子型と交配結果が一致しなかった原因は, おそらく, 類似の移動度を示す異なる S-RNase を同一の S-RNase と混同したことによると推測される. したがって, 交配実験により裏付けられる方法を用いた S 遺伝子型の推定が必要と考えられる.

本章では, 多くのセイヨウナシ品種が単為結果性を有するため, 結実率や果実当たりの種子数を指標とした不和合・和合の識別がセイヨウナシには適応できないことを示した. そこで, 単為結果性と種子形成能力の品種差異の要因を排除した新たな判定基準として SI index を考案し, ‘グランド・チャンピオン’を部分的自家和合性, 他 9 品種を自家不和合性と判定し, セイヨウナシでも交雑不和合の関係があることを見出した. また, 和合花粉受粉により結実した有種子果実は単為結果による無種子果実より優れた品質を持っていたことから, セイヨウナシでも安定的な良質果実の生産には和合花粉の受粉が必要であることを指摘した. 和合受粉を効率よく行なうためには, ニホンナシやリンゴと同様に品種の S 遺伝子型情報が必要であろう.

## 第 2 章

### CAPS マーカーシステムを用いた日本の栽培品種の *S* 遺伝子型推定

#### <摘要>

日本の栽培品種 25 品種の *S* 遺伝子型を推定するため、セイヨウナシの雌しべ側 *S* 遺伝子産物も *S*-RNase であると仮定し、自家不和合性の 10 品種の花柱から 10 種類の *S*-RNase cDNA をクローニングした。10 種類の cDNA の推定アミノ酸配列はナシ亜科の *S*-RNase に特徴的な 1 次構造および異なるアミノ酸配列で構成される HV 領域を有していたことから、これら cDNA は *S*-RNase をコードすると考えられた。本研究の進行中にゲノミック PCR により増幅された 13 種類の推定 *S*-RNase 対立遺伝子の部分配列がデータベースに登録された (Zuccherelli et al. 2002a, b; Zisovich et al. 2004a)。それらの配列と照合した結果、7 種類の cDNA は推定 *Sa*-, *Sb*-, *Sd*-, *Se*-, *Sh*-, *Sk*-, *Sl*-RNase 対立遺伝子に対応し、残り 3 種類は新規 *S*-RNase 対立遺伝子 (*Sg*-, *Sq*-, *Sr*-RNase) と同定された。

*S* 遺伝子型を迅速に推定するため、CAPS マーカーシステムの開発を試みた。ゲノム DNA からプライマーセット‘FTQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いた PCR により 10 種類の *S*-RNase 断片 (HV 領域とイントロンを含む) を増幅した。増幅断片を cDNA の塩基配列と照合し、各 *S*-RNase 対立遺伝子と対応付けた。*Sg*, *Sl*, *Se*, *Sb* は 1,906, 1,414, 998, 440 bp の断片として、*Sq* と *Sk* は約 1.3 kb 断片、*Sa*, *Sd*, *Sh*, *Sr* は約 350 bp 断片として検出された。断片長による識別が困難な約 1.3 kb と約 350 bp 断片はそれぞれ、6 種類の制限酵素、*Bgl*II (*Sk*), *Hind*III (*Sq*), *Sph*I (*Sa*), *Eco*O109I (*Sd*), *Bss*HII (*Sh*), *Bae*I (*Sr*) で切断されることで識別し、10 種類の *S* 対立遺伝子を識別する CAPS マーカーシステムを開発した。

このシステムを用いて *S* 遺伝子型を推定したところ、日本の栽培品種 25 品種は 17 種類の *S* 遺伝子型に分類された。そのうち、6 種類には複数の品種が分類され、同じ *S* 遺伝子型に推定された品種間の交配は全て交雑不和合性を示した。

以上の結果から、セイヨウナシにおいても雌しべ側 *S* 遺伝子産物は *S*-RNase であることが証明された。また、日本の栽培品種 25 品種間の交雑和合・不和合関係が明らかになり、6 種類の交雑不和合グループの存在が示された。

## ＜緒言＞

日本の栽培品種は計 25 品種により構成されている (表 2-1). 22 品種は海外からの導入品種で, ‘ラ・フランス’, ‘パートレット’, ‘ル・レクチェ’, ‘ドワイエネ・デュ・コムス’, ‘コンファレンス’, ‘セニョール・デスペラン’, ‘プレコース’, ‘フレミッシュ・ビューティー’, ‘アレクサンドリン・デュイヤール’, ‘ウィンター・ネリス’, ‘パス・クラサン’の導入は古く, 明治・大正時代に遡る. 戦後, ‘マックス・レッド・パートレット’ (‘パートレット’の赤色系枝変わり), ‘エル・ドラド’ (‘パートレット’の自然交雑実生), ‘マルゲリット・マリーラ’, ‘グランド・チャンピオン’ (‘Gorham’の銹系枝変わり)が, 1970 年以降には‘ゼネラル・レクラーク’ (1977 年導入), ‘オーロラ’ (‘マルゲリット・マリーラ’×‘パートレット’の交雑実生, 1983 年導入), ‘ミクルマス・ネリス’ (‘ウィンター・ネリス’の自然交雑実生), ‘カリフォルニア’ (‘マックス・レッド・パートレット’×‘ドワイエネ・デュ・コムス’の交雑実生), ‘スタークリームソン’ (‘Clapp’s Favourite’の赤色系枝変わり), ‘デボー’ (‘Clapp’s Favourite’の自然交雑実生), ‘ポートヌ’ (‘コンファレンス’×‘Doyenné d’hiver’の交雑実生)が導入されている. 残り 3 品種, ‘シルバー・ベル’ (‘ラ・フランス’の自然交雑実生, 1990 年育成)と‘バラード’ (‘パートレット’×‘ラ・フランス’, 1999 年登録), および, ‘越さやか’ (‘パートレット’×‘ラ・フランス’の交雑実生, 1998 年登録)は山形県および新潟県の育成品種である.

晩生品種の‘ラ・フランス’によって多くの消費者に認知されるようになったセイヨウナシであるが, 消費者に対する宣伝効果およびその結果として期待される消費の拡大, さらに生産者側における労働力の分散などの点から, ‘ラ・フランス’中心の品種構成の見直しが検討されている. 早生優良品種では, 果実品質のよい‘オーロラ’や果皮が暗赤色で美しい‘スタークリームソン’が挙げられる. 中生品種では, 大果品種で栽培しやすい‘マルゲリット・マリーラ’, 比較的大果で食味良好な‘ゼネラル・レクラーク’, 果面が鮮紅色で美しい‘カリフォルニア’, 肉質の良い‘ドワイエネ・デュ・コムス’などがあるが, 特に近年は, わが国で育成された‘バラード’および‘越さやか’が品質の良い中生品種として期待されている. 晩生品種では, 果実品質が非常に優れている‘ル・レクチェ’や貯蔵性のよい‘シルバー・ベル’が有望品種である. 今後の日本におけるセイヨウナシ栽培では, ‘ラ・フランス’よりも収穫期が早く食味の優れる品種, もしくは外観の美しい赤果皮性の品種が増加し, 品種構成は多様化すると予想される.

第 1 章において, 他家受粉により結実した有種子果実は単為結果による無種子果実より優れた品質を持っていたことから, 良質なセイヨウナシ果実の安定的な生産には和合花粉の受粉が必要であることを指摘した. また, 10 品種間の相互交配により, ‘フレミッシュ・ビューティー’と‘スタークリームソン’および‘パートレット’と‘セニョール・デスペラン’の 2 つの組み合わせが

表2-1 日本の栽培品種の由来および諸特性

品種	原産国	親品種	開花期	収穫盛期	追熟日数 (日)	果皮色 (追熟前→後)	果実重量 (g)	糖度 (%)	酸度 (%)	肉質	その他
スタークリムソン	アメリカ	Clapp's Favorite 着色系突然変異	+2	8.06	10	全面暗赤色	193	12.1	0.50	中	果面の紅色が美しい, 甘味少
デポー	アメリカ	Clapp's Favorite 自然交雑実生	+1	8.11	14	黄色, 陽光面赤色	334	14.3	0.26	やや粗	淡泊, 果肉軟
パートレット	イギリス	不明	+3	8.27	11	黄緑色→黄色	327	12.5	0.50	中	豊産性, 栽培易, 甘味少
マックス・レッド・パートレット	アメリカ	パートレット枝変わり	+3	8.27	11	鮮紅食	-	-	-	-	果面の紅色が美しい, 甘味少
プレコース	フランス	不明	+3	8.28	8	緑色→黄色	350	11.3	0.27	やや粗	淡泊
オーロラ	アメリカ	マルゲリット・マリーラ×パートレット	+2	9.03	8	褐色, 薄い錆	355	15.4	0.28	密	肉質良, 甘味多, 多汁, 芳香
セニョール・デスベラン	ベルギー	不明	+3	9.03	11	緑黄色→黄色	186	14.5	0.18	中	酸味少, 繊維質少
マルゲリット・マリーラ	フランス	不明	+3	9.06	12	淡黄色→黄金色	711	13.2	0.24	やや粗	大果, 多汁, 栽培易, 繊維質多
ミクルマス・ネリス	イギリス	ウィンター・ネリス自然交雑実生	+2	9.10	11	緑色→緑黄色	212	15.1	0.20	密	肉質良, 甘味多, 酸味少
プレミッシュ・ビューティ	ベルギー	不明	+1	9.13	12	陽光面赤色	327	12.5	0.20	やや粗	陽光面着色, 食味淡泊
コンファレンス	イギリス	不明	+1	9.13	15	黄緑色→緑黄色	249	12.5	0.23	やや密	果肉淡桃色, 酸味少
カリフォルニア	アメリカ	マックス・レッド・パートレット×ドワイエネ・デュ・コムス	+4	9.17	11	黄色, 陽光面紅色	403	12.3	0.26	中	陽光面着色, 食味淡泊
ゼネラル・レクラーク	フランス	不明(ドワイエネ・デュ・コムス自然交雑実生)	+1	9.25	14	黄緑色, 錆	410	14.9	0.45	中	多汁, 芳香・肉質よい
バラード	日本	パートレット×ラ・フランス	+3	9.25	14	黄緑色→黄色	441	15.5	0.25	中	多汁, 糖度高く良食味
アレクサンドリン・デュイヤール	フランス	不明	+4	9.25	17	黄緑色→黄色	305	14.5	0.33	やや密	肉質やや良, 甘酸適和
越さやか	日本	パートレット×ラ・フランス	+2	9.25	11	黄緑色→黄色	273	14.5	-	密	多汁, 食味爽やかで良好
ドワイエネ・デュ・コムス	フランス	不明	+4	10.01	13	黄緑色→黄色	379	15.5	0.26	やや密	食味濃厚
グランド・チャンピオン	アメリカ	ゴーラム枝変わり	+4	10.04	8	全面錆	319	14.6	0.41	密	肉質良, 芳香やや多, 貯蔵良
エル・ドラド	アメリカ	パートレット自然交雑実生	+2	10.04	11	緑色→緑黄色	363	12.7	0.24	中	多汁, 食味やや淡泊
ラ・フランス	フランス	不明	0	10.11	14	緑色→緑黄色, 錆	389	14.8	0.27	密	食味芳香極めて優良
ポートヌ	フランス	コンファレンス×Doyenné d'hiver	+3	10.17	24	緑黄色, 錆	304	15.3	0.12	密	豊産性, 多汁, 肉質軟
シルバー・ベル	日本	ラ・フランス自然交雑実生	+3	10.22	21	緑黄色, 錆	499	13.7	0.46	密	豊産性, 貯蔵性よい
ウィンター・ネリス	ベルギー	不明	+4	10.25	14	緑色→黄色, 錆	232	14.1	0.21	密	肉質良, 酸味少, 微かに渋味
ル・レクチェ	フランス	パートレット×Bergamotte Fortunee	+2	10.29	29	緑色→黄色	390	14.7	0.26	密	多汁, 芳香・肉質よい
パス・クラサン	フランス	不明	+1	10.29	21	黄緑色→黄色	428	14.3	0.42	密	豊産, 貯蔵性極めて良

品種: 収穫盛期の順。

開花期: 'ラ・フランス'の開花日を0とした場合の開花日。「西洋ナシの作業便利帳」の満開日, 「バラエティー西洋なし」の開花日および農研機構果樹研究所リンゴ研究拠点(盛岡)での開花日を参考に修正した。長野県果樹試験場平成16年果樹生態調査における'ラ・フランス'の平年の開花日は4月25日。(-)は記載およびデータなし。

収穫盛期: 山形県農業総合研究センター2001年度調査による。'越さやか'は新潟県園芸研究センターの調査を修正。'プレコース'は1992年の, 'デポー'は1998年の山形県農業総合研究センター調査, 'ポートヌ'は2002年農研機構果樹研究所リンゴ研究拠点(盛岡)における調査に基づく。

追熟日数: 予冷後の日数。山形県農業総合研究センター2001年度調査による。

果皮色: 「西洋ナシの作業便利帳」および「バラエティー西洋なし」による。

果実重量, 糖度, 酸度, 肉質, その他特性: 山形県農業総合研究センター2001年度調査による。'マックス・レッド・パートレット'は記載がないがパートレットとほぼ同じと考えられる。'越さやか'は新潟県園芸研究センター調査による(酸度は'ラ・フランス' pH 4.1に対し'越さやか' pH 3.8)。'プレコース'は1992年の, 'デポー'は1998年の山形県農業総合研究センター調査, 'ポートヌ'は2002年農研機構果樹研究所リンゴ研究拠点(盛岡)における調査に基づく。

交雑不和合であることを見出した。さらに、‘パートレット’×‘ラ・フランス’の交雑後代から育成された‘バラード’は‘ラ・フランス’と交雑不和合性を示すことが確認されている (阿部ら 1996)。

効率の良い混植を実現するには、日本の栽培品種 25 品種間の交雑不和合・和合関係を明らかにし、各品種の *S* 遺伝子型を決定することが望まれる。しかし、現在までのところ、セイヨウナシでは 4 種類の *S* 対立遺伝子が‘パートレット’と‘Coscia’の交雑後代から同定され、5 つの *S* 遺伝子型が決定されているにすぎない (Sanzol and Herrero 2002)。第 1 章において確立した方法により交配実験の結果から不和合・和合の判定は可能になったが、交配による *S* 遺伝子型の決定には、交配に対する労力、品種間における開花時期の不一致、交雑後代の実生樹の養成に要する期間や土地など多くの困難がある。

日本のセイヨウナシ栽培品種のうち 8 品種は、二次元電気泳動 (2D-PAGE) を用いた花柱タンパク質の解析から *S* 遺伝子型の推定が試みられている (Tomimoto et al. 1996)。しかし、同じ *S* 遺伝子型 (*S5S6*) に推定された‘パートレット’と‘フレミッシュ・ビューティー’は交雑和合であり、異なる *S* 遺伝子型を持つことが示唆されたことから (第 1 章)、これら 2D-PAGE による推定遺伝子型には疑問が生じている。2D-PAGE における移動度による *S*-RNase の識別は困難であると推測されるので、信頼できる推定システムの構築が必要である。

ニホンナシにおいては、雌しべ側 *S* 遺伝子産物をコードする *S*-RNase を約 350~1300 bp の断片 (C2 領域と HV 領域、イントロンを含む) として増幅し、これを制限酵素により *S* 対立遺伝子特異的に切断することで増幅断片を識別する PCR-RFLP 法、別名 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) マーカーシステムが開発されている。このシステムにより迅速かつ確実な *S* 対立遺伝子の識別、そして品種の *S* 遺伝子型推定が可能になっている (Ishimizu et al. 1999; Takasaki et al. 2004; Janssens et al. 1995; Broothaerts 2003)。ニホンナシやリンゴの *S*-RNase には N 末端に 22~27 残基のシグナルペプチドが存在し、RNase 活性に必須な 2 つのヒスチジン残基、立体構造に関わる 8 つのシステイン残基が保存されている。推定アミノ酸配列の比較から、*S*-RNase に 5 つの保存領域 (C1, C2, C3, RC4, C5) とアミノ酸配列の変化に富んだ 1 つの超可変領域 (HV 領域) が同定されている (図 0-2)。この HV 領域の推定アミノ酸配列は *S* 対立遺伝子特異的であり、花粉と花柱間の自他認識に関与すると推測されている (Norioka et al. 1996; Sassa et al. 1996; Ishimizu et al. 1998)。

本章では、セイヨウナシの雌しべ側 *S* 遺伝子産物も *S*-RNase であるという仮定に基づき、日本の栽培品種から 10 種類の *S*-RNase cDNA をクローニングした。また、*S*-RNase 断片をゲノム

DNA から増幅して識別する CAPS マーカーシステムを開発した。このシステムを用いて、日本の栽培品種の S 遺伝子型を推定し、交配実験により日本の栽培品種 25 品種間の交雑不和合・和合関係を明らかにした。

## ＜材料および方法＞

### 材料

弘前大学生物共生教育研究センター藤崎農場（青森県藤崎町）、長野県果樹試験場（長野県須坂市）、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点（岩手県盛岡市）に栽培されているセイヨウナシ 25 品種（表 2-1）から未展開葉を採取した。‘ラ・フランス’、‘パートレット’、‘ル・レクチェ’、‘ゼネラル・レクラーク’、‘オーロラ’、‘コンファレンス’、‘ドワイエネ・デュ・コムス’、‘フレミッシュ・ビューティー’、‘ウィンター・ネリス’、‘パス・クラサン’の white stage (Norioka et al. 1996) の花から花柱を採取した。未展開葉および花柱は液体窒素で急速冷却後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 方法

#### 交配実験

交配および調査は第 1 章で確立した方法により行なった。交配約 10 週間後に結実数と充実種子数を調査した。結実率, Seeds/Flower, SI index を算出し、不和合・和合を判定した。

#### Total RNA の抽出

Total RNA の抽出には RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いた。凍結保存しておいた white stage の花柱約 250 本（新鮮重約 150 mg）を液体窒素下で十分に粉碎した。粉碎物に 450  $\mu\text{L}$  の RLC buffer と 4.5  $\mu\text{L}$  の  $\beta$ -メルカプトエタノールを加え、室温で 3 分間回転振盪した。抽出液を QIA shredder column に移し、室温、15,000 rpm で 2 分間遠心した。流出液を新しいチューブに移し、225  $\mu\text{L}$  の 100%エタノールを加えて良く混和した。混和液を RNeasy spin column に移し、10,000 rpm で 15 秒間遠心した。流出液を捨てた後、column に 700  $\mu\text{L}$  の Buffer RW1 を加え、10,000 rpm で 15 秒間遠心した。column を付属の collection tube に移し、500  $\mu\text{L}$  の Buffer RPE を column に加えた後、室温、10,000 rpm で 15 秒間遠心した。再度 500  $\mu\text{L}$  の Buffer RPE を column に加えて、室温、10,000 rpm で 15 秒間遠心した。室温、15,000 rpm で 1 分間遠心してメンブランを乾かした。

後, column を新しいチューブに移し, 30  $\mu\text{L}$  の RNase free water を加えて 15 分間放置した. 室温, 10,000 rpm で 1 分間遠心して total RNA を抽出し, 分光光度計で濃度を測定した後,  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した.

### mRNA の単離

mRNA の単離には Micro-FastTrack<sup>TM</sup> 2.0Kit (Invitrogen)を用いた. 抽出した total RNA を Lysis Buffer (1 mL の Stock Buffer に RNase/Protein Degradar を 20  $\mu\text{L}$  添加) に加え,  $45^{\circ}\text{C}$ , 20 分間回転振盪した. 63  $\mu\text{L}$  の 5M NaCl を加えて懸濁した後, 懸濁液を Oligo (dT) Cellulose パウダーが入ったチューブに移し, 十分に混和してから室温で 20 分間回転振盪した. 室温, 7000 rpm で 8 分遠心した後, 上清を取り除き, 1.3 mL Binding Buffer を加えて再懸濁した. この操作を Buffer が透明になるまで 3 回以上繰り返した後, Spin-column に懸濁液を移し, 室温, 7800 rpm で 10 秒遠心した. Spin-column に 700  $\mu\text{L}$  の Binding Buffer を加え, 室温, 7800 rpm で 10 秒遠心した. この操作をさらに 2 回繰り返した. 200  $\mu\text{L}$  の Low Salt Wash Buffer を Spin-column に加え, 室温, 7800 rpm で 10 秒遠心した後, この操作をもう一度繰り返した. Spin-column を新しいチューブに移し, 100  $\mu\text{L}$  の Elution Buffer を加えて Cellulose を懸濁し, 10 分放置した後, 室温, 7800 rpm で 1 分遠心した. この操作をもう一度繰り返し, 200  $\mu\text{L}$  の溶出液を回収した. 溶出液に 10  $\mu\text{L}$  の Glycogen (2 mg/mL)と 30  $\mu\text{L}$  の NaOAc, 600  $\mu\text{L}$  の 100%エタノールを加えて $-80^{\circ}\text{C}$ に一晩放置した.  $4^{\circ}\text{C}$ , 14,000 rpm で 20 分間遠心した後, 上清を完全に取り除き, 沈殿を乾燥させた. 1~10  $\mu\text{L}$  の Elution Buffer を加えて 15 分間放置し再懸濁した後, 分光光度計で mRNA の濃度を測定した.

### プライマーの設計

本章の RACE クローニングおよびゲノミック PCR やプライマーウォーキングに用いたプライマーの塩基配列を表 2-2, -3 および図 2-1 にまとめた.

### RT-PCR

Titan<sup>TM</sup> One Tube RT-PCR system (Roche Diagnostics)を用いて RT-PCR を行なった. 約 1  $\mu\text{g}$  の花柱 total RNA を鋳型にし, 0.4  $\mu\text{M}$  フォワードプライマー‘FTQQYQ’, 0.4  $\mu\text{M}$  リバースプライマー‘anti-(I/T)IWPNV’, 5 mM DTT, 10  $\mu\text{L}$  5 $\times$  RT-PCR Buffer, 0.2 mM dNTP mix, 1  $\mu\text{L}$  Enzyme mix (Taq DNA polymerase, Pwo DNA polymerase, AMV reverse transcriptase)と滅菌水を加えた 50  $\mu\text{L}$  の反応液を作成した. ‘FTQQYQ’と‘anti-(I/T)IWPNV’プライマーは, ニホンナシ *S-RNase* の C1 領域およ

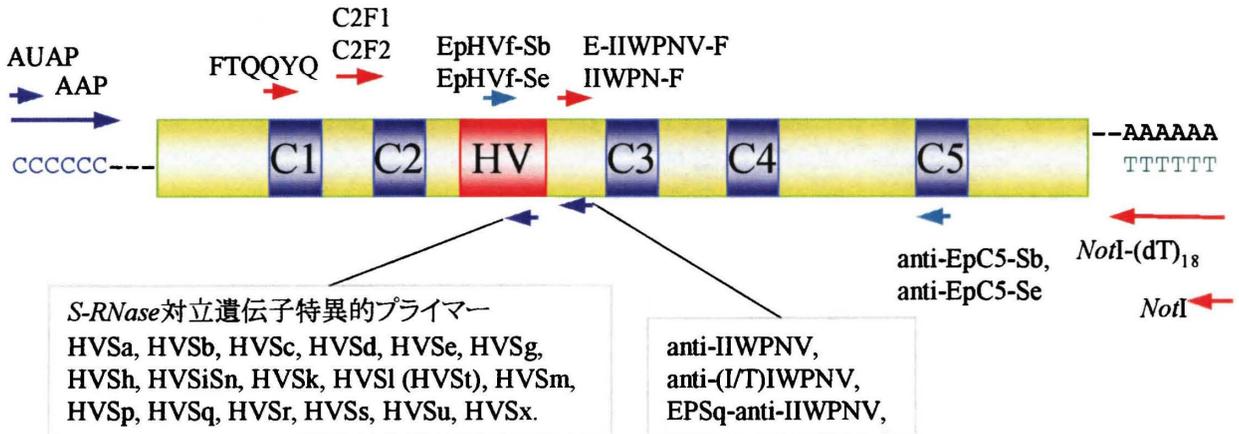
表2-2 本章のRACEクローニングおよびゲノミックPCRに用いた*S-RNase*特異的プライマー.

プライマー	配列(5'-3')	プライマーの位置
FTQQYQ	TTACGCAGCAATATCAG	C1
C2FI	TCTAATCCTACTCCTTGT	C2上流
C2F2	GATCCTCCTGACAAGT	C2
HVSa	GGGCTGTCAGATTTGCT	HV
HVSb	GGGGTTCGAGTATTTTC	HV
HVSd	GCTGCCATATTTCTATCT	HV
HVSe	GGTTGAGTGATGGATCTA	HV
HVSg	CTGGAGATTTCTATCTTGG	HV
HVSh	GGGGTTCGAGTTTTTTTGC	HV
HVSk	GGCTTTAAGATCTGTTATCG	HV
HVSI	GGGGTTGAGTGATGTATCTA	HV
HVSq	CTTATCGTTCGAGGTTTC	HV
HVSr	GCTTGGATATTTGTTATCC	HV
anti-IIWPNV	AC (A/G) TTCGGCCAAATAATT	HV下流
EpSg-anti-IIWPNV	ACGTTTCGGCCAAATAATG	HV下流
anti-(I/T)IWPNV	AC (A/G) TTCGGCCAAATA (A/G) TT	HV下流
EP-anti-IIWPNV	AC (A/G) TT (C/T) GGCCAAATAATT	HV下流
EPSq-anti-IIWPNV	ACGTTTGGCCAAATAATT	HV下流
IIWPN-F	G (A/G) HAATTATTTGGCCG	HV下流
E-IIEPNV-F	ATTATTTGGCCAAACGTA	HV下流

表2-3 本章のイントロンウォーキングで設計したプライマー.

プライマー	配列(5'-3')	プライマーの位置
Se-INTF1	GCAAGGTTTTGTAGCC	Seイントロン
Sg-INTF1	CATTTTAACGAAAACC	Sgイントロン
Sg-INTR1	CAAATATTTTCACACGTGC	Sgイントロン
Sg-INTFzero	GGGAATTTTAACGAAAAAC	Sgイントロン
Sg-INTF2	GGAATATCACTAGACTGGAG	Sgイントロン
Sg-INTR2	GAATCAAATGGCTAAAAAC	Sgイントロン
Sk-INTF1	CAATCCAAACATTTCC	Skイントロン
Sk-INTF2	CTTATATGGGGACATTC	Skイントロン
Sk-INTR1	GATTTTGAATAAAATCCAC	Skイントロン
SI-INTF1	GGGTTTAATACTCACAC	SIイントロン
SI-INTF2	GATTTTCAAATCCTTAATC	SIイントロン
SI-INTF2a	CAAATCCTTAATCCTAAATG	SIイントロン
SI-INTR1	CTGAAACTTTGTTGGTG	SIイントロン
SI-INTR2	CACACACACACATGG	SIイントロン
SI-INTR3	TTACATATAACAAATTGATAC	SIイントロン
Sq-INTF1	GTAATTGAAGCTTACACC	Sqイントロン
Sq-INTF2	CCATTTATTTTAAGTTATCC	Sqイントロン
Sq-INTR1	GAAAAATTAATAATTTGTGG	Sqイントロン
Sq-INTR2	CTAAACAAAGCTATTGTACC	Sqイントロン

<RNAを鋳型にしたcDNAクローニングと半定量的RT-PCR>



<gDNAを鋳型にしたPCR>

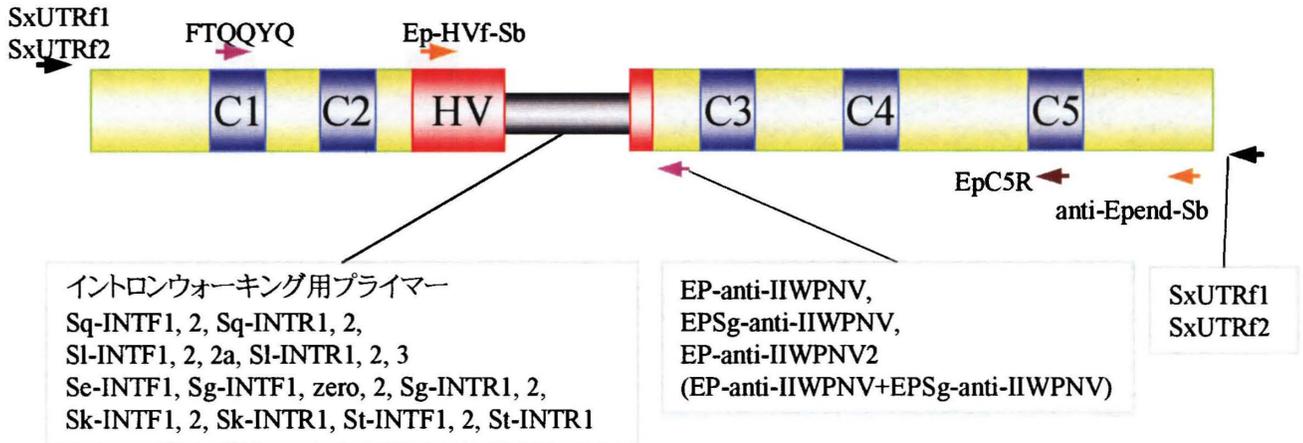


図2-1 本論文で用いたプライマーの位置. 矢印(赤):3'RACE, 矢印(青):5'RACE, 矢印(緑):半定量的RT-PCR, 矢印(紫):CAPSマーカースystemにおけるゲノミックPCR, 矢印(橙):*Sb-RNase*の解析, 矢印(茶):*Sv-RNase*の解析, 矢印(黒):*Sx-RNase*の解析.

びHV領域下流の保存領域の塩基配列からそれぞれ設計されている (Takasaki et al. 2004). 50℃ 30分で逆転写反応を行なった後, PCRは始めに94℃ 2分の熱変性, 続いて94℃ 30秒の熱変性, 55℃ 30秒のアニーリング, 68℃ 45秒の伸長反応を30サイクル行ない, 最後に68℃ 7分で伸長反応を行なった.

### 3'Rapid Amplification of cDNA Ends (3'RACE)

3'RACEは花柱 total RNAを鋳型にして行なった. 始めにTitan One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics)を用いてRT-PCRを行なった. 100 ngのmRNAを鋳型にし, フォワードプライマーに'FTQQYQ', リバースプライマーに'*No1*-(dT)<sub>18</sub>' (5'-ATTCGCGGCCGCGCAGGAAT<sub>18</sub>-3')を用いた. 反応液の組成と反応サイクルはRT-PCRの項と同じである.

RT-PCR産物を鋳型にし, セイヨウナシ *Sd*-および *Se-RNase* のC1領域直後の塩基配列に基づき設計した'C2F1', または, リンゴ *S-RNase* のC2領域直前の塩基配列に基づき設計した'C2F2'をフォワードプライマーに, '*No1*' (5'-ATTCGCGGCCGCGCAGGAAT-3')をリバースプライマーに用いたNested PCRを行なった. Nested PCRにはGeneAmp High Fidelity PCR System (Applied Biosystems)を用いた. 2 μLのRT-PCR産物に0.2 mM dNTP mix, 0.3 μMのフォワードプライマー'C2F2'または'C2F1', 0.3 μMのリバースプライマー'*No1*', 3 μL 10×Buffer, 0.2 μL Enzyme mixと滅菌水を加えた30 μLの反応液を作成した. PCRは始めに94℃ 2分の熱変性を行なった. 続いて, 94℃ 15秒の熱変性, 48℃ 30秒のアニーリング, 72℃ 2分の伸長反応を10サイクル行ない, 94℃ 15秒の熱変性, 48℃ 30秒のアニーリング, 72℃ 2分30秒の伸長反応を20サイクル行ない, 最後に72℃ 7分で伸長反応を行なった. 反応終了後, PCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色して増幅断片を確認した.

3'RACEでクローニングした*Sq-RNase*断片はプライマーセット'C2F2'および'E-IIWPNV-F'を, *Sd*-, *Se-RNase*断片はプライマーセット'C2F1'および'IIWPN-F'を, その他の*S-RNase*断片はプライマーセット'C2F2'および'IIWPN-F'を用いて塩基配列を決定した.

### 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE)

5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 (Invitrogen)を用いて5'RACEを行なった. 始めに, 100 ngの花柱mRNAに2.5 pM リバースプライマー'EPSq-anti-IIWPNV' (*Sq-RNase*増幅用)または'anti-IIWPNV' (*Sq-RNase*以外の*S-RNase*増幅用)とDEPC処理水を加えて作成した15.5 μLの反応液を70℃で10分間加温した後, 氷上に1分放置した. 反応液に2.5 μL

の 10×PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.4 mM dNTP mix を加えた反応液 24 μL を穏やかに混和した後, 42°C で 1 分加温した. 反応液に Super Script II RT を 1 μL 加えて穏やかに混和した後, 42°C で 50 分間反応させた. Super Script II RT を 70°C 15 分間で失活させた. 反応液を 5000 rpm で 10~20 秒遠心した後, 37°C に加温した. 反応液に 1 μL RNase mix を加えて穏やかに混和した後, 37°C で 30 分間加温して, 一本鎖 cDNA を作成した.

一本鎖 cDNA 溶液に 120 μL の binding solution (6 M NaI) を加えた後, S.N.A.P. Column に移し, 11,500 rpm で 20 秒遠心した. 流出液を除いた後, 4°C に冷やしておいた 1×Wash Buffer 400 μL を column に加え, 11,500 rpm で 20 秒遠心した. この操作をさらに 3 回繰り返した後, 4°C の 70% エタノール 400 μL を加えて column を洗浄した. この洗浄をもう一度繰り返した. 11,500 rpm で 1 分間遠心して, column から完全にエタノールを除去した後, column を新しいチューブに移し, 予め 65°C に温めておいた滅菌水 50 μL を加えて 3 分間放置した. 11,500 rpm で 20 秒遠心して, column から一本鎖 cDNA を溶出させた.

溶出した一本鎖 cDNA 10 μL に 5 μL の 5×tailing buffer, 200 μM dCTP, 6.5 μL の DEPC 処理水を加えた反応液を作成した. 94°C で 2~3 分加温後, 氷上 1 分に放置した. 反応液に 1 μL の TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) を加えて穏やかに混和した後, 37°C で 10 分間加温して, 一本鎖 cDNA の 3' 末端にポリ dC-tail を付加した. 65°C で 10 分間加熱して TdT を不活化させた.

dC-tailed cDNA を鋳型にし, High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics) を用いて First PCR を行なった. 5 μL の dC-tailed cDNA に 5 μL の 10×buffer, 200 μM dNTP, 0.4 μM のフォワードプライマー 'AAP' (Abridged Anchor Primer: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'), 0.4 μM のリバースプライマー 'anti-IIWPNV' または 'EPSq-anti-IIWPNV', 0.5 μL enzyme と滅菌水を加えた 50 μL の反応液を作成した. PCR は 94°C 2 分の熱変性に続き, 94°C 1 分の熱変性, 48°C 1 分のアニーリング, 72°C 2 分の伸長反応を 35 サイクル行ない, 最後に 72°C 7 分で伸長反応を行なった.

Nested PCR には High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics) を用いた. 5 μL の First PCR 産物に 5 μL の 10×buffer, 200 μM dNTP, 0.4 μM のフォワードプライマー 'AUAP' (Abridged Universal Anchor Primer: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'), 0.4 μM の各 S-RNase の HV 領域に特異的なリバースプライマー ('HVSa', 'HVSb', 'HVSd', 'HVSe', 'HVSg', 'HVSh', 'HVSk', 'HVSj', 'HVSq', 'HVSr'), 0.5 μL enzyme と滅菌水を加えて 50 μL の反応液を作成した. PCR は 94°C 2 分の熱変性に続いて, 94°C 1 分の熱変性, 48°C 1 分のアニーリング, 72°C 2 分の伸長反応を 30 サイクル行ない, 最後に 72°C 7 分で伸長反応を行なった. 反応終了後, PCR 産物を 1% アガロース

ゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して増幅断片を確認した。

## ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA の抽出には CTAB 法 (Castillo et al. 2001)を用いた。各品種の未展開葉約 100 mg を液体窒素で冷却しながら粉碎棒で十分に磨砕した。70℃に温めておいた 2-メルカプトエタノールを 5%含む 2×CTAB 溶液 (2% Cetyl-trimethylammonium bromide (CTAB), 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl) を 400 μL 加えて懸濁した後、60℃ 40 rpm で 10 分振盪した。懸濁液にクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)を 400 μL 加えて、室温、40 rpm で 30 分振盪した後、室温 10,000 rpm で 5 分遠心した。上清をクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) 400 μL を分注しておいた新しいチューブに移し、再度同じ条件で振盪して遠心した。イソプロパノールを分注しておいた別の新しいチューブに上清を移し、室温 40 rpm で 10 分振盪した。4℃ 10,000 rpm で 5 分遠心して DNA を析出させた。上清を捨て、70%エタノールを 500 μL 加えて析出した DNA の沈殿を洗浄した後、沈殿を風乾させた。1 mL に RNase A (10 mg/mL)を 1 μL 含む 1×TE 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0))を 50 μL 加えて 5 分放置した後、上清を新しいチューブに移して 37℃ 10 分加温した。

抽出した DNA 溶液には DNA とともに糖が多く含まれているため、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (PCI)処理を行ない、ゲノム DNA を精製した。新たに 1×TE 溶液を加えて 200 μL にした DNA 溶液に、等量の飽和フェノール/ (クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)) (1:1) を加えて、10 分間回転振盪させた。室温 12,000 rpm で 5 分遠心した後、上清を新しいチューブに移した。この上清に 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)と 2.5 倍量の 100%エタノールを加え、室温で 10 分放置した後、室温 12,000 rpm で 10 分遠心した。上清を捨て、沈殿を 70%エタノールで洗浄した後、沈殿を風乾させた。適当な量の 1×TE 溶液を加えて 5 分放置した後、上清を回収してゲノム DNA 溶液とした。

## ゲノミック PCR

ゲノミック PCR はフォワードプライマーとして‘FTQQYQ’を、リバープライマーとして‘EP-anti-IIWPNV’、‘EPSg-anti-IIWPNV’、‘EP-anti-IIWPNV2’ (‘EP-anti-IIWPNV’ と ‘EPSg-anti-IIWPNV’の混合プライマー)を用いて行なった。ゲノム DNA 溶液 2 μL に、3 μL の 10×PCR Buffer, 3 μL の dNTP (2 μM), 各プライマー (3 μM)をそれぞれ 3 μL, 0.2 μL rTaq polymerase (TOYOBO), 滅菌水を加えた 30 μL の反応液を作成した。PCR は 94℃ 2 分の熱変性

に続いて、94℃ 15 秒の熱変性、48℃ 30 秒のアニーリング、72℃ 3 分の伸長反応を 10 サイクル行ない、さらに、94℃ 15 秒の熱変性、48℃ 30 秒のアニーリング、72℃ 3 分 30 秒の伸長反応を 20 サイクル行ない、最後に 70℃ 7 分で伸長反応を行なった。PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドでゲルを染色して増幅断片を確認した。

ゲノミック PCR 産物の塩基配列決定のためのゲノミック PCR には、rTaq polymerase の代わりに proof reading 活性を有する KOD-Plus- (TOYOBO)を用いた。3.3  $\mu\text{L}$  のゲノム DNA 溶液に 0.2 mM dNTP mix, 0.3  $\mu\text{M}$  のフォワードプライマー、0.3  $\mu\text{M}$  のリバースプライマー、5  $\mu\text{L}$  の 10 $\times$  Buffer, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1  $\mu\text{L}$  KOD-Plus- DNA polymerase と滅菌水を加えて 50  $\mu\text{L}$  の反応液を作成した。PCR は 94℃ 2 分の熱変性に続いて、94℃ 15 秒の熱変性、48℃ 30 秒のアニーリング、68℃ 2 分の伸長反応を 30 サイクル行ない、最後に 68℃ 7 分で伸長反応を行なった。

### ゲルからの PCR 増幅断片の抽出

アガロースゲルからの PCR 増幅断片の抽出には、GENECLEAN®III Kit (BIO 101)を使用した。PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、目的の増幅断片を切り出した。切り出したゲル重の 3 倍量の飽和 NaI 溶液を加え、50℃でゲルを融解させた。ゲル溶液に 5  $\mu\text{L}$  の EZ-GLASSMILK を加えて混和して 5 分間放置した後、4℃ 14,000 g で 5 秒遠心して上清を捨てた。500  $\mu\text{L}$  の New Wash Buffer (NaCl-EtOH-Water)を加えてガラスミルクを再懸濁した後、4℃ 14,000 g で 5 秒遠心して上清を捨てた。この操作を再度行なった後、最後に NEW 液を完全に取り除き、5  $\mu\text{L}$  の 1 $\times$ TE 溶液を加えて再懸濁し、14,000 g で 30 秒遠心して上清 (増幅断片を含む)を回収した。抽出液を 1%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して抽出断片の濃度を決定した。

### 増幅断片の TA クローニング

PCR 産物のクローニングには、TA Cloning® Kit (Invitrogen)を用いた。滅菌水、1  $\mu\text{L}$  の 10 $\times$  Ligation Buffer, 2  $\mu\text{L}$  の pCR2.1 vector, 1  $\mu\text{L}$  の T4 DNA Ligase に vector とのモル比が 1:1 になるように調整した PCR 産物を加え、10  $\mu\text{L}$  の反応液を作成し、14℃で 16 時間ライゲーション反応を行なった。50  $\mu\text{L}$  のコンピテント細胞 (One Shot TOP10F' Chemically Competent *E.coli*)を氷上で融解し、2  $\mu\text{L}$  のライゲーション反応液を加えて、氷上で 30 分間放置した。42℃ 30 秒のヒートショックを与え、氷上に 1 分置いた後、250  $\mu\text{L}$  の SOC 培地 (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM glucose (dextrose))を加え、37℃ 60 rpm で

1 時間振盪培養した。50 mg/mL カナマイシン, 20  $\mu$ L/mL X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoryl- $\beta$ -D-Galactoside)と 0.1 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)を加えた LB 培地 (10 g/L Tryptone, 5 g/L Yeast Extract, 5 g/L NaCl, 1.5% Agar) に植菌し, 37°Cで一晩培養した。Blue/White 選抜により区別される白色コロニーを LB 培地 (50 mg/mL カナマイシン)に楊枝で移してマスタープレートを作成するとともに, 20  $\mu$ L の 20T-2E-1% Triton X (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 2 mM EDTA, 1% Triton X-100)に懸濁した。懸濁液を 94°Cで 15 分加温した後, 4°C, 15,000rpm で 1 分遠心し, 上清を PCR に用いた。インサートチェックの PCR には rTaq DNA polymerase (TOYOBO) を用いた。懸濁液 1  $\mu$ L に 0.2 mM dNTP mix, 0.3  $\mu$ M のフォワードプライマー, 0.3  $\mu$ M のリバースプライマー, 1  $\mu$ L 10 $\times$ Buffer, 0.07  $\mu$ L rTaq DNA polymerase と滅菌水を加えて 10  $\mu$ L の反応液を作成した。PCR は始めに 94°C 2 分の熱変性を行なった。続いて, 94°C 30 秒の熱変性, 48°C 30 秒のアニーリング, 72°C 2 分の伸長反応を 25 サイクル行ない, 最後に 70°C 7 分で伸長反応を行なった。反応終了後, PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色してインサートの有無を確認した。

目的の断片を含むコロニーの懸濁液を鋳型にし, KOD-Plus- (TOYOBO)を用いて断片を増幅した。1.5  $\mu$ L の懸濁液に 0.2 mM dNTP mix, 0.3  $\mu$ M のフォワードプライマー‘M13(-20)’ (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'), 0.3  $\mu$ M のリバースプライマー‘M13RV’ (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), 5  $\mu$ L の 10 $\times$ Buffer, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ L の KOD-Plus- DNA polymerase と滅菌水を加えて 50  $\mu$ L の反応液を作成した。PCR は始めに 94°C 2 分の熱変性を行なった。続いて, 94°C 15 秒の熱変性, 48°C 30 秒のアニーリング, 68°C 1 分の伸長反応を 30 サイクル行ない, 最後に 68°C 7 分で伸長反応を行なった。反応終了後, PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色して目的の増幅断片を切り出し, 前述の方法でゲルから抽出した。抽出した増幅断片を  $\lambda$ DNA/HindIII digest マーカーとともに 1%アガロースゲルで電気泳動し, DNA の濃度を測定した。

## 塩基配列の決定

シーケンス反応には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いた。抽出した PCR 増幅断片 10~20 ng に 1.6 pM プライマー, 3  $\mu$ L の 5 $\times$ Sequence Buffer, 2  $\mu$ L の BigDye Terminator Ready Reaction Mix と滅菌水を加えて 20  $\mu$ L の反応液を作成した。シーケンス反応は始めに 96°C 1 分の熱変性を行なった後, 96°C 10 秒の熱変性, 50°C 5 秒のアニーリング, 60°C 4 分の伸長反応を 25 サイクル行なった。反応終了後, 反応液に 2  $\mu$ L の 3 M 酢酸ナトリウ

ム (pH 5.2), 2  $\mu$ L の 125  $\mu$ M EDTA, 50  $\mu$ L の 100%エタノールを加えて4回転倒で混和した後, 室温で15分間放置した. 4°C 15,000 rpm で20分間遠心し, 上清を取り除いた後, 70  $\mu$ L の 70%エタノールを加えて沈殿を洗浄し, 4°C 15,000rpm で5分間遠心して上清を完全に取り除いた. 室温で15分風乾させた後, シークエンスを行なうまで-20°Cに遮光保存した.

シークエンスには 373S DNA Sequencing System (Applied Biosystems)または ABI PRISM™ 310 DNA capillary sequencer (Applied Biosystems)を用いた. 前者を用いた場合, 25 g の尿素, 6.75 mL の 50% Long Ranger stock, 5 mL の 10×TBE と滅菌 Mili Q 水で 6.75%のゲル溶液を作成し, 重合促進剤として 250  $\mu$ L の過硫酸アンモニウム (APS)と 25  $\mu$ L の TEMED (N,N,N',N',テトラメチルエチレンジアミン)を加えた後, きれいに洗浄して組み立てたガラス板の間にゲル溶液を流し込み4~5時間放置して十分重合させた. シークエンス用サンプルに 3  $\mu$ L の 50 mM EDTA (ブルーデキストランを含む): 脱イオン化ホルムアミド = 1 : 5 を加えて混和した. 373S にゲル板をセットし, 泳動条件を設定した後, サンプルを奇数レーンにロードした. 5分間泳動したところで一時停止してサンプルを偶数レーンにもロードし, 再開後16時間泳動した. 後者を用いた場合, シークエンス用サンプルに Hi Di™ Formamide 25  $\mu$ L を加え, サンプルをシークエンスチューブに移した. 96°C 2分加熱後, 急冷して解析に用いた.

シークエンスのデータは GENETYX-MAC 13.0 (Genetyx)を用いて解析した. シグナルペプチドの推定は Signal P ver. 2.0 により行なった (Nielsen et al. 1999)

## 制限酵素処理

PCR 産物 5  $\mu$ L を用いて, *Bae*I, *Bgl*II, *Bss*HIII, *Hind*III, *Eco*O109I, *Sph*I による制限酵素処理を行なった. *Bae*I は 25°C で 4 時間, *Bss*HIII は 50°C で 4 時間, それ以外の制限酵素は 37°C で 4 時間反応させた. 制限酵素処理前後の PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色した.

## <結果>

### 自家不和合性の評価

日本の栽培品種のうち第1章で供試していない15品種, ‘アレクサンドリン・デュイヤー’, ‘ウィンター・ネリス’, ‘セニョール・デスペラン’, ‘デポー’, ‘ドワイエネ・デュ・コムス’, ‘マルゲリット・マリーラ’, ‘ミクルマス・ネリス’, ‘マックス・レッド・バートレット’, ‘エル・ドラド’,

‘オーロラ’, ‘カリフォルニア’, ‘越さやか’, ‘シルバー・ベル’, ‘バラード’, ‘ボートヌ’の自家不和合性を第1章の方法により評価したところ, ‘マルゲリット・マリーラ’は雄性不稔であったが, その他の14品種は自家不和合と判定された(データ省略). したがって, 日本の栽培品種25品種においては, ‘マルゲリット・マリーラ’が雄性不稔性, ‘グランド・チャンピオン’が部分的自家不和合性, その他の23品種は自家不和合性を有することが明らかになった.

### ***S-RNase* をコードする cDNA 断片のクローニング**

セイヨウナシの雌しべ側*S*遺伝子産物も*S-RNase*であると仮定し, cDNAのクローニングを試みた. まず, 自家不和合性品種のうち10品種, ‘ラ・フランス’, ‘パートレット’, ‘ル・レクチェ’, ‘ゼネラル・レクラーク’, ‘オーロラ’, ‘コンファレンス’, ‘ドワイエネ・デュ・コムス’, ‘フレミッシュ・ビューティー’, ‘ウィンター・ネリス’, ‘パス・クラサン’の花柱から抽出したtotal RNAを鋳型にして, プライマーセット‘FTQQYQ’と‘anti-(I/T)IWPNV’を用いてRT-PCRを行ない, C2領域とHV領域を含むと予想されるcDNA断片を増幅した. RT-PCR産物をTAクローニングした後, 各品種に対して約10個のコロニーを採取し, インサートDNA配列を解析した. その結果, ‘パス・クラサン’以外の9品種から2種類ずつのcDNA断片が増幅されたが, ‘パス・クラサン’からは1種類の断片しか増幅されなかった.

そこで, 各品種のtotal RNAを鋳型に3’RACEを行なった. プライマーセット‘FTQQYQ’と‘*NotI*-(dT)<sub>18</sub>’を用いたRT-PCRでは, ニホンナシ*S-RNase* cDNAの塩基配列から予想される約800 bpの断片の他にいくつかの断片が増幅されたので, RT-PCR産物を鋳型に, 推定*S-RNase*断片の配列から設計したフォワードプライマー‘C2F1’および‘C2F2’と, リバースプライマー‘*NotI*’を用いてNested PCRを行なった. その結果, 各品種から*S-RNase*断片と期待される約800 bpの断片と若干の付随断片が増幅された. 約800 bpの増幅断片をゲル抽出し, TAクローニングした後, 各コロニーのインサートDNA配列を決定した. その結果, ‘パス・クラサン’を含むすべての品種から2種類ずつの3’末端側cDNA断片がクローニングされ, これらは配列の比較から10種類に分類された.

本研究の進行中に, ゲノミックPCRにより増幅された13種類の推定*S-RNase*対立遺伝子 (*Sa*-, *Sb*-, *Sc*-, *Sd*-, *Se*- (= *Sj*-), *Sh*-, *Si*-, *Sk*-, *Sl*-, *Sm*-, *Sn*-, *So*-, *Sp-RNase* (*Se*と*Sj*は同一の配列を持つので以降*Se*で表記))の部分配列がデータベースに登録された (Zuccherelli et al. 2002a, b; Zisovich et al. 2004a). Zuccherelli et al. (2002a, b)は6種類の推定*S-RNase*対立遺伝子, *Sa* (accession no. AJ458181), *Sb* (accession no. AJ458182), *Sc* (accession no. AJ459774), *Sd* (accession no. AJ759775), *Se* (accession

no. AJ457053), *Sh* (accession no. AJ459776)をクローニングし, 増幅された推定 *S-RNase* 対立遺伝子の種類から, 10 品種の *S* 遺伝子型を‘Abbé fetal’ (*SaSb*), ‘ドワイエネ・デュ・コムス’ (*SaSb*), ‘Cascade’ (*SbSe*), ‘マックス・レッド・パートレット’ (*SeS-*), ‘パートレット’ (*SeS-*), ‘Beurré Hardy’ (*ScSd*), ‘Eletta Morettini’ (*SaSc*), ‘パス・クラサン’ (*SaS-*), ‘コンファレンス’ (*SdSh*), ‘Beurré Bosc’ (*SeS-*)と推定した. また, *SaSb* の‘Abbé fetal’と‘ドワイエネ・デュ・コムス’が交雑不和合であることを交配実験で確認している. Zisovich et al. (2004a)は 8 種類の *S-RNase* 対立遺伝子; *Si* (accession no. AF518319), *Sj* (accession no. AF457594), *Sk* (accession no. AY103048), *Sl* (accession no. AY103409), *Sm* (accession no. AY159323), *Sn* (accession no. AY195840), *So* (accession no. AY261994), *Sp* (accession no. AY421968)をクローニングし, 9 品種の *S* 遺伝子型を‘Bon Rouge’ (*SeSl*), ‘Coscia’ (*SbSk*), ‘Docteur Jules Guyot (プレコース)’ (*SaSe*), ‘Forelle’ (*SeSn*), ‘Gentile’ (*SeSt*), ‘Lawson’ (*SmSo*), ‘Red Clapp’s (スタークリムソン)’ (*SdSe*), ‘Spadona’ (*SeSk*), ‘Spadochina’ (*SkSl*)と推定している. 推定 *S* 対立遺伝子の配列とクローニングした 10 種類の 3’末端側 cDNA 断片を照合させた結果, 7 種類の cDNA 断片は推定 *Sa-*, *Sb-*, *Sd-*, *Se-*, *Sh-*, *Sk-*, *Sl-RNase* 対立遺伝子に対応していた. 残り 3 種類は 13 種類の推定 *S-RNase* 対立遺伝子と異なる配列を持っていたことから, 新規の *S-RNase* 対立遺伝子と見なし, *Sg*, *Sq*, *Sr* と名付けた.

クローニングした断片の種類から 10 品種の *S* 遺伝子型を, ‘ラ・フランス’ (*SeSr*), ‘パートレット’ (*SeSl*), ‘ル・レクチェ’ (*SbSq*), ‘ゼネラル・レクラーク’ (*SlSq*), ‘オーロラ’ (*SaSe*), ‘コンファレンス’ (*SdSr*), ‘ドワイエネ・デュ・コムス’ (*SaSb*), ‘フレミッシュ・ビューティー’ (*SdSe*), ‘ウィンター・ネリス’ (*ShSk*), ‘パス・クラサン’ (*SgSr*)と推定した.

### ***S-RNase* 完全長 cDNA 塩基配列の決定**

推定 *S-RNase* cDNA 完全長塩基配列を決定するため, セイヨウナシ 6 品種, ‘ドワイエネ・デュ・コムス’ (*SaSb*), ‘フレミッシュ・ビューティー’ (*SdSe*), ‘ゼネラル・レクラーク’ (*SlSq*), ‘ラ・フランス’ (*SeSr*), ‘ウィンター・ネリス’ (*ShSk*), ‘パス・クラサン’ (*SgSr*)の花柱 mRNA を鋳型に 5’RACEを行なった. 各推定 *S-RNase* の HV 領域特異的リバープライマーを用いた Nested PCR により増幅された cDNA 断片をゲルから抽出し, 塩基配列を決定した. 3’末端側 cDNA 断片の配列と照合したところ, 10 種類の推定 *S-RNase* cDNA に対応する 5’末端側断片をクローニングすることができた.

5’および3’末端側断片配列を重複させ, cDNA 完全長塩基配列を決定した: *Sa-RNase* (accession no. AB236430), *Sb-RNase* (accession no. AB236429), *Sd-RNase* (accession no. AB236427), *Se-RNase*

(accession no. AB236428), *Sg-RNase* (accession no. AB258360), *Sh-RNase* (accession no. AB236431), *Sk-RNase* (accession no. AB236432), *Sl-RNase* (accession no. AB236425), *Sq-RNase* (accession no. AB236424), *Sr-RNase* (accession no. AB236426). 10 種類の完全長 cDNA 配列は 678~696 bp から構成され、226~232 アミノ酸をコードしていた。推定アミノ酸配列はニホンナシとリンゴの *S-RNase* に典型的な 1 次構造を有しており、25 または 27 アミノ酸残基のシグナルペプチド、*T2/S* 型 *RNase* の活性に必須な 2 つのヒスチジン残基 (Kawata et al. 1989), 高次構造形成に関わる 8 つのシステイン残基 (Ishimizu et al. 1996b) が確認された。10 種類の推定アミノ酸配列の比較から、ニホンナシやリンゴと同じ位置に 5 つの保存領域 (C1, C2, C3, RC4, C5) と対立遺伝子特異性に関与する 1 つの HV 領域が特定された (図 2-2) (Ishimizu et al. 19998; Ushijima et al. 1998)。クローニングした 10 種類の cDNA はナシ亜科の *S-RNase* に共通の特徴を有していることから、セイヨウナシの *S-RNase* (*Sa-*, *Sb-*, *Sd-*, *Se-*, *Sh-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sq-*, *Sr-RNase*) をコードすると考えられた。また、これら *S-RNase* の推定アミノ酸配列の相同性は 61.8% (*Sb-* と *Sl-RNase* 間)~89.5% (*Sk-* と *Sq-RNase* 間) であり、ニホンナシ (56.7~94.6%) やリンゴ (60.7~93.9%) と同程度であった。

## 10 種類の *S-RNase* 対立遺伝子を識別する CAPS マーカーシステムの開発

日本の栽培品種の *S* 遺伝子型を迅速に推定できる CAPS マーカーシステムを開発するため、10 種類の *S-RNase* 断片 (C2 領域と HV 領域、イントロンを含む) を増幅できるプライマーを cDNA の塩基配列から検討した。上述のように、ニホンナシのプライマーセット 'FTQQYQ' と 'anti-(I/T)IWPNV' を用いた RT-PCR により、*Sg-RNase* 以外の 9 種類の *S-RNase* は増幅されたが、*Sg-RNase* は増幅されなかった。一方、*Sg-RNase* を含む 10 種類の *S-RNase* 3' 末端側 cDNA 断片はプライマーセット 'FTQQYQ' と 'NotI-(dT)<sub>18</sub>' を用いた 3'RACE により増幅されている。このことから、10 種類の *S-RNase* 対立遺伝子の PCR 増幅にフォワードプライマー 'FTQQYQ' はそのまま使用できると判断した。*S-RNase* cDNA と 'anti-(I/T)IWPNV' プライマーの配列の比較から、新たな 2 つのリバースプライマー 'EPSg-anti-IIWPNV' (*Sg-RNase* 特異的) と 'EP-anti-IIWPNV' (*Sg-RNase* 以外の *S-RNase*) を設計した (図 2-3)。*Sa-*, *Sb-*, *Sd-*, *Se-*, *Sg-*, *Sh-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sq-*, *Sr-RNase* 対立遺伝子を有するセイヨウナシ 6 品種、'ドワイエネ・デュ・コムス' (*SaSb*), 'フレミッシュ・ビューティー' (*SdSe*), 'ゼネラル・レクラーク' (*SlSq*), 'ラ・フランス' (*SeSr*), 'ウィンター・ネリス' (*ShSk*), 'パス・クラサン' (*SgSr*) のゲノム DNA を鋳型に PCR を行なったところ、'FTQQYQ' と 'EP-anti-IIWPNV' のプライマーセットにより *Sg-RNase* 以外の *S-RNase* の断片が (図 2-4a), 'FTQQYQ' と 'EPSg-anti-IIWPNV' のプライマーセットにより *Sg-RNase* の断片のみが増幅された

Sa-RNase	MGITGIIYVMVTMVFLIVLILSPSTVG	YDYFQFTQQYQLAVCHFNPPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNS	TGNDPMYCKNTLNS TK	---IAN-LTAQLEIIWPNVLDRTDHI	FWNKQ	112	
Sb-RNase	MG-TGMIYVMVMVFLIVLILSSSTVG	FDYYQFTQQYQPAVCNSNPPTCKDPPDKLFTVHGLWPS	SDSNGNDPKYCKAPP-Y-QT---	MKI-LEPHLVIWPNVLRNDHEV	FWRKQ	109	
Sd-RNase	MGNTGMIYMFMTMVFLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPPTCNDRPEKLF	FTVHGLWPSNKKGPDPEKCKNIQMN	SQK---	IGN-MAAQLEIIWPNVLRNDHVG	FWERE	
Se-RNase	MGITRMIYVMTMAFSLIVLILSSSTMG	YDYFQFTQQYQPAACNSNPPTCKDPT	EKLFTVHGLWPSNSNGPDPVNC	PKTKVPAQQPIDPSLKPQLEIIWPNV	FNADNESFWNKQ	116	
Sg-RNase	MGIIIGMIYVMVMVFLIVLILSSSTVG	FDYFQFTHQYQPAVCNSNRTPCDPPDKL	FTVHGLWPSNRNGPDPPEYCKNTL	DVTK---	IGN-LQAQLDIWPNVYDR	TNNVGFWSKQ	
Sh-RNase	MGITGMIYVMTMVFLIVLILSSSTVG	FDYFQFTQQYQPAACNSNPPTCKDPT	DKLFTVHGLWPSNKIGGDPEYCKI	--RNP	RKLEPQLEIIWPNVLDRTNHTG	FWSRQ	
Sk-RNase	MGITGMIYVMTMVFLIVLILSSSA	VKFDYFQFTQQYQPAVCNSNPPTCKDPPDKL	FTVHGLWPSNVNGSDPKKCKATIL	NPQT---	ITD-LKAQLEIIWPNVLRKAHVR	FWRKQ	
Sl-RNase	MGITGMIYVMTMVFLIVLILSSSA	AKYDYLQFTQQYQPAACKFHHTPCDPL	DKLFTVHGLWPSNFNGPDPENCK	VKPTASQT---	IDTSLKPQLEIIWPNVFNADHES	FWQKQ	
Sq-RNase	MGITGMIYVMTVVFSLIVLILSSSA	VKFDYFQFTQQYQPAVCNSNPPTCKDPPDKL	FTVHGLWPSNVNGSDPKKCKTTIL	KPRT---	IRN-LKAQLEIIWPNVSYSGSVR	FWRKQ	
Sr-RNase	MGITGMIHIVTMVFLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCYFNPPTCKDPPDKL	FTVHGLWPSNLNGPHPENCTNATV	NSQR---	ITN-IQAQLKIWPNVLDRTNHVGF	WNKQ	
	-----	-----	-----	-----	-----		
	Signal peptide	C1	C2	HV			
Sa-RNase	WNBKHSRPAIQNDMHYLQTVIKMYITQKQNVSEILSKAKIEPVGRF	WTOKEIEKAI	IRKGTNNKEPKLKCQRNTQG--	TELVEVTLCS	DRNLKQFIDCPRPILNGSRY	YCPTNNILY	228
Sb-RNase	WDKHSRCASSPIQNTHYFDTVIKMYITQKQNVSEILSKANIKPGRKSRRL	VDIENAIRKVINNMTPKFKCQKNPRTSL	TELVEVGLCSDSNLTQFINCPHPFPQGSRY	FCPTN-IQY			
Sd-RNase	WLKHGTCGYPTIRDDMHYKTVIKMYITQKQNVSAILSKAMIQPNGQNRSL	VDIENAIRSGTNNTPKFKCQKNTRT-T	TELVEVTLCSDRDLTKFINCPQP-QQGSRY	LCPA-DVQY			
Se-RNase	WDKHSRCASSPIQNDMHYLQTVIKMYITQKQNVSEILSKANINPDG	IGRTRKLEIENAIRNGTNDKEPKLKCQKNNGT--	TELVEVSLCSNYL	GKHF	INCPNKPQGSRYFCPIKDIQY	232	
Sg-RNase	WAKHGICGSPTIQDDVNYLFTVINMYI	IKKQNVSEILSKANIEPEGKNRTRKD	IVKAI	IRSGTNGKRPKLCQKNRT--	TELVEVTLCSDRNLTRLINCPNL	IKPKSPYFCPLKSIHY	
Sh-RNase	WKKHACGYPTIQNDYFETVIKMYITEKQNVSRILSNAKIEPDGKSRL	VDIENAIRNGTNNKLPKLCQKTRV--	TELVEITLCS	DKNRAHFIDCPNPF	LPQSPYLCPNNSIHY	227	
Sk-RNase	WRKHGACGYPTIADDMHYFSTVIEMYITKQNVSEILSKANIKPEGRFRTRDD	IVNAISPIDYKPKLCKINNT--	TELVEVGLCSDNNLTQFINCPNPF	QGSRYFCPTNNIQY			
Sl-RNase	WDKHSRCASSPIIDKNHYFQTVIRMYITEKQNVSYILSKANINPDGGRTRKD	IQIAIRNSTNDKEPKLKCQTKNGI--	TELVEVSLCSNYL	GKNF	INCPNKPQKTRYSCTPNDIHY	229	
Sq-RNase	WRKHGTCGYPTIADDMHYFSTVIEMYITKQNVSEILLKAKIKPEGRFRTRDD	IVNAISQSIDDKPEPKLCKNNNNI--	TELVEVGLCSDNNLTQFINCPHPFPQGSRY	LCPTNNIQY			
Sr-RNase	WIKHSGCNGPIMNDTHYFQTVINMYI	IKKQNVSEILSKANIEPEGKNRTRKD	IVKAI	IRSGTNGKRPKLCQKNRT--	TELVEVTLCSDRNLTRLINCPNL	IKPKSPYFCPLKSIQY	
	-----	-----	-----	-----	-----		
	C3	RC4		C5			

図 2-2 10 種類のセイヨウナシ S-RNase の推定アミノ酸配列の比較

10 種類の S-RNase 間で保存されているアミノ酸残基を網掛けで示す。高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基、および、RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基をそれぞれ\*と#で記す。シグナルペプチド、超可変 (HV) 領域、保存領域 (C1, C2, C3, RC4, C5) は下線により示す。イントロンの挿入部位は▼で示す。10 種類の S-RNase は下記の accession number で DDBJ に登録されている: Sa-RNase (AB236430), Sb-RNase (AB236429), Sd-RNase (AB236427), Se-RNase (AB236428), Sg-RNase (AB258360), Sh-RNase (AB236431), Sk-RNase (AB236432), Sl-RNase (AB236425), Sq-RNase (AB236424), Sr-RNase (AB236426)。

FTQYQ  
 TTTACGCAGCAATATCAG

Sa-RNase TTTACGCAGCAATATCAGCTGGCTGTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC  
 Sb-RNase TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCAACCTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTACTGTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC  
 Sd-RNase TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCCGTATGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCGTCTGAAAAATTGTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC  
 Se-RNase TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGAAAAATTGTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC  
 Sg-RNase TTACGCATCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCGTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAATTGTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC  
 Sh-RNase TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGACAAGTTGTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC  
 Sk-RNase TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTACGGTTCATGGTTTGTGGCCTTC  
 Sl-RNase TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAAGTTTACCATACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTACGGTTCACGGATTATGGCCTTC  
 Sq-RNase TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTACGGTTCATGGTCTGTGGCCTTC  
 Sr-RNase TTTACGCAGCAATATCAGCCAGCTGTCTGCTACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC

Sa-RNase AAACAGCACAGGAAATGACCCAATGTAAGCAAGAATACAACCTTGAATTCTACTAAGGtaaatattattaataattagatgg.....  
 Sb-RNase AGACTCGAATGAAATGACCCAAAATATTGCAAGGCGCCGCATATCAGACGgtaaatattattagcataatcagatagtcaa.....  
 Sd-RNase AAACAAGAAAGGACCTGACCCAGAAAAATGCAAGAATATACAAATGAATTCTCAGAAgtaaatattattaataatgagatag.....  
 Se-RNase AAACCTAATGGACCTGACCCAGTAACTGCAAGCCGAAACCAAGGTGCCTCAGGCGCAGCAGCCGgtaatttatctgaaa.....  
 Sg-RNase AAACAGGAATGGACCTGACCCAGAGTATTGCAAGAACAACCTTGGATGTTACCAAGgtaaatattattagtaattagacaa.....  
 Sh-RNase AAACAAAATAGGAGGCGACCCAGAATATTGCAAGATAAGGAATCCTCGAAgtaaatattattagtaatcggatagtcaata.....  
 Sk-RNase AAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAGCTACAATCTTAAATCCTCAAACGgtaaatattattcaggaaaaattaa.....  
 Sl-RNase AAACCTTAAATGGACCTGACCCAGAAAAATGCAAGGTCAAACCCACGGCGTCTCAAACGgtaaatattattgataataagatag.....  
 Sq-RNase AAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAACTACAATCTTGAACCTCGAACGgtaaatattattcaggaaaaattaa.....  
 Sr-RNase AAACCTTGAATGGACCTCACCCAGAAAAATGCACGAACGCAACCGTGAATTCTCAGAGGgtaaatattattgataatcagatag.....

Sa-RNase .....tcataaattttttttattatattatattctcagatagcaaatctgcagagccagttggaAATTATTTGGCCCAACGT  
 Sb-RNase .....aaattatttctattatattatattatattgtcagatgaaaatactcgaaccccacttggtaATTATTTGGCCGAACGT  
 Sd-RNase .....atgaattgtttctattatataattatattgtcagataggaaatatggcagccagttggaAATTATTTGGCCGAACGT  
 Se-RNase .....aatttttttattgtatattttttttgtcagatagatccatcactcaaaccccagttggaAATTATTTGGCCGAACGT  
 Sg-RNase .....attttttttcttctaatgcataatattttcagataggaaatctccaagcacagttggaATTATTTGGCCGAACGT  
 Sh-RNase .....attttttaattgtacataattctattgtcagagagcaaaaaactcgaaccccagttggaAATTATTTGGCCGAACGT  
 Sk-RNase .....gtaatttttttctattataattatattgtcagataacagatcttaagcccagctggaAATTATTTGGCCGAACGT  
 Sl-RNase .....tatttttctattgtatattgtattttcagatagatacatcactcaaaccccagttggaAATTATTTGGCCGAACGT  
 Sq-RNase .....ataatttttttctattataattatattgtcagataagaaatcttaagcccagctggaAATTATTTGGCCAAACGT  
 Sr-RNase .....atttacctagctatattatattatattgtcagataacaaatatccaagcccagttggaAATTATTTGGCCGAACGT

TTAATAAACCGYTRCA  
 EP-anti-IIWPNV  
 GTAATAAACCGYTRCA  
 EPSg-anti-IIWPNV

図 2-3 プライマー‘FTQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’により増幅される *S-RNase* 対立遺伝子の部分塩基配列。  
 橙色: プライマー‘FTQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV’および‘EPSg-anti-IIWPNV2’ ( ) がプライマーの 5’側)を表す。赤字は、他の 9  
 種類の *S-RNase* 対立遺伝子と異なる塩基を示す。イントロンは小文字で示し、途中の配列は点線で省略している。

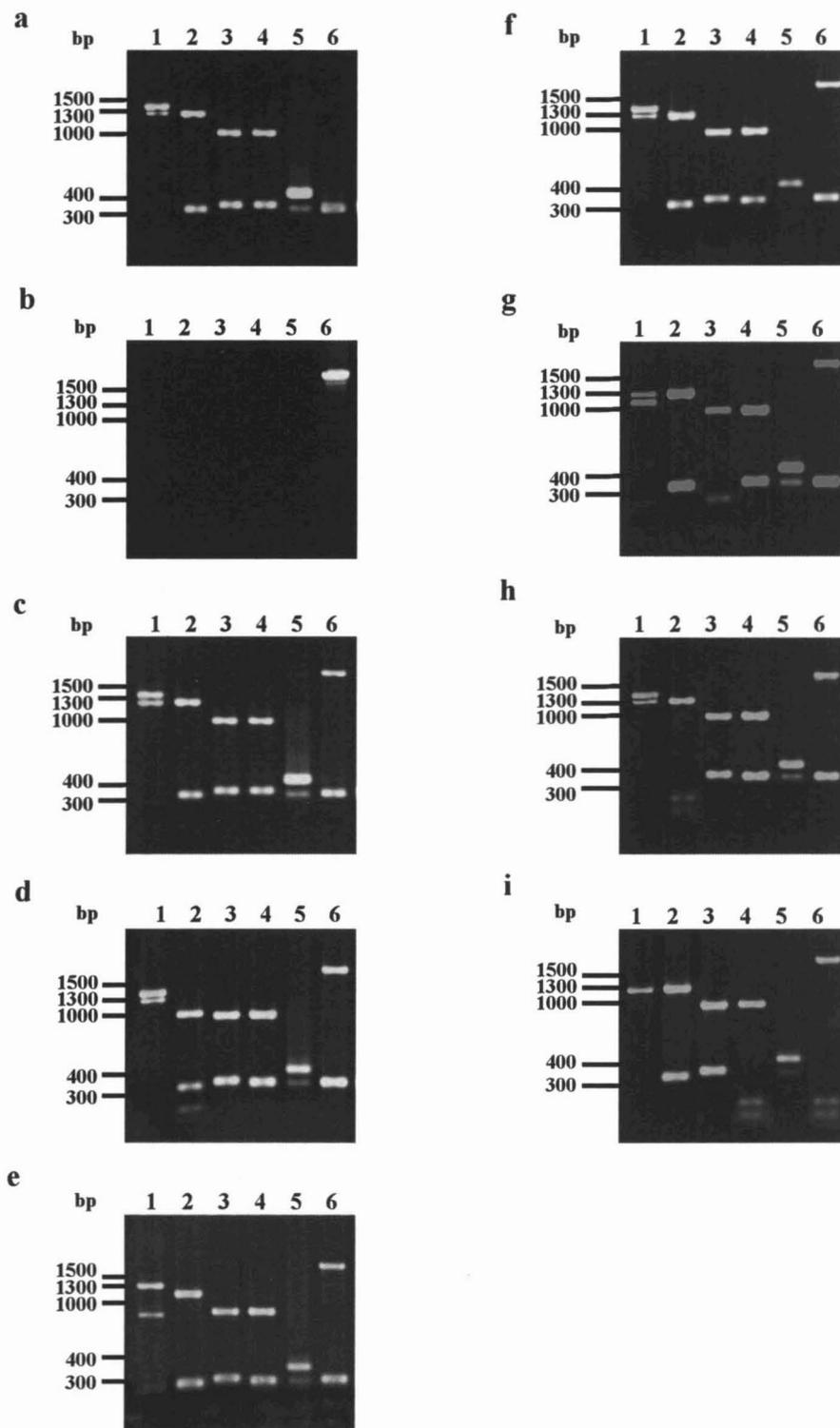


図2-4 ゲノミックPCRによる10種類の*S-RNase*対立遺伝子の増幅 (a-c)および6種類の制限酵素による識別切断 (d-i). (a)プライマー‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IWPNV’を用いたPCR, (b)プライマー‘FTQQYQ’と‘EPSg-anti-IWPNV’を用いたPCR, (c)プライマー‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IWPNV2’を用いたPCR. (d)*Bgl*IIによる切断, (e)*Hind*IIIによる切断, (f)*Sph*Iによる切断, (g)*Eco*O109Iによる切断, (h)*Bss*HIIIによる切断, (i)*Bae*Iによる切断. lane 1, ‘ゼネラル・レクラーク’ (*Slsq*); lane 2, ‘ウインター・ネリス’ (*ShSk*); lane 3, ‘フレミッシュ・ビューティアー’ (*SdSe*); lane 4, ‘ラ・フランス’ (*SeSr*); lane 5, ‘ドワイエネ・デュ・コムス’ (*SaSb*); lane 6, ‘バス・クラサン’ (*SgSr*).

(図2-4b). そこで、この2種類のリバープライマーの混合プライマーを‘EP-anti-IIWPNV2’とし、‘FTQQYQ’ともに用いてゲノミック PCR を行なったところ、10種類の *S-RNase* の断片を増幅することができた (図2-4c). ‘ゼネラル・レクラーク’ (*SlSq*)から約1,400 bp と約1,300 bp の断片が、‘ウィンター・ネリス’ (*ShSk*)から約1,300 bp と約350 bp の断片が、‘フレミッシュ・ビューティアー’ (*SdSe*)から約1,000 bp と約350 bp の断片が、‘ラ・フランス’ (*SeSr*)から約1,000 bp と約350 bp の断片が、‘ドワイエネ・デュ・コムス’ (*SaSb*)から約450 bp と約350 bp の断片が、‘パス・クラサン’ (*SgSr*)から約2,000 bp と約350 bp の断片が増幅された。

これらの増幅断片をゲル抽出した後、プライマー‘FTQQYQ’、および、‘EP-anti-IIWPNV’または‘EPSg-anti-IIWPNV’を用いて両端から DNA 配列を決定した。配列を10種類の *S-RNase* cDNA と比較した結果、各増幅断片は10種類の *S-RNase* cDNA に対応付けられ、HV 領域に対立遺伝子特異的な配列および長さを有する1つのイントロンが挿入されていることが明らかになった。約1.0 kb 以上の *Se-*, *Sg-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sq-RNase* 増幅断片に含まれるイントロン配列をプライマーウォーキングにより完全に決定した。10種類の *S-RNase* 対立遺伝子のゲノミック PCR 断片長とイントロン長は以下の通りに決定された (図2-5~14); *Sa* 345 bp (イントロン 145 bp), *Sb* 440 bp (同 246 bp), *Sd* 369 bp (同 169 bp), *Se* 998 bp (同 786 bp), *Sg* 1,906 bp (同 1,706 bp), *Sh* 345 bp (同 148 bp), *Sk* 1,274 bp (同 1,074 bp), *Sl* 1,414 bp (同 1,211 bp), *Sq* 1,283 bp (同 1,083 bp), *Sr* 353 bp (同 153 bp)。

ゲノミック PCR 後のアガロースゲル電気泳動により、*Sg-*, *Sl-*, *Se-*, *Sb-RNase* 対立遺伝子は断片長から識別できた。*Sk-*および *Sq-RNase* 対立遺伝子は約1.3 kb 断片として、*Sa-*, *Sd-*, *Sh-*, *Sr-RNase* 対立遺伝子は約350 bp 断片としてほぼ同じ断片長に検出されたので、断片長による識別が困難であった。そこで、これらの断片を特異的に切断できる制限酵素を探索した。クローニングした10種類の *S-RNase* だけでなく、データベースに登録されている *Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *So-*, *Sp-RNase* のゲノミック DNA 塩基配列も含めて検討し、6種類の制限酵素、*Bg*II, *Hind*III, *Sph*I, *Eco*O109I, *Bss*HIII, *Bae*I を選択した。約1.3 kb 断片は *Bg*II と *Hind*III 処理における切断の有無により識別可能となった: *Bg*II は *Sk-RNase* 断片のみを1,022 bp と214 bp の断片に切断した (図2-4d, lane 2); *Hind*III は *Sq-RNase* 断片のみを960 bp と323 bp の断片に切断した (図2-4e, lane 1)。約350 bp 断片については、*Sph*I, *Eco*O109I, *Bss*HIII, *Bae*I 処理における切断の有無により識別可能になった: *Sph*I は *Sa-RNase* 断片のみを233 bp と112 bp の断片に切断した (図2-4f, lane 5); *Eco*O109I は *Sd-RNase* 断片を260 bp と109 bp の断片に切断するだけでなく (図2-4g, lane 3), *Sl-RNase* 断片も1149 bp と265 bp に切断した (図2-4g, lane 1); *Bss*HIII は *Sh-RNase* 断片のみを210 bp と135 bp の断片に切断した (図2-4h, lane 2); *Bae*I は *Sr-RNase* 断片を195 bp と125 bp の断片に切断するだ

ATGGGGATTACGGGGATTATATATATGGTTACGATGGTATTTTTATTAATTGTATTAATA	60
<u>M G I T G I I Y M V T M V F L L I V L I</u>	20
TTGCCTTCCCCTACGGTAGGATACGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCTGGCT	120
<u>L P S P T V G Y D Y F Q F T Q Q Y Q L A</u>	40
GTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC	180
V C H F N P T P C K D P P D K L F T V H	60
GGTTTGTGGCCTTCAAACAGCACAGGAAATGACCCAATGTACTGCAAGAATACAACCTTG	240
G L W P S N S T G N D P M Y C K N T T L	80
AATTCTACTAAG-gtaatattattaataattagatggtcaatattgtttatttcatatat	299
N S T K	84
acataactcaacatagattttcatgcatgCGTgtgcaaataattacaattaattttaa	359
ttaatcataaatttttttttattatattatattctcag-ATAGCAAATCTGACAGCCCAG	418
I A N L T A Q	91
TTGGAATTTATTTGGCCAACTACTTGATCGAACCGATCATATAACCTTCTGGAATAAA	478
L E I I W P N V L D R T D H I T F W N K	111
CAGTGAACAAACATGGCAGCTGTGGGCGTCCCAGCAATACAGAACGACATGCATTACTTG	538
Q W N K H G S C G R P A I Q N D M H Y L	131
CAGACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAG	598
Q T V I K M Y I T Q K Q N V S E I L S K	151
CGAAGATTGAACCGGTGGGGAGATTCTGGACACAGAAGGAAATTGAAAAGGCCATACGC	658
A K I E P V G R F W T Q K E I E K A I R	171
AAAGGTACCAACAATAAGGAACCAAAACTCAAGTGCCAAAGGAATACTCAGGGGACTGAA	718
K G T N N K E P K L K C Q R N T Q G T E	191
TTGGTTGAGGTCACTATTTGTAGCGATCGCAACTTAAAGCAGTTCATAGATTGCCCCGC	778
L V E V T I C S D R N L K Q F I D C P R	211
CCTATTTTAAATGGATCACGATACTACTGCCCAACAATAATATTCTGTATTA	832
P I L N G S R Y Y C P T N N I L Y *	228

図 2-5 *Sa-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236430).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■ がプライマーの 5' 側)を表す.

ATGGGGACGGGGATGATATATATGGTTATGATGGTATTTCCCTAATTGTATTAATATTG	60
<u>M G T G M I Y M V M M V F S L I V L I L</u>	20
TCTTCGTCCACGGTGGGATTTCGATTATTATCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTC	120
<u>S S S T V G F D Y Y Q F T Q Q Y Q P A V</u>	40
TGCAACTCTAATCCAACCTCTTGTAAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTACTGTTACGGT	180
<u>C N S N P T P C K D P P D K L F T V H G</u>	60
TTGTGGCCTTCAGACTCGAATGGAAATGACCCAAAATATTGCAAGGCGCCGCATATCAG	240
<u>L W P S D S N G N D P K Y C K A P P Y Q</u>	80
ACGgtaatattattagcataatcagatagtcaatattgtttatctcatttatgtacttgt	300
<u>T</u>	81
gtgtgtatatatatatTTTTGGATAATGCTAGAGCCTCCAAATTTTTAAACCAATGATG	360
gtgcacaataagatataagaaatTTAGTCTTTCTAACATTACTCTATATTTTTGATAT	420
atacaaatattacacttaatTTTAAATTTTATCATAAATTTCTATTATATATATTA	480
tattgtcagATGAAAATACTCGAACCCCACTTGGTAATTATTTGGCCGAACGTACTCAAT	540
<u>M K I L E P H L V I I W P N V L N</u>	98
CGAAACGATCATGAAGTCTTCTGGCGTAAACAGTGGGATAAACATGGCTCCTGTGCGTCT	600
<u>R N D H E V F W R K Q W D K H G S C A S</u>	118
TCCCCGATTCAGAACCAGACGCATTACTTTGATACAGTAATCAAAATGTACACAACCCAG	660
<u>S P I Q N Q T H Y F D T V I K M Y T T Q</u>	138
AAACAAAACGTTTCTGAAATCCTCTCAAAGGCGAATATTAACCGGGTAGGAAAAGCAGG	720
<u>K Q N V S E I L S K A N I K P G R K S R</u>	158
AGGCTGGTGGATATTGAAAATGCCATACGCAAAGTTATCAACAATATGACACCAAAATTC	780
<u>R L V D I E N A I R K V I N N M T P K F</u>	178
AAGTGCCAAAAGAATCCTAGGACATCATTGACTGAATTGGTTGAGGTCGGTCTTTGCAGC	840
<u>K C Q K N P R T S L T E L V E V G L C S</u>	198
GATAGCAACTTAACGCAGTTCATAAATTGTCCCCACCCATTTCCACAAGGATCACGGTAT	900
<u>D S N L T Q F I N C P H P F P Q G S R Y</u>	218
TTCTGCCCCACCAATATTCAGTATTAA	927
<u>F C P T N I Q Y *</u>	226

図 2-6 *Sb-RNase* ゲノム DNA の部分塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236429).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■ がプライマーの 5' 側) を表す.

ATGGGAAATACGGGGATGATATATATGTTTACAATGGTATTTTCATTAATAGTATTAATA	60
<u>M G N T G M I Y M F T M V F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCGTCAACGGTGGGATACGATTATTTCAA	120
<u>L S S S T V G</u> Y D Y F Q F T Q Q Y Q P A	40
GTATGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAACGATCGTCCTGAAAAATTGTTTACGGTTCAC	180
V C N S N P T P C N D R P E K L F T V H	60
GGTTTGTGCCTTCAAACAAGAAGGGACCTGACCCAGAAAAATGCAAGAATATACAAATG	240
G L W P S N K K G P D P E K C K N I Q M	80
AATTCTCAGAAG-gtaatattattaataatgagatagtcaatattgtttatttcatttat	299
N S Q K	84
gcacttgtgtataaaatatattacataactcaacatagattttcatgcacacctgtgca	359
aatattagaattaatttaaatttaacatgaattgtttctattataataattatattgtc	419
ag-ATAGGAAATATGGCAGCCCAGTTGGA	478
I G N M A A Q L E I I W P N V L N R T	103
GATCATGTAGGCTTCTGGGAAAGAGAGTGGCTCAAACATGGCACCTGCGGGTATCCCACA	538
D H V G F W E R E W L K H G T C G Y P T	123
ATAAGGGACGACATGCATTACTTAAAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAA	598
I R D D M H Y L K T V I K M Y I T Q K Q	143
AACGTCTCTGCAATTCTCTCGAAGGCGATGATTCAACCGAACGGGCAAAACAGGTCATTG	658
N V S A I L S K A M I Q P N G Q N R S L	163
GTGGATATTGAAAAATGCCATACGCAGTGGTACCAACAATACGAAACCAAAATTCAGTGC	718
V D I E N A I R S G T N N T K P K F K C	183
CAAAAGAATACTAGGACGACGACTGAATTAGTTGAGGTCACTCTTTGCAGTGATAGAGAC	778
Q K N T R T T T E L V E V T L C S D R D	203
TTAACGAAGTTCATAAATTGCCCCCAACCACAACAAGGATCACGATATCTCTGCCCCGCC	838
L T K F I N C P Q P Q Q G S R Y L C P A	223
GATGTTCAGTATTA	853
D V Q Y *	227

図 2-7 *Sd-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236427).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■ がプライマーの 5' 側)を表す.

ATGGGGATTACGAGGATGATATATATGGTTACGATGGCATTTCATTAATTGTATTAATA	60
<u>M G I T R M I Y M V T M A F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCGTCCACGATGGGGTACGATTATTTTCAA	120
<u>L S S S T M G Y D Y F Q F T Q Q Y Q P A</u>	40
GCCTGCAATTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAC	180
A C N S N P T P C K D P T E K L F T V H	60
GGTTTGTGGCCTTCAAACCTAATGGACCTGACCCAGTAAACTGCAAGCCGAAAAACCAAG	240
G L W P S N S N G P D P V N C K P K T K	80
GTGCCTCAGGCGCAGCAGCCG	300
<u>V P Q A Q Q P</u> gtaatttatctgaaagtttaactttccctctctaaacac	87
atTTTTctagcctataaccatcgatcgatttatcacaataaaaccaataatcaga	360
atccaactaaacaacttaccaaattatTTgtgtgcatTTTTtatatTTTTaaatct	420
ctaatatgccctcatctaaagcaatataagagctcttgtaattacgtTTtaattgatga	480
catgcatccaattTggcaaggTTTTgtagccaagaaatctagttcaaaatgtaggattta	540
atTtgaaatTTTTcatttcaacaataaatttcgatttgaatatacctaattTTtaggg	600
TTtaattcaacaatataattgTTtaattTTataaaaaataacatagctactatgaaact	660
tacctaggTTTTatTTcttatgaaaattatgcacctacctTTgaattTTgacaaagtta	720
atgtatctgctTTTTtaattTTtaacaaaactaagttacctacttctTTTTatagtatt	780
agtatacataatgtagaacatatgttcgatgtattTgatctaatttagTTTTggatt	840
ggggaagttcacacaaaattaaatgtctgaaaaaatgaataagagatatggTggcctgat	900
TTtatataaaacacaaattcatggacatctTTgttcaacatgacatcttattcaaaatt	960
ttgagTTTTacttagaagtcatacatgtggcTTTTgtctagaagttatcataaatt	1020
TTTTtattgtatTTTTatTTgtcag	1080
ATAGATCCATCACTCAAACCCAGTTGGA	98
<u>I D P S L K P Q L E I</u>	
ATTTGGCCGAACGT	1140
I W P N V F N R A D N E S F W N K Q W D	118
AAACATGGCACCTGTGGGTATCCCACAATAAAAAGACAAGAACCATTACCTTCAAACAGTA	1200
K H G T C G Y P T I K D K N H Y L Q T V	138
ATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCTCAAATCCTATCCAAAGCCAACATC	1260
I K M Y I T Q K Q N V S Q I L S K A N I	158
AATCCAGACGGTATAGGCAGGACACGGAAGCTAATTGAAAAATGCCATACGCAATGGTACC	1320
N P D G I G R T R K L I E N A I R N G T	178
AACGATAAGGAACCAAACTCAAGTGCCAAAAAGAATAATGGGACTATTGAATTGGTTCGAG	1380
N D K E P K L K C Q K N N G T I E L V E	198
GTCAGTCTTTGCAGCAATTACCTCGGAAAACATTTTCATAAATTGCCCAACAAAATTCCA	1440
V S L C S N Y L G K H F I N C P N K I P	218
CAAGGATCACGATATTTCTGCCCATCAAAGATATCCAGTATTAA	1485
Q G S R Y F C P I K D I Q Y *	232

図 2-8 *Se-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236428).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に参与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■がプライマーの 5' 側) を表す.

ATGGGGATCATTGGGATGATATATATGGTTATGATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA	60
<u>M G I I G M I Y M V M M V F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCGTCCACGGTGGGATTCGATTATTTTCAATTCACGCATCAATATCAGCCGGCT	120
<u>L S S S T V G F D Y F Q F T H Q Y Q P A</u>	40
GTCTGCAACTCTAATCGTACTCCTTGTAAAGGATCCTCCTGACAAATTGTTTACGGTTCAC	180
<u>V C N S N R T P C K D P P D K L F T V H</u>	60
GGTTTGTGGCCTTCAAACAGGAATGGACCTGACCAGAGTATTGCAAGAACACAACCTTG	240
<u>G L W P S N R N G P D P E Y C K N T T L</u>	80
GATGTTACCAAGgtaatatatttagtaattagacaatattgtttatttcatgtatacata	300
<u>D V T K</u>	84
tactcaacatagattttcatacacgcgtgtgagcattttccaataaatttaaatttagt	360
cataattttttctattgaaaatagagtataccctttgaaattcaattagttttaatta	420
aggaattttaacgaaaactcccggctactatcattttaacgaaaaccatatttttac	480
actaaaaaatcaatcctgatactattttaccctttattttatctttttgttaaaa	540
ctcaaagttttcaagctcttttcattagttttcttcttaattaaaccccactatgataga	600
ttacctgacaaataccaaatgactaggctccaactaagcaatatccataattaagtttg	660
acatggcaaaatttggatgtcctaaattacccccccagtcacattgacctgggtccta	720
ttacttgttttttacaataaaggagaggagtagacttagcctcataatgctagca	780
ataatatggttcaaatttgccatttgcgagaaccgaacctaacctctctcttacaagtg	840
aaaaggaatatcacttagactcaaatttgccttttgcgagatccgaacctaacctctctc	900
ttacaagtgacaaggaatatcacttagactggagtaactaagtgtgcgttgttacttgtta	960
ttacttgttttttacaattttcaatcaattaaatgttttcaaacagcttatgaggatt	1020
tggaataaaaatttcatgatattagagtttgttctcatatagttgttttcaatttgc	1080
gtcaacttgagcatttttgttcttttccagatgatggtaacaggtaaattagtatattc	1140
taaaaataaaaaatgttattttattcaaaaataccaatattttacataataaatatagata	1200
aattatcttgcacaacataatataatataataaacaataaaatcctagtaaaattat	1260
gtaataatacatgccaaaataatttacaatactatttaataaaaaattgttttattcaaaa	1320
taattaaagcacctatatttgaaaaaaaaggggtaaattatttgcacaagcatatataca	1380
tatatataataatataaaaacgtgcctaacataatgtaataatacatgcaaaaataaataa	1440
gtgttaattgattccacaacaccatattataacaataaaatgagcctgggtatagtta	1500
aatacatgcaaaaacaatttacctataaaaataaagaatgtttttagccatttgattcaaaa	1560
aataattatttagctataataataaacaataatgtgcataatgtacatacaaaaataat	1620
ttatctccaatggttgtcaacaataaagaataatggaacataatgatggaagacgaata	1680
gacacttgtgtaatagtagggcacttatttccataatattggtgggtaagtaaatcat	1740
taacataattgttgcacgtgtgaaaatatttgtaaataagaggtactactttgtttaca	1800
tggcaatctatttcaaaatttgggttctatttggatgtttaaaatcatgcggtttttgtc	1860
aagaaaaataattgttgtatgggcttacatctaaagatttttctgaatattttgttcaaaa	1920
aaagatttttttttcttctaatgcataatattttcag-ATAGGAAATCTCCAAGCACAG	1979
<u>I G N L Q A Q</u>	91
TTGGAATTATTGGCCGAACGTATATGATCGCACTAATAATGTAGGCTTTTGGAGTAAA	2039
<u>L D I I W P N V Y D R T N N V G F W S K</u>	111
CAGTGGGCAAAACATGGCATCTGTGGGTCTCCCACAATACAGGACGCGTGAATTACCTT	2099
<u>Q W A K H G I C G S P T I Q D D V N Y L</u>	131
GAAACAGTAATCAACATGTACATAATCAAGAAACAAAACGTTTTTGAATCCTCTCAAT	2159
<u>E T V I N M Y I I K K Q N V F E I L S N</u>	151
GCGAAGATTGAGCCGGAGGGAAAAAACAGGACACGAAAGGACATTGTAAGCCATACGC	2219
<u>A K I E P E G K N R T R K D I V K A I R</u>	171
AGTGGTACCAACGGTAAGAGACAAAACCTTAAGTGCCAAAAGAATAATAGGACGACTGAA	2279
<u>S G T N G K R P K L K C Q K N N R T T E</u>	191
TTGGTTGAGGTCACTCTTTCAGCGATAGAACTTAACGCGGTTAATAAATTGCCCAAC	2339
<u>L V E V T L C S D R N L T R L I N C P N</u>	211
CTAATTAAGCCAAAATCACCATATTTCTGTCCCTTGAAAAGTATTCATTATTA	2393
<u>L I K P K S P Y F C P L K S I H Y *</u>	228

図 2-9 *Sg-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258360).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■がプライマーの 5' 側)を表す.  
 RT-PCR で *Sg-RNase* が増幅されなかった原因と推測された塩基を水色で示す.

ATGGGGATTACGGGGATGATATACATGGTTACGATGGTATTTTCATTACTTGTATCAATA	60
<u>M G I T G M I Y M V T M V F S L L V S I</u>	20
TTGTCTTCGTCCACGGTGGGATTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT	120
<u>L S S S T V G F D Y F Q F T Q Q Y Q P A</u>	40
GCCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC	180
A C N S N P T P C K D P T D K L F T V H	60
GGTTTGTGGCCTTCAAACAAAATAGGAGGCGACCCAGAATATTGCAAGATAAGGAATCCT	240
G L W P S N K I G G D P E Y C K I R N P	80
CGGAAGgtaaatattattagtaatcggatagtcaatattgtttatttcatttatataacttg	300
R K	82
tgtgtgcgcgcgagtggtgtgtataatTTTTCTTAATACCAATTAATTTAAATTTAATCA	360
taaatttttaaatgtacatattctattgtcag--AGAGCAAAAAAACTCGAACCCCG	418
R A K K L E P Q	90
TTGGAATTATTTGGCCGAACTACTCGATCGAACCAATCATAACAGGCTTCTGGAGTAGA	478
L E I I W P N V L D R T N H T G F W S R	110
CAGTGGAAAAACATGGCGCCTGTGGGTATCCCACAATACAGAACGAGAATGATTACTTT	538
Q W K K H G A C G Y P T I Q N E N D Y F	130
GAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCGAGAAAAACAAACGTCTCTCGAATCCTCTCAAAT	598
E T V I K M Y I T E K Q N V S R I L S N	150
GCAAAGATTGAACCGGACGGGAAAAAGCAGAGCGCTGGTGGACATTGAAAATGCCATACGC	658
A K I E P D G K S R A L V D I E N A I R	170
AACGGTACCAACAATAAGTTACCAAAATTGAAGTGCCAAAAGAAGACTAGGGTGACTGAA	718
N G T N N K L P K L K C Q K K T R V T E	190
TTGGTTGAGATCACTCTTTGCAGCGATAAAAAATAGAGCACATTTTCATTGATTGCCCAAC	778
L V E I T L C S D K N R A H F I D C P N	210
CCCTTTCTACCAGGATCACCATATTTATGCCCAACAACAGTATCCACTATTA	832
P F L P G S P Y L C P N N S I H Y *	227

図 2-10 *Sh-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236431).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■がプライマーの 5' 側) を表す.

ATGGGGATTACAGGGATGATATATATGGTTACAATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA	60
<u>M G I T G M I Y M V T M V F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCGTCGCCGGTGAAATTCGATTATTTTCAA	120
<u>L S S S A</u> V K F D Y F Q F T Q Q Y Q P A	40
GTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAT	180
V C N S N P T P C K D P P D K L F T V H	60
GGTTTGTGGCCTTCAAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAAGCTACAATCTTA	240
G L W P S N V N G S D P K K C K A T I L	80
AATCCTCAAACG	300
gtaatatattattcaggaaaaattaatatttggccttagttataatggt	84
N P Q T	
cattaattgagatccttatttagttttcaaattttgatcgaagtctcctaacattattgtata	360
aatgaattcaaatgtcagttacataatttttcaaataaaaaattagtaattgaaacttaca	420
accttattaaactcctaactaatttttcaattccaacattttcaaaaaaaaaataaaaatt	480
agaataagtttgaccatataatttttataaaaaatattttcaatttttaaaattttaaatg	540
cagccattcatataattttttaattttttctaactttacattttaccattcttttaataata	600
ccattttgttacgtaaaatgtaccttttttaaaaaatacaaatccgttgaatttttttct	660
aaaccatttttttaaaattataataaactacataaaaaatacattttttatattaaatccattc	720
aattttttttttttctaataccatttttttaaaacttatatggggacattctattttgttgac	780
ttgagagtgtatcgatgccaagtttaatggaagaaatttaataatgtaattaagcctaata	840
acctctctttttttctttcaaaaatgtaccgatgtttgatacaataaccttttgttagt	900
tttaatgaacgtaccatgttttcatacacacacacacacacacatatatgtatgtatgt	960
atgatgtaagtatgtatgtataaataatataatggagaacataatttattcattaattt	1020
tttaatcccataagtgatttttattcaaaaatctcattaatataaacaaccacaaaatttt	1080
aatttttcattttaaaattataataaactacataaaaaatacattatttatatgatgtcagag	1140
gtttcgatcaaaaacagaaaaatcaataatatttcaattaagaacattgataattaggac	1200
cgtatccaaaatctccgtattattaataattagatagtcaatattgttcatcttttcata	1260
tatacatattactattaatttaaaatttaatcgtaatttttttctattataatattatat	1320
gtcagATAACAGATCTTAAAGCCAGCTGGA	1380
I T D L K A Q L E I I W P N V L N R	102
AAGGCCATGTACGCTTCTGGCGTAAACAGTGGCGTAAACATGGCGCTGTGGGTACCCC	1440
K A H V R F W R K Q W R K H G A C G Y P	122
ACAATAGCGGACGACATGCATTACTTTAGCACAGTAATCGAAATGTACATAACCAAGAAA	1500
T I A D D M H Y F S T V I E M Y I T K K	142
CAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCCGAACATTAACCGGAGGGGAGATTACAGGACA	1560
Q N V S E I L S K A N I K P E G R F R T	162
CGGGACGACATTGTAAATGCCATAAGCCCAAGTATCGACTATAAGAAACCAAAACTCAAG	1620
R D D I V N A I S P S I D Y K K P K L K	182
TGCAAGATCAATAATCAGACAACACTGAATTGGTTGAGGTCGGTCTTTGTAGCGATAACAAC	1680
C K I N N Q T T E L V E V G L C S D N N	202
TTAACGCAGTTCATAAATGCCCCAAACCCATTTCTCAAGGATCACCATATTTCTGCCCC	1740
L T Q F I N C P N P F P Q G S P Y F C P	222
ACCAATAATATTCAGTATTAA	1761
T N N I Q Y *	228

図 2-11 *Sk-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236432).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■がプライマーの 5' 側) を表す.



ATGGGGATTACAGGGATGATATATATGGTTACAGTGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA	60
<u>M G I T G M I Y M V T V F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCGTCGCCCGTAAAATTTCGATTATTTTCAAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT	120
<u>L S S S A V K F D Y F Q F T Q Q Y Q P A</u>	40
GTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAT	180
<u>V C N S N P T P C K D P P D K L F T V H</u>	60
GGTCTGTGGCCTTCAAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAACTACAATCTTG	240
<u>G L W P S N V N G S D P K K C K T T I L</u>	80
250 260 270 280 290 291	
AAACCTCGAACGgtaatatattattcaggaaaaattaatatccggtccttagttataacgtt	300
<u>K P R T</u>	84
tattaatntagacctattagttttcagatgttgattgaagtccttagcat <sup>+</sup> <sup>+</sup> tgata	360
aatgaattcaaagtgcagctacataatTTTTTTTTTaaataaaaattagtaattgaa	420
gcttacacctattaaactcctaactaattttcaattcaaaacatttccaaaaaattaa	480
aattaaaataagtttgaccgtaatttttcataaaaagattttcaattgtttaatctt	540
aatgcagccattcatataatTTTcaattttttcfaatcttaccattcttaa	600
atatacattttgttagtaaaaataacc <sup>+</sup> <sup>+</sup> ttaaaataaaatgtaaaccctgttta	660
tataaatccatttattttttttctaaaccatttattttaagttatccatttttaata	720
taaaatgtaaccattttatattaaatctattcaattttttttctaatccattttgtaa	780
acttatatgggtacattctatttcggtgatttaagagtgtatccatgccaagttaattgg	840
aagaaatataataatgtaattaa <sup>+</sup> taataaccttttttttttgcaaaaatgtacc	900
atgtttgggtacaatagctttgttagtttaatgaaacgtaccatgctttcatttttag	960
ttttggagagcataatattctttaatattttta <sup>+</sup> ccataaaatggattttatttaa	1020
aatctcattaataaacaaccacaaattttaatttttcatttaaaattataaatcta	1080
cataaaaataataattacattagtgcaagacttcgattaaaaattaaaaatcagtaa	1140
gatttcaagtcaataacattgataattaggactgcatccaaatctctctattattaat	1200
aattagatagtcaatattgttaatcctttcatataaaacttatgctcaacatagattttca	1260
tgcactagtgaaaaatattactattaatttaaaatttaataataattttttctattata	1320
atattatattgtcagATAAGAAATCTTAAAGCCCAGCTGGA <sup>+</sup> AATTATTTGGCCAAACCTA	1380
<u>I R N L K A Q L E I I W P N V</u>	99
TCTTACTCGAAGGGCTCAGTACGCTTCTGGCGTAAACAGTGGCGTAAACATGGCACCTGT	1440
<u>S Y S K G S V R F W R K Q W R K H G T C</u>	119
GGGTACCCCAACAATAGCGGACGACATGCATTACTTTAGCACAGTAATCGAAATGTACACA	1500
<u>G Y P T I A D D M H Y F S T V I E M Y T</u>	139
ACCAAGAAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTTAAAGGCGAAGATTAACCGGAGGGGAGA	1560
<u>T K K Q N V S E I L L K A K I K P E G R</u>	159
TTCAGGACACGGGACGACATTGTAATGCCATAAGCCAGAGTATCGACGATAAGGAACCA	1620
<u>F R T R D D I V N A I S Q S I D D K E P</u>	179
AAACTCAAGTGCAAGAACAATAATAATAACTGAATTGGTTGAGGTCGGTATTTGCAGC	1680
<u>K L K C K N N N N I T E L V E V G I C S</u>	199
GATAACAACCTAACGCAGTTCATAAATTGCCCTCACCCATTTCCACAAGGATCACCATAT	1740
<u>D N N L T Q F I N C P H P F P Q G S P Y</u>	219
TTATGCCCCACCAATAATATTCAGTATTAA	1770
<u>L C P T N N I Q Y *</u>	228

図 2-13 *Sq-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236424)。赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■がプライマーの 5' 側)を表す。

ATGGGGATTACGGGGATGATACATATAGTTACGATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA	60
<u>M G I T G M I H I V T M V F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCCTCTACGGTGGGATACGATTATTTTCAA	120
<u>L S S S T V G</u> Y D Y F Q F T Q Q Y Q P A	40
GTCTGCTACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC	180
V C Y F N P T P C K D P P D K L F T V H	60
GGTTTGTGGCCTTCAAACCTGAATGGACCTACCCAGAAAATTGCACGAACGCAACCGTG	240
G L W P S N L N G P H P E N C T N A T V	80
AATTCTCAGAGGgtaatattattgataatcagatagtcactattgtttatttcatttagg	300
N S Q R	84
tacttgtgtttatatacatataactcaacatagattttcatgcacttacaataaatttaa	360
tctaatcataaatttacctagctatattatatattatattgtcagATAACAAATATCCAA	420
I T N I Q	89
GCCAGTTGAA	480
A Q L K I I W P N V L D R T N H V G F W	109
AATAAACAGTGGATAAAACATGGCAGCTGTGGGAATCCCCAATAATGAACGACACGCAT	540
N K Q W I K H G S C G N P P I M N D T H	129
TACTTTCAAACAGTAATCAACATGTACATAATCAAGAAACAAAACGTTTTTGAAATCCTC	600
Y F Q T V I N M Y I I K K Q N V F E I L	149
TCAAATGCGAAGATTGAGCCGGAGGGAAAAACAGGACACGAAAGGACATTGTAAGCC	660
S N A K I E P E G K N R T R K D I V K A	169
ATACGCAGTGGTACCAACGGTAAGAGACCAAACTTAAGTGCCAAAAGAATAATAGGACG	720
I R S G T N G K R P K L K C Q K N N R T	189
ACTGAATTGGTTGAGGTCCTTTCGACGATAGAAACTTAACGCGGTTAATAAATTGC	780
T E L V E V T L C S D R N L T R L I N C	209
CCCAACCTAATTAAGCCAAAATCACCATATTTCTGTCCCTTGAAAAGTATTCAGTATTA	840
P N L I K P K S P Y F C P L K S I Q Y *	228

図 2-14 *Sr-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236426).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■がプライマーの 5' 側) を表す.

けでなく (図 2-4i, lane 4), *Sl-RNase* 断片も 1,282 bp の断片に切断した (図 2-4i, lane 1). 以上より, 約 1.3 kb 断片として増幅される *Sk*-および *Sq-RNase* 対立遺伝子は *Bgl*III および *Hind*III による, 約 350 bp 断片として増幅される *Sa*-, *Sd*-, *Sh*-, *Sr-RNase* 対立遺伝子は *Sph*I, *Eco*O109I *Bss*HII, *Bae*I による切断で識別できた.

以上の結果から, プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IWPNV2’を用いたゲノミック PCR および 6 種類の制限酵素, *Bae*I, *Bgl*III, *Bss*HII, *Hind*III, *Eco*O109I, *Sph*I の処理からなる CAPS マーカーシステムを開発した. この CAPS マーカーシステムにより, 10 種類の *S-RNase* 対立遺伝子, *Sa*-, *Sb*-, *Sd*-, *Se*-, *Sg*-, *Sh*-, *Sk*-, *Sl*-, *Sq*-, *Sr-RNase* 対立遺伝子の識別が可能になった (表 2-4).

### CAPS マーカーシステムによる *S* 遺伝子型推定

開発した CAPS マーカーシステムにより, 日本の栽培品種の残り 19 品種のゲノム DNA から *S-RNase* 対立遺伝子を増幅し, 各品種の *S* 遺伝子型を推定した. これら品種から 1,906 bp (*Sg*), 1,414 bp (*Sl*), 約 1.3 kb, 998 bp (*Se*), 440 bp (*Sb*), 約 350 bp の断片が増幅された. 6 種類の制限酵素処理により約 1.3 kb および約 350 bp の断片を識別した. すべての品種から断片が 2 種類ずつ増幅され, 日本の栽培品種 25 品種は *Sa*-, *Sb*-, *Sd*-, *Se*-, *Sg*-, *Sh*-, *Sk*-, *Sl*-, *Sq*-, *Sr-RNase* 対立遺伝子の組み合わせからなる 17 種類の *S* 遺伝子型に分類された (表 2-5). ‘ドワイエネ・デュ・コムス’ (*SaSb*), ‘プレコース (ドクトール・ジュール・ギユイヨー)’ (*SaSe*), ‘スタークリームソン (レッド・クラップス)’ (*SdSe*) は, 推定 *S-RNase* 対立遺伝子の部分配列から推定された *S* 遺伝子型と一致した (Zuccherelli et al. 2002a; Zisovich et al. 2004). また, ‘パートレット’とその着色系枝変わり品種である‘マックス・レッド・パートレット’はどちらも *SeSl* に推定された.

17 種類の *S* 遺伝子型のうち, 6 種類には複数の品種が分類された. *SeSl* に‘パートレット’, ‘セニョール・デスペラン’, ‘マックス・レッド・パートレット’が, *SdSe* に‘フレミッシュ・ビューティ’, ‘スタークリームソン’, ‘ポートヌ’が, *SeSr* に‘ラ・フランス’と‘バラード’が, *SbSe* には‘グランド・チャンピオン’と‘カリフォルニア’が, *SaSe* には‘オーロラ’と‘プレコース’が, *SgSr* には‘パス・クラサン’と‘シルバー・ベル’が分類された.

### 交雑不和合性の確認

推定 *S* 遺伝子型の正誤を検証するため, 同じ *S* 遺伝子型に推定された品種間で他家受粉を行った (表 2-6). 推定 *S* 遺伝子型が *SeSl* の‘パートレット’と‘セニョール・デスペラン’の交配は, ‘パートレット’を種子親に用いた場合は結実率が 0.0% となり, ‘セニョール・デスペラン’を種子

表2-4 ゲノミックPCRにより増幅された10種類の*S-RNase*対立遺伝子の制限酵素断片長 (bp)

S-RNase 対立遺伝子	PCR増幅 断片長	イントロン	制限酵素					
			<i>Bgl</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Sph</i> I	<i>Eco</i> O109I	<i>Bss</i> III	<i>Bae</i> I
<i>Sa</i>	345	145	-	-	233, 112	-	-	-
<i>Sb</i>	440	246	-	-	-	-	-	-
<i>Sd</i>	369	169	-	-	-	260, 109	-	-
<i>Se</i>	998	786	-	-	-	-	-	-
<i>Sg</i>	1,906	1,706	-	-	-	-	-	-
<i>Sh</i>	345	148	-	-	-	-	210, 135	-
<i>Sk</i>	1,274	1,074	1,022, 214, 38	-	-	-	-	-
<i>Sl</i>	1,414	1,211	-	-	-	1,149, 265	-	1,282, 99, 33
<i>Sq</i>	1,283	1,083	-	960, 323	-	-	-	-
<i>Sr</i>	353	153	-	-	-	-	-	195, 125, 33

- : 制限酵素により切断されないPCR産物

表2-5 日本の栽培品種の推定S遺伝子型

S遺伝子型	品種
<i>SaSb</i>	ドワイエネ・デュ・コムス
<i>SaSe</i>	オーロラ プレコース
<i>SaSl</i>	マルゲリット・マリーラ
<i>SbSe</i>	カリフォルニア グランド・チャンピオン
<i>SbSk</i>	アレクサンドリン・デュイヤール
<i>SbSq</i>	ル・レクチェ
<i>SdSe</i>	ポートヌ フレミッシュ・ピューティー スタークリームソン
<i>SdSq</i>	デボー
<i>SdSr</i>	コンファレンス
<i>SeSh</i>	エル・ドラド
<i>SeSl</i>	バートレット セニョール・デスベラン マックス・レッド・バートレット
<i>SeSr</i>	バラード ラ・フランス
<i>ShSl</i>	ミクルマス・ネリス
<i>ShSk</i>	ウィンター・ネリス
<i>SlSq</i>	ゼネラル・レクラーク
<i>SlSr</i>	越さやか
<i>SeSr</i>	パス・クラサン シルバー・ベル

表2-6 同じ推定S遺伝子型を持つ品種間の交雑不和合性の評価

交配年	交配場所	種子親	推定S 遺伝子型	花粉親	推定S 遺伝子型	交配 花数 (花)	結実率 (%)	Seeds /Flower	SI index
2002	長野	ラ・フランス	<i>SeSr</i>	バラード	<i>SeSr</i>	12	100.0	0.0	0.0
				パス・クラサン	<i>SgSr</i>	58	98.3	7.9 <sup>2</sup>	
2003	盛岡	パートレット	<i>SeSl</i>	セニョール・デスペラン	<i>SeSl</i>	30	0.0	0.0	0.0
				ラ・フランス	<i>SeSr</i>	29	82.8	7.4 <sup>2</sup>	
2003	盛岡	セニョール・デスペラン	<i>SeSl</i>	パートレット	<i>SeSl</i>	30	16.7	0.1	3.0
				ラ・フランス	<i>SeSr</i>	30	86.7	3.3 <sup>2</sup>	
2002	長野	スタークリームソン	<i>SdSe</i>	フレミッシュ・ビューティー	<i>SdSe</i>	30	50.0	0.5	5.9
				ラ・フランス	<i>SeSr</i>	30	96.6	8.5 <sup>2</sup>	
2004	盛岡	オーロラ	<i>SaSe</i>	プレコース	<i>SaSe</i>	30	3.3	0.0	0.0
				ラ・フランス	<i>SeSr</i>	30	90.0	6.5 <sup>2</sup>	
2004	盛岡	プレコース	<i>SaSe</i>	オーロラ	<i>SaSe</i>	30	13.3	0.0	0.0
				ラ・フランス	<i>SeSr</i>	29	96.6	8.4 <sup>2</sup>	
2004	盛岡	パス・クラサン	<i>SgSr</i>	シルバー・ベル	<i>SgSr</i>	30	0.0	0.0	0.0
				ラ・フランス	<i>SeSr</i>	30	13.3	4.7 <sup>2</sup>	
2004	盛岡	シルバー・ベル	<i>SgSr</i>	パス・クラサン	<i>SgSr</i>	14	71.4	0.2	2.2
				ラ・フランス	<i>SeSr</i>	14	100.0	9.1 <sup>2</sup>	

<sup>2</sup> SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

親にした場合、結実率が 16.7%, Seeds/Flower が 0.1 で SI index が 3.0 となった。SdSe の‘スタークリームソン’×‘フレミッシュ・ビューティー’の交配では、結実率が 50.0%, Seeds/Flower が 0.5 で SI index が 5.9 となった。第 1 章で交雑不和合と判定された‘バートレット’と‘セニョール・デスペラン’, および, ‘フレミッシュ・ビューティー’と‘スタークリームソン’が交雑不和合の関係にあることが再度確認された。SeSr の‘ラ・フランス’×‘バラード’の交配では、結実率は 100.0%であったが、Seeds/Flower が 0.0 となり, ‘バラード’が‘ラ・フランス’と偏父不和合性を示すこと (阿部ら 1996)が再確認された。SaSe の‘オーロラ’と‘プレコース’の交配では、両品種を種子親に用いた場合の結実率はそれぞれ 3.3%と 13.3%であったが、Seeds/Flower が 0.0 となった。SgSr の‘パス・クラサン’と‘シルバー・ベル’の交配では、‘パス・クラサン’を種子親に用いた場合は結実率が 0.0%, ‘シルバー・ベル’を種子親にした場合、結実率は 71.4%であったが、Seeds/Flower が 0.2 で SI index が 2.2 となった。これらの結果から、同じ推定 S 遺伝子型を持つ品種間の交配はすべて交雑不和合と判定された。

## <考察>

ニホンナシやリンゴでは、雌しべ側 S 遺伝子である *S-RNase* をゲノミック PCR により増幅し、増幅断片の種類から品種の S 遺伝子型を推定する CAPS マーカーシステムが開発されている。PCR を用いた *S-RNase* 対立遺伝子の識別は少量の未展開葉があれば十分可能であり、交雑後代を開花まで育成させる必要がないことから、迅速・簡単に品種の S 遺伝子型を推定できる (Janssens et al. 1995; Ishimizu et al. 1999; Takasaki et al. 2004)。

本章では、はじめに、セイヨウナシの雌しべ側 S 遺伝子産物も *S-RNase* であると仮定し、日本の栽培品種から *S-RNase* cDNA のクローニングを試みた。ニホンナシの *S-RNase* を増幅するプライマーを用いた RT-PCR および 3'RACE により、自家不和合性品種 10 品種の雌しべから 10 種類の cDNA 断片がクローニングされた。5'および 3'RACE によりクローニングされた cDNA 断片配列を重複させ、完全長塩基配列を決定した。それら cDNA の推定アミノ酸配列には典型的なナシ亜科 *S-RNase* の一次構造と対立遺伝子特異性に関与する 1 つの HV 領域が特定された (図 2-2) (Ishimizu et al. 19998; Ushijima et al. 1998)。よって、これら cDNA はセイヨウナシ *S-RNase* (Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Sk-, Sl-, Sq-, Sr-*RNase*)をコードすると考えられた。

プライマー‘FTQQYQ’と‘anti-(I/T)IWPNV’を用いた RT-PCR とゲノミック PCR では‘パス・クラサン’以外の 9 品種からは 2 種類の断片が増幅されたが、‘パス・クラサン’の *Sg-RNase* は増幅

されなかった。3'RACE からクローニングされた 10 種類の *S-RNase* cDNA と 'FTQQYQ' および 'anti-(I/T)IWPNV' プライマーの配列を比較したところ、'FTQQYQ' プライマーの配列には *Sg-RNase* と 2 塩基、*Sl-RNase* と 1 塩基の違いが、'anti-(I/T)IWPNV' プライマーの配列には *Sa*-, *Sg*-, *Sq-RNase* とそれぞれ 1 塩基の違いが見出された。しかし、フォワードプライマーとして 'FTQQYQ' を用いた 3'RACE により *Sg-RNase* 断片が増幅されているので、リバースプライマー 'anti-(I/T)IWPNV' の 3' 末端の A (アデニン) が *Sg-RNase* では C (シトシン) となっている 1 塩基の違いにより *Sg-RNase* 断片が増幅されなかったと考えられた。

そこで、*Sg-RNase* を増幅できるリバースプライマー 'EPSg-anti-IIWPNV' を設計し、'anti-(I/T)IWPNV' との混合プライマー 'EP-anti-IIWPNV2' を作成した。プライマーセット 'FTQQYQ' と 'EP-anti-IIWPNV2' を用いたゲノミック PCR により、10 種類の *S-RNase* 対立遺伝子を増幅できた。*Sg*, *Sl*, *Se*, *Sb* は 1,906, 1,414, 998, 440 bp に検出され、増幅断片長で識別できた。しかし、約 1.3 kb 断片の *Sq* と *Sk*, 約 350 bp 断片の *Sa*, *Sd*, *Sh*, *Sr* の断片長による識別は困難であったので、6 種類の制限酵素、*Bgl*III (*Sk* 特異的), *Hind*III (*Sq* 特異的), *Sph*I (*Sa* 特異的), *Eco*O109I (*Sd* 特異的), *Bss*HII (*Sh* 特異的), *Bae*I (*Sr* 特異的) による切断の有無で識別することとした。プライマーセット 'FTQQYQ' と 'EP-anti-IIWPNV2' は、*Sc*, *Si*, *Sm*, *Sn*, *Sp* 対立遺伝子を約 350 bp に、*So* 対立遺伝子を 1,291 bp に増幅すると予想される。これら断片には上記 6 種類の制限酵素の認識部位が存在せず (Zuccherelli et al. 2002a; Zisovich et al. 2004), 本章で選択した制限酵素処理において切断されないと推測される。*Eco*O109I および *Bae*I は *Sd*-および *Sr-RNase* 対立遺伝子に加えて *Sl-RNase* 対立遺伝子も切断したが、*Sl-RNase* 対立遺伝子は断片長 (1,414 bp) から識別可能であり、*S-RNase* 対立遺伝子の識別に影響しない。最終的に、プライマーセット 'FTQQYQ' と 'EP-anti-IIWPNV2' および 6 種類の制限酵素処理からなる CAPS マーカーシステムを開発し、10 種類の *S* 対立遺伝子の識別が可能になった (表 2-4)。

このシステムにより日本の栽培品種の *S* 遺伝子型を推定し、25 品種の *S* 遺伝子型を 17 種類に分類した (表 2-5)。第 1 章で交雑不和合と判定された 'パートレット' と 'セニョール・デスペラン', および、'フレミッシュ・ビューティー' と 'スタークリムソン' はそれぞれ *SeSl* および *SdSe* の同じ *S* 遺伝子型に分類された。'パートレット' と 'フレミッシュ・ビューティー' が異なる *S* 遺伝子型と推定されたことは、これら品種が交雑不和合と判定された第 1 章の交配実験の結果を支持した。同じ *S* 遺伝子型に推定された 'ラ・フランス' と 'バラード' (*SeSr*), 'パートレット' と 'セニョール・デスペラン' (*SeSl*), 'スタークリムソン' と 'フレミッシュ・ビューティー' (*SdSe*), 'オーロラ' と 'プレコース' (*SaSe*), 'パス・クラサン' と 'シルバー・ベル' (*SgSr*) も交配実験の結果、交雑

不和合と判定された (表 2-6). いくつかの組み合わせは交配を行なうことができなかったが, ‘マックス・レッド・パートレット’ ( $SeSI$ )は‘パートレット’および‘セニョール・デスペラン’と, ‘ボートヌ’ ( $SaSe$ )は‘スタークリームソン’および‘フレミッシュ・ビューティー’とそれぞれ同じ  $S$  遺伝子型に分類されたことから, 交雑不和合を示すと推測された. ‘グランド・チャンピオン’と ‘カリフォルニア’は同じ  $S$  遺伝子型,  $SbSe$  に推定され, 交雑不和合の組み合わせであると考えられるが, ‘グランド・チャンピオン’が部分的自家和合と判定されていることから (第 1 章), 正逆交雑により不和合・和合を確認する必要がある.

‘パートレット’ ( $SeSI$ )×‘ラ・フランス’ ( $SeSr$ )の交配により育成された‘バラード’ ( $SeSr$ )は‘パートレット’から  $Se-RNase$  対立遺伝子を, ‘ラ・フランス’から  $Sr-RNase$  対立遺伝子を受け継いでおり, ‘ラ・フランス’と‘バラード’の交雑不和合性は偏父不和合性の関係にあると考えられた. 同じく‘パートレット’ ( $SeSI$ )×‘ラ・フランス’ ( $SeSr$ )の交配により育成された‘越さやか’ ( $SISr$ )は‘パートレット’から  $SI-RNase$  対立遺伝子を, ‘ラ・フランス’から  $Sr-RNase$  対立遺伝子を受け継いでいた. ‘マルゲリット・マリーラ’ ( $SaSI$ )×‘パートレット’ ( $SeSI$ )の交配から育成された‘オーロラ’ ( $SaSe$ )は‘マルゲリット・マリーラ’から  $Sa-RNase$  対立遺伝子を, ‘パートレット’から  $Se-RNase$  対立遺伝子を受け継いでいた. ‘マックス・レッド・パートレット’ ( $SeSI$ )と‘ドワイエネ・デュ・コムス’ ( $SaSb$ )の交雑実生である‘カリフォルニア’ ( $SbSe$ )は‘マックス・レッド・パートレット’から  $Se-RNase$  対立遺伝子を, ‘ドワイエネ・デュ・コムス’から  $Sb-RNase$  対立遺伝子を受け継いでいた. ‘ラ・フランス’ ( $SeSr$ )の自然交雑実生である‘シルバー・ベル’ ( $SgSr$ )は‘ラ・フランス’から  $Sr-RNase$  対立遺伝子を受け継いでいた. ‘パートレット’ ( $SeSI$ )の自然交雑実生である‘エル・ドラド’ ( $SeSh$ )は‘パートレット’から  $Se-RNase$  対立遺伝子を受け継いでいた. ‘ウィンター・ネリス’ ( $ShSk$ )の自然交雑実生である‘ミクルマス・ネリス’ ( $SISh$ )は‘ウィンター・ネリス’から  $Sh-RNase$  対立遺伝子を受け継いでいた. これらの結果から,  $S-RNase$  が対立遺伝子として遺伝していくことが確認されるとともに, ‘ドワイエネ・デュ・コムス’ ( $SaSb$ )の自然交雑実生とされていた‘ゼネラル・レクラーク’ ( $SISq$ )は,  $S$  遺伝子型から記載されている由来が正しくないことが明らかになった.

本章では, ‘パートレット’ ( $SeSI$ ), ‘マックス・レッド・パートレット’ ( $SeSI$ ), ‘パス・クラサン’ ( $SgSr$ ), ‘コンファレンス’ ( $SdSr$ )の  $S$  遺伝子型を推定した. これらの遺伝子型は Zuccherelli et al. (2002a)により推定された遺伝子型, ‘パートレット’ ( $SeS-$ ), ‘マックス・レッド・パートレット’ ( $SeS-$ ), ‘パス・クラサン’ ( $SaS-$ ), ‘コンファレンス’ ( $SdSh$ )と異なっていた. 彼らがゲノミック PCR に用いたプライマーセットでは  $SI$ -および  $Sg-RNase$  対立遺伝子を増幅できなかったと考えられ

る。また、*Sr-RNase* 対立遺伝子断片の制限酵素による切断多型が *Sa-RNase* の多型と似ていたことから、彼らは *Sr-RNase* を *Sa-RNase* と誤って識別したと考えられた。‘コンファレンス’の *S* 遺伝子型が一致しなかった原因は不明であるが、国外では‘コンファレンス’を育種親に用いた品種が栽培されており、それら品種の *S* 遺伝子型推定により、‘コンファレンス’の推定 *S* 遺伝子型の正誤を検証できると考えられる。

同じ推定 *S* 遺伝子型を持つ品種間の交配が交雑不和合性を示したことから、セイヨウナシにおいても雌しべ側 *S* 遺伝子産物は *S-RNase* であることが証明された。CAPS マーカーシステムにより推定された品種の *S* 遺伝子型は信頼できる情報として果樹園における品種選択に役立つと期待される。

日本の栽培品種 25 品種は 17 種類の *S* 遺伝子型に分類され (表 2-5)、そのうち 6 種類の *S* 遺伝子型には複数の品種が分類され、交雑不和合グループを形成した。これら *S* 遺伝子型に推定された 14 品種の栽培面積は、日本全体の 84% を占める。現在の日本の品種構成で交雑不和合性が最も危惧されるのは、栽培面積の 62.4% を占める主力品種‘ラ・フランス’と有望な新品種‘バラード’の組み合わせであると考えられる。‘ラ・フランス’の前に収穫できる‘バラード’は今後栽培の増加が見込まれる。したがって、これら 2 品種だけの混植では、結実単為結果性に頼ることとなるため、両品種に対して交雑和合となる品種の選択が今後非常に重要になると予想される。‘ラ・フランス’の受粉樹品種を考える上では、*S* 遺伝子型に加えて開花時期も考慮しなければならない。‘ラ・フランス’は主要品種の中で最も早く開花する。主産地である山形県では、開花期の比較的近い‘シルバー・ベル’や‘ゼネラル・レクラーク’を受粉樹として推奨している (大沼ら 西洋ナシの作業便利帳 2000)。どちらの品種も‘ラ・フランス’と交雑和合であり、受粉樹品種として適当である。しかしながら、開花期の気象条件によっては‘ラ・フランス’と受粉樹品種の開花日が大きくずれる可能性もある。そこで、セイヨウナシと交雑和合であり、開花日が‘ラ・フランス’に近い、‘豊水’や‘新興’などのニホンナシ品種を受粉樹品種として利用することも勧められている。その他、栽培面積 7.6% の‘パートレット’は同 1.0% の‘マックス・レッド・パートレット’および同 1.7% の‘セニョール・デスペラン’と、同 4.0% の‘シルバー・ベル’は‘パス・クラサン’と交雑不和合となる。また、早生品種‘オーロラ’は‘プレコース’と交雑不和合関係にあるが、栽培面積はそれぞれ 3.0% と 1.3% であり、現在の生産において結実不良が問題となることはほとんどないと思われる。同じく早生品種では、‘スタークリムソン’が‘ポートヌ’や‘フレミッシュ・ビューティー’と交雑不和合となる。中生有望品種では、‘カリフォルニア’が‘グランド・チャンピオン’と交雑不和合関係にある。‘ラ・フランス’と交雑不和合となる‘バラード’

を除けば、現在の栽培面積が少ない品種間の交雑不和合による結実不良が既存の経済園ですぐに問題となる可能性は低い。しかしながら、これからセイヨウナシ生産を始める新規の果樹園や、経済生産を目的とした大規模な栽培ではなく趣味で栽培を楽しむような栽培では、‘ラ・フランス’に偏らない品種選択がなされるかもしれない。‘スタークリームソン’および‘カリフォルニア’は果実の暗赤色および紅色が美しい。‘オーロラ’は早生の優良品種として注目されている。近年フランスで育成された‘ポートヌ’は優れた果実品質を持ち、今後、日本での栽培増加が予想されている。‘グランド・チャンピオン’は品質や貯蔵性が良い上に部分的自家和合性を有することから、1本植えも可能である。したがって、現在は栽培面積が小さくても、市場の需要も高い早生品種や‘ラ・フランス’以外の時期に楽しむことができる良食味品種、視覚的な楽しみもある果皮の赤い品種など様々な品種が新植されることも想定できるので、S 遺伝子型に基づいた栽植計画を立て、交雑不和合組み合わせを回避する必要がある。

一方、青森県および新潟県で特産化を進めている‘ゼネラル・レクラーク’および‘ル・レクチュエ’は日本の栽培品種中に同じ推定S遺伝子型を持つ品種がないので、開花期の近い品種が1品種あればそれが受粉樹となり、種子形成を確保できると考えられる。作業労力の分散や出荷期間の長期化を図るために、開花期が近く、収穫期の異なる品種が受粉樹品種として選ばれると推測されるが、唯一‘マルゲリット・マリーラ’だけは雄性不稔性を有するので受粉樹品種になり得ない。‘マルゲリット・マリーラ’は大果、多汁で栽培しやすく、‘ラ・フランス’の前に収穫できる品種であるが、雄性不稔であるためS遺伝子型の異なる品種を受粉樹品種として必要とし、さらに、その受粉樹品種に花粉を供与する品種の混植が必要となる。幸いにも、日本の栽培品種には‘マルゲリット・マリーラ’と同じ推定S遺伝子型を持つ品種がない。よって、‘マルゲリット・マリーラ’以外の2品種が交雑不和合の組み合わせであれば、それら品種が‘マルゲリット・マリーラ’の受粉樹の役割を果たすと考えられる。

生産の現場においては、消費者の好む果実品質、収穫期や環境適応性などの品種特性を考慮して品種が選択されているが、良質果実の安定的な結実に不可欠な種子形成をもたらす受粉について考えるとき、本章で推定したS遺伝子型が開花期とあわせて重要な情報となると期待される。

### 第3章

#### 17種類のS対立遺伝子を識別するCAPSマーカーシステムの確立

##### <摘要>

セイヨウナシは世界各地で栽培されているが、品種構成は国によって異なっている。国外における栽培品種のS遺伝子型を推定するため、農研機構果樹研究所リンゴ研究拠点に保存されている二倍体93品種を第2章で開発したCAPSマーカーシステムに供し、S遺伝子型を推定した。59品種からは2種類ずつの断片が増幅され、断片長や制限酵素切断パターンから、S遺伝子型を推定できた。一方、34品種は、このシステムで識別できない断片の検出や1種類の断片のみの増幅によりS遺伝子型を推定できなかった。塩基配列の解析から、識別できなかった断片のうち3種類はニホンナシから同定された*S-RNase*であった。残りの配列は7種類に分類され、推定*S-RNase*対立遺伝子との照合の結果、5種類は推定*Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-RNase*対立遺伝子に対応し、残り2種類は新規*S-RNase*対立遺伝子(*Ss-*, *St-RNase*)と推定された。これら7種類の推定*S-RNase*対立遺伝子を有する品種の5'および3'RACEにより*S-RNase*cDNA完全長塩基配列を決定した。推定アミノ酸配列はナシ亜科*S-RNase*の特徴を有しており、第2章の10種類を加えた17種類の*S-RNase*は異なる認識特異性を示すと推察された。増幅断片の種類から、新たにクローニングされた7種類の*S-RNase*を持つ22品種およびニホンナシの*S-RNase*を持つ3品種のS遺伝子型を推定できた。残り9品種からはRACEクローニングによりナシ亜科*S-RNase*の特徴を持つcDNA配列(*Sx-RNase*)が得られたが、その配列を有する断片がゲノミックPCRで増幅されず、また、花柱特異的な発現を示さなかったことから、*Sx-RNase*が*S-RNase*対立遺伝子であると結論づけられなかった。

17種類の*S-RNase*対立遺伝子,*Sa-*, *Sb-*, *Sc-*, *Sd-*, *Se-*, *Sg-*, *Sh-*, *Si-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Sq-*, *Sr-*, *Ss-*, *St-RNase*対立遺伝子を識別するCAPSマーカーシステムの開発を試みた。ゲノムDNAからプライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いたPCRにより17種類の*S-RNase*断片を増幅した。増幅断片をcDNAの塩基配列と照合し、*S-RNase*対立遺伝子特異的なイントロンの配列を決定した。1,642 bp断片として増幅される*St*は断片長により識別できたが、*Sc*, *Si*, *Sm*, *Sn*, *Sp*, *Ss*は約350 bp断片として検出され、断片長による識別が困難であった。そこで、約350 bp断片のうち*Sc*, *Si*, *Sm*, *Sp*, *Ss*は、5種類の制限酵素、*BmgBI* (*Sc*), *BstZ17I* (*Si*), *BseRI* (*Sm*), *BseYI* (*Sp*),

*Bss*SI (*Ss*)で切断されることで, *Sn* は選択したいいずれの制限酵素でも切断されないことで識別することとした. 第2章で選択した6種類の制限酵素と合わせて, 約350 bpに検出される *Sa*, *Sc*, *Sd*, *Sh*, *Si*, *Sm*, *Sn*, *Sp*, *Sr*, *Ss* の識別が可能になった. したがって, プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いたゲノミック PCR および11種類の制限酵素処理からなる CAPS マーカーシステムが確立され, 17種類の *S* 対立遺伝子の識別が可能になった. 世界の主要品種の大多数を含む二倍体品種106品種の *S* 遺伝子型はこのシステムにより推定できることになった. これら品種の *S* 遺伝子型は50種類に分類され, そのうち22種類には複数の品種が分類された. 同じ推定 *S* 遺伝子型の品種間の交雑不和合性が交配実験により確認され, 推定 *S* 遺伝子型と CAPS マーカーシステムの信頼性が裏付けられた.

## <緒言>

セイヨウナシは世界各国で栽培されているが, 各国の気候や風土に適した多様な品種構成がみられ, 主要品種として栽培されているものには古い品種が多い. ヨーロッパ南部および南西部においては, イタリアで‘Abbé fetal’, ‘William’s Bon Chrétien (Bartlett, パートレット)’, ‘Conference (コンファレンス)’, ‘Doyenné du Comice (ドワイエネ・デュ・コムイス)’, ‘Beurre Bosc’, ‘Coscia’が, フランスで‘Bartlett’, ‘Docteur Jules Guyot (Precoce, プレコース)’, ‘Conference’, ‘Doyenné du Comice’, ‘Passe Crassane’が, スペインで‘Blanquilla’, ‘Coscia’, ‘Docteur Jules Guyot’が, ポルトガルで‘Rocha’がそれぞれ主要品種として栽培されている. ヨーロッパ北部および北西部においては, イギリスで‘Conference’, ‘Bartlett’が, オランダで‘Conference’, ‘Doyenné du Comice’, ‘Gieser wildeman’, ‘Alexander Lucas’が, ベルギーで‘Durondeau’が, ドイツで‘Conference’, ‘Alexander Lucas’, ‘Fondante de Charneu’, ‘Clapp’s Favourite’が, デンマークで‘Clara Frijs’が, スウェーデンで‘Clara Frijs’, ‘Conference’, ‘Alexander Lucas’が主要品種として栽培されている. ヨーロッパ東部および小アジアにおいては, ブルガリアで‘Bartlett’, ‘Vicar of Winkfield (Curé)’, ‘Beurre Bosc’, ‘Clapp’s Favourite’, ‘Beurre Hardy’が, ポーランドで‘Clapp’s Favourite’, ‘Alexander Lucas’, ‘Conference’, ‘General Leclerc’が, ロシアで‘Bartlett’, ‘Flemish Beauty’, ‘Vicar of Winkfield (Curé)’, ‘Beurre Bosc’, ‘Kieffer’が, セルビアで‘Bartlett’, ‘Passe Crassane’, ‘Vicar of Winkfield (Curé)’が, ギリシャで‘Kristalli’, ‘Bartlett’, ‘Passe Crassane’が, トルコで‘Akça’, ‘Ankara’, ‘Santa Maria’が主要品種として栽培されている. 北アメリカにおいては, アメリカ合衆国で‘Bartlett’, ‘Beurré d’Anjou’, ‘Beurré Bosc’, ‘Forelle’が, カナダで‘Bartlett’, ‘Beurré Bosc’, ‘Beurré d’Anjou’が,

南アメリカにおいては、アルゼンチンで‘Bartlett’、‘Packham’s Triumph’、‘Beurre d’Anjou’が、チリで‘Packham’s Triumph’、‘Beurré Bosc’が主要品種となっている。オーストラリアでは‘Packham’s Triumph’、‘Bartlett’、‘Beurre Bosc’が、ニュージーランドでは‘Packham’s Triumph’、‘Winter Nelis’、‘Winter Cole’が、南アフリカでは‘Packham’s Triumph’、‘Forelle’が主要品種として栽培されている。

各国の主要品種のうち、第2章において‘Bartlett’ (SeSl), ‘Doyenne du Comice’ (SaSb), ‘Passe Crassane’ (SgSr), ‘Conference’ (SdSr), ‘Docteur Jules Guyot (Precoce)’ (SaSe), ‘General Leclerc’ (SlSq), ‘Flemish Beauty’ (SdSe), ‘Winter Nelis’ (ShSk)の遺伝子型を推定した。Zuccherelli et al. (2002a)あるいはZisovich et al. (2004a)は5品種のS遺伝子型, ‘Abbé fetal’ (SaSb), ‘Beurré Hardy’ (ScSa), ‘Coscia’ (SbSk), ‘Forelle’ (SeSn), ‘Beurré Bosc’ (ScS-)を推定している。しかし、残りの主要品種, ‘Blanquilla’, ‘Rocha’, ‘Alexander Lucas’, ‘Fondante de Charneu’, ‘Clapp’s Favourite’, ‘Gieser wildeman’, ‘Durondeau’, ‘Clara Frijs’, ‘Kristalli’, ‘Vicar of Winkfield’, ‘Beurre Bosc’, ‘Beurre Hardy’, ‘Kieffer’, ‘Akça’, ‘Ankara’, ‘Santa Maria’, ‘Beurré d’Anjou’, ‘Forelle’, ‘Packham’s Triumph’, ‘Winter Cole’の遺伝子型は推定されていない。また、赤色系突然変異として‘Bartlett’ (SeSl)の枝変わり品種‘Max Red Bartlett’ (SeSl), ‘Bon Rouge’ (SeSl), ‘Rosired’や‘Clapp’s Favorite’の枝変わり品種‘Red Clapp’s (Starkrimson, スタークリムソン)’ (SdSe), ‘Beurré d’Anjou’の枝変わり品種‘Red Anjou’, ‘Beurré Hardy’の枝変わり品種‘Royal Red Hardy’, 銹性突然変異として‘Gorham’の枝変わり品種‘Grand Champion (グランド・チャンピオン)’ (SbSe)も栽培が増加傾向にあるが, ‘Rosired’, ‘Clapp’s Favorite’, ‘Beurré d’Anjou’, ‘Red Anjou’, ‘Royal Red Hardy’, ‘Gorham’のS遺伝子型は推定されていない。

主要品種を交配親に用いて、栽培環境に適し、優れた果実品質を持つ品種の育成が各国で行なわれている。‘Bartlett’は世界中で栽培されているが、早生性を付与するための育種母本としても頻繁に利用されている。また、着色系枝変わり品種‘Max Red Bartlett’は早生性に加え赤果皮色の性質を持つ貴重な育種素材となっている。‘Doyenne du Comice’は、極めて優れた果実品質を有する一方で結実が安定しにくいいため、交配により結実安定で品質の良い品種の育成が行なわれている。その他、主要栽培品種を交配親にして, ‘Angelys’ [‘Doyenné d’hiver’×‘Doyenné du Comice’] (フランス, 1999年育成), ‘Bautomne’ [‘Conference’×‘Doyenné d’hiver’] (フランス, 1998), ‘Bristol Cross’ [‘Bartlett’×‘Conference’] (イギリス, 1931), ‘Condo’ [‘Conference’×‘Doyenne du Comice’] (イギリス), ‘Aurora’ [‘Marguerite Marillat’×‘Bartlett’] (アメリカ, 1950), ‘Canal Red’ [‘Forelle’×‘Max Red Bartlett’] (アメリカ, 1966), ‘California’ [‘Max Red Bartlett’ (SeSl)×‘Doyenné

du Comice' (SaSb)] (アメリカ, 1968), 'Cascade' ['Max Red Bartlett' × 'Doyenne du Comice'] (アメリカ, 1988), 'Devoe' ['Clapp's Favorite' 自然交雑実生] (アメリカ, 1949), 'El Dorado' ['Bartlett' 自然交雑実生] (アメリカ, 1931), 'Gorham' ['Bartlett' × 'Joséphine de Malines'] (アメリカ, 1923), 'Hartman' ['Doyenne du Comice' × 'Max Red Bartlett'] (アメリカ, 1936), 'Highland' ['Bartlett' × 'Doyenne du Comice'] (アメリカ, 1956), 'Reimer Red' ['Doyenne du Comice' × 'Max Red Bartlett'] (アメリカ, 1961), 'Rogue Red' ['Doyenne du Comice' × ('Seckel' × 'Farmingdale seedling 122')] (アメリカ, 1955), 'Santa Maria' ['Bartlett' × 'Coscia'] (イタリア, 1951), 'Rosemarie' ['Bon Rouge' × 'Forelle'] (南アフリカ), 'Flamingo' ['Bon Rouge' × 'Forelle'] (南アフリカ)など多くの品種が育成されている。

食味や果皮色などの果実形質に加えて、火傷病抵抗性も重要な育種目標である。ほとんどのセイヨウナシ品種は火傷病に対して罹病性であり、北アメリカ、西ヨーロッパ、地中海諸国、ニュージーランドでは火傷病による被害が深刻であった。アメリカでは19世紀に中国から導入されたチュウゴクナシ (*P. pyrifolia*)が火傷病抵抗性を示すことに着目し、セイヨウナシとチュウゴクナシの種間雑種、'Garbar', 'Le Conte', 'Kieffer' (*P. pyrifolia* × 'Bartlett'), 'Orient', 'Ayres' ('Garbar' × 'Beurré d'Anjou')が育成され、現在でもテキサス州などで栽培されている。しかし、香りや肉質などの果実品質が劣ることから、数少ない火傷病抵抗性セイヨウナシ品種、'Alexander Lucas', 'Tyson', 'Seckel', 'Old Home', 'Starking Delicious (Maxine)', 'Farmingdale'などを交配母本とした育種や、主要セイヨウナシ品種と他のナシ属種を交配した後に再びセイヨウナシ品種を戻し交雑する育種が取り組まれている。アメリカでは、'Magness' ['Seckel' × 'Doyenné du Comice'] (1968年育成), Moonglow ['US-Michigan 437' × 'Roi Charles de Wurtemberg'] (1960), 'Dawn' ['US-Michigan 437 ('Barseck' × 'Bartlett') × 'Doyenne du Comice'] (1960), 'Honey Sweet' ['Seckel' × 'U.S. 220 ('Vermont Beauty' × 'Roi Charles de Wurtemberg)'] (1977), 'Potomac' ['Moonglow' × 'Beurré d'Anjou'] (1992), 'Blake's Pride' (1998), 'Shenandoah' (2003)が育成されている。カナダでは'Bartlett'に火傷病抵抗性を導入した数品種、'Harrow Crisp' ['Bartlett' × 'US56112-146'] (2002), 'Harrow Delight' ['Purdue 80-51 ('Old Home' × 'Early Sweet') × 'Bartlett'], 'Harrow Sweet' ['Bartlett' × 'Purdue 80-51']が育成されている。

このような交雑育種の傾向において、特定の品種間の交雑が多く行なわれた結果、新品種間または新品種と親品種の間で交雑不和合となるケースが増えていると指摘されている (Sanzol and Herrero 2002)。栽培園において交雑不和合を回避し、安定的な結実を確保するためには、各国の栽培品種の *S* 遺伝子型を把握し、その情報に基づいた栽植を行なう必要がある。上述した

新品種のうち, 'California' (*SbSe*), 'El Dorado' (*SeSh*), 'Devoc' (*SdSq*), 'Grand Champion' (*SbSe*)の遺伝子型を推定した(第2章). 'Cascade' (*SbSe*)の*S*遺伝子型はZuccherelli et al. (2002a)により推定されている. しかし, 残りの新品種の遺伝子型は推定されていない.

セイヨウナシは品種成立の背景が複雑であるので (Janick Fruit Breeding 1996), 第2章でクローニングされた10種類以外の*S-RNase*対立遺伝子が存在すると考えられる. ゲノミックPCRにより増幅された13種類の推定*S-RNase*対立遺伝子のうち, *Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *So-*, *Sp-RNase*対立遺伝子は本論文第2章でクローニングされておらず, また, 新規*S*対立遺伝子を有する品種も多く存在すると考えられる. さらに, 'Frontier', 'Garbar', 'Kieffer'など*P. communis*と*P. pyrifolia*の雑種と言われる品種も存在するので, ニホンナシで報告されている9種類の*S-RNase*対立遺伝子が見出される可能性もある. 世界各国における果実生産の安定化や育種の効率化を達成するためには, より多くの品種の*S*遺伝子型を推定できるシステムの構築が必要である.

本章では, 遺伝資源として日本に導入されている二倍体品種93品種の*S*遺伝子型の推定を試みた. CAPSマーカーシステム(第2章)により識別できないゲノミックPCR断片の塩基配列を解析し, 品種の*S*遺伝子型を推定するとともに, 交配実験により栽培品種間の交雑不和合・和合関係を明らかにした. 新たに7種類の*S-RNase*対立遺伝子をクローニングし, 完全長cDNA配列を決定した. ゲノミックPCR産物およびcDNA断片の塩基配列に基づき, 17種類の*S-RNase*対立遺伝子を識別できるCAPSマーカーシステムを確立した.

## <材料および方法>

### 材料

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点(岩手県盛岡市)および神戸大学農学部圃場(兵庫県神戸市)において栽培されている二倍体のセイヨウナシ品種に加え, ニホンナシ3品種, '二十世紀' (*S2S4*), '豊水' (*S3S5*), '市原早生' (*S1S8*), および, リンゴ6品種, '国光' (*S1S2*), 'ゴールデン・デリシャス' (*S2S3*), 'さんざ' (*S5S7*), 'スターキング・デリシャス' (*S9S19*), '旭' (*S10S25*), '印度' (*S7S20*)を供試した. セイヨウナシ93品種(表3-1)とニホンナシおよびリンゴの各品種から未展開葉を, 'Beurré Hardy', 'Beurré de l'Assomption', 'Chapin', 'Saint Mathieu', 'Akça', 'Dana's Hovay', 'Starking Delicious', 'Bedford', 'Beurré Bosc', 'Beurré Dumont', 'Clara Frijs', 'Durondeau', 'Early Seckel', 'Jargonelle', 'Lincoln', 'Marie Louise', 'Saint Germain'のwhite stageの花から花柱を採取し, 液体窒素で急速冷却後-80℃で保存した. 交配実験には, 花

図3-1 セイヨウナシ93品種の由来および諸特性

品種	原産国	親品種	開花期	収穫盛期	追熟日数 (日)	果皮色	銹	果実重量 (g)	糖度 (%)	酸度 (%)	肉質	黒星病 抵抗性	火傷病 抵抗性
Abbe Fetal	フランス		C	10.10	15		多	316.4	14.3	0.20	砂状		
Akça	トルコ		D*										
Angelys	フランス	Doyenné d'hiver × Doyenné du Comice	C**										
Ankara	トルコ		C*	10.16	44		少	195.5	12.5	0.09	砂状		
Ayers	アメリカ	Garbar × Beurré d'Anjou	B*	9.11	14	黄+陽光面赤	多	131.5	15.8	0.39	溶質		R
Besi de Saint-Waast	フランス		C*	10.10	21	黄+陽光面赤	少	421.3	13.2	0.11	砂状		
Beurré Bedford	イギリス	Marie Louise × Durondeau	E										
Beurré Bosc	ベルギー		D*	10.01	16	暗黄	全面	311.5	12.6	0.19	砂状		
Beurré Clairgeau	フランス	Duchess d'Angouleme自然交雑実生	C	10.01	24	暗黄+陽光面赤	多	368.4	13.5	0.11	砂状		
Beurré d'Anjou	フランス		C	10.10	22	淡黄	中	231.2	13.5	0.23	粉質		
Beurré de l'Assomption	フランス		E	8.30	11	淡黄	多	190.7	12.5	0.21	粗		
Beurré Dumont	ベルギー		D	10.10	16		少	236.5	13.6	0.19	中	MR	
Beurré Giffard	フランス		C	7.29	21	黄緑	微	93.9	11.4	0.16	溶質	VR	R
Beurré Hardy	フランス		D	8.21	15	黄緑	無	255.6	10.4	0.28	中	R	
Beurré Jean Van Geert	ベルギー		D	10.31	31	明黄	や少	265.6	13.1	0.12	粉質		
Beurré Lubrum	フランス		D*	9.25	12		無	316.5	11.5	0.17	砂状		
Beurré Superfin	フランス		D	9.19	15	黄	微	338.9	13.1	0.51	中		
Blickling	イギリス		E	10.25	23		中	317.8	15.5	0.25	中		MR
Bon-Chrétien d'Hiver	イタリア		D	10.10	29	黄+陽光面赤	多	482.5	12.0	0.11	粗		
Bristol Cross	イギリス	Bartlett × Conference	D	9.25	16		少	236.5	13.6	0.19	中		VR
Canal Red	アメリカ	Forelle × Max Red Bartlett	E*			黄+陽光面赤							
Cascade	アメリカ	Max Red Bartlett × Doyenné du Comice	D	9.13	12	暗黄	や少	311.5	12.5	0.31	溶質		
Chapin	アメリカ	Seckel自然交雑実生	D	8.09	20		無	145.5	14.5	0.32	粗		S
Charles Ernest	フランス		C	10.16	23	黄金	少	374.9	12.9	0.09	中		
Clapp's Favorite	アメリカ	Flemish Beauty × Bartlett	D	8.22	14	淡黄	無	234.2	10.5	0.25	中		
Clara Frijs	フランス		D			淡黄						R	
Colorée de Juillet	フランス		D	7.25	7	明黄	無	96.7	8.4	0.14	粉質		
Comte de Flandre	ベルギー		D	10.10	22	黄緑	少	247.4	13.3	0.12	粗		S
Comte de Lambertye	フランス	Beurré Superfin自然交雑実生	D	9.03	14	淡黄	無	251.1	10.6	0.43	溶質		
Condo	イギリス	Conference × Doyenné du Comice	D*	9.19	15		多	241.7	12.9	0.17	や砂状		
Covert	アメリカ	Bartlett × Dorset	D*	10.16	22		や多	453.5	10.5	0.16	粉質		

各項目空白は不明または記載なし。

開花期:「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による。最も開花の早い品種の開花日を1とし、A (1-6), B (7-12), C (13-17), D (18-22), E (23-27), F (28-32), G (33-37)と分類している。この分類で、'Bartlett'はD, 'Conference'はC, 'Abbe Fetal'はDに分類されている。\*は盛岡での開花日をもとに分類。\*\*はインターネット上の品種説明をもとに分類。

収穫盛期, 追熟日数, 果皮色, 銹, 果実重量, 糖度, 酸度, 肉質は盛岡における調査(石黒私信)。収穫盛期の\*は山形県農業総合研究センター, その他は農研機構果樹研究所盛岡。

火傷病および黒星病に対する抵抗性は「Directory of Pear Cultivar」Crawford (1996)による。VR: Very resistant, R: Resistant, Moderately resistant, S: Susceptible, MS: Moderately susceptible, VS: Very susceptible。

図3-1 セイヨウナシ93品種の由来および諸特性(つづき)

品種	原産国	親品種	開花期	収穫 盛期	追熟日数 (日)	果皮色	銹	果実重量 (g)	糖度 (%)	酸度 (%)	肉質	黒星病 抵抗性	火傷病 抵抗性
Dana's Hovay	アメリカ	Seckel × Winter Nelis	D	9.19	14	黄金	多	174.0	13.4	0.19	砂状		
Délices d'Hardenpont	ベルギー		B*	10.10	14	明黄	無	302.4	12.5	0.39	砂状		
Doyenné d'hiver	ベルギー		D*	10.24	36	黄+陽光面赤	や少	272.4	14.1	0.24	粉質		R
Doyenné Gris	フランス	White Doyenne <sup>樹性突然変異</sup>	D*	8.02	35	暗黄	微	110.0	12.5	0.17	バター状		
Duchesse d'Angouleme	フランス		C	9.19	15	黄	や多	123.7	12.7	0.10	砂状		MR
Durondeau	ベルギー		C	9.19	15		全面	262.8	15.1	0.35	砂状		
Early Seckel	アメリカ	Seckel自然交雑実生	D		15		多	184.5					
Emile d'Heyst	ベルギー		C	10.24	14	淡黄	中	357.8	13.7	0.22	粉質		
Ewart	アメリカ		D	9.04	13	黄緑	多	272.8	12.0	0.50	溶質		MS
Fame	不明			9.05*	14			220.0	11.2	0.35			
Fertility	イギリス	Beurre Goubault自然交雑実生	D	9.27									S
Fondante de Charneu	ベルギー		C*			淡黄							
Fondante Thirriot	フランス		C	10.10	24	黄緑	少	369.1	13.7	0.17	砂状		
Frontier	日本	身不知 ( <i>P. pyrifolia</i> )×フレミッシュ・ビューティー	C*	10.10		黄		766.9	11.4	0.09			
Garbar	アメリカ	<i>P. pyrifolia</i> 雑種	C*	7.23			無	85.8	10.0	0.21	砂状		R
Glou Morceau	ベルギー		D	10.22	38	黄緑	少	253.1	12.5	0.17	粗		
Gorham	アメリカ	Bartlett × Joséphine de Malines	E	10.01	16		多	250.1	13.3	0.24	溶質	VR	
Harrow Crisp	カナダ	Bartlett × US56112-146	D**										R
Harrow Delight	カナダ	Purdue 80-51 (Old Home × Early Sweet) × Bartlett	C	8.28*	7	薄黄+陽光面赤		220.0	14.4	0.36			VR
Harrow Sweet	カナダ	Bartlett × Purdue 80-51 (Old Home × Early Sweet)	C			黄+陽光面赤							R
Hartman	アメリカ	Doyenné du Comice × Max Red Bartlett	D*	10.01									
Harvest Queen	カナダ	Michigan 572 (Barseck × Bartlett) × Bartlett	C	8.20	15	黄	無	144.2	11.1	0.34	溶質		VR
Highland	アメリカ	Bartlett × Doyenné du Comice	C	10.01	17	黄	中	295.8	13.3	0.12	溶質		
Honey Sweet	アメリカ	Seckel × U.S. 220 (Vermont Beauty × Roi Charles de Wurtemberg)	E*	10.01	16	黄金	全面	206.7	14.1	0.23	中		
Howell	アメリカ	Jonah自然交雑実生	D*	9.25	15	淡黄	少	293.6	12.6	0.28	砂状		
Idaho	アメリカ		D	9.19	16	明黄	少	386.2	12.2	0.21	粉質		
Joséphine de Malines	ベルギー		D	10.11	22	黄緑							
Kieffer	アメリカ	<i>P. pyrifolia</i> × Bartlett	B*	10.24	14	黄	や多	354.7	12.3	0.25	粗	R	MR
Koonce	アメリカ		D*	10.01	16	黄緑	多	330.5	11.4	0.33	溶質		R

各項目空白は不明または記載なし。

開花期:「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による。最も開花の早い品種の開花日を1とし、A (1-6)、B (7-12)、C (13-17)、D (18-22)、E (23-27)、F (28-32)、G (33-37)と分類している。この分類で、'Bartlett'はD、'Conference'はC、'Abbe Fetal'はDに分類されている。\*は盛岡での開花日をもとに分類。\*\*はインターネット上の品種説明をもとに分類

収穫盛期、追熟日数、果皮色、銹、果実重量、糖度、酸度、肉質は盛岡における調査(石黒私債)。収穫盛期の\*は山形県農業総合研究センター、その他は農研機構果樹研究所盛岡。

火傷病および黒星病に対する抵抗性は「Directory of Pear Cultivar」Crawford (1996)による。VR: Very resistant, R: Resistant, Moderately resistant, S: Susceptible, MS: Moderately susceptible, VS: Very susceptible。

図3-1 セイヨウナシ93品種の由来および特性(つづき)

品種	原産国	親品種	開花期	収穫 盛期	追熟日数 (日)	果皮色	筋	果実重量 (g)	糖度 (%)	酸度 (%)	肉質	黒星病 抵抗性	火傷病 抵抗性
Lincoln	アメリカ		D*	9.04	12		無	190.7	12.2	0.23	粗		
Magness	アメリカ	Seckel自然交雑実生 × Doyenné du Comice	C										R
Marie Louise	ベルギー		D	9.11	13	黄	中	228.6	13.4	0.29	粗	MS	S
Moonglow	アメリカ	US-Michigan 437×Roi Charles de Wurtemberg	D	9.17									VR
Napoleon	ベルギー		E	10.15*		黄緑	多	100.0	11.0	0.39	中		
Nouveau Poiteau	ベルギー		E	10.16	14	草緑	や多	413.1	14.5	0.18	粉質	R	
Old Home	アメリカ		D*	10.01	16		少	157.2	12.0	0.26	溶質		
Olivier de Serres	フランス	Forunee d'Angers自然交雑実生	D	11.07	31		多	247.2	14.7	0.33	粉質		
Ovid	アメリカ	Bartlett × Dorset	E	10.31	31		多	334.3	14.5	0.17	粉質		
Packam's Triumph	オーストラリア	Uvedale St. Germain (Bella Angevina × Bartlett) × Bartlett	C	10.04		明黄							
Pera d'Agua	スペイン	<i>P. pyrifolia</i> 雑種	B*	10.10	15		少	300.3	11.5	0.37	砂状		MR
Pierre Cornelle	フランス	Beurré Diel × Doyenné du Comice	C	10.10	14	黄緑	多	367.9	15.0	0.16	砂状		MR
Pierre Tourasse	フランス		D*	9.25*	10	淡黄褐	多	311.0	13.1	0.50	中		S
President Héron	フランス		C*	9.19	15		全面	257.5	11.6	0.19	砂状		
Red Anjou	アメリカ	Beurré d'Anjouの着色系突然変異	C	10.01	17		や多	259.0	14.2	0.25	や溶質		R
Reimer red	アメリカ	Doyenné du Comice × Max Red Bartlett	D*	9.25	16		多	291.2	14.4	0.19	溶質		
Rocha	ポルトガル												
Roguered	アメリカ	Doyenné du Comice × (Seckel (SeSt) × Farmingdale seedling 122)	D*	10.01	24	紅色	や多	220.6	15.1	0.18	粗	MS	
Rosired	アメリカ	Bartlettの着色系突然変異	D	9.11	15		少	258.1	12.2	0.27	溶質	R	MR
Royal Red Hardy	フランス	Beurré Hardyの着色系突然変異	D	9.13	23		中	149.2	13.7	0.21	溶質		MR
Saint Germain	フランス			9.19	22	黄緑	多	153.3	12.0	0.72	砂状		
Saint Mathieu	-		D*	9.19	22	黄緑	多	127.2	10.8	0.23	粗		
Santa Maria	イタリア	Bartlett × Coscia	D	9.04	14		無	262.7	10.5	0.19	粗		
Seckel	アメリカ		D	10.01	24	黄褐	多	127.0	15.1	0.12	砂状		
Starking Delicious	アメリカ		E	10.01	12	明黄	少	277.8	11.5	0.20	砂状		R
Summer Doyenne	ベルギー		D*	8.21	21	黄	無	199.0	10.9	0.34	中		
Triumphede Vienne	フランス		D	10.11		黄緑							
Turnbull Giant	-		B*									R	R
Tyson	アメリカ			8.28*	7	深緑			12.1	0.16			R
Urbaniste	ベルギー		D*	10.10	16	淡黄	や多	186.0	12.2	0.19	中		
Verdi	オランダ	B. Louise d'Avranches × Doyenné du Comice	D*			淡黄							
Washington	アメリカ			8.28*	9	黄+陽光面赤		110.0	0.30				
Winter Cole	オーストラリア	Winter Nelis自然交雑実生	D*	11.07	24		多	153.9	14.0	0.13	砂状		

各項目空白は不明または記載なし。

開花期:「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による。最も開花の早い品種の開花日を1とし、A (1-6)、B (7-12)、C (13-17)、D (18-22)、E (23-27)、F (28-32)、G (33-37)と分類している。この分類で、'Bartlett'はD、'Conference'はC、'Abbe Fetel'はDに分類されている。\*は盛岡での開花日をもとに分類、\*\*はインターネット上の品種説明をもとに分類

収穫盛期、追熟日数、果皮色、筋、果実重量、糖度、酸度、肉質は盛岡における調査(石黒 私信)。収穫盛期の\*は山形県農業総合研究センター、その他は農研機構果樹研究所盛岡

火傷病および黒星病に対する抵抗性は「Directory of Pear Cultivar」Crawford (1996)による。VR: Very resistant, R: Resistant, Moderately resistant, S: Susceptible, MS: Moderately susceptible, VS: Very susceptible.

そう数が十分な品種 (第 2 章で S 遺伝子型を推定した品種を含む) を供試した。

## 交配実験

交配実験は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点にて行なった。交配および調査は第 1 章で確立した方法に従い、交配約 10 週間後に結実数と充実種子数を調査した。結実率, Seeds/Flower, SI index を算出し、不和合・和合を判定した。

## プライマーの設計

本章の RACE クローニング, イントロンウォーキング, ゲノミック PCR のために設計したプライマーの塩基配列を表 3-2, -3 と図 2-1 にまとめた。

## CAPS 分析

「ゲノム DNA の抽出と精製」は第 2 章の方法に従った。プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いた PCR により、ゲノム DNA から *S-RNase* 断片を増幅した。増幅断片を第 2 章で選択した 6 種類を含む 11 種類の制限酵素 *BaeI*, *BglII*, *BmgBI*, *BseRI*, *BseYI*, *BssHII*, *BssSI*, *BstZ17I*, *HindIII*, *EcoO109I*, *SphI* で処理した。*BaeI* は 25°C で 4 時間, *BssHII* は 50°C で 4 時間, それ以外の制限酵素は 37°C で 4 時間反応させた。制限酵素処理前後の PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

## RACE クローニング

「Total RNA の抽出」, 「mRNA の単離」, 「3'RACE および 5'RACE」は第 2 章の方法に従った。5'RACE には各 *S-RNase* の HV 領域の配列に基づき設計した特異的なリバープライマー‘HVSc’, ‘HVSin’, ‘HVSin’, ‘HVSp’, ‘HVSs’, ‘HVSt’を用いた (表 3-2)。

## 塩基配列の解析

ゲノミック PCR においてほぼ同じ断片長に検出される増幅断片, および, RACE における PCR 産物をゲルから抽出した後で TA クローニングに供し, 目的の断片の塩基配列を解析した。

「ゲルからの PCR 産物の抽出」, 「TA クローニング」, 「塩基配列の決定」は第 2 章の方法に従った。

表3-2 本章のRACEクローニングおよびゲノミックPCRに用いた*S-RNase*特異的プライマー.

プライマー	配列(5'-3')	プライマーの位置
FTQQYQ	TTACGCAGCAATATCAG	C1
C2FI	TCTAATCCTACTCCTTGT	C2上流
C2F2	GATCCTCCTGACAAGT	C2
HVSq	CTTATCGTTCGAGGTTC	HV
HVSc	CTTGAGATTTGTTATCGTC	HV
HVSiSn	GGGCTTGGATATTTTTTA	HV
HVSm	CTTGATATGTCCAATCTG	HV
HVSp	GGGCTTCGATATTTTTTA	HV
HVSs	GGGCTGTCATATTCCTA	HV
HVSt	GGGGTTGAGTGATGTATCTA	HV
anti-IIWPNV	AC (A/G) TTCGGCCAAATAATT	HV下流
EpSg-anti-IIWPNV	ACGTTTCGGCCAAATAATG	HV下流
anti-(I/T)IWPNV	AC (A/G) TTCGGCCAAATARTT	HV下流
EP-anti-IIWPNV	AC (A/G) TT (C/T) GGCCAAATAATT	HV下流
IWPN-F	G (A/G) HAATTATTTGGCCG	HV下流
E-IIWPNV-F	ATTATTTGGCCAAACGTA	HV下流

表3-3 本章のイントロンウォーキングで設計したプライマー.

プライマー	配列(5'-3')	プライマーの位置
St-INTF1	CACCCACATTTTCTTTTC	<i>St-RNase</i> イントロン
St-INTR1	TAAATAAAAACCCATAAATC	<i>St-RNase</i> イントロン
St-INTF2	AATGTCTTGCCCTCATGTGG	<i>St-RNase</i> イントロン

## ***Sx-RNase* の増幅と発現解析**

*Sx-RNase* 配列を持つ断片を増幅するためのゲノミック PCR は、第 2 章の「シーケンス反応に用いる PCR 産物の抽出」における PCR の反応液組成を用い、反応は第 2 章と同じサイクル、もしくは、伸長時間 30 秒で 99 サイクルのパターンで行ない、後者ではアニーリングの温度を 52°C に設定した。鋳型として各品種の花柱 total RNA を、また、プライマーとして CAPS マーカーシステムのプライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’、*Sx-RNase* 特異的リバースプライマー‘EPSx-anti-IIWPNV’ (5’-TACGTTCGGCCAAATTAT-3’), *Sx-RNase* の非翻訳領域の配列に基づき設計した特異的プライマー‘SxUTRf1’ (5’-CTTCAAATGGATCAAATG-3’), ‘SxUTRf2’ (5’-GAGTAATTAATTTGCCTCGCTC-3’), ‘SxUTRr1’ (5’-CCACATATTCACCCGAGC-3’), ‘SxUTRr2’ (5’-GGCCAACATAGAAGTTCAC-3’)を用いた。‘Durondeau’の花柱、葯、花卉、葉の total RNA を鋳型に、プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EPSx-anti-IIWPNV’を用いた RT-PCR を第 2 章の方法に従って行ない、*Sx-RNase* の発現を解析した。

## **<結果>**

### **自家不和合性の評価**

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点に栽植されている二倍体品種のうち、交配実験に供試できる花そう数が確保できた 52 品種について、自家受粉により品種の自家不和合性を評価した。‘Ayers’, ‘Kieffer’, ‘Magness’, ‘Turnbell Giant’の 4 品種は雄性不稔性品種であった。SI index による判定の結果、供試 48 品種中 47 品種は自家不和合であったが、‘Gorham’は部分的自家和合と判定された。‘Grand Champion’は‘Gorham’の枝変わりであるので、‘Grand Champion’の部分的自家和合性は‘Gorham’から受け継いだと考えられた。

### **CAPS マーカーシステム (第 2 章)による S 遺伝子型推定**

セイヨウナシ 93 品種のゲノム DNA から、プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いた PCR により *S-RNase* 断片を増幅した後、6 種類の制限酵素、*Bgl*II (*Sk*), *Hind*III (*Sq*), *Sph*I (*Sa*), *Eco*O109I (*Sd*), *Bss*HII (*Sh*), *Bae*I (*Sr*)を処理して増幅断片を切断した。増幅断片長または制限酵素による切断の有無から、*Sa*-, *Sb*-, *Sd*-, *Se*-, *Sg*-, *Sh*-, *Sk*-, *Sl*-, *Sq*-, *Sr-RNase* 対立遺伝子を特定し、各品種の S 遺伝子型を推定した。供試品種中 60 品種については 2 種類の *S-RNase* 対立遺伝子を特定でき、S 遺伝子型を推定することができた (表 3-4)。60 品種は *Sa*-, *Sb*-, *Sd*-, *Se*-, *Sg*-, *Sh*-,

表3-4 第2章のCAPSマーカーシステムにより新たにS遺伝子型が推定された二倍体60品種

S遺伝子型	品種	S遺伝子型	品種
<i>SaSb</i>	Abbé fétal	<i>SeSg</i>	Beurré Superfin
<i>SaSe</i>	Duchesse d'Angouleme		Orivier de Serres
	Harrow Crisp	<i>SeSh</i>	Winter Cole
	Harrow Delight	<i>SeSk</i>	Fondante Thirriot
	Magness		Packam's Triumph
	Rocha		Washington
	Tyson	<i>SeSl</i>	Délices d'Hardenpont
<i>SaSg</i>	Charles Ernest		Harvest Queen
	Triumphede Vienne		Napoleon
<i>SaSl</i>	Harrow Sweet		Rosired
	Koonce		Seckel
	Pierre Tourasse	<i>(SeSl)</i>	Ayers
<i>SaSg</i>	Beurré Clairgeau		Pera d'Agua
<i>SaSr</i>	Angelys	<i>SeSq</i>	Besi de Saint-Waast
<i>SbSe</i>	Beurré Lubrum		Bon-Chretien d'Hiver
	Cascade		Covert
	Gorham		Pierre Cornelle
	Hartman	<i>SeSr</i>	Doyenné d'hiver
	Highland		Idaho
	Howell		Verdi
<i>SbSg</i>	Glou Morceau	<i>SgSl</i>	Blickling
<i>SbSl</i>	Beurré Jean Van Geert		Comte de Lambertye
	Canal Red	<i>SgSq</i>	President Héron
	Honey Sweet	<i>ShSq</i>	Fertility
	Joséphine de Malines	<i>SkSl</i>	Santa Maria
<i>SbSr</i>	Condo	<i>SkSr</i>	Ankara
	Urbaniste	<i>SlSq</i>	Ovid
<i>SdSe</i>	Clapp's Favorite	<i>SlSr</i>	Bristol Cross
<i>(SdSe)</i>	Frontier		Emile d'Heyst
<i>SdSl</i>	Doyenné Gris	<i>(SlSr)</i>	Kieffer

赤色は日本の栽培品種には見られなかったS遺伝子型。

チュウゴクナン (*P. pyrifolia*)との雑種とされる品種のS遺伝子型は()書きで示した。

*Sk-*, *Sl-*, *Sq-*, *Sr-RNase* 対立遺伝子の組み合わせからなる 25 種類の *S* 遺伝子型に分類され、そのうち 14 種類、*SaSq*, *SaSr*, *SbSg*, *SbSl*, *SbSr*, *SdSl*, *SeSg*, *SeSk*, *SeSq*, *SgSl*, *SgSq*, *ShSq*, *SkSl*, *SkSr* は日本の栽培品種にはない *S* 遺伝子型であった。‘Abbé fetal’ (*SaSb*) および ‘Cascade’ (*SbSe*) の推定 *S* 遺伝子型は Zuccherelli et al. (2002a) による推定と一致した。チュウゴクナシ (*P. pyrifolia*) との雑種とされる品種の遺伝子型は ‘Frontier’ (*SdSe*), ‘Kieffer’ (*SlSr*), ‘Ayers’ (*SeSl*), ‘Pera d’Agua’ (*SeSl*) と推定された。

一方、24 品種からは、第 2 章の CAPS マーカーシステムでは識別できない *S-RNase* 断片が検出された (図 3-1, 表 3-5)。「Old Home」と ‘Starking Delicious’ および ‘Turnbull Giant’ からは 998 bp の *Se-RNase* 対立遺伝子および 440 bp の *Sb-RNase* 対立遺伝子に加えて、新たに約 1.6 kb の断片が検出された。「Fondante de Charneu」からは 1,414 bp の *Sl-RNase* 対立遺伝子に加えて、2 種類の制限酵素、*Bgl*III および *Hind*III では切断されない約 1.3 kb の断片が増幅された。「Ewart’, ‘Beurré de l’Assomption’, ‘Chapin’, ‘Akça’, ‘Comte de Flandre」からは 1,414 bp の *Sl-RNase* 対立遺伝子と約 350 bp が、‘Beurré d’Anjou’, ‘Moonglow’, ‘Red Anjou’, ‘Dana’s Hovay’, ‘Beurré Giffard’, ‘Summer Doynne’, ‘Colorée de Juillet」からは 998 bp の *Se-RNase* 対立遺伝子と約 350 bp 断片が、‘Reimer Red」からは 440 bp の *Sb-RNase* 対立遺伝子と約 350 bp 断片が増幅された。これらの品種から増幅された約 350 bp の断片は *Bae*I, *Bss*HII, *Eco*O109I, *Sph*I で切断されなかった。「Roguered’, ‘Beurré Hardy’ (*ScSd*; Zuccherelli et al. 2002a), ‘Royal Red Hardy’, ‘Nouveau Poiteau’, ‘Garbor’, ‘Fame」からは 2 種類の約 350 bp 断片が増幅された。制限酵素切断片長多型から各品種の一方の約 350 bp 断片はそれぞれ、*Sa-*, *Sd-*, *Sd-*, *Sh-*, *Sh-*, *Sr-RNase* 対立遺伝子と特定できたが、もう一方の約 350 bp 断片は、*Bae*I, *Bss*HII, *Eco*O109I, *Sph*I で切断されなかったため、*S-RNase* 対立遺伝子を特定できなかった。「Beurré Hardy」と ‘Royal Red Hardy’ の切断されなかった断片は Zuccherelli et al. (2002a) の結果から推定 *Sc-RNase* 対立遺伝子に相当すると考えられた。「Saint Mathieu」からは約 350 bp の断片が増幅されたが、*Bae*I, *Bss*HII, *Eco*O109I, *Sph*I で切断されなかった。CAPS マーカーシステムで識別できなかった断片は *Sa-*, *Sb-*, *Sd-*, *Se-*, *Sg-*, *Sh-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sq-*, *Sr-RNase* 対立遺伝子以外の *S-RNase* 対立遺伝子であると考えられた。

残り 9 品種からは、CAPS マーカーシステムで識別できる 1 種類の断片のみが増幅された (図 3-1, 表 3-5)。「Beurré Bedford’, ‘Beurré Bosc’, ‘Durondeau」からは *Sh-RNase* 対立遺伝子のみが、‘Early Seckel」と ‘Marie Louise」からは *Sl-RNase* 対立遺伝子のみが、‘Lincoln’, ‘Clara Frijs’, ‘Beurré Dumont’, ‘Saint Germain」からはそれぞれ *Sb-*, *Se-*, *Sg-*, *Sr-RNase* 対立遺伝子のみが検出された。これら品種には、プライマーセット ‘FTQQYQ’ と ‘EP-anti-IIWPNV2’ を用いた PCR では増幅されな

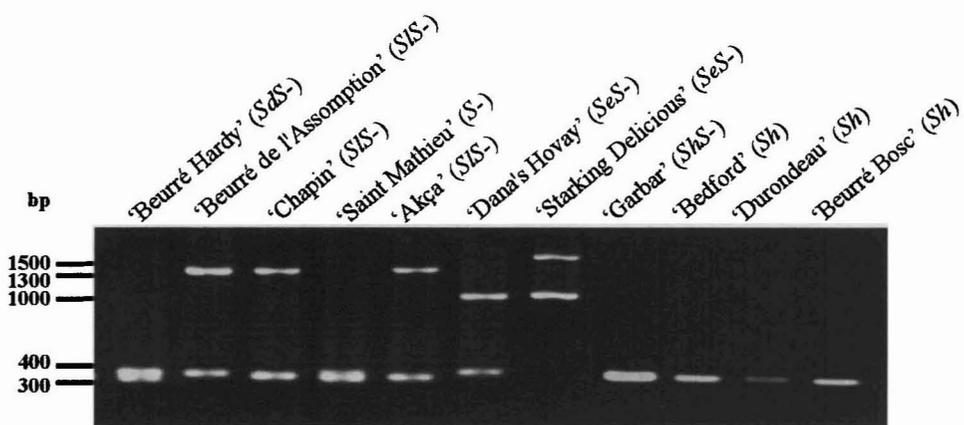


図3-1 プライマーセット‘FTQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いたゲノミックPCRによる二倍体品種からの*S-RNase*対立遺伝子の増幅。第2章のCAPSマーカーシステムにより*S*遺伝子型が推定されなかった品種の一部。

表3-5 第2章のCAPSマーカーシステムによりS遺伝子型が推定できなかった二倍体33品種

S遺伝子型	品種
識別できない断片が増幅された品種	
<i>SaS-</i>	Roguered
<i>SbS-</i>	Reimer Red Turnbull Giant
<i>SdS-</i>	Beurré Hardy Royal Red Hardy
<i>SeS-</i>	Beurré d'Anjou Moonglow Red Anjou Dana's Hovay Beurré Giffard Summer Doyenne Colorée de Juillet Old Home Starking Delicious
<i>ShS-</i> ( <i>ShS-</i> )	Nouveau Poiteau Garbar
<i>SiS-</i>	Ewart Beurré de l'Assomption Chapin Akça Comte de Flandre Fondante de Charneu
<i>SrS-</i> <i>S-</i>	Fame Saint Mathieu
識別できる1種類の断片のみが増幅された品種	
<i>Sb</i>	Lincoln
<i>Se</i>	Clara Frijs
<i>Sg</i>	Beurré Dumont
<i>Sh</i>	Beurré Bedford Beurré Bosc Durondeau
<i>Sl</i>	Early Seckel Marie Louise
<i>Sr</i>	Saint Germain

チュウゴクナシ (*P. pyrifolia*)との雑種とされる品種のS遺伝子型は()書きで示した。

い *S-RNase* 対立遺伝子が存在すると考えられた。

Zuccherelli et al. (2002a, b)と Zisovich et al. (2004a)は、ゲノック PCR により *Sa-*, *Sb-*, *Sd-*, *Se-*, *Sh-*, *Sk-*, *Sl-RNase* 対立遺伝子以外に 6 種類の推定 *S-RNase* 対立遺伝子; *Sc* (accession no. AJ459774), *Si* (accession no. AF518319), *Sm* (accession no. AY159323), *Sn* (accession no. AY195840), *So* (accession no. AY261994), *Sp* (accession no. AY421968)を増幅している。プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いた PCR により、*So-RNase* は 1,291 bp の断片として、その他は約 350 bp の断片として増幅されると予測される。また、チュウゴクナシ (*P. pyrifolia*)との雑種である‘Frontier’, ‘Kieffer’, ‘Ayers’, ‘Garbar’, ‘Pera d'Agua’にはニホンナシ *S-RNase* 対立遺伝子が増幅されている可能性がある。そこで、第 2 章の CAPS マーカーシステムにより識別できない断片が増幅された 24 品種と‘Frontier’, ‘Kieffer’, ‘Ayers’, ‘Pera d'Agua’から、プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いた PCR により増幅された断片の DNA 配列を解析した。‘Old Home’と‘Starking Delicious’および‘Turnbull Giant’からの約 1.6 kb の増幅断片、‘Fondante de Charneu’からの約 1.3 kb の増幅断片、‘Ewart’, ‘Beurré de l'Assomption’, ‘Chapin’, ‘Akça’, ‘Comte de Flandre’から、‘Beurré d'Anjou’, ‘Moonglow’, ‘Red Anjou’, ‘Dana’s Hovay’, ‘Beurré Giffard’, ‘Summer Doynne’, ‘Colorée de Juillet’, ‘Old Home’, ‘Starking Delicious’, ‘Reimer Red’, ‘Frontier’, ‘Kieffer’からの約 350 bp の増幅断片、および、‘Kieffer’, ‘Ayers’, ‘Pera d'Agua’の 1,414 bp 断片、‘Frontier’, ‘Ayers’, ‘Pera d'Agua’の 998 bp はゲル抽出した後、直接、塩基配列を解析した。約 350 bp 断片のみが増幅された‘Roguered’, ‘Beurré Hardy’, ‘Royal Red Hardy’, ‘Nouveau Poiteau’, ‘Garbar’, ‘Saint Mathieu’, ‘Jargonelle’, ‘Fame’の 8 品種はゲル抽出した断片を TA クローニングに供し、各コロニーのインサート DNA 配列を決定した。1 kb を超える断片については、さらにプライマーウォーキングを行ない、インサートの配列を決定した。

得られた断片の配列を推定 *Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *So-*, *Sp-RNase* 対立遺伝子および 9 種類のニホンナシの *S-RNase* の塩基配列, *S1* (accession no. AB14073), *S2* (accession no. AB002139), *S3* (accession no. AB025421), *S4* (accession no. AB009385), *S5* (accession no. AB045711), *S6* (accession no. AB002142), *S7* (accession no. AB002143), *S8* (accession no. AB104908), *S9* (accession no. AB104909) と照合させた。‘Old Home’, ‘Starking Delicious’, ‘Turnbull Giant’から増幅された 1,642 bp 断片は一致する配列がなかったので新規 *S-RNase* 対立遺伝子と考えられた。‘Fondante de Charneu’の制限酵素で切断されない約 1.3 kb 断片はニホンナシ *S2-RNase* の配列と一致した。‘Fame’の 372 bp 断片はニホンナシ *S4-RNase* の配列と一致した。‘Roguered’, ‘Reimer Red’, ‘Beurré Hardy’, ‘Royal Red Hardy’, ‘Beurré d'Anjou’, ‘Moonglow’, ‘Red Anjou’, ‘Nouveau Poiteau’, ‘Ewart’, ‘Saint Mathieu’の

334 bp 断片は *Sc-RNase* 対立遺伝子と, 'Beurré Giffard', 'Summert Doyenne', 'Beurré de l'Assomption' の 362 bp 断片は *Si-RNase* 対立遺伝子と, 'Colorée de Juillet', 'Garbar', 'Chapin', 'Jargonelle' の 350 bp 断片は *Sm-RNase* 対立遺伝子と, 'Saint Mathieu' の 362 bp 断片は *Sn-RNase* 対立遺伝子と, 'Akça' の 338 bp 断片は *Sp-RNase* 対立遺伝子と一致した. 'Dana's Hovay' の 367 bp の断片は一致する配列がなかったので, 新規 *S-RNase* 対立遺伝子と考えられた. 'Frontier' の 376 bp の断片は *Sd-RNase* 対立遺伝子ではなく, ニホンナシ *S5-RNase* であることが明らかになった. 2 種類の新規 *S-RNase* 対立遺伝子が検出されたので, 'Dana's Hovay' の 367 bp 断片を推定 *Ss-RNase* 対立遺伝子, 'Old Home', 'Starking Delicious', 'Turnbull Giant' の 1,642 bp 断片を推定 *St-RNase* 対立遺伝子と名付けた.

以上の結果から, 2 種類の断片が増幅された 24 品種の *S* 遺伝子型を推定した (表 3-6). 'Beurré Hardy' の *S* 遺伝子型 *ScSd* は Zuccherelli ら (2002a) による推定と一致した. ニホンナシ *S-RNase* が増幅された 'Fondante de Charneu' と 'Fame' の遺伝子型をそれぞれ *SIPpS2* と *SrPpS4* と推定した. チウゴクナシとの雑種品種では, 'Garbar' の遺伝子型を *ShSm* と推定し, 'Frontier' の遺伝子型を *SePpS5* に修正した. また, 'Kieffer', 'Ayers', 'Pera d'Agua' の推定遺伝子型は *SISr*, *SeSI*, *SeSI* であることを確認した. (表 3-6).

### 3'および5'RACEによる完全長 cDNA のクローニング

*Sc*-, *Si*-, *Sm*-, *Sn*-, *Sp*-, *Ss*-, *St-RNase* の完全長塩基配列を決定するため, 7 種類の *S-RNase* 対立遺伝子を持つ品種のうち, 'Beurré Hardy' (*ScSd*), 'Beurré de l'Assomption' (*SiSI*), 'Chapin' (*SiSm*), 'Saint Mathieu' (*ScSn*), 'Akça' (*SISp*), 'Dana's Hovay' (*SeSs*), 'Starking Delicious' (*SeSt*) の 7 品種を選び, 花柱 total RNA を鋳型に 3'RACE と 5'RACE を行なった. それぞれの推定 *S* 遺伝子型に相当する cDNA 断片が各品種からクローニングされた. 5'および3'末端側断片の配列を重複させ, 7 種類の *S-RNase* cDNA 完全長塩基配列を決定した: *Sc* (accession no. AB258359), *Si* (accession no. AB258364), *Sm* (accession no. AB258362), *Sn* (accession no. AB258363), *Sp* (accession no. AB258364), *Ss* (accession no. AB258365), *St* (accession no. AB258366). *Sc*-, *Si*-, *Sm*-, *Sn*-, *Sp*-, *Ss*-, *St-RNase* は 678 ~687 bp からなり, 226~229 アミノ酸をコードしていた. 17 種類の *S-RNase*, *Sa*-, *Sb*-, *Sc*-, *Sd*-, *Se*-, *Sg*-, *Sh*-, *Si*-, *Sk*-, *Sl*-, *Sm*-, *Sn*-, *Sp*-, *Sq*-, *Sr*-, *Ss*-, *St-RNase* の推定アミノ酸配列の比較から, *Sc*-, *Si*-, *Sm*-, *Sn*-, *Sp*-, *Ss*-, *St-RNase* にも, 2 つのヒスチジン残基, 8 つのシステイン残基, シグナルペプチド, 5 つの保存領域 (C1, C2, C3, RC4, C5), 1 つの HV 領域を有するナシ亜科 *S-RNase* に典型的な構造が確認されたので, 新たにクローニングした 7 種類の cDNA もセイヨウナシの *S-RNase* を

表3-6 ゲノミックPCR断片の塩基配列解析による二倍体93品種のS遺伝子型

S遺伝子型	品種	S遺伝子型	品種
<i>SaSb</i>	Abbé fetal	<i>SeSl</i>	Ayers
<i>SaSc</i>	Roguered		Délices d'Hardenpont
<i>SaSe</i>	Duchesse d'Angouleme		Harvest Queen
	Harrow Crisp		Napoleon
	Harrow Delight		Pera d'Agua
	Magness		Rosired
	Rocha		Seckel
	Tyson	<i>SeSm</i>	Colorée de Juillet
<i>SaSg</i>	Charles Ernest	<i>SeSq</i>	Besi de Saint-Waast
	Triumphede Vienne		Bon-Chretien d'Hiver
<i>SaSl</i>	Harrow Sweet		Covert
	Koonce		Pierre Cornelle
	Pierre Tourasse	<i>SeSr</i>	Doyenné d'hiver
<i>SaSg</i>	Beurré Clairgeau		Idaho
<i>SaSr</i>	Angelys		Verdi
<i>SbSc</i>	Reimer Red	<i>SeSs</i>	Dana's Hovay
<i>SbSe</i>	Beurré Lubrum	<i>SeSt</i>	Old Home
	Cascade		Starking Delicious
	Gorham	<i>SgSl</i>	Blickling
	Hartman		Comte de Lambertye
	Highland	<i>SgSq</i>	President Héron
	Howell	<i>ShSm</i>	Garbar
<i>SbSg</i>	Glou Morceau	<i>ShSq</i>	Fertility
<i>SbSl</i>	Beurré Jean Van Geert	<i>SiSl</i>	Beurré de l'Assomption
	Canal Red	<i>SkSl</i>	Santa Maria
	Honey Sweet	<i>SkSr</i>	Ankara
	Joséphine de Malines	<i>SISm</i>	Chapin
<i>SbSr</i>	Condo	<i>SISp</i>	Akça
	Urbaniste	<i>SISq</i>	Ovid
<i>SbSt</i>	Turnbull Giant	<i>SISr</i>	Bristol Cross
<i>ScSd</i>	Beurré Hardy		Emile d'Heyst
	Royal Red Hardy		Kieffer
<i>ScSe</i>	Beurré d'Anjou	<i>SISs</i>	Comte de Flandre
	Moonglow	<i>SePpS5</i>	Frontier
	Red Anjou	<i>SIPpS2</i>	Fondante de Charneu
<i>ScSh</i>	Nouveau Poiteau	<i>SrPpS4</i>	Fame
<i>ScSl</i>	Ewart	( <i>SaSx</i> )	Lincoln
<i>ScSn</i>	Saint Mathieu	( <i>SeSx</i> )	Clara Frijs
<i>SdSe</i>	Clapp's Favorite	( <i>SgSx</i> )	Beurré Dumont
<i>SdSl</i>	Doyenné Gris	( <i>ShSx</i> )	Beurré Bedford
<i>SeSg</i>	Beurré Superfin		Beurré Bosc
	Orivier de Serres		Durondeau
<i>SeSh</i>	Winter Cole	( <i>SISx</i> )	Early Seckel
<i>SeSi</i>	Beurré Giffard		Marie Louise
	Summer Doyenne	( <i>SrSx</i> )	Saint Germain
<i>SeSk</i>	Fondante Thirriot		
	Packam's Triumph		
	Washington		

*Pp*: ニホンナシ (*P. pyrifolia*)からクローニングされた*S-RNase*対立遺伝子  
*Sx-RNase* cDNAがクローニングされた品種の*S*遺伝子型を()書きで記載した。

コードすると考えた (図 3-2). 17 種類の *S-RNase* のアミノ酸レベルの相同性は 61.1% (Si-と Sm-*RNase* 間)~93.0% (Si-と St-*RNase* 間)であり (塩基レベルでは 74.9~95.2%), ニホンナシ (56.7~94.6%)やリンゴ (60.7~93.9%)と同程度であった (表 3-7). このうち, Si-*RNase* と Sn-*RNase* は 92.1%の相同性であったが, HV 領域の推定アミノ酸配列が同じであった (図 3-3). *S-RNase* の対立遺伝子特異性には HV 領域のアミノ酸配列が関与しているとされており, リンゴやニホンナシの *S-RNase* は HV 領域の推定アミノ酸配列がそれぞれ異なっている (Sassa et al. 1996; Ishimizu et al. 1998). しかし, セイヨウナシの Si-*RNase* と Sn-*RNase* は *Si* を持つ花粉に対して異なる対立遺伝子特異性を示すことが報告されている (Zisovich et al. 2004b). その他の 15 種類の *S-RNase* の HV 領域は異なる配列を有していたので 17 種類の *S-RNase* は異なる認識特異性を持つと考えた.

プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いたゲノミック PCR により 1 種類の断片しか増幅されなかった 9 品種, ‘Beurré Bedford’, ‘Beurré Bosc’, ‘Beurré Dumont’, ‘Clara Frijs’, ‘Durondeau’, ‘Early Seckel’, ‘Lincoln’, ‘Marie Louise’, ‘Saint Germain’から新規 *S-RNase* 対立遺伝子をクローニングするため, これら品種の花柱 total RNA を鋳型に用いて 3’RACE を行なった. 各品種からは CAPS マーカーシステムで識別された *S-RNase* 対立遺伝子と同じ配列を持つ cDNA 断片に加えて, 9 品種すべてから同一の配列を有する cDNA 断片がクローニングされた. そこで, 5’RACE を行ない, 5’および 3’末端側断片配列を重複させ, cDNA 完全長塩基配列を決定した. 681 bp からなるこの cDNA は 227 アミノ酸をコードし, 推定アミノ酸配列にはナシ亜科 *S-RNase* に典型的な一次構造が確認された. 第 2 章でクローニングされた 10 種類の *S-RNase* や *Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *So-*, *Sp-*, *Ss-*, *St-RNase* とともにニホンナシの 9 種類の *S-RNase* と一致せず, 新規 *S-RNase* 対立遺伝子の可能性が考えられたので, *Sx-RNase* と名付けた. 9 品種の *S* 遺伝子型を ‘Bedford’ (*ShSx*), ‘Beurré Bosc’ (*ShSx*), ‘Beurré Dumont’ (*SgSx*), ‘Clara Frijs’ (*SeSx*), ‘Durondeau’ (*ShSx*), ‘Early Seckel’ (*SlSx*), ‘Lincoln’ (*SbSx*), ‘Marie Louise’ (*SlSx*), ‘Saint Germain’ (*SrSx*)と推定した.

### 17 種類の *S-RNase* 対立遺伝子を識別する CAPS マーカーシステムの開発

プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いたゲノミック PCR では *Sx-RNase* 対立遺伝子は増幅されない (図 3-1). *Sx-RNase* の塩基配列には, リバースプライマー ‘EP-anti-IIWPNV’との間に 1 塩基の違いが見出された. そこで, *Sx-RNase* 特異的なリバースプライマー ‘EPSx-anti-IIWPNV’ (5’-TACGTTTCGGCCAAATTAT-3’)を設計し, プライマーセット ‘FTQQYQ’と ‘EPSx-anti-IIWPNV’用いて再度ゲノミック PCR を行なったが, *Sx-RNase* 対立遺伝

表3-7 18種類のセイヨウナシS-RNaseの推定アミノ酸配列およびcDNA配列の相同性 (%)

	Sa	Sb	Sb'	Sc	Sd	Se	Sg	Sh	Si	Sk	Sl	Sm	Sn	Sp	Sq	Sr	Ss	St	Su
Sa		66.1	66.1	69.7	69.3	65.1	69.3	67.1	69.7	68.9	62.9	64.0	70.2	69.6	67.1	70.6	68.4	63.9	63.6
Sb	79.5		99.1	66.1	67.7	64.6	64.6	67.7	67.3	71.8	61.8	63.0	68.1	67.3	67.0	63.9	66.4	64.9	61.9
Sc	83.7	79.6	77.9		66.4	67.2	66.7	65.4	65.8	73.7	66.4	64.5	67.1	65.8	71.5	67.5	65.1	67.8	61.0
Sd	81.7	81.0	78.5	81.4		67.0	68.1	68.1	69.7	69.0	62.2	65.1	73.1	70.6	65.5	68.6	85.5	65.1	62.0
Se	78.8	77.8	78.6	80.3	78.0		65.1	65.1	64.7	67.7	78.4	65.9	66.8	64.7	64.2	65.5	67.8	81.5	62.1
Sg	82.0	78.9	76.9	81.3	81.0	79.0		69.7	67.5	70.2	63.3	68.4	68.9	67.5	67.5	84.2	68.1	64.8	62.7
Sh	81.4	81.2	78.8	80.9	81.2	80.3	81.6		69.7	66.2	64.2	64.9	69.7	71.9	63.6	67.5	64.6	66.5	74.0
Si	83.7	81.2	77.9	81.7	83.6	78.2	81.4	81.4		68.0	62.9	64.0	92.1	91.2	66.2	80.3	69.7	63.9	65.8
Sk	82.9	81.6	78.9	84.3	80.9	79.0	81.4	80.0	81.6		68.6	69.3	69.3	68.4	89.5	70.2	68.6	71.3	62.7
Sl	77.2	76.3	75.8	79.3	76.6	87.0	77.2	78.0	77.2	78.2		61.1	64.2	64.6	65.5	65.1	63.0	93.0	60.3
Sm	81.7	77.7	76.4	80.4	80.3	79.4	82.3	80.7	81.0	81.0	77.8		66.7	64.5	66.2	67.1	63.3	64.3	61.0
Sn	80.7	78.3	81.2	78.6	81.6	78.8	78.9	79.0	91.5	79.0	75.8	78.6		89.4	68.0	80.3	71.5	66.4	65.4
Sp	80.7	79.2	81.4	79.7	81.0	79.5	78.5	80.5	91.6	79.3	74.9	79.4	93.3		65.8	79.8	70.2	64.8	67.5
Sq	82.6	80.2	78.0	83.7	80.3	78.2	81.0	79.6	80.7	95.2	77.6	79.7	78.8	78.5		65.4	65.5	68.3	61.8
Sr	83.9	80.5	78.6	83.6	83.1	79.7	91.5	82.4	88.5	82.4	79.0	83.1	86.3	86.3	81.3		68.1	64.8	62.3
Ss	81.7	80.0	78.9	81.2	91.2	78.8	80.3	79.5	83.3	80.6	77.2	80.0	80.3	80.4	79.9	82.6		65.2	59.8
St	77.5	77.2	77.0	79.5	77.6	86.7	77.3	78.5	76.3	78.7	94.2	77.7	77.1	76.1	78.2	78.5	77.7		62.2
Su	78.0	77.1	75.3	77.1	78.5	76.8	77.1	84.0	79.0	76.2	75.6	77.1	77.8	79.0	76.1	78.2	77.3	76.9	

上段: 推定アミノ酸配列間の相同性, 下段: 塩基配列間の相同性, どちらも最高値を赤字で, 最低値を青字で示した. 17種類のS-RNaseは下記の accession number でDDBJに登録されている: Sa-RNase (AB236430), Sb-RNase (AB236429), Sc-RNase (AB258359), Sd-RNase (AB236427), Se-RNase (AB236428), Sg-RNase (AB258360), Sh-RNase (AB236431), Si-RNase (AB258364), Sk-RNase (AB236432), Sl-RNase (AB236425), Sm-RNase (AB258362), Sn-RNase (AB258363), Sp-RNase (AB258364), Sq-RNase (AB236424), Sr-RNase (AB236426), Ss-RNase (AB258365), St-RNase (AB258366). Su-RNaseは未登録.

Sa-RNase	MGITGIIYMVTMVFLLIVLILSPSTVG	YDYFQFTQQYQLAVCHFNPPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNSGNDPMYCKNTTLNSTK	---IAN-LTAQLEI IWPVNLDRDTHITFWNKQ	112
Sb-RNase	MG-TGMIYMVMVFSLLIVLILSSSTVG	FDYYQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSDSNGNDPKYCKAPP-Y-QT	---MKI-LEPHLVI IWPVNLNRNDHEVFWRKQ	109
Sc-RNase	MGITGMIYMVPTVFSLLIVLILSSSA	AKYDYFQFTQQYQPAVCNSNPTPCSDPTDKLFTVHGLWPSKSSGRDPKRCSKTPVQSQT	---ITN-LKAQLEI IWPVNLNRANNITFWETQ	112
Sd-RNase	MGNITGMIYMFTMVFSLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTPCNDREKLFVHGLWPSNKKGDPPEKCKNIQMSQK	---IGN-MAAQLEI IWPVNLNRDTHVGFWEERE	112
Se-RNase	MGITRMIYMVTMAFSLIVLILSSSTMG	YDYFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPTKLFVHGLWPSNSNGPDPVNCCKPKTKVPOAQQP	IDPSLKPQLEI IWPVNFNRADNESFWNKQ	116
Sg-RNase	MGIIGMIYMVMVFSLLIVLILSSSTVG	FDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNRNGPDPPEYCKNTTLDTVTK	---IGN-LQAQLEI IWPVNYDRTNVGFWSKQ	112
Sh-RNase	MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG	FDYFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPTDKLFTVHGLWPSNKGDPPEYCKI--RNPRK	---RAKKLEPQLEI IWPVNLDRTNHTGFWSRQ	111
Si-RNase	MGITGMIYIVTMVFSLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPTDKLFTVHGLWPSNLNGPHPENCTNATVNSHR	---IKN-IQAQLEI IWPVNLDRTNHLGFWNKQ	112
Sk-RNase	MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSA	VKFDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNVNGSDPKKCKATILNPQT	---ITD-LKAQLEI IWPVNLNRKAHVRFWRKQ	112
Sl-RNase	MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSA	AKYDYLQFTQQYQPAACKFHHTPCKDPDKLFTVHGLWPSNFNGPDPENCKVKPTASQT	---IDTSLKPQLEI IWPVNFNRADHESFWQKQ	113
Sm-RNase	MGITGIIYMVTMVFSLVVLIFSSSTVG	FDYFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPAKLFTVHGLWPSNWNLDPDFICKNTTITPQQ	---IGH-IQAQLEI IWPVNFNRNHLVFWNKQ	112
Sn-RNase	MGITGMIYIVTVFSLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCNSKPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNLNGPHPENCTNATVNSHR	---IKN-IQAQLEI IWPVNLDRTNHVGFWNKQ	112
Sp-RNase	MGITGMIYIVTMVFSLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPTDKLFTVHGLWPSNLNGPHANCTNATVNSHR	---IKN-IEAQLKI IWPVNLDRTNHVGFWNKQ	112
Sq-RNase	MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSA	VKFDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNVNGSDPKKCKTILKPRT	---IRN-LKAQLEI IWPVNSYSGSVRFWRKQ	112
Sr-RNase	MGITGMIHIVTMVFSLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCYFNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNLNGPHPENCTNATVNSQR	---ITN-IQAQLEI IWPVNLDRTNHVGFWNKQ	112
Ss-RNase	MGVGTGMTYMTMVFSLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCNDPTDKLFTVHGLWPSNRNGPDPPEKCKTTALNSQK	---IGN-MTAQLEI IWPVNLNRSDHVGFEKE	112
St-RNase	MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSA	AKYDYLQFTQQYQPAACNSHPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNVNGPDPENCKVKPTPSQT	---IDTSLKPQLEI IWPVNFNRADHESFWQKQ	113
	-----	-----	-----	
	Signal peptide	C1	C2	HV
	# *		*	*
Sa-RNase	WNBKHCSCGRPAIQNDMHYLQTVIKMYITQKQNVSEILSKAKIEPVGGRFWTQKEIEKAIKRGTNKPEKPKLKCQRNTQG	---TELVEVTICSDRNLKQFIDCPRPILNGSRYYCPTNNILY	228	
Sb-RNase	WDKHGSCASSPIQNTHTYFDTVIKMYITQKQNVSEILSKANIKPGRKSRRLVDIENAIRKVINNMTPKFKCQKNPRTSL	TELVEVGLCSDSNLTQFINCPHPFPQGSRYFCPTN-IQY	226	
Sc-RNase	WEKHGTCGGPTIQGDEHYFRTVIKMYITQKQNVSKILSKAKIEPEGKIWAREEIVKAIKRGSTDDKRPKPKCKKNTQN	---TELVEVTLCSDENLTQFINCPRPYPKGSRYFCP INGIQY	228	
Sd-RNase	WLKHGTCGYPTIKDKNHYLQTVIKMYITQKQNVSEILSKANIKPGRKSRRLVDIENAIRKVINNMTPKFKCQKNPRTSL	TELVEVGLCSDSNLTQFINCPHPFPQGSRYFCP INGIQY	227	
Se-RNase	WDKHGTCGYPTIKDKNHYLQTVIKMYITQKQNVSEILSKANINPDGIGRTRKLEIENAIRNGTNDKEPKLKCQKNNGT	---TELVEVSLCSNYLKGKHF INCPNKIPQGSRYFCP IKDIQY	232	
Sg-RNase	WAKHGICGSPTIQDDVNYLETVINMYITQKQNVSEILSKAKIEPEGKNRTRKDIVKAIKRGSTNGKRPKPKCKKNNRT	---TELVEVTLCSDRNLTRLINCPNLKPKSPYFCPLKSIHY	228	
Sh-RNase	WKKHGACGYPTIQENDYFETVIKMYITEKQNVSRILSNKAKIEPDGKSRALVDIENAIRNGTNNKPKLKCQKKNTRV	---TELVEITLCSDKNRAHFIDCPNPFPLGSPYLCPTNNIHY	227	
Si-RNase	WIKHGSCGNPPIIMNDTHYFQTVINMYITQKQNVSEILSKAKIEPLGIQRPLVDIENAIRNSINNKPKFKCQKNNGV	---TELVEISLCSDRSLTQFRDCPHFPFGSPYLCPA-DIQY	227	
Sk-RNase	WRKHGACGYPTIADDMHYFSTVIEMMYITKQNVSEILSKANIKPEGRFRTRDDIVNAISPSIDYKPKLCKINNQT	---TELVEVGLCSDDNLTQFINCPNPFQGSRYFCPTNNIHY	228	
Sl-RNase	WDKHGTCGSPTIIDKNHYFQTVIRMYITEKQNVSEILSKANINPDGKGRTRKDIQIAIRNSTNDKEPKLKCQTKNGI	---TELVEVSLCSNYLKGKHF INCPNKTPGKTRYSCPTNDIHY	229	
Sm-RNase	WNBKHCSCGYTTINDEIQYFETVIKMYITKQNVSEILSKAKIEPEGKNRTRTEIINAISISTNNMTPKFKCQKNNGT	---TELVEVTLCNDHNI TKFINCRHPYDPQSQFCPKINILY	228	
Sn-RNase	WIKHGSCGNPPIIMNDTHYFQTVINMYITQKQNVSEILSKAKIEPLGIQRPLVDIENAIRNSINNKPKFKCQKNNGV	---TELVEISLCSDRSLTQFRDCPHFPFGSPYLCPA-DIQY	226	
Sp-RNase	WIKHGSCGNPPIIMNDTHYFQTVINMYITKQNVSEILSKAKIEPVGKRLPLVDIENAIRNSINNKPKFKCQKNNRV	---TELVEISLCSDRSLTQFINCPNPFQGSRYFCPTNNIHY	227	
Sq-RNase	WRKHGTCGYPTIADDMHYFSTVIEMMYITKQNVSEILSKAKIEPEGKNRTRDDIVNAISQSIDDKPKLCKKNNNNI	---TELVEVGLCSDDNLTQFINCPHPFPQGSRYFCPTNNIHY	228	
Sr-RNase	WIKHGSCGNPPIIMNDTHYFQTVINMYITKQNVSEILSKAKIEPEGKNRTRKDIVKAIKRGSTNGKRPKPKCKKNNRT	---TELVEVTLCSDRNLTRLINCPNLKPKSPYFCPLKSIHY	228	
Ss-RNase	WLKHGTCGYPTIKDKNHYLQTVIRLYIQKQNVSEILSKAAIQPNGTNRPLVDIENAIRNGTNNKPKFKCQKNNRT	---TELVEVTLCSDRDLKFINCPHPFPQGSRYFCPTNNIHY	228	
St-RNase	WDKHGTCGSPTIIDKNHYFQTVIRMYITEKQNVSEILSKANINPDGGRTRKDIQIAIRNSTNDKEPKLKCQKKNNG	---TELVEVSLCSNYLKGKHF INCPNK-NPGSRYSCPTTKDIHY	229	
	-----	-----	-----	
	C3	RC4	C5	

図 3-2 17 種類のセイヨウナシ S-RNase の推定アミノ酸配列の比較

17 種類の S-RNase 間で保存されているアミノ酸残基を網掛けで示す。高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基、および、RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基をそれぞれ \* と # で記す。シグナルペプチド、超可変 (HV) 領域、保存領域 (C1, C2, C3, RC4 and C5) は下線により示す。イントロンの挿入部位は ▼ で示す。17 種類の S-RNase は下記の accession number で DDBJ に登録されている: Sa-RNase (AB236430), Sb-RNase (AB236429), Sc-RNase (AB258359), Sd-RNase (AB236427), Se-RNase (AB236428), Sg-RNase (AB258360), Sh-RNase (AB236431), Si-RNase (AB258361), Sk-RNase (AB236432), Sl-RNase (AB236425), Sm-RNase (AB258362), Sn-RNase (AB258363), Sp-RNase (AB258364), Sq-RNase (AB236424), Sr-RNase (AB236426), Ss-RNase (AB258365), St-RNase (AB258366)。

(a)			
Si-RNase. nt	ATGGGGATTACGGGGATGATATATATAGTTACGATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA	60	
Sn-RNase. nt	.....G.....G...		
Si-RNase. nt	TTGTCTTCTCTACGGTGGGATACGATTATTTCAATTTACACAGCAATATCAGCCAGCT	120	
Sn-RNase. nt	.....G.....		
Si-RNase. nt	GTCTGCAGATCTAATCCTACTCCTTGAAGGATCCTACTGACAAGTTATTTACGGTTCAC	180	
Sn-RNase. nt	.....AC..C..A.....C.....G..C.....		
Si-RNase. nt	GGTTTGTGGCCTTCAAACCTGAATGGACCTCACCCAGAAAATTGCACGAATGCAACCGTG	240	
Sn-RNase. nt	.....T.....		
Si-RNase. nt	AATTCTCACAGGATAAAAAATATCCAAGCCAGTTGAAAATTATTTGGCCGAACGTACTC	300	
Sn-RNase. nt	.....T.....		
Si-RNase. nt	GATCGAACCAATCATTTAGGCTTCTGGAATAAACAGTGGATAAAACATGGCAGCTGTGGC	360	
Sn-RNase. nt	.....G.....G		
Si-RNase. nt	AATCCGCCAATAATGAACGACACGCATTACTTTCAAACCGTAATCAACATGTACATAACC	420	
Sn-RNase. nt	.....CG.....A.....		
Si-RNase. nt	CAGAAAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCGAAGATTGAACCGTTGGGAATACAA	480	
Sn-RNase. nt	.....A.....		
Si-RNase. nt	AGGCCACTGGTGGATATTGAAAAGGCCATACGGAATAGTATCAACAAGAAGAAACCAAAA	540	
Sn-RNase. nt	.....C.....T.....C.....T.....G...		
Si-RNase. nt	TTCAAGTGCCAAAATAATGGTGGGGTGACAGAATTGGTTGAGATCAGTCTTTGTAGCGAT	600	
Sn-RNase. nt	.....G..TC.....T...A...G.....C.....		
Si-RNase. nt	CGCAGCTTAACGCAGTTCAGAGATTGCCCCACCCATTTCCACCAGGATCACCATTTCTC	660	
Sn-RNase. nt	.....A.....---		
Si-RNase. nt	TGCCCCGCCGATATTCAGTATTAA	684	
Sn-RNase. nt	..T.....		
(b)			
Si-RNase. aa	MGITGMIYIVTMVFSILVLIILSSSTVGYDYFQFTQQYQPAVCRSNPTPCKDPTDKLFTVH	60	
Sn-RNase. aa	.....V.....L.....N.K.....P.....	60	
Si-RNase. aa	GLWPSNLNGPHPENCTNATVNSHRIKNIQALQKI IWPVLDRTNHLGFWNKQWIKHGSCG	120	
Sn-RNase. aa	.....V.....	120	
	----- PS1 ----- PS2 -----		
Si-RNase. aa	NPPIMNDTHYFQTVINMYITQKQNVSEILSKAKIEPLGIQRPLVDIEKAIRNSINKKKPK	180	
Sn-RNase. aa	Y.A.....H..N....T.N....	180	
	----- PS2 ----- PS3 -----		
Si-RNase. aa	FKCQNGGVTELVEISLCSDRSLTQFRDCPHFPFPPGSPFLCPADIQY	227	
Sn-RNase. aa	....K.S.....V.....G.....N.....-.....Y.....	226	
	----- PS3 ----- PS4 -----		

図 3-3 Si-RNase と Sn-RNase の DNA (a) と推定アミノ酸 (b) の配列比較。  
 下線部はバラ科 S-RNase の Positive Selection (PS) 領域 (Ishimizu et al. 1998)。2 つの配列間で保存されている塩基およびアミノ酸残基を「・」で示す。赤色: HV 領域, 青色: 保存領域, 緑色: シグナルペプチド。

子は増幅されなかった (データ省略). また, cDNA の 5' および 3' 末端側非翻訳領域の配列に基づき設計したプライマー, 'SxUTRf1', 'SxUTRf2', 'SxUTRr1', 'SxUTRr2' を組み合わせた 4 種類のプライマーセット, 'SxUTRf1' と 'SxUTRr1', 'SxUTRf1' と 'SxUTRr2', 'SxUTRf2' と 'SxUTRr1', 'SxUTRf2' と 'SxUTRr2' を用いたゲノミック PCR でも, *Sx-RNase* の断片は増幅されなかった. これらの結果から, *Sx-RNase* 対立遺伝子のゲノム DNA からの増幅は困難であると判断した.

プライマーセット 'FTQQYQ' と 'EP-anti-IIWPNV2' によるゲノミック PCR で増幅できる 7 種類の *S-RNase* (*Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Ss-*, *St-RNase*) 対立遺伝子を加えた 17 種類の *S-RNase* 対立遺伝子を識別する CAPS マーカーシステムの開発を検討した. *Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Ss-*, *St-RNase* 対立遺伝子の PCR 増幅断片と cDNA 配列とを照合したところ, これら PCR 増幅断片には 1 つの対立遺伝子特異的な配列を持つイントロンが挿入されていた. PCR 増幅断片長とイントロン長は以下の通りに決定された (図 3-4~10); *Sc-RNase* 334 bp (イントロン 134 bp), *Si-RNase* 362 bp (同 177 bp), *Sm-RNase* 350 bp (同 150 bp), *Sn-RNase* 362 bp (同 162 bp), *Sp-RNase* 338 bp (同 138 bp), *Ss-RNase* 367 bp (同 167 bp), *St-RNase* 1,642 bp (同 1,439 bp). 1,906 bp, 1,642 bp, 1,414 bp, 998 bp, 440 bp の断片として増幅される *Sg-*, *St-*, *Sl-*, *Se-*, *Sb-RNase* 対立遺伝子はアガロースゲル電気泳動による識別が可能であった (図 3-11a). 約 1,300 bp 断片として増幅される *Sk-* および *Sq-RNase* は, 引き続き, 第 2 章で選択した制限酵素, *Bgl*III および *Hind*III による切断の有無で識別した (図 3-11b, c). *Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Ss-RNase* 対立遺伝子は *Sa-*, *Sd-*, *Sh-*, *Sr-RNase* 対立遺伝子とともに約 350 bp 断片として増幅されるので, これら対立遺伝子を断片長により識別することはできない. そこで 10 種類の約 350 bp 断片の塩基配列をもとに, *Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Ss-RNase* の増幅断片を特異的に切断する制限酵素を探索した. 第 2 章で選択した *Sa-*, *Sd-*, *Sh-*, *Sr-RNase* 断片をそれぞれ特異的に切断する制限酵素, *Sph*I, *Eco*O109I, *Bss*HII, *Bae*I は *Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Ss-RNase* の断片を切断しないことが確認されたので, 引き続き採用した (図 3-11d~g). *Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sp-*, *Ss-RNase* 断片の識別のために, 新たに 5 種類の制限酵素を選択した. *Bmg*BI は, *Sc-RNase* 断片のみを 222 bp と 112 bp の断片に切断した (図 3-11h, lane7, 10). *Bst*Z17I は, *Si-RNase* 断片を 214 bp と 148 bp の断片に切断したが (図 3-11i, lane8), 同時に *Se-RNase* 断片を 688 bp と 310 bp の断片に (図 3-11i, lane3, 4, 12, 13), *Sg-RNase* 断片を 1,612 bp, 198 bp, 96 bp の断片に切断した (図 3-11i, lane6). *Bse*RI は *Sm-RNase* 断片のみを 213 bp と 137 bp の断片に切断した (図 3-11j, lane9). *Bse*YI は *Sp-RNase* 断片のみを 221 bp と 117 bp の断片に切断した (図 3-11k, lane11). *Bss*SI は *Ss-RNase* 断片のみを 207 bp と 160 bp の断片に切断した (図 3-11l, lane12). *Sn-RNase* 断片の塩基配列には *Sn-RNase* 断片のみを特異的に切断する制限酵素の切断部位がなかったため, 選択した 11 種類

ATGGGGATTACGGGGATGATATATATGGTTCGACGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA	60
<u>M G I T G M I Y M V P T V F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCGTCCGCGGCGAAATACGATTATTTTCAA	120
<u>L S S S A A K Y D Y F Q F T Q Q Y Q P A</u>	40
GTCTGCAACTCTAATCCTACCCCTTGTAGCGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCAT	180
V C N S N P T P C S D P T D K L F T V H	60
GTTTGTGGCCCTTCAAAGTCGAGTGGACGTGATCCAAAAGATGCTCGAAAACACCCGTG	240
G L W P S K S S G R D P K R C S K T P V	80
CAGTCTCAGACG	300
gtaatattattaataatcagctagtcgatattgaatatttcatatata	84
Q S Q T	
cattgctaaatataatatttccatgtacacgtgtgcaaataattacaattaatcatagagtt	360
tttccattataatgtttacattgtcag-ATAACAAATCTCAAAGCCCAGTTGGA	419
I T N L K A Q L E I I	95
TGGCCGAA	479
ACTCAATCGAGCCAATAATATAACCTTCTGGGAAACACAGTGGGAAAAA	115
W P N V L N R A N N I T F W E T Q W E K	
CATGGCACCTGTGGGGGTCCCACAATACAGGGGGATGAGCATTACTTTTGAACAGTAATC	539
H G T C G G P T I Q G D E H Y F R T V I	135
AAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCTAAAATCCTCTCAAAGGCGAAGATAGAA	599
K M Y I T Q K Q N V S K I L S K A K I E	155
CCGGAGGGGAAAATCTGGGCACGGGAGGAAATTGTAAGCCATACGCCAAAGTACCGAT	659
P E G K I W A R E E I V K A I R Q S T D	175
GATAAGCGACCAAAACTCAAGTGCAAAAAGAATACACAGAATACTGAATTGGTTGAGGTC	719
D K R P K L K C K K N T Q N T E L V E V	195
ACTCTTTGCAGCGATGAAAACCTTAACCCAGTTCATAAATTGCCCCCGCCCATATCCAAAA	779
T L C S D E N L T Q F I N C P R P Y P K	215
GGATCACGATATTTCTGCCCCATCAATGGTATTTCAGTATTAA	821
G S R Y F C P I N G I Q Y *	228

図 3-4 *Sc-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258359).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■ がプライマーの 5' 側)を表す.

ATGGGGATTACGGGGATGATATATATAGTTACGATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA	60
<u>M G I T G M I Y I V T M V F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCCTCTACGGTGGGATACGATTATTTTCAA	120
<u>L S S S T V G Y D Y F Q F T Q Q Y Q P A</u>	40
GTCTGCAGATCTAATCCTACTCCTTGTAAAGGATCCTACTGACAAGTTATTTACGGTTCAC	180
V C R S N P T P C K D P T D K L F T V H	60
GGTTTGTGGCCTTCAAACCTGAATGGACCTCACCCAGAAAATTGCACGAATGCAACCGTG	240
G L W P S N L N G P H P E N C T N A T V	80
AATTCTCACAGGgtgaattctcacagggtaataattactgataatcagatagtcactattg	300
N S H R	84
tttatttcatttatttacttgtgtatacatataactcaacatagattttcatgcag	360
cgtgtgcaaatattgcaataaatttaaatttaatacataaatttacctatattatatta	
tattgtcagATAAAAAATATCCAAGCCCAGTTGAA	420
<u>I K N I Q A Q L K I I W P N V L D</u>	101
CGAACCAATCATTTAGGCTTCTGGAATAAACAGTGGATAAACATGGCAGCTGTGGCAAT	480
R T N H L G F W N K Q W I K H G S C G N	121
CCGCCAATAATGAACGACACGCATTACTTTCAAACCGTAATCAACATGTACATAACCCAG	540
P P I M N D T H Y F Q T V I N M Y I T Q	141
AAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCGAAGATTGAACCGTTGGGAATACAAAAGG	600
K Q N V S E I L S K A K I E P L G I Q R	161
CCACTGGTGGATATTGAAAAGGCCATACGGAATAGTATCAACAAGAAGAAACCAAAATTC	660
P L V D I E K A I R N S I N K K K P K F	181
AAGTGCCAAAATAATGGTGGGGTGACAGAATTGGTTGAGATCAGTCTTTGTAGCGATCGC	720
K C Q N N G G V T E L V E I S L C S D R	201
AGCTTAACGCAGTTCAGAGATTGCCCCACCCATTTCCACCAGGATCACCATTTCTCTGC	780
S L T Q F R D C P H P F P P G S P F L C	221
CCCGCCGATATTCAGTATTA	861
P A D I Q Y *	227

図 3-5 *Si-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258361).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に参与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■ がプライマーの 5' 側) を表す.

ATGGGGATTACGGGGATTATATATATATGGTTACGACGGTATTTTCATTAGTTGTATTAATA	60
<u>M G I T G I I Y M V T T V F S L V V L I</u>	20
TTCTCGTCGTCCACGGTTGGATTTCGATTATTTTCAA	120
<u>F S S S T V G</u> F D Y F Q F T Q Q Y Q P A	40
GCCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGGATCCTCCTGCCAAGTTGTTTACGGTTCAC	180
A C N S N P T P C K D P P A K L F T V H	60
GGTTTATGGCCTTCAAACCTGGAACCTACCCGACCCAATCTTCTGCAAGAATACAACCATT	240
G L W P S N W N L P D P I F C K N T T I	80
ACTCCTCAGCAGgtaatatattattaataatcagatagtcfaatattgtttatttcatataca	300
T P Q Q	84
cataaactcaacatagatTTTTcatgcacgcgtgtgcaaatattacaattaataaaaacatt	360
taatcatgatTTTTTTTTctattttataattatattgtcagATTGGACATATCCAAGCC	420
I G H I Q A	90
CAGTTGGA	480
Q L E I I W P N V F N R T N H L V F W N	110
AAACAGTGGAAACAAACATGGCAGCTGTGGGTATACCACAATAAATGACGAAATACAATAC	540
K Q W N K H G S C G Y T T I N D E I Q Y	130
TTCGAAACTGTTATCAAAATGTACATAACCAAGAAACAAAACGTCTCTAAAAATCCTCTCA	600
F E T V I K M Y I T K K Q N V S K I L S	150
AAGGCGAAGATTAACCGGAGGGGAAAAACAGGACACGGACGGAAATTATAAACGCCATA	660
K A K I K P E G K N R T R T E I I N A I	170
AGCATTAGTACCAACAATATGACACCAAAACTCAAGTGCCAAAAGAATAATGGGACGATT	720
S I S T N N M T P K L K C Q K N N G T I	190
GAATTGGTTGAGGTCACTCTTTGCAACGATCACAACATAACAAAATTCATAAATTGCCGT	780
E L V E V T L C N D H N I T K F I N C R	210
CACCCATATGACCCACAATCACAATTTTTCTGCCCAAAAATAAATATTCTATATTAG	837
H P Y D P Q S Q F F C P K I N I L Y *	228

図 3-6 *Sm-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258362).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■がプライマーの 5' 側) を表す.

ATGGGGATTACGGGGATGATATATATAGTTACGGTGGTATTTTCATTAATTGTATTGATA	60
<u>M G I T G M I Y I V T V V F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCCTCTACGGTGGGATACGATTATTTTCAA	120
<u>L S S S T V G Y D Y F Q F T Q Q Y Q P A</u>	40
GTCTGCAACTCCAAACCTACTCCTTGTAAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTCACGGTTCAC	180
V C N S K P T P C K D P P D K L F T V H	60
GGTTTGTGGCCTTCAAACCTGAATGGACCTCACCCAGAAAATTGCACTAATGCAACCGTG	240
G L W P S N L N G P H P E N C T N A T V	80
AATTCTCACAGGgtaatattactgataatcagatagtcactattgtttattttcatttatg	300
N S H R	84
tacttgtgtatatatacatataactcaacatagattttcatgcacgcgtgtccaaatatta	360
caataaatttaaatttaatacataaatttacttatatcatatatttatattgtcagATAAAA	420
I K	86
AATATCCAAGCCCAGTTGAA	480
N I Q A Q L K I I W P N V L D R T N H V	106
GGCTTCTGGAATAAACAGTGGATAAAACATGGCAGCTGTGGGTATCCCGCAATAATGAAC	540
G F W N K Q W I K H G S C G Y P A I M N	126
GACACGCATTACTTTCAAACAGTAATCAACATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCT	600
D T H Y F Q T V I N M Y I T Q K Q N V S	146
GAAACTCTCAAAGCGAAGATTGAACCGTTGGGAATACAAAGGCCACTGGTGCATATT	660
E I L S K A K I E P L G I Q R P L V H I	166
GAAAATGCCATACGGAATAGTACCAACAATAAGAAACCGAAATTCAAGTGCCAAAAGAAT	720
E N A I R N S T N N K K P K F K C Q K N	186
TCTGGGGTGA	780
S G V T E L V E V S L C S D G S L T Q F	206
AGAAATTGCCCCACCACCAGGATCACCATATCTCTGTCCC	840
R N C P H P P P G S P Y L C P A D I Q Y	226
TAA	843
*	226

図 3-7 *Sn-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258363).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 ( がプライマーの 5'側)を表す.

ATGGGGATTACGGGGATGATATATATTGTTACGATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA	60
<u>M G I T G M I Y I V T M V F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCCTCTACGGTGGGATACGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCAGCT	120
<u>L S S S T V G</u> Y D Y F Q F T Q Q Y Q P A	40
GTCTGCAGATCTAATCCTACTCCTTGTAAAGGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC	180
V C R S N P T P C K D P T D K L F T V H	60
GGTTTGTGGCCTTCAAATTTGAATGGACCTCACCCAGCAAATTGCACGAATGCAACCGTG	240
G L W P S N L N G P H P A N C T N A T V	80
AATTCTCACAGGgtaatattactgataatcagatagtcactattgtttatttcatttatg	300
N S H R	
Tacttctcaacatagattttcatgcacgcgtctgcaaataattacaataaatttaaattta	360
atcataaatttacctatatttatattgtcagATAAAAAATATCGAAGCCCAGTTGAAATT	420
I K N I E A Q L K I	94
ATTTGGCCGAACGTACTCGATCGAACCAACCATGTAGGCTTCTGGAATAAACAGTGGATA	480
I W P N V L D R T N H V G F W N K Q W I	114
AAACATGGCAGCTGTGGGAATCCTCCAATAATGAACGACACGCATTACTTTCAAACAGTA	540
K H G S C G N P P I M N D T H Y F Q T V	134
ATCAACATGTACATAACCCGAAACAAAACGTCTCTGGAATCCTCTCAAAGGCCGAAGATT	600
I N M Y I T R K Q N V S G I L S K A K I	154
GAACCAGTGGGGTTGAAAAGGCCACTGGTAGATATTGAAAATGCCATACGGAATAGTACC	660
E P V G L K R P L V D I E N A I R N S T	174
AACAATAAGAAACCAAATTCAGTGCCAAACGAAGAATAGGGTGACTGAATTGGTTGAG	720
N N K K P K F K C Q T K N R V T E L V E	194
ATCAGTCTTTGCAGCGATGGCAGCTTAACGCAGTTCATAAATTGCCCCGCCATTTC	780
I S L C S D G S L T Q F I N C P R P F P	214
CCAGGATCACCATTCTCTGCCCTGCCGATATTGAGTATTAA	822
P G S P F L C P A D I E Y *	227

図 3-8 *Sp-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258364).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■がプライマーの 5'側)を表す.

ATGGGAGTTACGGGGATGACGTATATGTTTACAATGGTATTTTCGTTAATTGTATTAATA	60
<u>M G V T G M T Y M F T M V F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCATCCACGGTGGGGTACGATTATTTTCAATTACGCAGCAATATCAGCCGGCC	120
<u>L S S S T V G Y D Y F Q F T Q Q Y Q P A</u>	40
GTATGCAACTCTAATCCTACTCATTGTAACGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC	180
V C N S N P T H C N D P T D K L F T V H	60
GGTTTGTGGCCTTCAAACAGAAATGGACCTGACCCAGAAAAATGTAAGACTACAGCCCTG	240
G L W P S N R N G P D P E K C K T T A L	80
AATTCTCAGAAGgtaatatattattaataatgagatggtcaatatgtttatttcatttatg	300
N S Q K	84
Cactcgtgtatatatagattacaataacttaacatagattttcatgcacgcctgtgcaaat	360
attacaattaattttaaaatttaacatgaattgtttctattacataattatattgtcag-	419
ATAGGAAATATGACAGCCCAATTGGAAATTATTTGGCCGAACGTCTCAATCGATCCGAT	479
I G N M T A Q L E I I W P N V L N R S D	104
CATGTAGGCTTCTGGGAAAAAGAGTGGATCAAACATGGCACCTGCGGGTATCCCACAATA	539
H V G F W E K E W I K H G T C G Y P T I	124
AAAGACGACATGCATTACTTACAAACGGTAATCAGACTGTACATAATCCAGAAACAAAAC	599
K D D M H Y L Q T V I R L Y I I Q K Q N	144
GTCTCTGCAATCCTCTCAAAGGCGGCGATTCAACCGAACGGGACAAAACAGGCCACTGGTG	659
V S A I L S K A A I Q P N G T N R P L V	164
GATATTGAAAATGCCATACGCCGTGGTACCAACAATACGAAACCAAAATTCAAGTGCCAA	719
D I E N A I R R G T N N T K P K F K C Q	184
AAGAATACTAGGACGACGACTGAATTGGTTGAGGTCCTCTTTGCAGTGATAGAGACTTA	779
K N T R T T T E L V E V T L C S D R D L	204
AAGAAGTTCATAAATTGCCCCACGGACCTCCACAAGGATCACGATTTTCTGCCCTCC	839
K K F I N C P H G P P Q G S R F S C P S	224
AGTGTTTCAGTATTAA	854
S V Q Y *	228

図 3-9 *Ss-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258365).  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に参与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■ がプライマーの 5' 側)を表す.

ATGGGGATCACGGGGATGATATATATGGTTACGATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATT	60
<u>M G I T G M I Y M V T M V F S L I V L I</u>	20
TTGTCTTCGTCTGCGGGCAAATACGATTATTTGCAA	120
<u>L S S S A A K Y D Y L Q F T Q Q Y Q P A</u>	40
GCCTGCAACTCTCACCCGACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTAC	180
A C N S H P T P C K D P P D K L F T V H	60
GGATTGTGGCCTTCAAACGTTAATGGACCTGACCCAGAAAAGTCAAGGTCAAACCCACG	240
G L W P S N V N G P D P E N C K V K P T	80
CCATCTCAAACG	300
<u>P S Q T</u> gtaatattattgataataagatagtcfaatattgttttaggaaaaattag	84
TataatgttcattgactgagatTTTTATTAGTTTTGATCGAAGTCACTATTGT	360
TGGTATATTAATTAGTCAATTCATAATTTCTTAAATAGAAAGTTTATTATATTAACA	420
CCTACAAATTTGTGAATAAACCTCATATACTTAATACACCCACATTTTCTTTTCAAT	480
TAAAAATTATCTTAATAAACCCACATACTTCCCATAACTCTCACACCCGAAATCT	540
CAATAACTCTTACATTTCTACATGCACCCATTTCTATTCAACCCATTTCTC	600
AAAGCTTATAAAGCTTTAATTTGGACAAAAATCCGACTGAAATTTGACAAAAGATGC	660
CGCTGAGATTTAAAGCATATGTGGTGTGTTTCAATTCACCATTA AACCTATGTCGT	720
CTGTTTTAACATTTGGTGGTAATTTAGGTGTTAACTCTTCATGTATCCCTGTGATC	780
CCTAAAAGATGAATATGAACATAGAAGCTTGATCGATGTTGCAAAATCACTAAAACAAC	840
AAAAAATAAATGTCTTGCTCATGTGGAGCTTCCAAAACATTAATTTGTATTTCAAT	900
CATAAAAAATAAATTTCTCAATTAACATGTTGTAGTTTCAATGGTTAGGGTTTTGTTT	960
AATAAGAGGCTCGGAGGGTTTTGATAGTTGAAGAAGATAAATAACGTTAAAAGTG	1020
ATTTGGGATGTATAAAGAAATTTTTATTTTTTTTTAAACCTAATAAGGTCCAAATGTCT	1080
ATTGTATAGTAGGGTAAATAAGTCATTTAATATTAATTTTAAATGTGGGTGCATCAAC	1140
ATTTGTGGGTGCTAATATAAAAAGCCAATAAAAATTAATAAATTAATTTAGGGTTTTA	1200
ATACTCACACTTACTAAACTCTTAAGTAATTTTGACTCAAAACATTTCCGAAAATAAAA	1260
AAAAAATAAAAATAAAAATAAGTTTGACTTATAATTTTTTCAAAAAGAGTTTTCAAA	1320
TTCTTAATCTTAAATGTACCAATTCATATTTTTTTTTTCAACAATAGATTTATGGGTTTT	1380
ATTTAAAATCTCATTAAATAAAACCCCCCAATTTTAAATTTTGATTTAAAATATAAT	1440
AACATACATAGAAATATATTATTACATTAATTCAGAGACTTCAAAAAAAAAATGAAAA	1500
ACCAACAAAGTTTCAGTTAAAGAACATTTATAATTAGGGACCGGATCCAAGTCTATTAT	1560
TTTTTTCATTTATGTACTTGTGTATATATACATATACACAACATAGATTTTCATGCACGC	1620
TGTGCAAAATATACAATCAATTTAAAATTTAATCATAAATATTTTTCTATTGTATATAT	1680
tatattttcag-ATAGATACATCACTCAAACCCAGTTGGA	1739
<u>I D T S L K P Q L E I I W P N V</u>	100
TTCAATCGAGCCGATCATGAAAGCTTCTGGCAAAAACAGTGGGACAAAACATGGCACCTGT	1799
F N R A D H E S F W Q K Q W D K H G T C	120
GGGTCTCCCACAATAATAGACAAGAACCATTACTTTGAAACAGTAATCAGAATGTACATA	1859
G S P T I I D K N H Y F E T V I R M Y I	140
ACCGAGAAGCAAAACGTCTCTTATATCCTATCCAAAAGCCAACATCAATCCGGATGGTAGA	1919
T E K Q N V S Y I L S K A N I N P D G R	160
GGCAGGACACGGAAGGATATTGAAAATTGCCATACGCAATAGTACCAACGATAAAGGAACCA	1979
G R T R K D I E I A I R N S T N D K E P	180
AAGCTCAAGTGCCAAAAAAGAAGAATGGGATAAATTGAATTGGTTGAGGTCTCTCTTTGC	2039
K L K C Q K K K N G I I E L V E V S L C	200
AGCAATTACTTAGGAAAAAATTTTCATAAATTTGCCCAACAAAAATCCAGGATCACGATAC	2099
S N Y L G K N F I N C P N K N P G S R Y	220
TCCTGTCCTACCAAAGATATCCATTATTA	2129
S C P T K D I H Y *	229

図 3-10 *St-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258366)。赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に参与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■がプライマーの 5' 側)を表す。

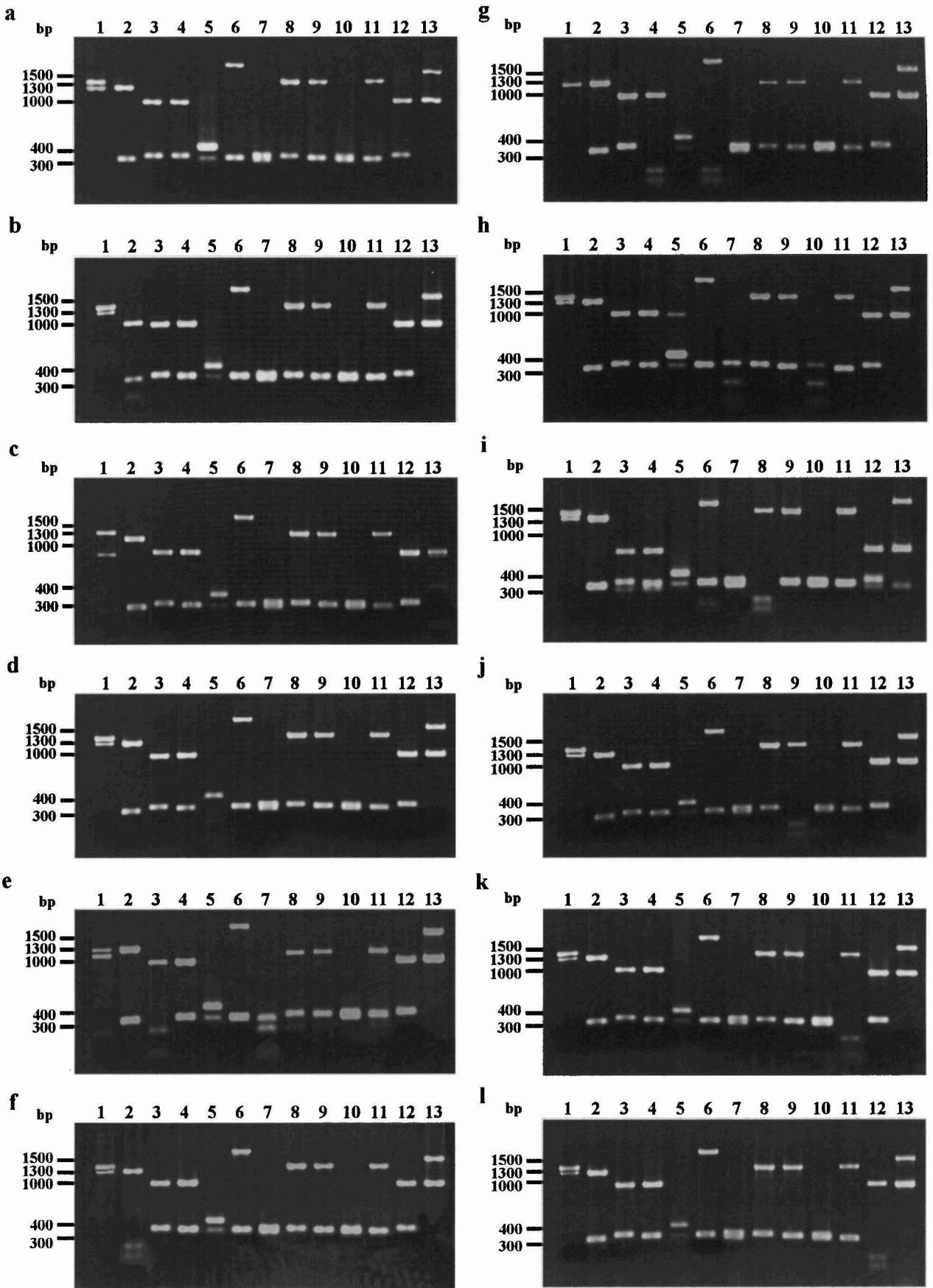


図3-11 ゲノミックPCRによる17種類の*S-RNase*対立遺伝子の増幅 (a)および11種類の制限酵素による切断 (b-l). *Bgl*II (b), *Hind*III (c), *Sph*I (d), *Eco*O109I (e), *Bss*HII (f), *Bae*I (g), *Bmg*BI (h), *Bst*Z171 (i), *Bse*RI (j), *Bse*YI (k), *Bss*SI (l). lane 1, 'General Leclerc' (*SISg*); lane 2, 'Winter Nelis' (*ShSk*); lane 3, 'Flemish Beauty' (*SdSe*); lane 4, 'La France' (*SeSr*); lane 5, 'Doyenné du Comice' (*SaSb*); lane 6, 'Passe Crassane' (*SgSr*); lane 7, 'Beurré Hardy' (*ScSd*); lane 8, 'Beurré de l'Assomption' (*SiSl*); lane 9, 'Chapin' (*SISm*); lane 10, 'Saint Mathieu' (*ScSn*); lane 11, 'Akça' (*SISp*); lane 12, 'Dana's Hovay' (*SeSs*); lane 13, 'Starking Delicious' (*SeSt*).

の制限酵素, *Bgl*III, *Hind*III, *Sph*I, *Bmg*BI, *Eco*O109I, *Bss*HII, *Bst*Z17I, *Bse*RI, *Bse*YI, *Bae*I, *Bss*SI のいずれによっても切断されないことで *Sn-RNase* 断片を識別することとし (図 3-11b-1, lane10), 約 350 bp 断片として増幅される 10 種類の *S-RNase* 対立遺伝子, *Sa-*, *Sc-*, *Sd-*, *Sh-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Sr-*, *Ss-RNase* 対立遺伝子の識別が可能になった。

以上の結果から, プライマー‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IWPNV2’を用いたゲノミック PCR および 11 種類の制限酵素 (*Bgl*III, *Hind*III, *Sph*I, *Bmg*BI, *Eco*O109I, *Bss*HII, *Bst*Z17I, *Bse*RI, *Bse*YI, *Bae*I, *Bss*SI)の処理からなる CAPS マーカーシステムを開発した。この CAPS マーカーシステムにより, 17 種類の *S-RNase* 対立遺伝子, *Sa-*, *Sb-*, *Sc-*, *Sd-*, *Se-*, *Sg-*, *Sh-*, *Si-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Sq-*, *Sr-*, *Ss-*, *St-RNase* 対立遺伝子を有する品種の *S* 遺伝子型を推定することが可能になった (表 3-8)。

### 交雑不和合性

本章では, 17 種類のセイヨウナシの *S-RNase* 対立遺伝子を持つ二倍体 81 品種の *S* 遺伝子型が推定された。第 2 章の日本の栽培品種も合わせると, 106 品種が 50 種類の *S* 遺伝子型に分類され, そのうち 22 種類には複数の品種が分類された (表 3-9)。

17 種類のセイヨウナシの *S-RNase* 対立遺伝子のうち 10 種類, *Sa*, *Sb*, *Sd*, *Se*, *Sg*, *Sh*, *Sk*, *Sl*, *Sq*, *Sr* 対立遺伝子から構成される *S* 遺伝子型に推定された品種間で交配を行ない, 結実率または Seeds/Flower から品種間の交雑不和合・和合を判定した。同じ推定 *S* 遺伝子型の組み合わせ, *SaSb* の‘Doyenné du Comice’と‘Abbé fetal’, *SaSg* の‘Triomphe de Vienne’と‘Charles Ernest’, *SaSl* の‘Marguerite Marillat’と‘Koonce’, *SbSe* の‘Highland’と‘California’, ‘Cascade’, *SbSl* の‘Beurré Jean Van Geert’と‘Joséphine de Malines’, *SbSr* の‘Condo’と‘Urbaniste’, *ScSe* の‘Beurré d’Anjou’と‘Moonglow’, *SeSg* の‘Beurré Superfin’と‘Orivier de Serres’, *SeSh* の‘Winter Cole’と‘El Dorado’, *SeSk* の‘Fondante Thirriot’と‘Packam’s Triumph’, *SeSl* の‘Ayers’と‘Bartlett’および‘Pera d’Agua’, *SeSq* の‘Pierre Cornelle’と‘Covert’, *SgSl* の‘Blickling’と‘Comte de Lambertye’, *SlSq* の‘General Leclerc’と‘Ovid’, *SlSr* の‘Bristol Cross’と‘Emile d’Heyst’で行なった他家受粉交配は, ‘Ayers’×‘Bartlett’の交配で Seeds/Flower が 0.1 となった以外は, 充実種子は形成されず, すべての組み合わせが交雑不和合と判定された (表 3-10)。

*Sx-RNase* cDNA がクローニングされた品種から, 同じ *S* 遺伝子型と推定された‘Beurré Bosc’ (*ShSx*)と‘Durondeau’ (*ShSx*)および‘Early Seckel’ (*SlSx*)と‘Marie Louise’ (*SlSx*)の交配を行なった (表 3-11)。2 年間行なった‘Beurré Bosc’ (*ShSx*)と‘Durondeau’ (*ShSx*)の正逆交雑, および, ‘Early Seckel’ (*SlSx*)×‘Marie Louise’ (*SlSx*)の交配は Seeds/Flower が 0.3 以下となり, いずれも交雑不和

表3-8 ゲノミックPCRにより増幅された17種類の*S-RNase*対立遺伝子の制限酵素断片長 (bp)

<i>S-RNase</i> 対立遺伝子	PCR増幅 断片長	イントロン	制限酵素											
			<i>Bgl</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Sph</i> I	<i>Bmg</i> BI	<i>Eco</i> O109I	<i>Bss</i> HIII	<i>Bst</i> Z17I	<i>Bse</i> RI	<i>Bse</i> YI	<i>Bae</i> I	<i>Bss</i> SI	
<i>Sa</i>	345	145	-	-	233, 112	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sb</i>	440	246	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sc</i>	334	134	-	-	-	222, 112	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sd</i>	369	169	-	-	-	-	260, 109	-	-	-	-	-	-	-
<i>Se</i>	998	786	-	-	-	-	-	-	688, 310	-	-	-	-	-
<i>Sg</i>	1,906	1,706	-	-	-	-	-	-	1,612, 198, 96	-	-	-	-	-
<i>Sh</i>	345	148	-	-	-	-	-	210, 135	-	-	-	-	-	-
<i>Si</i>	362	177	-	-	-	-	-	-	214, 148	-	-	-	-	-
<i>Sk</i>	1,274	1,074	1,022, 214, 38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sl</i>	1,414	1,211	-	-	-	-	1,149, 265	-	-	-	-	1,282, 99, 33	-	-
<i>Sm</i>	350	150	-	-	-	-	-	-	-	213, 137	-	-	-	-
<i>Sn</i>	362	162	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sp</i>	338	138	-	-	-	-	-	-	-	-	221, 117	-	-	-
<i>Sq</i>	1,283	1,083	-	960, 323	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sr</i>	353	153	-	-	-	-	-	-	-	-	-	195, 125, 33	-	-
<i>Ss</i>	367	167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	207, 160
<i>St</i>	1,642	1,439	-	933, 506, 194, 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : 制限酵素により切断されないPCR産物

表3-9 17種類の*S-RNase*対立遺伝子を識別するCAPSマーカーシステムにより識別される二倍体106品種の推定*S*遺伝子型

<i>S</i> 遺伝子型	品種	<i>S</i> 遺伝子型	品種
<i>SaSb</i>	Abbé fétal	<i>SeSg</i>	Beurré Superfin
	Doyenné du Comice		Orivier de Serres
<i>SaSc</i>	Roguered	<i>SeSh</i>	El Dorado
<i>SaSe</i>	Aurora		Winter Cole
	Docteur Jules Guyot	<i>SeSi</i>	Beurré Giffard
	Duchesse d'Angouleme		Summer Doyenne
	Harrow Crisp	<i>SeSk</i>	Fondante Thirriot
	Harrow Delight		Packam's Triumph
	Magness		Washington
	Rocha	<i>SeSl</i>	Ayers
	Tyson		Bartlett
<i>SaSg</i>	Charles Ernest		Délices d'Hardenpont
	Triomphede Vienne		Harvest Queen
<i>SaSl</i>	Harrow Sweet		Max Red Bartlett
	Koonce		Napoleon
	Marguerite Marillat		Pera d'Agua
	Pierre Tourasse		Rosired
<i>SaSg</i>	Beurré Clairgeau		Seckel
<i>SaSr</i>	Angelys		Seigneur d'Espéren
<i>SbSc</i>	Reimer red	<i>SeSm</i>	Colorée de Juillet
<i>SbSe</i>	Beurré Lubrum	<i>SeSq</i>	Besi de Saint-Waast
	California		Bon-Chretien d'Hiver
	Cascade		Covert
	Gorham		Pierre Cornelle
	Grand Champion	<i>SeSr</i>	Ballad
	Hartman		Doyenné d'hiver
	Highland		Idaho
	Howell		La France
<i>SbSg</i>	Glou Morceau		Verdi
<i>SbSk</i>	Alexandrine Douillard	<i>SeSs</i>	Dana's Hovay
<i>SbSl</i>	Beurré Jean Van Geert	<i>SeSt</i>	Old Home
	Canal Red		Starking Delicious
	Honey Sweet	<i>SgSl</i>	Blickling
	Joséphine de Malines		Comte de Lambertye
<i>SbSq</i>	Le Lectier	<i>SgSq</i>	President Héron
<i>SbSr</i>	Condo	<i>SgSr</i>	Passe Crassane
	Urbaniste		Silver Bell
<i>SbSt</i>	Turnbull Giant	<i>ShSk</i>	Winter Nelis
<i>ScSd</i>	Beurré Hardy	<i>ShSl</i>	Michaelmas Nelis
	Royal Red Hardy	<i>ShSm</i>	Garbar
<i>ScSe</i>	Beurré d'Anjou	<i>ShSq</i>	Fertility
	Moonglow	<i>SiSl</i>	Beurré de l'Assomption
	Red Anjou	<i>SkSl</i>	Santa Maria
<i>ScSh</i>	Nouveau Poiteau	<i>SkSr</i>	Ankara
<i>ScSl</i>	Ewart	<i>SISm</i>	Chapin
<i>ScSn</i>	Saint Mathieu	<i>SISp</i>	Akça
<i>SdSe</i>	Bautomne	<i>SISq</i>	General Leclerc
	Clapp's Favorite		Ovid
	Flemish Beauty	<i>SISr</i>	Bristol Cross
	Red Clapp's		Emile d'Heyst
<i>SdSl</i>	Doyenné Gris		Kieffer
<i>SdSq</i>	Devoe		Koshisayaka
<i>SdSr</i>	Conference	<i>SISs</i>	Comte de Flandre

赤字: 日本の栽培品種

表3-10 同じ推定S遺伝子型を持つ品種間の交雑不和合性の評価

種子親品種	S遺伝子型	花粉親品種	S遺伝子型	交配花数 (花)	結実率 (%)	Seeds /Flower	SI index
Doyenné du Comice	<i>SaSb</i>	Abbé fetal	<i>SaSb</i>	10	10.0	0.0	0.0
		La France	<i>SeSr</i>	10	80.0	5.4 <sup>z</sup>	
Abbé fetal	<i>SaSb</i>	Doyenné du Comice	<i>SaSb</i>	14	7.1	0.1	2.4
		La France	<i>SeSr</i>	15	66.7	4.2 <sup>z</sup>	
Triomphe de Vienne	<i>SaSg</i>	Charles Ernest	<i>SaSg</i>	26	15.4	0.0	0.0
		Blickling	<i>SgSl</i>	27	92.6	6.4 <sup>z</sup>	
Marguerite Marillat	<i>SaSl</i>	Koonce	<i>SaSl</i>	30	30.0	0.0	0.0
		Verdi	<i>SeSr</i>	30	95.0	4.2 <sup>z</sup>	
Highland	<i>SbSe</i>	California	<i>SbSe</i>	30	3.3	0.0	0.0
		Cascade	<i>SbSe</i>	29	0.0	0.0	0.0
		La France	<i>SeSr</i>	30	76.7	4.0 <sup>z</sup>	
Beurré Jean Van Geert	<i>SbSl</i>	Joséphine de Malines	<i>SbSl</i>	30	20.0	0.0	0.0
		Howell	<i>SbSe</i>	29	79.3	6.2 <sup>z</sup>	
Condo	<i>SbSr</i>	Urbaniste	<i>SbSr</i>	30	0.0	0.0	0.0
		Hartman	<i>SbSe</i>	30	60.0	5.1 <sup>z</sup>	
Beurré d'Anjou	<i>ScSe</i>	Moonglow	<i>ScSe</i>	10	0.0	0.0	0.0
		Beurré Superfin	<i>SgSe</i>	9	55.6	4.8 <sup>z</sup>	
Beurré Superfin	<i>SeSg</i>	Orivier de Serres	<i>SeSg</i>	30	0.0	0.0	0.0
		La France	<i>SeSr</i>	29	72.4	4.4 <sup>z</sup>	
Winter Cole	<i>SeSh</i>	El Dorado	<i>SeSh</i>	20	55.0	0.0	0.0
		Packam's Triumph	<i>SeSk</i>	11	100.0	3.6 <sup>z</sup>	
Fondante Thirriot	<i>SeSk</i>	Packam's Triumph	<i>SeSk</i>	30	6.7	0.1	1.2
		La France	<i>SeSr</i>	30	93.3	8.5 <sup>z</sup>	
Ayers	<i>SeSl</i>	Bartlett	<i>SeSl</i>	30	6.7	0.1	1.4
		Pera d'Agua	<i>SeSl</i>	30	0.0	0.0	
		Besi de Saint Waast	<i>SeSq</i>	30	80.0	7.2 <sup>z</sup>	
Pierre Cornelle	<i>SeSq</i>	Covert	<i>SeSq</i>	30	26.7	0.0	0.0
		La France	<i>SeSr</i>	30	93.3	6.0 <sup>z</sup>	
Blickling	<i>SgSl</i>	Comte de Lambertye	<i>SgSl</i>	30	0.0	0.0	0.0
		Beurré Superfin	<i>SgSe</i>	29	82.8	5.6 <sup>z</sup>	
General Leclerc	<i>SlSq</i>	Ovid	<i>SlSq</i>	29	89.7	0.0	0.0
		Le Lectier	<i>SbSq</i>	30	96.7	7.2 <sup>z</sup>	
Bristol Cross	<i>SlSr</i>	Emile d'Heyst	<i>SlSr</i>	30	3.3	0.0	0.0
		Seigneur d'Espéren	<i>SeSl</i>	30	90.0	8.3 <sup>z</sup>	

<sup>z</sup> SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

表3-11 *Sx-RNase* cDNAがクローニングされた品種の自家および他家受粉による結実率と種子数

種子親	<i>S</i> 遺伝子型	交配 年	花粉親	<i>S</i> 遺伝子型	交配 花数	結実率 (%)	Seeds /Flower	SI index
Beurré Bosc	<i>ShSx</i>	2005	Beurré Bosc	<i>ShSx</i>	5	0.0	0.0	0.0
			Durondeau	<i>ShSx</i>	5	0.0	0.0	0.0
			Winter Cole	<i>SeSh</i>	5	100.0	2.0 <sup>2</sup>	
		2006	Beurré Bosc	<i>ShSx</i>	5	40.0	0.0	0.0
			Durondeau	<i>ShSx</i>	5	75.0	0.0	0.0
			Chapin	<i>SISm</i>	5	40.0	0.2 <sup>2</sup>	
Durondeau	<i>ShSx</i>	2005	Durondeau	<i>ShSx</i>	5	20.0	0.0	0.0
			Beurré Bosc	<i>ShSx</i>	5	0.0	0.0	0.0
			El Dorado	<i>SeSh</i>	5	100.0	9.2 <sup>2</sup>	
		2006	Durondeau	<i>ShSx</i>	5	100.0	0.3	5.0
			Beurré Bosc	<i>ShSx</i>	5	100.0	0.3	5.0
			Chapin	<i>SISm</i>	5	100.0	6.0 <sup>2</sup>	
Early Seckel	<i>SISx</i>	2006	Early Seckel	<i>SISx</i>	5	20.0	0.8	44.4
			Marie Louise	<i>SISx</i>	5	0.0	0.0	0.0
			Chapin	<i>SISm</i>	5	20.0	1.8 <sup>2</sup>	
Beurré Bedford	<i>ShSx</i>	2006	Beurré Bedford	<i>ShSx</i>	5	0.0	0.0	0.0
			Fertility	<i>ShSq</i>	5	60.0	4.8 <sup>2</sup>	
Lincoln	<i>SbSx</i>	2006	Lincoln	<i>SbSx</i>	5	60.0	0.6	24.0
			Chapin	<i>SISm</i>	5	25.0	2.5 <sup>2</sup>	
Chapin	<i>SISm</i>	2006	Marie Louise	<i>SISx</i>	5	100.0	6.3	
			Lincoln	<i>SbSx</i>	5	40.0	1.8	
			Beurré Bosc	<i>ShSx</i>	5	60.0	5.6	
			Durondeau	<i>ShSx</i>	5	100.0	8.6	
Beurré Hardy	<i>ScSd</i>	2006	Early Seckel	<i>SISx</i>	5	100.0	8.2	

<sup>2</sup> SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

合と判定された。

### *Sx-RNase* の解析

*Sx-RNase* は、プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’、および、*Sx-RNase* 特異的プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EPSx-anti-IIWPNV’を用いたゲノミック PCR では増幅されなかった。しかし、プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いたゲノミック PCR を伸長時間 30 秒、99 サイクルで試行したところ、*Sx-RNase* の配列を持つ 197 bp の断片が増幅された (図 3-12)。この断片をゲルから抽出して塩基配列を決定したところ、ナシ亜科 *S-RNase* 対立遺伝子の HV 領域に挿入されているイントロンが存在せず、プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’で増幅された *Sx-RNase* cDNA 断片の配列と完全に一致した (図 3-13)。既に *S* 遺伝子型が推定されたセイヨウナシ品種、および、ニホンナシ品種、‘二十世紀’、‘豊水’、‘市原早生’、リンゴ品種、‘国光’、‘ゴールデン・デリシャス’、‘さんざ’、‘スターキング・デリシャス’、‘旭’、‘印度’のゲノム DNA を鋳型にして同じ条件で PCR を行なったところ、供試したすべての品種からも *Sx-RNase* の配列を有する 197 bp の断片が増幅された (図 3-12)。

*Sx-RNase* がクローニングされた‘Durondeau’の花柱、花卉、葯、葉の total RNA を鋳型に、*Sx-RNase* 特異的プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EPSx-anti-IIWPNV’を用いて RT-PCR を行なったところ、*Sx-RNase* は花柱のみならず、花卉と葯でも発現していた (図 3-14)。

### <考察>

CAPS マーカーシステム (第 2 章)を用いて二倍体 93 品種の *S* 遺伝子型を推定したが、22 品種からはセイヨウナシ (*P. communis*)の 10 種類の *Sa-*, *Sb-*, *Sd-*, *Se-*, *Sg-*, *Sh-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sq-*, *Sr-RNase* 対立遺伝子およびニホンナシ (*P. pyrifolia*)の 9 種類の *S-RNase* 以外の断片が検出され、*S* 遺伝子型を推定できなかった (表 3-5)。これら識別できなかったゲノミック PCR 断片の塩基配列は 7 種類に分類され、5 種類は推定 *Sc-*, *Si-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-RNase* 対立遺伝子の配列と一致していた。残り 2 種類は新規 *S-RNase* 対立遺伝子であると考えられ、*Ss-*および *St-RNase* 対立遺伝子と名付けた。RACE クローニングを用いて 7 種類の *S-RNase* cDNA 完全長塩基配列を決定した。これら 7 種類の *S-RNase* の推定アミノ酸配列には典型的なナシ亜科 *S-RNase* の一次構造と対立遺伝子特異性に関与する 1 つの HV 領域が確認された。*Sc-*, *Sm-*, *Sp-*, *Ss-*, *St-RNase* はそれぞれ 10 種類のセイヨウナシおよび 9 種類のニホンナシ *S-RNase* とは異なるアミノ酸配列の HV 領域を有していた

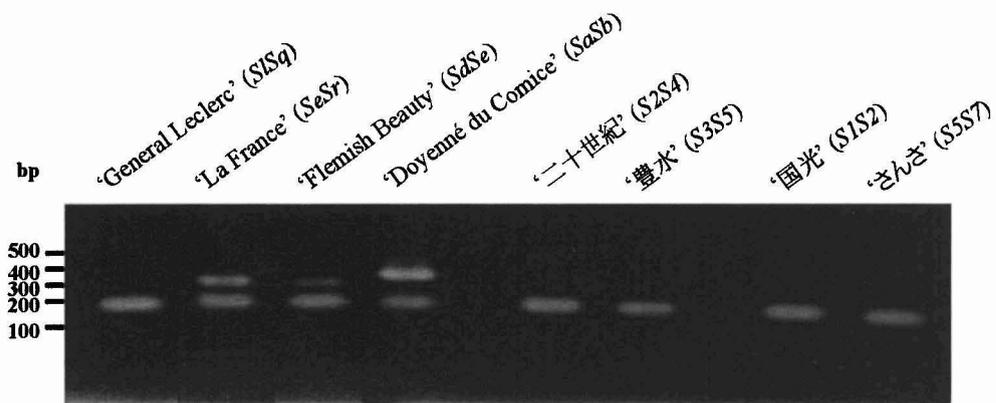


図3-12 プライマーセット'FTQQYQ'と'EPSx-anti-IIWPNV'を用いたゲノミックPCRによる*Sx-RNase*対立遺伝子の増幅.

ATGGGGATTACAGGGATGATCTCCATGGTTACGATGGTATTTTCATTACTTGTATTAATA	60
<u>M G I T G M I S M V T M V F S L L V L I</u>	20
TTGTCTTCGTCCACGGTGGGATTCGATTATTTTCAA	120
<u>L S S S T V G F D Y F Q F T Q Q Y Q P A</u>	40
GTCTGCAACTTTAATCCTACTCCATGTAAGGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC	180
V C N F N P T P C K D P T D K L F T V H	60
GGTTTGTGGCCTTCAAACAACGTAGGAGGTGACCCAGAATCTTGCAAGATAAGGAATCAT	240
G L W P S N N V G G D P E S C K I R N H	80
CGAGCGAGAGCAAAGGCACTCGAACCCAGTTGGA	300
R A R A K A L E P Q L E I I W P N V L D	100
CGAACCAATCATAACGCCTTCTGGCGTAGACAGTGGATAAAACATGGCACTTGTGGGTAT	360
R T N H T A F W R R Q W I K H G T C G Y	120
CCCACAATACAGAATGAGAATGATTACTTCGAAACAGTAGTCAAATGTACACAACCGAG	420
P T I Q N E N D Y F E T V V K M Y T T E	140
AAACAAAACGTCTCTAAAATCCTCTCAAGTGCAAAGATTGAACCGGACGGGATAAAAAGA	480
K Q N V S K I L S S A K I E P D G I K R	160
ACACTGGCGGACCTTGAAATTGCCATACGCAATGGTACCGACAACAAGAAACCAAATTC	540
T L A D L E I A I R N G T D N K K P K F	180
AAGTGCCAAAAGAAGAGAAGGGTACTGAATTAGTTGAGGTCACTCTTTGCAGCGATAAA	600
K C Q K K R R V T E L V E V T L C S D K	200
AACAGAGCACATTTTCATAGATTGCCCAACCCCTTTCAACCAGGATCACCATATTTATGC	660
N R A H F I D C P N P F Q P G S P Y L C	220
CCCACCAACAATATCCTGTATTA	684
P T N N I L Y *	227

図 3-13 *Sx-RNase* cDNA およびゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列。  
 赤色: HV 領域, 青色: システイン残基, 桃色: ヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (■がプライマーの5'側)を表す。

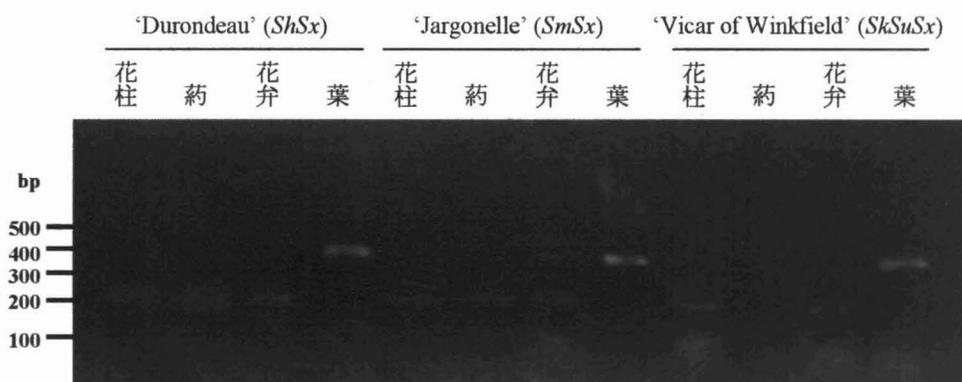


図3-14 プライマーセット'FTQQYQ'と'EPSx-anti-IIWPNV'を用いたRT-PCRによる*Sx-RNase*対立遺伝子の器官別の発現.

ことから、異なる対立遺伝子特異性を示すと考えられた。一方、Si-RNase と Sn-RNase は他の S-RNase とは異なるアミノ酸配列の HV 領域を有していたが、Si-RNase と Sn-RNase の HV 領域の推定アミノ酸配列は同一であった。Zisovich et al. (2004b)は、*Se-RNase* 対立遺伝子を有する自家不和合品種 3 品種、‘Forelle’ (*SeSn*)、‘Spadona’ (*SeSk*)、‘Gentile’ (*SeSi*)を用いて交配実験を行っている。HV 領域の配列が同じ Si-RNase と Sn-RNase が同じ認識特異性を示すならば、‘Forelle’ (*SeSn*)×‘Spadona’ (*SeSk*)は交雑和合、‘Forelle’ (*SeSn*)×‘Gentile’ (*SeSi*)は交雑不和合を示すと推測される。しかし、実際には、‘Forelle’ (*SeSn*)×‘Spadona’ (*SeSk*)および‘Forelle’ (*SeSn*)×‘Gentile’ (*SeSi*)の交配では、結実率がそれぞれ 32%と 78%を示し、果実当たり 5.2 個と 6.7 個の充実種子が含まれていたことから、どちらの組み合わせも交雑和合であると判定された。また、‘Forelle’ (*SeSn*)×‘Gentile’ (*SeSi*)の交雑後代 30 個体から *SeSi* 18 個体、*SiSn* 12 個体が分離したことから、雌しべの *Sn* ハプロタイプは *Si* ハプロタイプを持つ花粉を拒絶していないことが示され、Si-RNase と Sn-RNase が異なる認識特異性を持つことが明らかにされた。Ishimizu et al. (1998)は、ニホンナシの 7 種類の S-RNase とリンゴの 4 種類の S-RNase の同義置換と非同義置換を解析し、4 つの Positive Selection (PS)領域を見出し、この領域が自他認識に関与すると推測している (図 3-3b)。Si-および Sn-RNase の配列間には 19 アミノ酸残基の違いがあり、そのうち 10 アミノ酸残基は PS 領域に相当する部分に存在する。よって、HV 領域以外のアミノ酸残基により対立遺伝子特異性が制御されている可能性が示唆された。同じ HV 領域の推定アミノ酸配列を持つ Si-RNase と Sn-RNase が異なる対立遺伝子特異性を示したことから、17 種類のセイヨウナシ S-RNase は異なる対立遺伝子特異性を示すと考えられた。

プライマーセット‘FTQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いたゲノミック PCR により増幅される 17 種類の S-RNase 対立遺伝子を識別できる CAPS マーカーシステムの開発を試みた。*Sg-*、*St-*、*Sl-*、*Se-*、*Sb-RNase* 対立遺伝子は 1,906、1,642、1,414、998、440 bp に検出され、増幅断片長により識別できた。しかし、約 350 bp に検出される *Sc-*、*Si-*、*Sm-*、*Sn-*、*Sp-*、*Ss-RNase* 対立遺伝子の断片は *Sa-*、*Sd-*、*Sh-*、*Sr-RNase* 対立遺伝子とともに断片長による識別が困難であった。*Sc*、*Si*、*Sm*、*Sp*、*Ss* を識別するために、5 種類の制限酵素、*BmgBI*、*BstZ17I*、*BseRI*、*BseYI*、*BssSI* を新たに選択した。*Sn-RNase* 対立遺伝子の増幅断片を特異的に切断できる制限酵素がなかったため、約 350 bp 断片を識別する 9 種類の制限酵素、*BaeI*、*BmgBI*、*BseRI*、*BseYI*、*BssHIII*、*BssSI*、*BstZ17I*、*EcoO109I*、*SphI* および約 1.3 kb 断片を識別する 2 種類の制限酵素、*BgIII*、*HindIII* のいずれの制限酵素でも切断されないことにより、*Sn-RNase* 対立遺伝子を識別することとした。

最終的に、プライマーセット‘FTQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いたゲノミック PCR および

11 種類の制限酵素, *Bgl*III (*Sk* 特異的), *Hind*III (*Sq* 特異的), *Sph*I (*Sa* 特異的), *Bmg*BI (*Sc* 特異的), *Eco*O109I (*Sd* 特異的), *Bss*HII (*Sh* 特異的), *Bst*Z17I (*Si* 特異的), *Bse*RI (*Sm* 特異的), *Bse*YI (*Sp* 特異的), *Bae*I (*Sr* 特異的), *Bss*SI (*Ss* 特異的)による切断からなる CAPS マーカーシステムを確立し, 17 種類のセイヨウナシ *S-RNase* 対立遺伝子, *Sa-*, *Sb-*, *Sc-*, *Sd-*, *Se-*, *Sg-*, *Sh-*, *Si-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Sq-*, *Sr-*, *Ss-*, *St-RNase* 対立遺伝子の識別が可能になった (表 3-8). 11 種類の制限酵素のうち, *Hind*III は *Sk-RNase* 対立遺伝子断片に加えて *St-RNase* を, *Eco*O109I は *Sd-RNase* 対立遺伝子断片に加えて *Sl-RNase* 対立遺伝子断片を, *Bst*Z17I は *Si-RNase* 対立遺伝子断片に加えて *Se-*, *Sg-RNase* 断片を, *Bae*I は *Sr-RNase* 対立遺伝子断片に加えて *Sl-RNase* 対立遺伝子断片を切断した. *Se-*, *Sg-*, *Sl-*, *St-RNase* 対立遺伝子は各制限酵素が切断の対象としている *S-RNase* 対立遺伝子とは断片長が異なるため, *S-RNase* 対立遺伝子の識別には影響を与えない. ただし, *Bae*I はスター活性により *Sh-RNase* 断片を切断してしまう可能性があるため, *Bae*I により切断された *S-RNase* 断片については *Bss*HII 処理を行なうことが望ましい.

第2章で推定した日本の栽培品種を合わせると, 17 種類の *S-RNase* 対立遺伝子 (*Sa-*, *Sb-*, *Sc-*, *Sd-*, *Se-*, *Sg-*, *Sh-*, *Si-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Sq-*, *Sr-*, *Ss-*, *St-RNase* 対立遺伝子)の組み合わせからなる 106 品種の *S* 遺伝子型が推定された (表 3-9). これら品種の中には, 計画的な交配による交雑後代や自然交雑実生から育成された品種も多いので (Crawford 1996), 親品種の推定 *S* 遺伝子型と照会して品種の真偽を検討した (表 3-1). 枝変わり突然変異由来の 4 品種, ‘Grand Champion’ (*SbSe*) [‘Gorham’ (*SbSe*)の銹性枝変わり], ‘Red Clapp’s (Starkrimson)’ (*SdSe*) [‘Clapp’s Favourite’ (*SdSe*)の着色系枝変わり], ‘Red Anjou’ (*ScSe*) [‘Beurré d’Anjou’ (*ScSe*)の着色系枝変わり], ‘Royal Red Hardy’ (*ScSd*) [‘Beurré Hardy’ (*ScSd*)の着色系枝変わり]はそれぞれの変異親品種と同じ *S* 遺伝子型に推定された. 両親とされている品種の *S* 遺伝子型が推定された品種のうち 11 品種, ‘Aurora’ (*SaSe*) [‘Mar guerite Marillat’ (*SaSl*) × ‘Bartlett’ (*SeSl*)の交雑後代], ‘Angelys’ (*SaSr*) [‘Doyenné d’hiver’ (*SeSr*) × ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*)の交雑後代], ‘Bautomne’ (*SeSd*) [‘Conference’ (*SdSr*) × ‘Doyenné d’hiver’ (*SeSr*)の交雑後代], ‘Bristol Cross’ (*SlSr*) [‘Bartlett’ (*SeSl*) × ‘Conference’ (*SdSr*)の交雑後代], ‘California’ (*SbSe*)および‘Cascade’ (*SbSe*) [‘Max Red Bartlett’ (*SeSl*) × ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*)の交雑後代], ‘Condo’ (*SbSr*) [‘Conference’ (*SdSr*) × ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*)の交雑後代], ‘Gorham’ (*SbSe*) [‘Bartlett’ (*SeSl*) × ‘Joséphine de Malines’ (*SbSl*)の交雑後代], ‘Hartman’ (*SbSe*) [‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*) × ‘Max Red Bartlett’ (*SeSl*)の交雑後代], ‘Highland’ (*SbSe*) [‘Bartlett’ (*SeSl*) × ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*)の交雑後代], ‘Santa Maria’ (*SlSk*) [‘Bartlett’ (*SeSl*) × ‘Coscia’ (*SbSk*, Zisovich et al. 2004a)の交雑後代]は種子親および花粉親から 1 つ

ずつ *S-RNase* 対立遺伝子を受け継いでおり, *S* 遺伝子型に矛盾は見られなかった.

花粉親の *S* 遺伝子型が推定されていない 7 品種のうち 6 品種, ‘Covert’ (*SeSq*) [‘Bartlett’ (*SeSl*) × ‘Dorset’], ‘Harrow Crisp’ (*SaSe*) [‘Bartlett’ (*SeSl*) × ‘US56112-146’], ‘Harrow Sweet’ (*SaSl*) [‘Bartlett’ (*SeSl*) × ‘Purdue 80-51’], ‘Honey Sweet’ (*SbSl*) [‘Seckel’ (*SeSl*) × ‘U.S. 220’ (‘Vermont Beauty’ × ‘Roi Charles de Wurtemberg’)], ‘Ovid’ (*SlSq*) [‘Bartlett’ (*SeSl*) × ‘Dorset’], ‘Roguered’ (*SaSc*) [‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*) × (‘Seckel’ (*SeSl*) × ‘Farmingdale seedling 122’) の交雑後代] は種子親由来の *S-RNase* 対立遺伝子を有していた. ‘Covert’ と ‘Ovid’ の花粉親はどちらも ‘Dorset’ であることから, ‘Dorset’ が *Sq-RNase* 対立遺伝子を有することは確実であると考えられた.

種子親の *S* 遺伝子型が推定されていない 5 品種のうち 4 品種, ‘Harrow Delight’ (*SaSe*) [(‘Old Home’ (*SeSl*) × ‘Early Sweet’) × ‘Bartlett’ (*SeSl*)], ‘Harvest Queen’ (*SeSl*) [‘Michigan 572’ (‘Barseck’ × ‘Bartlett’ (*SeSl*)) × ‘Bartlett’ (*SeSl*)], ‘Magness’ (*SaSe*) [‘Seckel’ (*SeSl*) の自然交雑実生 × ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*)], ‘Packam's Triumph’ (*SeSk*) [‘Uvedale St. Germain’ (‘Bella Angevina’ × ‘Bartlett’ (*SeSl*)) × ‘Bartlett’ (*SeSl*)] は花粉親品種の *S-RNase* 対立遺伝子のうちの 1 つを受け継いでいた.

自然交雑実生とされる品種のうち 7 品種, ‘Beurré Clairgeau’ (*SaSq*) [‘Duchesse d'Angouleme’ (*SaSe*) の自然交雑実生], ‘Chapin’ (*SlSm*) [‘Seckel’ (*SeSl*) の自然交雑実生], ‘Comte de Lambertye’ (*SgSl*) [‘Beurré Superfin’ (*SeSg*) の自然交雑実生], ‘Devoe’ (*SaSq*) [‘Clapp's Favorite’ (*SaSe*) の自然交雑実生], ‘El Dorado’ (*SeSh*) [‘Bartlett’ (*SeSl*) の自然交雑実生], ‘Michaelmas Nelis’ (*ShSl*) および ‘Winter Cole’ (*SeSh*) [‘Winter Nelis’ (*ShSk*) の自然交雑実生] はそれぞれの種子親から 1 つの *S-RNase* 対立遺伝子を受け継いでいた.

一方, 7 品種は, 交配親品種の組み合わせからは生じない *S* 遺伝子型を有していた. ‘Ayers’ (*SeSl*) は ‘Garbar’ (*ShSm*) × ‘Beurré d'Anjou’ (*SeSe*) の交雑後代とされているが, ‘Garbar’ 由来の *S-RNase* 対立遺伝子を持たない. ‘Canal Red’ (*SbSl*) は ‘Forelle’ (*SeSn*) × ‘Max Red Bartlett’ (*SeSl*) の交雑後代とされているが, ‘Forelle’ 由来の *S-RNase* 対立遺伝子を持たない. よって, ‘Ayers’ と ‘Canal Red’ の種子親は記載されている品種とは異なる可能性が示唆された. ‘Dana's Hovay’ (*SeSs*) は ‘Seckel’ (*SeSl*) × ‘Winter Nelis’ (*ShSk*) の交雑後代とされているが, ‘Winter Nelis’ 由来の *S-RNase* 対立遺伝子を持たない. ‘Reimer Red’ (*SbSc*) は ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*) × ‘Max Red Bartlett’ (*SeSl*) の交雑後代とされているが, ‘Max Red Bartlett’ 由来の *S-RNase* 対立遺伝子を持たない. ‘Pierre Cornelle’ (*SeSq*) は ‘Beurré Diel’ (*SbSeSv*) × ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*) の交雑後代とされているが, ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*) 由来の *S-RNase* 対立遺伝子を持たない. よって, ‘Dana's Hovay’, ‘Reimer Red’, ‘Pierre Cornelle’ の花粉親は記載されている品種とは異なる可能性が示唆

された。‘Clapp’s Favorite’ (*SdSe*)は‘Flemish Beauty’ (*SdSe*)×‘Bartlett’ (*SeSl*)の交雑後代とされているが、この組み合わせでは遺伝子型 *SdSe* の後代は生じない。種子親と花粉親が入れ替わって記録されている、もしくは、どちらかが間違っている可能性が考えられた。‘Le Lectier’ (*SbSq*) [‘Bartlett’ (*SeSl*)×‘Bergamotte Fortunee’の交雑後代]は花粉親の *S* 遺伝子型が不明であるが、少なくとも‘Bartlett’が種子親でないことが示された。‘Verdi (Sweet Blush)’ (*SeSr*) [‘Louise Bonne d’Avranches’×‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*)]は種子親の *S* 遺伝子型が推定されていないが、‘Doyenné du Comice’は花粉親でないと推測された。

本章および第2章の結果、品種の由来が記載されている45品種のうち36品種において、両親と後代品種間の *S* 遺伝子型に矛盾が見られなかったことから、*S-RNase* が対立遺伝子として交配親から遺伝していることが確認された。一方、残り9品種では事実と異なる交配親品種が記載されていると考えられる。

*S* 遺伝子型の推定により、いくつかの異名同種や同名異種も明らかになった。盛岡に栽植されていた‘Easter Beurre’は果実の形などから‘Easter Beurre’ではなく‘Besi de Saint-Waast’であるとみられたが、推定 *S* 遺伝子型が‘Besi de Saint-Waast’と一致したことから、同名異種であると考えられた。また、実験当初盛岡には、‘California’とされている樹が2本栽植されていたが、両樹の推定 *S* 遺伝子型が異なったことから、交配親品種の *S* 遺伝子型と矛盾する片方の樹が誤って‘California’とされていることが明らかになった。さらに、盛岡の‘Duchesse d’Angouleme’は文献にある収穫時期や果実形質と異なっていることに加え、推定 *S* 遺伝子型 *SeSs* も‘Duchesse d’Angouleme’の自然交雑実生とされる‘Beurré Clairgeau’の遺伝子型が *SaSq* と矛盾したことから、同名異種が疑われた。山形県農業総合研究センターの栽植樹から神戸大学圃場に接ぎ木された‘Duchesse d’Angouleme’の *S* 遺伝子型が *SaSe* と推定され、‘Beurré Clairgeau’の推定 *S* 遺伝子型、*SaSq* と矛盾が生じなかったことから、盛岡の樹が同名異種であることが示され、‘Duchesse d’Angouleme’の正しい *S* 遺伝子型が *SaSe* であることが明らかになった。

いくつかの品種の *S* 遺伝子型は、起源を同じくするナシ属 (*Pyrus*)の種間交雑の容易さ、様々なナシ属種の交配から生じたセイヨウナシの種形成の背景、現在の育種にも用いられる種間雑種からの品種形成の様子を表した。チュウゴクナシ (*P. pyrifolia*)との種間雑種とされる品種の *S* 遺伝子型は、‘Frontier’(*SePpSS*)、‘Kieffer’ (*SlSr*)、‘Ayers’(*SeSl*)、‘Pera d’Agua’(*SeSl*)と推定され、‘Frontier’でのみニホンナシで同定されている *S5-RNase* が検出された。‘Kieffer’ (*P. pyrifolia*×‘Bartlett’ (*SeSl*))からは *Sl*-および *Sr-RNase* 対立遺伝子が検出されたので、花粉親が‘Bartlett’であることに矛盾はないと推測され、種子親となった品種はセイヨウナシの *S-RNase* 対立遺伝子を

共有する *P. pyrifolia* であると考えられた。‘Garbar’ (*P. pyrifolia* × *P. communis*) と ‘Pera d’Agua’ (交配親不明) からはそれぞれ *Sh*-および *Sm-RNase* 対立遺伝子と *Se*-および *Sl-RNase* 対立遺伝子が増幅されたことから、両品種の交配親となったチュウゴクナシ (*P. pyrifolia*) もセイヨウナシの *S-RNase* 対立遺伝子を有すると推測される。 *S* 遺伝子型から ‘Garbar’ を交配親に持たないと考えられた ‘Ayers’ (*SeSl*) は、セイヨウナシの *S-RNase* 対立遺伝子を有する別のチュウゴクナシ、もしくは、セイヨウナシ品種間の交雑後代と推測される。一方、種間雑種とされていなかった ‘Fondante de Charneu’ (*SlPpS2*) と ‘Fame’ (*SrPpS4*) の 2 品種からもニホンナシの *S-RNase* が検出された。今後、品種の *S* 遺伝子型を推定する際に、ニホンナシ *S-RNase* が検出される可能性も十分考えられる。

‘Conference’ の *S* 遺伝子型は、第 2 章の推定 (*SdSr*) と国外の推定 (*SdSh*) とが一致しなかった。本章では ‘Conference’ が育種親になった品種の *S* 遺伝子型を推定した。 ‘Bristol Cross’ (*SlSr*) の *Sl-RNase* 対立遺伝子は種子親である ‘Bartlett’ (*SeSl*) に、 *Sr-RNase* 対立遺伝子は花粉親である ‘Conference’ (*SdSr*) に由来するとみられた。 ‘Condo’ (*SbSr*) の *Sr-RNase* 対立遺伝子は種子親である ‘Conference’ (*SdSr*) に、 *Sb-RNase* 対立遺伝子は花粉親である ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*) に由来すると考えられた。 ‘Bautomne’ (*SdSe*) の *Sd-RNase* 対立遺伝子は種子親である ‘Conference’ (*SdSr*) に、 *Se-RNase* 対立遺伝子は花粉親である ‘Doyenné d’hiver’ (*SeSr*) に由来するとみられた。これら 3 品種の親子関係と推定 *S* 遺伝子型に基づき、正しい ‘Conference’ の *S* 遺伝子型は、CAPS マーカーシステムにより推定された *SdSr* であると結論づけた。

Modlibowska (1945) が交雑不和合組み合わせとして挙げた 7 種類のうち、 ‘Belle Lucrative (Seigneur d’Espéren)’ × ‘Louise Bonne de Jersey (Loise Bonne d’Avranches)’、 ‘Belle Lucrative’ × ‘Seckel’、 ‘Louise Bonne de Jersey’ × ‘Seckel’、 ‘Louise Bonne de Jersey’ × ‘William’s Bon Chrétien (Bartlett)’、 ‘William’s Bon Chrétien’ × ‘Seckel’ の 5 種類は二倍体品種同士の交配である。 ‘Belle Lucrative (Seigneur d’Espéren)’、 ‘Seckel’、 ‘William’s Bon Chrétien (Bartlett)’ の *S* 遺伝子型が *SeSl* であることから、 ‘Belle Lucrative’ × ‘Seckel’ および ‘William’s Bon Chrétien’ × ‘Seckel’ が交雑不和合を示すことと推定 *S* 遺伝子型が一致した。 ‘Louise Bonne de Jersey (Loise Bonne d’Avranches)’ の遺伝子型も *SeSl* であると推測され、 ‘Verdi (Sweet Blush)’ (*SeSr*) [ ‘Louise Bonne d’Avranches’ × ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*) ] に *Se-RNase* 対立遺伝子が遺伝していると考えられる。

第 2, 3 章で供試した二倍体 118 品種のうち、 106 品種は 17 種類のセイヨウナシ *S-RNase* 対立遺伝子の組み合わせからなる 50 種類の *S* 遺伝子型に分類され、 そのうち 22 種類の *S* 遺伝子型には複数の品種が分類された (表 3-9)。 同じ推定 *S* 遺伝子型の品種間での交配はすべて交雑不

和合を示した (表 3-10). このことは, セイヨウナシの雌しべ側 *S* 遺伝子産物が S-RNase であることを改めて証明するとともに, CAPS マーカーシステムによる *S* 遺伝子型推定の信頼性を裏付けると考えられる.

また, 118 品種に, ‘Coscia’や‘Forelle’など国外でゲノミック PCR により推定された 8 品種 (Zisovich et al. 2002a)を加えた 126 品種の解析の結果から, 世界各国で栽培されている多くの主要品種の *S* 遺伝子型が推定された (表 3-12). ヨーロッパ諸国の主要品種は, イタリアの‘Abbé fetal’ (*SaSb*), ‘William’s Bon Chrétien (Bartlett)’ (*SeSl*), ‘Conference’ (*SdSr*), ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*), ‘Beurré Bosc’ (*ShSx*), ‘Coscia’ (*SbSk*), フランスの‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Docteur Jules Guyot (Precoce)’ (*SaSe*), ‘Conference’ (*SdSr*), ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*), ‘Passe Crassane’ (*SgSr*), スペインの‘Coscia’ (*SbSk*), ‘Docteur Jules Guyot (Precoce)’ (*SaSe*), ポルトガルの‘Rocha’ (*SaSe*), イギリスの‘Conference’ (*SdSr*), ‘Bartlett’ (*SeSl*), ドイツの‘Conference’ (*SdSr*), ‘Fondante de Chameu’ (*SIPpS2*), ‘Clapp’s Favourite’ (*SdSe*), オランダの‘Conference’ (*SdSr*), ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*), ベルギーの‘Durondeau’ (*ShSx*), デンマークの‘Clara Frijs’ (*SeSx*), スウェーデンの‘Clara Frijs’ (*SeSx*), ‘Conference’ (*SdSr*), ブルガリアの‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Beurré Bosc’ (*ShSx*), ‘Clapp’s Favourite’ (*SdSe*), ‘Beurré Hardy’ (*ScSd*), ポーランドの‘Clapp’s Favourite’ (*SdSe*), ‘Conference’ (*SdSr*), ‘General Leclerc’ (*SISq*), ロシアの‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Flemish Beauty’ (*SdSe*), ‘Beurré Bosc’ (*ShSx*), ‘Kieffer’ (*SISr*), セルビアの‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Passe Crassane’ (*SgSr*), ギリシャの‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Passe Crassane’ (*SgSr*), トルコの‘Akça’ (*SISp*), ‘Ankara’ (*SkSr*), ‘Santa Maria’ (*SkSl*)と推定された. ヨーロッパ以外の主要生産国の栽培品種は, アメリカの‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Beurré d’Anjou’ (*ScSe*), ‘Beurré Bosc’ (*ShSx*), ‘Forelle’ (*SeSn*), カナダの‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Beurré Bosc’ (*ShSx*), ‘Beurré d’Anjou’ (*ScSe*), アルゼンチンの‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Packham’s Triumph’ (*SeSk*), ‘Beurré d’Anjou’ (*ScSe*), チリの‘Packham’s Triumph’ (*SeSk*), ‘Beurré Bosc’ (*ShSx*), オーストラリアの‘Packham’s Triumph’ (*SeSk*), ‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Beurré Bosc’ (*ShSx*), ニュージーランドの‘Packham’s Triumph’ (*SeSk*), ‘Winter Nelis’ (*ShSk*) ‘Winter Cole’ (*SdSh*), 南アフリカの‘Packham’s Triumph’ (*SeSk*), ‘Forelle’ (*SeSn*)と推定された.

また, 多くの新品種の推定 *S* 遺伝子型も決定された. 主要品種間の交雑から育成された品種は, 日本の栽培品種でもある‘Aurora’ (*SaSe*), ‘Bautomne’ (*SdSe*), ‘California’ (*SbSe*), ‘Devoe’ (*SdSq*), ‘El Dorado’ (*SeSh*)に加えて, ‘Angelys’ (*SaSr*), ‘Bristol Cross’ (*SISr*), ‘Condo’ (*SbSr*), ‘Canal Red’ (*SbSl*), ‘Cascade’ (*SbSe*), ‘Gorham’ (*SbSe*), ‘Hartman’ (*SbSe*), ‘Highland’ (*SbSe*), ‘Reimer Red’ (*SbSc*), ‘Rogue Red’ (*SaSc*)の *S* 遺伝子型が推定された. 火傷病抵抗性品種では, ‘Garbar’ (*ShSm*), ‘Ayres

表3-12 セイヨウナシ126品種の推定S遺伝子型

S遺伝子型	品種	S遺伝子型	品種	S遺伝子型	品種
<i>SaSb</i>	Abbé fétal	<i>SdSe</i>	Bautomme	<i>SgSl</i>	Blickling
	Doyenné du Comice		Clapp's Favorite		Comte de Lambertye
<i>SaSc</i>	Roguered		Flemish Beauty	<i>SgSq</i>	President Héron
	Eletta Morettini *		Red Clapp's	<i>SgSr</i>	Passe Crassane
<i>SaSe</i>	Aurora	<i>SdSl</i>	Doyenné Gris		Silver Bell
	Docteur Jules Guyot	<i>SdSq</i>	Devoe	<i>ShSk</i>	Winter Nelis
	Duchesse d'Angouleme	<i>SdSr</i>	Conference	<i>ShSl</i>	Michaelmas Nelis
	Harrow Crisp	<i>SeSg</i>	Beurré Superfin	<i>ShSm</i>	Garbar
	Harrow Delight		Orivier de Serres	<i>ShSq</i>	Fertility
	Magness	<i>SeSh</i>	El Dorado	<i>SiSl</i>	Beurré de l'Assomption
	Rocha		Winter Cole	<i>SkSl</i>	Santa Maria
	Tyson	<i>SeSi</i>	Beurré Giffard		Spadochia **
<i>SaSg</i>	Charles Ernest		Summer Doyenne	<i>SkSr</i>	Ankara
	Triomphe de Vienne		Gentile **	<i>SlSm</i>	Chapin
<i>SaSl</i>	Harrow Sweet	<i>SeSk</i>	Fondante Thirriot	<i>SlSp</i>	Akça
	Koonce		Packam's Triumph	<i>SlSq</i>	General Leclere
	Marguerite Marillat		Washington		Ovid
	Pierre Tourasse		Spadona **	<i>SlSr</i>	Bristol Cross
<i>SaSg</i>	Beurré Clairgeau	<i>SeSl</i>	Ayers		Emile d'Heyst
<i>SaSr</i>	Angelys		Bartlett		Kieffer
<i>SbSc</i>	Reimer Red		Délices d'Hardenpont		Koshisayaka
<i>SbSe</i>	Beurré Lubrum		Harvest Queen	<i>SlSs</i>	Comte de Flandre
	California		Max Red Bartlett	<i>SmSo</i>	Lawson
	Cascade		Napoleon	<i>SaSx</i>	Lincoln
	Gorham		Pera d'Agua	<i>SeSx</i>	Clara Frijs
	Grand Champion		Rosired	<i>ShSx</i>	Beurré Bedford
	Hartman		Seckel		Beurré Bose
	Highland		Seigneur d'Espéren		Durondeau
	Howell		Bon Rouge **	<i>SgSx</i>	Beurré Dumont
<i>SbSg</i>	Glou Morceau	<i>SeSm</i>	Colorée de Juillet	<i>SlSx</i>	Early Seckel
<i>SbSk</i>	Alexandrine Douillard	<i>SeSn</i>	Forelle **		Marie Louise
	Coscia **	<i>SeSq</i>	Besi de Saint-Waast	<i>SrSx</i>	Saint Germain
<i>SbSl</i>	Beurré Jean Van Geert		Bon-Chretien d'Hiver	<i>SePpS5</i>	Frontier
	Canal Red		Covert	<i>SIPpS2</i>	Fondante de Charneu
	Honey Sweet		Pierre Cornelle	<i>SrPpS4</i>	Fame
	Joséphine de Malines	<i>SeSr</i>	Ballad		
<i>SbSq</i>	Le Lectier		Doyenné d'hiver		
<i>SbSr</i>	Condo		Idaho		
	Urbaniste		La France		
<i>SbSt</i>	Turnbull Giant		Verdi		
<i>ScSd</i>	Beurré Hardy	<i>SeSs</i>	Dana's Hovay		
	Royal Red Hardy	<i>SeSt</i>	Old Home		
<i>ScSe</i>	Beurré d'Anjou		Starking Delicious		
	Moonglow				
	Red Anjou				
<i>ScSh</i>	Nouveau Poiteau				
<i>ScSl</i>	Ewart				
<i>ScSn</i>	Saint Mathieu				

赤: 日本の主要栽培品種, 紫: *Sx-RNase*の発現が確認された品種, 緑: ニホンナシの*S-RNase*を持つ品種,  
\*: Zuccherelli et al. 2002aによる推定, \*\*: Zisovich et al. 2004aによる推定.

(*SeSl*), 'Tyson' (*SaSe*), 'Seckel' (*SeSl*), 'Old Home' (*SeSl*), 'Maxine (Starking Delicious)' (*SeSl*), 'Magness' (*SaSe*), Moonglow (*ScSe*), 'Honey Sweet' (*SaSl*), 'Harrow Crisp' (*SaSe*), 'Harrow Delight' (*SaSe*), 'Harrow Sweet' (*SaSl*)の *S* 遺伝子型が新たに推定された。

これら品種の推定 *S* 遺伝子型をみると、品種が有する *S-RNase* 対立遺伝子は偏っており、特に *Sa-*, *Sb-*, *Se-*, *Sl-RNase* 対立遺伝子が多い。おそらく、世界各国で広く栽培されている 'Bartlett' (*SeSl*), 生産量世界一のイタリアで最も多く栽培されている 'Abbé fetal' (*SaSb*), 良食味でヨーロッパにおいて人気の高い 'Doyenné du Comice' (*SaSb*) の *S* 遺伝子型に、この4種類の *S-RNase* 対立遺伝子が含まれること、また、火傷病抵抗性品種に *Sa-* および *Se-RNase* 対立遺伝子を持つ品種が多く、中でも遺伝子型 *SaSe* の品種が多いことが、上記4種類の *S-RNase* 対立遺伝子の増加に関与していると考えられる。主要品種間および少数の抵抗性品種の交雑後代や他のナシ属種に対する主要品種の戻し交雑を用いた新品種育成により、交雑不和合性を示す組み合わせの増加が各国における実際の栽培現場で問題となる可能性がある。また、 $\gamma$  線照射個体から選抜された半わい性品種 'Abate light' (*SaSb*) および 'Conference light' (*SdSr*) や 'Max Red Bartlett' (*SeSl*), 'Bon Rouge' (*SeSl*), 'Royal Red Hardy' (*SsSa*), 'Red Anjou' (*ScSe*) など突然変異による赤色系品種も主要品種との交雑不和合が危惧される。イタリアでは、遺伝子型 *SaSb* の 'Abbé fetal' および 'Doyenné du Comice' がそれぞれ生産量の24%と9%を、また、*SeSl* の 'William's Bon Chrétien (Bartlett)' とその変異系統が22%を占めており (岩堀 2002), 混植する品種の *S* 遺伝子型の考慮が他国より必要であると考えられる。また、フランスの栽培面積の26%, スペインの栽培面積の17%を占める 'Docteur Jules Guyot (Precoce)' やオランダの栽培面積の90%に達する 'Rocha', 日本でも栽培増加が予想される 'Aurora' は、火傷病抵抗性品種の 'Harrow Crisp', 'Harrow Delight', 'Magness' と同じ *SaSe* の遺伝子型に推定された。持続可能な農業を求める声の高まりもあり、火傷病抵抗性品種の栽培は今後増えると予想されるので、交雑不和合組み合わせに注意が必要である。したがって、いずれの品種の場合においても、良質果実を確実に生産するために、推定 *S* 遺伝子型に基づいた品種選択が不可欠である。

*Sx-RNase* は9品種, 'Beurré Bedford', 'Beurré Bosc', 'Beurré Dumont', 'Clara Frijs', 'Durondeau', 'Early Seckel', 'Lincoln', 'Marie Louise', 'Saint Germain' の花柱からクローニングされた。上記以外の品種を用いた3'RACEにおいて(第2,3章), *Sx-RNase* cDNA断片はクローニングされていない。'Beurré Bosc' (*ShSx*) と 'Durondeau' (*ShSx*) および 'Early Seckel' (*SlSx*) × 'Marie Louise' (*SlSx*) の交配はいずれも交雑不和合を示した(表3-11)。また, 'Beurré Bedford' (*ShSx*) ['Marie Louise' (*SlSx*) × 'Durondeau' (*ShSx*) の交雑後代], および, 'Early Seckel' (*SlSx*) ['Seckel' (*SeSl*) の自然交雑実

生]は親子関係にある品種の *S* 遺伝子型が矛盾しない。したがって、*Sx-RNase* が *S-RNase* 対立遺伝子であるようにも思われる。しかし、*Sx-RNase* はプライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いた伸長時間30秒、99サイクル、アニーリング52℃の条件で行なったゲノミックPCRにより、ニホンナシやリンゴを含めすべての供試品種において検出された。また、雌しべだけでなく花弁と葯でも発現していることから、花柱特異的発現という一般的な雌しべ側 *S* 遺伝子の条件を満たさない。*Sx-RNase* が *S* 遺伝子型に関係なくどの品種の花柱にも存在する non-*S RNase* をコードするとも考えられるが、9品種以外では発現しておらず、また、報告されている non-*S RNase* と 25.8~30.5%の相同性しか示さなかった(表 3-13)。したがって、*Sx-RNase* が *S-RNase* 対立遺伝子であるとも non-*S RNase* であるとも結論づけることができない。

輸出用品種として南半球諸国で栽培の多い‘Beurré Bosc’(ShSx) (USDA/FAS March 2006; Australian Bureau of Statistics), スウェーデンやデンマークで栽培されている‘Clara Frijs’(SeSx) (Eurostat 2002), ベルギーの‘Durondeau’(ShSx) (Eurostat 2002)から *Sx-RNase* がクローニングされた。*Sx-RNase* が *S-RNase* 対立遺伝子である場合、‘Beurré Bosc’, ‘Durondeau’, ‘Beurré Bedford’および‘Early Seckel’と‘Marie Louise’は、それぞれ同じ *S* 遺伝子型 ShSx および SISx を持ち、交雑不和合を示した交配実験の結果と一致する。一方、*Sx-RNase* が *S-RNase* 対立遺伝子ではない場合、‘Chapin’(SISm)×‘Marie Louise’(SISx)が交雑不和合を示したことから、‘Marie Louise’は *S* 対立遺伝子をヘテロに持つと推測され、これら品種は 17 種類の *S-RNase* 対立遺伝子や推定 *So-RNase* 対立遺伝子以外の *S-RNase* を持つと考えられる。ただし、この場合においても、‘Beurré Bosc’(ShSx)と‘Durondeau’(ShSx)および‘Early Seckel’(SISx)と‘Marie Louise’(SISx)の交雑不和合から、少なくとも各組み合わせにある品種は同じ新規 *S-RNase* 対立遺伝子を有していると推測される。現段階では、*Sx-RNase* が *S-RNase* 対立遺伝子であるかを結論づけることができないが、*Sx-RNase* がクローニングされた9品種が *Sx-RNase* 対立遺伝子または未同定の *S-RNase* 対立遺伝子のどちらを持っていても、これら品種は *S* 遺伝子型を推定した多くの経済品種と交雑不和合になる。したがって、本章における推定 *S* 遺伝子型は栽培や育種において参考になると考えられる。*Sx-RNase* が *S-RNase* 対立遺伝子であるのか、また、*Sx-RNase* がゲノミックPCRで増幅されない原因やナシ亜科全体に存在する理由などは今後の解析により明らかにされるべき課題であると考える。

表 3-13 セイヨウナシのS-RNaseおよび他の植物のT2/S型RNaseとの推定アミノ酸配列の相同性 (%)

	Class III RNase <sup>a</sup>									Class I, II RNase <sup>a</sup>								
	ナシ亜科のS-RNase				塩基性 non-S RNase					バラ科酸性 non-S RNase			キク亜綱の酸性 non-S RNase					
	PcSh	PcSm	PpS5	MdS16	LC1	LC2	MC	X2	PA1	PP-nonS	PD1	PD2	LE	LX	NE	RNS1	RNS2	RNS3
PcSx	85.5	63.2	74.0	97.8	28.0	29.8	32.3	27.9	25.8	27.8	29.8	26.0	26.3	29.2	28.6	27.2	26.7	30.5
PcSh	-	64.9	75.8	85.5	29.5	30.8	31.7	31.2	25.1	29.9	29.1	27.4	28.1	29.7	28.1	28.0	28.1	33.2
PcSm	64.9	-	62.3	63.2	28.1	30.6	28.6	30.2	26.7	28.5	29.5	26.2	25.8	26.6	27.8	28.6	25.5	29.6
PA1	25.1	26.7	25.1	25.3	26.3	22.9	28.0	31.8	-	25.9	26.1	24.1	28.4	27.5	28.9	26.4	26.3	26.5
Pp-nonS	29.9	28.5	33.5	29.2	34.3	33.9	37.2	28.6	25.9	-	85.9	64.7	61.4	61.3	62.1	62.9	35.8	64.1
PD1	29.1	29.5	34.1	29.8	34.3	33.9	37.2	28.1	26.1	85.9	-	66.5	61.9	62.8	65.6	63.6	34.4	63.6
PD2	27.4	26.2	28.0	26.0	32.7	31.9	37.7	26.7	24.1	64.7	66.5	-	71.8	63.8	71.7	73.8	35.0	60.7

PcSx: *Pyrus communis* Sx-RNase, PcSh: *P. communis* Sh-RNase (AB236431), PcSm: *P. communis* Sm-RNase (AB258362), PpS5: *P. pyrifolia* S5-RNase (AB045711), MdS16: *Malus x domestica* S16RNase (AF016919), LC1: *Luffa cylindrica* RNase LC1 (D64011), LC2: *L. cylindrica* RNase LC2 (D64012), MC: *Momordica charantia* RNase MC (P23540), PA1: *Prunus avium* PA1 (AB096918), X2: *Petunia inflata* RNase X2 (S28611), LE: *Lycopersicon esculentum* RNase LE (S33840), LE: *L. esculentum* RNase LX (S53507), NE: *Nicotiana glauca* RNase NE (U13256), PD1: *Prunus dulcis* RNase PD1 (AF227522), PD2: *P. dulcis* RNase PD2 (AF157011), PP-nonS: *Pyrus pyrifolia* non-S RNase (D49529), RNS1: *Albidopsis thaliana* RNS1 (U05206), RNS2: *A. thaliana* RNS2 (M98336), RNS3: *A. thaliana* RNS3 (U05207). \*RNaseのClass I~IIIへの分類は, Yamane et al. 2003に従った。

## 第 4 章

### 三倍体品種の S 遺伝子型推定

#### <摘要>

第 3 章で確立した CAPS マーカーシステムを用いて、三倍体と記載されている 9 品種の S 遺伝子型推定を試みた。フローサイトメトリー分析により 8 品種の倍数性を確認したところ、6 品種は三倍体、'Jargonelle' と 'Pitmaston' は二倍体であった。三倍体 3 品種から、CAPS マーカーシステムでは識別されない 2 種類の新規 *S-RNase* 対立遺伝子 (*Su*-および *Sv-RNase* 対立遺伝子) が検出された。RACE クローニングにより *Su-RNase* cDNA 完全長配列を決定した。*S-RNase* 対立遺伝子の種類から三倍体品種の S 遺伝子型を推定した。S 遺伝子型に基づいて行なった交配実験により雄性不稔性や交雑不和合性を確認した。

#### <緒言>

多くのセイヨウナシ品種は二倍体 ( $2n = 2x = 34$ ) であるが、三倍体 ( $2n = 3x = 51$ ) や四倍体 ( $2n = 4x = 68$ ) の品種も報告されている (Crane and Thomas 1939; Crane and Lewis 1940; Lewis and Modlibowska 1942)。三倍体や四倍体は二倍体より細胞が大きく、大きな果実を得られることから、大果品種として利用価値が高い。しかし、三倍体では異常な減数分裂が起こるため、雄性不稔や雌性不稔を生じやすい。Crawford (1996) は 'Triploid' としてニホンナシを含む 27 品種を挙げ、用途、収穫期、開花期間を記載している。しかし、この場合の 'Triploid' の定義は一般的な三倍体という意味ではなく、雄性不稔性品種を指している。雄性不稔性品種を導入したナシ園では、受粉樹品種と、さらにその受粉樹品種を結実させるための別の受粉樹品種が必要となるため、3 品種の混植が必要となることから、雄性不稔性品種を 'Triploid' として紹介している。

Moffett (1933) はセイヨウナシ 15 品種の染色体数を調査し、'Beurré Diel', 'Beurré d'Amanlis', 'Catillac', 'Pitmaston Duchess' を三倍体品種として同定している。Crane et al. (1940) はセイヨウナシ 81 品種の葉縁、葉の中肋、茎の毛、茎の色の 5 つの形態学的特徴を調査した。不良花粉を多く生産すること、生長旺盛で葉が厚いこと、多くの場合に花が大きく果実が大きいことの 3 点から三倍体品種と二倍体品種を識別できるとし、'Beurré Alexandre Lucas', 'Beurré d'Amanlis',

‘Beurré Diel’, ‘Jargonelle’, ‘Pitmaston Duchess’, ‘Catillac’, ‘Verulam’, ‘Vicar of Winkfield’の8品種を三倍体品種として挙げているが、染色体数は調査されていない。

これら品種のうち、‘Alexander Lucas (Beurré Alexandre Lucas)’, ‘Beurré d’Amanlis’, ‘Beurré Diel’, ‘Catillac’, ‘Pitmaston (Pitmaston Duchess)’, ‘Vicar of Winkfield (Curé)’や‘Merton Pride’および‘Triomphe de Jodoigne’が三倍体品種として日本にも導入されている(表 4-1)。「Alexander Lucas」はドイツの主要品種であり、耐寒性とともには火傷病抵抗性を有している(Janick and Moore 1996)。「Beurré d’Amanlis」は三倍体とされているが果実が小さいが、暖地に適した早生品種である(Keepers Nursery ホームページ, 以下‘Pitmaston’まで同じ)。「Beurré Diel」は果実品質の極めてよい暖地向け中生品種として紹介されている。「Catillac」は、1665年にフランスで発見された大果品種で、調理に適している。貯蔵性もよく、イギリスでは12月から3月まで市場に出回る。「Merton Pride」は、‘Glou Morceau’と‘Bartlett’ (4x)の交配から1959年にイギリスで育成された品種で、果実品質が極めてよく、生食に適している。「Vicar of Winkfield」は非常に古い品種であり、その果実は調理に適している。「Jargonelle」は古くからある早生品種で、その名を冠した飴が製造されるなど人々に親しまれている。「Pitmaston (Pitmaston Duchess)」は、‘Duchesse d’Angouleme’×‘Glou Morceau’の交配から1841年にイギリスで育成された品種で、果実が大きく、果実品質は生食用にも調理用にも優れている。「Triomphe de Jodoigne」は詳細を示した文献が少なかったが、大果品種として栽培されていると思われる。有用な特性により、これら品種が栽培や育種に導入される機会も少なくないと考えられ、*S*遺伝子型情報を明らかにする必要がある。

本章では、三倍体と記載されている9品種について、フローサイトメトリー分析により倍数性を確認した後、17種類の*S-RNase*対立遺伝子を識別するCAPSマーカーシステム(第3章)を用いて品種の*S*遺伝子型を推定した。三倍体品種3品種からこのシステムでは識別できない2種類の新規*S-RNase*対立遺伝子を見出し、RACE法によりcDNA完全長配列を決定した。また、交配実験を行ない、雄性不稔性や交雑不和合性を確認した。

## <材料および方法>

### 材料

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点(岩手県盛岡市)において栽培されているセイヨウナシ8品種、‘Alexander Lucas’, ‘Beurré d’Amanlis’, ‘Beurré Diel’, ‘Catillac’, ‘Jargonelle’, ‘Merton Pride’, ‘Pitmaston’, ‘Vicar of Winkfield’から萌芽葉と未展開葉を、

表4-1 三倍体と記載されていた8品種の由来と諸特性

品種	原産国	親品種	開花期	収穫 盛期	追熟日数 (日)	出荷期	果実重量 (g)	糖度 (%)	酸度 (%)	果皮色	肉質など	その他品種特性
Jargonelle *	イギリス		C	8.02	13	8月	77.1	11.9	0.10	黄色	粉質, 淡白	豊産性
			C							緑黄色	溶質, 甘味多, 多汁, 芳香	
Beurré d'Amanlis	フランス 1800		C	8.23	18	9月	182.1	10.4	0.28	緑黄色	粗, 生食用	暖地向き
			C	9月		325	9月			錆少		
Alexander Lucas	フランス		B	10.28*	36	11~1月	250.0	10.3	**	緑黄色	crisp, 多汁, 甘い	火傷病抵抗性, 耐寒性
			B	10月								
Catillac	フランス 1665		D	10月下~11月上		1~5月	650			緑黄色	粗, 調理用	耐寒性, 貯蔵性
			D			12~5月						
Beurré Diel	ベルギー 1800		C	9.23*	16	11~12月	308.0	14.0	0.24	淡黄色	溶質, 甘味多, 多汁, 芳香	暖地向き
			C	10月		500	11~12月			全面錆		
Triomphe de Jodoigne	ベルギー		C			11~12月						
Merton Pride	イギリス 1959	Glou Morceau ( <i>SbSg</i> ) ×Bartlett ( <i>SeSeSLSl</i> ) (4x)		10.01	17	9月	366.7	14.2	0.32	錆全面	溶質, 多汁, 品質良好	
			D									
Vicar of Winkfield	フランス 1760		C	10.24	35	12~2月	334.5	10.9	0.16	淡黄色	粗, 調理用	
			C	10月						錆少		
Pitmaston †	イギリス 1841	Duchesse d'Angouleme ( <i>SaSe</i> ) ×Glou Morceau ( <i>SbSg</i> )	D	9.03*	14	10~11月	319.0*	9.2	0.31	淡黄色	生食用, 調理用	
			D	10月		450	10~11月					

品種は収穫期の順, 各欄空白は不明または記載なし。

開花期: 上段は「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による。最も開花の早い品種の開花日を1とし, A (1~6), B (7~12), C (13~17), D (18~22), E (23~27), F (28~32), G (33~37)と分類している。下段は「Keepers Nursery」(<http://www.keepers-nursery.co.uk/searchresultscat.aspx>)による。最も開花の早い品種群をAとし, 以下, B, C, D, Eと続く。どちらの分類においても, 'Bartlett'はD, 'Conference'はC, 'Abbe Fetal'はDに分類されている。

収穫盛期: 無印は農研機構果樹研究所盛岡, \*印は, 山形県農業総合研究センターにおける調査。

出荷期: 上段は「GUIDE OF PEARS」(<http://www.pomologie.com/poire/poire1/fpoires/varietes.html>), 下段は「Keepers Nursery」(<http://www.keepers-nursery.co.uk/searchresultscat.aspx>)から転載。

果実重量: 上段は山形県農業総合研究センターで収穫された果実, 下段は「GUIDE OF PEARS」(<http://www.pomologie.com/poire/poire1/fpoires/varietes.html>)より転載。

その他品種特性は「Keepers Nursery」(<http://www.keepers-nursery.co.uk/searchresultscat.aspx>)および「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による。

\*\* : 'Alexander Lucas'の酸度は「バラエティー西洋なし」では pH3.8とされている。

† : 'Jargonelle'の肉質, 上段は「バラエティー西洋なし」による盛岡の樹, 下段は「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による。「バラエティー西洋なし」の果実は短びん形であるが, 「The Pears of New York」の果実は長びん形である (図4-6)。

‡ : 'Pitmaston'の果実重量, 糖度, 酸度は「バラエティー西洋なし」による。「バラエティー西洋なし」の果実は円形であるが, 「The Pears of New York」の果実は倒卵形またはびん形である (図4-7)。

神戸大学農学部圃場 (兵庫県神戸市)に接ぎ木された‘Triomphe de Jodoigne’から未展開葉を採取した。‘Catillac’, ‘Beurré d’Amanlis’, ‘Jargonelle’, ‘Merton Pride’, ‘Vicar of Winkfield’の white stage の花から花柱を、また、‘Vicar of Winkfield’と‘Jargonelle’から花弁と葯を採取した。萌芽葉はすぐに実験に供試し、未展開葉と花柱は液体窒素で急速冷却後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 方法

### フローサイトメトリー分析

分析には萌芽葉を用いた。シャーレに試料の葉を5mm角程度とり、植物倍数性分析用DNA試薬キット (Partec High Resolution Staining Kit for Plant DNA Analysis, Partec GmbH, Münster, Germany)のA液 (核抽出液)を数滴加え、カミソリで試料を細かく刻んで裸核を抽出した。その後、試料液をメッシュで濾過し、プラスチック製試験管に移した後、同試薬キットB液 (DAPI染色液)を試料液の約4倍量入れて染色を行ない分析に供した。フローサイトメーターはプロイディアナライザーPA型 (Partec GmbH, Münster, Germany)を用い、GAIN 500.0, L-L 30, U-L 999, SPEED 0.60  $\mu\text{l/s}$ の条件下でDAPI蛍光強度を測定した。

### CAPS解析

「ゲノムDNAの抽出と精製」は第2章、「CAPS分析」は第3章の方法に従って行なった。

### RACE クローニング

「Total RNA の抽出」、 「mRNA の単離」、 「3’RACE および 5’RACE」は第2章の方法に従った。5’RACE に *Su-RNase* の HV 領域の配列に基づき設計した特異的なリバースプライマー ‘HVSu’ (5’-GGGTTTCGAGTAATTTTTC-3’)を用いた。

### *Sx-RNase* の発現解析

‘Vicar of Winkfield’と‘Jargonelle’の花柱、花粉、花弁、葉の total RNA を鋳型に、*Sx-RNase* 特異的プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EPSx-anti-IIWPNV’を用いて RT-PCR を行なった。

### 塩基配列の解析

ゲノミック PCR 増幅断片および RACE における PCR 産物をゲルから抽出した後、TA クローニングに供して目的の断片の塩基配列を解析した。「ゲルからの PCR 産物の抽出」、 「TA クロ

ーニング」, 「塩基配列の決定」は第 2 章の方法に従った. *Sv-RNase* の塩基配列はナシ亜科 *S-RNase* の C5 領域配列に基づき設計したリバースプライマー‘EpCSR’ (5'-GACCTCAACCAATT CA-3')を用いて解析した.

## 交配実験

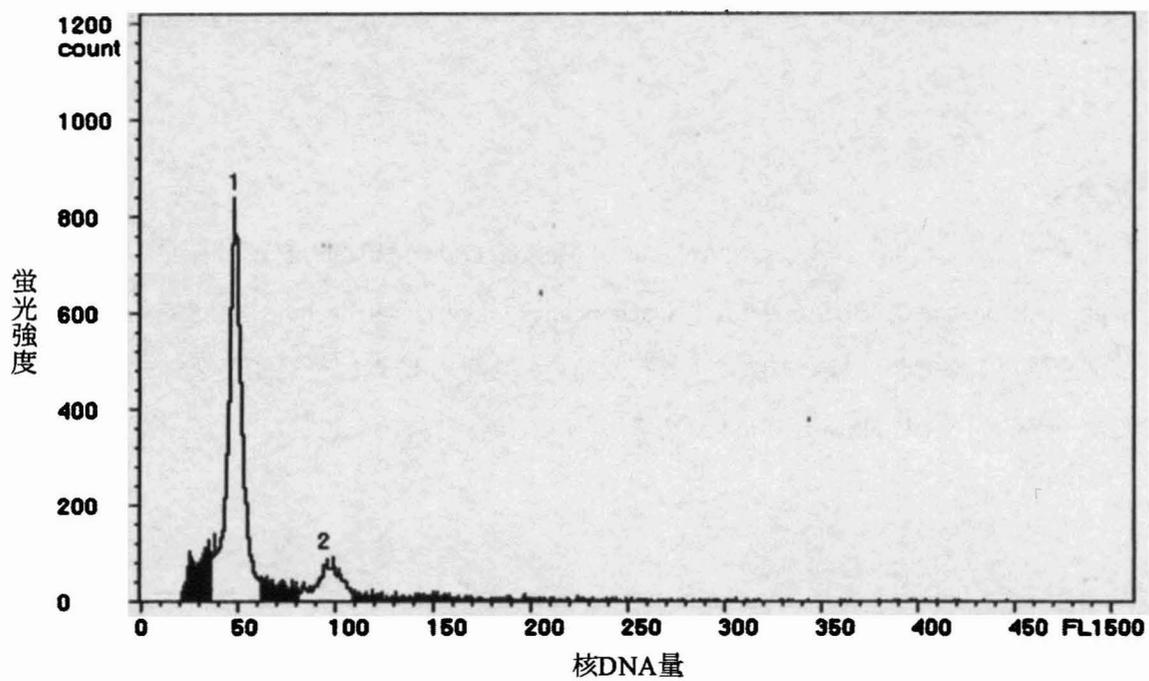
交配実験には‘Catillac’, ‘Beurré d'Amanlis’, ‘Merton Pride’, ‘Vicar of Winkfield’, ‘Reimer Red’, ‘Joséphine de Malines’, ‘Beurré Hardy’, ‘Docteur Jules Guyot’, ‘Michaelmas Nelis’を用いた. 交配および調査は第 1 章で確立した方法により行なった. 交配約 10 週間後に結実数と充実種子数を調査した. 結実率, Seeds/Flower, SI index を算出し, 不和合・和合を判定した.

## <結果>

### 倍数性解析

Crane et al. (1940)の品種分類において三倍体と記載されている 7 品種, ‘Alexander Lucas’, ‘Beurré d'Amanlis’, ‘Beurré Diel’, ‘Catillac’, ‘Jargonelle’, ‘Pitmaston (Pitmaston Duchess)’, ‘Vicar of Winkfield’に加え, 三倍体品種として日本に導入されている‘Merton Pride’の倍数性をフローサイトメトリーにより分析した. 対照として二倍体の‘Bartlett’および‘La France’を用いた場合, それぞれ平均値 43.88 および 48.46 に大きなピークが, 平均値 87.64 および 96.15 に小さなピークが検出された (図 4-1). どちらの品種においても後者の平均値は前者の約 2 倍であることから, 大きなピークが二倍体の細胞 ( $2n = 34$ )の核を示し, 小さなピークは細胞周期の S 期にあり DNA 量が倍加している細胞 ( $4n = 68$ )の核であると推測された. 一方, ‘Alexander Lucas’, ‘Beurré d'Amanlis’, ‘Beurré Diel’, ‘Catillac’, ‘Merton Pride’, ‘Vicar of Winkfield’ではそれぞれ 69.72, 75.12, 70.19, 72.42, 76.09, 75.68 に大きなピークが検出された. これらのピークは二倍体 ( $2n = 34$ )のピークの約 1.5 倍の核 DNA 量に検出されたことから, 三倍体 ( $3n = 51$ )の核とみなされた. ‘Jargonelle’と‘Pitmaston’では 49.68 と 49.90 に大きなピークが検出され, どちらも二倍体 ( $2n = 34$ )の核と判定された. したがって, ‘Alexander Lucas’, ‘Beurré d'Amanlis’, ‘Beurré Diel’, ‘Catillac’, ‘Merton Pride’, ‘Vicar of Winkfield’は記載通りに三倍体であることが確認されたが, ‘Jargonelle’と‘Pitmaston’は二倍体と判定された (表 4-2). 過去の研究と本章で用いた‘Jargonelle’と‘Pitmaston’が同名異種である可能性が考えられたが, 本章ではこの結果に基づいて以降の解析を行なった.

(a)



(b)

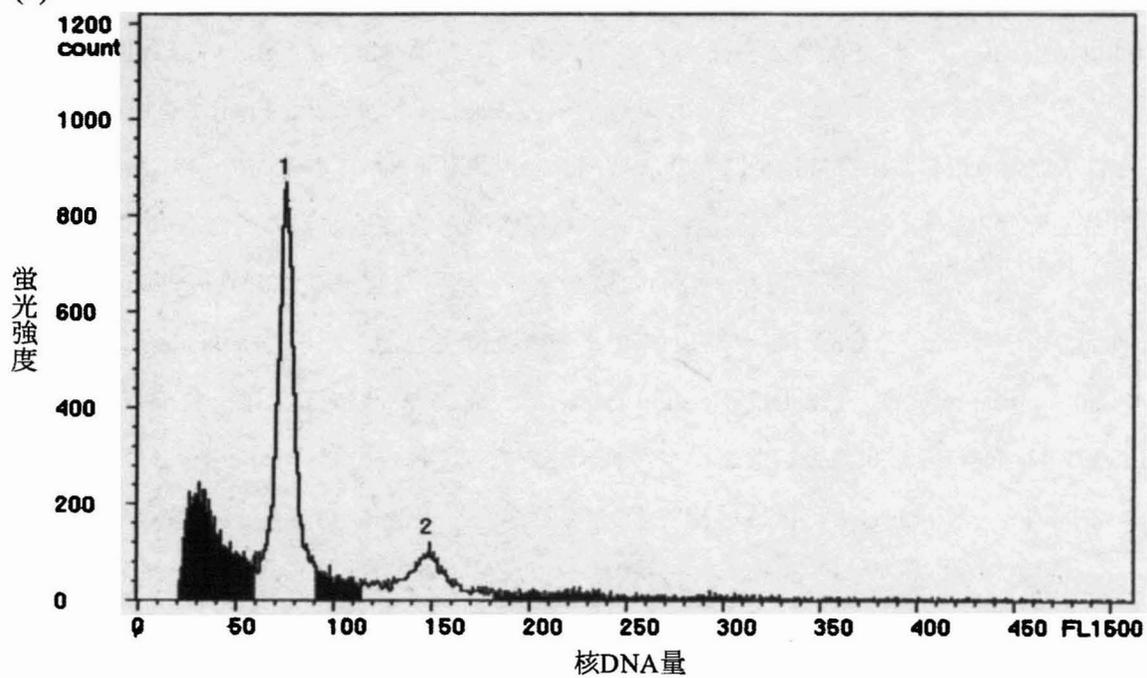


図4-1 'La France' (二倍体) (a)と 'Beurré d'Amanlis' (三倍体) (b)のフローサイトメトリ分析.

表4-2 三倍体と記載されていた8品種の倍数性と推定S遺伝子型

品種	フロー サイトメリー 分析	第3章で開発した CAPSマーカーシステムによる ゲノミックPCR断片の識別	塩基配列の解析による ゲノミックPCR断片の識別	3'RACEによる S-RNase cDNA断片の クローニング	推定 S遺伝子型
Alexander Lucas	三倍体	<i>Sb, Se, Ss</i>	<i>Sb, Se, Ss</i>	n.d.	<i>SbSeSs</i>
Catillac	三倍体	<i>Sb, Sc, Ss</i>	<i>Sb, Sc, Ss</i>	<i>Sb, Sc, Ss</i>	<i>SbScSs</i>
Beurré Diel	三倍体	<i>Sa, Sb, Se</i>	<i>Sb, Se, Sv</i>	n.d.	<i>SbSeSv</i>
Triomphe de Jodoigne	n.d.	<i>Sa, Sb, Sl</i>	<i>Sb, Sl, Sv</i>	n.d.	<i>SbSlSv</i>
Beurré d'Amanlis	三倍体	<i>Sb, Sd</i>	<i>Sb, Sd</i>	<i>Sb, Sd</i>	<i>SbSd</i>
Merton Pride	三倍体	<i>Sb, Sl</i>	<i>Sb, Sl</i>	<i>Sb, Sl</i>	<i>SbSl</i>
Vicar of Winkfield	三倍体	<i>Sc, Sk</i>	<i>Sk, Su</i>	<i>Sk, Su, Sx</i>	<i>SkSuSx</i>
Jargonelle	二倍体	<i>Sm</i>	<i>Sm</i>	<i>Sm, Sx</i>	<i>SmSx</i>
Pitmaston	二倍体	<i>Se, Si</i>	<i>Se, Si</i>	<i>Se, Si</i>	<i>SeSi</i>

n.d.: サンプルがないため未調査.

## CAPS マーカーシステムによる *S* 遺伝子型推定

二倍体の‘Pitmaston’と‘Jargonelle’, および三倍体 7 品種の *S* 遺伝子型を第 3 章で確立した CAPS マーカーシステムにより推定した (図 4-2). ‘Pitmaston’からは 998 bp の *Se-RNase* 対立遺伝子および約 350 bp の断片が増幅された. 制限酵素処理により約 350 bp の断片が *Si-RNase* 対立遺伝子と識別されたことから, *S* 遺伝子型は *SeSi* と推定された. ‘Jargonelle’からは約 350 bp 断片のみが増幅され, 制限酵素処理により *Sm-RNase* 対立遺伝子と特定された. 1 種類の断片しか増幅されなかったため, プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いた PCR では増幅されない, あるいは 11 種類の制限酵素では識別できない新規 *S-RNase* 対立遺伝子を‘Jargonelle’が持つ可能性が考えられた.

三倍体 7 品種のうち 4 品種からは, それぞれ 3 種類の断片が増幅された. ‘Alexander Lucas’からは 998 bp の *Se-RNase* 対立遺伝子, 440 bp の *Sb-RNase* 対立遺伝子, 約 350 bp の断片が増幅され, 約 350 bp の断片は *Ss-RNase* 対立遺伝子と識別された. ‘Catillac’からは 440 bp の *Sb-RNase* 対立遺伝子と 2 種類の約 350 bp の断片が増幅され, 約 350 bp の断片は *Sc-*と *Ss-RNase* 対立遺伝子と識別された. ‘Beurré Diel’からは 998 bp の *Se-RNase* 対立遺伝子, 440 bp の *Sb-RNase* 対立遺伝子, 約 350 bp の断片が増幅され, 約 350 bp の断片は *Sa-RNase* 対立遺伝子と識別された. ‘Triomphe de Jodoigne’からは 1,414 bp の *Sl-RNase* 対立遺伝子, 440 bp の *Sb-RNase* 対立遺伝子, 約 350 bp の断片が増幅され, 約 350 bp の断片は *Sa-RNase* 対立遺伝子と識別された.

一方, ‘Beurré d'Amanlis’, ‘Merton Pride’, ‘Vicar of Winkfield’の 3 品種からは 2 種類の断片が増幅された. ‘Beurré d'Amanlis’からは 440 bp の *Sb-RNase* 対立遺伝子と約 350 bp 断片が増幅され, 約 350 bp 断片は *Sd-RNase* 対立遺伝子と識別された. ‘Merton Pride’からは 1,414 bp の *Sl-RNase* 対立遺伝子と 440 bp の *Sb-RNase* 対立遺伝子が増幅された. ‘Vicar of Winkfield’からは約 1.3 kb 断片と約 350 bp の断片が増幅され, 制限酵素切断によりそれぞれ *Sk-*と *Sd-RNase* 対立遺伝子と識別された.

CAPS マーカーシステムにより識別された増幅断片の種類に基づき, 各品種の *S* 遺伝子型を, ‘Alexander Lucas’ (*SbSeSs*), ‘Catillac’ (*SbScSs*), ‘Beurré Diel’ (*SaSbSe*), ‘Triomphe de Jodoigne’ (*SaSbSl*), ‘Beurré d'Amanlis’ (*SbSdS-*), ‘Merton Pride’ (*SbSlS-*), ‘Vicar of Winkfield’ (*SdSkS-*)と仮に推定した (表 4-2). ‘Beurré d'Amanlis’, ‘Merton Pride’, ‘Vicar of Winkfield’からは 2 種類の *S-RNase* 対立遺伝子しか増幅されなかったことから, これら品種は, (1)既知の *S-RNase* 対立遺伝子を重複して持つ, (2)プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いた PCR では増幅されない新規 *S-RNase* 対立遺伝子を持つ, (3)11 種類の制限酵素では識別できない新規 *S-RNase* 対立遺伝

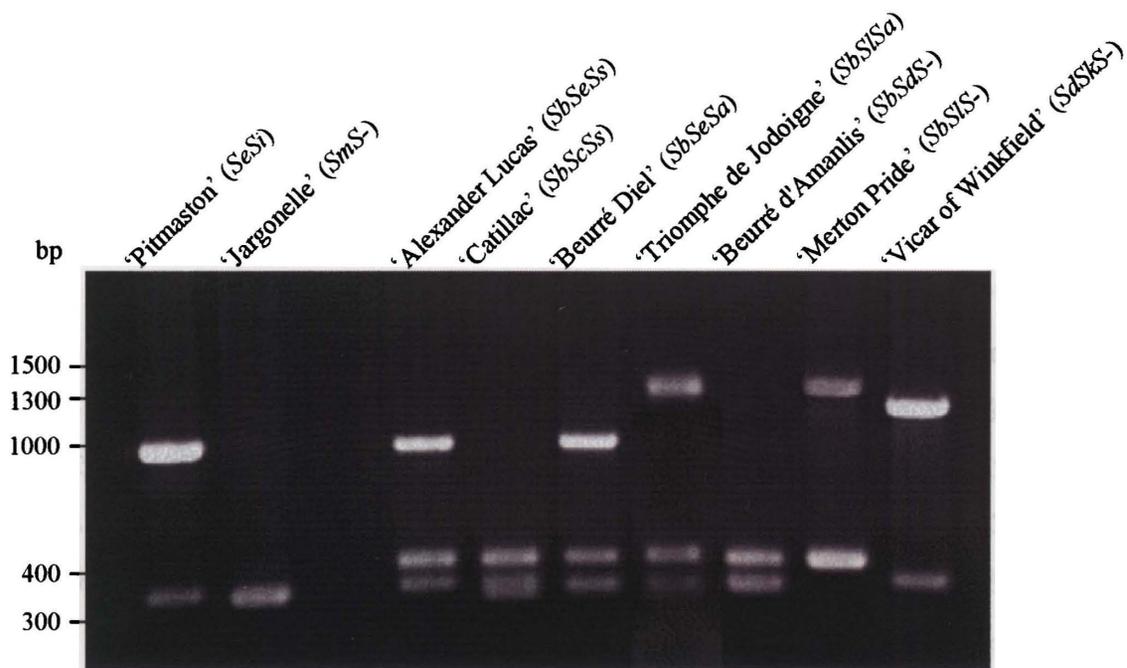


図4-2 プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いたゲノミックPCRによる三倍体と記載されていた9品種からの*S-RNase*対立遺伝子の増幅. *S*遺伝子型は第3章のCAPSマーカーシステムによる.

子を持つ、という3種類の可能性が示された。

### RACE 法による cDNA クローニング

三倍体品種5品種, 'Alexander Lucas', 'Catillac', 'Beurré d'Amanlis', 'Merton Pride', 'Vicar of Winkfield'および二倍体品種の'Jargonelle'と'Pitmaston'の total RNA を鋳型に3'RACE を行ない, TA クローニング後, 各コロニーのインサート DNA 配列を解析した. 三倍体品種'Beurré Diel'と'Triomphe de Jodoigne'は花柱をサンプリングできず, RACE クローニングに供することができなかった. 'Alexander Lucas'からは *Sb-*, *Se-*, *Ss-RNase* の cDNA 断片が, また, 'Catillac'からは *Sb-*, *Sc-*, *Ss-RNase* cDNA 断片がクローニングされ, CAPS 解析で特定された3種類の *S-RNase* 対立遺伝子の発現が確認された (表4-2). 'Pitmaston'からは *Se-*と *Si-RNase* cDNA 断片がクローニングされ, CAPS マーカーシステムによる推定と一致した.

一方, 'Jargonelle'からは *Sm-RNase* cDNA 断片に加え, 第3章において10品種からクローニングされたが, 花柱特異的発現を示さないことから, *S-RNase* 対立遺伝子と結論づけることができなかった *Sx-RNase* の cDNA 断片がクローニングされた. 'Vicar of Winkfield'からは3種類の cDNA 断片がクローニングされた. 1種類の断片は *Sk-RNase* 対立遺伝子, もう1種類は *Sx-RNase* であったが, 残る1種類は *Sd-RNase* 対立遺伝子とは異なる塩基配列を持つ新規 *S-RNase* であった. この新規 cDNA 断片の配列は17種類の *S-RNase* および推定 *So-RNase* 対立遺伝子, また, ニホンナシ *S-RNase* の配列と一致しなかったことから, *Su-RNase* と名付けた. 'Beurré d'Amanlis'からは *Sb-*と *Sd-RNase* cDNA 断片が, 'Merton Pride'から *Sl-*と *Sb-RNase* cDNA 断片が得られ, 新規 *S-RNase* 対立遺伝子は増幅されなかった (表4-2).

5'RACE を行なって *Su-RNase* の5'末端側をクローニングし, 3'および5'末端側配列の重複から *Su-RNase* の cDNA 完全長塩基配列を決定した. *Su-RNase* は684 bp からなり, 228 アミノ酸をコードし, 推定アミノ酸配列はナシ亜科 *S-RNase* に典型的な一次構造を有していた (図4-3). また, 17種類のセイヨウナシ *S-RNase* との相同性は59.8%~74.8%となり, *Ss-RNase* と *Su-RNase* 間の相同性59.8%は18種類のセイヨウナシ *S-RNase* 間の相同性で最も低かった (表3-7).

*Sx-RNase* の器官特異的発現を RT-PCR により解析したところ, *Sx-RNase* は'Vicar of Winkfield'では花柱と花弁で, 'Jargonelle'では花柱と花弁に加え, 葯でも発現していた (図3-14).

### ゲノミック PCR 増幅断片の解析

RACE クローニングにより'Vicar of Winkfield'から新規 *Su-RNase* 対立遺伝子がクローニング

Sa-RNase	MGITGIIYVMTVMVFLIVLILPSPTVG	YDYFQFTQQYQAVCHFNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNSTGNDPMYCKNTTLNSTK	---	IAN-LTAQLEIIWPNVLDRTDHIHFWNKQ	112
Sb-RNase	MG-TGMIYVMVMVFLIVLILSSSTVG	FDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSDSNGNDPKYCKAPP-Y-QT	---	MKI-LEPHLVIWPNVLRNRDHEVFWRKQ	109
Sc-RNase	MGITGMIYVMPVTFSLIVLILSSSA	AKYDYFQFTQQYQPAVCNSNPTPCSDPTDKLFTVHGLWPSKSSGRDPKRCSTPVSQST	---	ITN-LKAQLEIIWPNVLRNRANNITFWETQ	112
Sd-RNase	MGNTGMIYMFVTFSLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTPCNDRPEKLFVHGLWPSNKKGPDPKCKNIQMSQR	---	IGN-MAAQLEIIWPNVLRNRDTHVGFWEKE	112
Se-RNase	MGITRMIYVMTMAFSLIVLILSSSTMG	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPTDKLFTVHGLWPSNSNGPDPVNCCKPCTKVPQAQQPIDPSLKPQLEIIWPNVLRNRADSEFWNKQ	---		116
Sg-RNase	MGIIGMIYVMVMVFLIVLILSSSTVG	FDYFQFTHQYQPAVCNSNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNRNGPDPPEYCKNTTLDVTK	---	IGN-LQAQLDIIWPNVYDRTNVGVFWSKQ	112
Sh-RNase	MGITGMIYVMTVMVFLIVLILSSSTVG	FDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPTDKLFTVHGLWPSNKGIGDPEYCKI	--	RNPRK---RAKKLEPQLEIIWPNVLDRTNHTGFWSRQ	111
Si-RNase	MGITGMIYIVTMVFLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPTDKLFTVHGLWPSNLNGPHPENCTNATVNSHR	---	IKN-IQAQLKIIWPNVLDRTNHLGFWNKQ	112
Sk-RNase	MGITGMIYVMTVMVFLIVLILSSSA	VKFDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNVNGSDPKKCKATILNPQT	---	ITD-LKAQLEIIWPNVLRNRKAHVRFWRKQ	112
Sl-RNase	MGITGMIYVMTVMVFLIVLILSSSA	AKYDYLQFTQQYQPAACKFHHTPCKDPLDKLFTVHGLWPSNFGNDPENCKVKPTASQT	---	IDTSLKPQLEIIWPNVLRNRADHSEFWQKQ	113
Sm-RNase	MGITGIIYVMTVFLIVLILSSSTVG	FDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNWLPLDPEFCNNTTTPQQ	---	IGH-IQAQLEIIWPNVLRNRTHLGFWNKQ	112
Sn-RNase	MGITGMIYIVTMVFLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCNSKPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNLNGPHPENCTNATVNSHR	---	IKN-IQAQLKIIWPNVLDRTNHLGFWNKQ	112
Sp-RNase	MGITGMIYIVTMVFLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPTDKLFTVHGLWPSNLNGPHPENCTNATVNSHR	---	IKN-IEAQLKIIWPNVLDRTNHLGFWNKQ	112
Sq-RNase	MGITGMIYVMTVMVFLIVLILSSSA	VKFDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNVNGSDPKKCKTILKPT	---	IRN-LKAQLEIIWPNVLSYKGSVRFWRKQ	112
Sr-RNase	MGITGMIHIVTMVFLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCYFNPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNLNGPHPENCTNATVNSQR	---	ITN-IQAQLKIIWPNVLDRTNHLGFWNKQ	112
Ss-RNase	MGVITGMIYMFVTFSLIVLILSSSTVG	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTHCNDPTDKLFTVHGLWPSNRNGPDPKCKTALNSQR	---	IGN-MTAQLEIIWPNVLRNRSDHVGFEKE	112
St-RNase	MGITGMIYVMTVMVFLIVLILSSSA	AKYDYLQFTQQYQPAACNSHPTCKDPPDKLFTVHGLWPSNVNGSDPENCKVKPTPSQT	---	IDTSLKPQLEIIWPNVLRNRADHSEFWQKQ	113
Su-RNase	MGITGMVYVVTMVFLLIVLILSSSTMG	HDYFQFTQQYQPAVCNSNRPCKDPPDKLFTVHGLWPSMVGPDPSNCSI	--	RNIRK---REKLEPQLAIWPNVLRNRADHSEFWQKQ	111
Sv-RNase		PCKDPPDKLFTVHGLWPSNSTGNDPIYCKNTTMINSTK	---	IAN-LTARLEIIWPNVLDRTDHIHFWNKQ	
Sx-RNase	MGITGMIYVMTVMVFLIVLILSSSTVG	FDYFQFTQQYQPAVCNFNPTCKDPTDKLFTVHGLWPSNVNGSDPESECKI	--	RNHRA---RAKALEPQLEIIWPNVLDRTNHTAFWRKQ	111
	-----	-----	-----	-----	
	Signal peptide	C1	C2	HV	
	# *		*	*	*
Sa-RNase	WNKHGSCGRPAIQNDMHYLQTVIKMYITQKQNVSEILSKAKIEPVGFRFWTQKEIEKAIKRGTNNKEPKLKCQRNTQG	---	T	ELVEVTIICSDRNLKQFIDCPRPILNGSRYYCPTNNILY	228
Sb-RNase	WDKHGSCASSPIONQTHYFDVTKMYITQKQNVSEILSKANIKPKGRKSRRLVDIENAIRKVINNMTPKFKCQKQNPRTSLTELVEVGLCSDSNLTFQINCPHPFPQGSRYPCPTN-IOY	---			226
Sc-RNase	WEKHGTCGGPTIQGDEHYRFTVTKMYITQKQNVSEILSKAKIEPEGIKAREEIVKALRQSTDDKRLKCKKNTQ	---	T	ELVEVTLCSHDENLTFQINCPRPYPKGSRYPCPTN-IOY	228
Sd-RNase	WLKHGTCGYPTIRDDMHYLQTVIKMYITQKQNVSAILLSKAMIQPNGQRSLVDIENAIRSGTNNIKPKFKCQKQNTRT	---	T	ELVEVTLCSDRDLTKFINCPQP-QQGSRYLCPA-DVQY	227
Se-RNase	WDKHGTCGYPTIKDKNHYLQTVIKMYITQKQNVSEILSKANINPDGIGRTRKLIENAIRSGTNDKEPKLKCQKQNNGT	---	I	ELVEVSLCSNYLGHKFINCPNKPQGSRYPCPTN-IOY	232
Sg-RNase	WAKHGICGSPTIQDDNVNLETVINMYI IKKQNVSEILSKAKIEPEGNTRKDIVKALRSGTNGRKPPLKCKQKQNTRT	---	T	ELVEVTLCSDRNLTRLINCPNLIKPKSPYFCPLKSIHY	228
Sh-RNase	WKKHGACGYPTIQNENDYFETVTKMYITEKQNVSRILSNAKIEPDGKSRALVDIENAIRNGTNNKPKLKCQKQKTRV	---	T	ELVEITLCSDKNRAHFIDCPNPFPLGSPYLCPTNNIHY	227
Si-RNase	WIKHGSCGNPPIMNDTHYFQTVINMYITQKQNVSEILSKAKIEPLGIQRLVLDIEKALRNSINKKPKFKCQKQNGV	---	T	ELVEITLCSDRSLTFQINCPHPFPQGSRYPCPTN-IOY	227
Sk-RNase	WRKHGACGYPTIADDMHYFSTVIMYITKKQNVSEILSKANIKPEGRFRTRDDIVNAISPSIDYKPKLCKKINNQT	---	T	ELVEVGLCSDNNLTFQINCPNPFQGSRYPCPTN-IOY	228
Sl-RNase	WDKHGTCGSPTIIDKNHYFQTVIRMYITEKQNVSYILSKANINPDGKGRTRKDIQIARINSTNDKEPKLKCQKQTKNGI	---	T	ELVEVSLCSNYLGHKFINCPNKPQGSRYPCPTN-IOY	229
Sm-RNase	WNKHGCGGYTTINDEIQYFETVTKMYITKKQNVSKILSKAKIKPEGNTRTRTEIINAIISISTNNMTPKLKCQKQNNGT	---	I	ELVEVTLCSNDHNTKFINCRHPYDQSQFPCKPINILY	228
Sn-RNase	WIKHGSCGYPAIMNDTHYFQTVINMYITQKQNVSEILSKAKIEPLGIQRLVLIENAIRNSTNNKPKFKCQKQNSGV	---	T	ELVEVSLCSDGSLTFQINCPHPFPQGSRYPCPTN-IOY	226
Sp-RNase	WIKHGSCGNPPIMNDTHYFQTVINMYITQKQNVSEILSKAKIEPVGKRLPLVDIENAIRNSTNNKPKFKCQKQTKNRV	---	T	ELVEITLCSDGSLTFQINCPHPFPQGSRYPCPTN-IOY	227
Sq-RNase	WRKHGTCGYPTIADDMHYFSTVIMYITKKQNVSEILSKAKIKPEGRFRTRDDIVNAISQSIDDKPKLCKKNNNI	---	T	ELVEVGLCSDNNLTFQINCPHPFPQGSRYPCPTN-IOY	228
Sr-RNase	WIKHGSCGNPPIMNDTHYFQTVINMYI IKKQNVSEILSNAKIEPEGNTRKDIVKALRSGTNGRKPPLKCKQKQNNRT	---	T	ELVEVTLCSDRNLTRLINCPNLIKPKSPYFCPLKSIQY	228
Ss-RNase	WIKHGTCGYPTIKDDMHYLQTVIRLYI IQKQNVSEILSKAAIQPNGTNRPLVDIENAIRSGTNNKPKFKCQKQNTRT	---	T	ELVEVTLCSDRDLTKFINCPHGGPQGSRYPCPTN-IOY	228
St-RNase	WDKHGTCGSPTIIDKNHYFETVIRMYITEKQNVSYILSKANINPDGGRTRKDIQIARINSTNDKEPKLKCQKQKNG-I	---	I	ELVEVSLCSNYLGHKFINCPNKPQGSRYPCPTN-IOY	229
Su-RNase	WMKHGTCGYPTIDNENHYFETVTKMYISKKQNVSEILSKAKIEPDGKRRALLIENAIRKGDNKKPKLKCQKQKGT	---	T	ELVEITLCSDRSGEHFIDCPHPFEPISPHYCPTNNIKY	227
Sv-RNase	WNKHGSCGHPAIQNDMHYLQTVIKMYITQKQNVSEILSKAKIEPVGKFRTRQKEIEKAIKRGTNNKEPKLKCQ				
Sx-RNase	WIKHGTCGYPTIQNENDYFETVTKMYITTEKQNVSKILLSAKIEPDGKIRTLADLEIARINSGTNDKPKFKCQKQKRRV	---	T	ELVEVTLCSDKNRAHFIDCPNPFQGSRYPCPTN-IOY	227
	-----	-----	-----	-----	
	C3	RC4		C5	

図4-3 20種類のセイヨウナシS-RNaseの推定アミノ酸配列の比較

全S-RNase間で保存されているアミノ酸残基を網掛けで示す。高次構造形成に関与する8つのシステイン残基、およびRNase活性に必須の2つのヒスチジン残基をそれぞれ\*と#で記す。シグナルペプチド、超可変(HV)領域、保存領域(C1, C2, C3, RC4 and C5)は下線により示す。イントロンの挿入部位は▼で示す。17種類のS-RNaseは下記のaccession numberでDDBJに登録されている: *Sa-RNase* (AB236430), *Sb-RNase* (AB236429), *Sc-RNase* (AB258359), *Sd-RNase* (AB236427), *Se-RNase* (AB236428), *Sg-RNase* (AB258360), *Sh-RNase* (AB236431), *Sr-RNase* (AB258361), *St-RNase* (AB236432), *Sl-RNase* (AB236425), *Sm-RNase* (AB258362), *Sn-RNase* (AB258363), *Sp-RNase* (AB258364), *Sq-RNase* (AB236424), *Sr-RNase* (AB236426), *Sv-RNase* (AB258365), *Sr-RNase* (AB258366), *Su-RNase*, 推定*Sv-RNase*, *Sx-RNase*は未登録。推定*Sv-RNase*のイントロン挿入部位は推定,*Sx-RNase*にはイントロンが挿入されていない。

されたことから、増幅断片長と 11 種類の制限酵素による切断片長多型から識別できない *S-RNase* 対立遺伝子が他にも存在する可能性が示唆された。そこで、三倍体品種 7 品種のゲノム DNA から増幅された断片 (図 4-2) の塩基配列をすべて解析した。‘Vicar of Winkfield’ の *Sd-RNase* と識別された約 350 bp の断片が *Su-RNase* の断片であり、*Su-RNase* 対立遺伝子は 179 bp のイントロンを有する 376 bp の断片として検出されることが明らかになった (図 4-4)。‘Beurré Diel’ と ‘Triomphe de Jodoigne’ から増幅された 345 bp の断片は *Sa-RNase* 対立遺伝子とは異なる配列を持つことが示された (図 4-5)。プライマー ‘FTQQYQ’ と C5 領域の配列から設計したプライマー ‘EpC5R’ を用いたゲノミック PCR を行ない、C5 領域直前までの塩基配列を決定したところ、推定 *So-RNase* 対立遺伝子およびニホンナシ *S-RNase* と異なる配列を有していたので、新規 *S-RNase* であると考え、推定 *Sv-RNase* 対立遺伝子と名付けた。塩基配列から推定されるアミノ酸配列にはナシ亜科 *S-RNase* の相当する部分の特徴が確認できた (図 4-3)。その他の断片は CAPS 解析により特定された *S-RNase* 対立遺伝子の配列と一致した。

最終的に、3’RACE およびゲノミック PCR において増幅された断片の種類に基づき、‘Alexander Lucas’ (*SbSeSs*)、‘Catillac’ (*SbScSs*)、‘Beurré Diel’ (*SbSeSv*)、‘Triomphe de Jodoigne’ (*SbSISv*)、‘Beurré d’Amanlis’ (*SbSd*)、‘Merton Pride’ (*SbSl*)、‘Vicar of Winkfield’ (*SkSuSx*)、‘Jargonelle’ (*SmSx*)、‘Pitmaston’ (*SeSi*) と各品種の推定 *S* 遺伝子型を修正した (表 4-2)。

### 雄性不稔性および交雑不和合性

三倍体品種 (3x) の雄性不稔性を、三倍体品種 (3x) の花粉を重複する *S* 対立遺伝子を持たない二倍体品種に受粉することで調査した (表 4-3)。「Beurré d’Amanlis’ (*SbSd*, 3x) および ‘Catillac’ (*SbScSs*, 3x) の花粉は ‘Docteur Jules Guyot’ (*SaSe*) に対して、それぞれ 0.6 および 0.8 Seeds/Flower を示した。「Vicar of Winkfield’ (*SkSu*, 3x) の花粉は ‘Beurré Hardy’ (*ScSd*) に対して 0.2 Seeds/Flower を示した。これらの値は ‘Reimer Red’ (*SbSc*) および ‘Pitmaston’ (*SeSi*) の花粉を受粉した場合の Seeds/Flower, 5.8 および 7.8 に比べて明らかに小さかったことから、これら 3 品種を雄性不稔と判定した。「Merton Pride’ (*SbSl*, 3x) の花粉は、*Sl* 対立遺伝子が重複する ‘Michaelmas Nelis’ (*ShSl*) に対して 2.3 Seeds/Flower (2005 年) を、*S* 対立遺伝子が重複しない ‘Beurré Hardy’ (*ScSd*) に対して 0.2 Seeds/Flower (2006 年) を示したことから、‘Merton Pride’ も雄性不稔性と判定した。

‘Beurré d’Amanlis’, ‘Catillac’, ‘Vicar of Winkfield’, ‘Merton Pride’ は雄性不稔性であるので、自家受粉、および、これら品種を花粉親とした 3 種類の *S* 対立遺伝子のうち 2 種類を共有する二倍体品種に対する他家受粉、‘Reimer Red’ (*SbSc*) × ‘Catillac’ (*SbScSs*, 3x) および ‘Joséphine de Malines’

ATGGGGATTACGGGGATGGTATATGTGGTTACGATGGTATTTTTATTAATTGTGTTAATA	60
<u>M G I T G M V Y V V T M V F L L I V L I</u>	20
TTGTCTTCGTCCACGATGGGACACGATTATTTCAA	120
<u>L S S S T M G</u> H D Y F Q F T Q Q Y Q L A	40
GTCTGCAACTCTAATCGTGCTCCTTGTAAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC	180
V C N S N R A P C K D P P D K L F T V H	60
GGTTTGTGGCCTTCAAGCATGGTAGGACCTGACCCAAGTAATTGCTCGATAAGGAATATT	240
G L W P S S M V G P D P S N C S I R N I	80
CGGAAGgtaaaattattagtaatcagatggccaatattgtttatttcatttatgtccttg	300
R K	82
tgcggtgtgtttgtgtatattcaatatatacgtcctcaaacatagattttcattcacgtgt	360
gtacaaatattacaattagtttaaaatataatcataatTTTTTTTTTTTcttttgtgcat	420
accag-AGAGAAAAATTA	479
<u>R E K L L E P</u> Q L A I I W P N V F D	100
CGAACCAAAAATAAACTCTTCTGGGATAAAGAGTGGATGAAACATGGCACCTGTGGGTAT	539
R T K N K L F W D K E W M K H G T C G Y	120
CCCACAATAGATAACGAGAACCATTACTTTGAAACCGTAATCAAAATGTACATCAGCAAG	559
P T I D N E N H Y F E T V I K M Y I S K	140
AAACAAAACGTCTCTGGAATCCTCTCAAAGGCGAAGATTGAACCGGACGGGAAAAAAGA	659
K Q N V S G I L S K A K I E P D G K K R	160
GCACTGTTGGATATTGAAAATGCCATACGCAAGGGTGCCGACAATAAGAAACCAAAACTC	719
A L L D I E N A I R K G A D N K K P K L	180
AAGTGCCAAAAGAAGGGTACGATGACTGAATTAGTTGAGATCACTCTTTGCAGTGACAAA	779
K C Q K K G T M T E L V E I T L C S D K	200
AGCGGAGAACATTTTCATAGATTGCCCCACCCCTTTGAACCAATATCACCACATTATTGC	839
S G E H F I D C P H P F E P I S P H Y C	220
CCCACCAACAATATCAAGTATTA	863
P T N N I K Y *	227

図4-4 *Su-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列。  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (   がプライマーの 5' 側)を表す。

TTTACCCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCT 60  
 F T Q Q Y Q P A V C H F N P T P C K D P  
 CCTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACAGCACAGGAAATGACCCA 120  
 P D K L F T V H G L W P S N S T G N D P  
 ATATACTGCAAGAATACAACCATGAATTCTACTAAGgtaatattattaataatcagatgt 180  
 I Y C K N T T M N S T K  
 taaatattgtttatttcatatatacatataactccaacataaattttcatgcatgcgtgtg 240  
 agaatattacaattaatttaaatttaatacataaatttttctattatattatattgtca 300  
 g--ATAGCAAATCTGACAGCCCGGTTGGA<sup>AATTATTTGGCCCAAC</sup>CGTGCTCGATCGAACC 360  
 I A N L T A R L E I I W P N V L D R T  
 GATCATATAACCTTCTGGAATAAACAGTGGAACAAACATGGCAGCTGTGGGCATCCCGCA 420  
 D H I T F W N K Q W N K H G S C G H P A  
 ATACAGAACGACATGCATTA<sup>CTTGCAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAGACAA</sup> 480  
 I Q N D M H Y L Q T V I K M Y I T Q R Q  
 AACGTCTCTGAAATCCTCTCAAGGGCGAAGATTGAACCGGTGGGGAAATTCAGGACACAG 540  
 N V S E I L S R A K I E P V G K F R T Q  
 AAGGAAATTGAAAAGGCCATACGCAAAGGTACCAACAATAAGGAACCAAAA<sup>ACTCAAGTGC</sup> 600  
 K E I E K A I R K G T N N K E P K L K C  
 CAAAA  
 Q

図 4-5 *Sv-RNase* ゲノム DNA の部分塩基配列と推定アミノ酸配列。  
 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,  
 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,  
 小文字: 推定イントロン領域,  
 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (   がプライマーの 5' 側) を表す。

表4-3 三倍体品種の自家および他家受粉による結実率と種子数

交配年	種子親	S遺伝子型	倍数性	花粉親	S遺伝子型	倍数性	交配 花数	結実率 (%)	Seeds /Flower	SI index
2006	Catillac	<i>SbScSs</i>	3	Catillac	<i>SbScSs</i>	3	5	20.0	0.0	0.0
				Reimer Red	<i>SbSc</i>	2	15	20.0	0.1	9.1
				Beurré de l'Assomption	<i>SiSI</i>	2	15	80.0	1.1 <sup>z</sup>	
2006	Reimer Red	<i>SbSc</i>	2	Reimer Red	<i>SbSc</i>	2	5	0.0	0.0	0.0
				Catillac	<i>SbScSs</i>	3	30	0.0	0.0	0.0
				Beurré de l'Assomption	<i>SiSI</i>	2	28	42.9	3.9 <sup>z</sup>	
2005	Merton Pride	<i>SbSI</i>	3	Merton Pride	<i>SbSI</i>	3	5	0.0	0.0	0.0
				Beurré Jean Van Geert	<i>SbSI</i>	2	5	0.0	0.0	0.0
				Koonce	<i>SaSI</i>	2	5	80.0	2.2 <sup>z</sup>	
2006	Joséphine de Malines	<i>SbSI</i>	2	Joséphine de Malines	<i>SbSI</i>	2	20	26.7	0.2	4.9
				Beurré Jean Van Geert	<i>SbSI</i>	2	20	55.6	0.1	2.4
				Merton Pride	<i>SbSI</i>	3	5	75.0	0.0	0.0
				Pierre Tourasse	<i>SaSI</i>	2	20	57.9	4.1 <sup>z</sup>	
2006	Beurré d'Amanlis	<i>SbSd</i>	3	Beurré d'Amanlis	<i>SbSd</i>	3	10	80.0	0.1	3.1
				Beurré d'Anjou	<i>ScSe</i>	2	10	90.0	3.2 <sup>z</sup>	
2006	Vicar of Winkfield	<i>SkSuSx</i>	3	Vicar of Winkfield	<i>SkSuSx</i>	3	5	0.0	0.0	0.0
				President Héron	<i>SgSq</i>	2	5	100.0	8.3 <sup>z</sup>	
2006	Beurré Hardy	<i>ScSd</i>	2	Vicar of Winkfield	<i>SkSuSx</i>	3	5	60.0	1.0	12.8
				Merton Pride	<i>SbSI</i>	3	5	20.0	0.2	2.6
				Pitmaston	<i>SeSi</i>	2	5	100.0	7.8 <sup>z</sup>	
2006	Docteur Jules Guyot	<i>SaSe</i>	2	Beurré d'Amanlis	<i>SbSd</i>	3	5	80.0	0.6	10.3
				Catillac	<i>SbScSs</i>	3	5	100.0	0.8	13.8
				Reimer Red	<i>SbSc</i>	2	5	60.0	5.8 <sup>z</sup>	
2005	Michaelmas Nelis	<i>ShSI</i>	2	Merton Pride	<i>SbSI</i>	3	4	75.0	2.3	30.3
				Honey Sweet	<i>SbSI</i>	2	5	100.0	7.6 <sup>z</sup>	
2006	Pitmaston	<i>SeSi</i>	2	Summer Doyenne	<i>SeSi</i>	2	5	60.0	0.0	0.0
				Beurré Superfin	<i>SeSg</i>	2	5	100.0	3.2 <sup>z</sup>	

<sup>z</sup> SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

(*SbSl*)×‘Merton Pride’ (*SbSl*, 3x)においては種子を形成しなかった (表 4-3). 一方, 三倍体品種を種子親にした交配では, 両方の *S* 対立遺伝子を共有しない二倍体品種の花粉を受粉した場合, ‘Catillac’ (*SbScSs*, 3x)×‘Beurré de l'Assomption’ (*SiSl*), ‘Merton Pride’ (*SbSl*, 3x)×‘Koonce’ (*SaSl*), ‘Beurré d'Amanlis’ (*SbSd*)× ‘Beurré d'Anjou’ (*ScSe*), ‘Vicar of Winkfield’ (*SkSuSx*, 3x)×‘President Héron’ (*SaSl*)の結実率はそれぞれ 80.0%, 80.0%, 90.0%, 100.0%といずれも高かったが, Seeds/Flower は 1.1, 2.2, 3.2, 8.3 となった. ‘Vicar of Winkfield’以外を種子親にした和合組み合わせの他家受粉において充実種子数が少なかったが, 二倍体品種‘Conference’ (*SdSr*)を種子親にした交配における Seeds/Flower, 3.0 を始め, Seeds/Flower が 3 程度となった和合他家受粉が複数認められる (第 1, 2, 3 章). したがって, ‘Merton Pride’, ‘Beurré d'Amanlis’, ‘Vicar of Winkfield’の 3 品種の交配は交雑不和合と判定され, ‘Catillac’は三倍体であることによる部分的雌性不稔である可能性が考えられた. また, 三倍体品種に 2 種類の *S* 対立遺伝子の両方を共有する二倍体品種の花粉を受粉した場合, ‘Catillac’ (*SbScSs*: 3x)×‘Reimer Red’ (*SbSc*)では結実率が 20.0%, Seeds/Flower が 0.1 と算出された. ‘Merton Pride’ (*SbSl*: 3x)×‘Beurré Jean Van Geert’ (*SbSl*)の交配では結実が見られなかった. 結実率が大幅に減少したこと, また, ‘Catillac’の充実種子数が十分の一以下となったことから, どちらの組み合わせも交雑不和合と判定した.

### <考察>

三倍体と記載されている品種の倍数性をフローサイトメトリー分析により調査した. 供試 9 品種のうち, ‘Triomphe de Jodoigne’は盛岡に栽植されていなかったため, その他の 8 品種を用いた. ‘Jargonelle’と‘Pitmaston’以外の 6 品種は, これまでの分類通りに三倍体であることが確認された. ‘Jargonelle’と‘Pitmaston (Pitmaston Duchesse)’は複数の文献で三倍体と記載されているが, 本章の分析では二倍体と判定された. ‘Jargonelle’は CAPS マーカーシステムのプライマーセットでは *Sm-RNase* 対立遺伝子しか検出されず, RACE クローニングにより *Sx-RNase* がクローニングされたことから, *SmSx* と *S* 遺伝子型が推定された. 盛岡に栽植されている‘Jargonelle’の果実が短びん形であるのに対し, 「The Pears of New York」に掲載されている‘Jargonelle’の果実は長びん形であり, その形を模した「Jargonelle Pears」という名のキャンディーがイギリスで販売されている (図 4-6). したがって, 本章で供試した‘Jargonelle’は, 多くの論文で三倍体とされている‘Jargonelle’の同名異種であると推測される. 一方, ‘Pitmaston’の *S* 遺伝子型は CAPS マーカーシステムにより *SeSi* と推定され, 同じ推定 *S* 遺伝子型の‘Summer Doyenne’の花粉に対して交雑

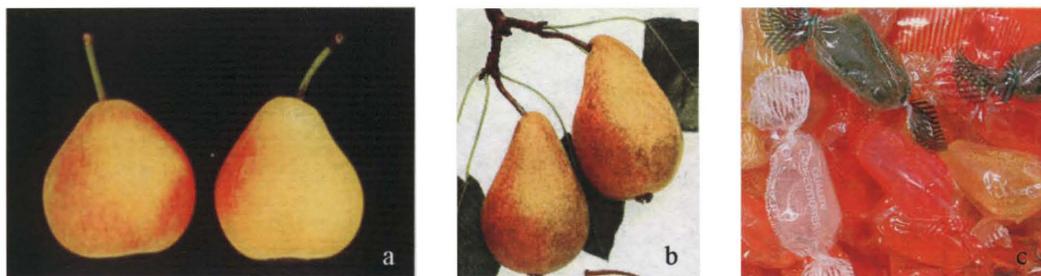


図4-6 盛岡に栽植されている‘Jargonelle’の果実 (a), 「The Pears of New York」に描かれている‘Jargonelle’の果実 (b), および、イギリスの飴菓子‘Jargonelle Pears’ (c).

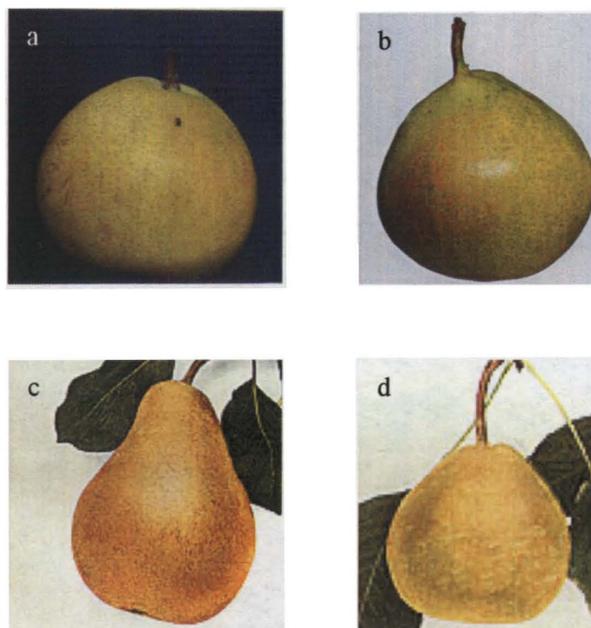


図4-7 盛岡に栽植されている‘Pitmaston’ (a), ‘Summer Doyenne’ (b)の果実, および、「The Pears of New York」に描かれている‘Pitmaston’ (c), ‘Summer Doyenne’ (d)の果実.

不和合を示したことから、*S* 遺伝子型に間違いはない。しかし、‘Pitmaston (Pitmaston Duchess)’は ‘Duchesse d’Angouleme’ (*SaSe*)×‘Glou Morceau’ (*SbSg*)の交雑実生であるとされており (Crawford 1996), 本章での推定 *S* 遺伝子型 *SeSi* はこの交配組み合わせからは生じない。また、盛岡に栽植されている‘Pitmaston’の果実が円形であるのに対し、「The Pears of New York」に掲載されている‘Pitmaston’の果実は倒卵形である (図 4-7)。したがって、本章で供試した‘Pitmaston’は二倍体であること、*S* 遺伝子型が親品種の遺伝子型と矛盾すること、果実の形が異なることから、‘Pitmaston (Pitmaston Duchesse)’の同名異種である可能性が高いと考えられた。盛岡に栽植されている‘Pitmaston’と‘Summer Doyenne’は花や果実の特徴が似ており、‘Summer Doyenne’が誤って‘Pitmaston’と表記されているかもしれない。この推測が正しければ両品種が同じ *S* 遺伝子型を有するのは当然であり、‘Pitmaston’が二倍体と判定されたことも説明がつくと考えられる。

三倍体品種の *S* 遺伝子型は、最終的に、ゲノミック PCR 産物および cDNA 断片の塩基配列の解析により決定された。第 2, 3 章でクローニングされた 17 種類の *S-RNase* 対立遺伝子および推定 *So-RNase* 対立遺伝子とは異なる配列を持つ 2 種類の推定 *S-RNase* 対立遺伝子が‘Vicar of Winkfield’および‘Beurré Diel’と‘Triomphe de Jodoigne’から得られ、*Su* および *Sv* と名付けられた。*Su-RNase* の cDNA 完全長塩基配列は RACE クローニングにより決定され、イントロンの配列も明らかになった。*Su-RNase* 対立遺伝子はゲノミック PCR より約 350 bp 断片として増幅され、*EcoO109I* のみで 267 bp と 109 bp の断片に切断される。そのため、260 bp と 109 bp に切断される *Sd-RNase* と区別できない。一方、*Sv-RNase* は‘Beurré Diel’と‘Triomphe de Jodoigne’から花柱をサンプリングできず、cDNA 完全長塩基配列を決定できなかった。推定 *Sv-RNase* 対立遺伝子は 145 bp のイントロンを含む 345 bp の断片として増幅され、*SphI* のみで 234 bp と 111 bp に切断される。そのため、233 bp と 112 bp に切断される *Sa-RNase* と区別できない。これら 2 種類の新規 *S-RNase* 対立遺伝子以外にも、セイヨウナシ品種には 17 種類の *S-RNase* 対立遺伝子を識別できる CAPS マーカーシステムで識別できない新規 *S-RNase* 対立遺伝子が存在する可能性が高いと考えられる。

‘Vicar of Winkfield’からは、ゲノミック PCR により *Sk*-および *Su-RNase* 対立遺伝子のみが増幅されたが、3’RACE により *Sk*-および *Su-RNase* cDNA 断片に加え、第 3 章でクローニングされた *Sx-RNase* も増幅された。また、‘Jargonelle’からはゲノミック PCR により *Sm-RNase* 対立遺伝子のみが増幅され、RACE クローニングにより *Sx-RNase* が増幅された。さらに、*Sx-RNase* は、‘Vicar of Winkfield’の花柱と花弁、および、‘Jargonelle’の花柱、花弁、葯で発現していた。したがって、第 3 章と同様に本章においても *Sx-RNase* が *S-RNase* 対立遺伝子であるかを結論づけることができな

かった。

ゲノミック PCR と 3'RACE クローニングにより 'Beurré d'Amanlis'からは *Sb*-および *Sd-RNase* の断片のみが, 'Merton Pride'からは *Sb*-および *Sl-RNase* の断片のみが増幅され, 各品種 2 種類の *S-RNase* 対立遺伝子しか検出されなかった. 3'RACE に用いたフォワードプライマー 'FTQQYQ' の配列はナシ亜科のセイヨウナシ, ニホンナシ, リンゴの *S-RNase* のほぼすべてに保存されている. 本研究の 3'RACE の方法でクローニングできない新規 *S-RNase* 対立遺伝子が存在する可能性は低いと思われ, これら品種はどちらかの *S-RNase* 対立遺伝子を重複して持つと考えられる. 'Merton Pride'は 'Glou Morceau' (*SbSg*) × 'Bartlett' (*SbSbSISl*, 4x) の交雑実生である. 四倍体の 'Bartlett'は自家和合性を示すことから (Modlibowska 1942), 'Glou Morceau' と和合になる花粉の *S* 遺伝子型は *SbSl* または *SISl* と考えられる. よって, 'Merton Pride'の *S* 遺伝子型は *SbSbSl* または *SbSISl* であると推測される.

'Merton Pride'以外の三倍体品種は, 'Merton Pride'のように二倍体品種と四倍体品種の交雑により自然に生じた可能性が考えられるが, 非還元卵細胞(2n)と花粉 (2n)がその成立に関与している可能性もある. リンゴの三倍体品種は, 'Jonagold' (*S2S3S9*) ['Golden Delicious' (*S2S3*) × 'Jonathan (紅玉)' (*S7S9*)], '陸奥' (*S2S3S20*) ['Golden Delicious' (*S2S3*) × '印度' (*S7S20*)], 'Hac 9' (*S1S3S9*) ['ふじ' (*S1S9*) × 'つがる' (*S3S7*)], 'Spigold' (*S1S2S3*) ['Red Spy' (*S1S3*) × 'Golden Delicious' (*S2S3*)], '静香' (*S2S3S20*) ['Golden Delicious' (*S2S3*) × '印度' (*S7S20*)], 'さんたろう' (*S3S9S19*) ['はつあき' (*S3S9*) × 'Starking Delicious' (*S9S19*)]などがあり, 種子親から 2 種類の *S* 対立遺伝子を受け継いでいることから (Sakurai et al. 2000), 非還元分裂により生じた卵細胞 (2n) がその成立に関与しているとされる. 'Merton Pride'以外の三倍体品種は親品種の由来が不明であるので, その成立に非還元卵細胞(2n)と花粉 (2n)のどちらが関与しているかについて言及することはできない.

'Catillac', 'Merton Pride', 'Beurré d'Amanlis', 'Vicar of Winkfield'は雄性不稔性であった. 'Merton Pride'の花粉稔性は年次変動したが, 三倍体品種は基本的に雄性不稔であると考えられた. 一方, 'Catillac'は, 和合受粉の Seeds/Flower が 1.1 であることから, 部分雌性不稔であると考えられた. おそらく, 三倍体であることにより, 正常な卵細胞の形成や受精後の胚発達など起こりにくいのであろう. 'Merton Pride'と 'Beurré d'Amanlis'は, 和合受粉の Seeds/Flower がそれぞれ 2.2 と 3.2 であるが, 二倍体品種を種子親にした和合他家受粉でも Seeds/Flower が 3.0 程度になる場合があることから, 雌性不稔ではないと判定した.

三倍体品種に *S* 遺伝子型が完全に重複しない二倍体品種を交配した 'Catillac' (*SbScSs*) ×

‘Beurré de l'Assomption’ (*SiSl*)と‘Merton Pride’ (*SbSl*)×‘Koonce’ (*SaSl*)では、それぞれ結実率 80.0% (1.1 Seeds/Flower)と結実率 80.0%, (2.2 Seeds/Flower)であったが、重複する二倍体品種を交配した場合、‘Catillac’ (*SbScSs*)×‘Reimer Red’ (*SbSc*)では結実率 20.0% (0.1 Seeds/Flower)を示し、‘Merton Pride’ (*SbSl*)×‘Beurré Jean Van Geert’ (*SbSl*)では結実しなかった。したがって、三倍体品種の花柱において S-RNase は正常であり、雌しべの S ハプロタイプは二倍体品種と同様に機能していると考えられる。三倍体品種の栽培においては、三倍体品種、三倍体品種に対して和合な二倍体品種、さらに、その二倍体品種に対して和合な二倍体品種、の少なくとも3品種の混植が必要とされていた。しかし、‘Catillac’のように部分的な雌性不稔性を示す可能性を考慮すると、三倍体品種の S 対立遺伝子を共有しない品種が受粉樹品種により適しているだろう。

‘Williams (Bartlett)’ (*SeSl*), ‘Conference’ (*SdSr*), ‘Abbé fetal’ (*SaSb*), ‘Rocha’ (*SaSe*), ‘Coscia’ (*SbSk*), ‘Docteur Jules Guyot (Precoce)’ (*SaSe*), ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*), ‘Beurré d’Anjou’ (*ScSe*), ‘Packam’s Triumph’ (*SeSk*)など世界の主要品種は供試した三倍体品種と完全に重複する S 遺伝子型を持たない。これら品種が大部分を占める果樹園で三倍体品種を生産する場合には、主力品種と交雑和合の品種を混植することで結実の安定化を図ることができると考えられる。

ヨーロッパ北東部の諸国では、‘Alexander Lucas’や‘Vicar of Winkfield (Curé)’が主要品種となっている。本章および第 2, 3 章の結果から各国の主要栽培品種は、ドイツの‘Conference’ (*SdSr*), ‘Alexander Lucas’ (*SbSeSs*), ‘Fondante de Charneu’ (*SIPpS2*), ‘Clapp’s Favourite’ (*SdSe*), オランダの‘Conference’ (*SdSr*), ‘Doyenné du Comice’ (*SaSb*), ‘Alexander Lucas’ (*SbSeSs*), スウェーデンの‘Clara Frijs’ (*SeSx*), ‘Conference’ (*SdSr*), ‘Alexander Lucas’ (*SbSeSs*), ポーランドの‘Clapp’s Favourite’ (*SdSe*), ‘Alexander Lucas’ (*SbSeSs*), ‘Conference’ (*SdSr*), ‘General Leclerc’ (*SISq*), ブルガリアの‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Vicar of Winkfield (Curé)’ (*SkSuSx*), ‘Beurre Bosc’ (*ShSx*), ‘Clapp’s Favourite’ (*SdSe*), ‘Beurre Hardy’ (*ScSa*)が、ロシアの‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Flemish Beauty’ (*SdSe*), ‘Vicar of Winkfield (Curé)’ (*SkSuSx*), ‘Beurre Bosc’ (*ShSx*), ‘Kieffer’ (*SISr*), セルビアの‘Bartlett’ (*SeSl*), ‘Passe Crassane’ (*SgSr*), ‘Vicar of Winkfield (Curé)’と推定された。‘Alexander Lucas’ (*SbSeSs*)の栽培が多いドイツでは、‘Conference’ (*SdSr*)や‘Clapp’s Favorite’ (*SdSe*)が二倍体の主力品種である。両品種は相互に交雑和合で、‘Alexander Lucas’とも交雑和合の関係であり、特に、‘Alexander Lucas’と‘Conference’は S 対立遺伝子を重複しない。また、3 品種の開花期は‘Alexander Lucas’, ‘Conference’, ‘Clapp’s Favorite’の順になっており、‘Conference’は‘Alexander Lucas’および‘Clapp’s Favorite’の受粉樹として推奨されている (Keepers Nursery ホームページ)。したがって、これら 3 品種の混植園では安定的な結実が得られると推測される。ドイツ以外の国の主要栽培品種の

中にも‘Alexander Lucas’とS遺伝子型が重複する品種が存在しなかったので、主要品種の混植園では十分な結実が得られると考えられる。ブルガリア、ロシア、セルビアの主要品種のうち、‘Bartlett’ (SeS), ‘Clapp’s Favourite’ (SdSe), ‘Beurre Hardy’ (ScSd), ‘Flemish Beauty’ (SdSe), ‘Kieffer’ (S/Sr), ‘Passe Crassane’ (SgSr)は‘Vicar of Winkfield (Curé)’と開花期が近いので、これら品種の混植園では十分な結実が期待できるであろう。

三倍体品種のうち、‘Alexander Lucas’ (SbSeSs)および‘Beurré Diel’ (SbSeSv)は、果皮が赤い品種として人気のある‘California’や‘Cascade’を含む遺伝子型 SbSe の品種とは交雑不和合の関係にあたる。果樹園全体で不和合組み合わせだけの品種構成になることはほとんどないと考えられるが、これら品種が隣り合うような栽植計画を避けるといった細かい配慮がより安定した生産につながるであろう。本章で推定した三倍体品種の S 遺伝子型が、第 2, 3 章での二倍体品種の S 遺伝子型情報とともに効率的な品種選択および栽植計画に貢献すると期待される。

## 第 5 章

### ‘グランド・チャンピオン (Grand Champion)’の部分的自家和合性

#### <摘要>

‘Grand Champion’ (*SbSe*)の部分的自家和合性の原因を解析した。部分的自家和合性は変異親品種の‘Gorham’に由来していた。‘Grand Champion’と自家不和合性品種 (*SbSe*)の正逆交雑の結果、部分的自家和合性は雌しべ側に起因していることが明らかになった。そこで、‘Grand Champion’の *S-RNase* の変異と発現を解析した。‘Grand Champion’からクローニングした *Sb-RNase* cDNA 配列には 2 つの非同義置換が見出された。置換をもつ *Sb'-RNase* は ‘Gorham’に加え、自家不和合品種にも見出された。また、‘Grand Champion’の *Sb'-*と *Se-RNase* の発現量、タンパク質量、*RNase* 活性は自家不和合品種と同等であった。‘Grand Champion’の自殖後代では *Sb'Sb':Sb'Se:SeSe* が 1:2:1 に分離していた。以上の結果から、‘Grand Champion’の部分的自家和合性の原因は *S-RNase* ではなく、*S* 遺伝子座に連鎖しない *S-RNase* 以外の雌しべ側因子によるものと推察された。

#### <緒言>

セイヨウナシ、ニホンナシ、リンゴ、オウトウ、ウメ、アーモンド、アンズなどのバラ科果樹は自家不和合性を有するので、果樹園では安定的な結実確保のために交雑和合となる受粉樹の混植や人工受粉が不可欠である。しかしながら、受粉樹の混植については、樹種によっては経済品種が特定の品種に偏重する傾向の中で受粉樹となりうる品種が不足しつつあり、受粉樹の導入により果樹園としての経済性が低下することが問題となっている。また、訪花昆虫を利用した受粉は、昆虫の活動に影響する開花期間の低温や風雨などの天候条件により結実が左右される。一方、人工受粉は結実を確保できるが、短期間に多くの労働力を必要とし、コストがかかる。さらに、今後、生産者の高齢化および後継者不足が予想される状況においては、労働力の確保も容易ではない。そのため、受粉作業および受粉樹の導入を必要とせず十分な結実を確保することができる自家和合性品種の育成が望まれている。

様々な樹種において、自家和合性品種が育成・導入されている。ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia*)では、‘おさ二十世紀’ ( $S2S4^{mm}$ )が‘二十世紀’ ( $S2S4$ )の枝変わり突然変異として見出され、1979年に品種登録されている。また、‘おさ二十世紀’への $\gamma$ 線照射により黒斑病抵抗性を持つ‘おさゴールド’ ( $S2S4^{mm}$ )が、‘おさ二十世紀’の自家受粉により自家和合性後代を効率的に獲得できる‘なし中間母本農1号’が選抜・育成されている (増田ら 1997; 壽ら 2003)。リンゴ (*Malus × domestica*)では、‘Ralls Janet (国光)’ ( $S1S2$ )×‘Jonathan (紅玉)’ ( $S7S9$ )の交雑後代から育成された‘恵’ ( $S2S9$ )と、‘Starking Delicious’ ( $S9S19$ )と‘Golden Delicious’ ( $S2S3$ )の交雑実生である‘弘大1号’ ( $S2S19$ )が自家和合性品種として報告されている (Matsumoto et al. 1999; 李ら 2002)。甘果オウトウ (*Prunus avium*)では、 $\gamma$ 線を照射した‘Napoleon’ ( $S3S4$ )の花粉を‘Emperor Francis’ ( $S3S4$ )に交雑した実生から、2つの自家和合性系統J12420 ( $S4S4$ )とJ12434 ( $S3'S4$ )が選抜され、‘Lambert’ ( $S3S4$ )×‘J12420’ ( $S4S4$ )の交雑実生から‘Stella’ ( $S3S4$ )が選抜・育成されている (Ushijima et al. 2004)。「Stella」は交配親としても用いられ、‘Van’ ( $S1S3$ )×‘Stella’ ( $S3S4$ )の交雑後代から、‘Lapins’ ( $S1S4$ )、‘Sunburst’ ( $S3S4$ )、‘Newstar’ ( $S3S4$ )が選抜された。さらに、‘Van’ ( $S1S3$ )×‘Newstar’ ( $S3S4$ )から‘Celeste’ ( $S1S4$ )および‘Sweetheart’ ( $S3S4$ )が、‘Van’ ( $S1S3$ )×‘Stella’ ( $S3S4$ )の交雑後代間の交配では、‘Lapins’ ( $S1S4$ )×‘2N-39-5’から‘Sonata’ ( $S3S4$ )が、‘2C61-18’×‘Sunburst’ ( $S3S4$ )から‘Sandra Rose’ ( $S3S4$ )が、‘Bing’ ( $S3S4$ )×‘Stella’ ( $S3S4$ )の後代系統‘2N-60-07’と‘Van’ ( $S1S3$ )×‘Stella’ ( $S3S4$ )の後代系統‘2N-38-32’の交配から‘Skeena’ ( $S1S4$ )が育成されている。ウメ (*P. mume*)では、‘越の梅’ ( $S3Sf$ )、‘林州’ ( $S3Sf$ )、‘地藏梅’ ( $S3Sf$ )、‘織姫’ ( $S6Sf$ )、‘紅さし’ ( $S8Sf$ )、‘竜峡小梅’ ( $S8Sf$ )、‘剣先’ ( $SfSf$ )などの多くの自家和合性品種が栽培されている (Tao et al. 2002)。福井県において選抜・育成された‘新平太夫’ ( $S3Sf$ )、‘地藏梅’ ( $S3Sf$ )の自然交雑実生から選抜された‘八郎’ ( $S8Sf$ )などの新品種も育成されている (田辺ら 1986; 山口ら 2002)。アーモンド (*P. dulcis*)においても、‘Falsa Barese’ ( $S1Sf$ )、‘Filippo Ceo’ ( $S1Sf$ )、‘Genco’ ( $S1Sf$ )、‘Tuono’ ( $S1Sf$ )など多くの自家和合性品種が栽培されている (Boskovi'c et al. 1997)。また、単植園を可能にする自家和合性品種の育種計画が行なわれ、‘Lauranne’ ( $S3Sf$ ) [‘Ferragnes’ ( $S1S3$ )×‘Tuono’ ( $S1Sf$ )]、‘Steliette’ ( $S3Sf$ ) [‘Ferragnes’ ( $S1S3$ )×‘Tuono’ ( $S1Sf$ )]、‘D-3-5’ ( $S8Sf$ ) [‘Titan’ ( $S-S$ )×‘Tuono’ ( $S1Sf$ )]、‘R973’ ( $S1Sf$ ) [‘Ferragnes’ ( $S1S3$ )×‘Tuono’ ( $S1Sf$ )]、‘R987’ ( $S8Sf$ ) [‘Tardy Nonpareil’ ( $S7S8$ )×‘Tuono’ ( $S1Sf$ )]などが交雑実生から選抜されている。‘Nonpareil’ (*ScSd*)の枝変わりとして見出された‘Jeffries’ (*ScmSd*)も自家和合性品種である (Kester et al. 1994)。

一方で、これら自家和合性品種は自家不和合性機構を解明するための材料としても用い

られている。アーモンドの自家和合性品種‘Jeffries’ (*ScmSa*)では*Sc*ハプロタイプ全体が欠失している (Ushijima et al. 2001)。雌しべ側*S*遺伝子産物が*S-RNase*であることは、雌しべ側変異体を用いた解析により証明されている。ニホンナシ品種‘おさ二十世紀’(*S2S4<sup>sm</sup>*)の*S4<sup>sm</sup>*ハプロタイプでは*S4-RNase*のゲノム領域が4 kb以上欠失している (Sassa et al. 1997)。アーモンドの自家和合性品種が有する*Sf*ハプロタイプは、*Sf-RNase*が活性を持っておらず (Boskovi'c et al. 1997)、*Sf-RNase*の推定アミノ酸配列において高次構造形成に関与するシステインが1箇所保存されていないことから (Ma et al. 2001)、立体構造の変化による*RNase*活性の喪失が推測される。花粉側*S*遺伝子はナシ亜科からは同定されていないが、サクラ亜科からF-boxタンパク質遺伝子*SLF* (*S-Locus F-box*)/*SFB* (*S-locus F-Box*)が同定されている (Ushijima et al. 2003; Entani et al. 2003; Yamane et al. 2003b, c; Ikeda et al. 2004; Sonneveld et al. 2005; Vaughan et al. 2006)。F-boxタンパク質は、ユビキチンが介在するタンパク質分解経路(26S/プロテアソーム経路)に関与し、Skp1, Cullin-1, F-boxタンパク質, Rbx1からなるSCF複合体を形成する。SCF複合体によりポリユビキチン化された標的タンパク質が26S/プロテアソームで分解されるので、*SLF/SFB*と*S-RNase*の相互作用により自家不和合反応が制御されると考えられている。花粉側*S*遺伝子産物が*SLF/SFB*であることは、花粉側変異体を用いて証明されている。甘果オウトウの自家和合系統‘J12434’ (*S3'S4*)の*S3'*ハプロタイプでは*SFB3*のゲノム領域が欠失し (Sonneveld et al. 2005)、『J12420’ (*S4S4*)の*S4'*ハプロタイプでは*SFB4*の翻訳領域内の4塩基の欠失により読み枠がシフトしたことで停止コドンが生じ、機能を持たない短い*SFB4*が合成されている (Ushijima et al. 2004; Sonneveld et al. 2005)。ウメの自家和合性品種が有する*Sf*ハプロタイプでは、*SFBf*の翻訳領域内に6.8 kb断片が挿入され、機能を持たない短い*SFB*が合成されている (Ushijima et al. 2004)。二倍体の甘果オウトウと四倍体のドワーフチェリー (*P. fruticosa*)の異質四倍体である酸果オウトウには雌しべ側および花粉側*S*遺伝子の変異による機能不全のハプロタイプが多い。‘Erdi Botermo’ (*S4S6mSaSnull*)の*S6m*ハプロタイプでは、*S6-RNase*のプロモーター領域に約2600 bp断片が挿入され、*S6-RNase*の転写が阻害されている (Yamane et al. 2003a)。‘Cigány 59’ (*S6m2S9S26Sa*)の*S6m2*ハプロタイプでは、C2領域に1 bpの欠失があり、RC4下流で停止コドンが生じた結果、短い*S6-RNase*が合成されると予想される (Tsukamoto et al. 2006)。‘Montmorency’ (*S6S13mSaSnull*)の*S13m*ハプロタイプでは、C3領域下流の10 bpの欠失により停止コドンが生じ、保存領域RC4以降を持たない短い*S13-RNase*が合成されると予想される (Tsukamoto et al. 2006)。一方、‘Újfehértói Fürtös’ (*S1'S4SdSnull*)の*S1'*ハプロタイプでは、*SFB1*の開始コドン

から225 bp下流に615 bpの非自律性トランスポゾン (*Ds*)様配列の挿入があり、短いSFB1が合成されると予想されている (Hauck et al. 2006b). ‘Rheinische Schattenmorelle’ (*S6S13/S26Sa*)の*S13*ハプロタイプでは、*SFB13*の開始コドンから数えて733番目の塩基がグアニンからチミンに置換したことにより停止コドンが生じ、HVaおよびHVbを含む下流部分を欠いた短いSFB13が合成されると予想される (Tsukamoto et al. 2006). また、*Snull*ハプロタイプは*S-RNase*と*SFB*を含む領域の欠失によると推測されている (Hauck et al. 2006a). 自家和合となる*Sa*ハプロタイプおよび*Sd*ハプロタイプの分子レベルの詳細は明らかではないが、*Sd*ハプロタイプについてはハプロタイプ領域内における少なくとも約2 kbの欠失が予想されている (Hauck et al. 2006a).

甘果オウトウ自家和合性品種‘Cristobalina’ (*S3S6*)とアンズ (*P. armeniaca*)品種‘Canino’ (*S2Sc*)は花粉側の機能を欠失しているが、どちらの変異も*S*遺伝子座とは連鎖していないことが交配実験と後代解析により明らかにされている (Wünsch and Hormaza 2004; Vilanova et al. 2006). この結果は、自家不和合性反応には、*S-RNase*とSLF/SFBの他に、*S*遺伝子座と連鎖していない因子も関与していることを示唆している. このような因子として、バラ科果樹と同じ配偶体型自家不和合性を示すナス科植物のタバコ (*Nicotiana. alata*)から、HT-Bや120Kが単離・同定されている (O’Brien et al. 2002; Hancock et al. 2005). HT-Bは発達後期の花柱で発現するsmall asparagine-rich proteinであり、*S-RNase*の作用に直接影響を与えない. 120K (分子量約120 kDaの糖タンパク質)は花柱の細胞外マトリックスに多量に存在するアラビノガラクトサンであり、*S-RNase*と結合して伸長中の花粉管に取り込まれる. HT-Bや120Kの発現を抑制した植物体では*S*特異的な花粉管の拒絶が阻害され、表現型が自家不和合から自家和合に変化することが明らかにされている (Kondo et al. 2002ab; Cruz-Garcia et al. 2005; Hancock et al. 2005). 配偶体型自家不和合性機構を説明する最新のモデルとして提案されたコンパートメントモデルには、*S-RNase*とSLF/SFBに加え、HT-Bが登場している (Goldraij et al. 2006; McClure et al. 2006, 図5-1).

第1章では、セイヨウナシ品種‘Grand Champion’を部分的自家和合性と判定した. セイヨウナシでは、部分的および完全な自家和合性として二倍体の‘Fertility’といくつかの四倍体品種から報告されているが (Crane and Thomas, 1939), これら品種の和合性の原因は調査されていない. 同じナシ亜科では、リンゴ品種‘恵’ (*S2S9*)および‘弘大1号’ (*S2S19*)の自家受粉の結実率はそれぞれ33.5~54.0%および24.0~88.6%を示し、果実あたり1.7個および2.0~4.2個の充実種子が得られたことから (李ら 2002; Matsumoto et al. 1999), ‘Grand Champion’

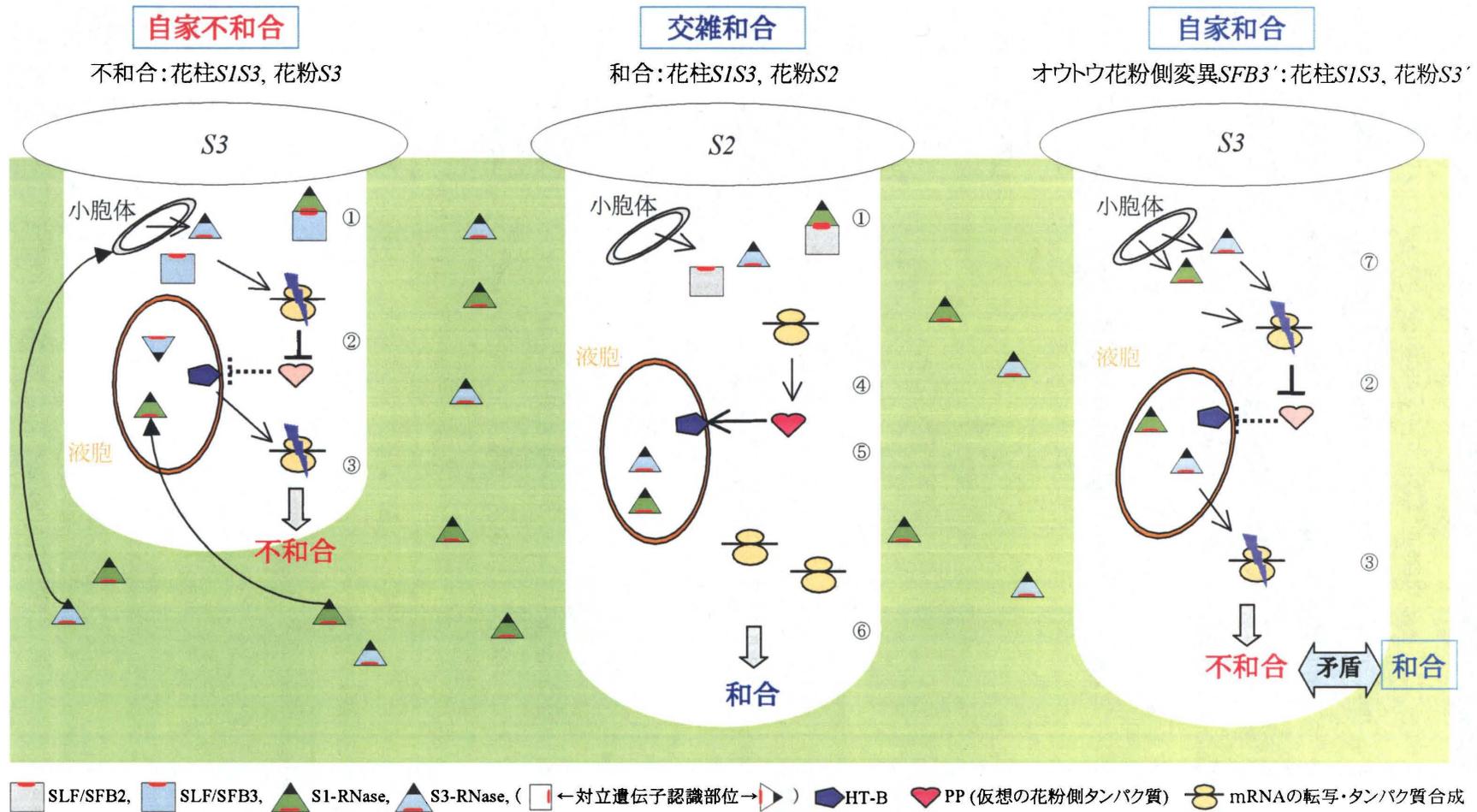


図5-1 S-RNaseが非特異的に液胞に囲い込まれるコンパートメントモデル (HT-Bが液胞による囲い込みを破る作用を持ち、HT-Bを抑制する花粉側タンパク質(PP)が存在すると仮定する)。(Goldraj et al. 2006). S-RNaseはHT-Bおよび120Kとともに、エンドサイトーシスにより非特異的に花粉管に取り込まれ液胞に囲い込まれる。一般的な細胞毒素の動態と同様に、一部のS-RNaseは逆行輸送によりゴルジ体、小胞体を経て細胞質に放出されると推測される (McClure et al. 2006)。不和合花粉が受粉した場合: ①SLF/SFBは異なるハプロタイプのス-RNaseとより結合しやすい (Hua et al. 2006)。異なるハプロタイプのス-RNaseと結合したス-RNaseは、26S/プロテアソーム経路で分解される。②同じハプロタイプのス-RNaseはSLF/SFBと結合せず、rRNAを分解する。PPが作られないのでHT-Bの働きを抑制できない。③HT-Bの作用により液胞が崩壊し、ス-RNaseや液胞に大量に含まれるス-RNase以外のRNaseおよびDNaseが細胞質に放出される。ス-RNaseによる代謝阻害、または、RNaseやDNaseによる細胞死が起きた結果 (杉山ら 2005)、花粉管伸長が停止し、不和合となる。和合花粉が受粉した場合: ④正常な代謝によりPPが合成される。⑤PPがHT-Bの働きを抑制するので、ス-RNaseは液胞に囲い込まれたままになる。⑥正常なmRNAの転写からタンパク質が合成される結果、花粉管が伸長し、和合となる。甘果オウトウの花粉側変異S3が自家受粉した場合: ⑦SFB3を欠失しているため、花粉管内にSFBは存在しない。細胞質に放出されたス-RNaseがrRNAを分解する。②、③を経て、不和合となるため、自家和合の表現型と矛盾する。

と同じ部分的自家和合性に分類されると思われる。‘恵’に同じ *S* 遺伝子型の‘Red Gold’ (*S2S9*)および‘金星’ (*S2S9*)の花粉を受粉した場合には単為結果による無種子果実しか得られていない。また、‘Red Gold’および‘金星’に対する‘恵’の交配では結実が見られない。さらに、自殖後代には *S2S2*, *S2S9*, *S9S9* の *S* 遺伝子型が確認された。したがって、‘恵’の自家和合性の原因は雌しべ側および花粉側の *S* 対立遺伝子の変異ではないことが示されている (Matsumoto et al. 1999)。*‘恵’*の花柱における *S*-RNase タンパク質量は自家不和合性の‘Starking Delicious’よりも少量であったが、自家和合性との関連は明らかにされていない (李ら 2002; Katoh et al. 2002)。*‘弘大1号’*では、花柱の顕微鏡観察から、自家不和合性品種‘ふじ’ (*S1S9*)よりも花粉管伸長量が大きいたことが示された。*‘弘大1号’*の花柱で発現している *S2*-および *S7*-RNase は自家不和合性品種からクローニングしたものと同じであり、花柱における *S*-RNase の含有量は自家不和合性品種‘Starking Delicious’と同等であった。これらのことから、*‘弘大1号’*の自家和合性は *S*-RNase の消失や極端な量的変化によるものではないことが明らかにされている (李ら 2002)。

本章では、‘Grand Champion’ (*SbSe*)と同じ *S* 遺伝子型を有する品種間で正逆交雑を行ない、‘Grand Champion’の部分的自家和合性が雌しべ側変異であることを明らかにした。‘Grand Champion’から *S*-RNase をクローニングし、塩基配列と発現を解析するとともに、雌しべにおける RNase 含量および活性、自殖後代における *S* 対立遺伝子の分離を解析し、‘Grand Champion’の部分的自家和合性の原因を考察した。

## <材料および方法>

### 材料

独立行政法人農業・食品産業技術研究総合機構果樹研究所リンゴ研究拠点 (岩手県盛岡市)および農業者大学校落葉果樹農業研修所 (岩手県雫石町)に栽培されているセイヨウナシ28品種、および、2002年に行なった‘Grand Champion’の開花自家受粉により結実した果実中の種子に由来する自殖後代67個体を供試した。品種および自殖後代から集めた未展開葉、および、‘Grand Champion’、‘Gorham’ (‘Bartlett’ × ‘Joséphine de Malines’)、‘Highland’、‘California’、‘Cascade’、‘Howell’、‘Joséphine de Malines’、‘Beurré Jean Van Geert’、‘Bartlett’、‘La France’、‘Doyenné du Comice’ のwhite stage, balloon stageの花から採取した花柱は、液体窒素で急速冷却後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 交配実験

交配実験には‘Grand Champion’, ‘La France’, ‘Highland’, ‘Gorham’, ‘Cascade’, ‘California’, の6品種を用いた。交配および調査は第1章で確立した方法により行なった。2003年5月7日, 2004年5月8日に栗石において, 2004年5月5~7日, 2005年5月9, 10日に盛岡において交配実験を行ない, 交配約10週間後に結実数と充実種子数を調査した。結実率, Seeds/Flower, SI index を算出し, 不和合・和合を判定した。

## ゲノミック PCR および塩基配列の解析

第2章の方法に従い, ‘Grand Champion’, ‘Gorham’, *Sb-RNase* 対立遺伝子を有する品種および‘Grand Champion’の自殖後代からゲノム DNA を抽出した。プライマー‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いた CAPS マーカーシステム (第3章)により自殖後代の *S* 遺伝子型を推定した。*Sb-RNase* 対立遺伝子は, *Sb-RNase* cDNA の HV 領域および3'末端領域の配列に基づいて設計した特異的プライマーセット‘EpHVf-Sb’ (5'-AAATATTGCAAGGCGCCG-3') および‘anti-Epend-Sb’ (5'-CTGAATATTGGTGGGGC-3')を用いて断片を増幅した。「塩基配列の決定」は第2章の方法に従った。

## RACE クローニング

第2章の方法に従い, 3'および5'RACEクローニングを行なった。3'RACEにおいては, first PCR にプライマーセット‘FTQQYQ’と‘NotI-(dT)<sub>18</sub>’を, second PCR にプライマーセット‘FTQQYQ’と‘NotI-dT’を用いて cDNA の3'末端配列を増幅した。5'RACEにおいては, 逆転写および first PCR にプライマーセット‘AAP’と‘EP-anti-IIWPNV’を, second PCR にフォワードプライマー‘AUAP’と各 *S-RNase* に特異的なりバースプライマー‘HVSb’または‘HVSe’を用いて cDNA の5'末端配列を増幅した。「塩基配列の決定」および「推定アミノ酸配列の解析」は第2章の方法に従った。

## ホモロジーモデリング

*Sb-RNase* および *Sb'-RNase* の立体構造を, ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server (Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)提供)を用いて解析した。SIB 提供の SwissModel First Approach Mode に *Sb-RNase* および *Sb'-RNase* の推定アミノ酸配列を供し, PDB ファイル化されたデータを Swiss-PdbViewer (SIB)により解析した。

## 半定量的 RT-PCR 分析

1 本鎖 cDNA の合成は Rever Tra Ace® (TOYOBO)を用いて行なった. 11 品種の花柱 total RNA 1 µg に 1 mM dNTP mix, 0.5 µM Oligo(dT)<sub>18</sub> プライマー (Promega), 4 µL 10×Buffer, 0.5 U/µL RNase Inhibitor, 1 µL ReverTra Ace®と滅菌水を加えた 20 µL の反応液を作成し, 30°C 10 分加温後 42°C 60 分で反応させた. その後, 99°C 5 分で酵素を失活させた. PCR 反応は Expand High Fidelity PCR system (Roche Diagnostics)を用い, 1 µl の 1 本鎖 cDNA を含む 30 µL の反応系で行なった. *Sb*-および *Se*-RNase の HV 領域および C5 領域下流の cDNA 配列に基づいて設計した *Sb*-および *Se*-RNase 対立遺伝子特異的プライマーセット ‘EpHVf-*Sb*’ (5’-AAATATTGCAAGGCGCCG-3’)と ‘anti-EpC5-*Sb*’ (5’-GTTAAGTTGCTATCGCTG-3’), および, ‘EpHVf-*Se*’ (5’-CCGAAAACCAAGGTGCC-3’) と ‘anti-EpC5-*Se*’ (5’-AAATGTTTTCCGAGGTA-3’)を用いた. また, 内部コントロールとしてユビキチン遺伝子を増幅した. セイヨウナシの推定ユビキチン遺伝子の塩基配列に基づき設計したプライマーセット ‘EP-Ubi-F’ (5’-CGAGGTTGAGAGCTCTGAC-3’) と ‘EP-Ubi-R’ (5’-GAACGAGGTGGAGGGTAGAC-3’)を用いて, ユビキチン遺伝子が指数関数的に増幅される PCR 条件を検討した. PCR は 94°C 15 秒の変性, 48°C 30 秒のアニーリング, 72°C 2 分の伸長反応を 10 サイクル行なった後, 94°C 15 秒の変性, 60°C 30 秒のアニーリング, 72°C 2 分の伸長反応を 10 および 15 サイクル行ない, 70°C 7 分の final extension を行なった. PCR 産物は 1.5%アガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色により解析した.

## SDS-PAGE と RNase 活性測定

約 125 本の balloon stage の花柱 (新鮮重約 75 mg)を液体窒素下で磨砕し, 凍結粉末を Polyclar-AT 30 mg および 15 mg/ml アスコルビン酸ナトリウムを含む抽出バッファー (0.1 M Tris-HCl (pH 7.8), 25 mM EDTA) 0.5 ml に融解した. 氷上 4°C で 30 分振盪した後, 4°C, 12,000 rpm で 15 分遠心し, 上清を回収した. 沈殿物を再度抽出バッファー 0.5 ml に融解し, 振盪および遠心した後, 上清を回収した. 両方の上清を合わせて粗抽出液とし, 使用するまで -20°C で保存した. 各粗抽出液中のタンパク質濃度は, ウシ血清アルブミン (BSA)をスタンダードにし, Bradford 法 (1976)により定量した.

タンパク質および RNase 活性を分析するため, 花柱タンパク質 15 µg を含む粗抽出液を SDS-PAGE に供した. 15%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動は 80 V で 20 分の後, 120 V で 120 分行なった. タンパク質は Coomassie brilliant blue (CBB)法と銀染色法で可視化

した。CBB 法では、泳動後のゲルを CBB 溶液 (酢酸:メタノール:水=1:10:9 (v:v:v)に 2.5 g CBB R-250 を融解)に室温 30 分浸漬して染色した後、脱色液 (8%酢酸, 15%メタノール, 10%イソプロパノール)により脱色した。銀染色法には 2D-銀染色試薬・II「第一」 ((株)第一化学薬品工業)を使用した。泳動後のゲルを固定液 I (メタノール 40 ml, 酢酸 8 ml, 脱イオン水 32 ml) 80 ml で 10 分振盪した。固定液 I を捨て、固定液 II (メタノール 24 ml, 酢酸 8 ml, ①固定化剤 4 ml, 脱イオン水 44 ml) 80 ml で 15 分振盪した。固定液 II を捨て、前処理液 (メタノール 40 ml, ②前処理剤 4 ml, 脱イオン水 36 ml) 80 ml で 10 分振盪した。前処理液を捨て、脱イオン水 80 ml で 5 分振盪後、水を捨て、銀染色液 (③染色液 A 4 ml, ④染色液 B 4 ml, 脱イオン水 72 ml) 80 ml で 15 分振盪した。銀染色液を捨て、脱イオン水 80 ml 中での 2 分間の振盪を 3 回繰り返した。水を捨てた後、現像液 (⑤現像原液 4 ml, 脱イオン水 76 ml) 80 ml で振盪し、適度な染色像が得られたところで、⑥停止液 4 ml を注ぎ、よく振盪した。

ゲル中の RNase 活性は Blank et al. (1982) を改変した方法で可視化した。SDS-PAGE 後のゲルを 25% (v/v) イソプロパノールを含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中で 20 分振盪し、これを再度繰り返した。さらに、10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中 15 分振盪による二度の洗浄後、酵母由来 Ribonucleic Acid Sodium Salt 1 mg/ml を含む 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中で、37℃ 120 分振盪した。0.5% (w/v) methylen blue を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中 15 分振盪によりゲルを染色した後、RNase 活性のある部分が透明になり、きれいなコントラストが得られるまで、10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中での振盪を繰り返した。

染色したゲルのバンドパターンをスキャナ (GT-8000, Epson, Japan) で取り込んだ後、染色強度を Image J software (National Institute of Health, USA) を用いて数値化し RNase 活性を比較した。RNase 活性測定は 5 反復行ない、分散分析により統計処理した。

## <結果>

### 自家受粉と正逆交雑

‘Grand Champion’ (SbSe) の部分的自家和合性が、2000 年から 2002 年に交配を行なった弘前大学生物共生教育研究センター藤崎農場 (青森県藤崎町) の樹において偶発的に観察された現象ではなく、品種固有の性質であることを確認するため、2003 年と 2004 年に、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点 (岩手県盛岡市) に場

所を移して交配実験を行なった。両年における‘Grand Champion’の自家受粉の結実率はそれぞれ79.3%および71.4%, Seeds/Flowerは2.0および3.8 Seeds/Flowerと算出された(表5-1)。  
‘Grand Champion’に‘La France’ (*SeSr*)を受粉した和合交配の Seeds/Flower から, ‘Grand Champion’の自家受粉の SI index は40.0 および74.5 と算出され, ‘Grand Champion’が部分的自家和合性であることが再確認された。‘Grand Champion’は‘Gorham’ (*SbSe*)の錆性枝変わり突然変異である。‘Gorham’の自家受粉を行なったところ, 77.8%の結実率を示し, Seeds/Flowerは2.8, SI indexは47.0と算出された(表5-1)。この結果から, ‘Gorham’も部分的自家和合であり, ‘Gorham’の部分的自家和合性が‘Grand Champion’に受け継がれたと考えられた。

‘Grand Champion’と‘Gorham’の部分的自家和合性が雌しべ側と花粉側のどちらに起因するかを調べるため, 両品種と同じ *SbSe* の *S* 遺伝子型を持つ3品種, ‘Highland’, ‘Cascade’, ‘California’を用いて正逆交雑を行なった。‘Highland’に‘Grand Champion’, ‘Gorham’, ‘Cascade’, ‘California’の花粉を受粉したところ, ほとんど結実しなかった。花粉親に用いた4品種の花粉を *S* 遺伝子型の異なる品種に受粉した場合, 充実種子を含む果実が得られたので(データ省略), ‘Highland’に対する‘Grand Champion’, ‘Gorham’, ‘Cascade’, ‘California’の交配組み合わせは交雑不和合であると判定され, ‘Grand Champion’と‘Gorham’の花粉は正常に機能していることが示された。一方, ‘Grand Champion’に‘Highland’, ‘Gorham’, ‘Cascade’, ‘California’の花粉を受粉したところ, 結実率は56.7~79.3%を示し, Seeds/Flowerが0.6~3.2, SI indexが12.0~62.7と算出され, 部分的交雑和合と判定された。このことは, ‘Grand Champion’の雌しべが自家花粉だけでなく, *SbSe* 品種の花粉も完全に拒絶できないことを示し, ‘Grand Champion’と‘Gorham’の部分的自家和合性は雌しべ側に原因があることが明らかになった。

### 部分的自家和合性品種からの *Sb*-および *Se*-RNase のクローニング

‘Grand Champion’の部分的自家和合性の原因として, 雌しべ側 *S* 遺伝子産物である *S*-RNase の機能に異常が起きている可能性が考えられた。そこで, ‘Grand Champion’の花柱から5’RACEと3’RACEにより *Sb*-および *Se*-RNase cDNA をクローニングして, 完全長塩基配列を決定した。*Sb*-および *Se*-RNase の cDNA 完全長塩基配列は, それぞれ678 および696 bpからなり, 226 および232 アミノ酸残基をコードしていた。‘Grand Champion’からクローニングされた *Se*-RNase の塩基配列は‘La France’の *Se*-RNase (accession no. AB236428)の配列と

表5-1 'Grand Champion', 'Gorham', および*SbSe* 遺伝子型品種の自家受粉と他家受粉における結実率と種子数.

調査場所	種子親	S 遺伝子型	調査年	花粉親	S 遺伝子型	交配 花数	結実率 (%)	seeds /flower	SI index				
雫石	Grand Champion	<i>Sb'Se</i>	2003	Grand Champion	<i>Sb'Se</i>	29	79.3	2.0	40.0				
				Gorham	<i>Sb'Se</i>	30	63.3	1.6	32.0				
				Highland	<i>SbSe</i>	30	56.7	0.6	12.0				
				Cascade	<i>SbSe</i>	13	61.5	1.4	28.0				
				La France	<i>SeSr</i>	30	86.7	5.0 <sup>z</sup>					
			2004	Grand Champion	<i>Sb'Se</i>	21	71.4	3.8	74.5				
				California	<i>SbSe</i>	30	60.0	3.2	62.7				
				La France	<i>SeSr</i>	10	80.0	5.1 <sup>z</sup>					
				盛岡	Highland	<i>SbSe</i>	2004	Grand Champion	<i>Sb'Se</i>	30	6.7	0.0	0.0
								Gorham	<i>Sb'Se</i>	28	0.0	0.0	0.0
California	<i>SbSe</i>	30	3.3					0.0	0.0				
Cascade	<i>SbSe</i>	29	0.0					0.0	0.0				
La France	<i>SeSr</i>	30	76.7					4.0 <sup>z</sup>					
Gorham	<i>Sb'Se</i>	2005	Gorham	<i>Sb'Se</i>	27	77.8	2.8	47.0					
			La France	<i>SeSr</i>	26	96.2	5.9 <sup>z</sup>						

<sup>z</sup> SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

完全に一致したが、*Sb-RNase* の塩基配列は‘Doyenné du Comice’の *Sb-RNase* (accession no. AB236429)との間に 3 塩基の置換が見出された。ゲノム DNA から PCR 増幅した断片の塩基配列も解析したところ、*Sb-RNase* ではイントロン内にも 2 塩基の置換を見出した。‘Grand Champion’と‘Doyenné du Comice’との *Sb-RNase* のゲノム DNA 配列間には、合計 5 塩基の違いがあることが明らかになった (図 5-2a)。そこで、‘Grand Champion’から得た *Sb-RNase* を *Sb'-RNase* と名付けた。cDNA の 3 塩基の置換のうち、2 つは非同義置換であり、*Sb-RNase* のグアニンが *Sb'-RNase* においてチミンに置換されたことで、シグナルペプチド領域内のバリン (17)がロイシンへ、シトシンからアデニンへの置換により C5 領域上流のプロリン (158)がトレオニンに変化していた (図 5-2b)。しかしながら、*Sb'-RNase* の推定アミノ酸配列には T2/S 型 RNase の活性に必須な 2 つのヒスチジン残基 (Kawata et al. 1989)と高次構造形成に重要な 8 つのシステイン残基 (Ishimizu et al. 1996)が保存され、5 つの保存領域と HV 領域の推定アミノ酸配列は *Sb-RNase* と同一であったことから、*Sb'-RNase* は *Sb-RNase* とほぼ同じ高次構造および機能を持つと推測された。

そこで、ホモロジーモデリングにより *Sb-RNase* および *Sb'-RNase* の立体構造を推測し、比較した (図 5-3)。*Sb-RNase* および *Sb'-RNase* は、結晶構造解析により立体構造が明らかにされているニホンナシ S3-RNase と 61.4%および 61.7%の相同性を示した。ニホンナシ S3-RNase には 8 つの  $\alpha$ ヘリックスと 7 つの  $\beta$ シートが存在するが (Matsuura et al. 2001), *Sb-RNase* および *Sb'-RNase* の立体構造においては、6 つの  $\alpha$ ヘリックスと 7 つの  $\beta$ シートの存在が推測され、それらの位置はほぼ完全に保存されていた。2 つの S-RNase 間で唯一異なるプロリンとトレオニンは、4 番目の  $\beta$ シートと 5 番目の  $\beta$ シートをつなぐループ部分に存在し、その部分の構造を若干変化させていた。また、推定アミノ酸配列が完全に同じであるにも関わらず、HV 領域に相当する部分の位置が 2 つのタンパク質間で若干異なっていた。

*Sb'-RNase* と部分的自家和合性との関連を検証するために、*Sb* 対立遺伝子を持つ 26 品種の *Sb-RNase* を再解析した。プライマーセット‘EpHVf-Sb’と‘anti-Epend-Sb’を用いたゲノミック PCR により増幅された断片の塩基配列について、イントロン内の 2 つの置換のうち下流の 1 塩基、HV 領域直後における 1 塩基の同義置換、C5 領域上流における 1 塩基の非同義置換を解析し、異同を確認した。‘Doyenné du Comice’および‘Doyenné du Comice’の交雑後代を含む 20 品種は *Sb-RNase* を有していたが、‘Grand Champion’, ‘Gorham’ (‘Bartlett’× ‘Joséphine de Malines’), ‘Joséphine de Malines’, ‘Urbaniste’, ‘Alexander Lucas’, ‘Beurré Diel’の 6 品種は *Sb'-RNase* を有していた (表 5-2)。*‘Grand Champion’の Sb'-RNase* は‘Gorham’の花粉親





(a) Sb- RNase



(b) Sb'-RNase



(c) Sb- RNaseとSb'-RNase

図5-3 ホモロジーモデリングによるSb- RNase (a)およびSb'-RNase (b)の立体構造予測と構造比較 (c). 黄色で囲った部分はHV領域.

表5-2 *Sb*- または *Sb'*-RNaseを有するセイヨウナシ品種の*S*遺伝子型

品種	<i>S</i> 遺伝子型
<i>Sb</i> -RNase対立遺伝子を有する品種	
Abbé fetal	<i>SaSb</i>
Doyenné du Comice	<i>SaSb</i>
Reimer red	<i>SbSc</i>
Catillac <sup>z</sup>	<i>SbScSs</i>
California	<i>SbSe</i>
Cascade	<i>SbSe</i>
Hartman	<i>SbSe</i>
Highland	<i>SbSe</i>
Howell	<i>SbSe</i>
Beurré d'Amanlis <sup>z</sup>	<i>SbSd</i>
Glou Morceau	<i>SbSg</i>
Alexandrine Douillard	<i>SbSk</i>
Beurré Jean Van Geert	<i>SbSl</i>
Canal Red	<i>SbSl</i>
Honey Sweet	<i>SbSl</i>
Merton Pride <sup>z</sup>	<i>SbSl</i>
Triomphe de Jodoigne <sup>z</sup>	<i>SbSlSv</i>
Le Lectier	<i>SbSq</i>
Condo	<i>SbSr</i>
Turnbull Giant	<i>SbSt</i>
<i>Sb'</i> -RNase対立遺伝子を有する品種	
Grand Champion	<i>Sb'Se</i>
Gorham	<i>Sb'Se</i>
Alexander Lucas <sup>z</sup>	<i>Sb'SeSs</i>
Beurré Diel <sup>z</sup>	<i>Sb'SeSv</i>
Joséphine de Malines	<i>Sb'Sl</i>
Urbaniste	<i>Sb'Sr</i>

<sup>z</sup>三倍体品種

である‘Joséphine de Malines’に由来していた。

Sb'-RNase と Sb-RNase の構造の違いが機能に影響を与えないと断言することはできないが、Sb'-RNase を持つ‘Joséphine de Malines’が自家不和合性と判定されていることから、Sb'-RNase のアミノ酸置換が‘Grand Champion’と‘Gorham’における部分的自家和合性に関与している可能性はないと考えられた。

### 半定量的 RT-PCR による Sb- (Sb'-) および Se-RNase の転写量

‘Grand Champion’の部分的自家和合性に Sb'-および Se-RNase の転写量の違いが関連している可能性が考えられる。そこで、11 品種の total RNA を鋳型に半定量的 RT-PCR 解析を行ない、Sb- (Sb'-) および Se-RNase の転写量を比較した (図 5-4)。Sb- (Sb'-) RNase 対立遺伝子を有する‘Grand Champion’、‘Gorham’、‘Highland’、‘California’、‘Cascade’、‘Howell’、‘Doyenné du Comice’、‘Joséphine de Malines’、‘Beurré Jean Van Geert’から 153 bp の断片が、Se-RNase 対立遺伝子を有する‘Grand Champion’、‘Gorham’、‘Highland’、‘California’、‘Cascade’、‘Howell’、‘La France’、‘Bartlett’から 169 bp の断片が増幅された。Sb- (Sb'-) RNase の転写量は‘Gorham’、‘Joséphine de Malines’、‘Doyenné du Comice’において比較的高かった。Se-RNase の発現量は‘Gorham’、‘California’において高く、‘La France’において低かった。遺伝子型 SbSe (Sb'Se) の 7 品種‘Grand Champion’、‘Gorham’、‘Highland’、‘California’、‘Cascade’、‘Howell’では、どの品種においても Sb- (Sb'-) RNase が Se-RNase よりも発現していた。Sb- および Se-RNase は、品種間や対立遺伝子間で転写量に差が認められたが、部分的自家和合性の‘Grand Champion’と‘Gorham’において極端な発現抑制は認められなかった。

### 花柱における S-RNase 量および RNase 活性

‘Grand Champion’、‘Highland’、‘Doyenné du Comice’、‘La France’の花柱粗抽出液を SDS-PAGE に供し、花柱における S-RNase 含量と活性を分析した。CBB 染色および銀染色により得られたタンパク質のバンドパターンは 4 品種ともほぼ同一であった (図 5-5a)。供試 4 品種が有する Sa-, Sb-, Sb'-, Se-, Sr-RNase の平均分子量は cDNA 配列からそれぞれ、26.3, 26.0, 26.1, 26.5, 26.1 と推定された。ニホンナシの 7 種類の S-RNase, S1~S7-RNase は糖タンパク質であり、結合する糖鎖の種類と数により移動度に違いが生じる結果、約 30 kDa の位置に検出されている (Sassa et al. 1993)。セイヨウナシにおいても約 26~30 kDa のバンドが S-RNase に相当すると考えられた。約 26~30 kDa のタンパク質のバンドの濃さを比較した

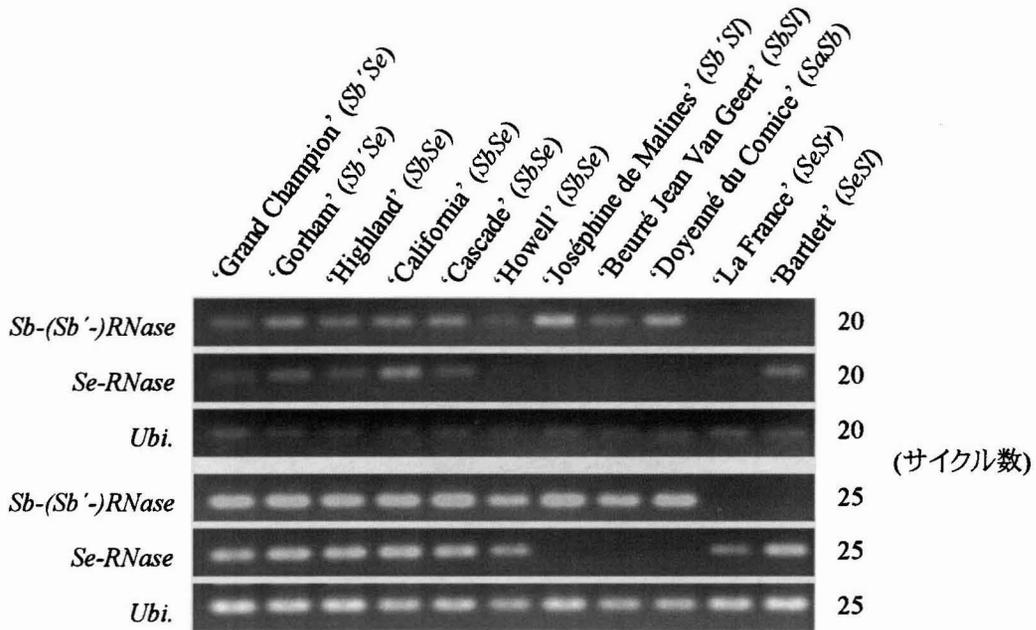


図5-4 半定量的RT-PCRによる*Sb-(Sb'-)*および*Se-RNase*の転写量の比較。右側の数字はPCRサイクル数を示す。ユビキチン遺伝子 (*Ubi.*)を内生コントロールとして用いた。

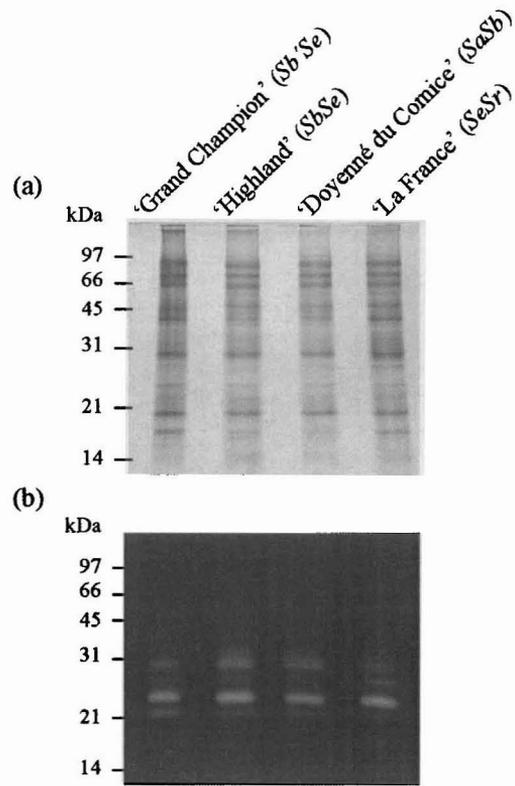


図5-5 花柱粗抽出液のSDS-PAGEによるS-RNase含量(a)とRNase活性(b)の比較。銀染色(a)およびRNase活性染色(b)により可視化した。

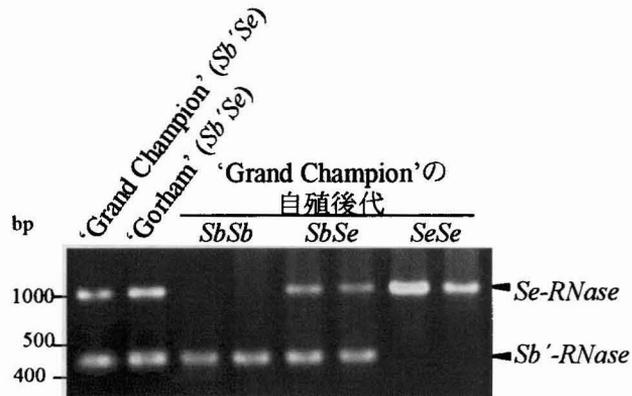


図5-6 'Grand Champion', 'Gorham'および'Grand Champion'の自殖後代からのゲノミックPCRによるS-RNase対立遺伝子の増幅。

ところ、セイヨウナシ4品種の花柱における約26~30 kDa タンパク質含量はほぼ同じであった。

花柱のRNase活性を測定するため、SDS-PAGE後、RNase活性染色を行なった。いずれの品種からも、約22, 25, 27, 30 kDaのタンパク質にRNase活性が検出された(図5-5b)。各バンドの活性強度のパターンには品種により多少の違いがみられたが、約25 kDaのバンドがどの品種においても強い活性を示した。この約25 kDaの活性はニホンナシと同様にnon-SRNaseの活性に相当すると考えられた(未公表データ)。そこで、S-RNaseと推測される約27および30 kDaタンパク質のRNase活性を比較した。‘Grand Champion’、‘Doyenné du Comice’、‘Highland’、‘La France’の約27および30 kDaタンパク質のRNase活性に有意差は認められなかった。

#### ‘Grand Champion’の自殖後代におけるSb-およびSe-RNase対立遺伝子の分離

‘Grand Champion’の自殖後代間におけるS-RNase対立遺伝子の分離を解析し、部分的自家和合性をもたらしている変異がS-RNaseと連鎖しているかを検討した。自殖後代のゲノムDNAからプライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いたPCRによりS-RNase対立遺伝子を増幅した。自殖後代からは440 bp断片(Sb)のみ、440 bp断片(Sb)と998 bp断片(Se)、998 bp断片(Se)のみが検出される個体が分離し、それぞれSb‘Sb’、Sb‘Se’、SeSeとS遺伝子型が推定された(図5-6)。合計67個体からSb‘Sb’が16個体、Sb‘Se’が32個体、SeSeが19個体得られ、1:2:1の分離比に適合していた( $\chi^2 = 0.40$ ,  $p > 0.750$ )。S-RNase対立遺伝子の分離に極端な歪みは見られなかった。

#### <考察>

配偶体型自家不和合性を有するバラ科果樹の育種目標の1つに自家和合性品種の育成がある。‘Grand Champion’は‘Gorham’の銹性枝変わりとして発見された品種であり、生食および貯蔵に適していることに加え(表2-1)、第1章で部分的自家和合性を持つことが示された。よって、‘Grand Champion’は自家和合性品種の育成だけでなく、自家不和合性機構の解明のためにも貴重な材料である。

自家受粉の結果、‘Grand Champion’と同様に‘Gorham’も部分的自家和合であることが明らかになった。部分的自家和合性は銹果皮を生じる突然変異に付随して起きたのではなく、

‘Gorham’がもともと持っている性質であると考えられた。‘Grand Champion’および‘Gorham’の花粉は‘Highland’ (*SbSe*)と交雑不和合であったが、花柱は *SbSe* 遺伝子型品種由来の花粉と部分的交雑和合となった。‘Grand Champion’の部分的自家和合性は雌しべ側に原因があると結論づけられ、原因の1つとして S-RNase の機能異常の可能性が考えられた。

‘Grand Champion’の花柱から *Sb*-および *Se*-RNase cDNA をクローニングしたところ、*Sb*-RNase の翻訳領域に2つの非同義置換を有する *Sb'*-RNase を見出したが、2つのアミノ酸置換は RNase 活性や対立遺伝子特異性に関与する領域外に存在した。ホモロジーモデリングにより立体構造を推定した結果、 $\alpha$ ヘリックスおよび $\beta$ シートの数と位置は保存されていたが、アミノ酸変異部分に加えて、HV 領域の部分が2つのタンパク質間で若干ずれていた。構造の変化は、おそらくアミノ酸変異の影響であろうと推測されるが、活性および対立遺伝子特異的認識に対する影響は不明である。しかしながら、この変異を持つ *Sb'*-RNase 対立遺伝子は部分的和合性を示す‘Grand Champion’と‘Gorham’だけでなく、自家不和合性品種からも見出された。したがって、*Sb'*-RNase のアミノ酸置換が部分的自家和合性の原因ではないと推測した。

ナス科のジャガイモ野生種 *Solanum chacoense* にみられる散発性自家和合性系統では、S-RNase タンパク質量が少ない系統ほど多くの自家花粉を許容することから、S-RNase 量の閾値が和合性に関与していると推察されている (Qin et al. 2006)。*‘Grand Champion’*と‘Gorham’の *Sb'*-と *Se*-RNase は、品種により多少の差は認められたものの、自家不和合性品種と同程度発現していた。また、‘Grand Champion’における S-RNase 量と RNase 活性は自家不和合性の‘Highland’とほぼ同じであり、‘La France’よりも多いことから、‘Grand Champion’の花柱には自家花粉を拒絶できる十分な量の S-RNase が含まれていると推測した。よって、‘Grand Champion’の部分的自家和合性と S-RNase の量は関係していないと考えられる。

‘Grand Champion’の自殖後代において、*S* 遺伝子型が *Sb'Se* と *Sb'Sb'*、または、*Sb'Se* と *SeSe* の個体だけが分離すれば、それぞれ *Sb'*-または *Se*-RNase が機能していないことが示される。しかし、自殖後代から *Sb'Sb' : Sb'Se : SeSe* 個体が 1: 2: 1 で分離したことから、‘Grand Champion’の花柱において *Sb'*-および *Se*-RNase は正常に機能している。以上の結果から、‘Grand Champion’の部分的自家和合性は、*S* 遺伝子座と連鎖していない HT-B や 120K のような雌しべ側因子の変異に起因すると推察された。この結果は、ナシ亜科の自家不和合反応の機構解明の手がかりとなりうることから、‘Grand Champion’と‘Gorham’は重要な研究材料であると言える。

同時に、部分的自家和合性を品種特性として有する‘Grand Champion’および‘Gorham’は重要な育種素材でもある。開花自家受粉により結実した‘Grand Champion’の果実品質と他家受粉果実は有意差がない(表 1-5)。よって、いくつかの四倍体品種の他には完全な自家和合品種がないセイヨウナシにおいては、‘Grand Champion’と‘Gorham’の部分的自家和合性を導入することにより、受粉樹の混植や人工受粉を必要とせずに良質果実が生産できる新品种が育成されることが考えられる。



## 総合考察

セイヨウナシ (*Pyrus communis*)が自家不和合性を有することは早くから指摘されていたが、交雑不和合性を示す品種の組み合わせが少ないとされたことから、同じナシ亜科のニホンナシやリンゴのように交配実験による品種の *S* 遺伝子型が決定されてこなかった。セイヨウナシ種の成立過程が複雑であることや栽培の歴史が長く各地で多様な品種が発見・選抜・育成されたことが背景として存在するが、単為結果性により品種の自家不和合性および品種間の交雑不和合性が正しく評価されなかったことも大きく影響している。また、多くの品種が単為結果性を有していたが故に、和合花粉の受粉が果実生産に必ずしも必要ではなかったことも、セイヨウナシの自家不和合性研究があまり進まなかった原因として挙げられる。単為結果性は、開花期の天候が不順であっても結実を可能にするばかりか、受粉樹の混植がなくても十分な収量をもたらす場合もあるが、品種および栽培地の気候に影響されるため、これまでの報告は調査地における特定の供試品種についての特性を示すに過ぎず、単為結果性自体の評価も曖昧であった。一方で、無種子果実の品質は有種子果実に比べて劣ることが数品種で報告されていた。多様な品種の混植により、異なる *S* 遺伝子型を持つ品種が受粉樹として機能し、高品質果実が生産されると期待される。しかしながら、近年、栽培環境への適応性や消費者の嗜好性などから特定の品種の栽培割合が増加し、特に、輸出用の生産では貯蔵性のよい少数の品種が栽培されている。また、発表される新品種の多くは主要栽培品種の交雑後代から選抜されており、特定の *S* 対立遺伝子および *S* 遺伝子型を持つ品種の増加が危惧されている。したがって、今後のセイヨウナシ栽培においては、*S* 遺伝子型情報に基づいた効率的な受粉樹品種の選択が必要になると思われる。本研究では、セイヨウナシの自家不和合性を取り上げ、品種の交雑不和合・和合関係を明らかにするとともに、和合花粉による結実管理に不可欠な品種の *S* 遺伝型を推定した。

不和合・和合の判定が自家不和合性研究の出発点となることから、交配による自家および交雑不和合・和合の判定方法を検討した。1花そうあたりの交配花数や結実数の調査時期は結実率に影響すると考えられたが、過去の交配実験では統一されていなかった。そこで、セイヨウナシ10品種を用いた交配実験から結実の安定性を評価し、1花そう1花で交配して June Drop 後に調査する方法を提案した。また、これまで判定の妨げとなっていた単為結果性の影響を排除するため、Seeds/Flower および SI index を判定基準とした。その結果、交配による不和合・和合の判定方法を確立し、異なる調査地および調査年での交配結果の比較が可能になった。この判定

方法により、交配実験に供試できた 77 品種中 5 品種は雄性不稔性、残り 72 品種のうち‘Gorham’とその枝変わり品種‘Grand Champion’は部分的自家和合性、その他の 70 品種は自家不和合性を示すことが明らかになった (表 6-1)。セイヨウナシは基本的に自家不和合性を有するとともに、多くの品種が単為結果性を有することが交配実験により示された。しかし、これまでに報告された‘ラ・フランス’と‘バートレット’を含む 6 品種の果実形質の比較から、いずれの品種においても単為結果による無種子果実よりも有種子果実の品質が優れることが明らかにされた。したがって、単為結果性を有するセイヨウナシにおいても良質果実の生産には和合花粉の受粉が不可欠であり、品種の *S* 遺伝子型情報が必要である。

不和合・和合の判定方法を確立したものの、交配による *S* 遺伝子型の決定は多くの時間、労力、土地を必要とする。そこで、ニホンナシやリンゴと同様に、品種の *S* 遺伝子型を迅速に推定するシステムの構築を行なった。セイヨウナシにおいても雌しべ側 *S* 遺伝子産物は *S*-RNase であると仮定し、セイヨウナシの *S*-RNase の同定を試みた。RACE クローニングやゲノミック PCR により、19 種類の *S*-RNase 対立遺伝子 (*Sa*-, *Sb*-, *Sc*-, *Sd*-, *Se*-, *Sg*-, *Sh*-, *Si*-, *Sk*-, *Sl*-, *Sm*-, *Sn*-, *Sp*-, *Sq*-, *Sr*-, *Ss*-, *St*-, *Su*-, *Sv*-RNase 対立遺伝子)と *Sx*-RNase を増幅し、得られた断片の種類から 127 品種の *S* 遺伝子型を推定した。これら品種には、日本で栽培されている二倍体 25 品種 (第 2 章)、海外の主要品種を含む二倍体 82 品種 (第 3, 4 章)および三倍体 7 品種 (第 4 章)、ニホンナシ *S*-RNase を有する 3 品種 (第 3 章)、*Sx*-RNase が発現していた二倍体 10 品種 (第 3, 4 章)が含まれる。また、国外で 13 種類の推定 *S*-RNase 対立遺伝子 (*Sa*-, *Sb*-, *Sc*-, *Sd*-, *Se*-, *Sh*-, *Si*-, *Sk*-, *Sl*-, *Sm*-, *Sn*-, *So*-, *Sp*-RNase 対立遺伝子)の部分配列から推定された 8 品種 (Zuccerelliet al. 2002a; Zisovich et al. 2004a)を合わせると、*S*-RNase 対立遺伝子の検出により *S* 遺伝子型が推定された品種は 135 品種となった。Sanzol and Herrero (2002)は、花粉管伸長試験の結果から 7 品種の *S* 遺伝子型を、‘Williams (Bartlett)’ (*S1S2*)、‘Coscia’ (*S3S4*)、‘Agua de Aranjuez’ (*S1S3*)、‘S(SS×W)7’ (*S2S3*)、‘Butirra Precoce Morettini’ (*S1S3*)、‘Santa Maria Morettini’ (*S2S3*)、‘Tosca’ (*S1S4*)と推定した。‘Santa Maria Morettini’ (*S2S3*) [‘Bartlett’ (*S1S2*)×‘Coscia’ (*S3S4*)の交雑後代]は本論文で供試した‘Santa Maria’ (*S1Sk*) [‘Bartlett’ (*SeSl*)×‘Coscia’ (*SbSk*)の交雑後代]の異名同種であることから、*S1*, *S2*, *S3*, *S4* はそれぞれ *Se*, *Sl*, *Sk*, *Sb* に相当すると推測される。したがって、4 品種の *S* 遺伝子型が‘Agua de Aranjuez’ (*SeSk*)、‘S(SS×W)7’ (*SkSl*)、‘Butirra Precoce Morettini’ (*SeSk*)、‘Tosca’ (*SbSe*)と考えられ、総計 139 品種の *S* 遺伝子型が推定されたことになった (表 6-1)。

これら品種のうち、12 種類の *S*-RNase (*Sa*-, *Sb*-, *Sc*-, *Sd*-, *Se*-, *Sg*-, *Sh*-, *Si*-, *Sk*-, *Sl*-, *Sq*-, *Sr*-RNase)の組み合わせからなる同じ推定 *S* 遺伝子型を持つ品種間の交配はすべて交雑不和合を示した。

表6-1 セイヨウナシ139品種の推定S遺伝子型, 開花時期, 自家不和合性, 品種の親子関係.

S遺伝子型	品種	開花時期	自家不和合性 雄性不稔性	品種の親子関係
<i>SaSb</i>	Abbé fetal	C	SI	
	Doyenné du Comice	D*	SI	
<i>SaSc</i>	Roguered	D*		Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> ) × (Seckel ( <i>SeSl</i> ) × Farmingdale seedling 122)
	Eletta Morettini *			
<i>SaSe</i>	Aurora	D*	SI	Marguerite Marillat ( <i>SaSl</i> ) × Bartlett ( <i>SeSl</i> )
	Docteur Jules Guyot	D	SI	
	Duchesse d'Angouleme	C		
	Harrow Crisp	D**		Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × US56112-146
	Harrow Delight	C	SI	Purdue 80-51 (Old Home ( <i>SeSr</i> ) × Early Sweet) × Bartlett ( <i>SeSl</i> )
	Magness	C	MS	Seckel ( <i>SeSl</i> ) 自然交雑実生 × Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> )
	Rocha			
	Tyson			
<i>SaSg</i>	Charles Ernest	C		
	Triomphe de Vienne	D		
<i>SaSl</i>	Harrow Sweet	C		Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × Purdue 80-51 (Old Home ( <i>SeSr</i> ) × Early Sweet)
	Koonce	D*	SI	
	Marguerite Marillat	C	MS	
	Pierre Tourasse	D*		
<i>SaSg</i>	Beurré Clairgeau	C	SI	Duchesse d'Angouleme ( <i>SaSe</i> ) 自然交雑実生
<i>SaSr</i>	Angelys	C**		Doyenné d'hiver ( <i>SeSr</i> ) × Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> )
<i>SbSc</i>	Reimer Red	D*		Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> ) × Max Red Bartlett ( <i>SeSl</i> )
<i>SbScSs</i>	Catillac (3x)	D	MS	
<i>SbSd</i>	Beurré d'Amanlis (3x)	C	MS	
<i>SbSe</i>	Beurré Lubrum	D*	SI	
	California	E*	SI	Max Red Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> )
	Cascade	D		Max Red Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> )
	Gorham	E	PSC	Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × Joséphine de Malines ( <i>SISb</i> )
	Grand Champion	E	PSC	Gorham ( <i>SbSe</i> ) の鱗果突然変異
	Hartman	D*	SI	Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> ) × Max Red Bartlett ( <i>SeSl</i> )
	Highland	C	SI	Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> )
	Howell	D*	SI	
	Tosca***		SI	Coscia ( <i>SbSk</i> ) × Bartlett ( <i>SeSl</i> )
<i>SbSeSs</i>	Alexander Lucas (3x)	B		
<i>SbSeSv</i>	Beurré Diel (3x)	C		
<i>SbSg</i>	Glou Morceau	D		
<i>SbSk</i>	Alexandrine Douillard	E*	SI	
	Coscia **			
<i>SbSl</i>	Beurré Jean Van Geert	D	SI	
	Canal Red	E*		Forelle ( <i>SeSn</i> ) × Max Red Bartlett ( <i>SeSl</i> )
	Honey Sweet	E*		Seckel ( <i>SeSl</i> ) × U.S. 220 (Vermont Beauty × Roi Charles de Wurtemberg)
	Joséphine de Malines	D	SI	
<i>SbSl</i>	Merton Pride (3x)	D	MS	Glou Morceau ( <i>SbSg</i> ) × Bartlett (4x) ( <i>SeSeSISl</i> )
<i>SbSISv</i>	Triomphe de Jodoigne (3x)	C		
<i>SbSq</i>	Le Lectier	D	SI	Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × Bergamotte Fortunee
<i>SbSr</i>	Condo	D*	SI	Conference ( <i>SdSr</i> ) × Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> )
	Urbaniste	D*	SI	
<i>SbSt</i>	Turnbull Giant	B*	MS	

赤: 日本の栽培品種, \*: Zuccherelli et al. 2002aにより推定された品種, \*\*: Zisovich et al. 2004aにより推定された品種, \*\*\*: 本章における推定とSanzol and Herrero 2002の実験結果から推測される品種 (自家不和合性検定は花粉管伸長試験による). 三倍体品種および同名異種と推測された品種はそれぞれ (3x) と (?) で表記した. 開花時期については, 無印: 「Directory of Pear Cultivar」 「Keepers Nursery HP」 「GUIDE OF PEARS (HP)」 による評価, \*: 農研機構盛岡における開花日による評価, \*\*: その他のHPにおける記述に基づく評価. 空白は不明. 雄性不稔性および自家不和合性については, MS: 雄性不稔性, SI: 自家不和合性, PSC: 部分的自家和合性, 空白は調査していない. 品種の親子関係については, S遺伝子型に矛盾があるものを青で示した. 空白は由来不明.

表6-1 セイヨウナシ139品種の推定S遺伝子型, 自家不和合性, 品種の親子関係. (つづき)

S遺伝子型	品種	開花 時期	自家不和合性 雄性不稔性	品種の親子関係
<i>ScSd</i>	Beurré Hardy	D	SI	
	Royal Red Hardy	D	SI	Beurré Hardy ( <i>ScSd</i> )の着色系突然変異
<i>ScSe</i>	Beurré d'Anjou	C	SI	
	Moonglow	D	SI	
	Red Anjou	C	SI	Beurré d'Anjou ( <i>ScSe</i> )の着色系突然変異
<i>ScSh</i>	Nouveau Poiteau	E		
<i>ScSl</i>	Ewart	D		
<i>ScSn</i>	Saint Mathieu	D*		
<i>SdSe</i>	Bautomme (Serenade)	D*	SI	Conference ( <i>SdSr</i> ) × Doyenné d'hiver ( <i>SeSr</i> )
	Clapp's Favorite	D	SI	
	Flemish Beauty	C*	SI	Flemish Beauty ( <i>SdSe</i> ) × Bartlett ( <i>SeSl</i> )
	Red Clapp's (Starkrimson)	D*	SI	Clapp's Favorite ( <i>SdSe</i> )の着色系突然変異
<i>SdSl</i>	Doyenné Gris	D*	SI	
<i>SdSq</i>	Devoe	C*	SI	Clapp's Favorite ( <i>SdSe</i> )自然交雑実生
<i>SdSr</i>	Conference	C	SI	
<i>SeSg</i>	Beurré Superfin	D	SI	
	Orivier de Serres	D	SI	
<i>SeSh</i>	El Dorado	D*	SI	Bartlett ( <i>SeSl</i> )自然交雑実生
	Winter Cole	D*	SI	Winter Nelis ( <i>ShSk</i> )自然交雑実生
<i>SeSi</i>	Beurré Giffard	C	SI	
	Summer Doyenne	D*	SI	
	Pitmaston (?)	D	SI	Duchesse d'Angouleme ( <i>SaSe</i> ) × Glou Morceau ( <i>SbSg</i> )
	Gentile **			
<i>SeSk</i>	Fondante Thirriot	C	SI	
	Packam's Triumph	C	SI	Uvedale St. Germain (Bella Angevina × Bartlett ( <i>SeSl</i> )) × Bartlett ( <i>SeSl</i> )
	Washington		SI	
	Spadona **			
	Agua de Aranjuez***		SI	
	Butirra Precoce Morettini***		SI	Coscia ( <i>SbSk</i> ) × Bartlett ( <i>SeSl</i> )
<i>SeSl</i>	Ayers	B*	MS	Garbar ( <i>ShSm</i> ) × Beurré d'Anjou ( <i>ScSe</i> )
	Bartlett	D	SI	
	Délices d'Hardenpont	B*		
	Harvest Queen	C	SI	Michigan 572 (Barseck × Bartlett ( <i>SeSl</i> )) × Bartlett ( <i>SeSl</i> )
	Max Red Bartlett	D	SI	Bartlett ( <i>SeSl</i> )の着色系突然変異
	Napoleon	E		
	Pera d'Agua	B*		
	Rosired	D		Bartlett ( <i>SeSl</i> )の着色系突然変異
	Seckel	D	SI	
	Seigneur d'Espéren	C	SI	
	Bon Rouge **			
<i>SeSm</i>	Colorée de Juillet	D	SI	
<i>SeSn</i>	Forelle **	C		
<i>SeSq</i>	Besi de Saint-Waast	C*	SI	
	Bon-Chretien d'Hiver	D	SI	
	Covert	D*	SI	Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × Dorset
	Pierre Comelle	C	SI	Beurré Diel ( <i>SbSeSr</i> ) × Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> )
<i>SeSr</i>	Ballad	D*	SI	Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × La France ( <i>SeSr</i> )
	Doyenné d'hiver	D*		
	Idaho	D	SI	
	La France	B*	SI	
	Verdi (Sweet Blush)	D*	SI	B. Louise d'Avranches × Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> )
<i>SeSs</i>	Dana's Hovay	D	SI	Seckel ( <i>SeSl</i> ) × Winter Nelis ( <i>ShSk</i> )
<i>SeSt</i>	Old Home	D*		
	Starking Delicious	E		

赤: 日本の栽培品種, \*: Zuccherelli et al. 2002aにより推定された品種, \*\*: Zisovich et al. 2004aにより推定された品種, \*\*\*: 本章における推定とSanzol and Herrero 2002の実験結果から推測される品種 (自家不和合性検定は花粉管伸長試験による). 三倍体品種および同名異種と推測された品種はそれぞれ (3x) と (?) で表記した. 開花時期については, 無印: 「Directory of Pear Cultivar」「Keepers Nursery HP」「GUIDE OF PEARS(HP)」による評価, \*: 農研機構盛岡における開花日による評価, \*\*: その他のHPにおける記述に基づく評価. 空白は不明. 雄性不稔性および自家不和合性については, MS: 雄性不稔性, SI: 自家不和合性, PSC: 部分的自家和合性, 空白は調査していない. 品種の親子関係については, S遺伝子型に矛盾があるものを青で示した. 空白は由来不明.

表6-1 セイヨウナシ139品種の推定S遺伝子型, 自家不和合性, 品種の親子関係. (つづき)

S遺伝子型	品種	開花時期	自家不和合性 雄性不稔性	品種の親子関係
<i>SgSl</i>	Blickling	E	SI	
	Comte de Lambertyc	D	SI	
<i>SgSq</i>	President Héron	C*		
<i>SgSr</i>	Passe Crassane	C	SI	
	Silver Bell	D*	SI	La France ( <i>SeSr</i> )自然交雑実生
<i>ShSk</i>	Winter Nelis	E*	SI	
<i>ShSl</i>	Michaelmas Nelis	D*	SI	Winter Nelis ( <i>ShSk</i> )自然交雑実生
<i>ShSm</i>	Garbar	C*		
<i>ShSq</i>	Fertility			
<i>SiSl</i>	Beurré de l'Assomption	E		
<i>SkSl</i>	Santa Maria	D	SI	Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × Coscia ( <i>SbSk</i> )
	Spadocchia **			
	S(SS×W)7***		SI	Agua de Aranjuez ( <i>SeSk</i> ) × Bartlett ( <i>SeSl</i> )
<i>SkSr</i>	Ankara	C*	SI	
<i>SkSuSx</i>	Vicar of Winkfield (3x)		MS	
<i>SISm</i>	Chapin	D	SI	Seckel ( <i>SeSl</i> )自然交雑実生自然
<i>SISp</i>	Akça	D*		
<i>SISq</i>	General Leclerc	C*	SI	Doyenné du Comice ( <i>SaSb</i> )自然交雑実生
	Ovid	E	SI	Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × Dorset
<i>SISr</i>	Bristol Cross	D	SI	Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × Conference ( <i>SdSr</i> )
	Emile d'Heyst	C	SI	
	Kieffer	B*	MS	
	Koshisayaka	D*	SI	Bartlett ( <i>SeSl</i> ) × La France ( <i>SeSr</i> )
<i>SISs</i>	Comte de Flandre	D	SI	
<i>SmSo</i>	Lawson			
<i>SePpS5</i>	Frontier	C*		
<i>SIPpS2</i>	Fondante de Chameu	C*		
<i>SrPpS4</i>	Fame			
( <i>SbSx</i> )	Lincoln	D*		
( <i>SeSx</i> )	Clara Frijs	D		
( <i>ShSx</i> )	Beurré Bedford	E		Marie Louise ( <i>SISx</i> ) × Durondeau ( <i>ShSx</i> )
	Beurré Bosc	D*	SI	
	Durondeau	C		
( <i>SgSx</i> )	Beurré Dumont	D		
( <i>SISx</i> )	Early Seckel	D		
	Marie Louise	D	SI	
( <i>SmSx</i> )	Jargonelle (?)		SI	
( <i>SrSx</i> )	Saint Germain			

赤: 日本の栽培品種, \*: Zuccherelli et al. 2002aにより推定された品種, \*\*: Zisovich et al. 2004aにより推定された品種, \*\*\*: 本章における推定とSanzol and Herrero 2002の実験結果から推測される品種 (自家不和合性検定は花粉管伸長試験による)。三倍体品種および同名異種と推測された品種はそれぞれ(3x)と(?)で表記した。開花時期については、無印:「Directory of Pear Cultivar」「Keepers Nursery HP」「GUIDE OF PEARS(HP)」による評価, \*: 農研機構盛岡における開花日による評価, \*\*: その他のHPにおける記述に基づく評価。空白は不明。雄性不稔性および自家不和合性については、MS: 雄性不稔性, SI: 自家不和合性, PSC: 部分的自家和合性, 空白は調査していない。品種の親子関係については、S遺伝子型に矛盾があるものを青で示した。空白は由来不明。

この結果は、セイヨウナシにおいても雌しべ側 *S* 遺伝子産物は *S-RNase* であることを明らかにするものであり、12 種類の *S-RNase* が自家不和合性に関与する対立遺伝子であることを直接裏付けるとともに、同じ方法により同定された 8 種類 (*Sm-*, *Sn-*, *So-*, *Sp-*, *Ss-*, *St-*, *Su-*, *Sv-RNase*) も同様であることを間接的に示した。一方、親子関係にある品種の *S* 遺伝子型を照合したところ、交配親の記載がある 51 品種のうち 41 品種は親子間の *S* 遺伝子型に矛盾がなく、9 種類の *S* 対立遺伝子 (*Sa*, *Sb*, *Sc*, *Sd*, *Se*, *Sh*, *Sk*, *Sl*, *Sr* 対立遺伝子) の遺伝が確認された (表 6-1)。また、‘Grand Champion’ (*Sb*’*Se*) の自殖後代からは *Sb*’-および *Se-RNase* が期待される分離比で得られた。以上より、*S-RNase* が雌しべ側 *S* 遺伝子であることが裏付けられ、*S-RNase* の配列に基づく *S* 遺伝子型情報が信頼できると考えられた。

品種の *S* 遺伝子型の信頼性は CAPS マーカーシステムによる *S* 遺伝子型推定の信頼性でもある。プライマーセット‘FTQQYQ’と‘EP-anti-IIWPNV2’を用いたゲノミック PCR および 11 種類の制限酵素処理からなるこのシステムは、17 種類の *S-RNase* 対立遺伝子 (*Sa-*, *Sb-*, *Sc-*, *Sd-*, *Se-*, *Sg-*, *Sh-*, *Si-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Sq-*, *Sr-*, *Ss-*, *St-RNase* 対立遺伝子) を識別することができ、世界の主要品種の大多数を含む合計 122 品種 (本論文で *S* 遺伝子型を推定した二倍体 107 品種および三倍体 4 品種、ゲノミック PCR による推定 *S-RNase* 対立遺伝子の塩基配列から推定された国外の 7 品種、花粉管伸長試験の結果から推定された 4 品種) をカバーしている。CAPS 解析は、迅速な *S* 遺伝子型推定を可能にする手段であるが、特に、*S* 遺伝子型が推定されている品種間の交雑後代の *S* 遺伝子型解析において有効である。近年のセイヨウナシ育種においては、特定の品種を交配親に用いた交雑育種が多い。特定の *S* 対立遺伝子を持つ品種が増加する結果、既存の主力品種と新品種の間もしくは新品種間で交雑不和合となる可能性が高まっており、育種現場において、既存の主力品種と同じ *S* 遺伝子型を有する後代の選抜を回避することも考えられる。CAPS マーカーシステムは、未展開葉から抽出したゲノム DNA を鋳型にするので、交雑後代の生育初期段階においても利用することができる。また、交雑親品種の *S* 遺伝子型が明らかであれば、処理する制限酵素を限定できる。したがって、迅速・簡単・確実な *S* 遺伝子型の推定が可能であり、育種現場における CAPS マーカーシステムの活用が大いに期待される。

一方で、本論文で確立した CAPS マーカーシステムは、ゲノミック PCR で増幅されない *S-RNase* 対立遺伝子や、上記 17 種類の *S-RNase* 対立遺伝子とほぼ同じ PCR 増幅断片長および制限酵素切断断片長に検出される *S-RNase* 対立遺伝子を識別できないことから、すべてのセイヨウナシ品種の *S* 遺伝子型を推定できるシステムにはなっていない。実際、第 4 章における三倍体の *S* 遺伝子型推定では、*Su*-および *Sv-RNase* 対立遺伝子が増幅され、それぞれ *Sd*-および *Sa-RNase*

対立遺伝子と区別することができなかった。また、Zisovich et al. (2004a)が品種‘Lawson’から同定した *So-RNase* 対立遺伝子は、CAPS 解析で 1,291 bp 断片として増幅されると予想されるので、約 1.3 kb 断片として増幅される *Sk*-および *Sq-RNase* 対立遺伝子との断片長による区別が困難である。*So-RNase* 断片の塩基配列には、約 1.3 kb 断片を識別するために選択した制限酵素、*Bg*III と *Hind*III の認識配列は含まれていないので、*Sk*-と *Sq-RNase* 対立遺伝子との識別は可能であるが、2 種類の制限酵素で切断されない約 1.3 kb 断片が *So-RNase* 対立遺伝子であると特定することはできない。さらに、このシステムのプライマーセットはセイヨウナシ (*Pyrus communis*) の *S-RNase* 対立遺伝子だけでなくニホンナシの *S-RNase* も増幅する。本論文でも、‘Frontier’、‘Fondante de Charneu’、‘Fame’の 3 品種のゲノミック PCR においてニホンナシの *S-RNase* が増幅され、それぞれ、*SePpS5*、*SlPpS2*、*SrPpS4* と *S* 遺伝子型が推定された (表 6-1)。現在のセイヨウナシ (*P. communis*)栽培品種はナシ属の種間交雑により生じた *P. communis* の改良種であるとされており、チュウゴクナシ (*P. ussuriensis*)やニホンナシ (*P. pyrifolia*)などナシ属樹種と容易に交雑できる。耐病性や耐凍性の導入を目的として、セイヨウナシ栽培品種を含む *P. communis* 品種と他のナシ属種の交配も多く行なわれていることから、セイヨウナシ品種の *S* 遺伝子型推定を進めていく過程において、ニホンナシの *S-RNase* の配列を持つ品種が出現する可能性が十分に考えられる。したがって、親品種の遺伝子型が明らかでない品種の *S* 遺伝子型を推定する際には、CAPS 解析に加えてゲノミック PCR 断片の塩基配列解析が必要である。本論文のゲノミック PCR により検出された 19 種類の *S-RNase* 対立遺伝子のうち、12 種類の *S-RNase* 対立遺伝子は約 350 bp 断片に増幅されているので、特に約 350 bp 断片は塩基配列の解析により *S-RNase* 対立遺伝子を特定するべきである。また、*P. pyrifolia* との雑種であることが明確な品種は、ニホンナシの CAPS マーカーシステム (Takasaki et al. 2004)の併用も検討するべきであろう。さらに、新規 *S-RNase* 対立遺伝子を含む推定 *S* 遺伝子型を持つ品種が複数存在し、交配が可能であるならば、交雑不和合性を確認することが望ましい。

CAPS マーカーシステムで検出されない *Sx-RNase* も品種の *S* 遺伝子型推定における課題である。*Sx-RNase* の発現が確認された二倍体および三倍体 10 品種では、ゲノミック PCR で検出された *S-RNase* 対立遺伝子の数に *Sx-RNase* 対立遺伝子を加えると、各品種の倍数性と一致することから、*Sx-RNase* が *S-RNase* 対立遺伝子であるとも思われる。ニホンナシにおいては、推定システムによる新規 *S* 遺伝子の同定には、*S-RNase* の雌しべにおける特異的発現および対立性を調べるための後代検定を必須とし、また、交配による不和合・和合の評価を行なって、システムに対する信頼性を確認する必要が指摘されている (Castillo et al. 2002; Takasaki et al. 2004)。本論文では、

‘Durondeau’, ‘Jargonelle’, ‘Vicar of Winkfield’の3品種のみを発現解析に供試したが、これら品種の *Sx-RNase* の発現は花柱特異的ではなかった。一方、*Sx* を有する品種の交配は、遺伝子型 *ShSx* および *SiSx* の2種類の組み合わせのみの結果ではあるが、交雑不和合を示した。*Sx-RNase* が雌しべ側 *S* 遺伝子であるかを検証するためには、*Sx-RNase* がクローニングされた品種およびその他の品種を用いて、より詳細な発現部位の解析や花の発達に伴う *Sx-RNase* の発現解析、*Sx* を含むより多くの組み合わせの *S* 遺伝子型を持つ品種間での交配実験、*Sx* を有する品種の交雑後代の *S* 遺伝子型検定を行なう必要がある。多数の *Sx* を含む同じ *S* 遺伝子型の品種間の交配が交雑不和合性を示すこと、また、様々な交配組み合わせにおける多数の交雑後代において期待値と一致する *S* 遺伝子型の分離が得られることが示されれば、*Sx-RNase* の発現がナシ亜科を含むバラ科植物の *S-RNase* のように部位特異的な発現を示さなくても、*Sx-RNase* が雌しべ側 *S* 遺伝子産物の *S-RNase* をコードしていることが証明されることが考えられる。*S* 遺伝子型が推定された品種やニホンナシおよびリンゴからも *Sx-RNase* が増幅された原因は今のところ不明であるが、更なる解析によりナシ亜科の自家不和合性や *S-RNase* に関する新たな知見が得られるかもしれない。

同様に、本論文においては、セイヨウナシおよびナシ亜科の自家不和合性機構の解明に繋がりうる成果が得られた。部分的自家和合性を示す‘Grand Champion’および‘Gorham’の *S-RNase* の解析では、*S* 遺伝子座と独立した *S-RNase* 以外の雌しべ側因子が自家不和合反応に関与していることを示した。また、18種類の *S-RNase* 対立遺伝子 (*Sa-*, *Sb-*, *Sc-*, *Sd-*, *Se-*, *Sg-*, *Sh-*, *Si-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sm-*, *Sn-*, *Sp-*, *Sq-*, *Sr-*, *Ss-*, *St-*, *Su-RNase* 対立遺伝子)と *Sx-RNase* の RACE クローニングにおいては *S-RNase* cDNA 完全長塩基配列を決定した。*S* ハプロタイプの認識は配偶体型自家不和合性を有する植物全体にわたる課題であり、世界各国で精力的な研究が行なわれているが、*S-RNase* が関与する自家不和合性のメカニズムは未だ明らかになっていない。ナシ亜科では花粉側 *S* 遺伝子も同定されておらず、また、HV 領域以外の部分も認識特異性に関与する可能性が示されている (Zisovich et al. 2004b)。したがって、上記の成果は、認識に関与する領域や自家不和合反応に関与する因子を特定する重要な手がかりとなりうる。さらに、18種類のセイヨウナシ *S-RNase* は、ニホンナシの9種類の *S-RNase* およびリンゴの14種類の *S-RNase* との系統樹分析から、ナシ亜科の属への分化以前に多様化したことが改めて示された (図 6-1)。近年、*S-RNase* や *SLF/SFB* の配列の解析による *S* 遺伝子座の進化に関する研究が報告されている (Ilgic and Kohn 2001; Vieira et al. 2003; Nunes et al. 2006; Ortega et al. 2006)。セイヨウナシを含むナシ亜科植物の *S-RNase* の塩基配列をより詳細に解析することにより、*S* 対立遺伝子の多様化に関する情報が得られる可能性がある。

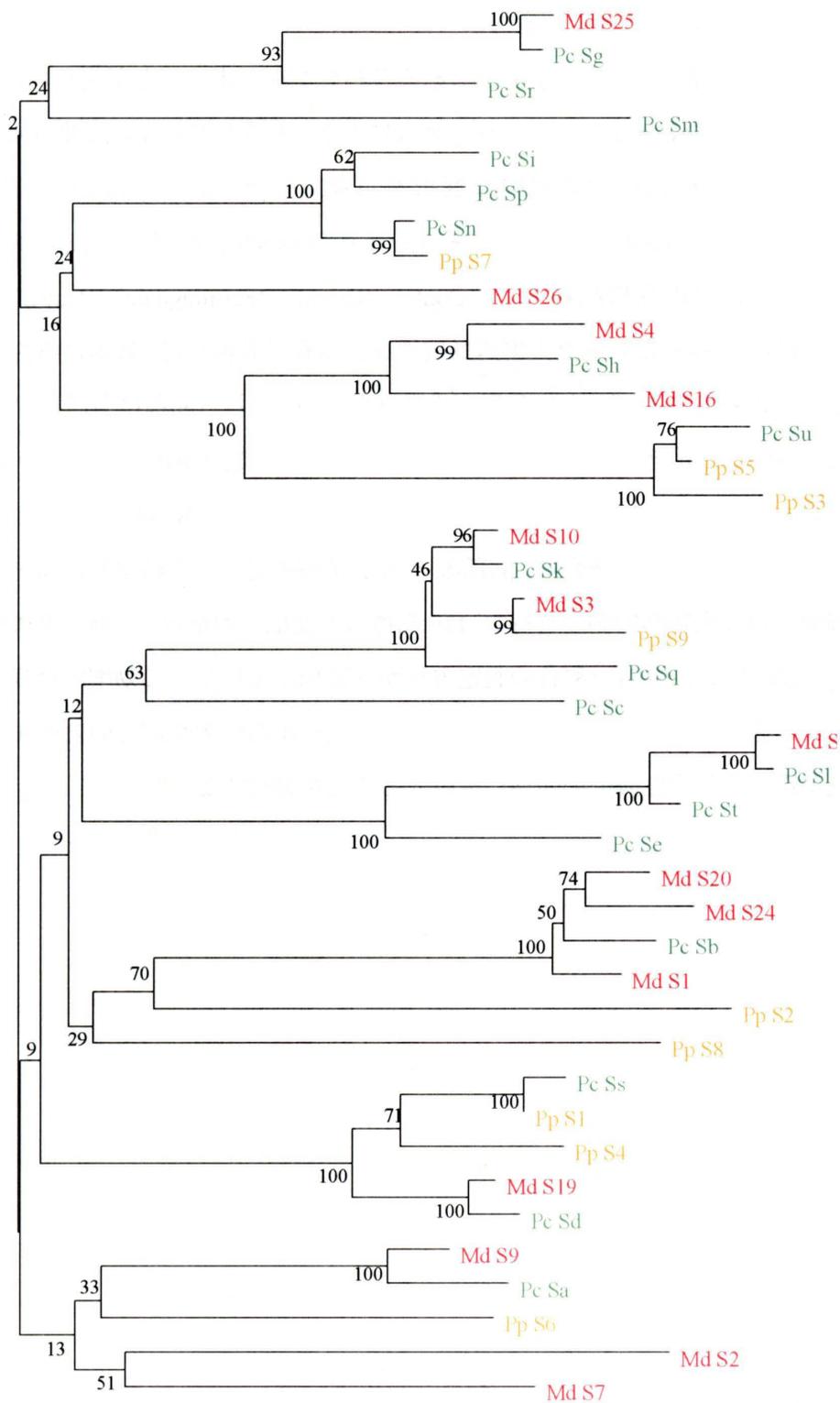


図 6-1 セイヨウナシ、ニホンナシ、リンゴのS-RNaseの推定アミノ酸配列に基づくNJ法による分子系統樹。  
 水平方向の枝の長さがS-RNase間の配列の違いを表す。数字はBootstrap value (%)。17種類のセイヨウナシ (Pc) S-RNase, 9種類のニホンナシ (Pp) S-RNase, 14種類のリンゴ (Md) S-RNaseのaccession numberは図0-1, 表3-7参照。

セイヨウナシにおいて、品種間の交雑不和合性はほとんど報告されていなかったが、本論文における交配による不和合・和合の判定方法の確立および品種の *S* 遺伝子型推定により、139 品種のうち 103 品種に交雑不和合を示す品種の組み合わせが存在することが明らかになった。また、cDNA クローニングや CAPS マーカーシステムにより、世界の主要栽培品種の大多数の *S* 遺伝子型を推定し、受粉樹品種の効率的な選択を可能にした。しかしながら、スペインの 'Blanquilla'、オランダの 'Gieser wildeman'、ギリシャの 'Kristalli'、南アフリカの 'Rosemarie' や 'Flamingo' といった各国の栽培品種や 'Le Conte'、'Orient'、'Farmingdale'、'Dawn'、'Potomac'、'Blake's Pride'、'Shenandoah' といった火傷病抵抗性を持つ育成品種など、日本に導入されていないため *S* 遺伝子型が推定されていない品種が多数存在する。これら品種にも同じ *S* 遺伝子型を有する品種が存在する可能性は高いことから、各国において、CAPS マーカーシステムや *S-RNase* のクローニングにより *S* 遺伝子型が迅速に推定されることを望む。

バラ科果樹の自家不和合性の研究は、品種の *S* 遺伝子型推定という農学的側面と自家不和合反応の機構解明という生物学的側面を持つ。139 品種の *S* 遺伝子型情報、品種の *S* 遺伝子型推定方法、そして、交配による不和合・和合の判定方法が *S* 遺伝子型に基づく効率的な栽培管理や育種に寄与することを期待する。また、*S-RNase* cDNA 完全長塩基配列や部分的自家和合性の原因に関する知見が自家不和合性研究の発展に貢献することを期待する。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、神戸大学農学部果樹科学研究室の中西テツ博士、野村啓一博士、高崎剛志博士から厳しくも温かいご指導、ご助言を賜りました。心から感謝申し上げます。学位論文を審査していただいた神戸大学農学部植物育種学研究室の上島脩志博士、土佐幸雄博士にも厚く御礼申し上げます。

また、実験材料および実験場所を提供していただきました弘前大学農学生命科学部生物共生教育研究センター藤崎農場の伊藤大雄博士、塩崎雄之輔博士、長野県果樹試験場の加藤秀一氏、峯村万貴氏、山近龍浩氏、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点の岩波宏氏、別所英男氏、古藤田信博博士、農業者大学校落葉果樹研究所の継枝良一郎氏に心より御礼申し上げます。

## 参考文献

- Anderson MA, Cornish EC, Mau S-L, Williams EG, Hoggart R, Atkinson A, Bonig I, Grego B, Simpson R, Roche P, Haley JD, Penschow J, Niall HD, Tregear GW, Coghlan JP, Crawford RJ, Clarke AE. 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 321: 38-44.
- Blank AR, Sugiyama H, Dekker CA. 1982. Activity Staining of Nucleolytic Enzymes after Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Use of Aqueous Isopropanol to Remove Detergent from Gels *Analytical Biochemistry* 120, 267-275.
- Boskovič R, Tobutt KR, Batlle I, Duval H. 1997. Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica* 97: 167–176.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Broothaerts W. 2003. New findings in apple *S*-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some *S* alleles. *Theor Appl Genet* 106: 703-714. DOI: 10.1007/s00122-002-1120-0
- Broothaerts W, Janssens GA, Proost P, Broekaert WF. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol Biol* 27:499-511.
- Brown GG, Childs L. 1929. Pollination Study of the Anjou Pear in Hood River Valley. Oregon State Agricultural College, Agricultural Experiment Station, Station Bulletin 239: 3-15
- Castillo C, Takasaki T, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanishi T. 2001. Reconsideration of *S*-genotypes assignments, and discovery of a new allele based on *S*-RNase PCR-RFLPs in Japanese pear cultivars. *Breed Sci* 51: 5-11.
- Crane MB, Lewis D. 1940. Genetical studies in pears II. A Classification of cultivated varieties. *J Pomology* 18: 52-61.
- Crane MB, Lewis D. 1942. Genetical Studies In Pears III. Incompatibility and Sterility *Journal of Genetics*, vol. 43 nos. 1 and 2: 31-43.
- Crane MB, Thomas PT. 1939. Genetical studies in pears I. The origin and behaviour of a new giant form. *J Genet* 37: 287-299.
- Crawford M. 1996. Directory of pear cultivars, 1st edn. Agroforestry Research Trust, UK, pp 42-79.

- Cruz-Garcia F, Hancock CN, Kim D, McClure B. 2005. Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. *The Plant Journal* 42, 295–304. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02375.x
- de Nettancourt D. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer, Berlin.
- Dorsey MJ. 1923. Sterility in relation to horticulture. *American Journal of Botany*. 10: 474-484
- East EM, Mangelsdorf AJ. 1925. A new interpretation of the hereditary behavior of self-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 11: 166-171
- Entani T, Iwano M, Shiba H, Che FS, Isogai A, Takayama S. 2003. Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells* 8: 203-213.
- Goldraj A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-Garciaand F, McClure B. 2006. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana* *Nature* 439: 805810. DOI: 10.1038/nature04491
- Golz JF, Oh HY, Su V, Kusaba M, Newbigin E. 2001. Genetic analysis of *Nicotiana* pollen-part mutants is consistent with the presence of an S-ribonuclease inhibitor at the S locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15372-15376. DOI: 10.1073/pnas.261571598
- Griggs WH, Iwakiri BT. 1954. Pollination and parthenocarpy in the production of Bartlett pears in California. *Hilgardia* 22:643-678.
- Hancock CN, Kent L, McClure BA. 2005. The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *The Plant Journal* 43: 716–723. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02490.x
- Hauck NR, Ikeda K, Tao R, Iezzoni AF. 2006. The Mutated S1-Haplotype in Sour Cherry Has an Altered S-Haplotype-Specific F-Box Protein Gene. *Journal of Heredity* 97: 514–520. doi:10.1093/jhered/esl029
- Hauck NR, Yamane H, Tao R, Iezzoni AF. 2006. Accumulation of Nonfunctional S-Haplotypes Results in the Breakdown of Gametophytic Self-Incompatibility in Tetraploid *Prunus*. *Genetics* 172: 1191–1198. DOI: 10.1534/genetics.105.049395
- Hiratsuka S., Y. Okada, Y. Kawai, F. Tamura and K. Tanabe.1995. Stylar Basic Proteins Corresponding to 5 Self-Incompatibility Alleles of Japanese Pears. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64 (3): 471-478.
- Hitatsuka, S., Kubo, T. and Okada, Y. 1998. Estimation of Self-incompatibility Genotype in Japanese Pear Cultivars by Stylar Protein Analysis. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67 (4): 491-496.

- Hua Z, Kao Th. Identification and Characterization of Components of a Putative *Petunia* S-Locus F-Box-Containing E3 Ligase Complex Involved in S-RNase-Based Self-Incompatibility Plant Cell 18: 2531-2553. DOI: 10.1105/tpc.106.041061
- Igic B, Kohn JR. 2001. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. PNAS 98: 13167-13171. doi: 10.1073/pnas.231386798
- Ikeda K, Igic B, Ushijima K, Yamane H, Hauck NR, Nakano R, Sassa H, Iezzoni AF, Kohn JR, Tao R. 2004. Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. Sex Plant Reprod 16: 235-243.
- Ishimizu T, Norioka S, Kanai M, Clarke AE, Sakiyama F. 1996b. Location of cysteine and cystine residues in S-ribonucleases associated with gametophytic self-incompatibility. Eur J Biochem 242: 627-635. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0627r.x
- Ishimizu T, Sato Y, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanishi T, Sakiyama F. 1996a. Identification and partial amino acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. J Biochem 120:326-334.
- Ishimizu T, Inoue K, Shimonaka M, Saito T, Terai O, Norioka S. 1999. PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. Theor Appl Genet 98: 961-967. DOI: 10.1007/s001220051156
- Ishimizu T, Shinkawa T, Sakiyama F, Norioka S. 1998. Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. Plant Mol Biol 37:931-941. DOI: 10.1023/A:1006078500664
- Ishimizu T, Sato Y, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanishi T, Sakiyama F (1996a) Identification and partial amino acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. J Biochem 120: 326-334.
- Janick J, Moore JN. 1997. Fruit Breeding volume I. Tree and Tropical Fruits.
- Janssens GA, Goderis IJ, Broekaert WF, Broothaerts W. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. Theor Appl Genet 91: 691-698. DOI: 10.1007/BF00223298
- Karadeniz F. 1999. A Research on the Chemical Composition of Pear Juice. Tr. J. of Agriculture and Forestry 23: 355-358
- Kao TH, McCubbin AG. 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to

- prevent inbreeding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12059-12065.
- Katoh N, Gotoh K, Asano J, Fukushima K, Yamada K, Kasai A, Li TZ, Takanoha M, Miyairi K, Okuno T. 2002. S-RNases from Self-incompatible and -compatible Apple Cultivars: Purification, Cloning, Enzymic Properties, and Pollen Tube Growth Inhibitory Activity. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:1185-1195
- Kawata Y, Sakiyama F, Hayashi F, Kyogoku Y. 1990. Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. Eur J Biochem 187: 255-262. DOI:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15303.x
- Kester DE, Micke WC, Viveros M. 1994. A mutation in 'Nonpareil' almond conferring unilateral incompatibility. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119: 1289-1292.
- Kitahara K, Komatsu H, Fukui H, Matsumoto S. 2000. Complete Sequences of the S-genes, Sd- and Sh-RNase cDNA in Apple. HortScience 35(4):712-715.
- Kitahara K, Matsumoto S. 2002. Sequence of the S10 cDNA from 'McIntosh' Aapple and a PCR-digestion Identification Method. HortScience 37(1): 187-190.
- Knight LI. 1917. Physiological aspects of self-sterility of the apple. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 1917: 101-105.
- Kobel F, Steinegger P, Anliker J. 1939. Weitere Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse der Apfel- und Birnsorten. Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz 53: 160-191.
- Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Masashi H, Norioka S, Hattori T, Kowiyama Y. 2002a. Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. Plant J. 29: 627-636.
- Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Egashira H, Hattori T, Kowiyama Y. 2002b. Insights into the evolution of self-incompatibility in *Lycopersicon* from a study of stylar factors. Plant J. 30: 143-153.
- Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G, Xue Y. 2002. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. Plant Mol Biol 50: 29-42. DOI: 10.1023/A:1016050018779
- Lee HS, Huang S, Kao TH. 1994. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. Nature 367, 560-563.
- Lewis, D. Modlibowska I. 1942. Genetical Studies in Pears IV. Pollen-tube growth and incompatibility. J.

Genet. 43: 211-222.

- Li TZ, Katoh N, Fujita T, Asada T, Shiozaki Y, Okuno T. 2002. Observations on Stylar Transmitting Tissue Cells and cDNA Cloning of S-RNase in a Self-fruitful Apple 'Hirodai Ichigo'. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 71: 553-560.
- Linskens HF. 1967. Isolation of ribosomes from pollen. *Planta* 73: 194-200
- Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M. 2000. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* 407: 649-651. DOI:10.1038/35036623
- LuuDT, Qin X, Laublina G, Yanga Q, Morse D, Cappadocia M. 2001. Rejection of S-heteroallelic Pollen by a dual-specific S-RNase in *Solanum chacoense* predicts a multimeric SI pollen component. *Genetics* 159: 329-335
- Ma RC, Oliveira MM. 2001. Molecular cloning of the self-incompatibility genes S1 and S3 from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnes). *Sex Plant Reprod* 14:163–167. DOI: 10.1007/s004970100103
- Marucucci MC, Visser T. 1983. Histological and anatomical characteristics of parthenocarpic and normal pear fruits. *Scientia Horticulturae* 19: 311-319.
- Matsumoto S, Komori S, Kitahara K, Imazu S, Soejima J. 1999a. S-genotypes of 15 Apple Cultivars and Self-compatibility of 'Megumi'. *J. Japan. Soc. Hort. Sci* 68: 236-241.
- Matsumoto S., K. Kitahara, S. Komori and J. Soejima. 1999b. A New S-allele in Apple, 'Sg', and Its Similarity to the 'Sf' Allele from 'Fuji'. *HortScience* 34(4): 708-710.
- Matsumoto S. and K. Kitahara. 2000. Discovery of a New Self-incompatibility Allele in Apple. *HortScience* 35(7): 1329-1332.
- Matsumoto S., Y. Furusawa, H. Komatsu and J. Soejima. 2003. S-allele genotypes of apple pollenizers, cultivars and lineages including those resistant to scab. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* (2003) 78 (5) 634-637.
- Matsuura T, Sakai H, Unno M, Ida K, Sato M, Sakiyama F, Norioka S. 2001. Crystal Structure at 1.5-Å Resolution of *Pyrus pyrifolia* Pistil Ribonuclease Responsible for Gametophytic Self-incompatibility. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 45261-45269.
- McClure B. 2006. New views of S-RNase-based self-incompatibility. *Current opinion in plant biology* 9: 639-646. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.09.004
- McCubbin AG, Kao TH. 2000. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 333–64.

- Modlibowska, I. 1945. Pollen tube growth and embryo-sac development in apples and pears. *J. Pomol.* 21: 57-89.
- Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA. 1994. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* 363-364.
- Nettancourt D, de. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag
- Nielsen H, Brunak S, Heijne G. 1999. Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Engineering* 12: 3-9. DOI:10.1093/protein/12.1.3
- Nishio T, Hinata K. 1977. Analysis of S-specific proteins in stigma of *Brassica oleracea* L. by isoelectric focusing. *Heredity* 21: 345-362
- Norioka N, Norioka S, Ohnishi Y, Ishimizu T, Oneyama C, Nakanishi T, Sakiyama F. 1996. Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding S-allele specific stylar RNases in a self-incompatible cultivar and its self-compatible mutant of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *J Biochem* 120:335-345
- Nunes MDS, Santos RAM, Ferreira SM, Vieira J, Vieira CP. 2006. Variability patterns and positively selected sites at the gametophytic self-incompatibility pollen *SFB* gene in a wild self-incompatible *Prunus spinosa* (Rosaceae) population. *New Phytologist* 172 (3), 577–587. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01838.x
- Nyéki, J., M. G. Pinter and Z. Szabo. 1994. Recent data on fertilization of pear variety. *Acta Hort* 367: 87-96
- Nyéki, J., M. Soltész. 1998. The variation of seed content of fruits in pear varieties, also as function of different conditions of fertilization, as open pollination, natural autogamy and allogamy. *Acta Hort.* 475:237-250
- O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y, Matton DP. 2002. Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *The Plant Journal* 32, 985–996. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01486.x
- Ortega E, Bošković RI, Sargent DJ, Tobutt KR. 2006. Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination. *Mol Gen Genomics* (2006) 276: 413-426 DOI: 10.1007/s00438-006-0146-4

- Qiao, H, Wang H, Zhao L, Zhou J, Huang J, Zhang Y, Xue Y. 2004. The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell* 16: 582-595. DOI: 10.1105/tpc.017673
- Qin X, Liu B, Soulard J, Morse D, Cappadocia M (2006) Style-by-style analysis of two sporadic self-compatible *Solanum chacoense* lines supports a primary role for S-RNases in determining pollen rejection thresholds. *J. Exp. Bot.* 57: 2001-2013; doi:10.1093/jxb/erj147
- Rawes, AN. 1933. Contributions from the Wisley Laboratory LXVIII. – Pollination in Orchards (IX). Summary of investigations on pear pollination. *J. Royal Hort. Soc.* 58: 288-295.
- Ruiz VS. 1977. Study on the pollination and fruit-set on ‘Blanca de Aranjuez’ pear. *Acta Hort.* 69:235-241
- Sakurai K, Brown SK Weeden N. 2000. Self-incompatibility Alleles of Apple Cultivars and Advanced Selections. *HortScience* 35(1): 116-119.
- Sanchez EE. 2002. Pear Production in South America. *ActaHorticulturae* 596 Proceedings of the Eight International Symposium on Pear Volume1: 67-69
- Sanzol J, Herrero M. 2002. Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Euphytica* 128: 325-331. DOI: 10.1023/A:1021213905461
- Sassa H, Hirano H, Ikehashi H. 1992. Self-incompatibility-related RNases in the style Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant Cell Physiol* 33: 811-814
- Sassa H, Hirano H, Ikehashi H. 1993. Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, *Pyrus serotina* Rehd. *Mol Gen Genet* 241: 17-25.
- Sassa H, Hirano H, Nishio T and Koba T. 1997. Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). *The Plant Journal* 12: 223-227. DOI:10.1046/j.1365-313X.1997.12010223.x
- Sassa H, Mase N, Hirano H, Ikehashi H. 1994. Identification of self-incompatibility-related glycoproteins in styles of apple (*Malus domestica*). *Theor Appl Genet* 89: 201-205. DOI: 10.1007/BF00225142
- Sassa H, Nishio T, Kowiyama Y, Hirano H, Koba T, Ikehashi H. 1996. Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol Gen*

Genet 250:547-557.

- Sharma N, Gautam DR, Jindal KK, Sharma DP. 2002. The pear industry of Himachal Pradesh in India. *Acta Horticulturae* 596: 97
- Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao T-h. 2004. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429: 302-305. DOI: 10.1038/nature02523
- Sonneveld T, Tobbutt KR, Vaughan SP, Robbins TP. 2005. Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-box gene. *Plant Cell* 17: 37-51. 10.1105/tpc.104.026963
- Takasaki T, Okada K, Castillo C, Moriya Y, Saito Y, Sawamura Y, Norioka N, Norioka S, Nakanishi T. 2004. Sequence of the S9-RNase cDNA and PCR-RFLP system for discriminating S1- to S9 allele in Japanese pear. *Euphytica* 135: 157-167. DOI: 10.1023/B:EUPH.0000014907.50575.d0.
- Tao R, Habu T, Namba A, Yamane H, Fuyuhiko F, Iwamoto K, Sugiura A. 2002. Inheritance of S<sub>f</sub>-RNase in Japanese apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-compatibility. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 222-228 DOI: 10.1007/s00122-002-0980-7
- Tao R, Watari A, Hanada T, Habu T, Yaegaki H, Yamaguchi M, Yamane H. 2007. Self-compatible peach (*Prunus persica*) has mutant versions of the S haplotypes found in self-incompatible Prunus species. *Plant Mol Biol* 63: 109-123. DOI 10.1007/s11103-006-9076-0
- Tomimoto, Y, Nakazaki T, Ikehashi H, Ueno H, Hayashi R. 1996. Analysis of self incompatibility-related ribonucleases (S-RNases) in two species of pears, *Pyrus communis* and *Pyrus ussuriensis*. *Scientia Hortic.* 66: 159-167.
- Tsukamoto T, Hauck NR, Tao R, Jiang N, Iessoni AF. 2006. Molecular characterization of three non-functional S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*). *Plant Mol Biol.* 62: 371-383. DOI: 10.1007/s11103-006-9026x
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R. 2003. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell* 15: 771-781. DOI: 10.1105/tpc.009290
- Ushijima K, Sassa H, Tao R, Yamane H, Dandekar AM, Gradziel TM, Hirano H. 1998. Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Mol Gen Genet* 260:261-268.

- Ushijima K, Yamane H, Watari A, Takehi E, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF, Tao R. 2004. The *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J* 39: 573-586. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02154.x
- Vaughan SP, Russell K, Sargent DJ, Tobutt KR. 2006. Isolation of *S*-locus F-box alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method to determine self-incompatible genotype. *Theor Appl Genet* 112: 856-866. DOI: 10.1007/s00122-005-0187-9
- Vieira CP, Charlesworth D, Vieira. 2003. Evidence for rare recombination at the gametophytic self-incompatibility locus. *J. Heredity* 91, 262–267.
- Vilanova S, Badenes ML, Burgos L, Martínez-Calvo J, Llácer G, Romero C. 2006. Self-compatibility of two *Prunus armeniaca* selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. *Plant Physiology* 142: 629-641. DOI: 10.1104/pp.106.083865
- Westwood MN, Grim J. 1962. Effect of Pollinizer Placement on Long Term Yield of Anjou, Bartlett and Bosc Pears. *American Society for Horticultural Science* 81: 103-107.
- Wünsch A, Hormaza JI. 2004. Genetic and molecular analysis in Cristobalina sweet cherry, a spontaneous self-compatible mutant. *Sex. Plant Reprod* 17: 203-210. DOI: 10.1007/s00497-004-0234-8
- Xue Y, Carpenter R, Dickinson HG, Coen ES. 1996. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum S* locus RNases. *Plant Cell* 8: 805-814.
- Yaegaki H, Shimada T, · Moriguchi T, · Hayama H, Haji T, · Yamaguchi M. 2001. Molecular characterization of *S*-RNase genes and *S*-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) *Sex Plant Reprod* 13:251–257. DOI: 10.1007/s004970100064
- Yamane H, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF, Tao R. 2003a. Selfincompatibility (*S*) locus region of the mutated *S*6-haplotype of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional pollen *S* allele and a non-functional pistil *S* allele. *J Exp Bot* 54:2431–2437
- Yamane H, Ikeda K, Ushijima K, Sassa H, Tao R. 2003b. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for *S*-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Plant Cell Physiol* 44: 764-769
- Yamane H, Ushijima K, Sassa H, Tao R. 2003c. The use of the *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, as a molecular marker for *S*-haplotypes and self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*). *Theor Appl Genet* 107: 1357-1361. DOI: 10.1007/s00122-003-1389-7

- Zisovich HA, Stern AR, Shafir S, Goldway M. 2004a. Identification of seven S-alleles from European pear (*Pyrus communis* L.) and the determination of compatible among cultivars. J Hort Sci Biotechnol 79:101-106
- Zisovich HA, Stern RA, Sapir G, Shafir S, Goldway M. 2004b. The RHV region of S-RNase in the European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. Sex Plant Reprod 17: 151-156. DOI: 10.1007/s00497-004-0225-9
- Zuccherelli S, Broothaerts W, Tassinari P, Tartarini S, Dondini L, Bester A, Sansavini S. 2002b. S-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.): biochemical, molecular and field analyses. Acta Hort 596:147-152
- Zuccherelli S, Tassinari P, Broothaerts W, Tartarini S, Dondini L, Sansavini S. 2002a. S allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). Sex Plant Reprod 15: 153-158. DOI: 10.1007/s00497-002-0145-5
- 浅妻力 1995. 「バラエティー 西洋なし」
- 阿部芳幸, 米野智弥, 西村幸一, 石黒亮, 佐藤功. 1996. 「セイヨウナシ新品種‘山園 P1 号’」園芸学会雑誌 65 別 2: 154-155.
- 岩堀修一 2002. 世界における西洋ナシ産業. (T. Deckers 著) 農業及び園芸第 77 巻第 4 号
- 大垣智明 1958. 和梨新品種の不稔性因子について. 神奈川県農業試験場園芸分場研究報告第 5 号別刷
- 小野田和夫, 伊藤明治. 1987. セイヨウナシの交雑和合性. 園芸学会要旨昭和 62 年秋: 76-77.
- 梶浦一郎. 1983. 「農業技術大系果樹編第 3 巻 基+3 ナシ 基礎編 ナシ栽培技術の歴史」
- 菊地秋雄. 1929. 昭和 2 年及 3 年における研究事項, 1. 日本梨に於ける偏父不和合性. 園芸之研究. 24: 1-6.
- 久保隆, 新谷潤一, 工藤仁郎. 1989. セイヨウナシの受粉和合性. 東北農業研究 42 : 253-254.
- 壽和夫, 齋藤寿広, 正田守幸, 澤村豊, 町田裕, 梶浦一郎, 佐藤義彦, 増田亮一, 阿部和幸, 栗原昭夫, 緒方達志, 寺井理治, 西端豊英, 檜村芳記, 小園照雄, 福田博之, 木原武士, 鈴木勝征. 2003. 自家和合性の後代を効率的に獲得できる‘なし中間母本農 1 号’. 園芸学会雑誌 72 別 1: 54.
- 小森貞男, 別所英男, 副島淳一, 伊藤祐司. 1993. ‘はつあき’ ‘いわかみ’ の戻し交雑実生群を用いたリンゴの交雑不和合性遺伝子の解明. 園芸学会雑誌 62 別 2: 160-161.

- 小森貞男, 副島淳一, 伊藤祐司, 別所英男, 阿部和幸, 古藤田信博. 1998a. リンゴ主要品種の自家不和合遺伝子型の解析. 園芸学会雑誌 67(6): 917-926.
- 小森貞男, 副島淳一, 工藤和典, 京谷英壽, 阿部和幸, 古藤田信博, 小松宏光. 1998b. ‘つがる’, ‘世界一’, ‘夏緑’, ‘アキタゴールド’, M.9 等の S 遺伝子型解析. 園芸学会雑誌 67(6): 880-889.
- 佐藤義彦 1992. ニホンナシの自家和合性品種の育成. 園芸学会平成 4 年度秋季大会シンポジウム講演要旨: 12-22.
- 杉浦明, 門屋一臣, 新居直祐, 仁藤伸昌, 行永寿二郎, 高木敏彦, 水谷房雄, 田辺賢二, 山下研介, 稲葉昭次, 松井弘之. 1991. 「新果樹園芸学」
- 杉山達夫, Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, 岡田清孝, 内藤哲, 中村研三, 長谷俊治, 福田裕穂, 前嶋正義. 2005. 「植物の生化学・分子生物学」
- 田辺賢治, 宮原継男, 山本仁, 冨田幸作, 高野隆志, 中川文雄. 1986. ウメの品種‘新平太夫’の特性について. 福井県園芸試験場報告 5: 1-8
- 寺見広雄, 鳥瀧博高, 島津祐吉. 1946. ニホンナシ各品種間の不稔性因子の分析. 京都大学園芸集録: 267-271.
- 日向康吉, 西尾剛. 2000. 「植物育種学」
- 日向康吉, 磯谷彰, 鎌田博, 米田好文, 長戸康郎, 鳥山欽哉. 「花 性と生殖の分子生物学」
- 増田哲男, 吉岡藤治, 壽和夫, 真田哲朗, 北川健一, 井上耕介, 吉田亮, 村田謙司, 長柄稔, 内田正人. 1997. ニホンナシ新品種‘おさゴールド’の特性. 園芸学会雑誌. 66 別 1: 164 - 165.
- 町田裕, 佐藤義彦, 小崎格, 清家金嗣. 1982. ニホンナシ数品種・系統の S 因子型と‘豊水’の交配親の疑問について. 園芸学会要旨昭和 57 年秋: 58-59.
- 松本辰也, 大竹智. 1998. セイヨウナシ新品種‘越さやか’の結実特性. 園芸学会雑誌 67 別 2: 212
- 山口正己, 京谷英壽, 吉田雅夫, 土師岳, 西村幸一, 中村ゆり, 三宅正則, 八重垣英明, 西田光夫, 垣内典夫, 田中敬一, 大宮あけみ, 石川祐子, 小園照雄, 木原武士, 鈴木勝征, 福田博之, 朝倉利員. 2002. ウメ新品種‘八郎’. 果樹研報 1: 35-46.

<記事引用>

- 果実日本 1999. 日本園芸農業共同組合連合会「特集◎西洋ナシ産業を展望する」Vol. 54: 26-64
- 果実日本 2001. 日本園芸農業協同組合連合会「海外トピックス ナシの国際シンポジウムに参加して」Vol. 56: 76-79

果実日本 2002. 日本園芸農業共同組合連合会「ラ・フランスの品種特性と販売方針」 Vol. 57:  
26-29

山形の西洋なし II. 山形県西洋なしの概要と生産の取り組み. 1-17

<統計資料>

国連食糧農業機関統計 (FAOSTAT) 2006. Production-core production-pear 2005

農林水産省大臣官房統計部 2006. 農林水産統計「平成 17 年産西洋なし, かき, くりの収穫量及び出荷量」<http://www.maff.go.jp/toukei/sokuhou/data/seiyounashi2005/seiyounashi2005.htm>

農林水産省大臣官房統計部 2006. 果樹生産出荷統計 西洋なし (H17).

農林水産省大臣官房統計部 2005 耕地及び作付面積統計 西洋なし (H17).

農林水産省大臣官房統計部 2004 平成 16 年産特産果樹生産動態等調査 西洋なし

山形県農業総合研究センター 2001 年度調査

Australian Bureau of Statistics 2006. Apples and Pears, Australia, Final, 2004-05

Eurostat 2006. European orchard survey 2002 Table pear trees.

United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service (USDA/FAS) March 2006. World Pear Situation: Driven by growing output in China, global production continues to increase.

<参考ホームページ>

GUIDE OF PEARS (<http://www.pomologie.com/poire/poire1/fpoires/varietes.html>)

Jargonelle Pears (<http://www.aquarterof.co.uk/jargonelle-pears-p-299.html>)

Keepers Nursery (<http://www.keepers-nursery.co.uk/searchresultscat.aspx>)

United States Department of Agriculture Agricultural Research Service National Clonal Germplasm Repository (NCGR) (<http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=11372>)

訂正

ページ番号を下記のように訂正いたします。

	【誤】	→	【正】
<u>目次</u>			
第4章 三倍体品種のS遺伝子型推定	<u>139</u>	→	<u>119</u>
第5章 ‘グランド・チャンピオン(Grand Champion)’の部分的自家和合性	<u>161</u>	→	<u>141</u>
総合考察	<u>183</u>	→	<u>163</u>
謝辞	<u>193</u>	→	<u>173</u>
参考文献	<u>195</u>	→	<u>175</u>
<u>本文</u>	<u>P139～P206</u>	→	<u>P119～P186</u>