

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月 31日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580005

研究課題名（和文）

カンキツ属植物における多胚発生制御遺伝子の同定とその多様化に関する研究

研究課題名（英文）

Identification of polyembryogenesis regulation gene in *Citrus* and diversification.

研究代表者

大村 三男 (Omura Mitsuo)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：90355397

研究成果の概要（和文）：

植物におけるアポミクシスの分子機構を解明するため、ポジショナルクローニング法を適用して、カンキツ珠心胚発生の制御に関わる遺伝子の同定を試みた。第1連鎖群上の原因遺伝子座領域に対応するゲノム領域380 kbの配列を決定し、この領域における多型分化を解析した。原因遺伝子座領域に検出された ORF については、多胚および単胚間での構造および発現比較した。また、これらと体細胞胚誘導時における発現遺伝子との関連を解析した。

研究成果の概要（英文）：

To understand the molecular mechanism of apomixis in plant, the positional cloning method was applied to identify the gene regulating nucellar embryogenesis in *Citrus*. The 380 kb covering the locus responsible to somatic embryogenesis on the linkage group 1 was sequenced and the diversification of the region was surveyed. The ORFs detected in the region were compared in their structure and expression between polyembryony and monoembryony haplotypes. The genes expressing during the somatic embryogenesis from cultured callus were also explored to associate with the responsible gene in nucellar embryogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：遺伝子、ゲノム、育種、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

植物におけるアポミクシスの遺伝的制御機構の解明は、体細胞胚発生・分化の解明・利用に道を開くと期待されるため、様々な植物

種において原因遺伝子の探求が進められている。ギニアグラス、セイヨウタンポポなどにおいても特異的発現を示す遺伝子の解析が進められつつあるが、いずれの種においても原

因遺伝子は特定には至っていない。

ミカン科カンキツ属植物では、ウンシュウミカン、スイートオレンジなどの種においては、胚嚢を取り囲む珠心から不定胚を発生させる型のアポミクシス能をもつため、1つの種子に交雑胚と体細胞胚を混在する多胚種子を形成する。一方、カンキツ属植物ではあっても、ブントなどでは交雑胚のみをもつ単胚種子を形成する。この現象に関して、カンキツについて開花前に形成されている珠心胚起源細胞の発育は、交雑胚と同調的に進行することが知られているが、カンキツ類においても現在まで珠心胚形成と明瞭な関連を示す遺伝子は確認されていない。

一方、カンキツの多胚性はその分離様式から、基本的には優性の1遺伝子による制御を受けることが報告されている。さらに、DNAマーカーを用いた遺伝地図作成技術の向上に伴い、カンキツ類においても多胚性遺伝子座のマッピングが高精度に進められた。多胚性遺伝子座に関して、ヘテロ接合型であるウンシュウミカン‘宮川早生’のBACライブラリーを用いて、この座位周辺のマーカー座位をカバーするBACクローンのコンティグ作成に成功し、ポジショナルクローニングによる多胚性原因遺伝子の同定に可能性が開かれてきた。

カンキツ以外の植物においてもアポミクシスに関与する遺伝子のポジショナルクローニングによる研究が試みられている。しかし、原因遺伝子領域付近の組換え抑制（ギニアグラス）などの要因により、遺伝子領域の解析が進んでいない。そのため、現段階では、カンキツ類は、多胚性遺伝子をポジショナルクローニングによって同定するための最も有効な植物種として期待されている。先にも述べたように、アポミクシス遺伝子は、植物の生殖・繁殖の農業的に利用するための

重要な情報を提供するばかりでなく、植物の繁殖システムの分子生物学的解析に貢献することから、カンキツ由来の多胚性遺伝子の同定、解析に期待が寄せられている。

2. 研究の目的

カンキツ多胚性原因遺伝子座は連鎖分析において第1連鎖群上に座乗することが知られてきた。この領域にある多胚性原因遺伝子を同定するために、いくつかのアプローチが可能である。カンキツのアポミクシス原因遺伝子座の領域には特段の組換え抑制は検出されていないため、多胚性制御遺伝子の同定に関してポジショナルクローニングが適用できる。この有利性を更に活用するアプローチとして、多胚性制御遺伝子の座乗領域の多胚/単胚ハプロタイプ間にある塩基配列の差異を検出する方法があげられる。特に、予測ORF領域における多胚/単胚ハプロタイプの配列比較からは、遺伝子の構造差から発現への影響を予測することができ、また、遺伝統計学的方法でその構造と胚性とをより密接に関連づけることができる。

同時に、予測ORFの発現について、珠心における体細胞胚の発育段階による変化、多胚性品種及び単胚性品種の発現比較を行うことで、ORFの珠心胚発生への関わりを複合的に検定することが可能となる。

本研究では、ポジショナルクローニングの方法からカンキツ多胚性原因遺伝子にアプローチするとともに、候補遺伝子の同定と機能解明のために、形質転換系を利用した実験基盤の開発を目的として一連の研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、カンキツ多胚性原因遺伝子を同定するため、以下の3つのアプローチを採

用した。

(1) 多胚性遺伝子座領域のゲノム配列の比較解析による ORF 構造・機能変異の推定

① 多胚性遺伝子座領域のゲノム配列の解析・比較

カンキツ第 1 連鎖群上に座乗する多胚性遺伝子領域をカバーする BAC クローン（‘宮川早生’ゲノム由来）で構築したコンティグ配列をサンガー法により確定し、遺伝子配列予測ソフトウェアにより領域内の候補遺伝子を抽出した。‘宮川早生’はこの座位においてヘテロ接合型であるので、単胚性ハプロタイプについても塩基配列を決定し、塩基置換、挿入/欠失、コピー数変異などの差異を網羅的に検出した。

② カンキツ品種の多胚性遺伝子座領域の多型解析とその関連解析への適用

多胚/単胚のハプロタイプ配列間の挿入/欠失を検出する STS プライマーを設計し、カンキツ品種 54 点でタイピングを行った。各品種の多胚/単胚性について、STS マーカー型から期待される多胚表現型と一致度について χ^2 検定により連鎖不平衡を推定することで、対象遺伝子領域の絞り込みを行った。

(2) 多胚および単胚品種の珠心における候補遺伝子の発現比較

多胚性遺伝子座のゲノム領域における多胚性原因遺伝子を探索するため、候補遺伝子領域の配列からの発現を検定した。第 1 に、このゲノム領域全体の発現を検索するため、候補領域全長のタイリングアレイを設計（センスおよびアンチセンスプローブともカバー率約 85%）し、遺伝的背景の類似する多胚品種、単胚品種各 2 品種の珠心（開花当日）から全 RNA を抽出して発現を解析した。

また、ゲノム配列に予測された 72 の ORF

を原因遺伝子候補として、発現解析を行った。これら遺伝子候補について、多胚品種 3 点および単胚品種 3 点の胚珠から、開花 0 日、15 日後、および 30 日後に発現を定量的に測定した。

(3) 形質転換による候補遺伝子の機能推定基盤の開発

① シロヌナズナ形質転換体の作出

多胚性遺伝子座候補領域に検出された ORF のうち、転写因子様遺伝子の塩基配列について、CaMV35S プロモータ制御下での構成的発現コンストラクトを作成し、シロイヌナズナに導入して、表現型の変異との関連性を解析した。

② カンキツ不定胚形成過程における発現遺伝子プロフィール解析

カンキツカルス細胞から体細胞胚形成の培養系における遺伝子発現のプロフィールを解析した。多胚性品種‘太田ポンカン’の珠心に由来する培養カルス細胞を、ガラクトース 0.1M とソルビトール 0.1M を添加した胚誘導培地に置床した。その後、経日的に胚形成状態を観察するとともに、cDNA マイクロアレイおよびリアルタイム RT-PCR による発現の変化を定量的に解析し、胚形成に関連した遺伝子の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) カンキツ多胚性遺伝子座領域における多胚および単胚ハプロタイプの塩基配列決定

① 配列決定と ORF 構造比較

多胚性遺伝子座領域をカバーする 3 つの BAC クローンで塩基配列を決定し、最終的に 382,081 bp からなる単一のコンティグを構築し、公的データベースに登録、公表した (DDBJ:Acc. No. AB573149)。

このゲノム配列を参照して単胚ハプロタイプ配列を解析した。66,514 リードの塩基配列から単一のコンティグを得た。これは、多胚ハプロタイプ全長の87%をカバーし、予測された72個のORFの内、4番目から67番目までの64個について比較可能となった。

多胚性ハプロタイプに予測されたエクソン領域(339エクソン)について、単胚ハプロタイプ配列との間に597カ所のSNPと13カ所の挿入/欠失が検出された。また、64ORFの内、53ORFではアミノ酸置換をもたらす変異が検出された。コード領域内の挿入/欠失によるフレームシフト、終止コドンの生成、エクソン-イントロンの連結部位の配列に変異など、多数のORFに遺伝子機能の差異を生じる可能性のある変異が認められた(表1)。

表1. ‘宮川早生’多胚性制御遺伝子座領域に予測されたORF配列の多胚/単胚ハプロタイプ間の構造比較。(中野ら2011)

ORF番号	エクソン数	SNP数	挿入/欠失カ所	予測変異
20	4	6	1	フレームシフト
27	4	14	0	終止コドン
28	11		1	終止コドン
29	4		2	終止コドン
45	2	3	1	
52	15	2	0	スプライシング
60	2	1	1	フレームシフト
64	1	7	1	

② カンキツ多胚性遺伝子座領域における挿入・欠失多型による胚性との連鎖不平衡解析

多胚・単胚ハプロタイプ間で配列比較を行った約335kbの領域には、20塩基以上の挿入/欠失は合計33カ所検出された。これらの変異のうち、ORF領域内の変異は5カ所で、そのうち2カ所はエクソン内の変異であった。また、100塩基以上の変異も、それぞれ4および7カ所で検出された。

これらの挿入/欠失を対象として15個のSTSマーカーを作成し、カンキツ54品種のタイピングを行い、多胚性表現型との関連を解

析した(表2)。その結果、150~250kbの領域で多胚性表現型に対して高い一致度が認められ、候補遺伝子領域は約1/2に絞り込まれた。同時に、単胚アレルを担架するハプロタイプ群の間には、カンキツ品種の多様化に対応する配列分化が認められたのに対して、多胚性ハプロタイプの間には、ほとんど変異が検出されず、多胚性に関わるハプロタイプの構造維持に関わる要因があるものと考えられ、多胚性遺伝子の生成、分化の手がかりになるものと期待された。

また、これらのSTSマーカーを用いて、各品種の多胚性遺伝子座領域における遺伝子型を決定した結果、‘フルア’および‘サガマダリン’の2品種だけが、この領域において多胚性をホモ接合型にもつことが確認され、遺伝子発現の解析実験に有効するための重要は情報を得ることができた。

表2. 多胚性ゲノム領域における挿入/欠失変異STSマーカーによるカンキツ品種のタイピングと多胚性との関連。(大村ら2011)

変異領域名	ORFとの位置関係	挿入/欠失(Δ)塩基数 ²	胚性との一致度 ³
GAP03	ORF10-ORF11間	Δ210	0.69
Rech03(3)	ORF17-ORF18間	200	0.55
GAP04	ORF21-ORF22間	Δ572	0.71
GAP05	ORF28(エクソン02)内	23	0.90
GAP06	ORF29(エクソン01)内	Δ42	0.86
Rech53	ORF31-ORF32間	32	0.93
Rech54	ORF31-ORF32間	28	0.76
GAP10	ORF35-ORF36間	Δ710	0.50
Rech56	ORF41-ORF42間	50	0.66
GAP13	ORF45-ORF46間	24	0.91
GAP15	ORF46-ORF47間	Δ988	0.66
GAP16	ORF47-ORF48間	800	0.90
GAP17	ORF50-ORF51間	Δ67	0.88
GAP18	ORF52-ORF53間	Δ176	0.71
GAP20	ORF58-ORF59間	Δ139	0.79

² ‘宮川早生’多胚性配列に対する単胚性配列の変異型
³ カンキツ54品種における挿入/欠失型と胚性との一致度

(2) カンキツの体細胞胚形成過程における遺伝子発現プロファイルの解析

① ゲノムタイピングアレイによる解析

多胚性遺伝子座ゲノム領域の塩基配列から作成したゲノムタイルアレイを用いて、多胚性品種および単胚性品種の珠心(開花当日)の発現を解析した。このアレイ上に配置されたエクソン予測領域で高い発現が認め

られ、ゲノム配列からの予測がほぼ正確に行われていることが示された。しかし、これらの発現には、品種による発現差が検出されたが、多胚/単胚と厳密に関連性を示す差は認められなかった。また、遺伝子間領域でのシグナルが確認されたこと、多くの ORF 領域についてアンチセンスプローブでの発現も認められたことから、より詳細な発現解析が必要と考えられた。

② ORF 発現の品種比較

多胚性ハプロタイプ配列に予測された72のORFについて、開花から不定胚形成時期(開花60日)までの間、15日ごとに発現を定量的に解析した。胚性の異なる品種を比較した結果、いくつかの特徴ある発現プロフィールを示すORFを検出した。ORF65の発現は、初期に上昇した後減少し(図1)、シロイヌナズナホモログ*MYB3*の種子の成長時のパターンと類似した。また単胚・多胚ハプロタイプ間に構造変異による発現差の予測された候補遺伝子群にも、品種間に異なる発現を示したものが検出された。

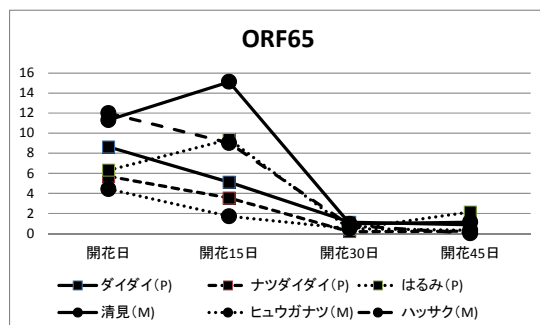


図1. カンキツ品種(多胚性P、単胚性M) 珠心発育期におけるORF65の発現プロフィール。(小澤ら 2011)

(3) ORF 機能検定のための形質転換実験

① シロイヌナズナでの形質転換実験

予測ORFのうち、転写に関わる遺伝子と類似性を示す10のORF配列をCaMV35Sプロモータに連結して、シロイヌナズナに形質転換したが、現在まで、特徴ある形態上の変化は

観察されていない。遺伝子発現における生物種の遺伝的背景による影響も推察されたため、カンキツ不定胚誘導条件下で発現させる検定など、より詳細な検定が必要と考えられた。

② カルスからの不定胚誘導過程における標識遺伝子の検索

体細胞胚への分化の過程において発現する遺伝子は、候補遺伝子の機能を推定する重要な実験の1つになると期待されたため、カンキツ培養からの体細胞胚分化において発現する遺伝子を検索し、珠心における原因遺伝子の発現との関連を考察した。

培養0日の試料と、球状胚の形成が観察され始める培養20日の試料との間で、cDNAマイクロアレイ(22k)を用いて遺伝子発現を比較した。その結果、3倍以上に発現が増減した遺伝子は、6505であった。このうち、シロイヌナズナの胚形成関連遺伝子に相同性を示すものは24遺伝子であり、これらについて詳細に解析した。

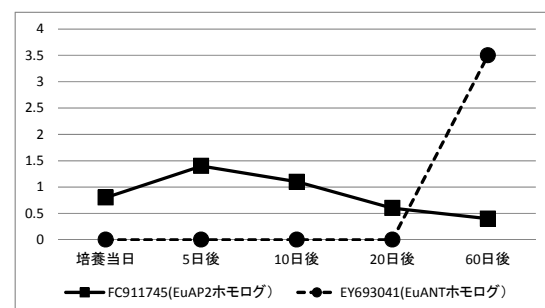


図2 シロイヌナズナの胚形成と関連するAP2様遺伝子ホモログのカンキツカルスからの胚誘導過程における発現プロフィール。(木越ら 2010)

シロイヌナズナのAP2サブファミリーに属する遺伝子ホモログのいくつかはRT-PCRによる発現に特徴的なパターンを示した(図2)。これらのうち*AINTEGUMENTA-LIKE 5 (AIL5)*と相同性の高いEST(EY682617)は、不定胚形成のステージが進むにつれて、単純に発現量が大きくなったが、*APETALA 2*と相同

性の高い EST (FC911745) は、培養 5 日後に発現が一時的に高まり、不定胚の発達段階が進むにつれ発現量は低下した。これらの結果は、*AP2* 様遺伝子群自体は、多胚性制御遺伝子座領域には存在しないため原因遺伝子とはなりえないが、カンキツ培養細胞からの体細胞胚形成への誘導を示す分子指標として利用できる可能性を示唆した。

これらの一連の研究により、多胚性遺伝子座領域にあり、構造および発現上胚性と高い関連を示す ORF の検出と候補の絞り込みが可能となった。また、それらの候補遺伝子が機能を検定するため形質転換実験系を整備することができた。これらの進展がカンキツの珠心胚制御遺伝子の同定に大きく貢献すると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Nakano, M., T. Shimada, T. Endo, H. Fujii, H. Nesumi, M. Kita, M. Ebina, T. Shimizu and M. Omura. Characterization of genomic sequence showing strong association with polyembryony among diverse *Citrus* species and cultivars, and its synteny with *Vitis* and *Populus*. *Plant Science* 査読有 183 巻 2012. 131-142.
- ② Sugiyama, A., M. Omura, H. Matsumoto, T. Shimada, H. Fujii, T. Endo, T. Shimizu, H. Nesumi and Y. Ikoma. Quantitative trait loci (QTL) analysis of carotenoid content in *Citrus* fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 査読有 80 巻 2011. 136-144.
- ③ Ohta, S., T. Endo, T. Shimada, H. Fujii, T. Shimizu, T. Kuniga, T. Yoshioka, H. Nesumi, T. Yoshida, and M. Omura. PCR primer for marker assisted backcrossing to introduce a CTV resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. into *Citrus*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 査読有 80 巻 2011. 295-307.
- ④ Sugiyama, A., Y. Ikoma, H. Fujii, T. Shimada, T. Endo, T. Shimizu and M. Omura. Structure and expression levels of alleles of *Citrus* zeaxanthine epoxidase genes. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 査読有 79 巻 2010. 263-274.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 大村三男・中野道治・藤井浩・遠藤朋子・島田武彦・清水徳朗・喜多正幸・吉岡照高. カンキツ連鎖地図 STS マーカーのクレメンチングノム

配列との対応づけ 園芸学会平成 24 年度春季大会 平成 24 年 3 月 29 日 大阪府立大学(大阪府)

- ② 小澤綾・中野道治・遠藤朋子・藤井浩・島田武彦・清水徳朗・喜多正幸・吉岡照高・大村三男. カンキツ多胚性遺伝子座領域における予測 ORF の発現解析 園芸学会平成 23 年度秋季大会 平成 23 年 9 月 26 日 岡山大学 (岡山県)

- ③ 大村三男・中野道治・藤井浩・遠藤朋子・島田武彦・清水徳朗・喜多正幸・吉岡照高. カンキツ多胚性遺伝子座領域における挿入欠失変異 カンキツ多胚性遺伝子座領域における挿入欠失変異 園芸学会平成 23 年度秋季大会 平成 23 年 9 月 26 日 岡山大学 (岡山県)

- ④ 中野道治・小澤綾・遠藤朋子・藤井浩・島田武彦・清水徳朗・蝦名真澄・大村三男. カンキツ多胚性遺伝子座領域におけるゲノム配列のハプロタイプ比較 園芸学会平成 23 年度春季大会 平成 23 年 3 月 21 日 宇都宮大学

- ⑤ 木越景子・中野道治・遠藤朋子・島田武彦・藤井浩・清水徳朗・大村三男. カンキツの不定胚形成過程における *AP2* 様遺伝子の発現プロフィールの解析 園芸学会平成 22 年度秋季大会 平成 22 年 9 月 20 日 大分大学

- ⑥ 木越景子・中野道治・遠藤朋子・島田武彦・藤井浩・清水徳朗・大村三男. マイクロアレイを用いたカンキツカルスからの胚形成過程における遺伝子発現プロフィールの解析 園芸学会 平成 22 年 3 月 21 日 藤沢市 日本大学

- ⑦ 中野道治・藤井浩・木越景子・島田武彦・遠藤朋子・清水徳朗・蝦名真澄・大村三男. カンキツ多胚性遺伝子座ゲノム領域の塩基配列決定と発現解析 園芸学会 平成 21 年 9 月 26 日 秋田市 秋田大学

- ⑧ 木越景子・中野道治・遠藤朋子・島田武彦・藤井浩・清水徳朗・大村三男. カンキツカルスからの胚形成過程における遺伝子発現プロフィールの解析 園芸学会 平成 21 年 9 月 26 日 秋田市 秋田大学

- ⑨ Omura, M., M. Nakano, H. Fujii, K. Kigoshi, T. Shimada, T. Endo, T. Shimizu and M. Ebina. Characterization of genomic sequence for the polyembryony locus in *Citrus* by expression and association analysis. *The International Conference on the status of Plant & Animal genome research. (PAG-XVIII)*. 2010. 1. 9-13. San Diego, CA, USA

[図書] (計 1 件)

- ① 八田洋章・大村三男. 果物学—果物のなる樹のツリーウォッチング 東海大学出版会 2010 388.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 三男 (Omura Mitsuo)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：90355397