

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18643

研究課題名(和文)カンキツのゲノム情報を利用したわい化関連遺伝子座の同定

研究課題名(英文)Identifying the dwarf related loci by using the genome information of citrus

研究代表者

後藤 新悟(GOTO, Shingo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主任研究員

研究者番号：60433215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒリュウとウンリュウはカラタチのわい化系統であるが、ヒリュウはカラタチの変異系統、ウンリュウは自殖後代であることがわかっている。そこで、ヒリュウとウンリュウをマイクロアレイ解析によって、わい化関連遺伝子を特定し、カラタチとウンリュウの遺伝子型をゲノムワイドに比較することによって、ウンリュウ特異的ホモ化領域、すなわち、わい化関連領域を特定した。ヒリュウ自殖後代に出現した極度のわい化系統においてわい化関連遺伝子とわい化関連領域が重なり合った領域を同定することによって、最終的にEY717552遺伝子がわい化の原因である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that Hiryu is a mutant line of Poncirus trifoliata and Unryu is inbred line of that, which both Hiryu and Unryu are dwarf lines of that. The dwarf related genes in Hiryu and Unryu were identified compared with Poncirus with microarray analysis. The Unryu specific homozygous genome regions, that is dwarf related genome regions, in Unryu were identified compared Poncirus genome with genome wide SSR makers. We finally showed the possibility that EY717552 gene is the cause of dwarf by identifying the overlap regions between the regions where the dwarf related genes locate and the dwarf related genome regions in the dwarf lines in Hiryu inbred lines.

研究分野：カンキツゲノム

キーワード：カンキツ SSRマーカー ゲノム情報 わい化 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

日本のカンキツ栽培では海外カンキツとの競合や農家の後継者不足や高齢化のために、低コスト化と省労力化が求められており、また、カンキツは傾斜地で栽培されることが多く、傾斜地での農作業を考えるとコンパクトに栽培するのは重要である。このような理由からカンキツのわい性化は重要な形質である。

わい性化はシロイヌナズナにおいては brassinosteroid の合成酵素や受容体、シグナル伝達経路遺伝子の欠損によっておこることがわかっている。またイネにおいてはジベレリン合成酵素遺伝子の欠損によって生じることが報告されている。しかしながら、カンキツにおけるわい性化にかかわる分子メカニズムは解明されていない。それはカンキツゲノムがヘテロ性に富んでおり(ホモ化され固定されていない) 開花までに 6-10 年かかり、DNA マーカー、マイクロアレイも整備されておらず、またゲノム配列も解読されていないため分子レベルの研究が困難を極めていたためである。

しかしながら、近年はカンキツのゲノム解読、マイクロアレイ、DNA マーカーの開発が進められてきている。マイクロアレイによって、カンキツのほぼすべての遺伝子発現を一度に定量することが可能であり、DNA マーカーによって遺伝子型を解析し、ゲノムの各領域がどちらの親系統由来なのか、またホモ/ヘテロの判別が可能である。このため、分子レベルでの研究が可能になっている。

日本で栽培されているカンキツ品種はほとんどが台木としてカラタチを使用し、接ぎ木によって栽培されている。カラタチの系統にはわい化形質を持つヒリュウとさらに強いわい化形質をもつウンリュウが知られている(表1)。

表1 わい性カラタチの表現型と特徴

わい性カラタチ	表現型	
‘ヒリュウ’	<ul style="list-style-type: none"> ✓ わい化性 ✓ 茎がややねじれる ✓ 穂木の生育は緩慢 	
‘ウンリュウ’	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 強度のわい性 ✓ 茎がねじれる ✓ トゲが短く、葉は針状 ✓ 生育は極めて緩慢 	

これまでに開発された 305 の DNA マーカーを用いてこれら 2 系統とカラタチのゲノム全体の遺伝子型を比較解析したところ、ヒリュウの遺伝子型はゲノム全域でカラタチの遺伝子型と一致しており、ウンリュウはホモ化率が上がっていた(表2)。

これらの結果はヒリュウがカラタチの変異系統であり、ウンリュウは自殖後代であることを示している。つまりは、ヒリュウのわい化は一部の遺伝子座の変異によって、また

表2 DNA マーカーをもちいた、ゲノムワイドな遺伝子型の判別

品種・系統	ホモ化率 (%)	遺伝子型の一致率 (%)
カラタチ (対照)	69.5	100
ヒリュウ	68.3	97.3
ウンリュウ	82.1	74.6

ウンリュウのわい化はある特定のヘテロ領域が自殖によりホモ化したことによってもたらされたことが考えられる。さらに付け加えると、カラタチとウンリュウのゲノム全域での遺伝子型を比較し、ウンリュウ特異的なホモ化領域には、わい性化に関わる遺伝子が存在している可能性があるということが示唆される。

2. 研究の目的

本研究ではカラタチをカンキツのモデルとして位置づけ、カラタチ、ヒリュウ、ウンリュウを研究材料とし、以下の 2 つを目的とした。

- 1) DNA マーカーとマイクロアレイを用いて、わい化形質を決める遺伝子座を同定する。
- 2) ヒリュウの自殖後代を用いて、わい化遺伝子座のホモ化とわい化形質の相関を評価する。

3. 研究の方法

- 1) DNA マーカーとマイクロアレイを用いて、わい化形質を決める遺伝子座を同定した。

1. 我々はゲノムワイドな SSR マーカーを既に開発しており(Shimizu H et al. BMC Research Notes 2011, Shimizu H et al. PLOS ONE 2016)、これらマーカーを含めた 305 個の SSR マーカーでカラタチとウンリュウを既に分析済みであり、共通して遺伝子型を取得できたのは、290 個のマーカーであった。それらの中からカラタチでヘテロ型、ウンリュウでホモ型になるマーカー(ウンリュウ特異的なホモ型遺伝子座)を探索した。

2. 我々はまたカンキツの遺伝子発現を網羅的に解析できるマイクロアレイを開発している(Shimizu H et al. Acta Horticulturae 2011)。2014 年 7 月と 8 月にサンプリングした枝から RNA を抽出し(Ikoma Y et al. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 1996)、Low Input Zuck Amp Labeling Kit (Agilent Tech.)を用いて蛍光ラベリングを行った。蛍光ラベルされた cRNA は精製後、カンキツオリゴアレイ(8 × 60K)を用いてハイブリダイゼーションを行い、マイクロアレイはアジレントマイクロアレイスキャナーでデータを取得した。スキャン後は Agilent Feature Extractor で数値化を行い、Subio (Subio) で解析を行った。

3. カンキツゲノムデータベース (<http://www.citrusgenome.jp/> Shimizu H et al. *Frontiers in Genetics* 2017) を用いて、マイクロアレイによって同定したわい化関連遺伝子とウンリュウ特異的ホモ型遺伝子座が近接するかどうかを調査した。

2) ヒリュウの自殖後代を用いて、わい化遺伝子座のホモ化とわい化形質の相関を評価した。

1. 2015年4月の開花期にヒリュウに自家受粉させ、11月に自家受粉させた果実を収穫した。これら果実の種子を播種し、48系統の実生を得た。ヒリュウは多胚性をもっているため、自家受粉を行った実から種子をとっても、自殖していない可能性がある。そこでこれら実生からDNAを抽出し(Shimizu H et al. *BMC Research Notes* 2011)、8つのSSRマーカーを用いて(Shimizu et al. *PLOS ONE* 2016)、ジェノタイピングし、そこで得られた遺伝子型からヒリュウ自殖後代を選抜した。これら自殖後代においてウンリュウ特異的ホモ型遺伝子座マーカーを用いて、ジェノタイピングを行い、わい化表現型と遺伝子型の相関を解析した。

4. 研究成果

カラタチとウンリュウに共通して遺伝子型を取得できた290個のマーカーから、17のウンリュウ特異的ホモ型遺伝子座を特定することができた。(表3)

表3 ウンリュウ特異的ホモ型遺伝子座

ウンリュウ特異的ホモ型遺伝子座	カラタチ遺伝子型	ウンリュウ遺伝子型	座乗する連鎖群
CTVR01	304/310	304/304	LG7
CTVR04	305/311	305/305	LG7
CUBER934	101/107	101/101	-
CX0010	222/231	231/231	LG1
CX0035	190/195	195/195	LG3
CX2018	156/158	158/158	LG2
CX2040	100/112	100/100	LG3
CX3002	160/162	162/162	-
CX5024	361/366	361/361	-
GSR5122	249/249	244/249	LG8
SSR07A19	127/130	130/130	LG3
SSR07B26	201/205	205/205	-
SSR08A09	90/94	90/90	LG2
SSR08B40	156/160	156/156	LG2
TSGR265	180/183	183/183	LG2
TSRF111	322/327	327/327	-
TSRF235	165/168	165/165	-

また、2014年の7月、8月にカラタチ、ヒリュウ、ウンリュウのそれぞれの枝のサンプリングを行い、マイクロアレイ解析に供試した。カラタチと比較し、ヒリュウとウンリュウそれぞれにおいて7月、8月に共通し、発

現差2倍以上かつt検定 $p < 0.05$ の遺伝子、及び、発現差0.5倍以下かつt検定 $p < 0.05$ の遺伝子を同定した。さらにそれらの中で、ヒリュウとウンリュウに共通して発現変動を示す遺伝子を同定した(表4)。表4に示す発現変動遺伝子のそれぞれのアノテーション

表4 カラタチに対するヒリュウとウンリュウ発現変動遺伝子

probeID	カラタチと比較した発現相対値			
	ヒリュウ		ウンリュウ	
	7月	8月	7月	8月
EY850824	4.4	40.0	75.0	30.0
AB218613	17.3	37.2	15.8	38.6
GE213399	32.9	33.2	32.1	35.8
EY709286	15.2	20.8	12.5	28.0
CX305054	4.5	7.1	20.3	10.7
LLL1661	3.0	2.9	2.3	2.9
FC920194	3.5	2.0	3.8	2.7
DY291520	0.33	0.08	0.11	0.28
FBI1869R	0.47	0.10	0.22	0.24
EY739705	0.30	0.10	0.09	0.26
EY797567	0.50	0.37	0.00	0.04
EY717552	0.48	0.38	0.23	0.44

を以下に示す。EY850824: zinc ion binding、AB218613 EY709286: SHP1 / transcription factor、GE213399: SHP2 / transcription factor、CX305054: hAT dimerisation domain-containing protein、LLL1661: structural constituent of ribosome、FC920194: 2-nitropropane dioxygenase family、DY291520 FBI1869R: GPT2 / glucose-6-phosphate transmembrane transporter、EY739705: FAD2 / delta12-fatty acid dehydrogenase、EY797567: PMEPCRA / enzyme inhibitor、EY717552: putative starch synthase。これら遺伝子はわい化に関連していることが示唆される。特に、AB218613、EY709286、GE213399はSHP(SHATTERPROOF)のアノテーションがついており、この遺伝子はシロイヌナズナにリグニン化に関係していることが報告されている。カンキツのわい化とリグニン化の関係についてとても興味深い。

次に、ヒリュウ自殖後代を用いて、わい化の表現型とウンリュウ特異的ホモ型遺伝子座のホモ化との相関を調べた。自家受粉させたヒリュウの実の種子を播種し、発芽した実生のジェノタイピングを8つのマーカーで行うことで、ヒリュウの自殖後代を選抜を行った。48系統の実生から8系統の自殖後代を選抜することができた。これらのうち2系統(D1、F1)が極度のわい化形質を有していた(表5)。

自殖後代でのわい化形質とウンリュウ特異的ホモ型遺伝子座のホモ化との相関を調べるため、表3で示す17個のマーカーを用いてヒリュウ自殖後代のジェノタイピングを行った。その結果、極度のわい化形質を持

表 5 ヒリュウ自殖後代の表現型とウンリュウ特異的ホモ化領域との相関

	表現型	CTVR01	CTVR04	SSR07A19
ウンリュウ	極度のわい化	304/304	305/305	130/130
ヒリュウ	わい化	304/310	305/311	127/130
自殖後代 A1	わい化	304/310	305/311	127/130
自殖後代 B2	わい化	304/310	305/311	127/130
自殖後代 D1	極度のわい化	304/304	305/305	130/130
自殖後代 E4	わい化	304/310	305/311	127/130
自殖後代 F1	極度のわい化	304/304	305/305	130/130
自殖後代 G1	わい化	304/310	305/311	127/130
自殖後代 D5	わい化	304/310	305/311	127/130
自殖後代 D7	わい化	304/310	305/311	127/130

つD1、F1 系統においては共通してCTVR01、CTVR04、SSR07A19 の領域のホモ化が確認された。これらがわい化に関連した領域であることが示唆される。

続いて、CTVR01、CTVR04、SSR07A19 の領域に表 4 で示す発現変動遺伝子が存在するかどうかをゲノムデータベースを用いて、検証した。その結果、SSR07A19 領域に EY717552 が存在している可能性が示された。

本研究において EY717552 遺伝子がヒリュウとウンリュウにおけるわい化の原因である可能性が示されたが、この遺伝子のアノテーションは putative starch synthase であり、シロイヌナズナにおける相同遺伝子においても詳しい機能は明らかとなっていない。また、わい化とデンプン合成が関連しているという報告もない。今後は EY717552 遺伝子をカラタチ、ヒリュウ、ウンリュウからクローニングし、遺伝子構造等のさらなる解析が必要になってくるが、本研究によって、カンキツのわい化のメカニズムの一端が解明された。

引用文献

H. Shimizu and K. Yano, A post-labeling method for multiplexed and multicolored genotyping analysis of SSR, indel and SNP markers in single tube with bar-coded split tag (BStag), BMC Research Notes, 4, 2011, 161.

H. Shimizu et al., Hybrid origins of citrus varieties inferred from DNA marker analysis of nuclear and organelle genomes, PLOS ONE, 11, 2016, e0166969.

H. Shimizu et al., Data Mining of Citrus Expression Sequence Data Sets and Application for Functional Genomic Study, Acta Horticulturae, 892, 2011, 29-36.

Y. Ikoma et al., Isolation and evaluation of RNA from polysaccharide-rich tissues in fruit for quality by cDNA library construction and RT-PCR, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 64, 1996, 809-814.

H. Shimizu et al., Draft sequencing of the heterozygous diploid genome of Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) using a hybrid assembly approach, Frontiers in Genetics, 8, 2017, 180.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

T. Shimada, T. Endo, A. Rodriguez, H. Fujii, S. Goto, T. Matsuura, Y. Hojo, Y. Ikeda, I. Mori, T. Fujikawa, L. Pena, M. Omura, Ectopic accumulation of linalool confers resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in transgenic sweet orange plants, Tree physiology, 査読有, 37, 2017, 654-664. DOI: 10.1093/treephys/tpw134

S. Goto, T. Yoshioka, S. Ohta, M. Kita, H. Hamada, T. Shimizu, Segregation and heritability of male sterility in populations derived from progeny of Satsuma mandarin, POLS ONE, 査読有, 11, 2016, e0162408, DOI: 10.1371/journal.pone.0162408

T. Shimizu, A. Kitajima, K. Nonaka, T. Yoshioka, S. Ohta, S. Goto, A. Toyoda, A. Fujiyama, T. Mochizuki, H. Nagasaki, E. Kaminuma, Y. Nakamura, Hybrid Origins of Citrus Varieties Inferred from DNA Marker Analysis of Nuclear and Organelle Genomes, POLS ONE, 査読有, 11, 2016, e0166969, DOI: 10.1371/journal.pone.0166969

[学会発表](計 3 件)

後藤新悟、吉岡照高、太田智、喜多正幸、濱田宏子、清水徳朗、温州ミカン後代集団におけるカンキツ雄性不稔性 QTL の検出とその効果の検証、日本育種学第 131 回講演会、2017

清水徳朗、野中圭介、吉岡照高、太田智、後藤新悟、北島宣、神沼英里、中村保一、高精度 DNA マーカー分析による在来カンキツ品種の類縁関係の推定、園芸学会平成 28 年春季大会、2016

清水徳朗、神沼英里、野中圭介、吉岡照高、後藤新悟、松本敏美、片寄裕一、望月孝子、谷澤靖洋、豊田敦、藤山秋佐夫、中村保一、カンキツの高密度連鎖地図の構築と参照ゲノム配列との比較、日本育種学会第 129 回講演会、2016

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 新悟 (GOTO, Shingo)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主任研究員

研究者番号：60433215