

令和 元年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0285

研究課題名（和文）ヒュウガナツ‘西内小夏’の非還元花粉形成機構の解明とそのカンキツ育種への利用（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Unveiling the mode of unreduced pollen formation in 'Nishiuchi Konatsu' Hyuganatsu and its application for citrus breeding(Fostering Joint International Research)

研究代表者

本勝 千歳 (Honsho, Chitose)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：30381057

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,200,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：ヒュウガナツ‘西内小夏’の非還元花粉は自家不和合性を打破して受精に至るが、その機構は明らかでない。本研究ではカンキツ属の自家不和合性に関する知見を得るために、まずクレメンティンゲノムデータベースで他植物において自家不和合性への関与が知られているT2型RNaseを検索し、その中に花柱特異的発現を持つものを見出した。また、ヒュウガナツとその自家和合変異系統の花柱RNAを用いてRNA-seqを行い、T2型RNaseの一つが自家和合系で有意に発現低下していることを明らかにした。また、フロリダ大学で自家不和合性カンキツ品種3種から花柱を採取してRNA-seqを行い、いくつかのT2型RNaseを獲得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンキツ属植物における自家不和合性は、結実性や無核性に関連する農業上重要な形質であるが、そのメカニズムについてはあまり知見が得られていない。本研究においては、他の自家不和合性植物に見られるS-RNase（T2型RNase）に焦点を当て、クレメンティンやヒュウガナツなどの自家不和合性カンキツ属植物にもS-RNaseのオーソログの可能性が示唆される遺伝子が存在することをみいだした。これにより、自家不和合性メカニズムの解明に向けて新たな知見を加えることができたことは、学術的・社会的に意義のあるものである。

研究成果の概要（英文）：Although unreduced pollen of 'Nishiuchi Konatsu' Hyuganatsu can break self-incompatibility followed by fertilization, its mechanism is not fully understood. In this study, in order to obtain the knowledge for the genetic mechanism of self-incompatibility in citrus, T2 RNases, which are known as female S determinant in some self-incompatible plant species, were searched in the genome database of clementine mandarin. It was also found that there was one gene showing the expression specific to the pistil of the flower. RNA-seq was conducted using RNAs from styles of flowers from self-incompatible Hyuganatsu and its self-compatible mutant. As a result of an analysis of differentially expressed genes, one T2 RNase was significantly downregulated in the self-compatible mutant. In addition, styles of three self-incompatible citrus cultivars were used for RNA-seq analysis to obtain some T2 RNases.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹 カンキツ 自家不和合性 T2型RNase

様式 F - 19 - 2

## 1. 研究開始当初の背景

カンキツ属(*Citrus*)果樹の一種であるヒュウガナツ (*Citrus tamurana*) の突然変異品種 ‘西内小夏’ では、非還元花粉(非還元花粉とは減数分裂の異常により染色体数の半減が起こらずに、親植物体と同数の染色体をもった  $2n$  花粉)の形成が特徴的に見られる。この形成メカニズムの解明を目的に研究を行ってきた結果、‘西内小夏’ の非還元花粉は、第一減数分裂時に異常が生じ、その非還元花粉は親植物のヘテロ接合性を高い割合で維持していることを明らかにした。

この ‘西内小夏’ の生殖特性として、自家受粉を行うと、自家不和合性反応が生じずに受精に至る。また、これまでの研究から、受精に至っているのは  $2n$  花粉のみであることが明らかにされているが、なぜ自家不和合性が打破されるのかは明らかでなかった。しかし、 $2n$  花粉の高いヘテロ接合性を考慮すれば、これはカンキツの自家不和合性が S-RNase 型であるためではないかと推察された。それは、現在までに明らかになっている他の自家不和合性メカニズムでは、花粉の染色体数の倍化(増加)による自家不和合性打破現象の説明ができず、S-RNase 型自家不和合性で見られる競合的相互作用 (competitive interaction) を考えたときのみ、この ‘西内小夏’ に見られる自家不和合性打破現象を矛盾無く説明できるからである。

## 2. 研究の目的

本研究では、非還元花粉形成の研究で得られた知見を発展させ、カンキツ属植物全体に広く見られる自家不和合性の解明を目的としている。現在カンキツ属植物では、スイートオレンジ (*C. sinensis*) とクレメンティン (*C. clementina*) の二種において参照ゲノム配列が公開されており、申請者が Phytozome データベースで、これらのゲノム配列において、S-RNase 型自家不和合性植物の花柱側因子である T2 型 RNase の配列を検索したところ、複数の配列がヒットした。さらにそのゲノム周辺領域には、S-RNase 型自家不和合性で花粉側因子として機能する F-Box タンパク質の配列が存在するものも見られた。そこで、本研究では、まずクレメンティンゲノムデータベースより得られた T2 型 RNase の特徴について調査を行う。次に、ヒュウガナツを含めた複数のカンキツ属植物の花柱および花粉より、total RNA を抽出し、次世代シーケンサーによって発現遺伝子の配列を網羅的に回収するトランスクリプトーム解析を行い、カンキツ属植物の自家不和合性に関する知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) クレメンティンゲノムデータベース検索による T2 型 RNase 遺伝子の獲得とその特徴づけ

**植物材料** 宮崎県宮崎市佐土原町の宮崎県総合農業試験場にあるクレメンティン(品種不詳)を使用した。花は 2016 年 4 月に開花直前のものを採取し、器官ごと(花柱、柱頭、花弁、花糸、子房、がく + 花梗)に分けた後、液体窒素で冷却し、 $-80^{\circ}\text{C}$  ディープフリーザで保存した。また宮崎大学農学部果樹園芸学研究所圃場にあるクレメンティン樹から、2015 年に採取した種子を発芽させて得た実生の葉、茎、根をあわせて使用した。

クレメンティン×ヒュウガナツの果実を 2016 年 11 月 16 日に収穫して、種子を採取した。湿らせたろ紙を敷いたシャーレ内に置き、宮崎大学果樹園芸学研究室内のインキュベーターで発芽させた。その後 74 個体が発芽し、ジフィーポットに植え替えて、子葉が十分に展葉した時点で葉を採取し、これを実験に供試した。

**クレメンティンゲノムデータベースからの T2RNase 遺伝子の検索** Phytozome 内のクレメンティンゲノムを検索クエリ「ribonuclease T2」として検索することにより、7 種類の T2 型 RNase 遺伝子を得た。

**組織別発現解析** 採取したクレメンティンの花柱、柱頭、花弁、花糸、子房、がく + 花柄、実

生の葉，茎，根から，NucleoSpin® RNA Plus (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany) を用いて total RNA を抽出した．抽出後は濃度を 50 ng/μL に調節した．1 μg の RNA をテンプレートとし，RevrTraAce® qPCR RT Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて，全体量 20μL の反応系で cDNA 合成反応を行った．反応後，180μL の TE バッファーを加えて，サンプルを希釈した．作成した cDNA をテンプレートとして，RT-PCR を行った．プライマーは，ゲノムデータベースより検索された 7 種の T2RNase 遺伝子，および過去にヒュウガナツ花柱 cDNA より単離された 5 種類の T2RNase 遺伝子に特異的なプライマーを使用した．テンプレートの DNA には希釈した cDNA 1μL を用い，EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (TaKaRa bio) を用いて PCR 反応を行った，反応は 95 30s, 55 30s, 72 1min を 30 サイクル行い，PCR 産物は 1% アガロースゲル電気泳動によって増幅の確認を行った．

clementine0.9 035888m の遺伝解析 クレメンティン，ヒュウガナツおよびクレメンティン×ヒュウガナツ実生 74 個体の葉を破砕チューブ内でビーズを用いて砕いた後，CTAB 法を用いて DNA を抽出した．抽出後は RNase を 10 μg/mL で添加した TE buffer 50μL を加え，一晚室温で置いた．抽出した DNA と clementine0.9 035888m 特異的プライマーを用いて，EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (TaKaRa bio) で PCR 増幅を行った．5 μL を混合し，95 30s, 55 30S, 72 30S で 34 サイクルのプログラムで PCR を行った．PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動によって増幅の確認を行った．

## (2) ヒュウガナツ花柱の RNA-Seq による T2 RNase 遺伝子の獲得と発現解析

植物材料 宮崎大学農学部果樹園芸学研究室研究圃場に植栽されている在来系ヒュウガナツ (在来系)，およびそれに高接ぎされているヒュウガナツの枝変わり自家和合系統 (和合系) を実験に供試した．2016 年と 2017 年の開花期に，それぞれから開花直前の花を採取した．花から花柱を切り分け，-80°C で使用時まで保存した．

RNAseq と T2 RNase の獲得および系統解析 採取した花柱より total RNA を抽出し，RNA-Seq 解析を行った．2016 年のサンプルについてはペアエンド 100bp, 1000 万リード, 2 反復, 2017 年のサンプルについては，ペアエンド 150bp, 2000 万リード, 3 反復のデータを獲得した．2017 年採取のサンプルより獲得したデータを使用して，Trinity による *de novo* assembly を行い，トランスクリプトームを構築した．次に blast2GO を用いて，blastp と InterProScan により獲得した配列のアノテーション付けを行った．アノテーション情報を参照して T2 RNase 遺伝子と予測されたものを抽出した．これらの中から *de novo* assembly 時に作られる冗長な配列や不完全な配列を除くために，CD-HIT によってアミノ酸配列レベルで 95% 一致でクラスター化し，さらに CDS の配列長が 600 塩基 (200 アミノ酸) に満たないものを除いた．系統解析のために，他植物で報告されている T2 RNase を，カンキツ属植物については公開ゲノム情報より，カンキツ属植物以外の植物については DDBJ/EMBL/NCBI データベースより取得した．これらをヒュウガナツの T2 RNase と合わせて，MAFFT によりアライメントを行い，RAxML によって最尤系統樹を作製した．

遺伝子発現解析 構築したトランスクリプトームを参照配列として，2016 年と 2017 年の在来系および和合系の RNAseq リードデータを，Bowtie2 を用いてマッピングした．その後，各トランスクリプトにマッピングされたリード数をカウントし，DESeq2 によって DEG を検出した．また，得られた T2 RNase 遺伝子について遺伝子特異的プライマーを作製し，2017 年度のサンプルについて qPCR による発現解析を行った．

(3) フォーチュン・クレメンティン・オーランドからの RNAseq による T2 型 RNase 遺伝子の獲得

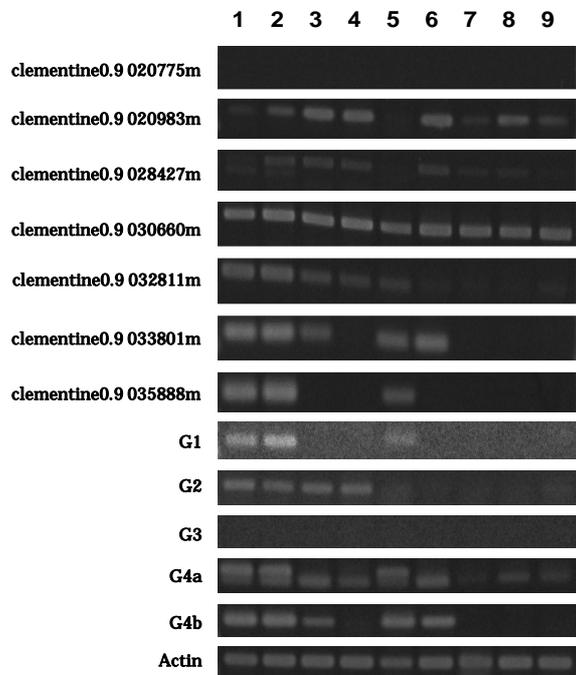
**植物材料** フロリダ大学カンキツ教育研究センターに植栽されている‘フォーチュン’,クレメンティン‘Nules’,および Florida Citrus Arboretum, Florida Department of Agriculture に植栽されている‘オーランド’より 2018 年 2 月の開花期に各品種の花柱を採取した。

**RNAseq と T2 RNase の獲得** サンプリングした花柱から total RNA を Pure Link RNA mini kit (Ambion)を用いて抽出し, RNAseq を行った。得られた RNA-seq データは, ヒュウガナツ花柱の RNA-seq データと同様に Trinity を用いて de novo assembly を行い, blast2GO によるアノテーション付けを行った。その後, T2 RNase 遺伝子と予測されたものを抽出した。その後, CD-HIT によるクラスター化および 200 アミノ酸以下の配列を除いた。それらを用いて, NJ 法による系統樹を構築した。

4. 研究成果

(1) クレメンティンゲノムデータベース検索による T2 型 RNase 遺伝子の獲得とその特徴づけ

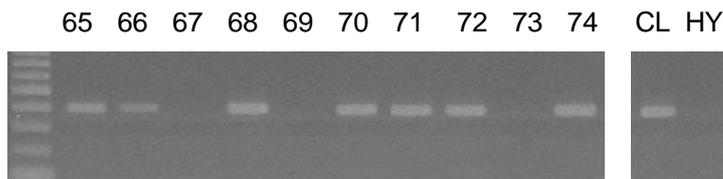
**組織別発現解析** 作成したクレメンティンの cDNA を使い PCR をした後, 電気泳動で発現の有無を確認した。(第 1 図) カンキツにおける T2 型 RNase 遺伝子の花柱特異的発現は Liang ら (2015) の実験においての *Citrus grandis* の自家不和合性品種‘Shatian’pummelo で報告されており, その遺伝子も S-RNase 遺伝子として有力である。RT-PCR の結果から clementine0.9\_035888m とヒュウガナツより単離した G1 の 2 つでのみ花柱, 柱頭, 子房での雌ずい特異的な発現が見られた。また他の遺伝子においても発現は確認することはできたが, 特異的発現ではなかった。



第 1 図 クレメンティンの組織別での各 RNase 様遺伝子の発現。1: 花柱, 2: 柱頭, 3: 花弁, 4: 花糸, 5: 子房, 6: がく + 花柄, 7: 葉 (実生), 8: 茎 (実生), 9: 根 (実生)

**clementine0.9\_035888m の遺伝解析**  
clementine0.9\_035888m について, クレメンティン × ヒュウガナツの後代実生

74 個体を用いて遺伝様式の調査をした。その結果, まずクレメンティンは clementine0.9\_035888m を保持していることが確認されたが, ヒュウガナツはこれを保持していなかった。交雑後代では 35 個体がこれを保持し, 残りの 39 個体は保持していなかった(第 2 図)。もし clementine0.9\_035888m が配偶体型自家不和合性に関与する S-RNase であるとするれば, クレメンティンにおいてヘテロ接合体として存在しているはずであり, 実生個体では保持している



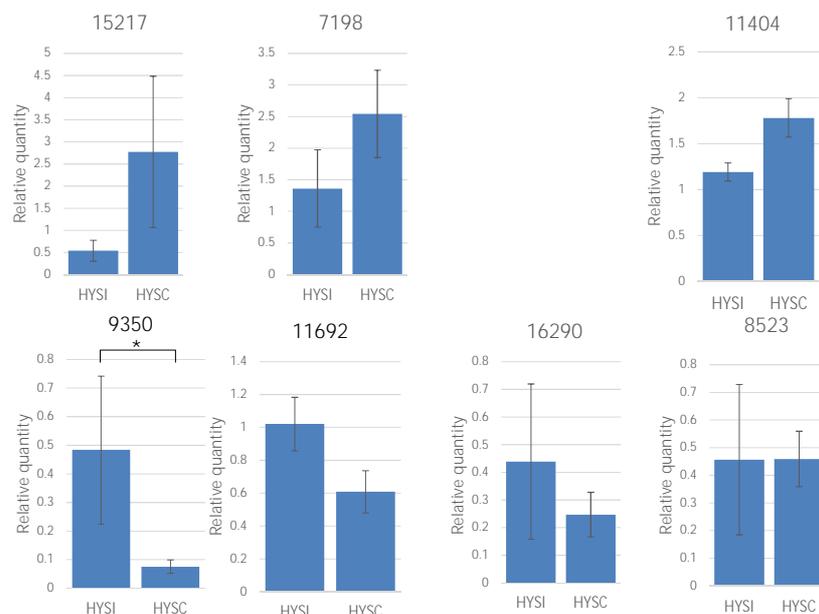
第 2 図 クレメンティン (CL), ヒュウガナツ (HY) およびクレメンティン × ヒュウガナツ後代実生 (No.65~74) における, T2 型 RNase 遺伝子 clementine0.9\_035888m の有無

個体：保持していない個体 = 1 : 1 の割合で出現するはずである。そこでカイ二乗検定を行ったところ、統計的に、clementine0.9\_035888m を保持している実生個体と保持していない実生個体の割合は 1 : 1 であることが確認された。よって clementine0.9\_035888m はクレメンティンにおいて、ヘテロ接合体の状態で存在していると考えられた。

## (2) ヒュウガナツ花柱の RNA-Seq による T2 RNase 遺伝子の獲得と発現解析

De novo assembly によって 203,776 個のトランスクリプトが構築された。Blastp と InterProScan により、166,866 個のトランスクリプトにアノテーションが付与され、そのうち 42 個が T2 RNase 遺伝子であると予測された。これらはクラスター化および配列長での cut-off により、最終的に 9 個に集約された。既知の T2 RNase を含めた系統解析の結果、4 個が S-RNase が形成するクラスターに配置された。

DEG 解析の結果、 $q < 0.05$  となったトランスクリプトは 133 個あり、その内訳は、和合系で発現上昇していたものが 36 個、発現低下していたものが 97 個であった。有意な発現低下が検出されたものの中に T2 RNase とアノテーション付けされたものが一つ (HYSISCst\_DN9350\_c0\_g2\_i1) 含まれていた。qPCR によって T2 RNase の発現を検証したところ、この HYSISCst\_DN9350\_c0\_g2\_i1 が唯一和合系で有意に発現低下していることが確認された (第 3 図)。ヒュウガナツを含むカンキツ属植物の自家不和合性が T2 RNase に支配されているということを、本結果のみから断定することはできないが、自家和合化したヒュウガナツにおいて、花柱で発現する T2 RNase 遺伝子の発現量が有意に低下していたことは、ヒュウガナツの自家不和合性にこの T2 RNase が関与している可能性を示すものであると考えられる。

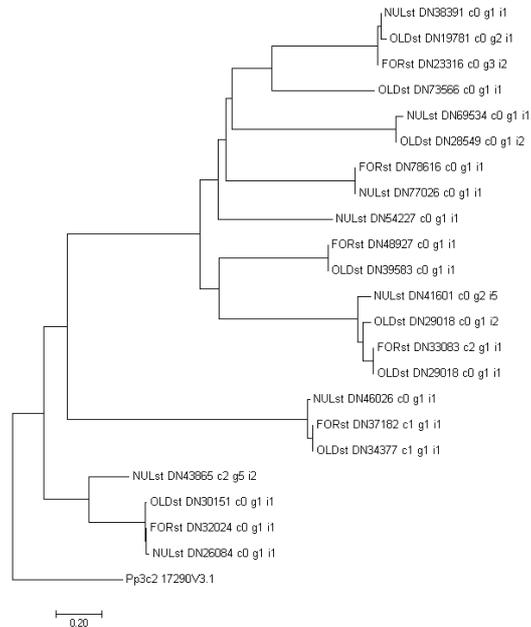


第 3 図 qPCR によるヒュウガナツ花柱での T2 型 RNase 遺伝子の発現解析。HYSI：在来系ヒュウガナツ，HYSIC：自家和合系ヒュウガナツ。\*は  $P < 0.05$  で有意差があることを示す。

## (3) フォーチュン・クレメンティン・オーランドからの RNAseq による T2 型 RNase 遺伝子の獲得

‘フォーチュン’・クレメンティン・‘オーランド’の花柱 total RNA を材料に行った、RNA-seq 解析によって、最終的に‘フォーチュン’から 6 種、クレメンティンから 11 種、‘オーランド’

から 8 種の T2RNase が得られた。これらの中には、クレメンティンのみに見られる配列が 2 種、  
 ‘オーランド’のみに見られる配列が 1 種、クレメンティンと‘オーランド’、クレメンティン  
 と‘フォーチュン’、‘オーランド’と‘フォーチュン’のみで共通して見られる配列が各 1 種  
 ずつ見られた (第 4 図)。また、先にクレ  
 メンティンゲノムより検索された T2 型  
 RNase で、最も S-RNase が持つ特徴に合致  
 した clementine0.9\_035888m は、ここで  
 得られた NULst\_DN54227\_c0\_g1\_i1 に相  
 当した。今回使用した‘フォーチュン’、  
 クレメンティン、‘オーランド’は全て自  
 家不和合性を示し、また、‘フォーチュン’  
 はクレメンティン×‘オーランド’の交配  
 によってできた品種である。そして S 遺伝  
 子は個体内では、ヘテロ接合で存在してい  
 るはずである。本結果で見られた 3 種で共  
 有されていない配列は、これらがヘテロ接  
 合性の対立遺伝子である可能性が考えら  
 れる。今後、これらの配列に着目し、自家  
 不和合性との関連について、さらに解析を  
 行う必要があると考えられる。



第 4 図 フォーチュン、クレメンティン、オーランドから得られた T2 型 RNase 遺伝子の系統解析。FOR：フォーチュン、NUL：クレメンティン、OLD：オーランドを表す。Pp3c.17290V3.1 はアウトグループ。

5. 主な発表論文等  
 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Chitose Honsho, Shingo Umegatani, Dai Furukawa, Shuji Ishimura, Takuya Tetsumura Isolation and characterization of *S-RNase*-homologous genes expressed in styles in ‘Hyuganatsu’ (*Citrus tamurana* hort. ex Tanaka) The Horticulture Journal (In press). <https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-032>

[学会発表](計 1 件)

本勝千歳・石村修司・牛島幸一郎・Qibin Yu・Fred Gmitter・鉄村琢哉。ヒュウガナツ花柱の RNA-Seq による T2 RNase 遺伝子の獲得と発現解析。園芸学会平成 31 年度春季大会。2019 年

6. 研究組織

研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

研究協力者氏名：Fred G. Gmitter, Jr.

ローマ字氏名：Fred G. Gmitter, Jr.

所属研究機関名：University of Florida

部局名：Citrus Research and Education Center (CREC)

職名：Professor

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。