

令和 4 年 9 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02192

研究課題名(和文)雌雄異株アスパラガスにおける間性株出現の分子機構とその育種的利用

研究課題名(英文)Molecular mechanism and application of the andromonoecy in garden asparagus

研究代表者

菅野 明 (Kanno, Akira)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：10260449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：アスパラガスの全雄品種育成には、間性株の自殖で得られる超雄株が必要である。間性株が生じる分子機構を明らかにするため、アスパラガスの雌ずい発達抑制に関わるSOFF遺伝子の構造と発現について野生株と間性株で比較解析したが、顕著な差は見られなかった。一方、アスパラガス間性株と近縁種ハマタマボウキの交雑を行い、種間雑種後代の中に間性を有する個体があったことから、これらの種では間性が遺伝することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスパラガスの間性は雄株における雌蕊の発達が抑制されない現象であることから、SOFF遺伝子そのものに変異があることが予想されたが、結果は否だった。SOFF遺伝子がアスパラガスの雌蕊の発達抑制にどのように関与しているかは明らかになっておらず、間性の分子機構を明らかにすることで、アスパラガスの性分化機構における新しい制御因子の存在が明らかになる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Andromonoecious is an important agricultural characteristic for asparagus breeding. For producing all-male hybrid seeds, we need super-male line which can be obtained by self-crossing of an andromonoecious line. To clarify the the molecular mechanism of the transformation from male to andromonoecious line, we analyzed the structure and expression of the SOFF gene, which is a male repressor gene. However, there are no remarkable difference between wild type male and andromonoecious line. We crossed *Asparagus officinalis* (andromonoecious line) and *A. kiusianus* and succeeded to get the andromonoecious interspecific hybrid, indicating that this character was inheritable in these species.

研究分野：分子育種学

キーワード：アスパラガス 間性 SOFF遺伝子

1. 研究開始当初の背景

アスパラガスは雌雄異株植物で、個体によって雌雄性が分かれている(雌 XX 型, 雄 XY 型)。アスパラガスの露地栽培では、落下した種子による雑草化がないことや食用とする若茎の形状が斉一で収量が高いことなどの理由から、もっぱら雄株が利用されてきた。かつては圃場での雄性株の選抜が行われていたが、現在は雄個体のみを生ずる種子集団(全雄品種)が生産されるようになり、生産の省力化、低コスト化がもたらされた。

全雄品種の生産には同型の雄性決定因子を持つ花粉親である超雄株(Y_Y)を利用する。すなわち、Y_Yのゲノム組成を持つ親個体を花粉親として用い、雌株(XX)と交雑することによって、全ての個体がXYの遺伝子型を持つ雄の次世代を得ることができる。超雄株は、間性株(XYの遺伝子型を持つ雄性両性同株性の個体で、雄花と両性花を着生する個体)の自殖によって得られる。すなわち、間性株の自殖によって生じた種子由来の実生株ではXX:XY:Y_Yが1:2:1に分離するので、この中からY_Y型の超雄株を選抜する。近年は雄株の倍加半数体を利用して超雄株を作出し、全雄品種を育成する方法がヨーロッパの種苗会社で用いられているが、薬培養による倍加半数体を得る技術はアスパラガスでは非常に難しく、世界的にも成功例が非常に少ないことから、成功した種苗会社もかなりの資金を投入して開発を行っていると予想される。倍加半数体作成技術の開発を続ける必要はあるが、現時点では間性株の自殖で超雄株を得るのが現実的な方法となっている。

前述のように全雄品種は間性株自殖後代から得られる超雄株が利用されるが、食用アスパラガスは基本的に雌雄異株であり、間性株を生じることは殆どない。実際には、品種‘Gijnlim’由来の系統など、ごく限られた品種でしか利用できなかったため、より品質(食感、形態およびアントシアニン低着色性)が優れ、収量性の高い全雄品種の生産が望まれてきた。またアスパラガス全雄品種には、多かれ少なかれ結実性個体が混在する。全雄品種に見られる結実性個体は間性株と考えられ、その形質は超雄株を選抜した際に用いた間性の親株の形質に起因すると推察される。結実は落下した種子による雑草化を引き起こすためアスパラガス栽培にとって有益ではなく、結実性個体を含まない全雄品種育成が望まれている。

アスパラガスの間性は、雄花における雌蕊形成の抑制が弱まるために雄株において雌蕊が発達し、両性花が形成される現象だと考えられる。しかし、雌雄異株のアスパラガスでなぜ間性が生じるのか、またなぜ‘Gijnlim’など限られた品種でのみ間性が生じるか、その分子機構は全くわかっていない。研究が進まない主な要因としては雌蕊形成の抑制に関わる遺伝子の実体が不明だったため分子生物学的な解析が難しかったことが挙げられる。

近年申請者らの研究グループにより、アスパラガスの性決定遺伝子座の解明が進み、雄の性染色体に座乗する雄蕊促進遺伝子(AoMSE1/AoMYB35)と雌蕊抑制遺伝子(AoSOFF)が雌雄性を決定する遺伝子であることが明らかになった(Murase et al. 2017, Harkess et al. 2017)。雌蕊形成の発達抑制に関わる遺伝子が明らかになったことで、この遺伝子を用いることにより、間性の分子生物学的解析が初めて可能となった。間性の分子機構を明らかにすることで、様々なアスパラガス品種で間性株を得ることや、結実性個体のない全雄品種を作出することが期待されていた。

2. 研究の目的

本研究においては、まず SOFF 遺伝子と間性の関係性を明らかにする。SOFF 遺伝子が雌蕊形成抑制に関わる性決定遺伝子であることは明らかになっているが (Harkess et al. 2017)、その発現パターンや機能については明らかになっていないことから、まず食用アスパラガスにおける SOFF 遺伝子の発現と機能を解析する。さらに食用アスパラガスの野生株と間性株における SOFF 遺伝子の発現と構造を比較解析し、間性と SOFF 遺伝子の関係を明らかにする。

間性株が生じる原因としては、SOFF 遺伝子の発現量の低下を予想している。原因が SOFF 遺伝子そのものにあった場合、全雄品種の一部にのみ結実性個体が認められる現象を説明できないことから、間性は SOFF 遺伝子の変異のみが原因で生じる現象ではなく、他の因子が関係していることが予想される。そこで本研究では、間性の原因遺伝子を特定するため、間性株と近縁種ハマタマボウキの種間雑種を作出し、その交雑後代を用いた QTL 解析により、間性の原因遺伝子の特定を試みる。ハマタマボウキは食用アスパラガスとの交雑が容易にできる上、茎枯病抵抗性を有することから、種間雑種を用いた茎枯病抵抗性系統作出の研究が進んでおり (農食事業)、その一環で栽培実験系や RNA-seq データの蓄積だけでなく、遺伝地図作成が進んでいる。これら研究リソースを利用することで、間性の QTL 解析を行う。

3. 研究の方法

(1) アスパラガスにおける雌蕊形成抑制遺伝子 (SOFF 遺伝子) の発現及び機能解析

食用アスパラガスのゲノム配列は決定されており (Nature Communications 8:1279, 2017)、ゲノム配列情報はデータベース上に公開されている。この配列情報から SOFF 遺伝子配列を抽出した。食用アスパラガス野生株 'メリーワシントン 500W' の擬葉からゲノム DNA を抽出し、PCR によって SOFF 遺伝子特異的な DNA 断片を増幅した。この PCR 産物を大腸菌ベクター pGEM-T Easy にクローニングし、塩基配列を決定した。

次に SOFF 遺伝子の発現を解析するため、食用アスパラガスの花芽から全 RNA を抽出し、Oligo dT プライマーを用いて cDNA プールを合成した。この cDNA を鋳型とし、SOFF 遺伝子特異的な配列から作成したプライマーを用いて RT-PCR を行った。

一方、アスパラガス SOFF 遺伝子の機能解析では、シロイヌナズナを用いた形質転換実験を行った。食用アスパラガスの雄株から単離した SOFF 遺伝子 cDNA 断片を発現ベクターの 35S プロモーターの下流に組み込み、アグロバクテリウムに導入したのちにフローラルディップ法によりシロイヌナズナに形質転換した。抗生物質による選抜ののち、得られた形質転換体については全 DNA を抽出し、SOFF 遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR により、導入された遺伝子の確認を行った。

(2) 間性株における SOFF 遺伝子の発現と構造解析

本研究室で維持している間性株は由来の異なる 4 種類 12 系統がある。これらの擬葉からゲノム DNA を抽出し、PCR によって SOFF 遺伝子特異的な DNA 断片を増幅した。この PCR 産物を大腸菌ベクター pGEM-T Easy にクローニングし、塩基配列を決定した。

間性株における SOFF 遺伝子の発現については、(1)と同様の方法により、全 RNA 抽出、cDNA プール作成、RT-PCR を行った。

(3) 近縁種ハマタマボウキとの種間雑種後代を用いた間性原因遺伝子の特定

食用アスパラガスと近縁種ハマタマボウキは開花時期が限られており、またどちらも雌雄異株のため雌雄の株の開花時期が同時期になるよう調節する必要がある。そこで両種を複数株ずつ用い、植え替え時期や栽培温度を調節することにより、開花時期を合わせ、手交配により交雑を行った。得られた種間雑種の種子は次年度の春に播種し、幼苗から抽出した DNA と雌雄判別マーカーを用いて雌雄判別を行い、間性株が期待される雄株のみ大きいポットに定植・栽培した。間性株の自殖後代については、雌株 (XX)、雄株 (XY)、超雄株 (YY) が区別可能な SSM01 マーカーを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) アスパラガスにおける雌蕊形成抑制遺伝子 (SOFF 遺伝子) の発現及び機能解析

公開されている食用アスパラガスのゲノム配列情報 (Nature Communications 8:1279, 2017) を用い、SOFF 遺伝子配列を抽出した。この遺伝子配列を用いてアスパラガスゲノム内の相同配列を解析したところ、よく似た配列が 2 箇所見つかった。そこで SOFF 遺伝子特異的な領域を特定し、その領域にプライマーを作成することで、PCR による SOFF 遺伝子の増幅を試みた。食用アスパラガス野生株 (品種 MW500W) 2 系統からゲノム DNA を抽出し、PCR によって SOFF 遺伝子の増幅を試みた。その結果、野生株 2 系統から SOFF 遺伝子を単離することに成功し、それらの一次構造を決定した。SOFF 遺伝子とそれに酷似している遺伝子配列について、雌雄性との連鎖を確認することにより、性決定遺伝子 SOFF の cDNA 配列を特定した。

次に SOFF 遺伝子の発現を解析するため、食用アスパラガスの花芽から RNA を抽出し、cDNA プールを作成した。この cDNA を鋳型とし、SOFF 遺伝子特異的な配列から作成したプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、発現は弱いものの雄花特異的に発現していることを確認した。SOFF 遺伝子の発現については本研究課題期間中に海外の研究グループにより、この遺伝子は発現が非常に弱いことが報告されており、この結果を支持する発現パターンだった (Plant Cell 32:1790-1796, 2020)。

一方、アスパラガス SOFF 遺伝子の機能解析では、シロイヌナズナを用いた形質転換実験を行った。食用アスパラガスの雄株から単離した SOFF 遺伝子を過剰発現するよう構築された発現ベクターをアグロバクテリウムに導入し、シロイヌナズナに形質転換した。抗生物質による選抜の結果、形質転換体を複数個体得ることに成功した。これらの個体については、PCR により目的の遺伝子が導入されていることを確認した。形質転換体を栽培し、花の形態や生育状況を野生型シロイヌナズナと比較したが、顕著な違いは見られなかった。

(2) 間性株における SOFF 遺伝子の発現と構造解析

本研究室で維持している間性株 4 種類 12 系統の擬葉からゲノム DNA を抽出し、SOFF 遺伝子特異的な配列から作成したプライマーを用いて PCR を行った結果、全ての系統で増幅産物が得られた。この PCR 産物を大腸菌ベクターにクローニングし、間性株 12 系統の SOFF 遺伝子の一次構造を決定した。これらのアミノ酸配列を比較した結果、野生株と間性株には大きな違いがなく、一次構造には遺伝子の機能に影響を及ぼす変異はみられなかった。

次に、当研究室で保有している由来の異なる間性株及び野生株の花芽から全 RNA を抽出し、RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行った結果、野生株と間性株の花芽において SOFF 遺伝子の発現レベルに差異は見られなかった。

(3) 近縁種ハマタマボウキとの種間雑種後代を用いた間性原因遺伝子の特定

近縁種ハマタマボウキ（雌株 XX）と間性株（XY）との交配を試み、約 120 個の種子を得た。一方、コントロールとして食用アスパラガス MW500W と間性株（XY）を交配し、交配後代の種子を約 400 個得た。これらを播種し、最終的に近縁種ハマタマボウキ（雌株 XX）と間性株（XY）の種間雑種後代が 42 個体、食用アスパラガス MW500W と間性株（XY）が 92 個体得られた。

間性株（XY）と近縁野生種ハマタマボウキの雌株（XX）の種間雑種のうち雄 5 個体、雌 8 個体の計 13 個体が開花した。雄株 5 個体はそれぞれ 10-26 花を自殖させ、1 株のみ間性を示し結実した（図 1）。この種間雑種自殖後代の種子は 4 個得られ、うち 3 個体が発芽した。食用アスパラガスでは 2 つの性染色体（X 及び Y）を区別でき、雄株と超雄株を選抜できる RM17 マーカーが報告されているが（Acta Horticulturae 1223:51-58, 2018）、ハマタマボウキでは Y 染色体しか特定できなかった。他の研究課題において、様々なアスパラガス近縁種における RM17 マーカー近傍の配列を解析することにより、食用アスパラガス、ハマタマボウキ、紫アスパラガスなどにおいても 2 つの性染色体（X 及び Y）を区別できるマーカー（SSM01）を開発していたため、このマーカーを用いて種間雑種自殖後代 3 個体について解析した結果、1 個体が超雄株（YY）、2 個体が雄株（XY）だった。一方、間性株（XY）と食用アスパラガス MW500W の交配後代では雄 6 個体、雌 1 個体、計 7 個体が開花した。雄株 6 個体は間性を示さず、自殖後代は得られなかった。

以上の結果より、本研究課題において種間雑種の超雄株（YY）が少なくとも 1 個体得られ、食用アスパラガスと近縁種ハマタマボウキの種間雑種でも間性が遺伝することが明らかとなった。



図 1. 食用アスパラガス間性株（XY）と近縁野生種ハマタマボウキ（雌株）の種間雑種間性株。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akahori Mako, Kanno Akira	4. 巻 218
2. 論文標題 Development of a new codominant CAPS marker for sex genotype identification in asparagus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Euphytica	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10681-022-03029-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------