

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15813

研究課題名(和文)核ゲノムと細胞質ゲノムの協働作用から解明するバレイシヨの四分子型雄性不稔性

研究課題名(英文) Potato tetrad male sterility elucidate from the interaction between nuclear and cytoplasmic genomes.

研究代表者

實友 玲奈 (Sanetomo, Rena)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：20716378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：バレイシヨの四分子型雄性不稔性(T-CMS)を引き起こす細胞質型を明らかにするために24アクセッションのSolanum stoloniferum(sto)と栽培種とを交配し39系統の種間雑種を育成した。それらの花粉稔性を調査した結果、T-CMSを引き起こす系統と引き起こさない系統を見出し、TCMS型の雑種およびそれらの親系統のみが有する859 bpのバンドを発見し、このバンドを持つ細胞質型をTCSstoと名付けた。また、T-CMSを示す種間雑種とその親のstoでのみ出現する組換え型コンティグ(RC-1)を発見し、この組み換え型ミトコンドリア分子がT-CMSを引き起こす可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T-CMSを示す品種の増加により、正常な花粉を産出する系統が減少し、バレイシヨ育種において花粉親に使用できる系統の枯渇が危惧されてきた。本研究では、品種の中で問題になっているT-CMSがどのstoから引き起こされるのかを明らかにし、それらに特異的に存在するミトコンドリア分子および特異的遺伝子配列を同定した。これによって、T-CMSを示さない遺伝資源を利用し、交雑後代においても正常な花粉を産出する育成系統の作出が可能となり、雄性不稔性によるバレイシヨ育種の問題を解決する手段となった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the cytoplasmic type that causes the tetrad male sterility (T-CMS) of potatoes, 24 accessions of Solanum stoloniferum (sto) and cultivars were crossed, and 39 interspecific hybrids were obtained. As a result of observation of their pollen fertility, we found that hybrids derived from specific accession of sto showed T-CMS, and which has the 859-bp band. We named the cytoplasmic type with this band "TCSsto" and reported that this region may be associated with T-CMS (Sanetomo and Nashiki 2021). Next, as a result of comparing the mitochondrial genome sequences of T-CMS type and normal type, we discovered a recombinant contig (RC-1) that appeared only in T-CMS type interspecific hybrids and their parents. Finally, we suggested that this recombinant mitochondrial molecule may cause T-CMS.

研究分野：遺伝育種学

キーワード：四分子型細胞質雄性不稔性 バレイシヨ ミトコンドリアゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物では正常に花粉形成ができない雄性不稔性が頻繁に起こる。そのうち、細胞質雄性不稔性は細胞質ゲノムと核ゲノムの協働作用が壊れることにより生ずると考えられている。

バレイショ品種の中には、四分子型細胞質雄性不稔性 (T-CMS) と呼ばれる花粉の発育が四分子期の状態で停止する完全雄性不稔性が発見されている。DNA 多型に基づきバレイショ栽培品種の細胞質ゲノムを識別すると、T-CMS を示す栽培品種は全て W/γ 型に分類され、母方の系譜を辿るといずれもジャガイモ Y ウイルス (PVY) 抵抗性を導入するために利用されてきたメキシコ産 4 倍体野生種 *S. stoloniferum* にいきつく。T-CMS を示す栽培品種は母親としてのみ交雑が可能であるが、その後代では全て完全雄性不稔性となる。その結果、雄性不稔性の品種の割合が増加し、バレイショ育種において花粉親として利用できる系統を制限してしまう問題を引き起こしている。しかし、T-CMS の原因遺伝子や稔性を回復させる遺伝子はいまだ見つかっておらず、この問題を解決するためにもその発見が望まれている。

2. 研究の目的

これまで、*S. stoloniferum* に由来するとされる T-CMS は栽培品種にのみ発見されていた。しかし、*S. stoloniferum* は形態学的にも遺伝学的にも多様な種であり、細胞質ゲノム型は W/γ 型以外にも存在する。従って、栽培種と交雑した際にどの *S. stoloniferum* が T-CMS を引き起こすかは不明であり、細胞質ゲノム型との関係も分かっていない。

そこで本研究では、T-CMS を引き起こす細胞質ゲノムを明らかにすると共に、ミトコンドリアゲノムの解読を行い、T-CMS に関与する遺伝子領域を同定する。また、稔性回復系統の作出を試み、雄性不稔性と協働的に作用している核側因子の存在を明らかにする。

3. 研究の方法

実験 1: T-CMS を引き起こす細胞質ゲノムの決定

アメリカ合衆国バレイショ遺伝子銀行より採取地の異なる 20 系統の *S. stoloniferum* を入手し、栽培種と交雑試験を行う。得られた種間 F₁ 雑種の花粉稔性を調べ、正常型と T-CMS 型を識別する。T-CMS を引き起こす *S. stoloniferum* に特有の細胞質ゲノム型を決定することで、T-CMS に関するミトコンドリア遺伝子領域を明らかにする。

実験 2: ミトコンドリア遺伝子の発現解析による T-CMS 原因遺伝子の同定

S. stoloniferum の中でも T-CMS を引き起こす系統と起こさない系統のミトコンドリア DNA を抽出し、Nanopore シーケンサーによりミトコンドリア DNA をロングリードで取得する。得られたリードを公開されているバレイショのミトコンドリア遺伝子配列と比較し、両者のミトコンドリア遺伝子配列中に違いのある部位を特定する。

実験 3: 戻し交雑による稔性回復遺伝子の探索

T-CMS を示す種間 F₁ 雑種に母親に用いた *S. stoloniferum* を再度交配し、得られた BC₁ 雑種の花粉稔性を調べ、花粉稔性が回復する個体が出現するのかを明らかにする。稔性回復個体が得られた場合、T-CMS を示す種間 F₁ 雑種に花粉稔性が回復した BC₁ 雑種を交雑し、後代雑種の花粉稔性を調査する。稔性回復型 (正常型) と T-CMS 型の出現頻度を算出して遺伝モデルを立て、核ゲノム上の稔性回復因子の遺伝分析を行う。

4. 研究成果

(1) 24 系統の *S. stoloniferum* に 4 倍体普通バレイショの花粉を授粉し、12 系統に由来する 39 の雑種を育成した。このうち、6 系統に由来する 19 の雑種個体では、T-CMS が観察され、細胞質ゲノム型は D/γ-ないし W/γ 型であり、倍数性は 3、4、ないし 6 倍体であった。したがって、W/γ 型細胞質ゲノムが必ずしも T-CMS を引き起こすものではないことが明らかとなった。また図 1 の様に、完全な T-CMS を示す花粉を産出する雑種だけでなく、1 粒染色された T-CMS 花粉や、1 粒の不稔粒と T-CMS が混在した花粉を産出する雑種が得られ、T-CMS でもさまざまな段階があることが明らかになった。

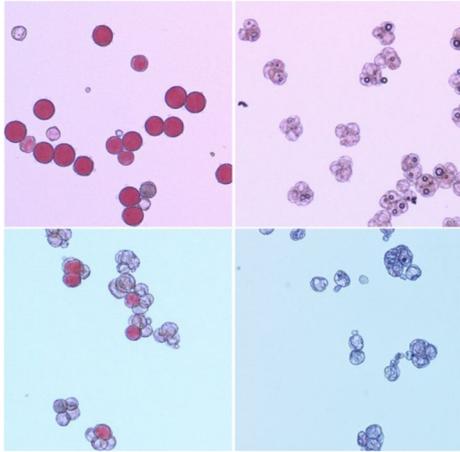


図 1 種間 F₁ 雑種の花粉稔性

左上：正常花粉 (*S. stoloniferum* PI 249929×10H17)

右上：T-CMS 花粉 (*S. stoloniferum* PI 558450×10H17).

左下：1 粒染色された T-CMS 花粉 (*S. stoloniferum* PI 498035×10H17).

右下：1 粒の不稔粒と T-CMS が混在した花粉 (*S. stoloniferum* PI 498038×10H17).

(2) 17 のミトコンドリア遺伝子とその遺伝子間領域の塩基配列を比較したところ、*rpl5* と *rps10* の間で多型が見られ、859 bp の PCR バンドを持つものが T-CMS を引き起こす細胞質ゲノムと一致していた。この結果より、T-CMS を引き起こす特異的な細胞質ゲノムを TSC_{sto} と名付け、859 bp のバンドにより TSC_{sto} の有無を診断できることを明らかにした。

(3) 次世代シーケンサーを用いて *S. stoloniferum* 由来の 4 系統の種間 F₁ 雑種、および T-CMS を有する品種 Alwara のミトコンドリアゲノム配列を解読し、それらの遺伝子配列の比較を行った。その結果、リファレンスのミトコンドリアゲノム (cv. Désirée) とは異なる 2 つの組換え型コンティグ (RC-I および RC-II) が同定された。そのうち、RC-I は *rpl5-ψrps14* 遺伝子が *nad6* 遺伝子に結合し、新しい遺伝子間領域を生成していた。この RC-I の特異的な遺伝子間領域を増幅する PCR マーカーを使用して RC-I の有無を 40 系統の *S. stoloniferum* と 39 系統の F₁ 雑種を用いて調べた結果、この遺伝子間領域は、T-CMS を示す種間雑種とその親の *S. stoloniferum* 系統でのみ出現することを発見した。また、前回報告した T-CMS を引き起こす細胞質ゲノム TSC_{sto} を識別する 859 bp のバンドの有無と完全に一致した (図 2)。従って RC-I は明らかに T-CMS と関連しており、RC-I 特異的な遺伝子間領域には、T-CMS の原因因子となる新規遺伝子が含まれている可能性が考えられた。

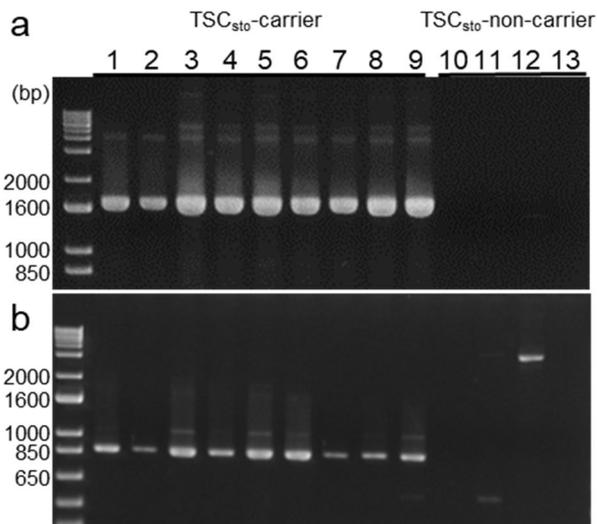


図 2 RC-I の特異的遺伝子間領域を増幅するマーカー (a) と TSC_{sto} の有無を識別する 859 bp のバンドを増幅するマーカー (b) で増幅した時の電気泳動結果
1~9 レーンは T-CMS を示す系統、10~13 レーンは正常型花粉を産出する系統

(4) *S. stoloniferum* と栽培種の種間 F₁ 雑種 (6 倍体) およびそれらの F₁ 雑種に再度栽培種を戻し交雑した BC₁ 雑種 (5 倍体) を母親に用いて、4 倍体あるいは 8 倍体の *S. stoloniferum* を花粉親として交配し得られた雑種の倍数性と花粉稔性を調査した結果、99 系統中 21 系統は T-CMS を示したが、残りの 78 系統は、花粉染色率が 5% 以上の完全な正常花粉を産出した。このことから、本研究において T-CMS を引き起こす細胞質を持ちながらも、花粉稔性がある系統の作出に成功した。また、同じ細胞質を持つ雑種内で花粉染色率が低い系統から高い系統まで存在したことから、T-CMS を引き起こす要因は *S. stoloniferum* および栽培種の核遺伝子が関与していると考えられた。

<引用文献> Sanetomo, R. and A. Nashiki (2021) Identification of the tetrad-sterility-causing *Solanum stoloniferum* cytoplasm in interspecific hybrids with *S. tuberosum*. Genet. Resour. Crop Evol. 68:3383-3397

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 Sanetomo Rena, Nashiki Akito | 4. 巻 68 |
| 2. 論文標題 Identification of the tetrad-sterility-causing <i>Solanum stoloniferum</i> cytoplasm in interspecific hybrids with <i>S. tuberosum</i> | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Genetic Resources and Crop Evolution | 6. 最初と最後の頁 3383-3397 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10722-021-01197-2 | 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 實友玲奈 |
| 2. 発表標題 パレイシヨ野生種 <i>Solanum stoloniferum</i> に由来する四分子型雄性不稔性に関連する変異型ミトコンドリアDNA分子の発見 |
| 3. 学会等名 日本育種学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|