

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 5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22658008

研究課題名（和文） 比較ゲノム解析によるカキの雌雄性制御遺伝子同定へのアプローチ

研究課題名（英文） COMPARATIVE GENOMICS APPROACH TO IDENTIFYING THE SEX DETERMINATION GENE OF PERSIMMON

研究代表者

田尾 龍太郎 (TAO RYUTARO)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：10211997

研究成果の概要（和文）：我が国で栽培されているカキ（*Diospyros kaki*）は雌雄混株であり、カキの栽培や育種の現場では、雌雄性の制御が求められている。しかしながら、カキの雌雄性の遺伝的・生理的制御機構は研究開始当初全く明らかにされておらず、その人為制御法も確立されていなかった。本研究では、カキの近縁野生種であり二倍体のマメガキ（*D. lotus*）をモデルとして用いて、カキの雌雄性の遺伝制御機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Persimmon (*Diospyros kaki* L.) shows a polygamous sex expression pattern. There are three different types of individuals bearing 1) only female flowers, 2) male and female flowers, and 3) male, female, and hermaphrodite flowers. This study is conducted to elucidate the genetic control of sex determination in hexaploid persimmon using a diploid wild relative species of persimmon, *D. lotus*, as a model.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 0 | 1,400,000 |
| 2011年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 総計 | 3,100,000 | 510,000 | 3,610,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学，園芸学・造園学

キーワード：花成，ゲノムライブラリー，走査型電子顕微鏡，分子マーカー，ポジショナルクローニング，マメガキ，AFLP，BAC

1. 研究開始当初の背景

我が国で栽培されているカキ（*Diospyros kaki*）は雌雄混株であり、カキの栽培や育種の現場では、雌雄性の制御が求められている。しかしながら、カキの雌雄性の遺伝的・生理

的制御機構は研究開始当初全く明らかにされておらず、その人為制御法も確立していなかった。

2. 研究の目的

我が国のカキ品種には、雌花と雄花を着生するもの、雌花と雄花に加え完全花を着生するもの、そして雌花のみを着生するものが存在する。雄花のみを着生するカキの品種・系統については我が国ではこれまで報告がないが、近年、中国の研究者が、中国には雄花のみを着生する系統が存在すると国際シンポジウムで報告している。しかしながら、我が国に半野生状態で自生するカキや、そして育種の過程で得られる中間母本や交雑後代にもこれまで雄花のみを着生する系統の報告がないことから、カキには雄花のみを着生させるような遺伝子型が生じにくいと考えられる。

カキの近縁野生種として二倍体のマメガキ (*D. lotus*) が存在する。マメガキの雌雄性の表現型はカキと異なり、マメガキには雌株と雄株が明確に分離して存在する。倍数化に伴い、雌雄の分化が不明瞭になることが知られているが、カキとマメガキに見られる雌雄性表現の差異も、両種の倍数性の違いに基づくものなのかも知れない。

カキの雌雄性に関連して、育種や栽培現場で問題が生じている。すなわち、‘富有’や‘次郎’をはじめ多くの優良栽培品種は雌花のみしか着生しないため、育種現場で交雑の組み合わせに制限が生じ、また栽培現場では‘太秋’など雄花着生品種で、雄花の着生過多による生産性の低下が大きな問題となっている。

このようなことから、カキの雌雄分化を制御する手法の開発が以前より望まれ、これまでもカキの雌雄性に関する研究が行われてきた。しかしながら、これまでの研究は主として雌花と雄花の分化様相の形態的調査に終始しており、その遺伝的、生理的制御機構の解明に迫る研究は皆無に等しい。カキの雌雄性の人為制御法の開発には、雌雄性の遺伝

的・生理的制御機構の解明が必要不可欠である。

本研究は、近年急速な進歩を遂げた分子生物学的な手法を用いたゲノム解析により、カキの雌雄性の分子マーカーを開発するとともに、雌雄性を制御する遺伝機構を明らかにしようとするものである。材料には、まずカキの近縁二倍体種であるマメガキを利用した。マメガキを利用することで、雌雄性形質の分離が明確になるばかりでなく、遺伝子連鎖地図に基づいた遺伝子のクローニングが可能になるからである。

3. 研究の方法

(1) カキとマメガキの花芽形成過程の比較観察

京都大学附属京都農場植栽のマメガキ‘君遷子’雄株と雌株の新梢腋芽を6月上旬より約10日毎に経時的に採取しFAAで固定した。固定した芽は臨界点乾燥を施し、イオンスパッターによる金蒸着の後に、走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察に供した。また比較のため、雌花のみを着生するカキ‘平核無’と雌花に加え雄花も着生する‘禅寺丸’の新梢腋芽も同様にSEM観察に供した。

(2) マメガキ交雑後代の雌雄分離の調査

2003年に京都大学附属京都農場栽植のマメガキ‘君遷子’の雌株と雄株を交雑して得られた実生64個体について開花期に花性を調査した。

(3) 雌雄性決定遺伝子マーカーの探索

上記の実験で雌雄性を決定した交雑分離後代50個体からCTAB法により全DNAを抽出した。雌雄各5個体のDNAよりバルクをそれぞれ2組作製し、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 分析を行い、雌雄のい

ずれかのバルクに特異的な AFLP バンドを探索した。雌雄性決定遺伝子座と連鎖していると考えられる AFLP バンドのいくつかについては、バンドを切り出し、Sequence Characterized Amplified Regions(SCAR)マーカー化を試みた。

4. 研究成果

(1) カキとマメガキの花芽形成過程の比較観察

雌花に加え雄花を着生する‘禪寺丸’および雌花のみしか着生しない‘平核無’のいずれのカキ品種においても6月下旬頃より花芽形成が始まった。雄花をつける‘禪寺丸’では、7月下旬頃より雄花の特徴である側生花芽をもつ花芽も観察されはじめた。その後、がく片原基が形成されはじめ、10月頃にはがく片原基が完成した。その状態で自発休眠に入り、越冬した。花卉および雄ずいと雌ずいの形成は自発休眠が完了した翌年の1月以降にはじまり、春には開花した。マメガキの雌株・雄株の花芽形成過程は、カキと非常によく似通っていた。ただマメガキの花成の開始と進行は、カキと比較して、若干早く6月上旬には花成が開始しており、雄花における側生花芽の形成も6月中に進行した。しかしながら、がく片原基が形成された状態で越冬し、自発休眠芽打破された後に花卉および雄ずいと雌ずいが形成される点については、カキと全く同じであり、マメガキの花成をモデルに、カキの花成の研究を行えることが確認された。

(2) マメガキ交雑後代の雌雄分離の調査

第1表に、今回、雌雄性的分離を調査したマメガキ交雑分離集団の雌雄的分離を示した。2008年と2009年のデータは、これまでの調査結果であるが、参考データとして示し

た。今回の分離集団では、雄株における幼木相が雌株より短く雄株が早期に開花しやすい傾向がみられた。このため調査の初期段階では雄株の比率が高かったが、2011年までの結果をとりまとめると雄株と雌株が1:1に分離することが明らかになった。このことから、マメガキの雌雄を支配する遺伝子はXY型のような一对の対立遺伝子あるいは密接に連鎖した遺伝子群によって決定されている可能性があると考えられる。しかし未だ開花のみられない個体が14個体存在し、雄株が早期に開花樹齢に達することを考慮すると雌雄的分離が1:1から逸脱する可能性もあり、今後、さらなる調査が必要であると考えられる。

第1表 マメガキ交雑分離集団の雌株と雄株の分離(播種は2004年)

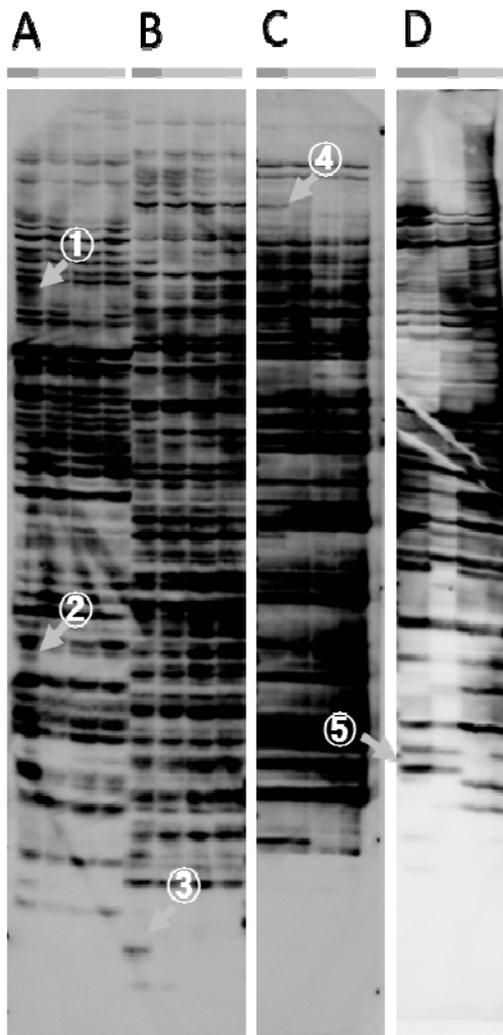
| 年度 | 個体数 (当該年度までの累計) | | |
|-------|-----------------|----|---------|
| | 雄株 | 雌株 | 花芽未着生個体 |
| 2008年 | 15 | 5 | 34 |
| 2009年 | 23 | 20 | 21 |
| 2010年 | 25 | 25 | 14 |
| 2011年 | 25 | 25 | 14 |

注) 2008年と2009年のデータは参考データとして掲載した

(3) 雌雄性決定遺伝子マーカーの探索

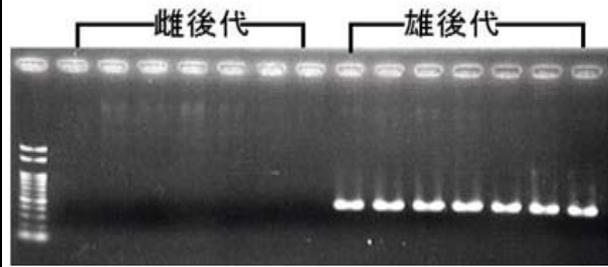
雄株より作製した雄バルクにのみ特異的に検出される AFLP バンドがいくつか見いだされた(第1図)。

すなわち今回行った交雑においてマメガキの雌雄性を決定する因子は一遺伝子支配であり雄性が雌性に対して優性であり、雄性がヘテロ接合となっていることが示唆された。



第1図 雄バルクに特異的な AFLP バンドの検出
 図中の矢印と番号は雄バルクに特異的に検出された AFLP バンド (それぞれ D1SxAF-1~5) を示す.

検出された雄バルク特異的 AFLP バンドのうち、高再現性のバンドから SCAR-マーカーを作出し (D1SxAF-4; 第2図), 雌雄が判明している 50 個体について調査したところ, D1SxAF-4 は存在を仮定した単一の性決定遺伝子座から約 4cM 程度の位置に座乗すると考えられた. 今後は更にマーカーの高密度化をはかり, 性決定遺伝子の特定を目指していく予定である.



第2図 SCAR-マーカーD1SxAF-4 によるマメガキ交雑分離後代の PCR 分析

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 赤木剛士, 梶田啓, 辻本誠幸, 木部隆則, 田尾龍太郎. 2011. マメガキの雌雄制御機構に関する研究 —カキの雌雄性制御機構の解明に向けて—. 平成 23 年度園芸学会秋季大会 (岡山大学津島キャンパス・平成 23 年 9 月 24-26 日).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田尾 龍太郎 (TAO RYUTARO)
 京都大学・農学研究科・准教授
 研究者番号: 102111997

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし