

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580011

研究課題名(和文)アポスポリー植物におけるASGR染色体の分子細胞学的解析

研究課題名(英文)Molecular cytological study for ASGR-carrier chromosome in aposporous plant

研究代表者

秋山 征夫(AKIYAMA, Yukio)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター畜産飼料作研究領域・主任研究員

研究者番号：70403160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：近年、アポミクシス(無性生殖)を制御する染色体特異的領域(ASGR)が発見された。本研究はギニアグラスで得られたアポミクシス候補遺伝子がASGRに座乗するか、アポミクシス植物間のASGRに相似性があるかについて解析した。その結果、候補遺伝子はASGRに座乗しておらず責任遺伝子ではないことが示唆され、ギニアグラスとチカラシバ属植物のASGRは相似性を示し、“ASGRの獲得によってアポミクシスが伝搬する”という仮説が支持された。

研究成果の概要(英文)：Apomixis is a phenomenon that produces clonal progeny through seed reproduction. Apospory is a mode of apomixis that is considered to be controlled by the Apospory-Specific Genomic Region (ASGR)-carrier chromosome. The ASGR-carrier chromosome was discovered in aposporous Pennisetum and Cenchrus species, but a portion of it (the ASGR) is absent from related sexual species. The ASGR-carrier chromosome was also discovered in Guinea grass (Panicum maximum).

In this study, I aimed to analyze the genomic position of three expressed sequence tags (ESTs) reported as candidate genes for apospory and to compare the ASGR between P. maximum and Pennisetum species. The results indicated that the ESTs were not mapped in the ASGR, therefore, the ESTs were probably not responsible genes for apospory, and that the ASGR was conserved between P. maximum and Pennisetum species, supporting the hypothesis "Apospory was spread by transmission of the ASGR."

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：アポミクシス アポスポリー 染色体 FISH 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション ギニアグラス

1. 研究開始当初の背景

アポミクシスとは無性生殖でクローン種子が生じる現象で、これに関与する遺伝子を人為的に制御できればヘテロシスの固定、育種年限の短縮などが可能である。ヘテロシスの固定は、食糧問題の解決、エネルギー作物の増産に有効である。また、育種年限の短縮は、近年危惧されている急激な気候変動への対応にも貢献できる。そのため、アポミクシスを活用した育種法の開発に対する期待は高まっている。しかし、以下に述べるようにアポミクシスのメカニズムの解明は、その遺伝子解析が困難であるために進んでおらず、主要作物での育種的な利用には至っていない。

アポミクシスの一様式であるアポスポリー（無孢子生殖）を持つイネ科植物の *Pennisetum squamulatum* において、連鎖解析によっても分離が起こらないアポスポリー遺伝子座領域は Apospory-Specific Genomic Region (ASGR) と名付けられた。応募者は、ASGR を持つ染色体はゲノム中で一本のみ存在し、対合可能な同祖染色体が存在するものの、ASGR は約 50 Mbp の巨大な Hemizygous 領域として存在するために、連鎖解析による遺伝子座の絞り込みが困難であることを明らかにした。これは、性染色体の性因子決定遺伝子と同様に、アポスポリー責任遺伝子の探索・単離は困難であることを示唆している。さらに、同種内に有性生殖とアポスポリーの系統を有するイネ科植物 *Cenchrus ciliaris* において、ASGR 染色体はアポスポリー系統のみで存在しており、そのサイズは同祖染色体よりも大きいため、ASGR の追加によるアポスポリー獲得の可能性があることを示した。*P. squamulatum* と *C. ciliaris* 間の ASGR 染色体比較解析において、両者の染色体の形態は異なるが、ASGR における 11 個の BAC クローンは同じ配列を示しており、高度なシンテニーが保持されていた。さらに、その他の

Pennisetum 属のアポスポリー植物にも、ASGR 染色体が保持されていることを明らかにした。このように *Pennisetum* 属と *Cenchrus* 属の ASGR は相似した染色体断片と考えられるが、他植物属との関係は明らかになっていない。上述の応募者が米国において行った ASGR 染色体研究を基盤とし、帰国後も我が国のアポスポリー研究のモデル植物・ギニアグラスを対象に研究を継続した。その結果、*Pennisetum* 属との相似性については不明であるが、ギニアグラスにおいても ASGR 染色体が存在することを明らかにした。

これまでの遺伝子解析からアポスポリーには複数の遺伝子の関与が予想されている。それらの遺伝子のセットが ASGR に含まれており、ASGR の獲得によって生殖様式が変化するという仮説が考えられ、性染色体研究同様にアポスポリー研究推進においては、ASGR 染色体の解析が重要な役割を果たすことが期待されている。一方、発現解析によるアポスポリー遺伝子単離も試みられており、これまでに複数の候補遺伝子の報告が行われている。ギニアグラスでもアポスポリー系統のみに高発現するアポスポリー特異的 EST が 3 種類得られており、ゲノム上の位置情報、すなわち ASGR 染色体との関係について解析が待たれている。

2. 研究の目的

本研究において明らかにしたいことは以下の 2 点である。

(1) アポスポリー特異的 EST は、ASGR に座乗するか？座乗していた場合、アポスポリー特異的 EST はアポスポリー責任遺伝子である可能性が考えられる。そうでなければ、下流遺伝子の可能性が高い。

(2) ギニアグラスと *Pennisetum* 属の ASGR に相似性があるか？相似性があった場合、“ASGR の獲得によってアポスポリーが伝搬する”という仮説を支持する結果となる。

3. 研究の方法

(1) ギニアグラスのバクテリア人工染色体 (BAC) ライブラリーから、アポスポリー特異的 EST を含む BAC クローンのスクリーニングし、単離された BAC クローンをプローブに用いて蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を行ない、ゲノムの位置解析を行った。

(2) *Pennisetum* 属アポスポリー植物を対象として、ギニアグラス由来の ASGR 特異的 BAC をプローブに利用し、FISH 解析を行った。また、ギニアグラスを対象に *Pennisetum* 属由来の ASGR 特異的 BAC を利用し、FISH 解析を行った。

4. 研究成果

(1) Yamada-Akiyama, H. et al. (2009) によって得られた 3 つのアポスポリー特異的 EST (P0165, P0195 または P2574) をプライマーに用いて、46,080 個の平均サイズ 120 kbp のギニアグラス・BAC クローンライブラリーについて PCR スクリーニングを行った結果、アポスポリー特異的 EST P0165 を含む BAC が 4 クローン、P0195 が 2 クローン、P2574 が 5 クローン得られた。得られたアポスポリー特異的 EST の P0165、P0195 または P2574 を含む BAC クローンからプローブを作製し、ギニアグラス・アポミクス品種・ナツカゼについて FISH 解析を行った。P0165 を含む BAC は、ギニアグラス・ナツカゼの全ゲノム領域にハイブリダイゼーションし、特異的なシグナルは検出されなかった。ASGR 特異的 EST P0195 および EST P2574 を含む BAC については、ASGR 染色体以外の 2 本の小型染色体末端にシグナルが観察された、いずれも ASGR 染色体には座乗していなかった。そのため、ASGR 特異的 EST P0195 および EST P2574 はアポスポリーを引き起こす遺伝子ではないことが示された。

(2) FISH 解析によって、ギニアグラス由来の ASGR 特異的 BAC は *Pennisetum* 属のアポスポリー植物の ASGR に座乗し (図 1)、また、*Pennisetum* 属由来の ASGR 特異的 BAC はギニアグラスの ASGR に座乗していることが明らかとなった (図 2)。さらに、*Pennisetum* 属の ASGR 特異的マーカーである ASGR-BBML がギニアグラスのアポスポリー系統で検出された。これらの結果は、ギニアグラスとチカラシバ属植物の ASGR の相似性を示し、“ASGR の獲得によってアポスポリーが伝播する” という仮説を支持する。よって、主要作物におけるアポミクシスの育種活用を実現するために、ASGR の解明と利用が重要であることが示唆された。

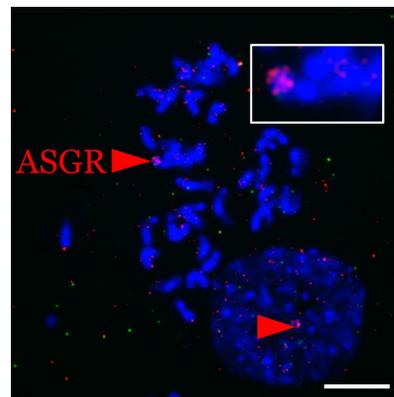


図 1 *Pennisetum* 属アポスポリー植物の ASGR にマッピングされたギニアグラス由来の ASGR 特異的 BAC。枠内：ASGR 染色体の拡大図 パー：10 μm

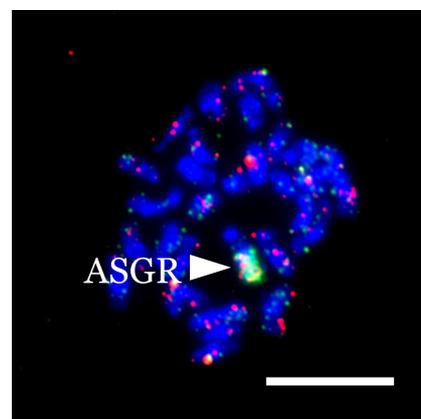


図 2 ギニアグラスの ASGR にマッピングされた *Pennisetum* 属由来の ASGR 特異的 BAC。パー：10 μm

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 5件)

木村健智、上山泰史、久保田明人、藤森雅博、高原美規、秋山征夫、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法による東北地方で収集されたリードカナリーグラスと外来リードカナリーグラスにおけるrDNAの物理的マッピング。日本草地学会誌、査読有、Vol. 60、2014、55-58。
久保田明人、上山泰史、秋山征夫、藤森雅博、四倍体イタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* Lam.) における高乾物率選抜の効果、東北農業研究センター研究報告、査読有、Vol. 115、2013、71-76。

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/tohoku115-6.pdf

藤森雅博、秋山征夫、久保田明人、秋田県および青森県西部におけるススキ属植物自生株の探索と収集、植物遺伝資源探索導入調査報告書、査読有、Vol. 29、2013、99-105。

[http://www.gene.affrc.go.jp/pdf/publications/plant-exp_2012\(29\)_p99.pdf](http://www.gene.affrc.go.jp/pdf/publications/plant-exp_2012(29)_p99.pdf)

Akiyama Y、Kimura K、Kubota A、Yamada-Akiyama H、Takahara Y、Ueyama Y、Genomic characteristics of a diploid F4 festulolium hybrid (*Lolium multiflorum* x *Festuca arundinacea*)、Genome、査読有、Vol. 55、2012、599-603。

doi: 10.1139/g2012-048

秋山征夫、山田-秋山仁美、木村健智、久保田明人、上山泰史、Fluorescence *in situ* hybridizationによるメドウフェスクおよびトールフェスクにおける余剰染色体の解析、日本草地学会誌、査読有、Vol. 58、2012、102-106。

〔学会発表〕(計 13件)

Akiyama Y、Akiyama-Yamada H、Conner JA、Hanna WW、Ozias-Akins P、Ebina M (2014/1/11-15) Comparison of Apospory-Specific Genomic Region (ASGR)-carrier chromosome between guineagrass (*Panicum maximum*) and *Pennisetum* species. Plant and Animal Genome XXII. San Diego, CA, USA.

秋山征夫、山田-秋山仁美、Conner JA、Hanna WW、Ozias-Akins P、蝦名真澄 (2014/3/30-4/2) ギニアグラスとチカラシバ属アボミクシス植物における apospory-specific genomic region (ASGR)の相似性。日本草地学会。宮崎県宮崎市・宮崎観光ホテル。

久保田明人、藤森雅博、田村健一、秋山征夫 (2014/3/30-4/2) DNAマーカーを利用したエンドファイト感染フェストロリウム系統の育成。日本草地学会。宮崎県宮崎市・宮崎観光ホテル。

藤森雅博、秋山征夫、久保田明人 (2014/3/30-4/2) 新規ペレニアルライグラス系統の盛岡での生産力検定。日本草地学会。宮崎県宮崎市・宮崎観光ホテル。
秋山征夫、木村健智、久保田明人、藤森雅博、高原美規、上山泰史 (2013/3/24-26) リードカナリーグラスにおける5Sおよび45S rDNAのマッピング。日本草地学会。山形県山形市 山形大学・小白川キャンパス。

久保田明人、秋山征夫、藤森雅博、清多佳子 (2013/3/24-26) フェストロリウムの単交配後代におけるフェスクゲノム割合 (f値) の変異幅。日本草地学会。山形県山形市・山形大学・小白川キャンパス。

藤森雅博、秋山征夫、久保田明人 (2013/3/24-26) ペレニアルライグラスを戻し交雑した新規フェストロリウム系統の耐暑性。日本草地学会。山形県山形

市・山形大学・小白川キャンパス。

秋山征夫, Goel S, Conner JA, Hanna WW,
山田-秋山仁美, Ozias-Akins P

(2012/8/27-29) *Pennisetum*, *Cenchrus*属
植物におけるアポスポリー特異的染色体
とその系統解析。日本草地学会。北海道
江別市・酪農学園大学。

上山泰史, 米丸淳一, 久保田明人, 秋山
征夫 (2012/8/27-29) 四倍体フェストロ
リウム品種における形態及び関連形質の
変異。日本草地学会。北海道江別市・酪
農学園大学。

久保田明人, 秋山征夫, 藤森雅博, 田村
健一 (2012/8/27-29) 早生ライグラス系
統の耐雪性。日本草地学会。北海道江
別市・酪農学園大学。

藤森雅博, 秋山征夫, 久保田明人, 上床
修弘, 我有満, 山下浩 (2012/8/27-29)
花粉・種子稔性のある三倍体ミスカンサ
ス。日本草地学会。北海道江別市・酪農
学園大学。

木村健智, 秋山征夫, 久保田明人, 藤森
雅博, 高原美規, 上山泰史

(2012/8/27-29) フローサイトメトリー
による東北地方自生クサヨシ(*Phalaris
arundinacea*) のゲノムサイズ推定。日
本草地学会。北海道江別市・酪農学園大
学。

秋山征夫, Goel S, Conner JA, Hanna WW,
山田-秋山仁美, Ozias-Akins P

(2012/3/29-30) *Pennisetum*における
apospory-specific genomic region
(ASGR)染色体の進化。育種学会。栃木県
宇都宮市・宇都宮大学。

〔図書〕(計 1件)

Ebina M, Tsuruta S, Akiyama Y (Eds Cai
H, Yamada T, Kole C) (2013) Warm Season
Grasses. In: Genetics, Genomics and
Breeding of Forage Crops., CRC Press,
322 (pp.144-167).

〔その他〕
ホームページ等

秋山征夫、新規二倍体フェストロリウム
における顕著な染色体構造変異。平成24
年度 東北農業・畜産、畜産草地研究成
果情報:

[http://www.naro.affrc.go.jp/project/
results/laboratory/tarc/2012/120b0_0
5_07.ht](http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/tarc/2012/120b0_05_07.ht)

秋山征夫、チカラシバ近縁植物における
アボミクスス特異的染色体とその系統関
係。平成23年度 東北農業・畜産、畜産
草地研究成果情報:

[http://www.naro.affrc.go.jp/org/tarc
/seika/jyohou/H23/souchi/H23souchi0
5.html](http://www.naro.affrc.go.jp/org/tarc/seika/jyohou/H23/souchi/H23souchi05.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山 征夫 (AKIYAMA, Yukio)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構東北農業研究センター畜産飼料作
研究領域・主任研究員
研究者番号: 70403160

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

オジマス・エイキンス ペギー
(OZIAS-AKINS, Peggy)
ジョージア大学・園芸学部・教授
研究者番号: なし

蝦名 真澄 (EBINA, Masumi)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構畜産草地研究所・飼料作物研究領域・
上席研究員
研究者番号: 80355122