

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580061

研究課題名(和文)カンキツ変異系統を利用した自然突然変異発生の分子機構解析

研究課題名(英文)Molecular biological analysis of natural mutation occurrence on citrus mutant lines

## 研究代表者

清水 徳朗 (SHIMIZU, Tokurou)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門カンキツ研究領域・上級研究員

研究者番号：90355404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：枝変わりを利用したカンキツの改変技術は農業上重要な手法であるがその変異発生機構は不明である。そこで突然変異発生機構の解明を目的に温州ミカン5系統の全塩基配列情報を解読し、系統間で変異を示すと思われる候補を数万件見いだした。変異発生の主因は複製時エラーと考えられ、検出された変異候補の大部分は非遺伝子領域に見いだされた。このうち遺伝子領域の複数の変異に注目したところ、それらは新たな変異系統や珠心胚実生でも見いだされて保持されていた。以上から、突然変異は組織内で高頻度で発生しており、消失する変異細胞もある一方で一部は組織全体を置換するにいたり、その後は安定して維持されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mutant selection is an important breeding technology, but the detail of mutation has not been understood. We evaluated whole genome sequences of five satsuma mandarin lines in order to identify the mutation among them. The sequence analysis identified more than 40,000 SNPs and 6,000 indels specific for individual mutant lines. Most of them were found in non-genic region, and observed mutation frequency suggested that replication error of DNA polymerase is a major cause of mutation. DNA markers developed from SNPs or indels located in genic region revealed their stable maintenance in posterior mutant lines, or in nucellar seedlings. These observations suggested frequent occurrence of mutation, but a few of them would substitute normal cell in a tissue, then maintained stably. No obvious increase of mutation detected on nucellar line also suggested that a random selection of existing mutant cells would be the major source of mutant in nucellar seedling.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：果樹 ウンシュウミカン 突然変異 枝変わり ゲノム解読 多型検出 SNP INDEL

### 1. 研究開始当初の背景

果樹の交雑育種では両親と大きく異なる特性を有する新規な系統が得られる反面、多くの優れた特性を有していても少数の不良形質のために淘汰されることも珍しくない。そのため、既存優良品種の変異を見だして一部の特性を部分的に改良する突然変異育種が重要な役割を担ってきた。これまでにリンゴやニホンナシ、セイヨウナシ、ブドウ、モモ、カキ、オウトウ、カンキツ等で果皮色や種子数、自家不和合性、耐病性、果実成熟時期、樹高など多くの形質に変異が見出された枝変わり系統が多数知られており、リンゴ「ふじ」の着色系や耐病性を獲得した「ゴールド二十世紀」、早生や極早生のウンシュウミカン系統のように経済栽培上の重要品種として位置づけられているものも多い。果樹の突然変異に関しては、これまでブドウの着色に関わる *myb* 遺伝子の変異にレトロトランスポゾンが関わっている例 (S. Kobayashi, et al. (2004) Science 304:982.) や、自家不和合性をもつニホンナシ二十世紀の不和合性遺伝子 S4 が変異して自家和合型 S4sm となった「おさ二十世紀」などが知られているが、永年生作物の自然突然変異の発生と維持の過程は、いくつかの点で一年生草本植物とは大きく異なる。モデル植物を含む一年生草本植物では、変異を有する細胞から分化した生殖細胞が種子形成時の組換えを経て種子となり、その後個別の変異ごとに異なる淘汰圧と、主に集団のサイズで規定される遺伝的浮動により特定の集団内部で一定の割合で保持されるか、または世代とともに失われる。一方、栄養繁殖性の果樹では減数分裂を経ることなく比較的長期間にわたり成長を続け、また接木等により多数のクローン苗が増殖される。そのため、果樹では無限成長する1本の巨大な仮想木の特定の枝の細胞に変異が発生し、その細胞が組換えや後代での分離を起こすことなく組織の中で維持され続け、新たに生じた変異が時間とともに蓄積されていくと見なすことができる。仮想木モデルでは、多様な変異系統は独立した変異を生じた仮想木の異なる枝として理解することができる。一つの細胞に発生した突然変異は、個別の突然変異の特性と環境との相互作用に依存する淘汰圧は受けつつも、一つの仮想木の組織内に一定の割合で存在し続ける場合がある。その結果、着生枝の生長につれて枝ごとに異なる突然変異が独立に発生して蓄積し、変異を有する細胞と未変異の細胞とがさまざまな存在比で含まれるキメラとして維持されると考えられる。しかし変異の発生機構を包括的に検証した例は極めて限定的であり、その原因には、遺伝解析の困難さに加え、キメラ性組織の中に不定な割合で存在する突然変異を網羅的に探索するための有効な技術が存在しなかったことが挙げられる。

研究代表者はこれまで、DNA マーカーを利

用した遺伝連鎖地図の構築と早期選抜マーカーの開発や品種判別に取り組み、ゲノム情報を活用したカンキツ類変異系統間での網羅的な多型検出技術を独自に開発してウンシュウミカンの変異系統を対象にその有効性を確認した。本手法を利用して、キメラ性を有する永年生果樹における系統間多型の網羅的な探索が可能となり、変異個所を特定して塩基配列を詳細に解析することで、どのような変異が生じたのかを分子レベルで明らかにすることができる。また、突然変異の発生部位を異なる塩基配列領域、異なる変異系統間や珠心胚実生発生過程で比較することで、塩基配列領域ごとの突然変異発生の特殊性と共通性の考察が可能になる。これらの知見は永年生果樹に特徴的な突然変異の仕組みを分子レベルで理解するだけでなく、植物の突然変異そのものの理解にも貢献することから、その積極的な推進を目的に本研究計画を構想した。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、ウンシュウミカンを対象とする以下の3項目の研究から、突然変異を生じた部位の変化とその周辺の構造を分子レベルで解析し、変異発生過程の特徴をあきらかにすることにより、果樹の突然変異の発生に関する、基礎的だが重要な知見を得ることを目的とした。

(1) 本研究で主な解析対象とするウンシュウミカンに適した大規模、かつ高精度の新たな分析基盤を構築する。その利用により、変異系統間での多型を検出し、系統識別に有効なDNA マーカー開発のための知見を集積する。

(2) 検出された系統間多型を示す複数の領域について、系統ごとに塩基配列を決定して変異部位を特定し、どのような突然変異が発生したのかを個別に検証する。同時に、変異が発生した複数の領域を相互に比較することで、突然変異発生の背景にある共通性についても検証を行い、系統判別のためのDNA マーカーを開発する。

(3) カンキツの珠心胚形成過程に注目し、珠心胚実生中に出現する変異がもとの枝変わり系統に蓄積されていたキメラ性が解消された結果であるのか、それとも珠心胚の発生過程で発生した新たな突然変異によるものであるのかを、具体的に検証する。

### 3. 研究の方法

(1) カンキツ変異系統の多型検出技術の高精度化と系統間の多型検出

次世代DNAシーケンサを基盤とする高精度な網羅的多型検索技術を利用し、突然変異検出条件を最適化してウンシュウミカンの変異系統間多型を検出する。

(2) 突然変異系統間での変異発生部位の解析  
検出された多型をゲノム情報と対応づけ、その構造解析から突然変異発生部位を特定してその特徴を明らかにする。

### (3) 珠心胚発生過程をモデルとする変異伝達過程の解析

ウンシュウミカンの珠心胚実生個体を複数養成し、1と2の知見をもとに、体細胞突然変異と珠心胚形成過程で発生する突然変異の共通性と特異性を検証する。

## 4. 研究成果

### (1) カンキツ変異系統の多型検出技術の高精度化と系統間の多型検出

本研究の構想時は、研究代表者が開発したCGH法による網羅的なゲノム多型検出法の利用を想定していたので、その大規模化にまず着手した。しかしその後、次世代型DNAシーケンサの能力が向上し、低価格化も進んだことから次世代DNAシーケンサを利用した研究実施に計画を変更した。この変更により、多型検出の精度と網羅性の飛躍的な向上が期待された。

次世代DNAシーケンス技術(NGS)を用いて、ウンシュウミカン5系統(‘宮川早生’、‘三保早生’、‘上野早生’、‘青島温州’、‘山下紅温州’)とヒュウガナツ2系統(普通系、‘室戸小夏’)の全配列を得て、カンキツ‘クレメンティン’半数体の参照配列にマッピングした。標準的なNGS解析手法を用いた解析から、それぞれ約5万の一塩基多型(SNP)が検出されたが、検出された多型はその後の確認実験で再現されないものがほとんどであった。その原因として、多型検出条件が最適化されていないことと、使用した参照配列がウンシュウミカンとは異なる品種のものであることが考えられた。そこで、NGSデータ解析法を再検討するとともに、並行して進めていたカンキツゲノム解析(国立遺伝学研究所中村研との共同研究)の成果として得られたウンシュウミカン全配列情報を利用して、多型の検出と高精度化を試みた。

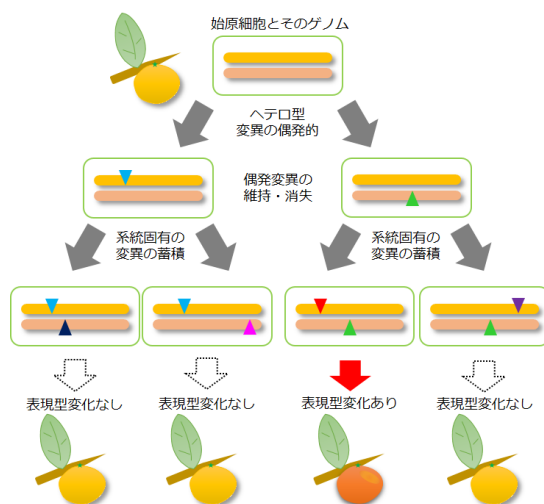


図1 栄養繁殖性作物における変異の発生と蓄積、表現型変化へのモデル

細胞内に蓄積する変異を、、、、で示す。

多型検出の高精度化では、NGSデータ解析条件の検討から、後述するゲノム内に長期間

にわたり蓄積されたランダムな変異(その多くは特定の組織、系統に固有なもの)が検出精度に影響することが示唆された。すなわち、種子繁殖性植物では種子形成時にゲノム内の特定部位に生じた変異の多くは失われていくが、栄養繁殖されるカンキツでは組織内に残存し、経時的に大量の変異が蓄積されていくと考えられる(図1)。また、同一の系統に由来する後代系統のゲノムでは、共通する変異が保持されていることが期待される。

ゲノム中のある部位に生じた変異を細胞ごとに評価することは困難であるが、変異を有する細胞が組織内に占める割合は変異の発生直後ではゼロと見なされる一方、形質の安定した系統ではほぼ全細胞が変異細胞に置換される結果、組織内構成比が1に近づくような連続分布を示すと想定される。その結果、通常のNGS解析では多型を示すリード数の比が1:1であればヘテロ型と判定されるが、突然変異が蓄積された組織の場合、ある塩基に注目すると多型を示すリード数は1:1から外れるものも一定数存在することになる。そのため、NGSデータの解析では多型の存在比が必ずしも1:1ではないものも検出対象とするように変更した。この結果、誤検出の可能性も同時に高まるが、組織内で必ずしも優勢でないような変異であっても検出感度が向上することが期待された。

ウンシュウミカンの全塩基情報の利用では、事前情報無しで構築された全配列とそこから予測された遺伝子情報を利用し、複数の多型検出条件を比較して最適化した条件で系統固有多型の検出を試みた結果、ウンシュウミカンでは約150万の、ヒュウガナツでは約340万のSNPが検出された。検出された多型には系統固有の変異のほか、祖先細胞から受け継いだ系統間に共通する多型や、特定組織に固有の一過的な変異、さらにNGS解析、または解析ソフトウェアに起因する固有のエラーが含まれていることから、検出された多型を総当たりで比較して複数の系統間で共通するものをすべて除外した。その結果、ウンシュウミカンで5万前後のSNPを、ヒュウガナツでは約40万のSNPが検出された。同様に、挿入欠失多型(INDEL)は、ウンシュウミカンで6,000前後、ヒュウガナツで約40,000検出され、SNPと比較するとその頻度はおよそ1/8~1/10であった。検出された系統固有多型数から推定されたSNPの発生頻度は約 $1.4 \times 10^{-4}$ /塩基であり、一般に知られているDNAポリメラーゼの複製時エラー発生頻度よりも2桁ほど高い結果となったが、これは長年にわたり複数の多型が組織内に繰り返し蓄積されてきた経過を反映しているものと考えられた。なお、対照として用いたヒュウガナツでは系統間比較による系統固有多型選抜の効果は確認出来たものの、2系統のみの比較ということもありウンシュウミカンと同程度にまで多型数を減少させるには至らなかったことから、以後の解析ではウン

シュウミカンを主な対象とした。

## (2) 突然変異系統間での突然変異部位の解析

前項で検出されたウンシュウミカンの SNP と INDEL 多型について解析した。ウンシュウミカンでは SNP のうち約 13% が遺伝子領域に見いだされ、これは予測されたゲノム中の遺伝子構成比に近い結果であった。一方で INDEL では約 17% となり、SNP よりもやや頻度が高い傾向が認められた。SNP と INDEL の存在比は対照としたヒュウガナツでも同様の結果であった。検出された多型は大部分がヘテロ型の多型であり、ホモ型多型の割合は全体の 1% 前後と低かった。また、検出された INDEL の挿入欠失長は  $\pm 1\text{bp}$  を極大とする分布を示したが、挿入または欠失について系統間で一定の傾向は認められず、ほぼ同程度の確率で発生しているものと推察された。検出された多型のうち、遺伝子領域内の Exon 領域内多型の割合は SNP で約 5.3%、INDEL で約 3.8% であり、想定される全 Exon のゲノム構成比 (約 8%) よりも低かった。

以上のように、長期間にわたり栄養繁殖されてきた果樹ではその間に大量の変異がゲノム中に蓄積している予想を強く裏付ける結果が得られた。SNP 多型が INDEL 多型の約 10 倍の頻度で発生していること、さらに、その頻度からゲノム内のほぼ全ての場所でランダムに発生していると考えられたことから、観察された現象は相同染色体のホモ型塩基のうち的一方が DNA ポリメラーゼの複製時エラーにより塩基置換または数 bp の挿入・欠失を起こして変異する、想定されているモデルとよく適合した。多型の大部分はヘテロ型であったことから、相同染色体の一方に生じた変異は、減数分裂過程での対合が起きない結果、ヘテロ性が維持された状態でゲノム内に保存されると考えられた。すでにヘテロ型であった領域に同種の変異が再度生じてホモ化するケースも想定されたが、確認された頻度から実際には極めてまれなケースと考えられ、シーケンサのエラーやノイズと明確に区別することは困難であった。見いだされた多型の頻度が高いことは、遺伝子領域外で発生した多型は生物の生存に対してほぼ中立なものであることを強く示唆した。しかし遺伝子エクソン領域で見いだされた多型数はそれ以外の領域のものよりもやや低い傾向にあったことから、遺伝子のエクソン領域で発生した多型には生存に影響するものも一定程度あり、それが淘汰圧となって検出比の違いとして現れたと考えられた。さらに、エクソン内で見いだされた多型の割合は SNP よりも INDEL で低く、このことは一塩基の置換よりも数塩基の挿入・欠失により生じるフレームシフトが表現型に大きな効果をもたらす、その結果として淘汰圧を高めたものと理解された。

以上の知見をもとに、ゲノム配列情報等を参照して検出された SNP と INDEL のうち、遺

伝子領域に見いだされたヘテロ型から十分なリード数で支持されるものを選択し、ウンシュウミカン 22 系統を対象に PCR による変異の確認を試みた。蛍光 DNA シーケンサを用いたフラグメント解析から、対象とした 74 INDEL 中 4 INDEL で、また、10 SNP 中、2 SNP で多型が確認された。検出された多型には始めに多型が見いだされた系統以外でも検出されたものが複数あったことから、今回多型が検出されたものはその起源が古く、組織が多型細胞でほぼ置換されたものであることが示唆された。しかし解析対象の一部でのみ実際の多型が検出されたことは、今回行った系統固有型多型の検出が 5 品種の総当たり比較では十分でなかったことを示唆しており、対照品種数を増やすことで精度の向上が期待される。一方で、組織内が変異細胞で完全に置換されていない、キメラ性が維持されている場合に期待されるような多型ピークの存在比が 1:1 から外れるようなものは今回の解析では見いだされなかった。NGS データの解析時に系統間の総当たり比較を行い、系統間で共通するものを積極的に排除したことや、多型検出の閾値を下げるとランダムノイズが増えるために一定値以下に下げることが困難であったことが影響していると考えられ、キメラ状態にある多型の検出については今後の課題である。

## (3) 珠心胚発生過程をモデルとする変異伝達過程の解析

カンキツでは多胚性を利用して、珠心胚実生の中から新たな変異を獲得した実生の選抜が行われてこれまでにいくつもの珠心胚実生系統が選抜・確立されてきた。しかし珠心胚実生で見いだされる多型がキメラ性の解消により従来から存在した多型が顕現した結果であるのか、それとも珠心胚形成時に新たな変異が誘発されたためであるかについては全く知見が無かった。今回解析対象とした系統のうち、'宮川早生' とその珠心胚実生である '三保早生' との比較では、それぞれの系統に固有と考えられる SNP と INDEL 数は枝変わり系統との間で明確な違いが認められなかったことから、珠心胚形成時に変異発生確率が向上することを示唆する結果は得られなかった。

これとは別に、'青島温州' にナツダイダイ花粉を受粉して得た実生のうち、SSR マーカーで珠心胚実生であることを確認した 55 実生個体について、'青島温州' に固有の SNP および INDEL 多型の挙動を検証した結果、これらの個体ではすべて '青島温州' と同様にヘテロ性が維持された状態で見いだされた。この結果を従来から提唱されている 3 層モデルに適用すると、今回検定した '青島温州' に固有の多型を保有する変異細胞は、少なくとも生殖細胞の起源となる第 2 層を構成する細胞の大部分を占めており、その細胞に由来する珠心胚が形成された結果、珠心胚実生

においても「青島温州」に固有の多型が維持されたと考えられた。この結果はまた、変異によりヘテロ化した多型は減数分裂による組換えを受けないためにヘテロ性が維持されるという、従来からのモデルと矛盾しなかった。

以上の結果から、珠心胚実生で観察される変異は珠心胚形成時に新たな変異が生じたためではなく、原系統の組織内で維持されてきた変異細胞のうち、第2層に存在しているものが珠心胚形成を経る際に全組織を置換して固定され、その結果として形態変化をもたらしたと考えられた。

#### (4)まとめ

本研究より、次のことが明らかとなった。

従来、表現型として現れる変異の発生がまれであることから、ゲノム中の変異発生確率も低いものと考えられてきたが、NGS解析から、実際には非常に多くの多型がカンキツ組織内に蓄積されていることが明らかとなった。

検出された多型は相同染色体のうち的一方に偶発的に検出されたことから、これらはDNAポリメラーゼの複製時エラーによるものと考えられた。検出された多型はカンキツの参照ゲノム配列に位置づけられており、ゲノム情報を参照した検証が可能となった。

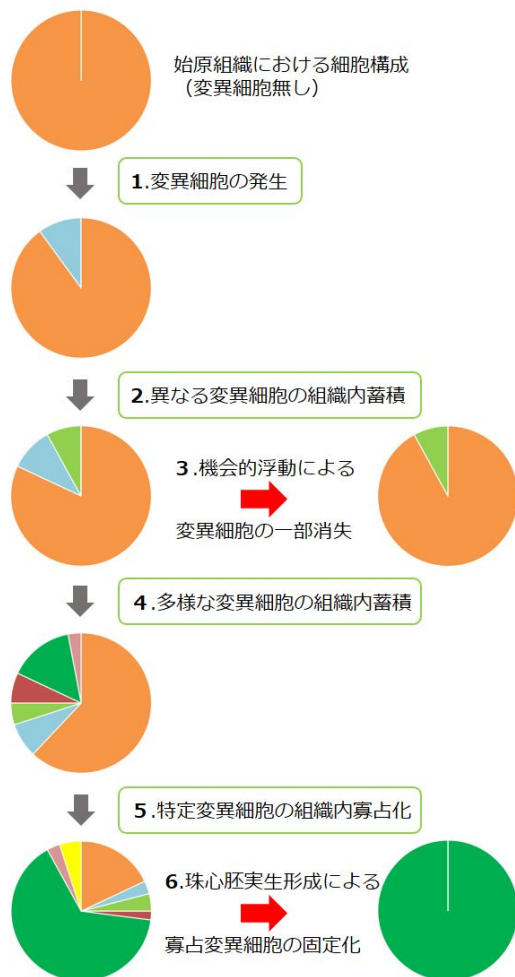


図2 本研究から推定されたカンキツ組織内の変異の発生と蓄積・消失、および珠心胚実生成による変異固定化のモデル

遺伝子外領域に発生した変異の多くは遺伝的にほぼ中立で強い淘汰を受けないことが示唆されたが、遺伝子領域のうち、特にエクソン領域で見いだされる多型の頻度は遺伝子外領域のものよりも低かったことから、遺伝子領域内に生じた多型の一部は淘汰を受けているものと考えられた。さらに、遺伝子領域内で発生した変異のうち、淘汰を受けなかったものの一部が表現型に変化をもたらす原因であると推定された(図1)。

栄養繁殖を続ける間、異なる変異を有するさまざまな細胞が組織内に徐々に蓄積し、一部は機会的浮動により消失するものの、時間とともにその種類、構成比は変化すると考えられた(図2の1~3)。

組織内に蓄積された変異細胞のうち、組織を寡占するまでになったものの一部に表現型の変化が認められるようになれば、人間に「枝変わり」として認識されるようになる(図2の4、5)。この時点では表現型に直接変化をもたらした変異細胞以外の他の変異細胞や、表現型変化には直接関与しない変異も組織内に残存している。NGS解析では非常に多くの多型が検出されたものの、系統固有と見なせるものはそのうちの約4%と限定されており、この推定を裏付けるものである。

珠心胚実生の形成時に突然変異発生確率が顕著に高まることを示唆する結果は得られなかったことから、珠心胚実生から選抜される変異系統は、その原系統の組織中に存在していた変異細胞が選抜されて固定化された結果、形質が安定化して表現型に違いをもたらすものと考えられた(図2の6)。

NGS解読の結果から、系統固有の多型を特異的に検出することができるDNAマーカーを複数開発することが出来た。設計したマーカー中、実際に多型を検出出来た割合はそれほど多くはなかったが、これは事前の系統間比較で系統固有と判断されたものの中にNGSのエラーや不安定な変異細胞に由来する多型がまだ残されていることが原因と推定された。しかし系統間比較による非特異的多型排除には大きな効果があることから、NGS解析の低コスト化にともない、より多くの系統間で評価することで、系統固有の多型の検出精度が高まるものと考えられる。また、キメラ性の評価に利用できるDNAマーカーを開発するには至らなかったが、これは組織内の変異細胞の種類や構成比が不安定であることや、NGS解析でリード数の微妙な変化を検出することが難しいなどの原因が考えられた。今後

さらにデータ数を増やして最適化を図ることで、より多くの DNA マーカーを開発することが期待される。

これらの結果はまた、突然変異で獲得された形質が交雑により後代に遺伝する可能性を暗示するものの、表現型の発現には多くの遺伝子が関与しており、特定の突然変異がもたらす効果については今後それぞれの遺伝特性を慎重に評価する必要がある。

以上のように、本研究課題は当初想定していたモデルを検証するだけでなく、系統固有な多型検出に有効な DNA マーカーを開発するための手法を確立するなど突然変異発生機構解明を通じて園芸研究と基礎科学に大きく貢献する成果を得ることが出来た。今後は検出された変異周辺の情報をより詳細に解析することで、突然変異の発生と組織内での拡大と固定に関わる知見の充実に努める。

#### <引用文献>

S. Kobayashi, N. Goto-Yamamoto, H. Hirochika, Retrotransposon-induced mutations in grape skin color, 2004, 304:982.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

・ F.G. Gmitter, C. Chen, MA. Machado, AA. de Souza, P. Ollitrault, Y. Froelicher, T. Shimizu. Citrus Genomics. 査読有, Tree Genet. Genom. 2012, DOI 10.1007/s11295-012-0499-2. (総説)

・ T. Shimizu. Genomic approaches for the molecular analysis of citrus mutants. 査読有, Gamma Field Symposia, 2012, 49:57-69. (総説)

・ 清水徳朗、他 カンキツゲノム CGH アレイを利用した温州ミカンの不安定な変異系統とその原系統間での多型性の評価. 査読有, DNA 多型, 2012, 20:71-75.

[学会発表](計 4 件)

・ T. Shimizu, A. Kitajima, et al. Verifying the mandarin breeding: lesson from parentage analysis of citrus varieties. Plant and Animal Genome XXIII, 2015 年 1 月 10 日、San Diego, CA, USA.

・ T. Shimizu, Y. Tanizawa, T. Mochizuki, et al. Genome sequence of Satsuma mandarin and comparison to other citrus genome. Plant and Animal Genome XXII, 2014 年 1 月 11 日、San Diego, CA, USA.

・ T. Shimizu, et al. (2012) Whole genome sequencing and mapping analysis for

identifying polymorphism among 11 citrus varieties. 国際柑橘学会第 12 回大会. 2012 年 11 月 23 日 Valencia, Spain.

・ T. Shimizu (2012) Molecular identification of varieties. 国際柑橘学会第 12 回大会. 2012 年 11 月 19 日 Valencia, Spain.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

清水 徳朗 (SHIMIZU, Tokurou)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門カンキツ研究領域上級研究員

研究者番号：90355404