

令和元年6月21日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07608

研究課題名(和文)カンキツ類における孢子体アポミクシス制御機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of sporophytic apomixis in citrus

研究代表者

島田 武彦 (SHIMADA, Takehiko)

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・ユニット長

研究者番号：10355399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カンキツ類には種子中に種子親と同一のゲノムを持つ体細胞胚を形成する多胚性が見られる。CitRKD1は多胚性の制御遺伝子座上にあり、MITE型トランスポゾンが挿入された多胚性アレルと挿入のない単胚性アレルの2種類に分類される。多胚性のアレルを持つカンキツ類ではCitRKD1の転写物が検出でき、CitRKD1の転写が抑制された遺伝子組換えオレンジでは単胚様の種子が形成された。播種後の生育個体はオレンジと異なる遺伝子型を示したことからCitRKD1が原因遺伝子であり、CitRKD1遺伝子の upstream に挿入されたMITE型のトランスポゾンがCitRKD1の転写制御に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンキツでは交雑育種法により新品種の開発が進められている。多胚性の個体を種子親に用いると、得られる実生個体のほとんどが種子親と同一のゲノムを持つクローン個体となり、交雑個体の獲得が極めて困難となる。多胚性は交雑組み合わせを限定する要因となっていることから、カンキツの育種を効率的に進めるためには、多胚性の原因遺伝子を解明し、芽生えの段階で胚性を識別可能なDNAマーカーの開発が求められている。

研究成果の概要(英文)：Somatic embryogenesis in nucellar tissues is widely recognized to induce comprised multiple alleles that were divided into two types, polyembryonic alleles with a miniature inverted-repeat transposable element (MITE) insertion in the upstream region and monoembryonic alleles without it. CitRKD1 was transcribed in reproductive tissues of polyembryonic varieties with the polyembryonic allele. Loss of CitRKD1 function by antisense-overexpression abolished somatic embryogenesis in transgenic sweet orange and the transgenic T1 plants were confirmed to derive from zygotic embryos produced by self-pollination by DNA diagnosis. The MITE insertion in the upstream region of CitRKD1 might be involved in regulating the transcription of CitRKD1.

研究分野：園芸科学

キーワード：多胚性 カンキツ アポミクシス 単胚性 MITE トランスポゾン アレル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

被子植物のアポミクシス(無融合種子形成)は受精を回避した種子が生産される現象で、親品種と相同な遺伝子型を持つクローン種子を生産することから、農業上、一代雑種の親品種の遺伝子型をアポミクシスで維持し、遺伝的に特性の均一な品種を生産するなどの新技術として利用が期待されている。アポミクシスは、胚のうを取り巻く胚珠中の体細胞から胚が形成される、胞子体アポミクシスと、減数分裂を経ずに形成された胚のうから胚が形成される、配偶体アポミクシスに大別され、はさらに、大孢子母細胞を起源とする複相胞子生殖(diplospory)と、それ以外の体細胞を起源とする無胞子生殖(apospory)に分けられる(表1)。アポミクシスは、カンキツ、マンゴー(共に)、タンポポ(diplospory)、ギニアグラス(apospory)などにおいて知られ、多くの植物では単一遺伝子座により制御されている可能性が示唆されているが、その分子機構についてはほとんどが未解明である。これらの植物種ではアポミクシスの制御機構解明に向けた取り組みが進められ、連鎖地図上にアポミクシスの遺伝子座をマッピングし、近傍領域のゲノム解読が行われている(Akiyama et al.2011、Nakano et al. 2008、Conner et al. 2008)。近年、配偶体アポミクシス(apospory)を行うペニセタム種において、アポミクシスの原因遺伝子座に存在するBABY BOOM-like(PsASGR-BBML)遺伝子を近縁種のトウジンビエに遺伝子導入を行い、遺伝子組換え体では単為発生の結果ハプロイド植物を生産することが明らかとなるなど(Conner et al. 2015)、配偶体アポミクシスの分子制御機構の一端が解明されつつある。一方、カンキツ、マンゴーなどの珠心や珠皮等の体細胞から不定胚を生じる胞子体アポミクシスは無性胚の起源が異なり、有性胚と共に無性胚が発生して多胚となるため、異なる制御機構が推定される。

2. 研究の目的

カンキツでは交雑育種法により新品种の開発を進めており、優れた特性を持つ親品種を交配し、数千の交雑個体の中から両親の優れた特性を兼ね持つ画期的な個体を選抜する。カンキツの交雑育種において多胚性の個体を種子親に用いると、得られる実生個体のほとんどが種子親と同一のゲノムを持つクローン個体となり、交雑個体はほぼ獲得できない。また、交雑により優れた特性を持った品種を得られても、多胚性である場合、交雑育種における種子親としては利用できないため、交雑を進めてさらに優れた品種を育成することは困難である。このように多胚性は交雑組み合わせを限定する要因となっており、カンキツの育種を効率的に進めるためには、多胚性を示さない、単胚性の個体を利用することが不可欠である。しかしながら、個体の胚性(単胚性/多胚性)を確認するためには果実の結実を待つ時間を要する。そこで、本研究では、カンキツの多胚性を制御する遺伝子をマップベースドクローニングにより単離し、この遺伝子のゲノム構造の特徴に基づき、芽生えの段階で胚性を識別可能なDNAマーカーを開発する。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析による多胚性原因遺伝子のスクリーニング

カンキツの多胚性の遺伝子座が座乗する約380kbpのゲノム領域中の79個の予測遺伝子からオリゴプローブを設計し、カスタムオリゴアレイを作成した。このアレイを用いて単胚性品種の「清見」と多胚性品種の「はるみ」の幼果実において統計的に有意な発現差を持つ遺伝子をマイクロアレイ解析でスクリーニングし、RT-PCRを用いて多胚性が形成される幼果実のサンプルを用いて候補遺伝子の遺伝子発現を調査した。

(2) 遺伝子組換え体を用いた候補遺伝子の機能解析

候補遺伝子(CitRKD1)の全長をアンチセンス方向で発現させるベクターを構築した。このベクターをアグロバクテリウムLBA4404株に導入して多胚性のスイートオレンジ(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)の胚軸に感染させ、隔離温室内で順化・育成した。得られた順化個体についてPCRおよびサザンブロット解析により遺伝子導入を確認し、RT-PCR法により花器官における遺伝子発現解析を行った。また、スイートオレンジでヘテロ型を示すCAPSマーカーを用いて播種後生育した個体が、交雑胚か否かを調査した。

(3) CitRKD1のアレルの構造解析

多胚性品種のウンシュウミカンからCitRKD1の配列の異なる2種類のアレルをクローニングし、塩基配列を決定し、RT-PCRにより各アレルの遺伝子発現解析を行った。

(4) 原因遺伝子に基づいたDNAマーカーの開発

国内の育成品種の元親となる祖先14品種のCitRKD1のアレルの保存性の高い領域から単胚性と多胚性の品種を識別できるDNAマーカーを作成し、国内で育成した95種類の品種や系統について遺伝子型と胚性(多胚性/単胚性)を調査した。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析による多胚性原因遺伝子のスクリーニング

マイクロアレイ解析により多胚性を制御する遺伝子座が座乗するゲノム領域内の79個の予測遺伝子の中から、多胚性の「はるみ」の開花後15日から60日の幼果実において単胚性の「清見」より高い発現を示す候補遺伝子が得られた(図1)。この候補遺伝子の全長を単離して塩基配列を決定したところ、CitRKD1はモデル植物のシロイヌナズナで報告されている胚の初期

化に関わる RKD 遺伝子と高い相同性を示した。

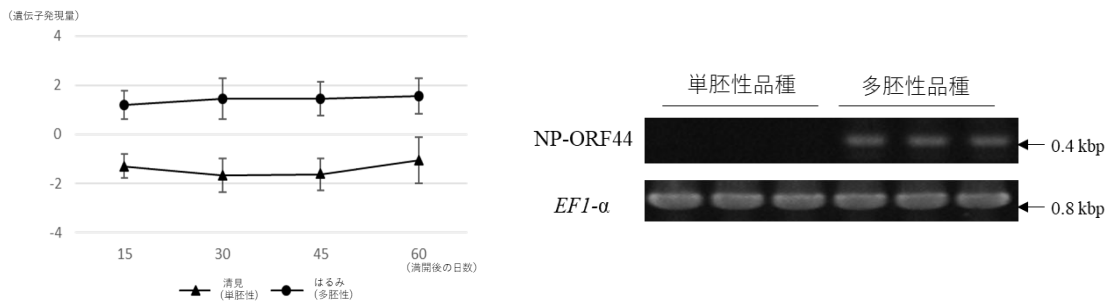


図1. マイクロアレイ解析で選定した候補遺伝子の発現パターン(左)と RT-PCR による遺伝子発現解析(右). NP-ORF44 はすべての期間において多胚性品種の幼果実で遺伝子発現が高い。(EF1-α: 細胞内で恒常的に発現する内部標準と利用される遺伝子)

(2) 遺伝子組換え体を用いた候補遺伝子の機能解析

多胚性のスイートオレンジの内在性の *CitRKD1* 遺伝子の転写を遺伝子組換え技術で抑制すると、単胚様の種子が形成されたことから *CitRKD1* が多胚性を制御する原因遺伝子と考えられた(図2)。この単胚様の種子を播種し、生育した個体の遺伝子型を調査した結果、スイートオレンジと異なる遺伝子型を保持していたことが明らかとなり、この種子が交雑胚であることを確認した。

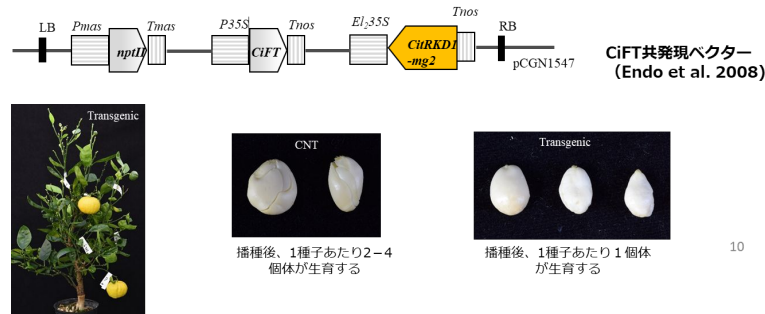


図2. 遺伝子組換え用のベクターコンストラクト(上)と遺伝子組換えオレンジの様子(下)。

(3) *CitRKD1* のアレルの構造解析

ウンシュウミカンから配列の異なる2種類の *CitRKD1* を単離して塩基配列を決定したところ、単胚性と多胚性のアレルはタンパク質の翻訳領域では高い相同性を示し、多胚性のアレルのプロモーター領域には miniature inverted-repeat transposable element (MITE)型のトランスポゾンが挿入されていた。代表的なカンキツを用いて、このトランスポゾン挿入と RT-PCR 法による遺伝子発現の関連について調査した結果、多胚性のアレルを持つカンキツで *CitRKD1* の転写が検出され、トランスポゾンの挿入が遺伝子発現の制御に関与することが示唆された。

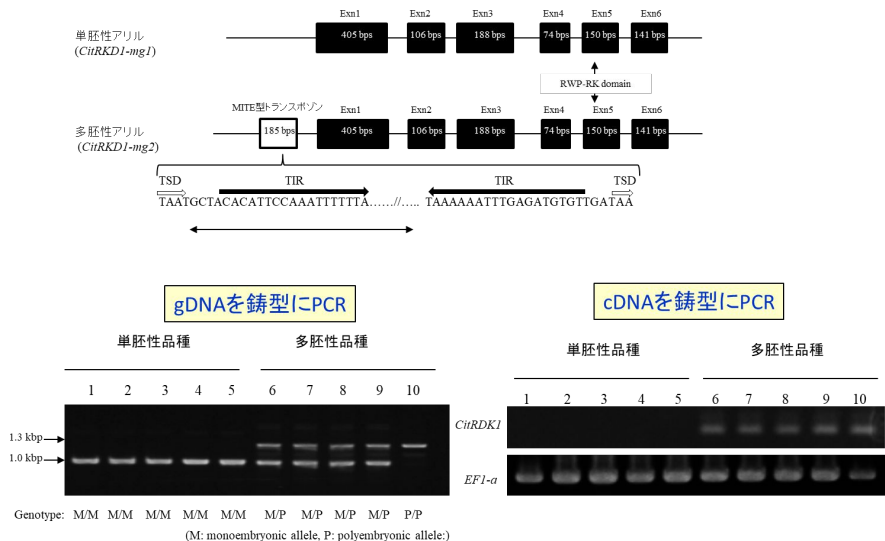


図3. ウンシュウミカンにみられる2種類の *CitRKD1* のアレルの構造(上)と、多胚性アレルと単胚性アレルの RT-PCR 法による遺伝子発現解析(下)。

(4) 原因遺伝子に基づいた DNA マーカーの開発

国内の育成品種の元親となる祖先 14 品種について、トランスポゾン近傍の領域の塩基配列を決定し、保存領域からプライマーを設計 MITE 型のトランスポゾンの挿入の有無を判別できる DNA マーカーを開発して国内で育成した 95 種類の品種や系統を調査したところ、遺伝子型と胚性(多胚性/単胚性)は完全に一致しており、MITE 型のトランスポゾンが挿入された CitRKD1 を対立遺伝子に持つカンキツ品種は多胚性の種子を形成し、挿入のない対立遺伝子をホモ型に持つカンキツ品種は単胚性の種子を形成することが明らかとなった(図4)。

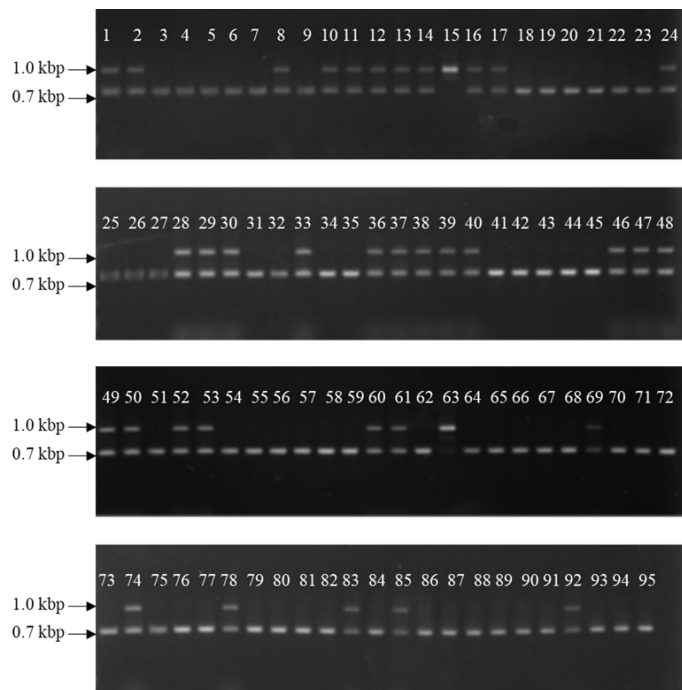


図4. 開発した DNA マーカーの PCR フラグメントパターン. 約 1.0kbp のフラグメントは多胚性のアレル、約 0.7kbp のフラグメントは単胚性のアレルから増幅される. 国内で育成した 95 種類の品種や系統の遺伝子型と胚型はすべて合致している.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Shimada T., Endo T., Fujii H., Nakano M., Sugiyama A., Daido G., Ohta S., Yoshioka T., Omura M. (2018) MITE insertion-dependent expression of CitRKD1 with a RWP-RK domain regulates somatic embryogenesis in citrus nucellar tissues. BMC Plant Biology 18(1): 166. (査読あり)

[学会発表](計 1 件)

島田武彦、遠藤朋子、藤井浩、中野道治、杉山愛子、大同原野、太田智、吉岡照高、大村三男 (2019) カンキツ類の多胚性の原因遺伝子の解明と DNA マーカーの開発. 園芸学研究 18(1): 34.

[その他]

ホームページ等

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/press/laboratory/nifts/130499.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 遠藤 朋子

ローマ字氏名: ENDO Tomoko

所属研究機関名: 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名: 果樹茶業研究部門

職名: 上級研究員

研究者番号(8桁): 50355400

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。