

平成 21 年 8 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2005～2008  
 課題番号：17380005  
 研究課題名（和文） HEGS-DD 法を用いた牧草アポミクシス遺伝子の精密マッピングとクローニング  
 研究課題名（英文） Fine mapping and cloning of apomixis genes in guineagrass using HEGS-DD methods

研究代表者  
 陳 蘭庄（CHEN LANZHUANG）  
 南九州大学・園芸学部・教授  
 研究者番号：40284822

## 研究成果の概要：

本研究は、イネ科牧草ギニアグラスを実験材料とし、HEGS-AFLP と HEGS-DD 法を用いてアポミクシス遺伝子のクローニングとそのマッピングを行ったものである。その成果、1) アポミクシス遺伝子を4つ捕捉でき、異なる塩基配列長をもつ同じ *ASG-1* 遺伝子ファミリーであることが明らかになった。2) *ASG-1* を用いてイネ遺伝子組換え植物を効率的に作出でき、結実しないイネを作出した。3) 有性生殖とアポミクシス系統との交配で作った F1 集団を利用してアポミクシス遺伝子の精密マップを作製した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	6,000,000	0	6,000,000
2006 年度	3,500,000	0	3,500,000
2007 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
総計	15,700,000	1,860,000	17,560,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：アポミクシス、ギニアグラス、HEGS-AFLP、HEGS-DD、アポミクシス遺伝子マッピング、アポミクシス遺伝子クローニング、交配実験、RNA・cDNA

## 1. 研究開始当初の背景

1995年9月にアメリカテキサス州であった第1回国際アポミクシス会議以来、EUやアメリカのロックフェラー財団、さらに IRRI、CIMMYT、アメリカ、オーストラリア諸国など、世界レベルでのアポミクシス研究を推進している。申請者は1992年より科学技術特別研究員として本格的にアポミクシス研究を

始めて以来、常に先導的な研究を実行し、これらの学会に出席・発表し、国内外の研究者とも協力して研究を進めてきている。申請者は自ら長年地道に開発した技術でアポミクシスの生殖様式を解明し、大孢子が崩壊後、珠心組織の体細胞が出現してのちにアポスポリー性胚嚢始原細胞(AIC)となり、AIC由来のアポミクシス性胚嚢を形成することを突

き止めた。しかも AIC の数が開花当日まで子房長の増加につれてその数も増えたことから、子房長を指標として Differential screening 手法を用いて、AIC ステージに特異的に発現する遺伝子を捕捉できた。構造解析と類似性検索の結果、アポミクシス特異的遺伝子であることが分かった。そこで *ASG-1* と命名した。*ASG-1* を用いた in situ hybridization の結果からも、AIC または AIC 由来の胚嚢内で特異的に局在することも明らかになった。

## 2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究では、まず、*ASG-1* 遺伝子と似た機能を持つ遺伝子をさらに多く捕捉することができるかどうかを確かめたく、同じサンプリング手法を使うが、RNA 抽出の材料は今までの蕾から子房に切り替え、しかも HEGS-DD 法を用いて、アポミクシス特異的遺伝子のクローニングを行い、AIC ステージ特異的遺伝子の大量捕捉に力を入れようとした。また、ギニアグラスの条件的アポミクシス性系統と有性生殖性系統を用いて交配による F1 または F2 集団を作り、HEGS-AFLP 法を用いてアポミクシス遺伝子の精密マッピングを行うことにした。さらに、*ASG-1* 遺伝子を用いて遺伝子導入実験を行い、その機能解析を計画し、組換え植物体を得たうえで、アポミクシス関連現象が現れるかどうかを検証することも、本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

1) アポミクシス性系統のギニアグラスより子房長を指標として AIC 出現時期を中心に、大孢子形成期、AIC 出現時期、胚嚢形成時期、胚形成時期ならびに種子形成時期の蕾、花および未熟種子をサンプリングし、RNA 抽出、cDNA 合成を行う。対象区の有性生殖性系統でも同じようなことを行う。各時期のサンプルから合成した cDNA を HEGS-DD を用いてアポミクシス遺伝子群のクローニングを行う。捕まえた遺伝子を構造解析や類似性検索を行い、遺伝子の同定を行う。

2) 同時に *ASG-1* 遺伝子をはじめ、クローニングできた遺伝子を用いて、イネやギニアグラスに遺伝子導入を行い、組換え植物体を大量に作出する。人工気象室内で植物体の全部を育てるまでに育成する。開花期の蕾や花をサンプリングし、胚嚢解析を行うと同時に植物体の形態・形質調査を行うことによって、*ASG-1* 遺伝子群を解析し、その機能を明らかにする。

3) イネ科牧草ギニアグラスの条件的アポミクシス性系統と有性生殖性系統を用いて交配による F1 または F2 集団を作る。得た F1

種子を次の年に蒔いて得た個体について、形質評価を行うため、ノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いた胚嚢分析法を実施し、それぞれの有性生殖率及びアポミクシス率を算出する。また、F1 集団およびその交配両親の形質調査には、栄養成長部分、生殖成長部分について調査・解析し、それぞれの特徴を見つけて形質評価を行う。交配実験によって得た F1 個体を使って 92 個体および両親のゲノム DNA を抽出し、HEGS-AFLP 法を用いてアポミクシス遺伝子のマッピングを行う。

## 4. 研究成果

1) HEGS-DD 法を用いてアポミクシス遺伝子のクローニング実験について、まず、液体窒素を用いた子房の切り出し法を確立した。それを使ってアポミクシス性胚嚢始原細胞出現時期、その前後の時期の蕾や小花から、子房長を指標として、それぞれ数千個の子房を切り出した。続いてこれらの子房からトータル RNA と mRNA を抽出して cDNA に合成できた。同時に AIC-cDNA ライブラリを作製した。HEGS-DD 法を用いて、アポミクシス特異的遺伝子のクローニングを行い、AIC ステージ特異的遺伝子の捕捉に成功した。その結果、6 つの AIC ステージに特異的に発現する遺伝子が見つかった。それと同時に 2 つの AIC と S2 (有性生殖性系統の大孢子分裂から胚嚢形成までの時期) の両ステージに同時に発現する遺伝子を、また 3 つのすべてのステージに同時に発現する遺伝子を、それぞれクローニングできた。

6 つの AIC ステージに特異的に発現する遺伝子については、構造解析を行った結果、RNA から cDNA への逆翻訳の開始点が 6 つとも同じであったが、塩基配列長はそれぞれ違った。しかし、驚くことにそれらは *ASG-1* 遺伝子とは、全く同じ塩基配列を持ち、塩基配列長だけが違うことが分かった。

この実験では、まったく異なった実験材料を用いたことにも関わらず、得られた 6 つの AIC ステージに特異的に発現する遺伝子が *ASG-1* 遺伝子と同じ塩基配列をもつことは、あたかもこれまでに長い期間の交配実験から生まれた支配的な仮説である「アポミクシスの 1 優勢遺伝子支配」を側面から支持・証明する。これらの遺伝子は *ASG-1* 遺伝子ファミリーに属すべく、*ASG-2*、*ASG-3*、*ASG-4* および *ASG-5* とそれぞれ命名した。類似性検索の結果、*ASG-1* と同じく、種子または胚発育特異的遺伝子と最も高い相同性を示した。

2) 同時に *ASG-1* 遺伝子をはじめ、クローニングできた遺伝子を用いて、イネやギニアグラスに遺伝子導入実験を行い、組換え植物体を大量に作出する実験を行った。その結果、

(1) 効率の高い組換えエイネの作出系を確立した。成熟した種子を無菌播種して1週間前後にアグロバクテリウムを介して、感染方法や、抗生物質の濃度、培地の種類などを検討した。従来の2回アグロバクテリウム感染液に浸すことを1回に減らしたほか、その後の除菌作業も回数を減らした結果、除菌後のカルスは2週間かかった回復期間が1週間では回復できた。(2) 引き続き、抗生物質の濃度について検討した。10mg/l~50mg/lの範囲で実施して30mg/lの処理区は最も高い再生率が得られた。(3) さらに培地の種類も検討した。カルス形成と再分化培地に関しては、N6培地がカルス形成に、MS培地が再分化に、それぞれ良い結果を示したことが明らかになった。(4) 自家不和合性個体の検出手法の確立については、異なるベクターをもつASG-1遺伝子を導入した組換えエイネ植物体は約2,000株を作出することができた。そのすべてから穂が出てきて、開花、受粉、穂の収穫をし、乾燥させ、電子デシゲーターに保存している。検出手法としては、1つ目に開花当日の小花をサンプリングし、固定してノマルスキー微分干渉顕微鏡で花粉の稔性や子房の発育過程を観察する予定。2つ目は2,000株からゲノムDNAを抽出し、ASG-1遺伝子の塩基配列をもとに作成したプローブを使ってPCRで早期検定法を探索する予定。3つ目は直接結実の有無を調査する予定。

3) HEGS-AFLP法を利用したアポミクシス遺伝子マッピング実験については、まず、ギニアグラスの植物を株分け・栽培してビニールハウスで開花させた。その間、交配親系統となる6系統を利用してHEGS-AFLP法を適合し、系統図を作成した。その結果から最も遠縁の両親を選び、プラスチックバッグ法を用いて交配を行った。夏と冬の両シーズンにてそれぞれ雑種種子を得ることができた。これらの種子を使って発芽実験を行い、発芽率等をチェックした上で、次の年に播種した。成熟した植物体から蕾や小花をサンプリング・固定し、それらの生殖様式をノマルスキー微分干渉顕微鏡による透明法で観察してアポミクシス率を推定した。

交配実験によって得たF1個体を使って92個体および両親のゲノムDNAを抽出した。次はHEGS-AFLP法を用いてアポミクシス遺伝子のマッピングを行った。384のプライマーを用いてそれぞれ交配の両親とF1集団92個体のゲノムDNAをPCRで増幅し、4連電気泳動装置を使ってそれぞれのバンドパターンを撮影した。それをもとにそれぞれの両親と比べて特異的バンドを選び出し、マッピング用ソフトに適合し、アポミクシス遺伝子マッピングを行った。その結果、アポミクシス遺伝子の精密マップがほぼ完成した。近い将来、そ

れを使ってアポミクシス遺伝子の同定実験やASG-1遺伝子群との関連、さらに実際の育種での応用などについても研究を進める予定。

#### 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 11 件)

- 1) **Chen, L. Z.**, Guan, L. M., Miyazaki, C., Kojima, A., Saito, A., Isolation and characterization of apomixis-specific gene family with different length of sequences in facultative apomictic guinea grass (*Panicum maximum*): Is it the evidence supporting hypothesis of 1 dominant gene of apomixis? **Journal of Plant Physiology** (in press) 査読: 有
- 2) Guan, L. M., **L. Z. Chen**, T. Adachi. Ultrastructural studies of embryo abortion in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) as a heat-stress. **Cytologia**, 73:371-379, 2008 査読: 有
- 3) **Chen, L. Z.**, Z. S. Du, T. Hamaguchi, **T. Sugita**, R. Nagata, **H. Terao** and T. E. Tsuzuki. Clonal propagation and quick detection of virus-free plants of sweet potato, *Ipomoea batatas*. **Bull. Minamikyushu Univ.** 38: 1-5, 2008 査読: 有
- 4) Guan, L. M., **L. Z. Chen**, **H. Terao**. Ultrastructural studies of Gametophytic Apomicts in Guinea grass (*Panicum maximum*) II. Characteristics of aposporous initial cell-derived embryo sac. **Cytologia**, 72, 2008 査読: 有
- 5) Guan, L. M., **L. Z. Chen** and **H. Terao**. Ultrastructural studies of gametophytic apomicts in guinea grass (*Panicum maximum*). I. Differentiation of aposporous initial cell. **Cytologia**, 71:379-389, 2007 査読: 有
- 6) **Chen, L. Z.**, S. Amano, L. M. Guan and T. Adachi. Preliminary isolation of viable embryo sacs and protoplasts from viable egg cells in facultative apomictic guineagrass (*Panicum maximum*). **Cytologia**, 70: 171-179, 2006 査読: 有
- 7) **Sugita, T.**, T. Kinoshita, T. Kawano, K. Yuji, K. Yamagichi, R. Nagata, A. Shimizu, **L. Z. Chen**, S. Kawasaki, A. Todoroki. Rapid construction of a sweet pepper genetic linkage map using

- high-efficiency genome scanning/AFLP and RAPD, from an intraspecific, doubled-haploid sweet pepper population. **Breeding Science**, 55 : 287-296, 2005 査読：有
- 8) Yasuda, S. AP. Kumar, M-Y. Liu, Y. Sakakibara, M. Suiko, **L. Z. Chen**, M-C. Liu. Identification of a novel thyroidhormone-sulfating cytosolic sulfotransferase, *SULT1 ST5*, from zebrafish : Molecular cloning, expression, characterization and ontogenic study. **FEBS Journal (Formerly European Journal of Biochemistry)**, 272: 3828-3837, 2005 査読：有
- 9) **Chen, L. Z.**, L.M. Guan, M.K. Seo, F. Hoffmann and T. Adachi. Developmental expression of *ASG-1* during gametogenesis in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). **Journal of Plant Physiology**, 162:1141-1148, 2005 査読：有
- 10) Yasuda, S., C-C. Liu, S. Takahashi, M. Suiko, **L. Z. Chen**, R. Snow and M-C. Liu. Identification of a novel estrogen-sulfating cytosolic *SUIT* from zebrafish: Molecular cloning, expression, characterization, and ontogeny study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 330: 219-225, 2005 査読：有
- 11) Seo, M.K., **L. Z. Chen**, H.Y. Lee and T. Adachi. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *ASG-1* gene from guinea grass (*Panicum maximum*) to rice. **Applied Biological Science**, 8:34-46, 2004 査読：有

[学会発表] (計 8 件)

- 1) **陳 蘭 莊**・関 黎明 ギニアグラスにおけるアポスポリー性胚嚢始原細胞出現の微細解析。日本育種学会 第 115 回講演会 育種学研究 第 11 巻別冊 1 号 p222 2009
- 2) **Chen, L. Z.**, L.M. Guan, **T. Sugita**, H. Ichikawa. Apomixis specific gene-1 (*ASG-1*) isolated from *Panicum maximum* expressing pollen sterile in transgenic rice. **Abstracts of The International Symposium of Rice Functional Genomics**. pp298, Jeju Korea, November 10-12, 2008
- 3) **陳蘭莊**・関黎明・**杉田 亘**・市川裕章・浜口卓郎 イネ科アポミクシス性ギニアグラスの自家不和合性のメカニズム。日本

- 育種学会 第 113 回講演会 育種学研究 第 10 巻別冊 1 号 p279 2008
- 4) **陳蘭莊**・関黎明・宮崎力・小島昭夫・斉藤彰 ギニアグラスにおけるアポスポリー性アポミクシス特異的遺伝子群の単離とその機能解析：アポミクシス 1 優性遺伝子支配説を支持する証拠？ 日本育種学会 第 112 回講演会 育種学研究 第 9 巻別冊 2 号 p304 2007
- 5) **陳蘭莊**・関黎明・浜口卓郎・**杉田 亘**・市川裕章 アポミクシス関連遺伝子 *ASG-1* が組換えイネで発現する。日本育種学会 第 111 回講演会 育種学研究 第 9 巻別冊 1 号 p254 2007
- 6) **Chen, L. Z.**, L.M. Guan. Aposporous apomixis may be controlled by single gene with different length of sequence in *Panicum maximum*. **Abstracts of 8<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology**, Adelaide, Australia, 20-25 August, 2006
- 7) **Chen, L. Z.**, L.M. Guan. Plant regeneration and functional analysis of *ASG-1* transgenic guineagrass and rice plants mediated with *Agrobacterium*. **Abstracts of Tropical Crop Biotechnology Conference 2006**, Far North Queensland city of Cairns, Australia, 16-19 August, 2006
- 8) **陳蘭莊**・井上公一・森山聡・**杉田 亘**・**川崎信二**・**寺尾寛之** HEGS 法を用いたアポミクシス遺伝子の精密マッピング：胚嚢分析と系統樹について。日本育種学会 第 110 回講演会 育種学研究 第 8 巻別冊 2 号 p324 2006

[図書] (計 3 件)

- 1) **L. Z. Chen**, L.M. Guan, **Chapter 7-Cell Differentiation Research Trends: The mechanism of asexual cell differentiation in cultures of protoplasts, interspecific hybrid embryos and asexual tissues**, pp171-182. in [Cell Differentiation Research Developments] Laura B. Ivanova (Editor). Nova Science Publishers, Inc. New York USA. 2007
- 2) **L. Z. Chen**, L.M. Guan and Jaime A Teixeira da Silva. Somatic embryogenesis, plant regeneration and clonal propagation in different tissue sources of different flowering plants - in monocots and dicots. pp299-304. in [Floriculture, ornamental and plant biotechnology: Advances and topical

issues] (1<sup>st</sup> Edition) Jaime A Teixeira da Silva (Ed). **Global Science Books, London UK. 2006**

- 3) **L. Z. Chen** and L. M. Guan. **Advances in cloning and expression of apomixis-specific genes in flowering plants. pp572-577.** in **Floriculture, ornamental and plant biotechnology: Advances and topical issues] (1<sup>st</sup> Edition)** Jaime A Teixeira da Silva (Ed). **Global Science Books, London UK. 2006**

[その他]

平成 18 年度 宮崎県文化賞 (学術部門)

受賞内容「アポミクシス研究を通じて作物の品種改良に寄与するとともに、宮崎県の学術レベルの向上に貢献した」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

陳 蘭庄 (CHEN LANZHUANG)  
南九州大学・園芸学部・教授  
研究者番号：4 0 2 8 4 8 2 2

### (2) 研究分担者

川崎 信二 (KAWASAKI SHINJI)  
独立行政法人農業生物資源研究所・生理機能研究グループ・上席研究員  
研究者番号：7 0 3 9 9 4 2 6

寺尾 寛行 (TERAO HIROYUKI)  
宮崎大学・農学部・准教授  
研究者番号：6 0 1 1 7 1 7 4

### (3) 連携研究者

松岡 秀道 (MATSUOKA HIDEMICHI)  
独立行政法人九州・沖縄農業研究センター・畜産飼料作物研究部・上席研究官

杉田 亘 (SUGITA TORU)  
宮崎県農業総合試験場・生物工学部・主任技師

### (4) 研究協力者

関 黎明 (GUAN LIMING)  
宮崎大学 非常勤講師