

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07617

研究課題名(和文)ミトコンドリア・核ゲノム関連遺伝子ネットワークの解明によるイチゴ雄性不稔の解析

研究課題名(英文) Analysis of male sterility associated gene networks between mitochondrial and nuclear genomes in the cultivated strawberry

研究代表者

永野 聡一郎 (Nagano, Soichiro)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等

研究者番号：50753836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：イチゴ野生種と栽培種との連続戻し交配により核置換系統を作出し、同株由来の正常株と雄蕊形態異常株でゲノムおよびトランスクリプトームの比較解析を行うことで稔性回復遺伝子の特定を行い、雄性不稔系統育種に活用できる識別マーカーを作成することを目的とした。正常株に特異的なゲノム配列を抽出し、網羅的遺伝子発現解析と家系構造による絞り込みを進めた結果、二つの染色体上の各一遺伝子を含む領域が正常系統で頻度高く保存されていることが明らかになった。これらの候補遺伝子の相同遺伝子はモデル植物のシロイヌナズナでも花器官で発現する遺伝子であり、この遺伝子配列を比較し稔性回復遺伝子を識別するマーカーを設計した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

雄性不稔系統の解析はアブラナやイネなど二倍体の作物で行われてきたが、倍数性が高い作物では解析が進んでいない。その点で高次倍数性の植物でも同祖染色体の識別が進んでいる栽培イチゴで雄性不稔原因遺伝子を特定することは先駆的な価値がある。さらに、生長や繁殖性で両親の形質を上回る雑種強勢を生かして他殖性作物やトウモロコシなどで行われているF1雑種育種がイチゴでも加速すると期待され、イチゴ産業における生産性の向上にも役立つ。また、他の高次倍数体作物でも雄性不稔系統の遺伝解析に向けた道が開かれる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated nucleus substituted lines with serial backcrossing between wild and cultivated strawberries, and we identified candidate genes that can be used as genetic marker for breeding male sterile lines through comparative genomic and transcriptomic analyses between the normal and the male sterility lines. After extracting genome sequences specific to the normal lines and narrowing them down with transcriptome analysis and the pedigree structure, we found two genomic regions that are containing a single gene on each of the chromosomes and frequently conserved in the normal lines. These homologous gene are also expressed in the floral organ in the model plant Arabidopsis, and we designed markers to compare these gene sequences and identify genes for restoration of sterility.

研究分野：植物ゲノム遺伝学、植物生理生態学

キーワード：種間交雑 細胞質雄性不稔 稔性回復遺伝子 雄蕊形態異常原因遺伝子 ゲノム解析 遺伝子発現解析 栽培イチゴ 異質倍数体

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。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) ランナー増殖による育苗と種子繁殖品種への移行に伴う問題点

栽培イチゴは遺伝的にヘテロ性が高く、一般的にランナーによる栄養繁殖で株分けされる。しかしこの方法は育苗に多くの手間と時間を必要とし、親株からウイルスや病気を引き継いでしまうリスクが高い。そこで、近年種子繁殖型の F<sub>1</sub> 品種(「よつぼし」など)が開発され、今後栽培イチゴでも戦略的な F<sub>1</sub> 育種が活発になると予想される。しかし、栽培イチゴの花は雌蕊を囲んで複数の雄蕊が位置する両全花であるため、自殖種子の混入を避けるための除雄に多くの労力がかかり、種子生産にかかるコストが高いという課題がある。もし、栽培イチゴで雄蕊が機能しない雄性不稔系統が作出できれば、自殖を予防し、効率的な育種が可能になるが、栽培イチゴでは雄性不稔を制御する方法の確立には至っていない。

#### (2) 栽培イチゴ核置換系統における雄蕊形態異常

植物の雄性不稔には核遺伝子だけが関与する核遺伝子型雄性不稔(GMS: Nuclear genic male sterility)と核遺伝子による細胞質中のミトコンドリア遺伝子の制御異常が生じて現れる細胞質雄性不稔(CMS: Cytoplasmic male sterility)がある。GMSの多くは劣性変異によることが多く、系統の作成・維持が困難であるのに対し、CMSは遠縁系統間の戻し交配による核置換系統で現れ、例えばニンジンでは雄蕊が花弁化するタイプの雄性不稔(ペタロイド)が実用化されている。研究分担者の野口博士は、栽培イチゴをその祖先種の一つである野生種ノウゴウイチゴ(*F. iinumae*)に掛け合わせた種間雑種に栽培イチゴを戻し交配し、BC<sub>2</sub>以降の世代においてペタロイドが現れることを発見した。この雄蕊形態異常系統を解析することで雄性不稔を制御する遺伝的なバックグラウンドが明らかになると期待される。

#### (3) 雄性不稔系統の遺伝育種法の確立にむけた進展

栽培イチゴは異質倍数体であるためゲノム・遺伝解析が困難であったが、我々のグループではSSRマーカーを用いた高密度連鎖地図(Isobe et al. DNA Research, 20:79-92, 2013)や、全ゲノム配列(Hirakawa et al. DNA Research, 21:169-181, 2014)を発表し、さらに高密度なSNP連鎖地図の構築(Nagano et al. BMC Genomics, 18:374, 2017)やハプロタイプを識別した高精度なゲノム配列の構築を進めてきた。これらのゲノム配列等の基盤情報を用いることで、栽培イチゴでも雄蕊形態異常に関連する変異の抽出や核遺伝子とミトコンドリア遺伝子の間の制御ネットワークを明らかにすることが可能になると考えられる。

### 2. 研究の目的

イチゴ野生種との交配による核置換を利用した雄性不稔系統を作出し、同株由来の兄弟個体間でゲノム配列の比較を行うことで雄性不稔の原因となるミトコンドリア・核ゲノム間のネットワークを解析し、雄性不稔原因遺伝子・稔性回復遺伝子の特定を行う。また、雄性不稔系統育種に活用できる稔性回復遺伝子を識別するマーカーを作成することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 核置換系統の作出と雄蕊形態異常株・正常株の形態評価

本研究では、すでに作成済みの種間雑種戻し交配系統(BC<sub>2</sub>)にさらに栽培イチゴの品種「さちのか」を交配して核置換を進めたBC<sub>3</sub>系統を作成した。この交配によって得られた種子を発芽させ、合計約100個体を促成栽培し、開花を待って雄蕊の発達度合いを5段階の形態異常指数で評価した。正常株については、裂開直後の葯から花粉を採取し、酢酸カーミン液で染色して形態を確認するとともに、花粉発芽培地に置いて稔性の有無を判断した。また、核置換が行われていることを確認するため、野生種*F. iinumae*、栽培品種、正常株5個体と形態異常株5個体について既存のイチゴの葉緑体のDNA配列多型マーカー(Honjo et al. HortScience 44(6): 1562-1565, 2009)を用いて配列解析を行った。

#### (2) 正常株・雄蕊形態異常株のゲノム変異と系統特異的配列の抽出

核置換系統のBC<sub>2</sub>では、正常(NS)株と雄蕊形態異常(AS)株が約1:9から3:7の割合で発生する。同じ母株由来の兄弟個体間では母系遺伝のミトコンドリアゲノムは共通であるため、NS株とAS株の差異は、核遺伝子によるミトコンドリアの制御不良によるものと予想される。まず核置換系統BC<sub>3</sub>100個体の中から、正常株5個体と雄蕊の形態異常の程度が最も顕著な5個体について、イルミナHiSeqXによりゲノムの40倍の重複率でリシーケンスを行った。得られたショートリードを用いて核ゲノムとミトコンドリアゲノム上の変異を抽出し、リスト化した。

当初計画では、リファレンスゲノム上の呼吸系や電子伝達反応系の機能遺伝子の構造と栽培イチゴゲノム配列上の位置を明らかにすることで関連ネットワークを構築する計画であった。しかし、核置換系統の各個体は野生種との種間交雑により個体固有の核ゲノムを持つ状態となっているため、栽培イチゴのリファレンスゲノム配列をそのまま使うことが困難であること、またリファレンスゲノム配列上に候補遺伝子が存在しない場合には稔性回復遺伝子の絞り込みやネットワークの構築は不可能であることから、リファレンス配列を用いずにNS株とAS株のゲノムを網羅的に直接比較し、NS株特異的なゲノム配列を抽出することとし、比較解析を進めた。NS株とAS株のショートリードについて、系統特異的なゲノム配列を抽出するためGenome

Tester4 で k-mer 解析を行なった。NS 株と AS 株の各 5 個体について個体特異的な 32-mer の検出を行い、個体ごとに 32-mer をカタログ化した。これに続いて、NS 株 5 個体と AS 株 5 個体の比較から各系統に特異的な配列を網羅的に抽出した。系統特異的な配列は Velvet を用いて NS 株と AS 株にそれぞれ特異的な contig 配列を *de novo* アッセンブリーした。

さらに、候補遺伝子を絞り込むため、家系構造を考慮した稔性回復遺伝子の探索を進めた。核置換系統では、核ゲノム中の栽培種の割合は戻し交配の世代を重ねるごとに高くなるが、一方、細胞質ゲノムは基本的に母性遺伝するため、世代を重ねても野生種の状態を維持している。同株由来の兄弟系統でも NS 株と AS 株が発生するのは、核ゲノム中に野生種由来の稔性回復遺伝子が維持されているか否かが原因であると仮定して、AS 株と比較した場合に NS 株特異的であり、かつ、野生種が保持する配列を稔性回復遺伝子の候補として、NS 株特異的な k-mer の絞り込みを行なった。抽出された部分配列を野生種のリファレンス配列に特異的にマッピングし、野生種ゲノム上の 1 kb ごとの頻度を計算した。

### (3) 雄蕊形態異常株と正常株の花器官形成時期のトランスクリプトームの比較解析

当初計画ではゲノム解析に対応した同一の NS 株と AS 株について花器官の遺伝子発現の網羅的な解析(トランスクリプトーム解析)を行う予定であった。しかし、予期せぬ病害の発生により、ゲノム解析に用いた NS 株と AS 株のうち大半が枯死し、花芽のサンプリングができない状況となった。このため、異なる核置換系統の F<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub>、BC<sub>3</sub> 系統を用いた遺伝子発現解析を行なった。出蕾後に若い蕾をサンプリングし、萼片を取り除き、花芽の totalRNA を抽出した。この totalRNA を用いて RNA-seq ライブラリーを作成し、イルミナ NovaSeq6000 を用いて各サンプルにつき 40 M リードを取得した。得られたリードは系統特異的な配列から作成された系統特異的 contig 配列にマッピングして発現量を比較した。

### (4) 稔性回復遺伝子の配列の特定と識別マーカーの開発

NS 株特異的な k-mer の絞り込みの結果稔性回復遺伝子の候補として抽出された遺伝子配列について、野生種と栽培種のリファレンス配列を対象に相同性検索し、配列のアラインメントを行なった。遺伝子配列を比較することにより、候補領域特異的なプライマーを設計し、稔性回復遺伝子の有無を識別する選抜マーカーを作成した。

## 4. 研究成果

### (1) 核置換系統の作出と雄蕊形態異常株・正常株の形態評価

野生種と栽培品種の種間雑種戻し交配系統 (BC<sub>2</sub>) に栽培品種「さちのか」を交配して BC<sub>3</sub> 系統を作出した。この BC<sub>3</sub> 系統の花の形態と雄性稔性を確認して得られた NS 株と AS 株各 5 個体について、既存の葉緑体の DNA 配列多型マーカーを用いて配列解析を行ったところ、これらの核置換 BC<sub>3</sub> 系統の NS 株と AS 株各 5 個体は、母株である野生種 (*F. iinumae*) と同じ DNA 配列多型パターンを示した (図 1)。このことから、作出した核置換 BC<sub>3</sub> 系統の NS 株と AS 株は想定通り野生種の細胞質を持つことが示唆された。

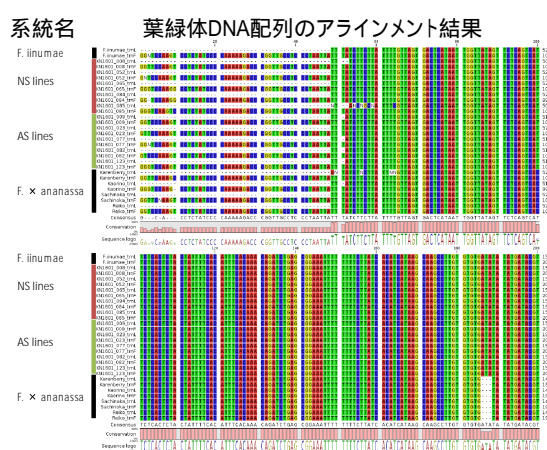


図 1 葉緑体 DNA 配列の多型解析による核置換の確認

### (2) 正常株・雄蕊形態異常株のゲノム変異と系統特異的配列の抽出

NS 株と AS 株について、リシーケンスによって取得したリードを栽培イチゴのリファレンスゲノム配列とデータベース上のミトコンドリア配列にマッピングし、ゲノム上の SNP と Indel を検出し、変異箇所のリスト化を行った。栽培イチゴをリファレンス配列として抽出した変異数は NS 系統と AS 系統の間で大きな差異は見られなかったが、野生種をリファレンスとして抽出した変異数は AS 系統のほうが NS 系統よりも 4 倍以上多かった (図 2)。また、ミトコンドリア配列をリファレンスとして抽出した変異は、多数の変異が両系統に共通していた。これらの結果は、稔性回復遺伝子が野生種由来であり NS 系統の方が AS 系統よりも野生種由来のゲノムを高い頻度で保持していること、細胞質ゲノムには両系統間の差異が小さいことを示唆している。

## 核ゲノム配列の変異

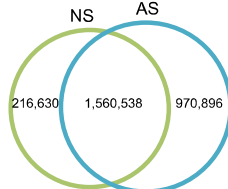
Aligned to FAN\_r2.2  
正常株に共通の変異数  
Common\_NS: 837,165

雄蕊形態異常株に共通の変異数  
Common\_AS: 857,196



Aligned to FII\_r1.1  
正常株に共通の変異数  
Common\_NS: 1,777,168

雄蕊形態異常株に共通の変異数  
Common\_AS: 2,531,432



## ミトコンドリアゲノム配列の変異

Aligned to GU363534.1  
正常株に共通の変異数  
Common\_NS: 588

雄蕊形態異常株に共通の変異数  
Common\_AS: 557



図2 核置換系統のゲノム変異の抽出

リファレンス配列によらず核置換系統のショートリードを直接比較するため、系統特異的な k-mer 解析を行なった結果、NS 株に共通して特異的な約 210 万配列と AS 株に共通して特異的な約 88 万配列が得られた。これらの系統特異的 32-mer から *de novo* アセンブリーした系統特異的な contig 配列は、NS 株特異的な contig が AS 株特異的な contig の約 3 倍の数に上り、配列長も長い傾向が見られた。この NS 株特異的な contig の中に稔性回復遺伝子の候補が含まれると考え、イチゴの栽培種および核置換系統の花芽のトランスクリプトーム配列を系統特異的な contig にマッピングし、稔性回復遺伝子候補の絞り込みを行なったところ、正常に雄蕊が発達する系統の花芽で発現している遺伝子配列候補を稔性回復遺伝子の候補として抽出することができた(図3)。しかし、この系統特異的な発現を示す contig 配列が、稔性回復遺伝子そのものなのか、それとも雄蕊の形態形成過程で発現する遺伝子なのかを発現の傾向からさらに絞り込むことは困難であると考えられた。

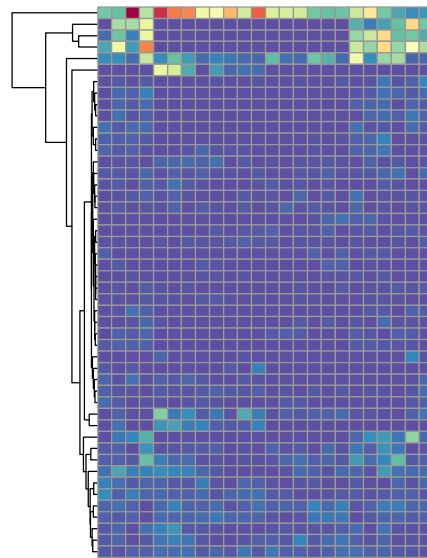


図3 花芽における系統特異的な contig 配列の発現パターン

### (3) 家系構造を考慮した稔性回復遺伝子の探索

系統特異的な k-mer 配列について、さらに野生種が保持する配列として絞り込みを進めた結果、野生種の二つの染色体上の配列について、頻度高く保存されている領域があることが明らかになった。野生種のゲノム上にこの配列をアラインメントしたところ、候補領域上の密なマッピング状況が確認できた。この二つの領域に含まれていたタンパク質をコードする遺伝子配列は各一遺伝子ずつであった。これらの遺伝子配列をモデル植物であるシロイヌナズナのデータベースで相同性検索したところ、どちらも花器官で発現する遺伝子であり、このうち最有力な候補遺伝子の転写産物はミトコンドリア局在性のタンパク質であることが明らかになった。

(4) 相同性検索の結果、この稔性回復遺伝子の相同配列は、栽培種においても完全に一致する配列と、部分的に一致する配列が存在しており、それぞれ栽培種の祖先種である二倍体の野生種に由来していることが示唆された。また、遺伝子配列を比較することにより、候補領域特異的なプライマーを設計し、稔性回復遺伝子の有無を識別する選抜マーカーを作成した。今後、核置換系統でこのマーカーを用いた多型解析や栽培種ゲノム中のコピー数変異の解析を行い、形態との関係を明らかにすることで選抜マーカーとしての有効性が確認できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永野聡一郎・野口裕司・平川英樹・磯部祥子
2. 発表標題 家系情報を考慮したイチゴ雄蕊形態異常原因遺伝子の探索
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永野聡一郎・野口裕司・平川英樹・磯部祥子
2. 発表標題 栽培イチゴ雄蕊形態異常系統に特異的なゲノム配列の抽出
3. 学会等名 園芸学会平成31年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永野聡一郎・野口裕司・平川英樹・磯部祥子
2. 発表標題 雄蕊形態異常を伴う栽培イチゴ核置換系統間のゲノム変異の検出
3. 学会等名 園芸学会平成30年度春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野口裕司・片岡 園・永野聡一郎
2. 発表標題 イチゴ雄蕊形態異常に対する稔性(形態)回復遺伝子の確認
3. 学会等名 園芸学会平成30年度春季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	野口 裕司  (Noguchi Yuji)  (50414678)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花 き研究部門・ユニット長   (82111)	
連携 研究者	磯部 祥子  (Isobe Sachiko)  (20343973)	公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・室長   (82508)	
連携 研究者	平川 英樹  (Hirakawa Hideki)  (80372746)	公益財団法人かずさDNA研究所・ゲノム情報解析施設・施 設長   (82508)	