

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05635

研究課題名(和文)種なし性カンキツ育種効率化に向けたウンシュウミカン由来雄性不稔遺伝子単離の試み

研究課題名(英文) Attempt at identifying the male-sterile gene derived from Satsuma for efficient seedless citrus breeding.

研究代表者

後藤 新悟 (Goto, Shingo)

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・上級研究員

研究者番号：60433215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題ではカンキツの種なしの主な要因である雄性不稔性(花粉が形成されない性質)の遺伝子同定を試みた。雄性不稔領域(MS-P1)に位置し、雄性不稔性と非常に強く連鎖するDNAマーカーを新たに開発した。これらのマーカーをもちいて、MS-P1領域を解析したところ、カンキツ雄性不稔性においては、ミトコンドリア側の雄性不稔性原因遺伝子とそれに対する核側の稔性回復遺伝子のモデルの存在が示唆された。3つの交配集団を用いた解析によって、候補遺伝子を68つにまで絞り込むことができた。さらに次世代シーケンサー解析によって、最有力候補を1つ発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンキツにおいて、食べやすさを求める消費者ニーズのため、果実に種がない性質は新品種育成において重要である。種がない性質の主な要因は雄性不稔性であるため、雄性不稔性はカンキツ品種育成で利用されてきた。しかし、雄性不稔性の原因となっている遺伝子やどのようなメカニズムで雄性不稔性となるのかは不明である。本研究課題により、雄性不稔性に関与する遺伝子候補が発見され、どのように雄性不稔性になるのかのメカニズムの一端が解明された。この研究成果をカンキツ育種事業に適用し、種なし性質をもつ新品種を効率よく育成することを進めている。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to identify a responsible gene for male sterility, which is the leading cause of seedlessness. The DNA markers which are located at the region of male sterility and are tightly linked to male sterility were newly developed. The result of analyzing at MS-P1 region with the developed DNA markers suggests that the existence of a model of a causative gene in the mitochondria genome and a fertility-restoration gene in the nuclear genome. The 68 candidate genes were narrowed by analyzing with the DNA markers and evaluating male sterility in three crossed populations. Finally, we identified the leading candidate gene by analyzing with the next generation sequencer.

研究分野：植物生理学

キーワード：カンキツ 雄性不稔性 DNAマーカー ゲノム 育種

1. 研究開始当初の背景

カンキツにおいて種なし性(無核性と少核性)は食べやすさを好む消費者から求められる重要な形質である。ウンシュウミカンでは雄性不稔性によって自家受粉が行われず単為結果し、他の品種からの花粉授粉があっても強い雌性不稔性のため安定して種なしになる。これまでにウンシュウミカン後代において‘清見’をはじめとする種なし性の品種が選抜されており、これら品種の種なし性の主な要因がウンシュウミカン由来の雄性不稔性であると考えられている。

過去の研究ではウンシュウミカン後代において雄性不稔性はキシウミカン由来の細胞質と核遺伝子との相互作用によって機能発現することが報告されているが、原因遺伝子の単離には至っておらず、雄性不稔性の機能発現メカニズムも明らかとなっていない。

このような状況下で、我々は、まずウンシュウミカン後代における雄性不稔性を引き起こす主な要因が花粉数の減少であることを示した(Goto *et al.* Act. Hort. 2016)(これ以降、雄性不稔性とは花粉数が極めて少なくなる形質を指す)。さらに、ウンシュウミカン後代の3つの交配集団を用いてキシウミカン由来細胞質と核遺伝子の相互作用によって雄性不稔性が発現することを支持する結果を得た(Goto *et al.* PLoS ONE 2016)。次に、キシウミカン由来細胞質と強い雄性不稔性を持つ興津46号を交配親にした興津46号×興津56号の交配集団を用いた雄性不稔性のQTL解析によって雄性不稔性に関わるゲノム領域(*MS-PI*ゲノム領域)を見出し、5.1 cMにまで絞り込むことができた(Goto *et al.* PLoS ONE 2018)。さらには、カンキツ育成品種・系統の家系解析から*MS-PI*ゲノム領域はクネンボ由来の染色体上に座乗していることが明らかとなった(Goto *et al.* PLoS ONE 2018)。この領域には雄性不稔性の原因遺伝子(*MS-PI*原因遺伝子)が存在していることが示唆される。

2. 研究の目的

我々が目指す最終的な目的は雄性不稔性原因遺伝子を単離することにある。これまでの解析において*MS-PI*ゲノム領域近傍にシロイヌナズナ「*AMS1*」と相同性の高い遺伝子(*CitAMS1*)が見つかった。この*AMS1*はシロイヌナズナにおいて花粉成熟を制御する遺伝子として同定され、変異が入り正常に機能しなくなった変異体では花粉が形成されないことが報告されている。我々の研究においても*MS-PI*ゲノム領域を持つことによって花粉数が極めて少なくなることから、*CitAMS1*が*MS-PI*原因遺伝子である可能性が見出された。しかし、*MS-PI*ゲノム領域は5.1 cMあり、ここには数百個の遺伝子が存在していることが予想されるため慎重に研究を進める必要があった。そこで、本研究において下記の2つを目的とするアプローチで同時に研究を進めた。

アプローチ1「*CitAMS1*が原因遺伝子の最有力候補であると示すことを目的とした」

アプローチ2「*MS-PI*領域におけるDNAマーカーの高密度化により原因遺伝子候補の数を絞ることを目的とした」

3. 研究の方法

(1) アプローチ1「*CitAMS1*が原因遺伝子の最有力候補であると示すことを目的とした」

Mikan Genome DB (<https://mikan.dna.affrc.go.jp/>) に搭載されているTASUKEを用いて、*CitAMS1*周辺領域の多型を探索し、DNAマーカーを作製した。作成されたDNAマーカー

を用いて、興津 46 号×興津 56 号の交配集団をジェノタイピングし、雄性不稔性の形質データとの相関解析によって、*CitAMS1* が原因遺伝子の最有力候補であるかどうかの可能性を判定した。

(2) アプローチ 2「*MS-PI* 領域における DNA マーカーの高密度化により原因遺伝子候補の数を絞ることを目的とした」

Mikan Genome DB の情報をもとに、*MS-PI* 領域周辺の SSR 配列を探索し、高密度に SSR マーカーを作製した。興津 46 号×興津 56 号の交配集団をジェノタイピングし、連鎖地図を再構築した。また、QTL 解析を行い *MS-PI* ゲノム領域を再検出した。

3 つの交配集団(興津 46 号×カラ、はれひめ×興津 63 号、スイートスプリング×興津 56 号)において、作製した SSR マーカーによってジェノタイピングし、ハプロタイプを決定した。雄性不稔性の形質データとハプロタイプとの相関解析をすることで、*MS-PI* ゲノム領域の効果を 3 つの集団で検証した。また、3 つの交配集団の中から *TSRF161* と *GSR5112* 間で組換えを起こしている実生を選抜し、組換え位置を同定した。同定された組換え位置と雄性不稔性形質データとを合わせて解析することで、*MS-PI* 原因遺伝子のファインマッピングをおこなった。ゲノムデータベースの情報をもとに、*MS-PI* ゲノム領域に存在する遺伝子を推定し、雄性不稔性遺伝子候補を絞り込んだ。雄性不稔性候補遺伝子をさらに絞り込むため、RNAseq 解析を適用し、雄性不稔性の選抜系統である KO14 と雄性稔性の育成品種である‘不知火’の網羅的遺伝子発現プロファイルを比較した。さらに、KO14 と‘不知火’の *MS-PI* ゲノム領域を次世代シーケンサーでリシーケンスし、多型の探索を行った。

4. 研究成果

(1) アプローチ 1

Mikan Genome DB 内の TASUKE をもちいて *CitAMS1* 近傍の多型を探索したところ、*CitAMS1* の 5'側領域に Indel を同定した。この Indel を踏むようにプライマーセット (*CitAMS1* Indel) を設計し、増幅の有無でジェノタイピングできる DNA マーカーを作製した。興津 46 号×興津 56 号の交配集団を *CitAMS1* Indel でジェノタイピングし、1 葯あたりの花粉数との相関解析をおこなったところ、相関は確認されなかった(図 1)。研究計画当初、クレメンティンゲノムデータベースをもち

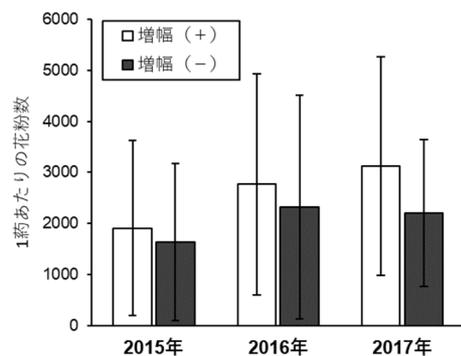


図 1 興津 46 号×興津 56 号における *CitAMS1* 近傍の Indel マーカーの遺伝子型と 1 葯あたりの花粉数

いて *MS-PI* ゲノム領域近傍の雄性不稔性関連遺伝子の探索し、*CitAMS1* を見出したのだが、実際には *MS-PI* 領域近傍には位置していないことが示された。この結果によって、*CitAMS1* が原因遺伝子であることが否定された。

(2) アプローチ 2

Mikan Genome DB の情報をもとにし、*MS-PI* ゲノム領域近傍に新たな 14 つの SSR マーカーを作製した。連鎖地図を再構築し、*MS-PI* ゲノム領域を再検出した(図 2)。その結果、*MS-PI* 直下に 00918-1、00918-2、00918-3 が位置していた。これら 3 つのマーカーをもちいて、*MS-PI* ゲノム領域のハプロタイプを決定し、表 1 のように整理した。3 つの交配集団(興津 46 号×カラ、はれひめ×興津 63 号、スイートスプリング×興津 56 号)におけるハプロタイプと 1 葯あたりの花粉数の相関を解析した。その結果、ハプロタイプの組み合わせによって花粉数が決定される

ことが明らかとなった(図3)。

3つの交配集団(興津46号×カラ、はれひめ×興津63号、スイートスプリング×興津56号)を用いたファインマッピングの結果、*MS-P1* ゲノム領域を第8染色体上部の約920kbの範囲にまで絞りこみ、この領域には68個の遺伝子が存在していることが予測された(図4Aの五角形矢印)。RNAseqによって、KO14と‘不知火’との遺伝子発現プロファイルの比較を行ったところ、KO14では68個の候補遺伝子の中の1つであるミトコンドリア移行タンパク質遺伝子(*MS-P1* 候補遺伝子#1)の発現が低下していた(図4B)。さらには、KO14において、*MS-P1* 候補遺伝子#1のプロモーター領域には4つの欠損が見つかった(図4Bの*印)。

今回の研究によって、キシウミカン由来細胞質をもつ個体では*MS-P1* ゲノム領域のハプロタイプの組み合わせによって雄性不稔性が決まることが示された(表1、図3)。雄性不稔性の個体

の多くは*MS-P1* Aハプロタイプを保有することから、*MS-P1* Aハプロタイプは雄性不稔性に大きく寄与していることが示唆される(図3A、B、C)。一方、*MS-P1* Aハプロタイプを保有していても、*MS-P1* Fと*MS-P1* Gハプロタイプを同時に持つと雄性稔性になるため、*MS-P1* Fと*MS-P1* Gハプロタイプは稔性回復に関与していることが示唆される(図3B、C)。アブラナ科植物を中心とした他の作物において、細胞質が関与する雄性不稔性(CMS)の機能発現はミトコン

ドリアゲノム側のCMS原因遺伝子とそれに対する核側の稔性回復遺伝子で説明される(Chen *et al.* Annu Rev Plant Biol. 2014)。この知見と今回得られた研究成果を合わせて考察すると、カンキツにおいても、キシウミカン由来細胞質のミトコンドリアゲノムにはCMS原因遺伝子が、核ゲノムの*MS-P1* ゲノム領域には稔性回復遺伝子が存在していることが示唆された。そして、カンキツの雄性不稔性は*MS-P1* ゲノム領域の稔性回復遺伝子が機能欠損したことによって機能発

現する可能性がある。この考察と図4の結果を合わせてさらに考察すると*MS-P1* 候補遺伝子#1が稔性回復遺伝子であり、KO14においてはプロモーター領域の欠損によって、遺伝子発現が低下し、雄性不稔性になっている可能性を示す。

今回の研究課題によって、*MS-P1* ゲノム領域のDNAマーカーをもちいて、ハプロタイプの組

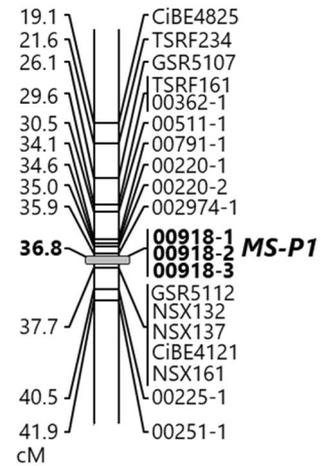


図2 再構築した興津46号×興津56号における連鎖地図と再検出したMS-P1ゲノム領域。第8連鎖群の一部分のみを示している。

表1 MS-P1ゲノム領域のハプロタイプと雄性不稔性への関与

MS-P1領域のハプロタイプ	雄性不稔性への寄与	由来する主な祖先品種
MS-P1 A	極大	クネンボ, ハッサク, マーコット, 日向夏, キング
MS-P1 B	大	スイートオレンジ
MS-P1 C	中	スイートオレンジ
MS-P1 D	中	キング, マーコット
MS-P1 E	小	キシウ
MS-P1 F	稔性回復	ボンカン, 地中海マンダリン, ダンシータンジェリン
MS-P1 G	稔性回復	ボンカン, 地中海マンダリン

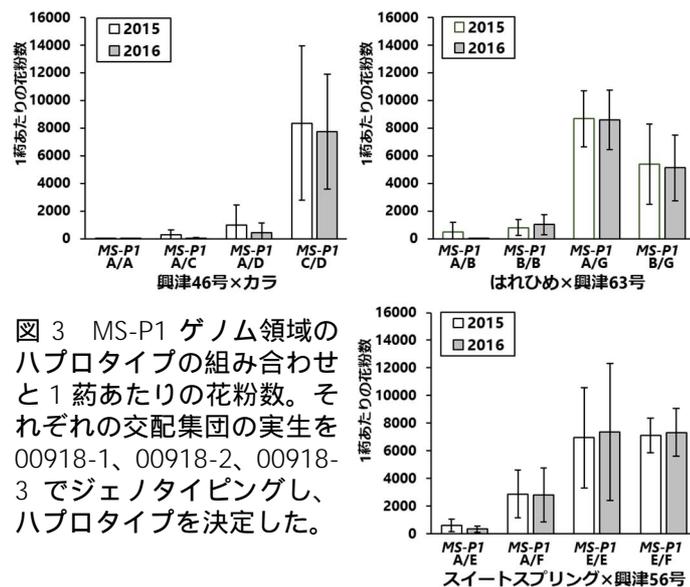


図3 MS-P1ゲノム領域のハプロタイプの組み合わせと1葯あたりの花粉数。それぞれの交配集団の実生を00918-1、00918-2、00918-3でジェノタイプピングし、ハプロタイプを決定した。

現する可能性がある。この考察と図4の結果を合わせてさらに考察すると*MS-P1* 候補遺伝子#1が稔性回復遺伝子であり、KO14においてはプロモーター領域の欠損によって、遺伝子発現が低下し、雄性不稔性になっている可能性を示す。

今回の研究課題によって、*MS-P1* ゲノム領域のDNAマーカーをもちいて、ハプロタイプの組

み合わせに注目することで雄性不稔性の実生を選抜できることが示された。この研究成果は、種なし性カンキツ育種の効率化にとっても有効であることを示す。また、カンキツ雄性不稔性の分子メカニズムがミトコンドリア側の CMS 原因遺伝子と、核側の稔性回復遺伝子で説明できることを示した。この研究成果はカンキツの雄性不稔性を理解するうえで学術的に重要な知見となる。

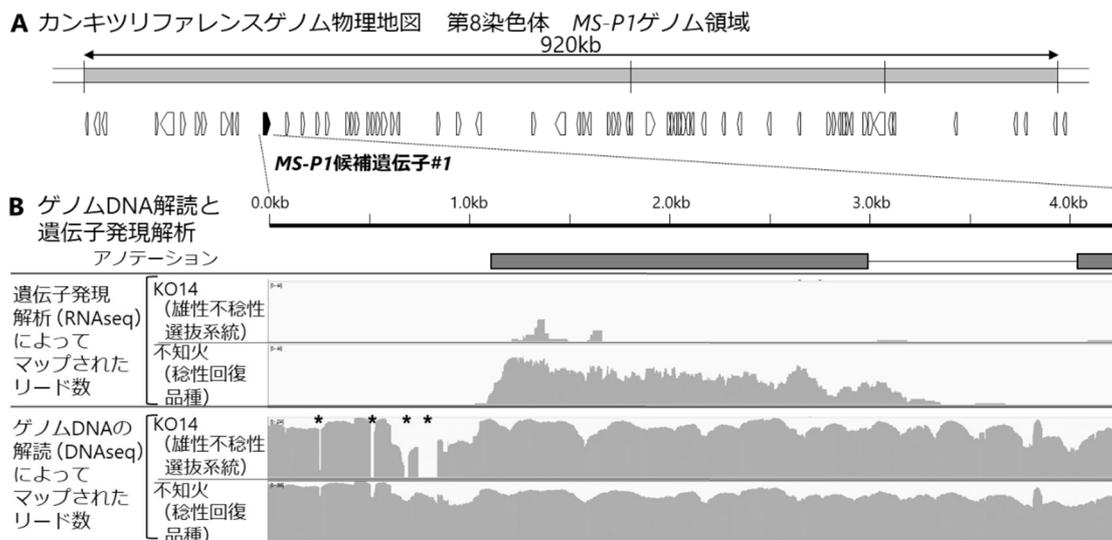


図4 MS-P1 候補遺伝子#1。A 稔性回復遺伝子が位置する物理地図上での位置。五角形矢印は予測される遺伝子を示し、黒色五角形矢印は MS-P1 候補遺伝子#1 を示す。B MS-P1 ゲノム領域の次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析とゲノム DNA 解読。リファレンスゲノムにマップされたリード数を示している。「*」は欠損部位を示す。

参考文献

- Goto S, Yoshioka T, Kita M, Ohta S, Shimizu T. Segregation of male sterility in populations derived from progenies of Satsuma mandarin. *Acta Horticulturae*, 1135, 103-108 (2016)
- Goto S, Yoshioka T, Ohta S, Kita M, Hamada H, Shimizu T. Segregation and Heritability of Male Sterility in Populations Derived from Progeny of Satsuma Mandarin. *PLoS ONE*, 11, e0162408 (2016)
- Goto S, Yoshioka T, Ohta S, Kita M, Hamada H, Shimizu T. QTL mapping of male sterility and transmission pattern in progeny of Satsuma mandarin. *PLoS ONE*, 13, e0200844 (2018)
- Chen L, Liu Y. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annual review of plant biology*, 65, 579-606 (2014)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shingo Goto, Terutaka Yoshioka, Satoshi Ohta, Masayuki Kita, Hiroko Hamada, Tokurou Shimizu	4. 巻 13
2. 論文標題 QTL mapping of male sterility and transmission pattern in progeny of Satsuma mandarin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0200844
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0200844	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tokurou Shimizu, Akira Kitajima, Keisuke Nonaka, Terutaka Yoshioka, Satoshi Ohta, Shingo Goto, Eri Kaminuma, Yasukazu Nakamura	4. 巻 1230
2. 論文標題 A model for the domestication and diversification processes of modern citrus cultivars in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 7-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17660/ActaHortic.2019.1230.2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 後藤新悟、太田智、濱田宏子、藤井浩、喜多正幸、吉岡照高、野中圭介、清水徳朗、島田武彦
2. 発表標題 カンキツ雄性不稔性選抜マーカーの開発と現場実装へ試み
3. 学会等名 第27回育種学会中部地区談話会講演要旨集（沼津高専）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤新悟、吉岡照高、太田智、喜多正幸、濱田宏子、清水徳朗
2. 発表標題 ウンシュウミカン後代における雄性不稔性連鎖マーカーの適応範囲の検証
3. 学会等名 園芸学会平成30年度秋季大会 2018年9月22日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤新悟, 太田智, 野中圭介, 濱田宏子, 吉岡照高, 清水徳朗
2. 発表標題 ウンシュウミカン後代における雄性不稔性連鎖マーカーの育種への適応の試み
3. 学会等名 H30年度果樹バイテク研究会 2018年10月3日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤新悟, 太田智, 野中圭介, 濱田宏子, 吉岡照高, 清水徳朗
2. 発表標題 温州ミカン後代の雄性不稔性はMS-P1領域のハプロタイプブロックの組み合わせによって決定される
3. 学会等名 日本育種第135回講演会 2019年3月16日
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

種なしカンキツの育種を加速する技術を開発 http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/press/laboratory/niffts/129018.html?utm_source=press&utm_medium=rss

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------