

令和 4 年 9 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19197

研究課題名(和文)雌雄性制御技術を用いたアスパラガス純系系統の作出

研究課題名(英文)Production of homogenous population by controlling the sex in garden asparagus

研究代表者

菅野 明(Kanno, Akira)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：10260449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではウイルスベクターによる遺伝子発現抑制技術を用いて性決定遺伝子の発現を抑制することにより、雌雄異株のアスパラガスを自殖させて、純系系統を作成する技術を開発することを目指した。ウイルスベクター作成のため、ウイルス感染の指標となるPDS遺伝子とアスパラガスの雌蕊発達抑制に関わるSOFF遺伝子の単離を行った。また純系後代解析のため、雌株、雄株、超雄株を区別できるマーカーの有効性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスパラガスの純系系統作成は品種の形質を均一化するために重要な技術である。本研究ではウイルスベクターによる遺伝子発現の抑制は遂行できなかったが、ベクター構築に必要な遺伝子の単離には成功したことで、今後の研究に寄与できる成果が得られた。また雌株、雄株、超雄株を区別できるDNAマーカーの有効性を示し、純系後代の安定した早期診断を可能としたことで、アスパラガス育種年限の短縮に貢献できる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：For production of homogenous population in asparagus, we aimed to develop the technique to get self-crossed offspring by reducing the sex determination gene expression using VIGS (virus induced gene silencing). In this study, we isolated PDS gene for indication of virus infection and SOFF gene for modification of sex organ development. In addition, we tested the applicability of sex marker to detect female, male and super male individuals for analyzing the self-crossing offspring.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：アスパラガス 性決定遺伝子 純系系統 PDS遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

アスパラガスは性染色体によって雌雄が決定される雌雄異株の農作物である(雄 XY 型, 雌 XX 型)。ダイズやイネなどの自殖性作物の場合は自殖を繰り返すことで純系系統を作り, 形質を均一化することが容易であるが, アスパラガスは種子繁殖する際に雄株と雌株の交配によって種子を得るため, 後代は常にヘテロとなり, 品種改良のために農業的有用形質を固定する際の障害となっている。アスパラガスは雌雄異株であり, 自然の状態では純系を得られないため, これまでの品種の多くは優良な雄株・雌株を選抜した後にクローン増殖により個体数を増やし, これらを交配させて F1 種子生産を行ってきた。近年, 優良個体を純系にするために, 薬培養によって得られる半数体を倍加して純系を育成する方法が用いられているが, この半数体倍加技術は非常に難しく, 多くの品種育成に応用するには現実的ではない。また親株保存は植物体として維持しなければならず, 優良な親株系統を多数保有する種苗会社等では病虫害防除等のため株の維持管理に多大なコストと労力が必要となっている。

近年, 申請者らの研究グループにより, アスパラガスのゲノム配列の解析が進み, 性決定遺伝子として雄蕊促進遺伝子(AoMSE1/AoMYB35)と雌蕊抑制遺伝子(AoSOFF)が発見された(Murase et al. 2017, Harkess et al. 2017)。雄株において Y 染色体に座乗するこれらの遺伝子が機能すると, 両性花として発達していた花芽が発達途中で雌蕊の発達が抑制されてしまい, 雄花へと分化する。また, 雌ではこれらの遺伝子がないため, 雄蕊の発達が促進されず雌蕊のみが発達して雌花に分化する。本研究開始当初は, これらの遺伝子の詳細な発現パターンや機能解析は行われておらず, これらの遺伝子の機能に関する報告はなかった。

一方, アスパラガスではアグロバクテリウム法による形質転換の報告があるが, 効率が極めて低く遺伝子導入が困難な植物の一つである。近年, キュウリモザイクウイルス(CMV)などの植物ウイルスベクターを利用した遺伝子発現抑制系が複数の植物で報告されており, 遺伝子導入が困難な植物においても一過的な遺伝子発現の抑制が可能となっている。CMV はアスパラガスにも感染することが知られており, このウイルスをベクターとして利用することにより, ウイルスを利用した RNA サイレncing 法(VIGS 法)に利用できると考えられた。

## 2. 研究の目的

雌雄異株のアスパラガスは種子繁殖する際に雄株と雌株の交配によって種子を得るため, 後代は常にヘテロとなり, 品種改良のために農業的有用形質を固定する際の障害となっている。アスパラガスの純系系統を作出するためには薬培養による半数体倍加も試みられているが, アスパラガスでは技術的に困難で, 多くの品種に応用することは難しい。近年, 申請者らの研究グループにより, アスパラガスの性決定遺伝子座の解明が進み, 雄の性染色体に座乗する雄蕊促進遺伝子(AoMSE1/AoMYB35)と雌蕊抑制遺伝子(AoSOFF)が雌雄性を決定する遺伝子であることが明らかになった。本研究においては, 植物ウイルスベクターを用いて AoSOFF 遺伝子の発現を一過的に抑制することにより, アスパラガス雄株上に両性花を形成させ, 雄株の自殖後代を得ることにより, アスパラガスの純系系統を作出する技術を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) アスパラガス接種用ウイルスベクターの作成～アスパラガス PDS 遺伝子の単離

食用アスパラガスのゲノム配列は決定されており (Nature Communications 8:1279, 2017), ゲノム配列情報はデータベース上に公開されている. この配列情報からアスパラガス PDS 遺伝子 (AspPDS) の配列を抽出した. 食用アスパラガス野生株 'メリーワシントン 500W' の花芽から全 RNA を抽出し, Oligo dT プライマーを用いて cDNA プールを合成した. この cDNA を鋳型とし, AspPDS 遺伝子特異的な配列から作成したプライマーを用いて RT-PCR を行った. PCR によって増幅された DNA 断片を大腸菌ベクター-pGEM-T Easy にクローニングし, 塩基配列を決定した.

#### (2) アスパラガスにおける雌蕊形成抑制遺伝子 (SOFF 遺伝子) の単離と機能解析

(1) の AspPDS 遺伝子の単離と同様の手法を用い, 食用アスパラガス野生株 'メリーワシントン 500W' の SOFF 遺伝子 cDNA 断片を大腸菌ベクター-pGEM-T Easy にクローニングし, 塩基配列を決定した.

次に SOFF 遺伝子の発現を解析するため, 食用アスパラガスの花芽から全 RNA を抽出し, Oligo dT プライマーを用いて cDNA プールを合成した. この cDNA を鋳型とし, SOFF 遺伝子特異的な配列から作成したプライマーを用いて RT-PCR を行った.

一方, アスパラガス SOFF 遺伝子の機能解析では, シロイヌナズナを用いた形質転換実験を行った. 食用アスパラガスの雄株から単離した SOFF 遺伝子 cDNA 断片を発現ベクターの 35S プロモーターの下流に組み込み, アグロバクテリウムに導入したのちにフローラルディップ法によりシロイヌナズナに形質転換した. 抗生物質による選抜ののち, 得られた形質転換体については全 DNA を抽出し, SOFF 遺伝子特異的なプライマーを用いて導入された遺伝子の確認を行った.

#### (3) アスパラガス自殖後代作出～既存 DNA マーカーの検証と新規 DNA マーカーの開発

アスパラガスは播種から開花まで 1～2 年を要することから, アスパラガスにおいて自殖後代の雌雄性や遺伝子型を解析するには DNA マーカーの利用が有効である. 食用アスパラガスでは 2 つの性染色体 (X 及び Y) を区別でき, 雄株と超雄株を選抜できる RM17 マーカーが本研究課題遂行中に発表されたため (Acta Horticulturae 1223:51-58, 2018), 本研究で利用可能であることを調べた. 食用アスパラガス雌雄混合 3 品種 (メリーワシントン 500W, UC157F 1, PC2000) の雌雄株と全雄品種 (ガインリム) の雄株の擬葉から全 DNA を抽出し, RM17 マーカーを用いた PCR 解析により, X および Y 染色体特異的 DNA 産物の増幅可否について解析した. また他の研究課題において RM17 マーカー近傍に新規 DNA マーカー (SSM01) を開発していたため, この DNA マーカーの有効性も同様に解析した.

### 4. 研究成果

#### (1) アスパラガス PDS 遺伝子の単離について

AspPDS 配列情報を元に作成したプライマーと、アスパラガスの若茎の先端と花芽それぞれから作成した cDNA プールを用いて PCR を行った結果、若茎から作成した cDNA プールを鋳型に用いた際に期待される大きさの増幅産物が得られた。この PCR 産物をプラスミドベクターにクローニングし、12 クローンについて塩基配列を決定した。この塩基配列はアスパラガスや他の植物から単離されている PDS 遺伝子と高い相同性を有していた。データベースで公開されているアスパラガスゲノム配列と比較すると C 末端領域で 1 アミノ酸異なっていたが、これは品種間差異の可能性が高いと考えられた (図 1)。

また当初の計画では PDS 遺伝子を CMV ウイルスベクターに導入することを予定していたが、構築を完了することはできなかった。

## (2) アスパラガスにおける雌蕊形成抑制遺伝子 (SOFF 遺伝子) の単離と機能解析

公開されている食用アスパラガスのゲノム配列情報 (Nature Communications 8:1279, 2017) を用い、SOFF 遺伝子配列を抽出した。この遺伝子配列を用いてアスパラガスゲノム内の相同配列を解析したところ、よく似た配列が 2 箇所見つかった。そこで SOFF 遺伝子特異的な領域を特定し、その領域にプライマーを作成することで、PCR による SOFF 遺伝子の増幅を試みた。食用アスパラガス野生株 (品種 MW500W) 2 系統からゲノム DNA を抽出し、PCR によって SOFF 遺伝子の増幅を試みた。その結果、野生株 2 系統から SOFF 遺伝子を単離することに成功し、それらの一次構造を決定した。SOFF 遺伝子とそれに酷似している遺伝子配列について、雌雄性との連鎖を確認することにより、性決定遺伝子 SOFF の cDNA 配列を特定した。

次に SOFF 遺伝子の発現を解析するため、食用アスパラガスの花芽から RNA を抽出し、cDNA プールを作成した。この cDNA を鋳型とし、SOFF 遺伝子特異的な配列から作成したプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、発現は弱いものの雄花特異的に発現していることを確認した。SOFF 遺伝子の発現については本研究課題期間中に海外の研究グループにより、この遺伝子は発現が非常に弱いことが報告されており、この結果を支持する発現パターンだった (Plant Cell 32:1790-1796, 2020)。

一方、アスパラガス SOFF 遺伝子の機能解析では、シロイヌナズナを用いた形質転換実験を行った。食用アスパラガスの雄株から単離した SOFF 遺伝子を過剰発現するよう構築された発現ベクターをアグロバクテリウムに導入し、シロイヌナズナに形質転換した。抗生物質による選抜の結果、形質転換体を複数個体得ることに成功した。これらの個体については、PCR により目的の遺伝子が導入されていることを確認した。形質転換体を栽培し、花の形態や生育状況を野生型シロイヌナズナと比較したが、顕著な違いは見られなかった。

## (3) アスパラガス自殖後代作出～DNA マーカーの検証と新規開発

間性株自殖後代は雌株 (XX), 雄株 (XY), 超雄株 (YY) が 1 : 2 : 1 の割合で生じることが予想される。まず RM17 マーカーの有効性を調べるため、当研究室保有のガインリム間性株自殖後

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

AspPDS_database      MSIIIGSVSAVSAASSIQRQFSGSNGFQGTFRSECMGFGLQAPVSYLRIKPSKVGPL 60
AspPDS_0-5.pep      MSIIIGSVSAVSAASSIQRQFSGSNGFQGTFRSECMGFGLQAPVSYLRIKPSKVGPL 60
*****
AspPDS_database      QVVCCKDYRPELESANVFLAAQMSAFRSFSPRPEKGLKIVIAGAGLAGLCTAKYLADAG 120
AspPDS_0-5.pep      QVVCCKDYRPELESANVFLAAQMSAFRSFSPRPEKGLKIVIAGAGLAGLCTAKYLADAG 120
*****
AspPDS_database      HKPILLEARDVLLGGIAANKDKDGDWYETGLHIFFGAYPMQNLFGELGIDRLQWKEHS 180
AspPDS_0-5.pep      HKPILLEARDVLLGGIAANKDKDGDWYETGLHIFFGAYPMQNLFGELGIDRLQWKEHS 180
*****
AspPDS_database      HIFAMPKPKGFSRFDPEVLPAFLNGIWIILRNNEHLTPKVRFAIGLLPAMVGGQAY 240
AspPDS_0-5.pep      HIFAMPKPKGFSRFDPEVLPAFLNGIWIILRNNEHLTPKVRFAIGLLPAMVGGQAY 240
*****
AspPDS_database      VEADGLTVKEMKRGVDRVNDVFIAMSKALNFINPELDMOCLIALNRFLOEKHG 300
AspPDS_0-5.pep      VEADGLTVKEMKRGVDRVNDVFIAMSKALNFINPELDMOCLIALNRFLOEKHG 300
*****
AspPDS_database      SKMAFLDGSPTERLCHPIVDHIQSLGGVQLNSRLQKIELNSDGTVKHFVLDGNIITGD 360
AspPDS_0-5.pep      SKMAFLDGSPTERLCHPIVDHIQSLGGVQLNSRLQKIELNSDGTVKHFVLDGNIITGD 360
*****
AspPDS_database      AYYVAAPVDILKLLPOENRDISYFKLEKLVGVVPIVNHVDFDRKLNKYDHLFRSP 420
AspPDS_0-5.pep      AYYVAAPVDILKLLPOENRDISYFKLEKLVGVVPIVNHVDFDRKLNKYDHLFRSP 420
*****
AspPDS_database      LLSVYADMSVTCKEYDPRNSHLELVFAPADENISRSDDSIIEATKELAKLFPDEIAAD 480
AspPDS_0-5.pep      LLSVYADMSVTCKEYDPRNSHLELVFAPADENISRSDDSIIEATKELAKLFPDEIAAD 480
*****
AspPDS_database      QSKAKILKYHVWKTFRSVYKTVPCCEPCPLQRSPIEGFYLAGDYTKOKYLASMEGAVLS 540
AspPDS_0-5.pep      QSKAKILKYHVWKTFRSVYKTVPCCEPCPLQRSPIEGFYLAGDYTKOKYLASMEGAVLS 540
*****
AspPDS_database      GKLCQAQIVQDNLAAARSNHSPQAEHIFV 570
AspPDS_0-5.pep      GKLCQAQIVQDNLAAARSNHSPQAEHIFV 570
*****

```

図 1. アスパラガスPDS遺伝子のアミノ酸配列。上はデータベースに登録されている遺伝子の配列、下は本研究でクローニングされた遺伝子の配列。矢印はアミノ酸配列が異なる位置を示す。

代を用いて解析した結果、3タイプのガインリム間性株自殖後代(雌株、雄株、超雄株)が区別できることを確認した。

次に、食用アスパラガス雌雄混合3品種(メリーワシントン 500W, UC157F1, PC2000)と全雄品種(ガインリム)を用いてRM17マーカーの有効性を検証した結果、メリーワシントン 500WとUC157F1では解析した全個体においてRM17マーカーが利用可能だったが、PC2000とガインリムでは一部の個体で利用できなかった。そこでRM17マーカー近傍のSSM01マーカーを用いて同様の解析を行ったところ、全ての個体で2つの性染色体(X及びY)を区別することができた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Akahori Mako, Kanno Akira	4. 巻 218
2. 論文標題 Development of a new codominant CAPS marker for sex genotype identification in asparagus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Euphytica	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10681-022-03029-5	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------