

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15827

研究課題名(和文) 食用アスパラガスの新規雌雄性決定遺伝子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of novel sex-determining gene candidates for sex-determining genes in *Asparagus officinalis*

研究代表者

津釜 大侑 (Tsugama, Daisuke)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：10726061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：食用アスパラガスの雌雄異株性は少数の遺伝子が制御し、転写因子遺伝子・AoMYB35はその候補である。当方では食用アスパラガスの自殖性株を有している。これらにより新規の食用アスパラガス雌雄性制御遺伝子を得ることが本研究の目的である。AoMYB35とそのシロイヌナズナにおける相同因子で花粉成熟に必須であるAtMYB35が結合するDNA配列を網羅的に解析し、それらの間に差異を見出した。これに基づく解析から不稔・半不稔のシロイヌナズナ変異体を得た。自殖性株の雌蕊と雄蕊の転写産物を網羅的に解析した。既知データを利用し雄株特異的な遺伝子を新たに2個得た。これらは食用アスパラガスの雌雄性の追究に役立つ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AoMYB35が結合するDNA配列とAtMYB35結合配列が互いに異なることは事前の予想に反しており、食用アスパラガスの雌雄異株性の進化を考える上で興味深いと考えている。本研究で単離したシロイヌナズナの半不稔変異体からは新規の植物生殖制御遺伝子が単離できる可能性があり、これは作物等有用植物の生殖様式の制御・変化にも利用できる可能性がある。本研究で得た2個の食用アスパラガス雄株特異的遺伝子の機能は、それらの配列から推定することは困難であり、今後解析を行い明らかにする必要があるが、これは学術的に興味深く、食用アスパラガスの雌雄性を理解し制御することにも役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Garden asparagus dioecy is regulated by a small number of genes. AoMYB35 is a strong candidate for such a gene. We have an autogamous garden asparagus line. Using them, this study aimed to identify novel candidates for such genes. DNA affinity purification sequencing with AoMYB35 and AtMYB35, which is a close AoMYB35 homolog in *Arabidopsis thaliana* and which is indispensable for pollen maturation, showed that AoMYB35-bound and AtMYB35-bound DNA sequences differ from each other. On the basis of this analysis, several *Arabidopsis* mutants were selected for phenotyping. Of these mutants, one showed male-sterile phenotype and another showed a female-semi-sterile phenotype. Transcriptomes of pistils and stamens of the autogamous garden asparagus line were analyzed. Revising data from previous studies led to identification of two male-specific genes in garden asparagus. The information from this study can help better characterize the garden asparagus dioecy.

研究分野：園芸学・育種学・分子生物学

キーワード：アスパラガス 雌雄性 遺伝子 転写因子 ゲノム シロイヌナズナ 生殖 花粉

1. 研究開始当初の背景

食用アスパラガス (*Asparagus officinalis*) はキジカクシ科の多年生植物であり、冷涼地でも春先に収穫できる貴重な野菜である。食用アスパラガスは雌雄異株性を持ち、雌株は雌花のみを着け、雄株は雄花のみを着ける。雌株は種子を着生するが、これは畑に落下すると雑草化し、その畑の栽培管理に悪影響を与えうる。このことから農業生産には雄株が好んで用いられる。超雄性株と呼ばれる雄株は、花粉親として用いた場合に雄株のみを後代に生じさせるものであり、そのような全雄種子の生産に利用されている。このように、食用アスパラガスの雌雄性は、学術的に興味深いだけでなく、生産上も重要である。食用アスパラガスの雌花においては、細胞死により雄蕊が退化する。雄花においては、雌蕊の発達が抑制される。このような花器官の形態形成(すなわち雌雄性)は、*M*座と呼ばれる優性の雄性化促進遺伝子座の遺伝子群により決定されることが知られている。*M*座遺伝子群の機能は、雄蕊の発達の促進と雌蕊の発達の抑制であり、これらは互いに異なる遺伝子により担われると考えられている。私達は、既報の食用アスパラガスのRNAシーケンシング (RNA-Seq) (Harkess et al., 2015, *New Phytol*, 207: 883-892) のデータを改めて解析し、*AoMYB35* という遺伝子が雄株のみに存在する(雌株に存在しない)ということを見出した。*AoMYB35*は、モデル植物・シロイヌナズナの花粉発達に必要な転写因子である *AtMYB35* と似たアミノ酸配列を持つタンパク質をコードし、タペート組織(花粉母細胞を取り囲み、それらの発達を促進する細胞群)において発現している (Tsugama et al., 2017, *Sci Rep*, 7: 41497)。これらのことから、*AoMYB35*は雄蕊の発達を促進する *M*座遺伝子の有力な候補であると考えられる。しかし、シロイヌナズナの *AtMYB35* の欠損変異体 (*atmyb35*) と食用アスパラガスの雌株との間では、表現型が完全に整合せず(例えば、*atmyb35* の雄蕊は、食用アスパラガスの雌株の雄蕊とは異なり、退化することなくその形を維持する)、*AoMYB35* の機能に関しては更に詳細な解析を行う必要があると考えている。他の研究グループによる全ゲノムの解読と自殖性変異株(突然変異により雌性不稔性が低下し少数の自殖種子を発達させる雄株)の解析により、雌蕊の発達を抑制する *M*座遺伝子の実体は *SOFF* (*SUPPRESSOR OF FEMALE FUNCTION*) であると考えられている (Harkess et al., 2017, *Nat Commun*, 8: 1279)。しかし、私達の実験系においては全長の *SOFF* のクローニングは不可能であり、私達の行った RNA-Seq においては、雌蕊・雄蕊・花被片のいずれの花器官についても、*SOFF* の発現量に雌雄間差は認められなかった。同研究においては、11 個の遺伝子が雄株特異的な遺伝子の候補として挙げられていたが、それらの雄株特異性を実証する実験は行われていなかった。これらのことから、*SOFF* の作用機序や *SOFF* 以外の雌蕊発達抑制遺伝子の存在の可能性に関しては検証する必要がある。

自殖性変異株は、私達の研究室においても見出され、維持されている。この株は *AoMYB35* を有し少数の種子を発達させることから、上述の変異株と同様、雌性不稔性の低下した雄株であると捉えることができる。また、私達は、種々の生理活性物質の花器官形成・発達に対する影響について予備実験を行い、雄株の雌蕊の肥大・発達を促進する物質の候補を得ていた。これらの状況から、(I) *AoMYB35* はいかに雌雄性を制御するか? (II) 雌蕊の発達抑制遺伝子・因子はいかなるものか? という学術的問いを得ていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*AoMYB35*、自殖性株、生理活性物質の更なる特徴付け等を通して、上述の問い (I) (II) に答え、新規の食用アスパラガス雌雄性制御遺伝子の候補を得、その作用機構について知見を得ることであった。転写産物の配列や全ゲノム配列が網羅的に解析されたことにより、食用アスパラガスの遺伝子のクローニングなどは以前より容易になったものの、食用アスパラガスの遺伝子の機能が詳細に解析された例は少なく、本研究の *AoMYB35* 等に関する解析はこれを実践しようとするものであった。

3. 研究の方法

(1) *AoMYB35* の生理機能と標的遺伝子

シロイヌナズナの *atmyb35* 欠損変異体においては、花粉粒が形成されないため受精が起こらず、種子が形成されない (Zhu et al., 2008, *Plant J*, 55: 266-277)。本研究では *AoMYB35* を *atmyb35* に導入し、花粉粒・種子が形成されるか調べた。また、特定の転写因子と相互作用するゲノム DNA 断片を網羅的に解析する手法として、DAP-Seq (DNA affinity purification sequencing) が開発されており (O'Malley et al., 2016, *Cell*, 165: 1280-1292)、本研究では *AoMYB35* と *AtMYB35* を用いてこれを行い、*AoMYB35* に結合する DNA のコンセンサス配列と *AtMYB35* に結合する DNA のコンセンサス配列を取得した。また、この DAP-Seq の結果を、食用アスパラガスの花芽を用いた RNA-Seq (Harkess et al., 2015, *New Phytol*, 207: 883-892) や *atmyb35* の花芽を用いた RNA-Seq (Li et al., 2017, *Front Plant Sci*, 8: 1559) の結果と比較し、*AoMYB35* と *AtMYB35* の直接的な標的遺伝子を推定・比較した。これらの標的遺伝子の中から、その配列から花粉発達において重要な役割を果たしうると考えられた 23 個を選び、その

(食用アスパラガス遺伝子については、シロイヌナズナにおけるその相同遺伝子)中に transfer-DNA (T-DNA) を持つシロイヌナズナ変異体を Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) より取得し、それらの表現系を観察した。

(2) 生理活性物質の影響の評価

雄株雌蕊の発達を促進する可能性がある物質(上述)を中心に、種々の生理活性物質を食用アスパラガスの花芽に与え、それらが花器官の形態に与える影響を評価した。

(3) 自殖性株の雌蕊と雄蕊における遺伝子転写産物の網羅的解析

自殖性株の花芽をサンプリングし、それを雌蕊・雄蕊・花被片に分け、それぞれを RNA-Seq に供し、それらにおける遺伝子転写産物を網羅的に解析した。これにより得られたデータを、先行研究により得られていた雌株・雄株の雌蕊・雄蕊・花被片の RNA-Seq データ (Ide et al., 2019, Sci Rep, 9: 2703) と比較し、自殖性株に特異的な発現パターンを示す遺伝子を同定した。

(4) その他の雄性特異的遺伝子の同定の試み

AoMYB35 隣接領域を TAIL (thermal asymmetric interlaced)-PCR により取得し、その配列を解析した。また、同領域の配列解析等のため、複数の食用アスパラガス品種の雌株と雄株の全ゲノム配列を MinION (Oxford Nanopore Technologies 社) シークエンサーにより解析した。上述の先行研究において見出された 11 個の遺伝子が食用アスパラガスの雌株と雄株に存在するか、ゲノミック PCR により検証した。

4. 研究成果

(1) *AoMYB35* と *AtMYB35* の機能の差異

AoMYB35 をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (目的遺伝子を高発現させるためのプロモーター) 又は *AtMYB35* プロモーターに連結して *atmyb35* に導入したが、これにより得られた植物体においても、*atmyb35* と同様の花粉欠損の表現型が観察された。私達の先行研究において、*AoMYB35* を転写抑制ドメインに融合させてシロイヌナズナに発現させると異常な花粉粒が増加し半不稔の表現型が引き起こされたが、これも *atmyb35* の表現型とは異なる。以上のことから、*AoMYB35* は *AtMYB35* とは代替不能であることが示唆された。

DAP-Seq により得られた *AoMYB35* に結合する DNA のコンセンサス配列は、他の幾つかの MYB 型転写因子の結合配列と同様の配列をコアとするものであった。一方、*AtMYB35* 結合配列は、それらとは異なる *AtMYB35* に特異的なものであった。この DAP-Seq と先行研究由来の RNA-Seq データから推定した *AoMYB35* 標的遺伝子の候補には、シロイヌナズナの花粉発達制御遺伝子の相同遺伝子で雄花特異的な発現を示すものが多く含まれていたが、これらと *AtMYB35* 標的遺伝子の候補との間には共通のもの(互いに相同な遺伝子であるもの)は少なかった。以上の結果は、*AoMYB35* と *AtMYB35* の生理・生化学的機能が分化していることを示唆するものであり、食用アスパラガスの雌雄異株性や *AoMYB35* の進化を考える上で興味深いと考えている(津釜ら、2021年、日本育種学会第139回講演会)。

(2) シロイヌナズナの新規の雄性不稔変異と雌性半不稔変異の同定

上述の *AoMYB35* と *AtMYB35* の標的遺伝子の候補に基づき取得したシロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体の中で、GDSL 型エステラーゼ/リパーゼ遺伝子の一つである *GELP77* に T-DNA を持つ変異体 (*gelp77*) は不稔性を示した。この変異体の雌蕊に稔性のある花粉を受粉させると、雌蕊が伸長し種子が発達した。この変異体においては互いに接着したような状態の花粉粒が見られ、これは葯からも放出されにくかった。*GELP77* の発現は未熟な花粉粒とタペート組織において検出された。これらの結果は、*GELP77* による花粉壁の性質の変化が正常な花粉粒の発達に必須であることを示唆する (Tsugama et al., 2020, Biochem Biophys Res Commun, 525: 1036-1041)。

上述のシロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体の中に、*gelp77* とは別に短い莢と少ない種子を持つ個体を見出した。この表現型はその自殖後代の個体でも観察された。この変異体を種子親として交配を行っても莢は成長せず、種子数も少なかった。一方、この変異体を花粉親として *atmyb35* (種子親) と交配させると、多くの種子が得られた。この交配から得られた個体の全てが、当該変異体と同様の半不稔の表現型を示した。当該変異体の柱頭における花粉管をアニリンブルーで染色して可視化したところ、多くの花粉管が雌蕊の途上で伸長を停止している様子が観察された(図 1)。これらの結果は、当該変異が優性であり、雌蕊における花粉管伸長の異常を引き起こすことで半不稔の表現型を引き起こすことを示唆する。当該変異体においては複数の T-DNA の挿入部位が検出されていたが、半不稔の表現型と連鎖するものはこの内の 1 個であり、これは当初の興味の対象であった *AoMYB35*・*AtMYB35* の標的遺伝子の領域とは異なっており、他の既知の稔性関連遺伝子・領域とも異なっていた。この新規の変異の同定は、いわば副次的な成果であるが、植物の生殖機構をより深く理解することに寄与していると考えている。

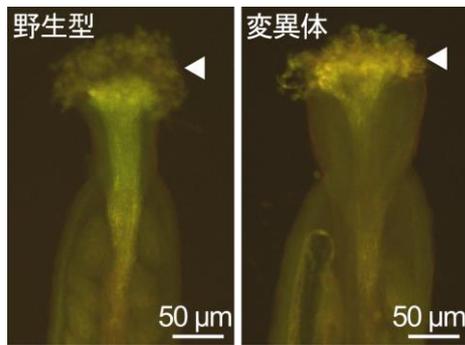


図 1. 本研究で得られたシロイヌナズナ変異体における花粉管伸長。矢頭は柱頭を示す。

(3) 生理活性物質施用試験

生理活性物質の施用は、研究代表者の異動や新型コロナウイルスの影響により当初の計画よりも生理活性物質の種類や反復回数を縮小して行ったが、予備実験で雄株の雌蕊の肥大・発達を促進した物質については、その効果が確認できず、他の物質においても、再現性よく花器官の形態を変化させるものは見出されなかった。しかし、それらの物質の濃度や施用時期（花芽の大きさ）等は依然として最適化の余地があるとも考えられる。

(4) 自殖株の転写産物の網羅的解析

RNA-Seq により、自殖株の雌蕊における遺伝子発現様式は、雌株の雌蕊よりも雄株の雌蕊に近いことが示された。このことは、当該自殖株が *AoMYB35* ないし *M* 座を持つことと整合する。*SOFF* の発現量については、自殖株の各花器官の間で差は無く、自殖株・雌株・雄株の雌蕊の間でも差は無かった。自殖株の雌蕊において雄株の雌蕊よりも強く発現する遺伝子には、細胞肥大に関わる植物ホルモンであるサイトカイニンの生合成遺伝子などが含まれていた。当該 RNA-Seq データは、生理活性物質やゲノム編集等による食用アスパラガスの雌雄性制御を行うことに役立つと考えている。

(5) 2 個の雄株特異的遺伝子の同定

TAIL-PCR と MinION による全ゲノム解析により、*AoMYB35* の 5'側隣接配列約 11 kb と、3'側隣接配列約 6 kb を解読することができた。しかし、これらの配列の大部分は反復配列であり、遺伝子として機能すると考えられる配列は含まれなかった。MinION に由来するリードは *AoMYB35* 隣接領域以外の領域をクロニングする上でも有用である (Tsugama and Fujino, 2019, Data Brief, 28: 104838)。ゲノミック PCR においては、上述の 11 個の雄株特異的遺伝子の候補の内の 9 個は、雌株と雄株の双方のゲノムにおいて検出されたが、残る 2 個については、雄株のゲノムにおいてのみ検出された（雌株のゲノムにおいては検出されなかった）(図 2)。これらの遺伝子のいずれについても、その配列から機能を推定することは困難である。今後、実験を通してこれらの機能の検証を進めたいと考えている。

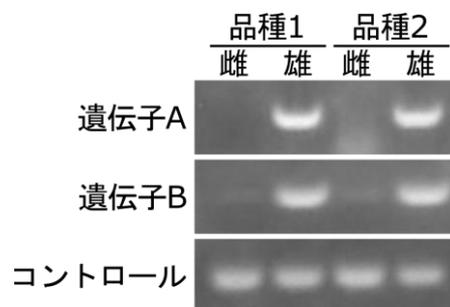


図 2. 雄株特異的遺伝子のゲノミック PCR による検出。

(6) 食用アスパラガス遺伝子のデータベースの作成

従前より、食用アスパラガス遺伝子の機能解析を促進するため、食用アスパラガスの全遺伝子について、シロイヌナズナとイネの相同遺伝子を探索し、その結果に基づいて食用アスパラガス遺伝子の機能を推定していた。これに関わるデータを公共リポジトリである figshare において公開し (Tsugama, 2021, figshare, <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13565168.v5>)、それにおける情報の取得・閲覧を補助するため、TGIF-DB というウェブサイトを作成した (Tsugama and Takano, 2021, BMC Res Notes, 14: 181, <http://webpark2116.sakura.ne.jp/rlgpr/>)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsugama Daisuke, Takano Tetsuo	4. 巻 14
2. 論文標題 TGIF-DB: terse genomics interface for developing botany	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 181 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-021-05599-4	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 Daisuke Tsugama	4. 巻 -
2. 論文標題 TGIF-DB datasets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 figshare	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.6084/m9.figshare.13565168.v2	査読の有無 無
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 Tsugama Daisuke, Fujino Kaien	4. 巻 28
2. 論文標題 Data of whole genome sequencing of five garden asparagus (<i>Asparagus officinalis</i>) individuals with the MinION nanopore sequencer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 104838 ~ 104838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2019.104838	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 Tsugama Daisuke, Fujino Kaien, Liu Shenkui, Takano Tetsuo	4. 巻 526
2. 論文標題 A GDSL-type esterase/lipase gene, GELP77, is necessary for pollen dissociation and fertility in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1036 ~ 1041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.179	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津釜大侑、藤野介延、高野哲夫
2. 発表標題 アスパラガスの性決定因子の候補・AoMYB35を用いたDAP-Seq
3. 学会等名 一般社団法人日本育種学会 第139回講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

TGIF-DB http://webpark2116.sakura.ne.jp/rlgpr/
--

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