

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22583

研究課題名(和文)栽培ギクのゲノム育種に向けたキク属の遺伝子解析の基礎研究

研究課題名(英文)Basic research on genetic analysis of the genus Chrysanthemum for genome breeding

研究代表者

増田 優 (Masuda, Yu)

東海大学・農学部・講師

研究者番号：80420511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：栽培ギクは日本の切り花生産において重要な植物種であるが、六倍体で自家不和合性を持つことから、これまで分子遺伝学的解析が困難だった。そこで本研究ではキク属におけるボジショナルクロニングのモデルケースとして、自家和合性突然変異を持つ二倍体野生種キクタニギクGojo-0系統を用いて、斑入り突然変異体(albino2)の原因遺伝子の単離を試みた。SSRプライマーを用いたマップベースクロニングの結果、原因遺伝子座を含むと推定される連鎖群を見出し、さらに30Mbまで候補遺伝子領域を絞り込んだ。さらに、MutMap法による原因遺伝子の同定を目指して解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はゲノム編集による栽培ギクの改良を最終目標に、キクにおける分子遺伝学的解析の基礎的な知見の蓄積を目指した。キクではこれまで報告のなかったマップベースクロニング法による遺伝子単離を試みた結果、今後の更なる解析が必要ではあるが、キクでも本手法の有用性を見出した。マップベースクロニング法は分子遺伝学における基本的な解析方法であることから、本研究の成果は、キクでも他の植物種と同様に遺伝子の単離と同定が困難ではないことを示唆していた。今後、本手法によってキクにおける園芸的に有用な形質の原因遺伝子の知見が蓄積されれば、これまで困難だった栽培ギクのゲノム育種に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cultivated chrysanthemums are one of the most important cut flowers in Japan, although an autohexaploidy and self-incompatibility have prevented the application of genetic analysis. In this report, we attempted to isolate the gene of variegated leaf from Chrysanthemum using model strain Gojo-0 (*C. seticuspe*) which is a diploid and self-compatible pure line. As a result of map-based cloning with SSR primers, we found a linkage group presumed to contain the responsible locus of variegated leaf of Chrysanthemum and estimated candidate gene region in the range of 30Mb. Furthermore, we performed MutMap analysis using next-generation sequencers to identify the responsible gene of variegated leaf of Chrysanthemum.

研究分野：植物育種学

キーワード：キク 育種 マップベースクロニング 斑入り キクタニギク 肥後菊

1. 研究開始当初の背景

栽培ギクは日本の切り花生産額の約 30%を占める重要な植物種であり、海外でも広く栽培されている。しかしながら、栽培ギクの多くが同質六倍体であり、自家不和合性を持つことから、これまでキクでは分子遺伝学的解析があまり進められてこなかった。

しかし、2019年にキク属の二倍体野生種(キクタニギク)の自家和合性変異体の自殖・純系化系統(Gojo-0)がモデル系統として確立され、さらにその全ゲノムが解読されたことから、栽培ギクを含むキク属の分子遺伝学的解析のプラットフォームが整えられた。

Gojo-0系統は、基本的に栽培ギクと同じゲノムを持つことから、栽培ギクのリファレンスゲノムとして有用であると考えられている。また、自家和合性の二倍体であるため、シロイヌナズナ等の他のモデル植物と同様に、これまでキク属では報告のなかったマップベースクローニングによる遺伝子単離が行えると考えられた。

さらに、同質六倍体である栽培ギクでは、劣性突然変異形質の顕在化には6つの劣性遺伝子がホモ化する必要があるため、栽培ギクのゲノム内には未利用の有用突然変異形質が数多く潜在していると期待される。一方で、ゲノム編集により一度の形質転換で6つの遺伝子を全て破壊できることが報告されていた。そのため、Gojo-0系統で見出される園芸的に有用な変異形質を分子遺伝学的に解析することで、栽培ギクのゲノム育種に繋がることを期待されていた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、栽培ギクのゲノム中に潜在すると予想される未利用の様々な変異形質の遺伝子をゲノム編集で破壊することで、これまでの栽培ギクには存在しなかった新しい形質を付与することである。その端緒として、劣性突然変異形質が顕在化しやすい二倍体種キクタニギク Gojo-0 系統にマップベースクローニングを適用することで、栽培ギクでは知られていない園芸的に有用な形質に関与する遺伝子の同定を試みた。また、キク属ではマップベースクローニングの報告がなかったため、その知見を得ることも目指した。

3. 研究の方法

本研究では、マップベースクローニングにより Gojo-0 と野生個体の交雑後代から得られる単因子劣性の斑入り突然変異体 *albino2* の原因遺伝子の解析を試みた。一般的に斑入りは重要な園芸形質であるが、栽培ギクに斑入り品種は知られていないため、新しい形質として有望である。また、この形質は発芽直後から観察でき、大量の個体を扱えるために、キク属のマップベースクローニングのモデルケースとしても好適な材料と考えられた。そのため、本課題では以下のような手法で、キクタニギクの斑入り遺伝子のマッピングを行い、変異の同定を目指した。

(1) *albino2* 分離集団種子の取得

Gojo-0 と野生型系統の交配を行い、斑入り形質 (*albino2*) が発現する分離集団について 2 系統で十分な数の種子を採取した。

(2) *ALBINO2* 遺伝子のラフマッピング

データベース上で公開されているキク属の SSR マーカーからゲノム全体を広くカバーする 74 個のプライマーを選定し、マップベースクローニングを行った。2つの分離集団から 16 個体ずつの *albino2* 系統と野生型系統から抽出したバルク DNA を用いて、検出された多型から *albino2* 候補領域を含む連鎖群の推定を行い、次に当該連鎖群を対象とする 45 個の SSR プライマーによる詳細な解析を行った。

(3) 次世代シーケンサー (Hi-seq) を用いた MutMap 法による用いた解析

MutMap 法による解析を行うために、*albino2* と野生型個体のそれぞれ 10 個体ずつのバルク DNA を用いて、次世代シーケンサーにより全ゲノム塩基配列を決定し、Gojo-0 系統の全ゲノム塩基配列情報をリファレンスに整列化を試みた。また、栽培ギクのゲノム育種に向けた基礎データを得るために、管弁を特徴とする古典菊の一種である肥後菊などの全ゲノム塩基配列決定も行った。

4. 研究成果

(1) *albino2* 分離集団種子の取得

ナショナルバイオリソースプロジェクト広義キク属（広島大学）の研究グループの協力を得て交配・採種が行われ、*albino2* 形質を示すと期待される 2 つの分離集団 XBAS 系統（約 1,400 粒）と XBAX 系統（約 2,800 粒）の種子を入手した。これらを播種・育成したところ、想定通りに野生型と *albino2* 形質がほぼ 3 : 1 に分離したことから、*albino2* 形質は単因子劣性の突然変異であると推定された（図 1）。また、発芽直後から形質が観察できるために大量の個体を扱うことが可能であることから、この交配により高精度のマッピングが可能な種子数が得られたものと期待された。



図 1 発芽後 約 3 週間の *albino2*（左）と野生型（右）の実生

(2) *ALBINO2* 遺伝子のラフマッピング

広島大学の研究グループの協力を得て、データベース上に公開されているキク属の SSR マーカーから、キクタニギク Gojo-0 系統のゲノム全体を広くカバーする 74 組のプライマーを選抜した。2 系統の分離集団について *albino2* と野生型のそれぞれ 16 個体から抽出したバルク DNA を用いてマッピングを行った結果、連鎖していることが期待されるマーカーが 2 つ見つかり、この結果は各個体の DNA を用いた解析でも確かめられた（図 2）。

一次スクリーニングで見出されたマーカーは、同一連鎖群の隣り合うマーカーであったため、この連鎖群に原因遺伝子座の候補領域が存在すると推定された。そのため、これらの近傍にある 45 個の SSR マーカーを新たに選定してマッピングを行った結果、原因遺伝子座候補領域が約 30Mb の範囲に絞り込まれた。現在、F2 集団の採種を試みており、これらを用いることで、更に詳しい解析が可能になることが期待される。

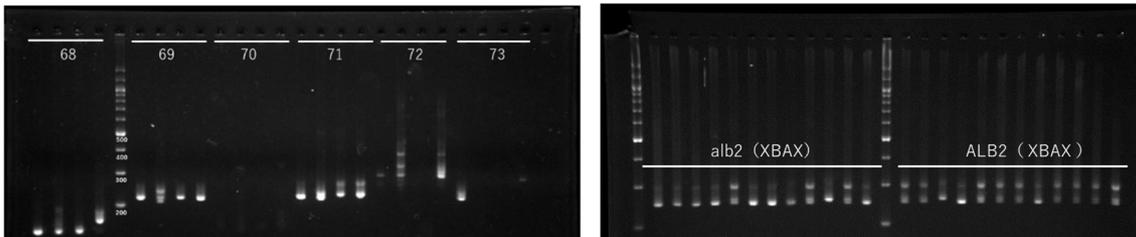


図 2 *albino2* と野生型バルク DNA を用いたラフマッピング（左）と各系統の解析（右）

(3) 次世代シーケンサー（Hi-seq）を用いた MutMap 法による用いた解析

マップベースクローニングと並行して、2021 年に発表された Gojo-0 系統の染色体レベルの高精度遺伝子情報をリファレンスに、*albino2* 系統と野生型のそれぞれ 10 個体から抽出したバルク DNA を用いて、次世代シーケンサーによる全ゲノム塩基配列決定を行い、MutMap 法による解析を試みた。現在、得られたデータから *albino2* と野生型の間の多型解析を進めており、ラフマッピングにより得られた原因遺伝子座候補領域付近のコーディング領域に突然変異を持つ遺伝子があれば、有力な候補となることが期待される。また、無ければ検出された多型を元に dCAPS 等のマーカー化を行い、現在採種中の F2 分離集団を用いてより高精度マッピングを行い、*albino2* 原因遺伝子候補の同定を試みる予定である。

さらに、栽培ギクのゲノム育種に向けた基礎データを得るために、管弁を特徴とする古典菊の一種である肥後菊や、舌状花を持たない野生菊の全ゲノム塩基配列決定も行った。

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 1件）

1. 著者名 Masuda Yu, Nakano Michiharu, Kusaba Makoto	4. 巻 7
2. 論文標題 The complete sequence of the chloroplast genome of <i>Chrysanthemum rupestre</i> , a diploid disciform capitula species of <i>Chrysanthemum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mitochondrial DNA Part B	6. 最初と最後の頁 603 ~ 605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/23802359.2022.2057252	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 -

〔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
---------	---------