

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580001

研究課題名（和文） テンサイの組織培養適性を決定する遺伝的要因の研究

研究課題名（英文） Study on the genetic factors involved in the tissue-culture response of sugar beet (*Beta vulgaris* L.)

研究代表者

久保 友彦（KUBO TOMOHIKO）

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：40261333

研究成果の概要（和文）：テンサイは、カルス化や植物体再生が非常に難しいことが知られている。ところが、NK-219mm-O については、例外的に非常に良好な組織培養適性を示す。そこで、この培養適性の遺伝的背景を調査した。NK-219mm-O と様々なテンサイ系統を交配して組織培養適性を調べたところ、組織培養適性が F1 世代でも良好であることを明らかにした。さらに、再分化に伴って強く発現する遺伝子の塩基配列を得た。

研究成果の概要（英文）：Sugar beet is known to be recalcitrant against callus induction and plant regeneration. Sugar-beet line NK-219mm-O is an exceptional line because it exhibits excellent response to tissue culture. Genetic basis of this tissue culture response was investigated. NK-219mm-O was crossed with various sugar beet lines of poor tissue-culture response. The resultant F1 plants exhibited good tissue-culture response. Nucleotide sequence of a gene whose expression is increased upon plant regeneration was obtained in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
2013年度	0	0	0
2014年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：組織培養、カルス化、再分化、テンサイ

## 1. 研究開始当初の背景

テンサイは組織培養が非常に難しい作物であり、再分化はおろか、カルス化すら容易ではない。海外の種苗会社において孔辺細胞のプロトプラストを利用した形質転換実験系が開発されたが、同グループ以外では再現されていない。わが国では、平成11～12年にかけて、北海道立中央農業試験場の玉掛に

より、テンサイ系統 NK-219mm-O の葉片が高いカルス化能を示し、さらに再分化能も著しく高いことが示された。さらに、アグロバクテリウムを用いた遺伝子導入により形質転換テンサイを得ることに成功している。テンサイはバイオマスの大きい作物であり、形質転換技術はテンサイの新たな利用法を実現する上で不可欠であろう。

## 2. 研究の目的

(1) NK-219mm-0 の再分化過程における形態的な変化を明らかにする。

(2) NK-219mm-0 の高い培養適性（高いカルス化能と高い再分化能）がいかなる遺伝的要因によって決定されているのかを明らかにする。

(3) NK-219mm-0 の再分化に関連して発現する遺伝子を単離し、コードされるタンパク質を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試材料

北海道農業研究センター育成のNK-195mm-0, NK-219mm-0, NK-235mm-0, NK-239mm-0, NK-294mm-0, TA-33BB-0、およびそれらを維持系統とするCMS系統を用いた。

### (2) 組織培養

無菌個体を確立するため、種子を表面滅菌し、滅菌水でよく濯いだ上で、発芽培地に埋め込んだ。暗所で発芽させ、幼苗をゼランガム培地に移植して育苗した。確立した無菌個体より葉片を切り出し、カルス誘導培地に置床した。出現したカルス塊を再分化培地上に移動させ、再分化を促した。

### (3) 形態観察

内部形態観察は、再分化物を寒天に包埋し、マイクロライザーを用いて切片とした。切片は、サフラニン染色、あるいはサフラニン・ファストグリーン FCF 二重染色を行い観察した。

### (4) ダイアレル分析

統計分析プログラム「DIAL98」を用いてF<sub>1</sub>系統における片側ダイアレル分析を行った。

### (5) 核酸分析

テンサイ total RNA は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) により調製した。Suppression Subtractive Hybridization は PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech) を用いて行った。PCR 増幅したサブトラクションライブラリーは pBluescriptII SK+ に TA クローニングした。Alkali-lysis 法で精製したプラスミド DNA を鋳型に BigDye Terminator v3.1 を用いてシーケンス反応を行い、DNA シーケンサーABI377 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) 再分化の様相

いくつかの遺伝子型について、カルス塊を再分化培地に置床し、約4週間後、どのような反応を示しているか置床カルス塊ごとに観察した。観察における評価は A（カルス塊から不定胚及び不定芽様の再分化物が多数形成される。）、B（カルス塊から不定胚及び不定芽様の再分化物が形成されるが、形成さ

れる再分化物の数が極めて少ない。）、C（カルス塊から緑色の再分化物が形成されるが、再分化物は不定胚及び不定芽様の形態を示さない。）、D（カルス塊より再分化物は形成されないが、カルス塊の緑化が確認できる。）、E'（カルス塊より再分化物は形成されず、カルス塊の緑化も確認できない。）の5段階で行った（図1）。

AとCの内部形態を示す（図2）。Aでは、規則正しい細胞の並びが観察でき、さらに表皮系の発達と維管束系の発達が確認できた一方、Cにおいては、リグニンの沈着した細胞が集合している部分は確認できるものの、規則正しい細胞の並びや、維管束系及び表皮系の発達は見られなかった。

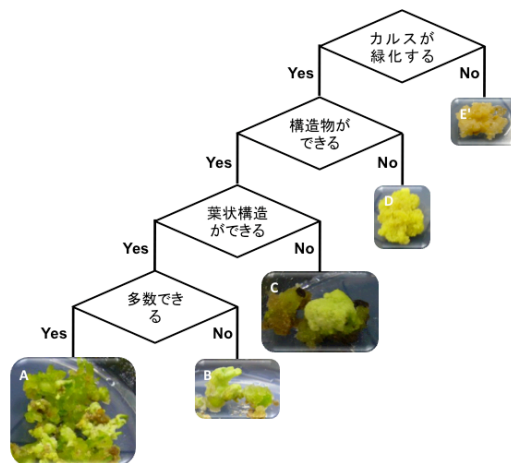


図1. カルスの再分化の様相.

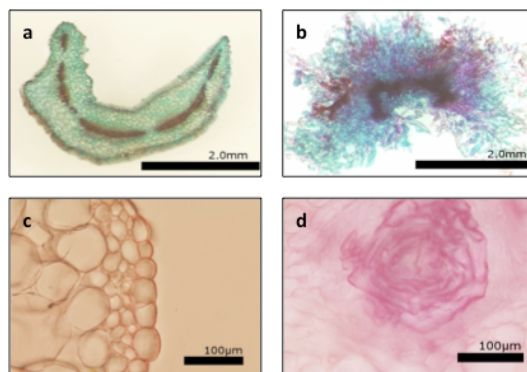


図2. 図1におけるA（写真aとc）とC（写真bとd）の内部構造の比較.

### (2) カルス形成率と再分化能に関するダイアレル分析

材料は、NK-195mm-0, NK-219mm-0, NK-235mm-0, NK-239mm-0及びNK-294mm-0の5系統、及びこれらを片側ダイアレル交配して得られたF<sub>1</sub>10系統の計15系統である。カルス形成率の調査は、個体毎に複数の外植片をカルス誘導培地に置床した後、4週間後

から 12 週間後に亘りカルス形成の有無を観察した。各系統のカルス形成率について分散分析を行ったところ、遺伝子型間に 1%水準で明らかな有意差が認められた。そこで、系列分散 ( $V_r$ ) と親と系列の共分散 ( $W_r$ ) の関係を  $V_r$ - $W_r$  グラフを用いて検討した。 $W_r$  と  $V_r$  との回帰直線の傾きは 1 に近く、カルス形成率にはエピスタシスの影響はないものと考えられた。また、各系列間の  $V_r$  および  $W_r$  の関係から、NK-219mm-0 は優性遺伝子の割合が多いと考えられた。

カルス形成率について各遺伝成分の分散分析を行うと、相加効果を表す a 項、優性効果を示す b 項ともに 1%水準で有意となった。優性効果のうち、 $b_1$  (平均優性効果)、 $b_2$  (親別の優性効果) および  $b_3$  (特定組合せの優性効果) については、 $b_1$  項と  $b_3$  項が 1%水準で、 $b_2$  項が 5%水準で有意となった。また、カルス形成率の組合せ能力は、GCA (一般組合せ能力) および SCA (特定組合せ能力) とともに、1%水準で有意であった。 $F_1$  と平均親間との相関係数は、 $r=0.667$  であり、5%水準で有意であった。すなわち、 $F_1$  の値は、概ね両親の形質値から予測可能と考えられた。平均ドミナンス ( $\sqrt{H_1/D}$ ) は、ほぼ 1 で、完全優性を示した。また、カルス形成率に関する広義の遺伝率、狭義の遺伝率ともに高い値を示し、有効因子数は約 1 つと推定された。

次に、テンサイ形質転換においては、遺伝子導入されたカルス塊より植物体の再生を行うため、カルスからの再分化の良否についても検討した。各系統の再分化の良否は、カルス形成より 2 週間以内のカルス塊を再分化培地へ置床し、約 4 週間後に置床カルスの状態を観察することで行った (図 1)。

また、カルスからの再分化能には、以下のようなスコアを与え、個体別の平均値 (0~200) により評価した ( $A=2$ ,  $B=1$ ,  $C=D=E'=0$ )

(全カルス数に対する A 反応を示したカルス塊の割合)  $\times$  (A の点数=2) + (全カルス数に対する B 反応を示したカルス塊の割合)  $\times$  (B の点数=1) + ... + (全カルス数に対する E' 反応を示したカルス塊の割合)  $\times$  (E' の点数=0) の 100 倍

再分化能について各遺伝成分の分散分析を行ったところ、反復間差は認められなかったが、遺伝子型間には 1%水準で明らかな有意差が認められた。そこで、カルス形成率と同様に  $V_r$  と  $W_r$  の関係を  $V_r$ - $W_r$  グラフを用いて検討したところ、再分化能についてもエピスタシスの影響はないものと考えられた。また、 $V_r$  と  $W_r$  の関係から、NK-219mm-0 は劣性遺伝子の割合が多く、NK-239mm-0 は優性遺伝子の割合が多いと考えられた。再分化能についての分散分析では、a 項、b 項ともに 1%水準で有意となった。優性効果に関する  $b_1$ 、 $b_2$ 、 $b_3$  のうち、 $b_1$  項が 5%水準で、 $b_3$  項が 1%水準で

有意となった。組合せ能力においても、GCA、SCA とともに、1%水準で有意であった。 $F_1$  系統と平均親間での相関係数を導いたところ、 $r=0.853$  となり、5%水準で有意であった。優性分散に比べて相加分散の方が大きく、平均ドミナンス ( $\sqrt{H_1/D}$ ) は 0.565 で、不完全優性を示した。なお、優性遺伝子の平均的方向は負値を示していたことから、再分化能の低い方向が優性と考えられた。また、再分化能の広義の遺伝率、狭義の遺伝率はともに高い値を示した。

### (3) カルス形成率と再分化能との相関関係

カルス形成率と再分化能との相関係数 ( $n=14$ ) は  $r=0.342$  であり、両者の間に有意な相関関係は認められなかった。しかし、片親に NK-219mm-0 を持つ  $F_1$  では、カルス形成率及び再分化能ともに、NK-219mm-0 よりは劣ったものの、カルス形成率は、いずれも 70%以上と高く、再分化能については、NK-294mm-0 との  $F_1$  は低かったが、3 つの  $F_1$  系統はいずれも高い再分化能を示すカルス塊が得られた。よって、NK-219mm-0 を片親に持つ  $F_1$  個体は、NK-219mm-0 に匹敵する高いカルス形成率や再分化能を示し、高効率にカルスを經由した植物体再生が可能であった。

### (4) NK-219mm-0 と一年生系統間での $F_1$ 系統作出

元来、越年生であるテンサイの世代短縮を図るには、一年生遺伝子の導入が有効である。そこで、NK-219mm-0 の中から、安定的にカルスを形成し、高頻度に再分化が見られる個体 (F2P10) を母本とし、TA-33BB-0 を父本として交配し、 $F_1$  を得た。また、同時に TA-33BB-0 と核遺伝子型がほぼ同質である TA-33BB-CMS を母本とし、F2P10 を父本としてと交配し、 $F_1$  を得た。

これら 2 種類の  $F_1$  とその親系統である TA-33BB-0、TA-33BB-CMS 及び F2P10 について、カルス形成率及び再分化能を評価し、比較した。TA-33BB-0 及び TA-33BB-CMS のカルス形成率は、両系統とも約 10%であった。一方、F2P10 自殖系統では 100%であった。F2P10 を交配した  $F_1$  は、ほぼ 100%であった。次にカルス塊の再分化能を調べると、TA-33BB-0 は、9 個体の再分化能スコアの平均値は 78 であった。TA-33BB-CMS は、8 個体の再分化能スコアの平均値は 77 であった。一方、F2P10 および F2P10 を TA-33BB-0 および TA-33BB-CMS と交配した  $F_1$  は、いずれも高い再分化能を示し、再分化能スコアの平均値は 170 以上と高かった。

以上の結果から、一年生系統である TA-33BB-0 及び TA-33BB-CMS は、F2P10 と交配することにより、カルス形成率及び再分化成績ともに向上することが明らかになった。

次に、形質転換の効率について評価するため、2つのF<sub>1</sub>に由来する合計22個体をアグロバクテリウム法を用いた形質転換実験に供試した。まず、本形質転換法では、カルスを懸濁培養細胞化した上でアグロバクテリウムを感染させる必要があるが、19個体で懸濁培養時に旺盛な細胞増殖が見られず、また、アグロバクテリウムとの共存培養時に、細胞が褐変化する、あるいは細胞増殖が停止する傾向が見られ、これら19個体から遺伝子導入されたカルス塊を得ることができなかった。残るF2P10×TA-33BB-0のうち2個体、TA-33BB-CMS×F2P10のうち1個体からは、遺伝子導入されたカルス塊が選抜できた。そこで、遺伝子導入されたカルス塊より植物体を再生させ、鉢上げ後、長日条件下で育成すると約2ヶ月で開花した。これらの対照の非形質転換体も同様に開花した。なお、F2P10×TA-33BB-0が雄性可稔であり、TA-33BB-CMS×F2P10が雄性不稔であることを確認した。このように、高培養適性系統へ一年生遺伝子を導入することにより、高い培養適性を保持したまま、本来は年1世代が限界であった世代促進のスピードを大幅に短縮することができることが明らかとなった。

#### (5) cDNA サブトラクションによる再分化関連遺伝子の探索

テンサイカルスからの再分化に伴って発現が上昇する遺伝子を得ることを目的として、cDNA サブトラクションを行った。テストターのソースとして、NK-219mm-0の中から、特に再分化成績の良い3個体を選び出した。ドライバーのソースとして、(2)のダイアレル分析によりカルス形成が良好でありながら再分化が起こらないことが判明しているNK-239mm-CMS x NK-294mm-0なるF1の中から、確実に再分化が起こらないことを確認した3個体を選び出した。それぞれ本葉から誘導したカルスを14日間培養し、再分化が生じているカルスと、生じていないカルスよりcDNAを合成し、サブトラクションを行ってライブラリーを作製した。ここからランダムに285クローンを選び出してプローブとしてバーチャルノーザンハイブリダイゼーションを行ない、NK-219mm-0で発現が多いクローンを225個特定して塩基配列を決定した。

得られたクローンの塩基配列をBLAST検索し、相同遺伝子の有無に基づいて機能を推定した(図3)。

最も頻度の高い機能グループはGlutathione S transferase (GST) 遺伝子であった。続いて色素体関連遺伝子、細胞壁関連遺伝子(Extension、β-Glucosidaseなど)が得られた。その他、植物ホルモン関連遺伝子、シグナル伝達関連遺伝子、あるいは熱ショックタンパク質様遺伝子が得られたが、全体の

24%はNo-hitであった。

バーチャルノーザン解析およびリアルタイムPCRを行った結果、HR-38(Asparagine synthetase)、HR-29(beta-glucosidase 42)、HR-136(beta-glucosidase 31)、HR-4(Glutathione S-transferase)、HR-56(Heat stable protein)、HR-55(Auxin-repressed protein)、HR-77(Auxin-responsive protein)、HR-65(Receptor-like protein kinase)、HR-150(Very long chain fatty acid condensing enzyme)、HR-164(GDSL-motif lipase/hydrolase family)、HR-288(beta-ketoacyl-CoA synthase)、HR-115(bZIP Transcription factor)、HR-3(No-hit)、HR-30(No-hit)、HR-275(C3HC4-type RING finger family protein)、HR-27(Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase)、およびHR-87(Glutamate decarboxylase)の17種を発現量の差が大きい遺伝子として選り出した。

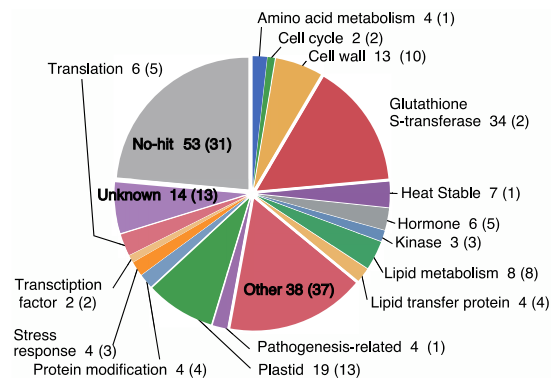


図3. サブトラクションにより得られた225クローンの機能グループ分けと数。カッコ内は重複を取り除いた数(合計145)。

#### (6) 再分化関連遺伝子であることの検証

前項(5)で得られた17種の遺伝子が、再分化に関わることを検証することにした。材料として、NK-219mm-0より選抜した、特に再分化成績の良いカルスを再分化培地上で培養し、0、1、3、7、および14日目にRNAを抽出した。陰性対照区として、同じ個体のカルスを6ヶ月以上継代培養し、再分化能を失われた上で再分化培地にて培養し、RNAを抽出した(従って、遺伝的な背景は等しい)。リアルタイムPCRにより発現量を調べたところ、HR-3、HR-29ならびにHR-56の3遺伝子は、再分化を起こすカルスにおいて7日目まで発現が認められないが、これ以後急速に発現が上昇(それぞれ約80倍、約25倍、約70倍)していることが分かった。一方、陰性対照区では、ほとんど発現は認められなかった。HR-30、HR-65ならびにHR-288は、1日目よ

り発現が上昇した。HR-30 は陰性対照区でも全調査区で 1/2 程度の発現が検出された。HR-65 は陰性対照区においても同様の発現パターンを示したため、本材料では再分化との相関が見られなかった。一方 HR-288 は陰性対照区においてほとんど発現が認められなかった。

以上の遺伝子について、さらに次の実験を行った。(2) より、NK-294mm-0 はカルス化が起こるが、再分化は起こさない系統であることが判明している。一方、NK-294mm-CMS (NK-294mm-0 と同じ核遺伝子型を保持するが、雄性不稔細胞質を持つ) と NK-219mm-0 との F1 は、カルス化および再分化ともに著しく向上する。まず、NK-294mm-0 より、再分化が起こらないことを確認した 4 個体を得た。次に、NK-294mm-CMS x NK-219mm-0 なる F1 より、カルス化と再分化が起こる 4 個体を得た。それぞれを培養して、カルスを再分化培地に置床し、0 および 14 日目で RNA を抽出した。リアルタイム PCR により発現量を調べたところ、HR-3 と HR-30 はともに NK-294mm-0 ではほとんど発現しないが、NK-294mm-CMS x NK-219mm-0 では発現すること、およびその発現量は 0 日目より 14 日目の方が高い傾向にあることが判明し、再分化との明瞭な相関が示された。一方、他の遺伝子の発現パターンからは再分化との明瞭な相関を見ることができなかった。以上から、HR-3 および HR-30 の 2 遺伝子の発現上昇が再分化と関連することが明らかになった。

HR-3 と HR-30 について、完全長 mRNA に対応する cDNA を、5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) と 3' RACE により得た。その結果、HR-3 は 137 アミノ酸残基、HR-30 は 136 アミノ酸残基のタンパク質をコードすることがわかった。再度 BLAST 検索を試みたが、遺伝子の機能に関わる情報は得られなかった。しかしながら HR-3 と HR-30 の間にはアミノ酸配列レベルで弱い相同性が認められる。TargetP および PSORT 解析によれば、HR-3 や HR-30 のコードするタンパク質は N 末端側に分泌シグナルを持つと予想された。あるいは、これらは細胞接着に関わる因子なのかもしれない。このような遺伝子の発現が再分化培地に強く応答することが、NK-219mm-0 の良好な再分化に関わる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

①Moritani M, Taguchi K, Kitazaki K, Matsuhira H, Katsuyama T, Mikami T, Kubo T, Identification of the predominant nonrestoring allele for Owen-type

cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): development of molecular markers for the maintainer genotype, *Molecular Breeding*, 査読有り, 2013, doi: 10.1007/s11032-013-9854-8

②Matsunaga M, Takahashi Y, Yui-Kurino R, Mikami T, Kubo T, Evolutionary aspects of a unique internal mitochondrial targeting signal in nuclear-migrated *rps19* of sugar beet (*Beta vulgaris*), *Gene*, 査読有り, Vol. 517, 2013, pp. 19-26.

③Matsuhira H, Kagami H, Kurata M, Kitazaki K, Matsunaga M, Hamaguchi Y, Hagihara E, Ueda M, Harada M, Muramatsu A, Yui-Kurino R, Taguchi K, Tamagake H, Mikami T, Kubo T, Unusual and typical features of a novel restorer-of-fertility gene of sugar beet (*Beta vulgaris* L.), *Genetics*, 査読有り, Vol. 192, 2012, pp. 1347-1358.

④Kagami H, Nagano H, Takahashi Y, Mikami T, Kubo T, Is RNA editing implicated in group II intron survival in the angiosperm mitochondrial genome?, *Genome*, 査読有り, Vol. 55, 2012, pp. 75-79.

⑤Yoshida Y, Matsunaga M, Cheng D, Xu D, Honma Y, Mikami T, Kubo T, Mitochondrial minisatellite polymorphisms in fodder and sugar beets reveal genetic bottlenecks associated with domestication, *Biologia Plantarum*, 査読有り, Vol. 56, 2012, pp. 369-372.

⑥Taguchi K, Kubo T, Takahashi H, Abe H, Identification and precise mapping of resistant QTLs of *Cercospora* leaf spot resistance in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), *G3: Genes / Genomes / Genetics*, 査読有り, Vol. 1, 2011, pp. 283-291.

⑦Kitazaki K, Kubo T, Kagami H, Matsumoto T, Fujita A, Matsuhira H, Matsunaga M, Mikami T, A horizontally transferred tRNA<sup>Cys</sup> gene in the sugar beet mitochondrial genome: evidence that the gene is present in diverse angiosperms and its transcript is aminoacylated, *The Plant Journal*, 査読有り, Vol. 68, 2011, pp. 262-272.

⑧Honma Y, Yoshida Y, Terachi T, Toriyama K, Mikami T, Kubo T, Polymorphic minisatellites in the mitochondrial DNAs of *Oryza* and *Brassica*, *Current Genetics*, 査読有り, Vol. 57, 2011, pp. 261-270.

⑨Matsunaga M, Nagano H, Mikami T, Kubo T, Large 3' UTR of sugar beet *rps3* is truncated in cytoplasmic male-sterile mitochondria, *Plant Cell Reports*, 査読有り, Vol. 30, 2011, pp. 231-238.

〔学会発表〕（計5件）

- ①Kagami H, Matsuhira H, Taguchi K, Kubo T, Mikami T, Production of transformation-competent sugar beet (*Beta vulgaris* L.) with annual habitat: a basis for sugar beet research, International Conference on Agricultural Biodiversity and Sustainability 2012, August 29th, 2012, Hokkaido University
- ②鏡豊代、田口和憲、久保友彦、三上哲夫、テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性における花粉稔性回復遺伝子 *Rf1* のプロモーター解析、日本育種学会第 121 回講演会、2012 年 3 月 30 日、宇都宮大学
- ③松平洋明、鏡豊代、田口和憲、久保友彦、三上哲夫、高度培養適性を保持するテンサイ系統において再分化過程で特異的に発現する遺伝子の探索、日本育種学会第 120 回講演会、2011 年 9 月 23 日、福井県立大学
- ④鏡豊代、松平洋明、久保友彦、三上哲夫、形質転換可能な一年生テンサイ作出の試み：テンサイ生殖研究の基盤研究、日本育種学会第 120 回講演会、2011 年 9 月 23 日、福井県立大学
- ⑤鏡豊代、松平洋明、久保友彦、三上哲夫、テンサイカルスからの再分化能は遺伝的制御下にある、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保 友彦 (KUBO TOMOHIKO)  
北海道大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：40261333

### (2) 研究分担者

田口 和憲 (TAGUCHI KAZUNORI)  
農業・食品産業技術総合研究機構・北海道  
農業研究センター・主任研究員  
研究者番号：80414754

### (3) 研究分担者

松平 洋明 (MATSUHIRA HIROAKI)  
農業・食品産業技術総合研究機構・北海道  
農業研究センター・研究員  
研究者番号：90549247