

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658033

研究課題名(和文) 遺伝子発現特性に基づくカンキツ自家不和合性遺伝子の単離

研究課題名(英文) Isolation of citrus self-incompatibility gene based on the gene expression profile

研究代表者

久保 達也 (KUBO, TATSUYA)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：70359983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：カンキツ自家不和合性遺伝子の単離を目的として蕾の発育段階の違いでサブトラクションを行い、花柱特異性によりcitT209を単離した。機能推定の結果、citT209はCu/Zn SODであると推定された。一方、カンキツの蕾にCuSO<sub>4</sub>処理することによって自家不和合性が打破される可能性を示した。更に、CuSO<sub>4</sub>により抗酸化酵素であるCu/Zn SOD遺伝子の発現量が高まることが明らかとなり、更に活性酸素が花粉の発芽および花粉管伸長を抑制することも明らかとなった。蕾へのCuSO<sub>4</sub>処理により、Cu/Zn SOD遺伝子の発現量が増大し、活性酸素の除去によって不和合性の打破効果が得られるものと推察された。

研究成果の概要(英文)：We performed gene expression subtraction of the difference in developmental stages of bud for the purpose of isolation of citrus self-incompatibility gene. As a result, citT209 was isolated by stylar specificity. Performing the function estimation, it was estimated be a Cu / Zn SOD. On the other hand, self-incompatibility of citrus was shown could be overcome by CuSO<sub>4</sub> sprays to bud. In addition, it is enhanced by CuSO<sub>4</sub> sprays to bud has revealed that the expression level of Cu / Zn SOD gene, which is an antioxidant enzyme. The pollen tube growth and germination of the pollen is inhibited by the active oxygen. Expression level of Cu / Zn SOD gene is increased by spraying CuSO<sub>4</sub> to bud, as a result, was suggested that active oxygen is removed, overcoming the effects of incompatibility can be obtained.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：カンキツ 自家不和合性

### 1. 研究開始当初の背景

カンキツ類における自家不和合性は結実不良の一因であるが、一方で、単為結果性が備わった場合には無核果実の生産に繋がる重要な形質である。逆に、単為結果性が備わっていても、自家和合性であれば種子が多くなる可能性が高くなり、商品的価値が低下する。

カンキツ類の自家不和合性遺伝子について、若菜ら (2011) は、蕾自家受粉により遺伝子型がホモである 8 種類の実生群 (S1S1, S2S2, -, S11S11) を作出し、これらの花粉を多数のカンキツに授粉して、S1 から S11 までの不和合性対立遺伝子を持つ品種群を明らかにしている。また、交配後 1 年で幼樹開花した実生の不和合性と和合性を基に、S 遺伝子と連鎖する DNA マーカーの決定がなされたが、S 遺伝子のクローニングには至っていない。Miao ら (2011) は *Citrus reticulata* 種に属する、自家不和合性の 'Wuzishatangju' と和合性の 'Shatangju' を用いて、バラ科果樹などの自家不和合性遺伝子の本体とされる S-RNase のホモログを単離した。しかし、その遺伝子は子房での発現量が極めて高く、発現時期が遅いという理由から、彼らは、子房の自家不和合性 (ovarian self-incompatibility, OSI) に関わる遅延作用型自家不和合性 (Late-acting self-incompatibility, LSI) 遺伝子であると結論付けた。

カンキツの自家不和合性は、花柱内で花粉管伸長が停止する配偶体型自家不和合性であるが (Yamamoto ら、2006)、未だ自家不和合性遺伝子の本体は単離されておらず、詳細なメカニズムについても不明である。

### 2. 研究の目的

本研究は、カンキツ類の自家不和合性関連遺伝子を単離し、カンキツの自家不和合性機構の解明に資することである。また、既存品種の S 遺伝子型を決定することによって、カンキツの交雑育種を進める上での品種選定の一助とすることを目的とする。

そのために、これまで知られている自家不和合性遺伝子の発現特性に着目し、発現特性を利用したスクリーニングにより自家不和合性遺伝子の単離を試みた。同時に、関連遺伝子の単離と機能解析を実施した。

### 3. 研究の方法

2011 年

(1) サブトラクションライブラリー (SSH ライブラリー) の作成

開花直前および開花 5 ~ 6 日前の 'ノバ' の花柱を採取し、それぞれ mRNA を抽出した。Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit を使用してサブトラクションを行い、開花直前の時点で発現量が增大する花柱 mRNA だけを増幅させた。それらの産物を pCR ベクターにライゲーションし、cDNA サブトラクシ

ョンライブラリーを作成した。

2011-2012 年

(2) SSH ライブラリーの網羅的解析

(1) で得られたライブラリーのクローン塩基配列を網羅的に決定し、DNA データベース (カンキツ EST を含む) の検索によって機能推定・発現組織の推定を行い S 遺伝子候補かどうかの検討を行った。

(3) 組織特異性によるスクリーニング

(2) で候補として挙げられた遺伝子について、花の各器官 (花柱、子房、葯、花糸、花弁、ガク) および葉における発現を RT-PCR およびリアルタイム PCR によって確認し、スクリーニングを行った。

(4) 品種間における多型の検出

S 遺伝子型が推定されているクレメンティンマンダリンを中心とした類縁関係にあるいくつかの品種について、各品種のゲノム DNA を鋳型にした PCR、あるいは AFLP により DNA 多型の検出を試みた。

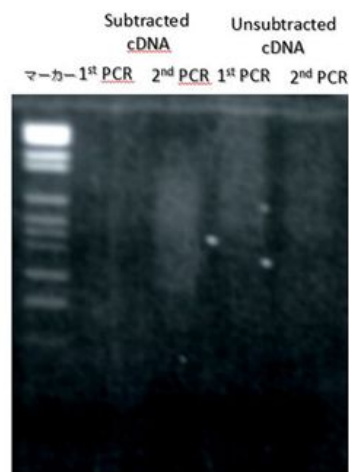
2013 年

(5) 機能解析

カンキツの自家不和合性に関連することが推定されたスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の役割を明らかにするために、活性酸素が花粉管伸長に及ぼす影響と、SOD による活性酸素除去が花粉管伸長に及ぼす影響を調査した。

### 4. 研究成果

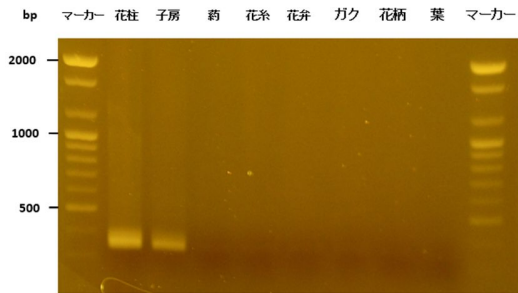
まず、開花直前および開花 5 ~ 6 日前の 'ノバ' の花柱から mRNA を調製し、開花直前と開花 5 ~ 6 日花柱で発現する遺伝子について RNA レベルで引き算を行い、cDNA サブトラクションライブラリーを作成した (第 1 図)。



第1図 ノバマンダリンの花柱から作成した cDNA サブトラクションライブラリー

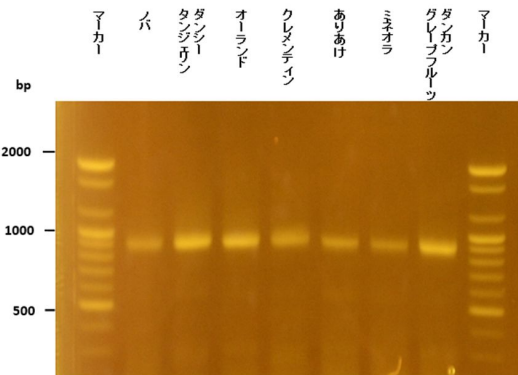
この cDNA サブトラクションライブラリーについて、網羅的に塩基配列を決定し、222 クローンを得た。

自家不和合性遺伝子の発現特性の一つが花柱特異性である。そこで、単離したクローンについて、カンキツ EST データベースを含む DNA データベースの BLAST 検索を行い、その中から花、果実等の生殖関連器官で存在が報告されている遺伝子を抽出し、更に RT-PCR により花柱特異性を調査した(第 2 図)。その結果、citT209 のみが候補として検出された。



第2図 遺伝子発現特性によりスクリーニングされた citT209の花器官特異性

さらに、交配試験から S 遺伝子型を推定しているカンキツ群について、各遺伝子型間の多型の有無を調査した(第 3 図)。



第3図 クレメンティン血縁品種間におけるcitT209の多型の有無の確認

しかしながら、ノバを含むクレメンティン血縁品種間では、citT209 の多型は検出されなかった。更に、確認のため、PCR 産物を制限酵素で切断し AFLP による多型の検出も試みたが、多型は検出されず、このことから citT209 はカンキツの S 遺伝子の本体ではないと推察された。

BLAST 検索の結果、citT209 は抗酸化酵素である Cu/Zn タイプ (Cu と Zn の両方と結合する) のスーパーオキシドジスムターゼと推定された。また、サブトラクションライブラリーの中にはキチナーゼや PR1

(pathogenesis-related protein 1) など抗菌性に関する遺伝子が多く含まれていた。おそらく生殖器官を保護するために発現量が増えるものと推察された。

2011 年か 2013 年のいずれの交配試験にお

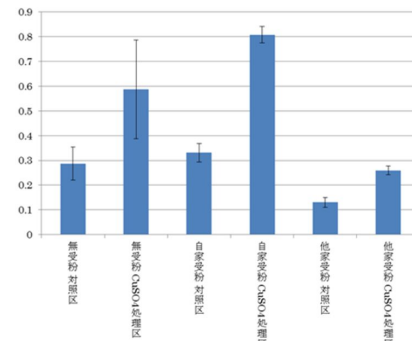
いても、CuSO<sub>4</sub> 処理による自家不和合性打破効果が確認された(第 1 表)。Cu イオンをはじめとする重金属イオンについては、ナシやリンゴにおいて自家不和合性を打破する効果が報告されている(堀川ら、2007)。

第 1 表 自家受粉および他家受粉したノバの花粉管伸長に及ぼす CuSO<sub>4</sub> の影響

組み合わせ	処理区	花柱各部位の花粉管数			下部/上部×100
		上部	中部	下部	
自家受粉					
×ノバ	対照区(水)	1.0	0.0	0.0	0.0
×ノバ	硫酸銅処理区	2.0	0.5	0.38	19.0
他家受粉					
×アマナツ	対照区(水)	110.25	64.75	53.25	48.30
×アマナツ	硫酸銅処理区	181.25	116.25	60.63	33.45
無受粉					
	対照区(水)	0.0	0.0	0.0	0.0
	硫酸銅処理区	0.0	0.0	0.0	0.0

そこで、CuSO<sub>4</sub> 処理の自家不和合性打破の効果は Cu/Zn SOD を介しているのではないかという仮説のもと、CuSO<sub>4</sub> 処理が Cu/Zn SOD 遺伝子の発現に及ぼす影響を調査した。

受粉後 5 日目の花柱の各処理区における Cu/Zn SOD の発現量の比較を、リアルタイム PCR によって行った。その結果、Cu/Zn SOD の発現量は対照区と比べ CuSO<sub>4</sub> 処理区で高かった(第 4 図)。



第4図 CuSO<sub>4</sub>処理が受粉後5日目の花柱における Cu/Zn SOD (citT209) の発現に及ぼす影響

このことから、CuSO<sub>4</sub> 処理により Cu/Zn SOD 遺伝子の発現量が増大することが示唆され、CuSO<sub>4</sub> 処理の自家不和合性打破は Cu/Zn SOD を介している可能性が高いと考えられた。

そこで、活性酸素による影響を明らかにするために、寒天培地上で Hypoxanthine に Xanthine Oxidase を加えることで活性酸素を発生させ、花粉管伸長に及ぼす影響を調査した。その結果、活性酸素の発生量が増加するにつれて、発芽率が低下し花粉管長が抑制された(第 2 表)。

第 2 表 活性酸素がカンキツ花粉の発芽および花粉管長に及ぼす影響

Xanthine Oxidase	発芽率	花粉管長(全ての花粉)	花粉管長(発芽花粉のみ)
0Unit	2.30%	6.09μm	280.11μm
0.001Unit	1.50%	3.00μm	197.55μm
0.01Unit	1.16%	0.77μm	72.00μm
0.1Unit	0.50%	0.13μm	8.88μm
1Unit	0.00%	0.00μm	0.00μm

テッポウユリでは、自家受粉の際、雌しべでは自家花粉の出現によりストレス状態となり活性酸素が発生し、花粉管の伸長に関する代謝系がスムーズに進行しないことが報告されている(手塚, 1995)。カンキツにおいても、活性酸素が花粉管伸長の抑制効果をもたらしている可能性が考えられた。

次に、カンキツの自家不和合性機構における SOD の働きを明らかにするため、SOD による活性酸素除去の効果を調査した。その結果、SOD の濃度が高くなるにつれて、発芽率は上昇し、花粉管長は長くなった(第 3 表)。

第 3 表 SOD による活性酸素除去がカンキツ花粉の発芽および花粉管長に及ぼす影響

SOD	発芽率	花粉管長(全ての花粉)	花粉管長(発芽花粉のみ)
0Unit	5.00%	8.33 $\mu$ m	169.56 $\mu$ m
0.1Unit	5.00%	9.10 $\mu$ m	179.42 $\mu$ m
1Unit	5.00%	11.49 $\mu$ m	218.58 $\mu$ m
10Unit	7.50%	25.12 $\mu$ m	330.14 $\mu$ m
100Unit	9.66%	27.82 $\mu$ m	288.03 $\mu$ m

以上のことから、まず Cu/Zn SOD は  $\text{CuSO}_4$  処理により発現量が増大し、抗酸化作用が高まることが考えられた。そして活性が高まることで活性酸素が一部除去され、花粉管伸長の抑制が緩和されることが示唆された。 $\text{CuSO}_4$  処理を行うと自家受粉の場合もわずかながら花粉管が伸長したが、これは  $\text{CuSO}_4$  処理により花柱での Cu/Zn SOD の発現量が高まり、活性酸素が除去されたからだと考えられた。

本研究において、カンキツの自家不和合性遺伝子の本体の単離には至らなかったが、自家不和合性もしくは花粉管伸長に影響する要因の一つを明らかにすることができた。

## 5 . 研究組織

### (1)研究代表者

久保 達也 (KUBO, Tatsuya)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号 : 70359983