

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658029

研究課題名(和文) 無核紀州型無核性カンキツの胚の発育停止はゲノムインプリンティング変異に起因するか

研究課題名(英文) Is arrested embryo development of seedless Kishu mandarin related to genomic imprinting gene?

研究代表者

北島 宣 (Kitajima, Akira)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70135549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナで明らかにされているインプリンティング遺伝子MEA、DME、MET1、FIS2、FWA、PHE、SSRP1と相同性の高いカンキツ遺伝子CLF、SWN、DME、ROS、MET1、FIS2、FWA、FWA2、PHEa、PHEb、SSRPが得られた。これら遺伝子について、無核紀州と大橋のcDNAにおける塩基配列を調査した結果、8遺伝子にSNPが検出された。無核紀州と大橋のcDNAにおいて異なるアリルをホモで持つ多型はFWAとPHEbであった。大橋に無核紀州を交配した若い種子で発現するFWAは花粉親の無核紀州型のみであり、FWAはインプリンティング遺伝子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is reported that MEA, DME, MET1, FIS2, FWA, PHE, SSRP1 are genomic imprinting genes in Arabidopsis. Citrus homologue genes of these genomic imprinting genes were CLF, SWN, DME, ROS, MET1, FIS2, FWA, FWA2, PHEa, PHEb and SSRP. Genomic DNA and cDNA of Seedless Kishu, Seedy Kishu mandarin and Otachibana pummelo were used for PCR by specific primer of these citrus homologue genes. The amplified products were sequenced. The SNPs were detected in 9 genes of genomic DNA and 8 genes of cDNA. To investigate the genomic imprinting gene expressions in endosperm or embryo crossed by Kishu and Otachibana, different homozygous SNP sequence between Kishu and Otachibana imprinting gene is necessary. These SNP polymorphisms are detected in FWA and PHEb.

The expression of FWA in young seeds resulted from Otachibana X Seedless Kishu was investigated, and only 'Seedless Kishu' FWA was expressed. This result indicated that citrus FWA would be genomic imprinting gene.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生産環境農学・園芸科学

キーワード：果樹 カンキツ 無核性 胚乳 ゲノムインプリンティング

1. 研究開始当初の背景

植物のゲノムインプリンティングに関する研究はシロイヌナズナ、イネ、キンギョソウなどのモデル植物を用いて行われており、シロイヌナズナでは母親由来でインプリントを受ける遺伝子や父親由来でインプリントを受ける遺伝子など、いくつかのインプリント遺伝子が同定されている。母親由来でインプリントを受ける遺伝子としてポリコム複合体の因子をコードする MEDEA (MEA) や FERTILIZATION-IN-DEPENDENT SEED2 (FIS2)、ホメオボックスを持つ FWA が、父親由来でインプリントを受ける遺伝子として MADS ボックスを有する PHERES1 (PHE1) などが報告されている。これまでの知見から、雌性配偶体において、中央細胞で DNA グリコシラーゼである DME が特異的に発現し、MEA、FIS2、FWA 遺伝子のプロモーター領域が脱メチル化されて発現抑制が解除されるとともに、MEA を含むポリコム複合体が PHE1 のヒストンメチル化を介して中央細胞における PHE1 の発現抑制を維持していると考えられている。また、花粉の精細胞では、MEA などの母親由来でインプリントを受ける遺伝子はサイレンシングを受けて発現抑制状態が維持されるが、PHE1 の発現抑制は解除される。受精後に形成される胚乳細胞ではポリコム複合体により、ヒストンメチル化を介して花粉親由来の MEA のアレルや、種子親由来の PHE1 のアレルの発現が抑制され、種子親由来の MEA、FIS2、FWA アレルおよび花粉由来の PHE1 アレルが発現することにより、正常な胚乳組織が形成され、胚が発育すると考えられている。また、酵母から哺乳類まで広く保存されたヒストンシャペロン複合体 FACT (facilitates chromatin transcription/transaction) の構成タンパク質である SSRP1 が、ヒストン H2A およびヒストン H2B に結合し、転写開始や転写伸長などの際に機能しているとされている。最近シロイヌナズナにおいて、SSRP1 遺伝子は母親特異的なインプリント遺伝子の発現や DNA の脱メチル化に必要であることが明らかにされている。しかし、カンキツにおいてインプリント遺伝子発現に関する報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、インプリント遺伝子 MEA、FIS2、FWA、PHE1 および関連遺伝子の DME、SSRP1 について、カンキツにおけるオーソログ遺伝子を同定し、品種間のアレル特異性を基に、胚乳細胞で発現する遺伝子が種子親由来か花粉親由来かを識別できる基盤を整備する。完全種子を形成する単胚性の ' 紀州蜜柑 ' (本ミカン)、' 大橋 ' および無核紀州型無核性の ' 無核紀州 ' を用い、キシウミ

カン有核の野生型と無核の変異型と ' 大橋 ' を交配し、種子や胚乳におけるオーソログ遺伝子の発現を調査し、インプリンティング遺伝子である可能性を明らかにする。

3・4. 研究の方法および成果

対象遺伝子各種について、シロイヌナズナのアミノ酸配列を TAIR より取得し、それらをクエリとして、オレンジ及びクレメンティンの CDS 配列及びゲノム配列を TBLASTN 解析により同源性検索を行い、各遺伝子に相同な CDS 及びゲノム配列を取得した。取得した遺伝子断片の同源性検索の結果を表 1 に示す。各遺伝子の状況は以下の通りである。

MEDEA (MEA)

MEA に対して相同な配列を取得できなかったが、MEA と同じファミリーに属する CURLY LEAF (CLF)、SWINGER (SWN) の 2 種を取得した。

DEMETER (DME) DNA グリコシラーゼ。

DME に対して相同な配列及び、DME と同一ファミリーに属する REPRESSOR OF SILENCING (ROS)1 に対して相同な配列を取得した。

METHYL TRANSFERASE (MET) 1 維持型 DNA メチルトランスフェラーゼ。

MET1 に対して相同な配列を取得した。

FERTILIZATION INDEPENDENT SEED (FIS) 2 VEFS ファミリー遺伝子。

FIS2 に対して相同な配列は無かった。FIS2 と同じ VEFS ファミリーに属する EMBRYONIC FLOWER (EMF)2 に対して相同な配列を取得した。

FLOWERING WAGENINGEN (FWA) HD-ZIP homeobox family 遺伝子。

FWA に相同な 2 種 (FWA、FWA2) の配列を取得した。

PHERES (PHE) MADS ボックスタンパク質。

PHE に相同な配列は無かった。最も同源性の高い配列は Agamous-like の MADS ボックス遺伝子であり、この配列として 2 種 (PHEa、PHEb) を取得した。

STRUCTURE-SPECIFIC

RECOGNITION PROTEIN (SSRP)

SSRP に対して相同な配列を取得した。

それぞれの遺伝子配列を元にして特異的プライマーを設計し、ゲノム及び cDNA をテンプレートとした PCR により増幅断片を取得して対象遺伝子のゲノム配列および mRNA 配列を決定した。プライマーは cDNA をテンプレートとした場合に 約 1kb を増幅するプライマーセット (同源性の確認用)、約 300bp を増幅するプライマーセットの 2 種類 (リアルタイム PCR 及びアレル特異的発現の調査用) を設計した。この内、の約 300bp を増幅するプライマーセットでゲノム及び cDNA をテンプレートとして PCR 増幅を行った場合の結果を図 1 に示す。それぞれのプライマーセットで増幅した場合のサイズは

表 2 に示す。それぞれの遺伝子について、ゲノム及び cDNA をテンプレートとした場合に増幅産物を得ることができたが、SWN、SSRP、FWA2 では cDNA をテンプレートとした場合に弱いバックグラウンドが発生した。PHEa は弱い増幅が認められたが、多数のバンドが増幅しておりプライマーの質に問題があると考えられた。

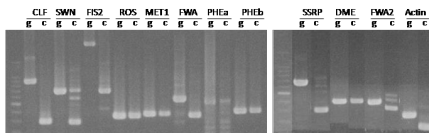


図 1 各遺伝子の PCR 増幅パターン (g: ゲノム DNA、c: cDNA での増幅結果)

Actin は内性コントロール遺伝子として使用した。

表 2 対象遺伝子のサイズと cDNA 配列に検出された多型数

Gene	Genomic DNA			cDNA		
	Size(bp)	Exon	Intron	Size(bp)	Hetero / Homo	Homo / Homo
CLF	915	0	7	291	—	—
SWN	681	2	4	277	2	0
DME	361	1	—	361	1	0
ROS	350	2	—	350	1	1
MET1	367	4	—	367	0	4
FIS2	1037	0	—	346	—	—
FWA	569	3	5	353	1	2
FWA2	415	2	2	287	2	0
PHEb	388	5	—	388	0	5
SSRP	713	1	7	295	1	0

ND: 未決定 (イントロン構造を決定していないため) - : データ無し

の cDNA をテンプレートとして約 300bp の増幅を行うプライマーセットについて、増幅産物の塩基配列を決定して大橋とマンダリン (無核紀州もしくは平紀州) の間で配列比較を行い、検出された SNP についてエキソン内とイントロン内の数を示した。

PCR 増幅断片内では、CLF、FIS2 以外の遺伝子ではエキソン領域に SNP が認められた。エキソン領域に検出された SNP を大橋と無核紀州 (本ミカンも同一配列) の間で比較した場合に、両品種が異なるアリルをホモで持つ場合 (例: 大橋 A/A、無核紀州 T/T、Homo / Homo と表記) と、片側の品種がヘテロでもう一方の品種がホモ (例: 大橋 A/T、無核紀州 T/T、Hetero / Homo と表記) の場合があった。調査した遺伝子の内、FWA、PHEb には大橋とマンダリン品種の間の交配でインプリンティングを評価するために有効な Homo / Homo の多型が認められ、これらの遺伝子が調査に使用可能である。

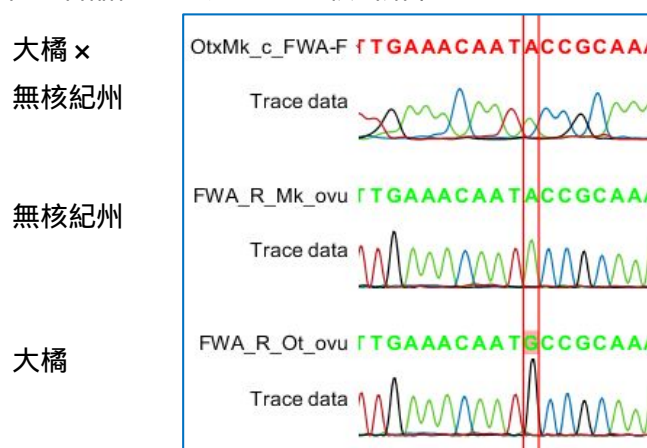
FWA 遺伝子の SNP について、胚珠から得た cDNA を用いて増幅した RT-PCR 産物のシーケンスを決定した。発現遺伝子の SNP 型は、大橋では G/G であったのに対して、本ミカン及び無核紀州は A/A であり、大橋 × 無核紀州

では A/A であった (図 2 および表 4)。この結果は、FWA 遺伝子は花粉親のアリルが胚珠において発現していることを示す。このような形でインプリンティングの可能性を調査可能である。

表 4 FWA 遺伝子に認められた SNP 遺伝子型

品種名	SNP 遺伝子型
大橋	G/G
本ミカン	A/A
無核紀州	A/A
大橋 × 無核紀州	A/A

図 2 各品種における SNP の検出結果



胚珠組織での各遺伝子の発現を調べるため、開花後の胚珠から経時的に RNA を抽出した。RNA 抽出は、無核紀州 (ポット植え、5 号露地での栽培) 本ミカン (ポット植え、5 号露地での栽培) 大橋 (露地植え、高接ぎ樹) からサンプルを採取した。ISOGEN による粗抽出を行った後、RNeasy により精製し、Qubit RNA HS キットにより定量を行い、50ng の total RNA を用いて Quantitect cDNA synthesis kit を用いて cDNA 合成を行った。35 サイクルの RT-PCR 解析の結果、開花 4 週間後以降の胚珠から得た RNA では遺伝子発現を見ることができなかった。これらのサンプルでは発現していない、RNA 品質に問題があり解析できていない、といった理由が考えられる。これらのサンプルでは内生コントロールとして用いた Actin 遺伝子の発現が若干低いことから RNA の品質に問題が高いと考えられるため、抽出法を再検討した。大橋 × 本ミカンの開花後 12 週のサンプル (図 2 と同じもの) では CLF、DME、FIS2 の発現は低い、胚乳から抽出した無核紀州および本ミカンの開花後 10 週のサンプルでは 3 遺伝子全ての発現が確認された。この結果は、開花 10 週後の胚珠においてこれらの遺伝子が発現していることを示し、図 2 で開花後 4 週

以降のサンプルで発現の認められなかったのは、RNA 抽出に問題があるために起こったと考えられる。

以上のように、大橋を種子親とし、無核紀州を花粉親としたときに、種子において無核紀州の FWA 遺伝子のみが発現することが明らかとなり、FWA 遺伝子はゲノムインプリンティング遺伝子であることが示唆された。また、このような手法によりゲノムインプリンティング遺伝子発現の調査が可能であることが示された。今後、無核紀州の無核性がゲノムインプリンティング遺伝子と関連するかを明らかにするためには、他のホモログ遺伝子において無核紀州と Homo / Homo の多型が認められる単胚性の有核品種を探索する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.farm.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 宣 (KITAJIMA, Akira)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70135549

(2) 研究分担者

山崎 安津 (YAMASAKI, Atsu)

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構・研究員

研究者番号：70582584