

委託プロジェクト研究
「ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発」
平成29年度 最終年度報告書

13405844

園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発

研究実施期間	平成25年度～平成29年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹茶業研究部門
研究開発責任者	山本 俊哉
共同研究機関	国立大学法人 岩手大学農学部
	国立大学法人 東北大学大学院農学研究科
	学校法人 京都産業大学総合生命科学部
	京都府公立大学法人 京都府立大学大学院生命環境科学研究科
	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（野菜花き研究部門）
	公益財団法人 かずさDNA研究所
普及・実用化支援組織	
研究開発責任者 連絡先	TEL : 029-838-6474 FAX : 029-838-6437 E-mail : toshiya@affrc.go.jp

<別紙様式3. 最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1. マップベースクローニング法によるキュウリの黄化えそ病抵抗性遺伝子の単離 (1) 抵抗性遺伝子領域の絞り込み	←		→			農研機構 野菜花き研究部門	ウリ科・イチゴユニット
			←	→			
				←	→		
(2) 抵抗性遺伝子候補の特定			←	→		農研機構 野菜花き研究部門	ウリ科・イチゴユニット
(3) 抵抗性遺伝子の同定				←	→	農研機構 野菜花き研究部門	ウリ科・イチゴユニット
2. ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子の単離 (1) <i>CRb</i> 遺伝子の単離発	←		→			農研機構 野菜花き研究部門	アブラナ科ユニット
	←				→		
	←				→		
	←				→		
(2) <i>Crr1b</i> 遺伝子の単離	←				→	岩手大学 農研機構 野菜花き研究部門	植物育種学研究室 アブラナ科ユニット
(3) <i>CRk</i> 遺伝子の単離	←				→	岩手大学 農研機構 野菜花き研究部門	植物育種学研究室 アブラナ科ユニット
(4) 抵抗性遺伝子アレルの機能解析と高精度マーカーセットの開発			←		→	岩手大学	植物育種学研究室

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
3. トマト単為結果性およびトマト黄化葉巻病抵抗性に関与する新規遺伝子の単離							
(1) 花粉への変異原処理による突然変異集団の育成						農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域 ゲノム解析ユニット
①花粉へのUV照射条件の検討と突然変異体集団の育成							
②花粉への化学変異原等処理条件の検討と突然変異体集団の育成							
(2) 超並列シーケンサーを用いた変異検出手法と一塩基多型タイピング法の開発						かずさDNA研	先端研究部 植物ゲノム・遺伝学研究室
①突然変異体集団の変異検索手法の検討と変異検索							
②遺伝資源の変異検索手法の検討と変異検索							
③戻し交雑個体の選抜法の確立							
(3) トマト単為結果性およびトマト黄化葉巻病抵抗性に関与する遺伝子の新規変異体の獲得							
①トマト単為結果性関連遺伝子の選定							
②トマト黄化葉巻病抵抗性関連遺伝子の選定							
③突然変異体および遺伝資源の選抜と表現系評価							

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
4. ナス単為結果性を制御する原因遺伝子の単離							
(1) ナス単為結果性遺伝子Cop8.1の単離						農研機構野菜花き部門	ゲノム解析ユニット
①候補領域の全塩基配列決定形質転換用コンストラクトの構築と遺伝子組み換えナスの作出	←→						
②網羅的マーカー開発	←→						
③遺伝子発現解析			←→				
④形質転換用コンストラクトの構築と遺伝子組み換えナスの作出			←→				
⑤原因遺伝子の同定とDNAマーカーの開発				←→			
⑥バイサルファイトシーケンス法によるメチル化状態の性状解析					←→		
(2) ナス単為結果性遺伝子Cop3.1の単離	←→					農研機構野菜花き部門	ゲノム解析ユニット
①ラフマッピング	←→						
②網羅的マーカー開発		←→					
③詳細マッピング			←→				
(3) ナス遺伝資源内に存在する単為結果性遺伝子の多様性調査				←→		農研機構野菜花き部門	ゲノム解析ユニット

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室		
	25	26	27	28	29	機関	研究室	
<p>5. ナスにおける花粉稔性回復遺伝子の単離</p> <p>(1) <i>Rf</i>候補遺伝子領域の絞り込み</p> <p><i>Rf</i>遺伝子の分離集団を用いて、<i>Rf</i>遺伝子のDNAマーカーを開発する。まず、<i>Rf</i>遺伝子に近接したDNAマーカーを検索する。その一方で、ナスの高密度連鎖地図を活用して、連鎖地図上での<i>Rf</i>遺伝子座位を特定しながら、<i>Rf</i>遺伝子の候補ゲノム領域を狭めていく。</p> <p>(2) <i>Rf</i>遺伝子のクローニング</p> <p><i>Rf</i>遺伝子を含む候補ゲノム領域を狭めた上で、候補ゲノム領域における<i>Rf</i>候補遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列を、稔性回復機能を持たない対立遺伝子座のものと比較する。また遺伝子産物の細胞内局在、遺伝子発現パターンを調べ、稔性回復との対応関係を評価する。さらに得られたDNAマーカーを用いて、我国内外のナスの遺伝資源について、広く<i>Rf</i>遺伝子の有無を調査する。</p> <p>(3) <i>Rf</i>遺伝子による稔性回復機構の解明</p> <p>大腸菌の系を利用して、<i>Rf</i>候補遺伝子が増殖速度に与える効果を調べる。また<i>Rf</i>候補遺伝子を導入した形質転換ナスを作成し、植物体内での発現と、実際の花粉稔性を調査する。</p>						京都産業大学 総合生命科学部 農業・食品産業技術総合研究機構	植物育種学 野菜育種・ゲノム研究領域・ナス科ユニット	
							京都産業大学 総合生命科学部 農業・食品産業技術総合研究機構	植物育種学 野菜育種・ゲノム研究領域・ナス科ユニット
							京都産業大学 総合生命科学部 農業・食品産業技術総合研究機構	植物育種学 野菜育種・ゲノム研究領域・ナス科ユニット

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
6. ダイコンのグルコシノレート含量を制御する遺伝子の単離							
(1) 4MTB-GSL合成酵素遺伝子の単離 ①遺伝子同定と機能解析	←→					農研機構野菜花き研究部門	アブラナ科ユニット
(2) グルコエルシン含量を制御する遺伝子の単離 ①グルコエルシン含量を制御する遺伝子座の同定	←→			→		農研機構野菜花き研究部門 東北大学	アブラナ科ユニット 植物遺伝育種学分野
②グルコエルシン含量を制御する遺伝子の同定と選抜マーカー開発				←→		東北大学 農研機構野菜花き研究部門	植物遺伝育種学分野 アブラナ科ユニット
7. アルタナリア病原菌と宿主植物との分子病理学的解析によるリンゴ斑点落葉病およびナシ黒斑病罹病性原因遺伝子の単離							
(1) リンゴ斑点落葉病高度罹病性遺伝子の単離	←→				→	農研機構果樹茶業研究部門	リンゴ育種ユニット、ゲノムユニット
(2) ニホンナシ黒斑病罹病性遺伝子の単離	←→				→	農研機構果樹茶業研究部門	ナシ・クリ育種ユニット、ゲノムユニット

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
8. リンゴの省力栽培に適したカラムナー樹形を制御する原因遺伝子の単離							
(1) 「Wijcik」の突然変異箇所の特定	←		→			農研機構果樹茶業研究部門	リンゴ育種ユニット
(2) カラムナー候補遺伝子の単離	←			→		農研機構果樹茶業研究部門	リンゴ育種ユニット、リンゴ栽培生理ユニット
(3) カラムナー選抜マーカーの開発					←	農研機構果樹茶業研究部門	リンゴ育種ユニット
(4) カラムナー候補遺伝子の機能解析	←				→	農研機構果樹茶業研究部門	リンゴ栽培生理ユニット、リンゴ育種ユニット
9. カンキツのβ-クリプトキサンチン高含有化のための遺伝子単離							
(1) シス因子で制御されるカロテノイド代謝遺伝子のアレルマーカーの開発	←		→			農研機構果樹茶業研究部門	カンキツゲノムユニット/カンキツ品種育成ユニット
(2) トランス因子で制御されるカロテノイド代謝遺伝子のアレルマーカーの開発	←		→			農研機構果樹茶業研究部門	カンキツゲノムユニット/カンキツ品種育成ユニット
(3) カロテノイド代謝に関与する転写因子遺伝子の機能解析	←		→			農研機構果樹茶業研究部門	カンキツゲノムユニット/流通利用・機能性ユニット

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
10. ニホングリ易渋皮剥皮遺伝子の単離							
(1) ニホングリ標準連鎖地図の構築	←→					農研機構果樹茶業研究部門	ナシ・クリ育種ユニット
(2) ニホングリBACライブラリーの構築	←→					農研機構果樹茶業研究部門	ナシ・クリ育種ユニット
(3) ニホングリ再分化系確立に向けた条件検討	←→					農研機構果樹茶業研究部門	ナシ・クリ育種ユニット
(4) 渋皮剥皮遺伝子座 (<i>Peeling</i>) のファインマッピング	←→				→	農研機構果樹茶業研究部門	ナシ・クリ育種ユニット
11. ニホンナシ果実の糖組成に関するDNAマーカーの開発							
(1) スクロース分解に関わる酸性インベルターゼの発現制御機構の解明とDNAマーカーの開発	←→					鳥取大学	農学部
					←→	京都府立大学	生命環境科学研究科
(2) スクロース蓄積に関わるスクロースリン酸合成酵素の発現制御機構の解明とDNAマーカーの開発	←→					鳥取大学	農学部
					←→	京都府立大学	生命環境科学研究科
(3) 実生集団を用いて網羅的発現解析による原因遺伝子の探索					←→	京都府立大学	生命環境科学研究科

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
12. ブドウべと病抵抗性のDNAマーカー開発							
(1) 集団ACを用いたブドウべと病抵抗性DNAマーカーの開発						農研機構果樹茶業研究部門	ブドウ・カキ育種ユニット
(2) ブドウ属近縁野生種由来のブドウべと病強度抵抗性DNAマーカーの開発						農研機構果樹茶業研究部門	ブドウ・カキ育種ユニット
(3) 国内べと病菌系統の収集並びに病原性調査						農研機構果樹茶業研究部門	ブドウ・カキ病害虫ユニット、ブドウ・カキ育種ユニット

I-2. 実施体制

課題 番号	研究項目	担当研究機関・研究室			研究担当者
		機関		研究室	
HOR 1001	マップベースクローニング法によるキュウリの黄化えそ病抵抗性遺伝子の単離	農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ゲノムユニット	◎ 山本 俊哉
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ウリ科・イチゴユニット	○ 川頭 洋一 (H25～H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ウリ科・イチゴユニット	下村 晃一郎 (H25～H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ウリ科・イチゴユニット	杉山 充啓 (H25～H29)
HOR 1002	ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子の単離	農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域		○ 島山 勝徳 (H25～H27)
		岩手大学	農学部	植物育種学研究室	○ 島山 勝徳 (H28～H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	アブラナ科ユニット	吹野 伸子 (H25～H29)
HOR 1003	トマト単為結果性およびトマト黄化葉巻病抵抗性に関する新規遺伝子の単離	農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ゲノム解析ユニット	○ 布目 司 (H25～H29)
		(公財) かずさDNA研究所	先端研究部	植物ゲノム・遺伝学研究室	白澤 健太 (H25～H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ゲノム解析ユニット	山口 博隆 (H25～H29)
HOR 1004	ナス単為結果性を制御する原因遺伝子の単離	農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ゲノム解析ユニット	○ 宮武 宏治 (H25～H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ゲノム解析ユニット	福岡 浩之 (H25～H27)

HOR 1005	ナスにおける花粉稔性回復遺伝子の単離	京都産業大学	総合生命科学部		○ 山岸 博 (H25~H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ナス科ユニット	齊藤 猛雄 (H25~H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	ナス科ユニット	松永 啓 (H29)
HOR 1006	ダイコンのグルコシノレート含量を制御する遺伝子の単離	農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	アブラナ科ユニット	○ 吹野 伸子 (H25~H29)
		東北大学	大学院農学研究科	植物遺伝育種学分野	西尾 剛 (H25~H29)
		東北大学	大学院農学研究科	植物遺伝育種学分野	北柴 大泰 (H25~H29)
		農研機構 野菜花き研究部門	野菜育種・ゲノム研究領域	アブラナ科ユニット	柿崎 智博 (H25~H29)
HOR 2001	アルタナリア病原菌と宿主植物との分子病理学的解析によるリンゴ斑点落葉病およびナシ黒斑病罹病性原因遺伝子の単離	農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ナシ・クリ育種ユニット	○ 寺上 伸吾 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	リンゴ研究領域	リンゴ育種ユニット	森谷 茂樹 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	リンゴ研究領域	リンゴ病害虫ユニット	伊藤 伝 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	生産・流通研究領域	病害ユニット	足立 嘉彦 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	生産・流通研究領域	病害ユニット	中畝 良二 (H25~H28)

		農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ゲノムユニット	山本 俊哉 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ナシ・クリ育種ユニット	齋藤 寿広 (H25~H29)
HOR 2002	リンゴの省力栽培に適したカラムナー性樹形を制御する原因遺伝子の単離	農研機構 果樹茶業研究部門	リンゴ研究領域	リンゴ育種ユニット	○ 岡田 和馬 (H25~H29)
HOR 2003	カンキツのβ-クリプトキサンチン高含有化のための遺伝子単離	農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツゲノムユニット	○ 島田 武彦 (H25~H27)
		農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツゲノムユニット	藤井 浩 (H25~H27)
		農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツゲノムユニット	遠藤 朋子 (H25~H27)
		農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツ育種ユニット	野中 圭介 (H25~H27)
		農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツ育種ユニット	今井 篤 (H25~H27)
		農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツ流通利用・機能性ユニット	生駒 吉識 (H25)
		農研機構 果樹茶業研究部門	カンキツ研究領域	カンキツ流通利用・機能性ユニット	松本 光 (H25~H27)
HOR 2004	ニホングリ易渋皮剥皮遺伝子の単離	農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ナシ・クリ育種ユニット	○ 西尾 聡悟 (H25~H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	品種育成研究領域	ナシ・クリ育種ユニット	寺上 伸吾 (H25~H29)
HOR 2005	ニホンナシ果実の糖組成に関するDNAマーカーの開発	鳥取大学	農学部	分子園芸学研究室	○ 板井 章浩 (H25~H27)
		京都府立大学	大学院生命環境科学研究科	資源植物学研究室	○ 板井 章浩 (H28~H29)
		鳥取大学	農学部	植物病理学研究室	児玉 基一郎 (H27)

HOR 2006	ブドウべと病抵抗性のDNAマーカー開発	農研機構 果樹茶業研究部門	ブドウ・カキ研究領域	ブドウ・カキ育種ユニット	○ 河野 淳 (H25～H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	ブドウ・カキ研究領域	ブドウ・カキ育種ユニット	佐藤 明彦 (H25～H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	ブドウ・カキ研究領域	ブドウ・カキ病害虫ユニット	須崎 浩一 (H25～H29)
		農研機構 果樹茶業研究部門	ブドウ・カキ研究領域	ブドウ・カキ病害虫ユニット	清水 健雄 (H29)

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号	13405844	研究期間	平成25～29年度
大課題名	ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発		
中課題名	園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹茶業研究部門・山本俊哉		

I-1. 研究目的

わが国の農業において、野菜類や果樹類などの園芸作物は農家経営の安定と向上および消費者の食生活向上に欠かせない基幹作物である。今後園芸作物の利用技術の推進と生産者・消費者・産業界への目に見える成果が期待されており、そのための画期的な形質をもつ先導的な新品種の開発が強く求められている。園芸作物特有の多様性から求められる形質も様々であり、土壌病害や虫媒性ウイルス病などの重要病害に対する抵抗性、生産安定性の確保および省力低コスト化に資する果菜類の単為結果性や果樹のカラムナー性などの生理形態学的形質、消費者や産業界への訴求効果が高い良食味性や加工適性、易剥皮性などの品質・機能性成分関連形質など多岐にわたっている。

このため、本研究では、

1. キュウリの黄化えそ病抵抗性、ハクサイの根こぶ病抵抗性、トマトおよびナスの単為結果性、ダイコンの辛み成分特性、リンゴの斑点落葉病抵抗性とカラムナー性、カンキツのβ-クリプトキサンチン高含有化、クリの易渋皮剥皮性等を対象として、これら有用形質に関わる遺伝子もしくは遺伝子領域を同定して、新品種の開発に利用可能なDNAマーカーを開発することを目的とする。

その結果、

1. 本プロジェクトの対象となる園芸作物の有用形質を選抜できるDNAマーカーを開発し、先導的な新品種の育成により、生産コストの低減、生産安定、消費拡大や新需要創出による生産規模の拡大など生産者と消費者へ様々なメリットの還元が期待される。

I-2. 研究結果

1. HOR1001 マップベースクローニング法によるキュウリの黄化えそ病抵抗性遺伝子の単離（農研機構野菜花き研究部門）

抵抗性系統を用いたこれまでの解析から、黄化えそ病抵抗性に関する主要なQTLが第3連鎖群の約30 cMの領域に存在することが明らかになっている。本課題では、このQTLに存在する抵抗性遺伝子の領域を絞り込み、抵抗性遺伝子を単離する。具体的には、これまでに報告されているキュウリのゲノム配列やSSR情報を利用して、抵抗性系統と罹病性系統の間に多型のあるSSRや一塩基多型をQTL領域内に高密度に設定する。次に、QTL領域内の様々な場所で組換えが生じた系統を育成し、育成した系統の抵抗性検定を行うことにより、目的遺伝子の領域を絞り込む。さらに、絞り込んだ領域の塩基配列を明らかにし、抵抗性系統と罹病性系統間の塩基配列や遺伝子発現の比較により候補遺伝子を特定する。本委託プロジェクト期間中に、黄化えそ病抵抗性の「きゅうり中間母本農7号」を育成するとともに、黄化えそ病抵抗性遺伝子の領域を約20cM（約6,000kb）から約45kbに絞り込んだ（第3染色体）。

2. HOR1002 ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子の単離（岩手大学農学部、農研機構野菜花き研究部門）

ハクサイ類において同定されている8つの抵抗性遺伝子座のうち、4つの病原型（G1～G4）に対する抵抗性反応が異なる3つの主働遺伝子座、すなわち、G3、G4に抵抗性を発揮する*CRb*、G1、G4に抵抗性を発揮する*Crr1b*、G2、G3、G4に抵抗性を発揮する*CRk*について、抵抗性遺伝子を単離する。中間期までに*CRb*遺伝子の単離を完了し、終了時まで*Crr1b*と*CRk*を単離する。既に単離済みである*Crr1a*を加えた4つの抵抗性遺伝子のハクサイ品種群内の対立遺伝子（アレル）多様性と抵抗性程度との関係を解析し、高精度な選抜マーカーセットを構築する。本委託プロジェクト期間中に、*CRb*遺伝子を単離し、*Crr1b*遺伝子のゲノム構造を明らかにして2つの候補遺伝子を特定し、*CRk*座に病原型特異性が異なる2つの抵抗性遺伝子が存在することを明らかにしそれぞれの座乗領域を50kb、75kbに絞り込むことに成功した。

3. HOR1003 トマト単為結果性およびトマト黄化葉巻病抵抗性に関与する新規遺伝子の単離（農研機構野菜花き研究部門、かずさDNA研究所）

大規模な突然変異体集団・遺伝資源の網羅的選抜を可能とする超並列シーケンサー（NGS）を活用した効率的なDNA変異検出技術、およびDNA解析による変異検出に供試する解析集団を育成するために花粉への変異原処理による突然変異体集団作出技術を開発し、トマト単為結果性関連遺伝子およびトマト黄化葉巻病抵抗性関連遺伝子を標的として新規有用変異体を検索・獲得する。本委託プロジェクト期間中に、トマト種子への化学変異原ENU処理による突然変異体集団を育成し、NGSを用いたTAS法による標的遺伝子の変異体選抜手法を確立し、トマト単為結果性関連遺伝子やトマト黄化葉巻病抵抗性関連遺伝子を標的遺伝子に選定し、効率的な戻し交雑による新規育種素材の育成方法を確立した。

4. HOR1004 ナス単為結果性を制御する原因遺伝子の単離（農研機構野菜花き研究部門）

ナスの生産現場において、環境条件に左右されずに果実が肥大する単為結果性は非常に利用価値の高い形質である。しかし、単為結果性個体の選抜には多大な時間と労力を要することから、効率的な品種育成が困難であることが問題となってきた。そこで、我々は単為結果性ナス品種「あのみり」が有する単為結果性遺伝子を単離し高精度な選抜マーカーを開発することを目標とする。まず、「あのみり」が有する2つの単為結果性遺伝子

*Cop3. 1*と*Cop8. 1*について、非単為結果性系統LS1934を遺伝的背景に同遺伝子座を挿入した大量の分離集団を作出し、形質評価することにより遺伝学的に候補領域を絞り込む。次に絞り込んだ領域について、同じナス科に属するトマトのゲノム情報や独自に有するナス遺伝資源を利用して候補遺伝子の探索と絞り込みを進め遺伝子組換え植物により原因遺伝子を単離する。本委託プロジェクト期間中に、*Cop3. 1*、*Cop8. 1*を有する個体の選抜を可能にするマーカーを作出し、*Cop8. 1*座の同定ではGENE2の発現をRNAiで抑制することによりAE-P03の単為結果性の発現も抑制されることを確認し、*Cop8. 1*座近傍のメチル化解析ではGENE2を含む7.5kbの領域についてAE-P03と中生真黒のメチル化状態を確認し、GENE2のORFのメチル化状態がAE-P03において優位に低いレベルにあることを確認した。

5. HOR1005 ナスにおける花粉稔性回復遺伝子の単離（京都産業大学総合生命科学部、農研機構野菜花き研究部門）

我国の重要な野菜の1つであるナスは、極めて顕著な雑種強勢を示す。このため古くからF₁育種が行われており、我国の実用的な品種はほぼすべてF₁品種である。しかしながら、ナスのF₁育種は今日まで、人工的な除雄と人工授粉によって行われており、効率的で確実なF₁採種には至っていない。ナスのF₁育種の効率化ならびにナスの生産性向上のために、現在、細胞質雄性不稔-稔性回復系の開発と利用が強く期待されている。本研究課題では、細胞質雄性不稔を利用したナスのF₁育種に必須である稔性回復遺伝子（*Rf*遺伝子）を単離するとともに、我国内外のナスの遺伝資源において、稔性回復遺伝子の有無を判定するために利用可能なDNAマーカーを開発することを目的とする。本委託プロジェクト期間中に、*Rf*遺伝子は第6染色体上に密接に連鎖して複数存在することが明らかにし、これらの*Rf*遺伝子のうち、回復力の大きい遺伝子についてDNAマーカーを開発した。

6. HOR1006 ダイコンのグルコシノレート含量を制御する遺伝子の単離（農研機構野菜花き研究部門、東北大学大学院農学研究科）

遺伝学的・生化学的な解析により4MTB-GSL合成酵素遺伝子を同定するとともに、本遺伝子内に選抜マーカーを設計することで新品種育成の際に利用可能な高精度選抜マーカーを開発する。4MTB-GSLを欠失しグルコエルシン含量に差のある両親系統より育成した90個体・系統以上のF₂およびF₃解析集団を用いたQTL解析により、グルコエルシン含量を制御する染色体領域を正確に捕捉する。1カ所以上のQTLについて、原因遺伝子のポジショナルクローニングを行い、グルコエルシン含量を決定する遺伝子を同定する。本委託プロジェクト期間中に、4MTB-GSL合成酵素遺伝子の単離では遺伝子の単離および機能解析を完了し国内特許を出願し、グルコエルシン含量を制御する遺伝子の単離ではグルコエルシン含量に関わるQTLを検出し効果を確認するとともに座乗領域を絞り込んだ。

7. HOR2001 アルタナリア病原菌と宿主植物との分子病理学的解析によるリンゴ斑点落葉病およびナシ黒斑病罹病性原因遺伝子の単離（農研機構果樹茶業研究部門）

リンゴ斑点落葉病およびニホンナシ黒斑病は、病原菌*Alternaria alternata*によって引き起こされるリンゴ・ニホンナシ栽培における最重要病害の一つである。その発病メカニズムや宿主範囲は、それぞれの病原菌が生産する宿主特異的毒素によって決定されている。リンゴ斑点落葉病菌、*A. alternata*（リンゴ病原タイプ）はAMトキシンを生産し、栽培の60%以上を占める主要品種「ふじ」、「王林」、「陸奥」などが罹病性であるため、5月下旬の落花期頃からその年の防除が終了するまで、殺菌剤の散布が欠かせない（我々の試算では約70億円の殺菌剤散布が必要）。一方、ニホンナシ黒斑病菌、*A. alternata*（ニホンナシ病原タイプ）はAKトキシンを生産し、「二十世紀」、「巾着」、「南水」などが罹病

性である。本研究課題では、リンゴ斑点落葉病およびニホンナシ黒斑病の原因遺伝子の単離と品種育成に有用なDNAマーカーの開発を目的とする。本委託プロジェクト期間中に、リンゴ斑点落葉病高度罹病性遺伝子、リンゴ斑点落葉病中度罹病性遺伝子およびニホンナシ黒斑病罹病性遺伝子が第11連鎖群の相同な領域に存在することを同定し、それぞれの候補領域の延期配列を決定し、リンゴ斑点落葉病高度罹病性、リンゴ斑点落葉病中度罹病性およびニホンナシ黒斑病罹病性を選抜可能なDNAマーカーを開発した。

8. HOR2002 リンゴの省力栽培に適したカラムナー性樹形を制御する原因遺伝子の単離（農研機構果樹茶業研究部門）

我が国のリンゴ産業は、生産者の高齢化や安価な外国産リンゴの輸入などの問題に直面しており、それを克服する研究アプローチとして、特徴のある樹形を持つ品種を利用した省力的な栽培技術の確立が望まれている。リンゴ品種「McIntosh」の突然変異体として発見された「Wijeik」は、普通の栽培品種に比べて節間が短く、側枝の発生が少ないため、円柱状の樹形に生長する。この性質はカラムナー（columnar）性と呼ばれ、樹形が単純でコンパクトになるため、「密植ができる」、「収穫やせん定作業が極めて容易になる」といった利点があり、リンゴ生産の省力化が大いに期待できる。農研機構果樹茶業研究部門では、カラムナー性樹形を示す良食味リンゴの育種を進めているが、カラムナー性の表現型の評価に播種後3年程度を要することが育種の効率化を阻む要因となっている。カラムナー性は単一の優性遺伝子Coによって制御されることから、我々はカラムナー性個体をマーカー選抜するために、カラムナー遺伝子のマッピングを進めてきた。本課題では、カラムナー性を制御する原因遺伝子の単離と機能解析、品種育成に有用なDNAマーカーの開発を進める。本委託プロジェクト期間中に、リンゴのカラムナー樹形を制御する突然変異箇所を特定し、候補遺伝子を絞り込み、選抜マーカーを開発し、候補遺伝子の機能解析を行ない目標を完全に達成した。

9. HOR2003 カンキツの β -クリプトキサンチン高含有化のための遺伝子単離（農研機構果樹茶業研究部門）

カンキツ類におけるカロテノイド類の代謝については生合成経路が解明されており、カロテノイド類の組成や含有量の多様性には、カロテノイドの生合成遺伝子の発現量のバランスが関与し、 β -クリプトキサンチンを高含有する品種や系統では、 β -クリプトキサンチンよりも上流の生合成遺伝子の発現量が高く、下流の生合成遺伝子の発現量が低いことが明らかとなっている。また、カンキツ類にはカロテノイドの代謝遺伝子には配列や発現パターンが異なる複数のアレルが存在することが明らかとなり、カロテノイドの代謝系において最適な遺伝子の組合せを持つ系統を選抜することで β -クリプトキサンチンを高含有する品種の育成が期待できる。本委託プロジェクト期間中に、シス因子で制御されるカロテノイド代謝遺伝子のアレルマーカーの開発、トランス因子で制御されるカロテノイド代謝遺伝子のアレルマーカーの開発、およびカロテノイド代謝に関与する転写因子遺伝子の機能解析を行った。

10. HOR2004 ニホングリ易渋皮剥皮遺伝子の単離（農研機構果樹茶業研究部門）

農研機構では2006年に、果実の渋皮がチュウゴクグリ並みに剥ける易渋皮剥皮性を持つ画期的なニホングリ品種「ぼろたん」を初めて育成した。「ぼろたん」は、電子レンジやオーブンで加熱することにより簡単に渋皮を剥くことができ、食味も優れていることから、今後、和洋菓子などを始めとする新たな需要開拓と国産グリの需要拡大、さらに国内のクリ関連産業の活性化、6次産業への貢献など攻めの農林水産業への寄与が大いに期待される。

今後は、易渋皮剥皮性がニホングリの標準となると考えられることから、易渋皮剥皮性をもち、さらに異なる収穫期や食味・果実品質に優れる品種の育成が必要となるが、渋皮剥皮性は果実形質であることから、従来型の選抜では、多大な圃場面積、労力や期間を必要とする。そこで本課題では、易渋皮剥皮性のクリ品種育成に利用可能なDNAマーカー開発のために、ニホングリ易渋皮剥皮遺伝子を単離することを目的とする。本委託プロジェクト期間中に、ニホングリ標準連鎖地図を構築し渋皮剥皮遺伝子座 (*Peeling*) を第1連鎖群に同定し、ニホングリ「丹沢」のBACライブラリーからファインマッピングにより、1.1 cMの領域に渋皮剥皮遺伝子座を絞り込み、実用的な易渋皮剥皮性の選抜用マーカーセットを開発した。

1 1. HOR2005 ニホンナシ果実の糖組成に関するDNAマーカーの開発 (京都府立大学生命環境科学研究科)

ナシ果実における良食味性は、糖、有機酸、アミノ酸、肉質、香り、色などの要因によって決定されており、生食としての利用が多いニホンナシでは甘味を構成する糖の組成と含量が良食味性を決定する上で最も重要である。一方、ニホンナシでは、糖の含量と組成に関連する遺伝子やその制御機構は十分に解明されておらず、良食味性を選抜するためのDNAマーカーも開発されていない。これまでの研究から、ナシ果実における主な糖成分はスクロース (ショ糖)、グルコース、フルクトース、ソルビトールであり、品種間でこれら糖の組成割合は大きく異なることが明らかとなっており、中でもスクロース含量については、品種によっては50%を越えるものから、ほとんど蓄積しない0%に近い品種まで著しい差異が認められている。特に第二次世界大戦以降に育成された品種では、晩生品種を除いて高いスクロース含量を示すものが多く、良食味性とスクロース含量との関連が強く示唆されている。このため、ニホンナシ良食味品種の育成においては、スクロース蓄積の分子メカニズムを明らかにし、スクロース蓄積型を判別できるDNAマーカーの開発を目的とする。本委託プロジェクト期間中に、スクロース分解に関わる酸性インベルターゼ遺伝子のDNAマーカーの開発と発現機構の解明では、*PpAIV1*、*PpAIV2*、*PpAIV3*のDNAマーカーを開発してスクロース低含量系統の選抜が可能となった。

1 2. HOR2006 ブドウべと病抵抗性のDNAマーカー開発 (農研機構果樹茶業研究部門)

これまでの研究により、醸造用ブドウを用いたべと病抵抗性DNAマーカーが欧米諸国で開発されている。一方、日本の生食用ブドウにおけるべと病抵抗性や日本国内のべと病菌系統に関する研究は進んでいない。そこで、本課題では、生食用ブドウ品種マスカットオブアレキサンドリア (アレキ) やキャンベルアーリー (キャンベル) が有する抵抗性について、アレキ×キャンベルの集団 (集団AC) を用いて葉および花穂・幼果での抵抗性の評価を行い、QTL解析により抵抗性遺伝子座を検出する。この抵抗性遺伝子座の有効性について、国内から単離した複数のべと病菌株を用いて検証する。その上で、ブドウのゲノム情報を利用して新規マーカーを設計し、抵抗性QTLを両側から挟み込むDNAマーカーを開発する。上記の解析を通じて、生食用ブドウ新品種育成の際にべと病抵抗性を効率良く選抜するためのDNAマーカーを開発することが本研究の目的である。本委託プロジェクト期間中に、べと病抵抗性に関与する毛じ量を制御するQTLをマーカー化することで、生食用ブドウ新品種育成にすぐに応用できるべと病抵抗性DNAマーカーを開発した。

I-3. 今後の課題

今後、遺伝子領域→遺伝子同定を進めてより高精度のDNAマーカーを作成すること、育種素材集団で利用可能かどうかの検証を進めること、民間・公設試等と共同で新品種育成を開始することで、社会実装への道筋を付ける。

具体的には、育種を行っている民間企業、公設研究機関や大学に成果を受け渡すこと、全国対応の育種を行っている農研機構果樹茶業研究部門や野菜花き研究部門での新品種育成の効率化と普及を進めることで、画期的新品種の短期間での開発を進める。

(1) 加工時に臭わず黄変しないダイコン新品種「悠白(ゆうはく)」と「サラホホワイト」の品種登録(農食推進事業にて育成)、

(2) 民間4社と共同で辛み成分に特徴あるダイコン品種を育成中、

(3) なすの単為結果性では共同研究5件、

(4) キュウリ黄化えそ病抵抗性では、「きゅうり中間母本農7号」を育成し、種苗会社9社に種子を配布、

(5) ハクサイ根こぶ病抵抗性では民間4社と共同研究、

(6) りんごのカラムナー性では14県で利用、

(7) リンゴ斑点落葉病抵抗性やくりの易渋皮剥皮性では農研機構果樹茶業研究部門の育種での利用

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成 25～29 年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (HOR)

小課題番号: HOR1001

研究期間: 平成 25～29 年度

小課題名: マップベースクローニング法によるキュウリの黄化えそ病抵抗性遺伝子の単離

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 野菜花き研究部門・野菜育種・ゲノム研究領域・ウリ科・イチゴユニット・川頭洋一

1) 研究目的

キュウリは年間に約 1,400 億円の産出額をあげるわが国の主要野菜の一つであるが、近年、メロン黄化えそウイルス (MYSV) によるキュウリ黄化えそ病の被害が深刻化し、九州、四国、東海、関東地域の産地に大きな被害を及ぼしている。キュウリ黄化えそ病はミナミキイロアザミウマによって永續伝搬される日本が初発生のウイルス病であり、MYSV に感染し発病すると生育が抑制され、最大 7 割程度の著しい減収となる。キュウリ産地では農薬散布や防虫ネットの設置など様々な防除法が試みられているが、本病の発生を抑制するのは困難であり、発生地域は拡大傾向にある。そのためキュウリ産地は抵抗性品種の導入を求めており、キュウリの育種を行っている種苗会社も本病に対する抵抗性育種を重要視している。しかしこれまで抵抗性素材が無かったことから、抵抗性品種は育成されていない。

一方、農研機構 野菜花き研究部門ではこれまでの研究で、キュウリ遺伝資源の中から黄化えそ病に抵抗性を示すタイ原産のキュウリ系統 27028930 を世界で初めて見いだした。本素材は強度抵抗性ではないものの、罹病性品種の収量が 5～6 割以上減少する場合でも、抵抗性素材は 1～2 割程度の減収率に抑制できるため、実用上有効な育種素材である。今後、抵抗性素材を用いて効率的に抵抗性品種を育成するためには、抵抗性遺伝子を単離し、高精度の DNA 選抜マーカーを開発することが重要である。そこで本課題では、黄化えそ病抵抗性系統を用いて抵抗性遺伝子を単離することを目的とする。

2) 研究成果

黄化えそ病抵抗性を有する「きゅうり中間母本農 7 号」(図 1) を育成し、品種登録出願した。本中間母本は、黄化えそ病抵抗性のキュウリ系統 27028930 と固定品種「ときわ」を交雑した F₅ 世代に F₁ 品種「アンコール 10」を交雑し、抵抗性検定による選抜と自殖を繰り返すことにより育成したものである。

次に、「きゅうり中間母本農 7 号」(抵抗性) と「きゅうり中間母本農 4 号」(罹病性) を交雑して得られた F₂ 集団を用いて黄化えそ病抵抗性の QTL 解析を行った。その結果、以前に由来の異なる F₂ (27028930 × ときわ) 集団を用いた時に検出された第 3 染色体の QTL と同様の位置に QTL が検出されたことから、この領域に抵抗性遺伝子が存在すると考えられた。F₂ (きゅうり中間母本農 7 号 × きゅうり中間母本農 4 号) 集団における DNA マーカーのタイプと抵抗性との関係を調べた結果、この QTL 領域に位置するマーカー CSN251 を用いることで、効率的に抵抗性個体を選抜することができることが分かった (図 2)。



図1.「きゅうり中間母本農7号」の植物体および果実
白い縦の棒は10cmを示している。

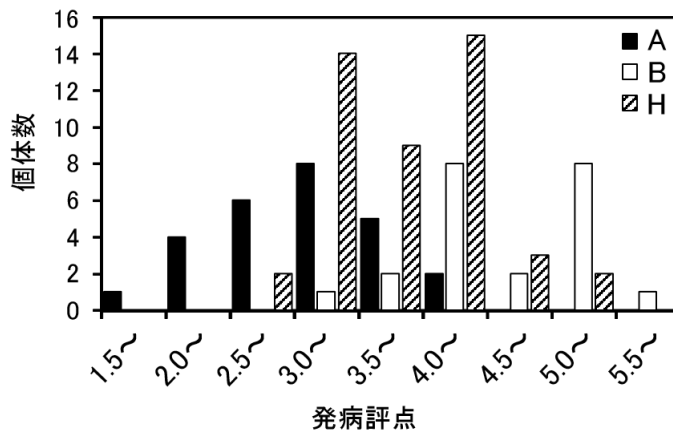


図2.「きゅうり中間母本農7号」と罹病性品種「きゅうり中間母本農4号」の交雑後代(F_2 世代)におけるDNAマーカーのタイプと抵抗性との関係
A: DNAマーカーCSN251が「きゅうり中間母本農7号」と同じタイプを示す個体、B: DNAマーカーCSN251が罹病性品種「きゅうり中間母本農4号」と同じタイプを示す個体、H: DNAマーカーCSN251が「きゅうり中間母本農7号」と「きゅうり中間母本農4号」の両方のタイプを示す個体。
Aの個体の多くは発病評点が低く(抵抗性)、Bの個体の多くは発病評点が高い(罹病性)結果となっている。

第3染色体の抵抗性遺伝子の領域を絞り込むため、QTL領域を含む36cMの領域について、1~3cM程度の間隔で多型マーカー(SSRマーカーA~O)を設定するとともに、この領域内で組換えが生じている個体を選抜し、採種した。採種した組換え系統を用いてMYSV抵抗性検定を行い、発病程度とマーカー遺伝子型との関係を調査した結果、抵抗性遺伝子はマーカーCとEの間(約4cM)に存在することが示唆された(図3)。さらにマーカーCとEの間で組換えが生じている17系統を用いて、同様に調査した結果、抵抗性遺伝子の領域が1.2cMまで絞り込まれた。

抵抗性遺伝子の領域をさらに絞り込むため、この1.2cMを含む2cM程度の領域について、13個の多型マーカー(SSRマーカーa~m)を設定するとともに、この領域内で組換えが生じている個体を

選抜し、採種した。採種した組換え系統を用いて MYSV 抵抗性検定を行い、発病程度とマーカー遺伝子型の関係を調査した結果、抵抗性遺伝子はマーカー e と g の間 (約 45kb) に存在することが示唆された (図 4)。

系統番号	検定個体数	発病度	判定	各マーカーの遺伝子型															
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
327-2	5	2.5	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
504-8	5	2.8	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
75-4	4	2.6	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
286-2	5	2.0	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
77-5-5	5	6.0	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
77-8-4	5	6.0	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
92-2	5	5.4	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
275-2	4	5.4	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

← 4cM →

図3. 第3染色体の目的遺伝子領域の絞り込み実験結果

マーカーDが抵抗性型の系統は発病度が低く、マーカーDが罹病性型の系統は発病度が高いことから、抵抗性遺伝子はマーカーCとEの間に存在すると考えられた。

系統	発病度	判定	各マーカーの遺伝子型																
			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m				
02_G12	4.0	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
08_G04	4.8	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
08_A02	5.0	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
12_A12	4.4	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
01_G03	4.2	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
04_G07	2.5	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
13_H03	2.3	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
05_H02	2.3	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
09_B01	2.2	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
16_A12	3.1	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
07_C01	2.2	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
08_H05	2.2	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
03_B09	2.4	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
05_F06	2.2	抵抗性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
18_G11	5.7	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
11_A01	5.1	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
08_D06	4.5	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
17_F05	6.0	罹病性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

■ : 抵抗性型
□ : 罹病性型

← 約45kb →

図4. 第3染色体の目的遺伝子領域のさらなる絞り込み実験結果

マーカーfが抵抗性型の系統は発病度が低く、マーカーfが罹病性型の系統は発病度が高いことから、抵抗性遺伝子はマーカーeとgの間に存在すると考えられた。

次に「きゅうり中間母本農7号」を用いて、BACライブラリーを作製し、絞り込んだ約45kbの領域を含むBACクローンを単離し、塩基配列を決定した。キュウリのリファレンスゲノム情報との比較から、絞り込んだ領域には7個の遺伝子があると考えられた。絞り込んだ領域の両側の遺伝子を含む合計9個の遺伝子A~Iについて、転写量を調査した結果、抵抗性系統と罹病性系統の間で差がある遺伝子A、B、Hを見いだした。遺伝子Eは特段の差は見られなかったが、アミノ酸配列は4箇所異

なっており、転写因子と考えられることから、抵抗性遺伝子の候補として A、B、H、E を選定した。

これらの候補遺伝子が抵抗性遺伝子であるかどうかを確かめるため、候補遺伝子を罹病性キュウリに導入した。遺伝子 E および MYSV (病原ウイルス) を接種すると抵抗性系統の方が高い発現量を示した遺伝子 A については、全長タンパク質が発現するコンストラクトを作製した。罹病性系統の方で発現量が高かった遺伝子 B および H については、発現を抑制するベクター (RNAi コンストラクト) を作製した。作製したベクターをアグロバクテリウム法により、キュウリ「霜しらず地這」に導入した。遺伝子 E については現在、形質転換体を作製中である。遺伝子 A、B、H については、形質転換体から得られた種子を用いて抵抗性検定中である。

以上をまとめると、本プロジェクトでは黄化えそ病抵抗性の「きゅうり中間母本農 7 号」を育成し、品種登録出願を行い、種苗会社 9 社に種子を配布した。また、抵抗性遺伝子の単離までは至っていないが、第 3 染色体上の黄化えそ病抵抗性遺伝子領域を、約 20cM (約 6,000kb) から約 45kb まで絞り込むことができた。

3) 成果活用における留意点

本プロジェクトで開発した「きゅうり中間母本農 7 号」を育種素材にして黄化えそ病抵抗性品種を育成することが可能であり、第 3 染色体領域の DNA マーカーを用いることにより、効率的に抵抗性個体を選抜することができる。ただし、「きゅうり中間母本農 7 号」と同程度の抵抗性を持つ F₁ 品種を育成するためには、複数の遺伝子の集積が必要であり、抵抗性検定による選抜も行う必要がある。

4) 今後の課題

候補遺伝子 A、B または H のコンストラクトを導入したキュウリについて、抵抗性の有無を明らかにする。候補遺伝子 E について、コンストラクトを導入したキュウリを作製し、抵抗性の有無を明らかにする。もし抵抗性の系統が得られなかった場合には、これまでに絞り込んだ領域内で組換えが生じた系統を複数育成し、抵抗性検定を行うことにより、目的の遺伝子を確実に絞り込んでいく。

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (HOR)

小課題番号: HOR1002

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子の単離

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 岩手大学・農学部・植物育種学研究室・畠山勝徳

1) 研究目的

根こぶ病はハクサイの重要病害であり、主要産地では防除のために大量の農薬が使用されている。強度抵抗性のカブを素材とした抵抗性品種が販売されているが、圃場内には病原型の異なる菌が混在しているために、単一の抵抗性遺伝子をもつ品種は容易に発病してしまう。多様な病原型に対応した強度抵抗性の獲得のためには、複数の抵抗性遺伝子の導入が必須である。我々は、ハクサイの8つの抵抗性遺伝子座のうち、*Crr1a* 遺伝子を単離し、根こぶ病菌で同定されている4つの病原型 (G1 ~ G4) のうち G2 と G4 に抵抗性を発揮することを明らかにしたが、*Crr1a* だけでは G1 と G3 には対応できない。本研究では、4つの病原型に対する抵抗性反応が異なる3つの抵抗性遺伝子座、すなわち、G3, G4 に抵抗性を発揮する *CRb*、G1, G4 に抵抗性を発揮する *Crr1b*、G2, G3, G4 に抵抗性を発揮する *CRk* を単離し、抵抗性品種育成のための高精度遺伝子マーカーを開発する。

2) 研究成果

- 1) *CRb* の単離: *CRb* 座の候補領域に位置するマーカーを用いてフォスミドライブラリーをスクリーニングし、DNA マーカー B1005 から B4701 までカバーすると考えられる3つのフォスミドクローンを単離した。そのうちの2つ (P007G12 と P005H06) について全長の塩基配列を決定し、抵抗性 1074RR 系統における約 64kb のゲノム配列を得た。罹病性ハクサイ (Chiifu-401-42) に由来するリファレンスゲノム配列と比較すると、1074RR には大きな挿入や欠失が認められ、NLR (Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing protein) をコードすると推定される ORF が同一方向にタンデムに存在していた。このうち B4732 と B1005 間に存在する5つの ORF (*CRb*₁, *CRb*₂, *CRb*₃, *CRb*₄, *CRb*₅) について、形質転換シロイヌナズナを作出し、根こぶ病病原型 G3 に属する No.14 菌を接種した。その結果、*CRb*₁ を導入した系統のみ抵抗性が認められた (図 1)。 *CRb*₁ は既報の *CRa* 遺伝子と同一の配列であったことから、*CRb* と *CRa* は同一の遺伝子であることを明らかにした。
- 2) *Crr1b* の単離: *Crr1b* 連鎖マーカー No.82 と BSA1 間で組換えを起こしている F₂ は 20 個体選抜されたが、この中で *Crr2* を抵抗性ホモ型あるいはヘテロ型で有するものは 12 個体であった。不稔性の 1 個体を除いた 11 個体から F₃ 種子を採種し、根こぶ病検定に供試した。組換え 11 個体に由来する F₃ 系統は全て罹病性を示したことから、*Crr1b* の座乗領域は No.88-No.96 間の約 52kb と推定された。さらに No.88-No.96 間に新たに DNA マーカーを作出し、組換え F₃ 系統の遺伝子型を決定した結果、抵抗性遺伝子の座乗位置を Sp.034-Sp.079 間の約 13kb にまで絞り込むことができた。一方、*Crr1b* 推定座乗領域上のマーカー No.82、BSA1、BSA2 を用いて根こぶ病強度抵抗性系統 G004 に由来する BAC ライブラリーを用いて 1 次スクリーニングを行い、ポジティブクローンについて周辺マーカーを用いた整列化を行った (図 2)。その結果、BSA2 は含まず BSA1 を含む 3 クローン、No.82 を含む 6 クローンを同定した。しかし、SP_034 ~ No.96 間をカバーするクローンは得られなかった。そこで、BSA1 と No.96 を含むクローン B224D04f の全長の塩基配列を決定し、No.96 側末端の塩基配列からマーカーを作成し、BAC ライブラリーをスクリーニングした。得られた 2 クローンの末端配列からマーカーを作成

し、これまでに単離したBACクローンのPCRスクリーニングを行い、No.88～No.96間の領域をカバーする3つのBACクローン、284B06、B220B08、B224D04fを特定した。単離したBACクローンのシーケンス結果から、公開リファレンスゲノム上でのSp_034とSp_079で挟まれる推定座乗領域は13kbであるが、抵抗性系統G004においては約55kbと推定された。この領域には4つのORF(ORF1～ORF4)が推定された(図2)。ORF2とORF4はG004のみで発現が認められたことから、これらについて全長のcDNAの塩基配列を決定した。ORF2およびORF4について全長を含むゲノムクローンを*Crr1a*プロモーターの下流に連結した導入遺伝子を構築し、シロイヌナズナCol-0に形質転換した。また、*Crr1b*と共存することで機能する*Crr2*の2つの候補ORFについて、プロモーター、ターミネーターを含むゲノムクローンを増幅し、導入遺伝子を構築した。Col-0に形質転換した。

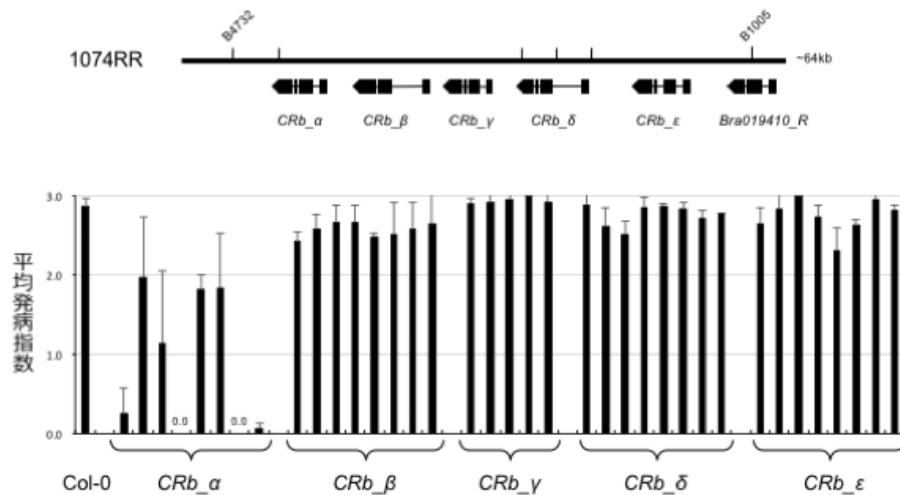


図1. *CRb*ゲノム上のORFの位置と形質転換シロイヌナズナの根こぶ病抵抗性
A: ORFの黒ボックスはエクソン、黒線はイントロンを示す。B: 各T₁系統の平均発病指数=T₂の発病指数の平均±SD. *CRb_alpha*を導入したT₁系統においてのみ、平均発病指数が低く、抵抗性と判定される系統が認められる。

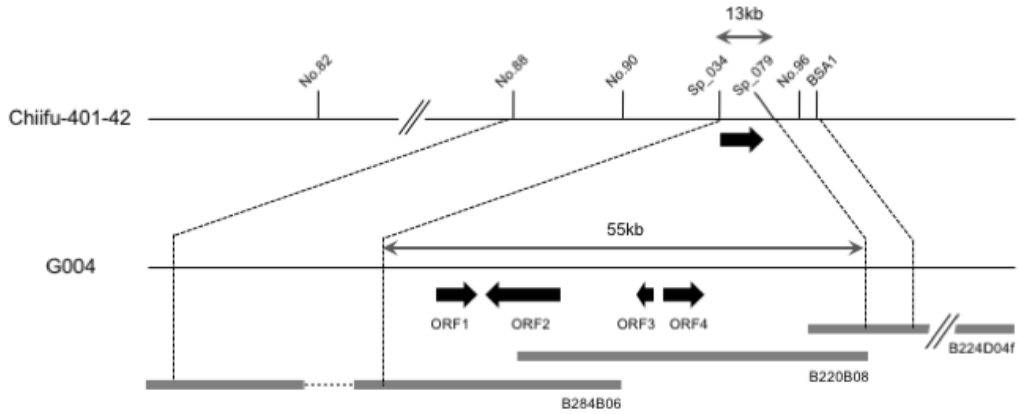


図2. ハクサイChiifu-401-42と抵抗性G004における*Crr1b*座乗領域のゲノム構造
 リファレンス (Chiifu-401-42) 上のマーカーの位置およびDNAマーカーSp_034からSp_079ま
 でをカバーするBACクローン (太線) の位置を示す. G004のゲノム上に推定されたORFの位置を
 矢印で示す.

- 3) *CRk* の単離: *CRk* 座候補領域であるマーカー 7219(14.3Mb) から 429850(15.4Mb) 間の組換え F₄ 系統のうち、当該領域のゲノムがホモ型である 155 系統を選抜し、そのうち 144 系統から F₅ 種子を採種した。90 系統の F₅ 系統について、2 回に分けて No.14 菌の接種試験を行い、推定座乗領域の絞り込みを試みた (図 3)。その結果、4050-BrSTS61 間と 25712-4050 間の 2 カ所に抵抗性遺伝子の存在が示唆され、それぞれ *CRk_1* と *CRk_2* とした。さらに、2 カ所の候補領域において組換えを起こした F₅ 系統を供試し、病原型 G3 の No.14 菌を用いて接種検定を行い、グラフ遺伝子型と表現型の関係から抵抗性遺伝子の座乗領域の絞り込みを行った。BrSTS78-BrSTS61 間の組換え F₅ 系統では、4 系統が抵抗性あるいは部分抵抗性を示し、1 系統が罹病性であった。このことから、このマーカー間の 50kb 内に *CRk_1* が存在すると考えられた。また、26330-4050 間の組換え F₅ 系統では、1 系統が抵抗性、1 系統は罹病性を示した。よって、このマーカー間で挟まれる 75kb 内に *CRk_2* が存在すると推定された。

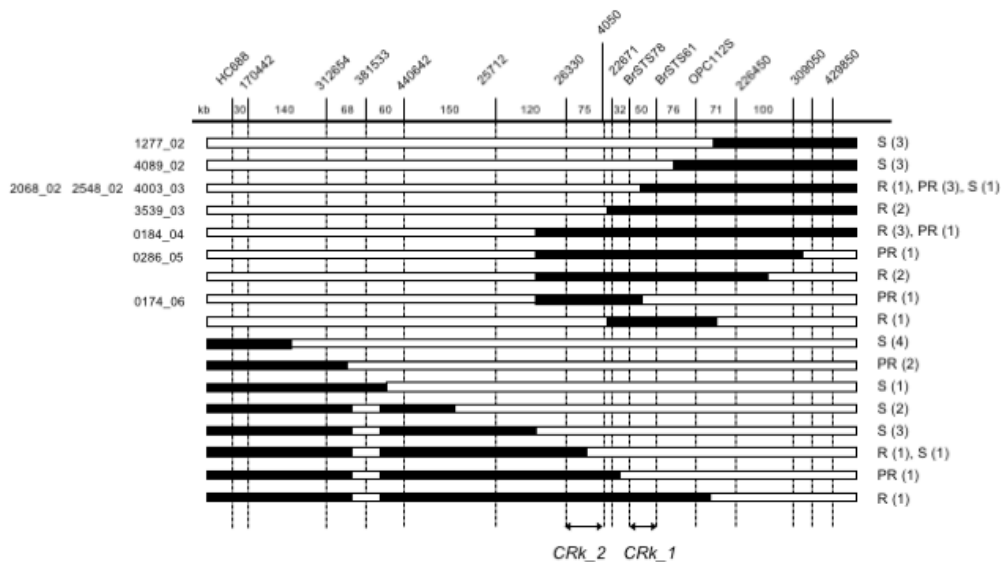


図3. CRk座乗領域の組換えF5系統のグラフ遺伝子型と根こぶ病抵抗性
 黒いバーは抵抗性系統のゲノム、白いバーは罹病性系統のゲノムを示す。右側に根こぶ病抵抗性
 (S:罹病性、PR:部分抵抗性、R:抵抗性)、括弧内にF₅系統数を示す。左側に病原型に対する抵抗
 性特性の解析に供試した9系統を示す。BrSTS78-BrSTS61間で組換えを起こした系統では、抵抗
 性と罹病性を示す系統が分離したことから、この領域内にCRk_1があると推定される。

CRk_1 と CRk_2 の座乗領域周辺で組換えを起こしている9系統について、G1, G2, G4の菌株を接種した。G1の菌株には全ての系統が罹病性を示した。G2とG4に対する抵抗性反応は、No.0174.06を除いてG3に対する表現型と同じであった。グラフ遺伝子型から、No.2068.02, No.2548.02, No.3539.03はCRk_1のみを有するので、CRk_1はG2, G3, G4の病原型に抵抗性を付与すると考えられた。No.0174.06はBrSTS78-BrSTS61間で組換えを起こしているが、G2に対して罹病性を示すことから、CRk_2のみを有すると考えられた。以上のことから、CRk_1とCRk_2は病原型に対する特異性が異なること示唆された。CRkはG2, G3, G4に対して抵抗性を付与する遺伝子座であることから、その条件を満たすCRk_1についてフォスミドクローンのスクリーニングを開始した。BrSTS78マーカーを用いてフォスミドライブラリーをスクリーニングし、30以上の陽性wellが検出されたが、このうちBrSTS61マーカーをもつwellはなかった。そこで、BrSTS61と反対側の22671マーカーをもつ1クローン(3.D01)と任意の1クローン(1.C06)についてシングルクローンを単離し、両末端のシーケンスの相同性検索を行ったが、いずれのクローンについても期待されるA03とは異なる染色体と相同性を示した。1.C06について、シーケンスショットガンクローンの塩基配列を解析中である。

- 4) *Crr1a* の単離：根こぶ病抵抗性品種に見出された3つの*Crr1a*アレルを導入したシロイヌナズナに根こぶ病病原型G4に属するAno-01菌を接種したところ、Kinami90アレルを導入した形質転換体で抵抗性が認められた(図4)。機能を有するG004とKinami90アレル特異的なマーカーを用いた解析から、この2つのアレルは根こぶ病抵抗性48品種中、それぞれ3品種、2品種に保持されていることが示唆された。Crr1aに見出されたアレルのうち、罹病性を示す2つのアレルではいずれもC末ドメインが欠失していることから、この領域が抵抗性付与に重要な部位である可能性が示唆された。非機能型Kiko85アレルにG004アレルのC末を付加した遺伝子(Kiko85+G004^{C-ter})の形質転換体では、全てのT₁系統で抵抗性を示し表現型が回復し

た(図4)。一方、同じく非機能型 Hiroki アレルのコンストラクト (Hiroki+G004^{C-ter}) では 9 系統中 4 系統で部分抵抗性を示したが、残りの系統は明らかな罹病性を示し、完全には表現型が回復しなかった。Hiroki アレルに Kinami90 アレルの C 末ドメインを付加したキメラ遺伝子を導入したシロイヌナズナの表現型を調査したところ、得られた 6 系統で病原型 G4 の Ano-01 を接種したところ、明らかな抵抗性が認められた。Hiroki アレルには C 末ドメインの欠失と LRR 内に 24 アミノ酸の欠失がある。Hiroki+G004^{C-ter} は抵抗性が不安定であったが、同じく LRR 内に 24 アミノ酸欠失をもつ Kinami90 の C 末を連結した Hiroki+Kinami90^{C-ter} が抵抗性を示したことから、LRR と C 末ドメインとの間に相互作用があり、これが病原体の認識あるいはシグナル伝達に必要な可能性が示唆された。現在、複数の系統で追試実験を行うとともに、同じく罹病性 Kiko85 アレルに Kinami90 アレルの C 末ドメインを付加したキメラ遺伝子の構築と形質転換を進めている。

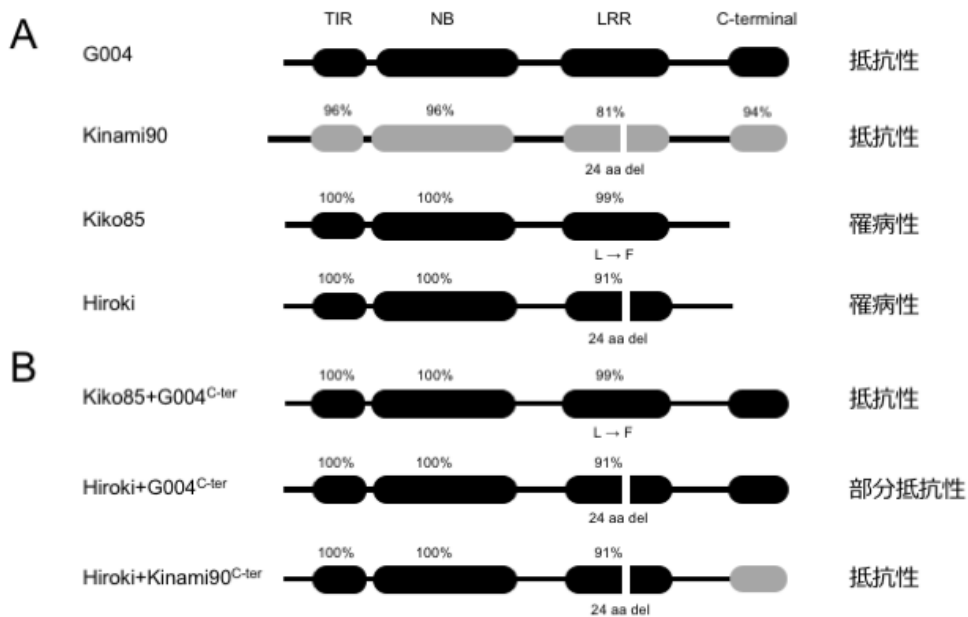


図4. *Crr1a*アレル (A) とキメラ遺伝子 (B) の推定タンパク質の構造
各アレルのTIR, NB, LRR, C末ドメイン上にG004アレルに対するアミノ酸の相同性を示す. 24 aa del: 24アミノ酸の欠失, L→F:ロイシンからフェニルアラニンのアミノ酸置換. 右側に形質転換Col-0の根こぶ病抵抗性を示す.

3) 成果活用における留意点

- 1) 抵抗性遺伝子の座乗領域周辺の DNA マーカーを利用することで効率的に抵抗性個体を選抜することが可能であるが、あらかじめ素材のマーカー遺伝子型と表現型の関係を調査して目的の抵抗性遺伝子の有無を確認しておく必要がある。
- 2) *Crr1b* については、はくさい中間母本農 9 号を素材として利用することができる。
- 3) *CRb* を選抜するための DNA マーカーは、Kato et al. Breed Sci (2013)63: 116., Hatakeyama et al. Mol Genet Genomics (2017) 292: 397. に記載されている。

4) 今後の課題

- 1) *Crr1b* , *CRk_1* , *CRk_2* については、抵抗性遺伝子を特定するまで至っていないが、いずれも本プロジェクトを通じた研究により、選抜には支障のない程度に遺伝子近傍のマーカースが得られている。さらに責任遺伝子を明らかにすることによってより高精度な DNA マーカーの開発が可能になる。
- 2) 根こぶ病の接種検定に用いている菌系の多くは、圃場において罹病した個体の根から調整したものであり、多様な病原型が混在している。病原型と抵抗性遺伝子の関係をより詳細に解析するためには、単孢子分離した菌系と単独の抵抗性遺伝子を有する同質遺伝子系統を用いて解析する必要がある。

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (HOR)

小課題番号: HOR1003

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: トマト単為結果性およびトマト黄化葉巻病抵抗性に関する新規遺伝子の単離

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 野菜花き研究部門・野菜育種・ゲノム研究領域・ゲノム解析ユニット・布目司

1) 研究目的

単為結果性は受粉・受精しなくても果実が着果・肥大する形質であり、訪花昆虫の利用や植物ホルモン剤散布による着果・果実肥大促進作業の軽減および高温期の着果安定が期待できる有用形質である。しかし、育種に利用されているトマト単為結果性遺伝子 *pat-2* は、多面発現により種子生産が不安定になる栽培時期があるため、新たな単為結果性遺伝子が求められている。一方、トマト黄化葉巻病は、物理的な遮断が難しいタバコナジラミによって媒介される難防除病害であり、薬剤耐性の発達した個体群への置換により薬剤防除が難しくなっている。抵抗性育種に利用可能なトマト黄化葉巻病強度抵抗性遺伝子は現時点では存在しないため、新たな強度抵抗性遺伝子に対するニーズは極めて高い。いずれの問題においても、解決のためにはこれまでに知られていない新規の遺伝子素材の獲得・作出が重要である。しかし、個体が大きく栽植密度が限定される園芸作物では大規模な集団を供試した選抜の実施は困難である。そのため、DNA解析により標的遺伝子に変異を持つ系統を選抜して形質評価を行う逆遺伝学的解析手法が有効である。本課題では、大規模な突然変異体集団・遺伝資源の網羅的選抜を可能とする超並列シーケンサー (NGS) を活用した効率的な DNA 変異検出技術、および DNA 解析による変異検出に供試する解析集団を育成するために花粉への変異原処理による突然変異体集団作出技術を開発し、トマト単為結果性関連遺伝子およびトマト黄化葉巻病抵抗性関連遺伝子を標的として新規有用変異体を検索・獲得する。獲得する新規有用変異体は、民間種苗企業などと連携してトマト新品種の育成への利用をはかる。

2) 研究成果

1. 花粉への変異原処理による突然変異体集団の育成

1) 花粉への UV 照射による突然変異体集団の育成

UV 照射が花粉発芽に与える影響を調査した。また、UV 照射花粉を受粉に用いて、着果した果実の果実重および採種量を調査した。UV 照射量に比例して花粉発芽率、果実重、採種量は減少した。花粉発芽率が未処理花粉の 50% 程度となる UV 照射条件の花粉を用いて交配を行ったが、種子は得られなかった。UV 照射が花粉に与える生理的影響が大きいために受精できなかったと推測される。着果して種子が得られる花粉への UV 照射条件を検討し、交配・採種により変異体集団を育成した。UV 照射花粉に由来する個体の全ゲノム配列データを取得し、UV 照射により引き起こされた DNA 配列の変異を検出した。UV 照射量と変異頻度には相関は見られず、1 変異体あたり平均 45 ~ 63 の変異 (15 ~ 20 Mb あたりに一つの突然変異) が検出されたが、種子への EMS 処理やガンマ線照射よりも変異頻度が低かった。また、種子への EMS 処理やガンマ線照射と比較して A/T > T/A 変異の割合が高かった。標的遺伝子の変異体検索を効率よく行うためには、他の変異原処理による変異体集団育成の検討が必要と考えられた。

2) 花粉へのガンマ線照射による突然変異体集団の育成

旧農業生物資源研究所・放射線育種場において、トマト花粉へガンマ線照射を行った。ガンマ線照射した花粉を受粉に用いて採種を行い果実重と採種量を調査することで、突然変異体集

団の育成に適したガンマ線照射条件を選定し、突然変異体集団を育成した。ガンマ線照射した花粉に由来する個体のゲノム配列の一部を RAD 解析により取得し、ガンマ線照射により引き起こされた DNA 配列の変異を検出した。トマト花粉へのガンマ線照射による突然変異頻度は、花粉への UV 照射や種子への EMS 処理やガンマ照射にくらべて低かった。標的遺伝子の変異体検索を効率よく行うためには、他の変異原処理による変異体集団育成の検討が必要と考えられた。

3) 花粉への化学変異原処理

花粉へ化学変異原を処理するため、花粉が破裂せず発芽しない花粉懸濁溶液の組成、花粉を交配に用いるための溶液条件等の検討を行った。浸透圧を調整した溶液に懸濁することで花粉は発芽せずに化学変異原を処理する条件を設定した。しかし、この花粉を交配に用いた場合には着果頻度が低く、採種量が少なかった。花粉懸濁液の影響により花粉の発芽および受精の頻度が低くなったことが原因と推測された。そのため、突然変異体集団の育成には、花粉への化学変異原処理は適用できないと判断した。

4) 種子への化学変異原処理による突然変異体集団の育成

トマト種子への化学変異原 ENU (N-ethyl-N-nitrosourea)、MNU (N-methyl -N-nitrosourea)、DEB (Diepoxy butane)、EMS (Ethyl methane sulfonate) の処理条件を検討した。1 日浸水して催芽したトマト種子に各濃度で化学変異原を処理し、種子発芽率と幼苗の生育を調査した。すべての化学変異原で処理濃度に応じて種子の発芽率が減少したが、突然変異体集団の育成には ENU 処理を採用し、突然変異体集団を育成した。

ENU 処理による突然変異体 M_1 植物のゲノム配列の一部を RAD 法により取得し、変異頻度を調査した。 M_2 植物の変異頻度も同様に調査したところ、 M_1 植物に比べて変異頻度が低く、 M_1 植物で検出された変異のうち約 7% の変異が M_2 植物で検出され (データ省略)、 M_1 植物の変異の多くはキメラだったと推測された。種子への ENU 処理は変異頻度が EMS 処理よりも高く、 $A/T > T/A$ および $A/T > G/C$ の変異が多く、EMS とは変異誘導スペクトルが異なるため、突然変異体集団の育成に有効と考えられた。

2. 超並列シーケンサーを用いた変異検出手法と一塩基多型タイピング法の開発

遺伝資源や突然変異体集団から標的遺伝子の変異個体を効率良く検索するためには、超並列シーケンサーを用いた変異検出手法の開発が必要である。そこで、個体別に異なる組み合わせの 2 種類のインデックス配列を付加した PCR 産物を作成し、シーケンス分析により各系統を識別できる TAS 法を適用し、有効性を検討した。

また、有用形質を示す突然変異体は農業上の利用価値が高いが、突然変異体のゲノム背景には標的遺伝子以外の領域にも突然変異が潜んでおり、これら変異のいくつかは表現型に予想外の影響をもたらす可能性がある。したがって、ゲノム背景に潜む不要な突然変異を連続戻し交配により排除する必要がある。そこで、突然変異体の戻し交配親に遠縁の品種・系統を用いる場合と、近縁ないし原品種を用いる場合の 2 つの状況を想定し、ゲノムワイドな遺伝子型分析としてそれぞれに RAD-Seq 法と TAS 法を適用し、分析精度と有効性を検討した。

1) ターゲットアンプリコンシーケンス法 (TAS)

NGS 解析に使用するアンプリコンは 2 回の PCR によって作製した (図 1)。トマト突然変異体 7 系統に存在する突然変異から、ランダムに 69 個の突然変異 (うち 39 個がホモ接合、残り 30 個がヘテロ接合) を選抜し、それぞれを含む DNA 断片を増幅するプライマー対を設計した。1 回目の PCR では、トマト突然変異体 7 系統のゲノム DNA を鋳型として 4 種類のプライ

マー対を混合したマルチプレックス PCR により増幅産物を得た。得られた増幅産物は系統ごとに混合後に希釈し、これを鋳型として 2 回目の PCR を行った。増幅産物の塩基配列を NGS により分析し、得られた配列から低品質のものを除去後、トマト品種 Heinz 1706 の標準ゲノム配列上に位置付けて、突然変異を検出した。その結果、調査した突然変異のうち 65 個の突然変異（うち 36 個がホモ接合、残り 29 個がヘテロ接合）の遺伝子型を正確に決定することができた。したがって、本実験条件における TAS 分析法の変異検出効率は 94.2% であり、精度は 100% であると推定された。なお、遺伝子型が決定できなかった座のうち 1 個は非特異的な断片の増幅によるものであり、残り 3 個では配列データが得られていないことが原因であった。

Target Amplicon Sequence 法

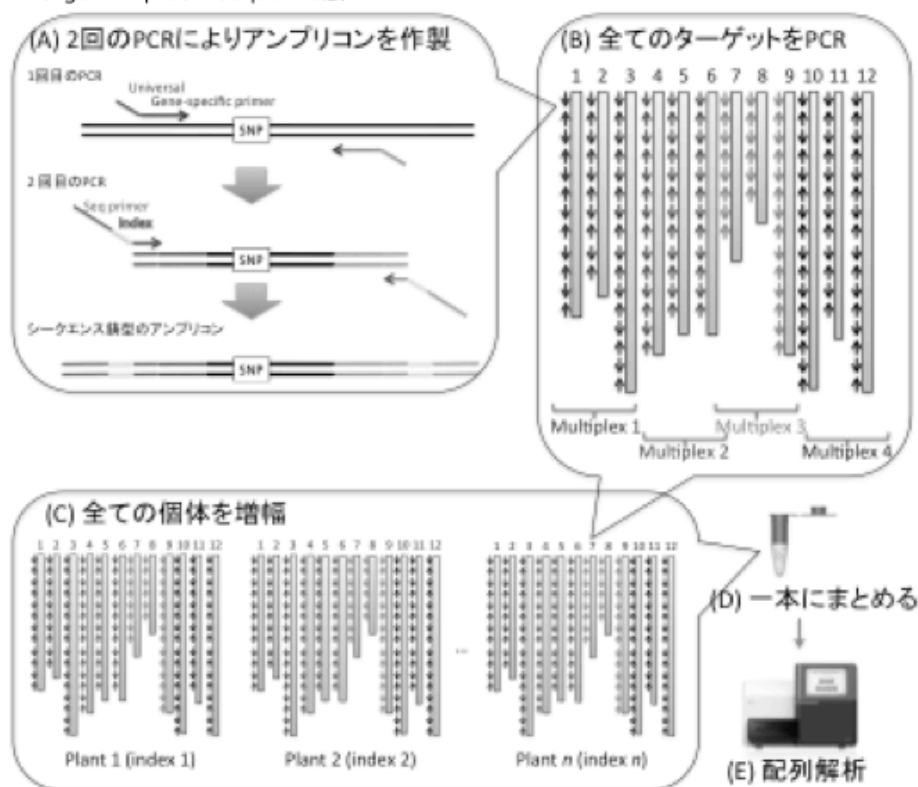


図1 TAS法の概要図

本法は、ゲノム配列情報や SNP 等のターゲットの位置情報を必要とする。(A) 1 回目の PCR では SNP 等を増幅するようにプライマーを設計し、プライマーの 5' 側には 2 回目の PCR の鋳型となるユニバーサル配列を付加する。2 回目の PCR は 1 回目の PCR 産物を希釈して鋳型として用い、プライマーはユニバーサル配列とその 5' 側に個体識別用のタグ配列と配列分析に必要な配列を付加したものをを用いる。(B) ゲノム中の複数のターゲットについて、この PCR を行う。ターゲット数が多い場合には、マルチプレックス PCR により省力化を図る。(C) このような操作を多検体について別々に行う。(D) 個体識別タグが付いた PCR 産物を混合する。混合した DNA はゲル電気泳動によるサイズ分画によりプライマーダイマー等の短鎖 DNA を除去後、リアルタイム PCR を用いて定量する。(E) 得られた DNA を NGS で配列分析する。情報的手法によりデータの解析を行い、個体間の SNP の検出を行う。

2) RAD-seq

トマト 6 品種の葉から全ゲノム DNA を抽出し、二種類の制限酵素 (*Pst* I と *Msp* I) で切断した。それぞれの切断末端にアダプターを付加し、PCR により各 DNA 断片を増幅し、同時に各品種を識別するタグ配列を付加した (図 2)。得られた DNA 断片を混合し、精製後に NGS で配列分析を行った。得られた配列は低品質のものを排除した後にトマト品種 Heinz 1706 の標準ゲノム配列上に位置付け、各品種と Heinz 1706 との間の SNP を検出した。

6 品種において合計 1736 個の SNP を検出した (表 1)。各染色体あたりの SNP の数には偏りがあり、第 7 染色体や第 8 染色体では SNP 数が少ないのに対して、第 5 染色体などでは多数の SNP が検出された (データ省略)。この偏りは、前プロジェクト (SGE1001) で行った、トマト 6 品種の全ゲノムリシーケンス解析で見出したゲノムワイドな SNP の偏り方と一致している (Shirasawa et al. 2013)。

さらに、本 RAD-Seq 分析に使用した品種のうち 3 品種は、前プロジェクト (SGE1001) の全

ゲノムリシークエンス解析に用いた材料であるため (Shirasawa et al. 2013)、ゲノムワイドな SNP 情報が整備されている。そこで、RAD-Seq で検出した SNP の精度を調べるため、RAD-Seq と全ゲノムリシークエンス解析で検出した SNP の異同を調査した。その結果、RAD-Seq で検出した SNP のうち約 75%は全ゲノムリシークエンス解析で明らかにした SNP と一致した (表 2)。残りのうち、4%は両者間で不一致だったが、22%は RAD-Seq 分析で新たに見出された SNP であった。したがって、RAD-Seq 分析で検出される SNP の精度は 74%~96%であると推定された。

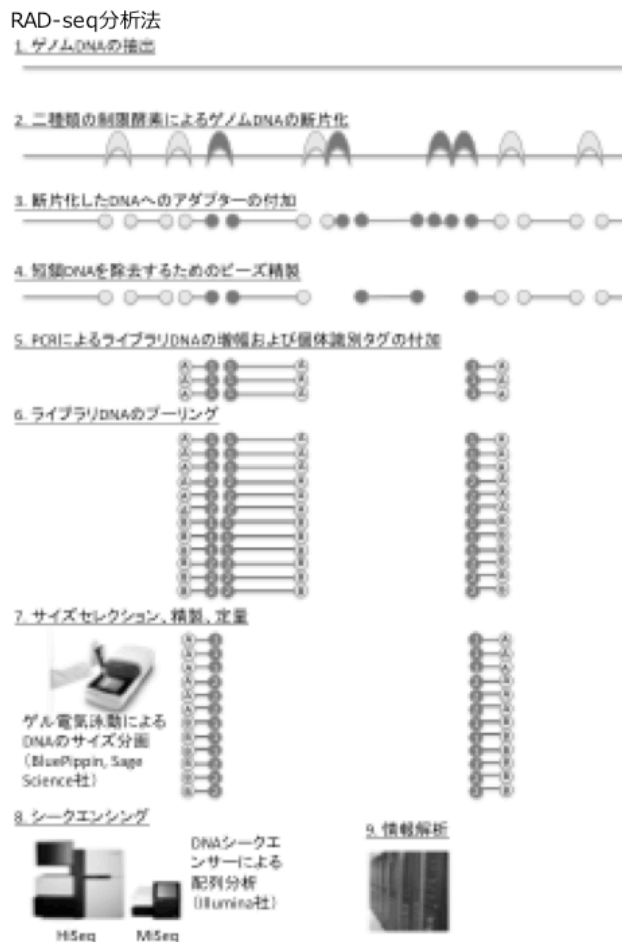


図2 RAD-seq分析法の概要図

本法は、事前にゲノム配列情報やSNP等のターゲットの位置情報を必要としない。

(1) 植物からゲノムDNAを抽出する。(2) 二種類の制限酵素を使用してゲノムDNAを切断する。(3) 切断末端にそれぞれの配列に特異的なアダプター配列を付加する。(4) 未反応のアダプターや短鎖DNAを除去するために磁気ビーズによる精製を行い、長鎖DNAを回収する。(5) 回収したDNAを鋳型にして、アダプター配列に相補的なプライマーを用いてPCRを行う。この際、プライマーには個体を識別するタグ配列を付加しておく。(6) この操作を多検体について別々に行い、それぞれの個体識別タグが付加されたPCR産物を一つに混合する。(7) 混合したDNAはゲル電気泳動によりサイズ分画し、プライマーダイマー等の短鎖DNAを除去し、リアルタイムPCRを用いて定量する。(8) 得られたDNAをシークエンスライブラリとし、これをNGSで配列分析し、配列データを得る。情報学的手法により得られたデータの解析を行い、個体間のSNPの検出を行う。

表1. RAD-Seqで見出したSNPの数

品種名	SNP数
愛知ファースト	1,592
Ailsa Craig	1,610
ふりこま	1,565
M82	1,710
Moneymaker	1,609
San Marzano	1,632
6品種共通	1,736

表2. RAD-Seqで検出されたSNPの数

品種名	RAD-SeqとWGSの結果が一致	RAD-SeqとWGSの結果が不一致	RAD-Seqでのみ検出	合計
Ailsa Craig	1228 (76.3%)	45 (2.8%)	337 (20.9%)	1,610
ふりこま	1183 (75.6%)	45 (2.9%)	337 (21.5%)	1,565
M82	1238 (72.4%)	97 (5.7%)	375 (21.9%)	1,710

3. トマト単為結果性およびトマト黄化葉巻病抵抗性に関する遺伝子の新規変異体の獲得

HOR1003

1) 標的遺伝子の変異体検索

トマト遺伝資源(736系統)を用いて、単為結果性関連遺伝子とトマト黄化葉巻病抵抗性関連遺伝子を対象にした変異検索を行った。個体別に異なる組み合わせの2種類のインデックス配列を付加したPCR産物を作成し、シーケンス分析により736系統を識別できる方法を確立した。配列データのバイオインフォマティクス解析により、標的遺伝子の変異を検出した(表3)。標的遺伝子の機能欠損やリーキー変異を持つ系統を選抜し、サンガー法により変異の確認を行った。

表3 トマト遺伝資源の標的遺伝子変異

標的遺伝子	遺伝子機能に与える変異の影響度	
	高	中
単為結果性遺伝子	0 (0)	63 (36)
単為結果性関連遺伝子_01	1 (1)	3 (3)
単為結果性関連遺伝子_02	2 (2)	65 (47)
単為結果性関連遺伝子_03	0 (0)	1 (1)
単為結果性関連遺伝子_04	2 (2)	66 (43)
単為結果性関連遺伝子_05	0 (0)	60 (40)
単為結果性関連遺伝子_06	1 (1)	114 (51)
単為結果性関連遺伝子_07	1 (1)	5 (5)
TYLCV相互作用遺伝子_01	3 (3)	165 (114)
TYLCV相互作用遺伝子_02	2 (4)	94 (81)
TYLCV相互作用遺伝子_03	3 (3)	68 (93)
TYLCV相互作用遺伝子_04	1 (1)	12 (11)
TYLCV相互作用遺伝子_05	2 (2)	83 (71)
TYLCV相互作用遺伝子_06	1 (1)	42 (42)
TYLCV相互作用遺伝子_07	0 (0)	34 (34)

*変異数(系統数)

*変異による遺伝子機能に与える影響度(推定)

高: フレームシフト変異、ナンセンス変異、スプライスサイトの変異など

中: ミスセンス変異など

2) トマト単為結果性関連遺伝子の変異体

トマト遺伝資源から単為結果性遺伝子に変異をもつ変異体3系統を見出した(図3)。変異体系統の単為結果性を評価したところ、いくつかの系統は弱い単為結果性を示した。今後、ゲノム背景を大玉トマト栽培品種に置換し、形質評価を行い、育種素材化を図る。

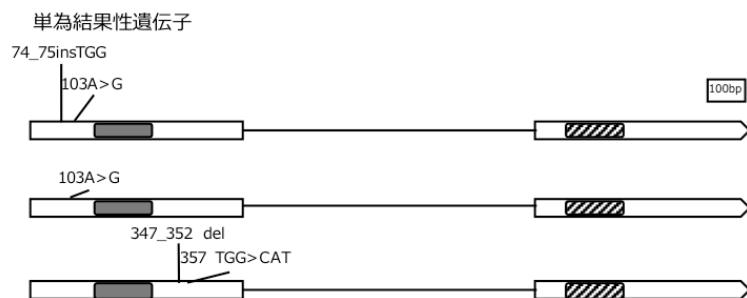


図3 トマト遺伝資源で検出された標的遺伝子の変異

3) トマト黄化葉巻病抵抗性関連遺伝子の変異体

トマト黄化葉巻病ウイルス TYLCV との相互作用が推測される 4 つの宿主遺伝子を標的としてトマト遺伝資源から変異体を検索し、アミノ酸置換を生じる変異体 13 系統を見出した。自殖後代から変異を固定した個体を選抜し (図 4) TYLCV 感染に対する応答の評価を行ったところ、少数系統でウイルス増殖の抑制が観察された。今後、標的遺伝子の変異とウイルス増殖の抑制との関係について、詳細な解析を進め、育種素材化を図る。

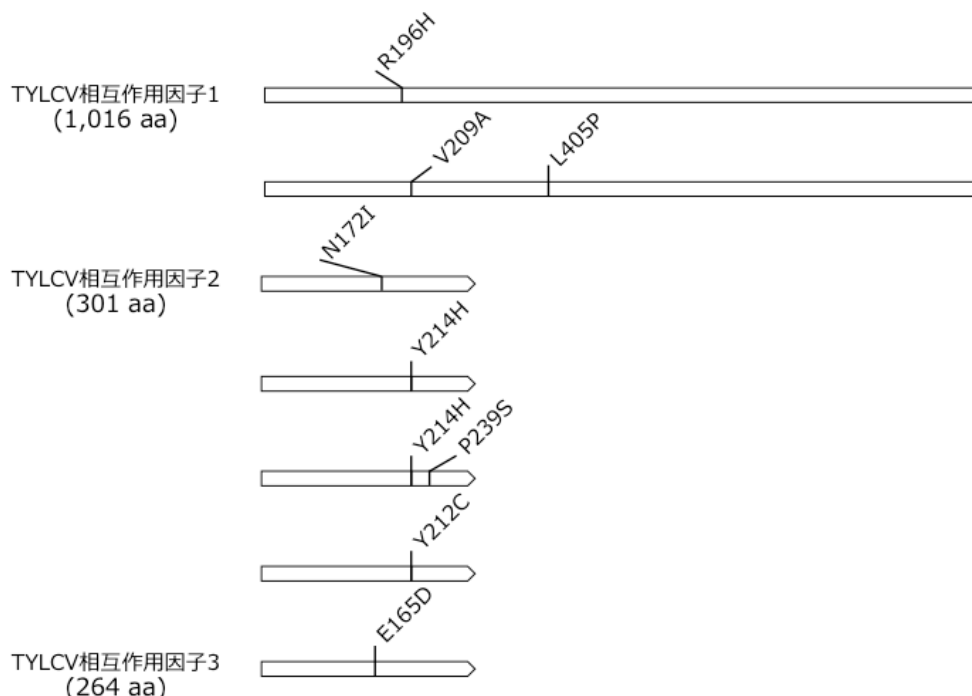


図4 トマト遺伝資源で確認された変異(TYLCV相互作用因子)

3) 成果活用における留意点

・超並列シーケンサーを用いた変異検出手法と一塩基多型タイピング法は、十分なデータ量を確保することでエラーを軽減できる。

4) 今後の課題

- ・遺伝資源から見出した突然変異体の評価を進め、育種素材化する。
- ・突然変異体集団から標的遺伝子の変異体を選抜し、表現型評価および栽培品種への戻し交雑により育種素材化する。
- ・育成した突然変異体集団の活用を図り、新たな標的遺伝子変異体を検索するとともに、突然変異体集団の表現型調査を行い遺伝学的解析により新たな育種素材を開発する。

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (HOR)

小課題番号: HOR1004

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: ナス単為結果性を制御する原因遺伝子の単離

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 野菜花き研究部門・野菜育種・ゲノム研究領域・ゲノム解析ユニット・宮武宏治

1) 研究目的

ナスの施設栽培において、低温あるいは高温環境下で生じる花粉稔性の低下は落花や果実の肥大不良を引き起こし、収量確保の大きな妨げとなってきた。これに対して、ホルモン剤(4-CPA)の散布等によってこれまで対策が取られてきたが、多大な時間と労力(全作業労働時間の27%)を要することから、生産コストの増大を招く要因となっていた。そこで、我々はこの問題に対する抜本的な解決策の1つとして単為結果性ナス品種「あのみり」、「あのみり2号」を育成し、普及に努めている。「あのみり」の発表を1つの契機として、ナスにおける単為結果性の利用が民間種苗会社や公立研究機関等の注目を集めることとなり、野茶研と素材を共有した単為結果性品種の育成が広範囲に広がりつつある。本課題では、これら単為結果性品種育成の効率化に利用可能な遺伝子マーカーの作出を目的とし、「あのみり」の両親と兄弟関係にあるAE-P03が有する単為結果性遺伝子座のうち効果の大きい2つ(*Cop3.1*, *Cop8.1*)に座乗する原因遺伝子を単離する。

本課題において対象とする単為結果性遺伝子は、実用上問題となる劣悪形質を伴わないことから、非常に有望な遺伝子として期待されている。代表的なナス科果菜類であるトマトにおいては、すでに数多くの先行研究が報告されているが、採種性、果実肥大性等が不安定であることが問題となっており、実用化には克服すべき課題が多く存在する。このことから、本課題において原因遺伝子が単離され、そのメカニズムの一端が明らかになることは、安定した単為結果性の発現誘導に資する新たな知見となり、得られた成果はナスだけにとどまらず、他のナス科果菜類に波及することも十分に期待できる。

2) 研究成果

(1) 解析材料の育成と単為結果性検定方法

単為結果性系統AE-P03を1回親、非単為結果性系統LS1934を反復親としたBC4F2個体どうしを交配後、自殖した後代(便宜上CSSLF2世代とする)について、*Cop3.1*、*Cop8.1*のいずれかがAE-P03ホモ型に固定し、もう一方がヘテロ型の集団をそれぞれ作出した。これらの後代集団を用いて以下の試験を実施した。検定試験は最低気温15度を目標に加温したビニルハウス内で30cmポットにて栽培し、各株につき7から10花を除雄して約1ヶ月後、単為結果性の有無を調査した。単為結果性の判断基準として「LS1934」の除雄果の最大果実長、65mmを指標とした(11月~翌年4月)。

(2) *Cop3.1* 遺伝子座の同定

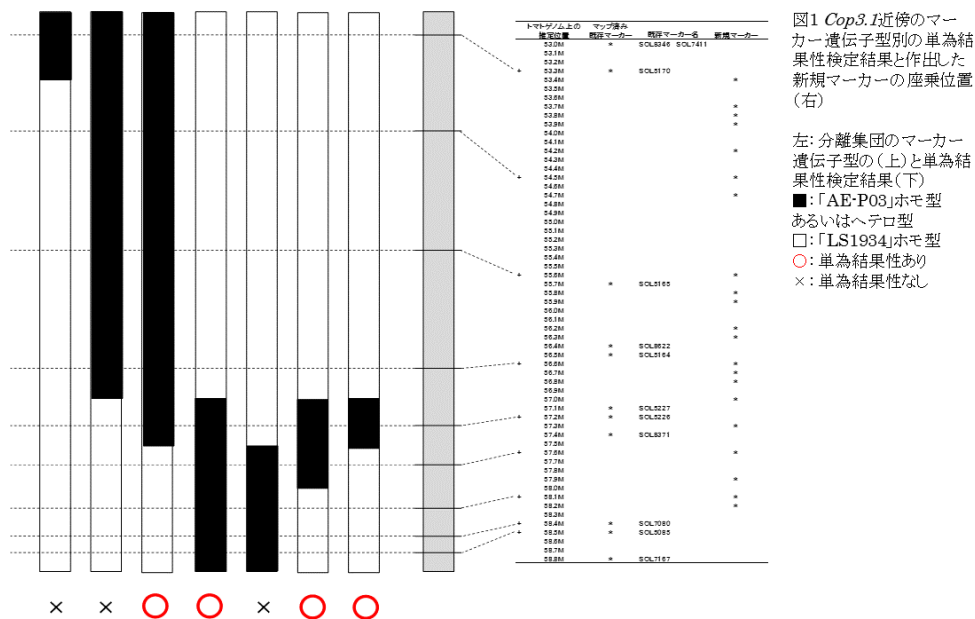
1) AE-P03が有する2つの単為結果性遺伝子座のうち、初期肥大に関わることが示唆されている*Cop3.1*座について、ナスとトマトのオルソログマーカー(Fukuokaら、2012)を手掛かりに、同領域に対応するトマトのゲノム配列(SL2.40)と、座乗するトマトのunigene配列(Sol Genomics Network: <https://www.solgenomics.net>)を取得した。トマトのunigene配列と同祖関係にあるナスのunigene配列(SMEr2.5.1、Hirakawaら、2014)を抽出し、これら遺伝子が座乗するナスのゲノム配列(Hirakawaら、2014)を明らかにした。この配列上に100kb間隔を目標に各ブロックにつき10-20kbを増幅するプライマーペアを設計した。

2) 上記プライマーペアによって増幅した2つのナス系統(単為結果性系統・AE-P03、非単為結果性系統・LS1934)由来のPCR産物をMiseqライブラリ調整キット(NexteraXT、Illumina社)に

よって調整し、MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina 社) を用いて塩基配列を取得した。

3) 2) で得られた2つの系統の配列を比較解析し、系統間多型情報を得た。その結果、候補領域を100kbpごとに区切ったブロックのうち、トマトにおいて座乗遺伝子が推定された44箇所について上記プライマーペアの設計を試みたところ、42箇所についてPCR産物の増幅が確認できた。このうち、MiSeqによって配列が正確に得られた38箇所の系統間変異を調査したところ、マーカー候補となる大量の変異を検出した。

4) これら系統間多型候補をダイレクトシーケンスで確認した結果、38個の新規マーカーが作出された。それぞれの由来配列をもとに、マーカーの座乗位置を検証したところ、候補領域5.2M(53.3M-58.5M:推定値)を100kbpごとに区切ったブロック52ヶ所のうち、既存のマーカーが9ヶ所、新規マーカーが同領域を除く21ヶ所に座乗することが明らかとなった(図1)。



5) Cop3.1 座近傍をヘテロ型に有する個体の自殖次世代集団 (CSSLF3) 1,800 個体に対して、候補領域に等間隔に配置した9つのSSRマーカーを供試し、各個体の遺伝子型を決定した。同領域内で乗り換えが生じていることが確認された個体を選抜後、自殖次世代 (CSSLF4) の中から、候補領域の一部がAE-P03ホモ型に置換した個体を選抜し、単為結果性検定に供試した。その結果、56.5M-57.6M(1.1Mbp)の範囲に原因遺伝子が座乗することが示唆された(図1)。さらなる候補領域の絞り込みと原因遺伝子の単離を目指したが、数百個体の個体を扱う必要があり、もう一つの主動的に働く単為結果性遺伝子座 Cop8.1 と並行して遺伝子単離を進めることは困難であると判断した。また、当該遺伝子座は果実の初期肥大に関与することが示唆されており、日本型ナスの多くは潜在的にその能力を有することが期待されることから、Cop8.1の遺伝子単離に集中することとした。

(3) Cop8.1 座に座乗する単為結果性遺伝子の単離

1) 候補領域に座乗するマーカー配列を手掛かりに同領域に座乗するBACクローンをスクリーニングし、配列情報を得た。この配列上に存在する系統間多型を元に16個の新規マーカー(M1-M16)を作出した。昨年度のCSSLF4集団を用いた単為結果性検定結果と併せて検証したところ、2つのマーカー間(M4-M13)に原因遺伝子が座乗することが明らかとなった。これは、68kbpの物理距離に相当する(図2)。

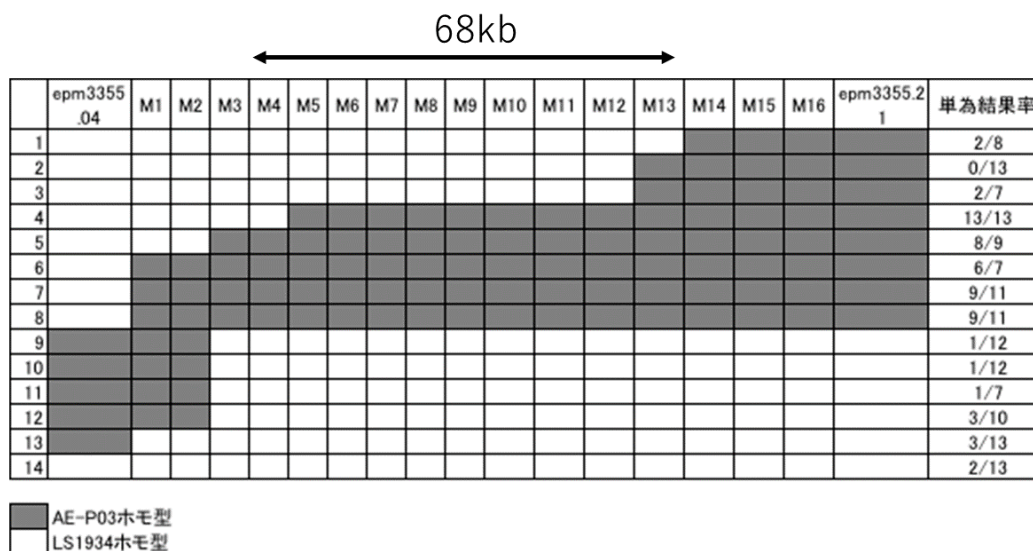


図2 *Cop8.1*が座乗するゲノム領域（マーカーM4-M13）とその物理距離
 M1-M16：近傍マーカー 1-14：単為結果性検定供試個体

2) 2つの系統（AE-P03、LS1934）に由来するBACライブラリーから上記候補領域をカバーするBACクローンをそれぞれ単離し、配列を決定した。それらを比較することにより、系統間に4つの変異が存在することが明らかとなった（図3：B-E）。

3) CSSLF6世代の中から、M4-M13の間で組換えが生じた個体を選抜し、単為結果性検定に供試した結果、B、Cの変異のいずれかが原因であることが示唆された（図3）。

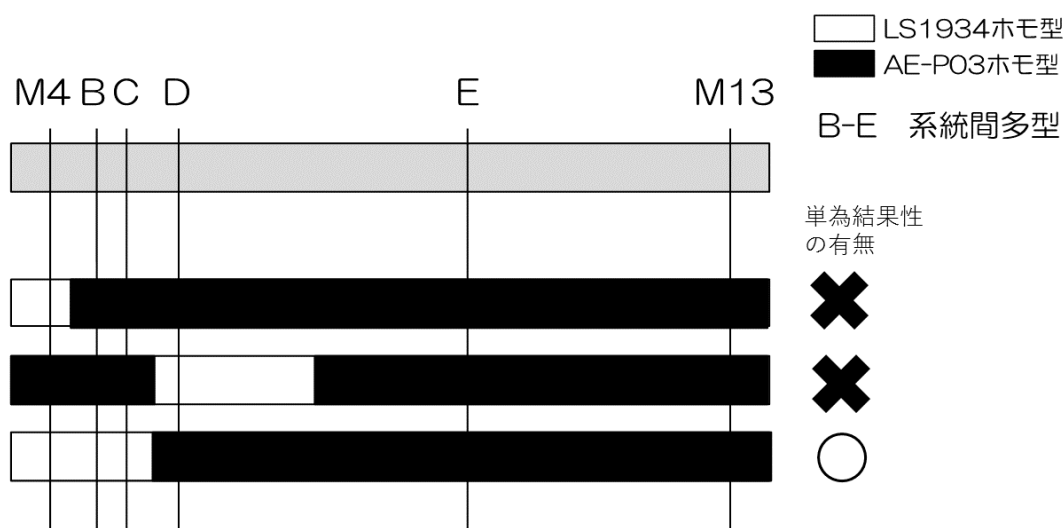


図3 候補領域内の系統間変異（A-E）の遺伝子型と単為結果性の有無

4) B、Cの変異について、ナス遺伝資源約1000点の遺伝子型を確認したところ、それぞれ31、143系統においてAE-P03型の遺伝子型を示した。Bの変異をAE-P03ホモ型、あるいはヘテロ型に有する個体は全て単為結果性を示すことが確認された。一方で、変異Cについては単為結果性の有無とは無関係であった。

5) 遺伝的背景を LS1934 とし、候補領域近傍のみをヘテロ型に有する個体の自殖後代から得られた系統 A と系統 B について、網羅的遺伝子発現解析により候補領域内で発現している領域を確認したところ、B、C の近傍領域に系統間で違いが見られる領域が存在することが明らかとなった。これを *GENE2* とする。*GENE2* の詳細な発現解析を実施したところ、AE-P03 ではあらゆる部位・ステージで発現が確認されたのに対して、中生真黒 (NKT) ではほとんど発現していないことが明らかとなった。ごく限られた候補領域内に存在し、発現パターンと単為結果性の有無が同調していることから、*GENE2* が新たな候補遺伝子として有望であることが示唆された。この転写産物について、得られた配列を NCBI の nr/nt データベースに対して BLASTN を用いて相同性検索したが、相同性の高い遺伝子は検出できなかったことから、機能の推定には至っていない。

6) 図 4 に示すとおり、*GENE2* をターゲットとした 3 つのコンストラクトを構築し、それぞれ GFP 発現植物形質転換用バイナリベクターの T-DNA 領域に挿入し形質転換ナスを作出した。

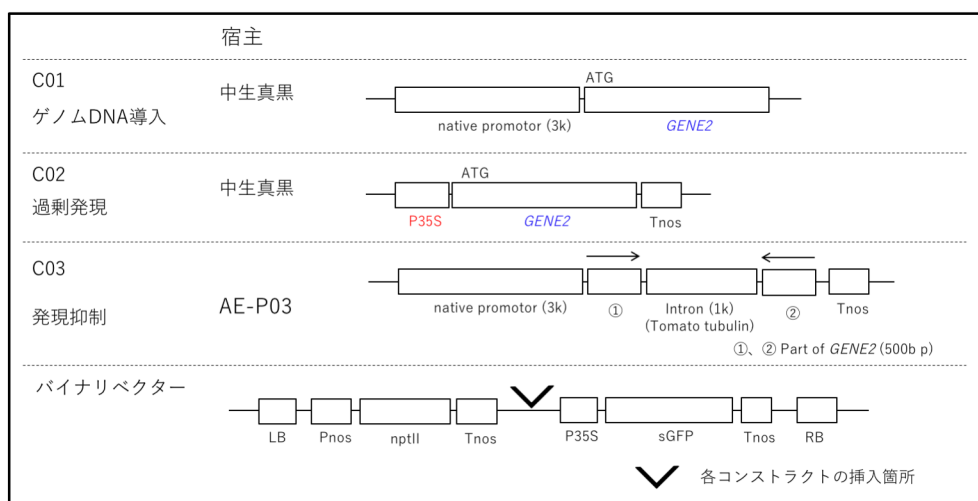


図4 形質転換用コンストラクトの模式図

上記のコンストラクトのうち、C01、C02 を導入した組換え個体においては、単為結果性を付与することはできなかったが、C03 を導入した AE-P03 において単為結果性が抑制される現象が T0 世代で確認された。

7) *GENE2* 近傍領域のメチル化解析

4) で選抜した変異 B をヘテロ型に有する単為結果性個体の自殖次代において、変異 B の有無とは関係なく *GENE2* が発現し、単為結果することが確認されたことから、変異 B が直接原因ではないことが示唆された。塩基配列上のいずれの変異も *GENE2* の発現の直接の原因ではないことから、メチル化状態に着目し解析することとした。中生真黒と AE-P03 のゲノム DNA を抽出しバイサルファイト処理したのち、候補領域をカバーする PCR プライマーで増幅した。約 8kb の領域を 12 ペアのプライマーで増幅した。その後、増幅した PCR 産物をプラスミドベクターでクローニングしシーケンスデータを取得した。両系統の該当する DNA 領域のメチル化程度を確認したところ、転写開始点を含むと思われる上流領域についてはメチル化程度の違いは確認されなかった。

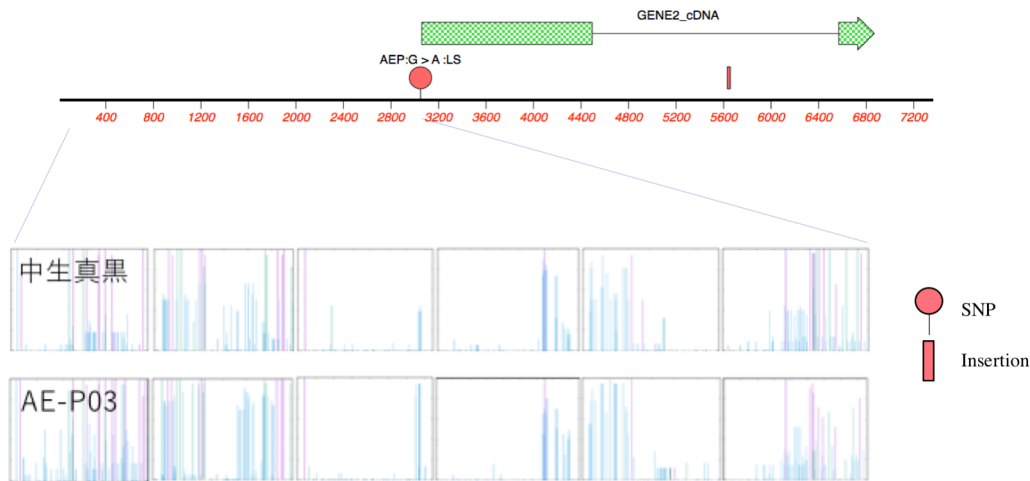


図5 GENE2近傍配列のメチル化状態

3) 成果活用における留意点

2つの単為結果性遺伝子座のうち、効果の小さい *Cop3.1* については初期の着果肥大に関与している可能性が高い。育種に用いる母本が未受粉時に初期肥大しない場合、当該遺伝子座の利用を強く推奨する。一方で、日本で一般的に栽培されているナスの中には、未受粉時に初期肥大が生じる品種が数多く存在する。こういった母本を利用する場合には、*Cop8.1* 座の利用を優先し、可能であれば *Cop3.1* についても考慮することが望ましい。いずれにしても、本課題で対象とした単為結果性素材は *Cop3.1*、*Cop8.1* 座以外にも遺伝的背景の影響により単為結果していることが示唆されている。マーカー選抜した個体の中でも単為結果性の程度に強弱が生じることを想定し育種規模や選抜方法を検討する必要がある。

4) 今後の課題

Cop8.1 遺伝子座にほぼ同定された単為結果性の原因遺伝子 *GENE2* (仮) については、機能が不明であり、制御メカニズムについても明らかになっていない。得られた原因遺伝子の情報をナス科全体に利用拡大する為には、遺伝子機能の同定と制御方法の解明が必要である。また、対象とする単為結果性は *Cop3.1*、*Cop8.1* 以外にも遺伝的背景の影響を受けることが示唆されている。今までに検出されていない単為結果性に関わる遺伝子座をゲノム全体において明らかにすることであらゆる交配組み合わせでの利用の促進につなげることが今後の課題である。

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (HOR)

小課題番号: HOR1005

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: ナスにおける花粉稔性回復遺伝子の単離

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 京都産業大学・総合生命科学部・山岸博

1) 研究目的

我国の重要な野菜の1つであるナスは、極めて顕著な雑種強勢を示す。このため古くから F₁ 育種が行われており、我国の実用的な品種はほぼすべて F₁ 品種である。しかしながら、ナスの F₁ 育種は今日まで、人工的な除雄と人工授粉によって行われており、効率的で確実な F₁ 採種には至っていない。ナスの F₁ 育種の効率化ならびにナスの生産性向上のために、現在、細胞質雄性不稔 - 稔性回復系の開発と利用が強く期待されている。本研究課題では、細胞質雄性不稔を利用したナスの F₁ 育種に必須である稔性回復遺伝子を単離するとともに、国内外のナスの遺伝資源において、稔性回復遺伝子の有無を判定するために利用可能な DNA マーカーを開発することを目的とする。

本研究を担当する2機関の共同研究によって、ナス属野生種に由来する細胞質雄性不稔の原因遺伝子候補がミトコンドリアゲノム上に同定され、単離されている。この細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子を単離することは、雄性不稔 - 稔性回復系という、農業生産の向上を目指す植物育種とりわけ F₁ 育種にとって、極めて重要な現象のメカニズムを明らかにする意義をもつ。また稔性回復遺伝子の DNA マーカーの開発は、この系を利用した効率的な F₁ 育種を、民間育種機関を含めて世界的に広く普及させることに貢献する。

2) 研究成果

(1) DNAマーカーの開発

ナスの台木用品種である「耐病 VF」と栽培ナスとの交雑後代を材料として用いた。「耐病 VF」は、ナス属野生種の雄性不稔細胞質を持つと同時に、この雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 (*Rf* 遺伝子) を有することが明らかになっている。交雑後代のうち、雄性不稔細胞質を持ち、かつ *Rf* 遺伝子をヘテロに持つと考えられる個体を自家受粉することによって、花粉稔性について分離する大規模な集団を作出した。この大規模集団を用いて、*Rf* 遺伝子の DNA マーカーを開発しようとした。

予備的な調査によって *Rf* 遺伝子と連鎖すると考えられる2つの DNA マーカー (マーカー A およびマーカー B) が得られた。そこでこれらのマーカーについて、多数の個体を含む花粉稔性分離集団を用いて、マーカー間の連鎖および *Rf* 遺伝子とマーカーの間の連鎖を調査した。調査した 1012 個体の集団において、*Rf* 遺伝子とマーカー A との組換え個体が 11 個体、*Rf* 遺伝子とマーカー B との組換え個体が 7 個体観察された。その一方で、マーカー A とマーカー B の間の組換え個体は 18 個体認められた (表-1)。これらのことから *Rf* 遺伝子は2つの DNA マーカー (マーカー A とマーカー B) の間に存在すると考えられた。

上記の結果と栽培ナスのゲノム解析情報に基づいて、栽培ナスにおいてマーカー A とマーカー B の間に存在すると考えられる8個の Scaffold 上に DNA マーカーを作出して、さらに大規模な集団を用いて、*Rf* 遺伝子と DNA マーカーとの関係をより詳細に調査した。約 3400 個体について *Rf* 遺伝子と DNA マーカーとの関係を観察した結果、可稔個体の中に Scaffold 5 ~ Scaffold 8 上のマーカーにおいて不稔個体特異的なパターンを示す個体 (表-2 の No.188) が認められた。その一方で、同じく可稔個体の中に Scaffold 1 ~ Scaffold 6 上のマーカーにおいて、不稔個体特異的なパターンを示す個体 (表-2 の No.633) が観察された。これらのことは、調査した花粉稔性分離集団には、マーカー A から Scaffold 5 に至る領域に *Rf* 遺伝子を持つ個体と、Scaffold 7 からマーカー B に至る領域に *Rf* 遺

伝子を持つ個体が存在することを示した。このためこの領域には、当初想定されたような単一遺伝子 (Saito *et al.* 2009) ではなく、密接に連鎖した2つの *Rf* 遺伝子が存在すると推定された。

表-1 花粉稔性分離集団におけるDNAマーカーと*Rf*遺伝子の連鎖

稔性 ^a	(a) <i>Rf</i> とマーカーA			(b) <i>Rf</i> とマーカーB			(c) マーカーAとマーカーB				
	マーカーA ^b		計	稔性	マーカーB ^b		計	マーカーA	マーカーB		計
	F	S			F	S			F	S	
可	699	5	704	可	701	3	704	F	696	9	705
不	6	302	308	不	4	304	308	S	9	298	307

- a. 稔性の可は、*Rf*遺伝子を持つことにより可稔の個体を、不は*Rf*遺伝子がないことにより不稔の個体を示す。
b. マーカーAおよびBのFとSはそれぞれ、可稔特異的なパターン(F)と不稔特異的なパターン(S)を持つ個体を示す。

表-2 大規模な花粉稔性分離集団における*Rf*遺伝子とDNAマーカーの組換え個体

個体と稔性 ^a	マーカー ^b									
	マーカーA	Sca1-10	Sca2-4	Sca3-10	Sca4-6	Sca5-3	Sca6-32	Sca7-1	Sca8-7	マーカーB
96(可)	H	H	H	H	H	G	H	H	H	S
845(可)	H	H	H	H	H	G	H	H	S	S
451(可)	H	H	H	H	H	G	H	S	S	S
850(可)	H	H	H	H	H	G	H	S	S	S
188(可)	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S
175(可)	S	H	H	H	H	G	H	H	H	H
63(可)	S	H	H	H	H	G	H	H	H	H
874(可)	S	S	S	H	H	G	H	H	H	H
199(可)	S	S	S	S	S	G	H	H	H	H
512(可)	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
633(可)	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H
459(不)	H	S	S	S	S	S	S	S	S	S
163(不)	H	S	S	S	S	S	S	S	S	S
568(不)	H	H	S	S	S	S	S	S	S	S
213(不)	H	H	H	S	S	S	S	S	S	S
218(不)	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S
270(不)	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S

- a. 可と不は表-1と同じ
b. Sca1～Sca8は栽培ナスゲノム中の Scaffoldを示す。
マーカーのHはヘテロ型、Sは不稔ホモ型を示す。
またGは優性マーカーの増幅を示す。

そこで、これら2つの個体 (No.188 および No.633) について花器の形態と葯の発達および花粉を詳しく観察した。その結果、No.188 の個体 (図-1 中央) は花弁の展開、葯の発達が正常で、高い可稔花粉率を示した。これに対して、No.633 の個体 (図-1 右) は花弁と葯がやや委縮している形態を示すものの、花粉稔性は正常であった (図-1)。このことから、No.188 がより高い稔性回復力を持つと考え、この *Rf* 遺伝子について優先的にDNAマーカーを開発しようとした。

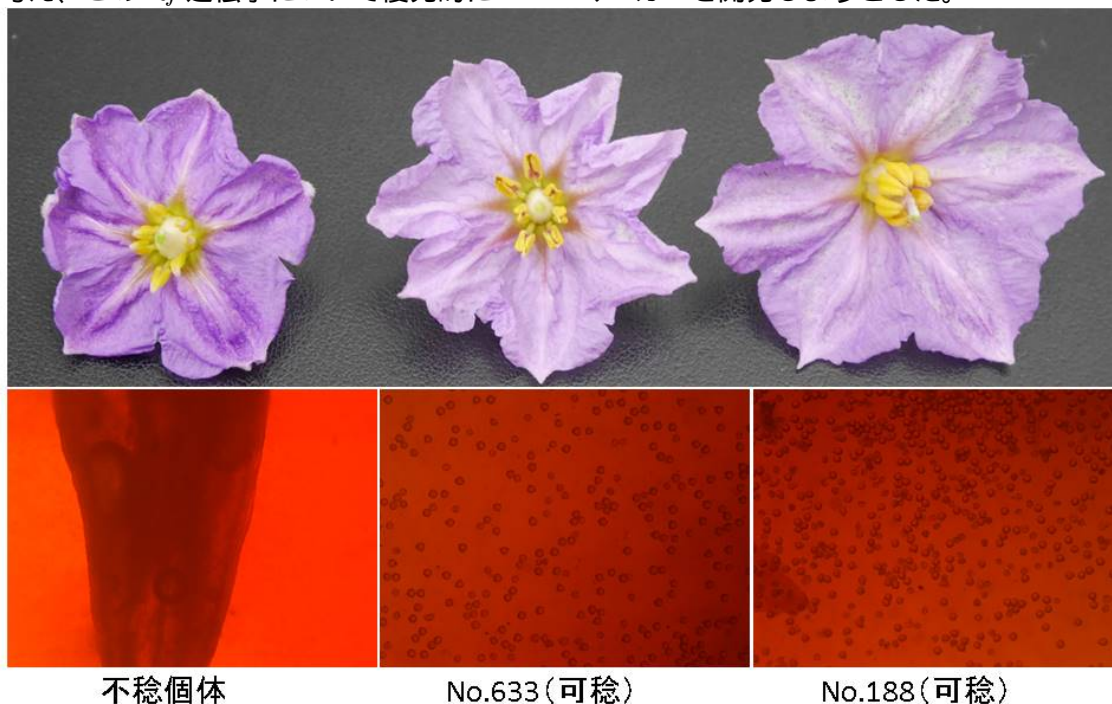


図-1 *Rf* 遺伝子の違いによる葯の発達と花粉稔性

一方、表-2 のうち *Rf* 遺伝子を持たない不稔個体において、Scaffold 1 ~ Scaffold 4 上のマーカーが可稔ヘテロ個体特有のパターンを示す個体 (No.218, No.270) が存在した。これらの不稔個体と No.188 の可稔個体のDNAマーカーのパターンから、*Rf* 遺伝子は栽培ナスのゲノムにおける Scaffold 4、Scaffold 5 およびこれらの間のギャップに対応した領域に存在すると判断し、より密接に連鎖するDNAマーカーの開発を試みた。そのために、後述するフォスミドクローンで明らかになった塩基配列を利用して、Scaffold 4 と Scaffold 5 およびそれらに対応する領域に新たにマーカーを作出して、花粉稔性との関係を調査した。その結果、先の大規模集団において、Scaffold 4 上のマーカーと Scaffold 5 上のマーカーの間で組換えを起こしていた個体 (No.188, No.199, No.270) について、花粉稔性と完全に連鎖したDNAマーカーが2つ (Sca4-seq01-2, Sca4-seq07) 見出された (表-3)。このうち Sca4-seq01-2 は *Rf* 遺伝子をホモに持つ個体とヘテロに持つ個体を識別することができる共優性マーカーである。また、Sca4-seq07 は *Rf* 遺伝子をホモまたはヘテロで持つ個体で、DNAの増幅が見られる優性マーカーである (表-3、図-2)。以上の結果より、今回調査した領域に存在する2つの *Rf* 遺伝子のうち、より高い稔性回復力を持つ *Rf* 遺伝子との間で、極めて密接に連鎖した2タイプのDNAマーカーが開発された。

表-3 *Rf*遺伝子のDNAマーカーの開発

個体と稔性 ^a	DNAマーカー ^b					
	Sca4-6	Sca4-15	Sca4-seq01-2	Sca4-seq07	Sca5-6a	Sca5-3
188(可)	H	H	H	+	S	S
199(可)	S	S	H	+	H	G
270(不)	H	H	S	-	S	S
組換え個体	あり	あり	なし	なし	あり	あり
優性・共優性	共優性	共優性	共優性	優性	共優性	優性

a. 表-1と同様

b. H: ヘテロ, S: 不稔特異的, G: ヘテロまたは優性ホモ, +: DNA増幅, -: DNA増幅なし

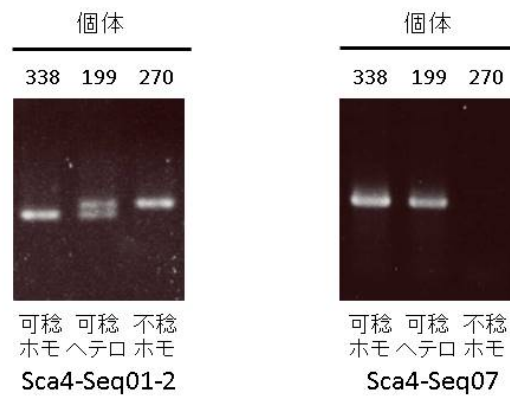


図-2 *Rf*遺伝子のDNAマーカー

開発されたDNAマーカーがナスの育種素材として利用される近縁野生種で有効であるかを試すために、*S. aethiopicum* を用いて調査した。*S. aethiopicum* は細胞質雄性不稔の原因遺伝子として推定されているミトコンドリアの *orf218* を持ち (Yoshimi *et al.* 2013) かつ正常に花粉を形成する。調査の結果、*S. aethiopicum* の2系統はいずれも *Rf* 遺伝子をホモに持つ個体に特有のDNAマーカーを持つことが明らかになった (図-3)。このことから、今回開発されたDNAマーカーは、ナスの育種において、1) 交雑後代で *Rf* 遺伝子を持つ個体を迅速かつ効率的に選抜するマーカーとして、また2) 育種素材として用いる近縁野生種での *Rf* 遺伝子の有無を判定するマーカーとして、ともに利用できるかと判断された。

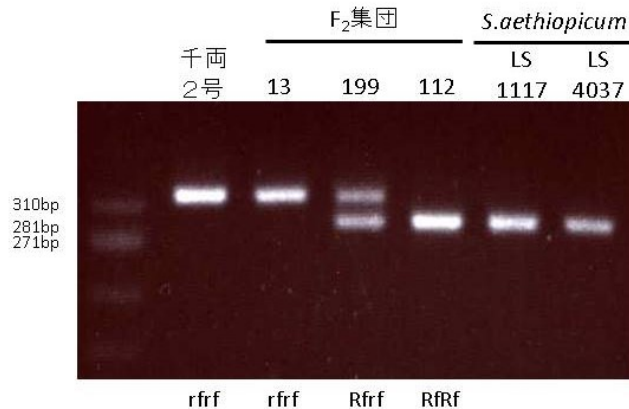


図-3 *S.aethiopicum*におけるDNAマーカーの増幅パターン
(Sme2209-seq01-2)

(2) *Rf* 遺伝子の単離

(1) で推定された2つの *Rf* 遺伝子のうち稔性回復効果が大きい *Rf* 遺伝子を単離することを目的として、Scaffold 4 と Scaffold 5 上のDNAマーカーを優性ホモの形で持ち、正常な花粉稔性を示す個体から fosmid ライブラリーを作成した。この可稔個体は *Rf* 遺伝子をホモに持つと考えられた。作成された fosmid ライブラリーから、上記2つの Scaffold 上の塩基配列を指標として、3個の fosmid クローンを選抜した。

得られた fosmid クローンの塩基配列を決定したところ、1つのクローンは栽培ナスにおける Scaffold 5 に対応する塩基配列を含んでいた。また他の2つのクローンは互いに一部の塩基配列が重複しており、全体として Scaffold 4 に対応する塩基配列および Scaffold 4 と5の間のギャップに対応する約 16.7kbp の塩基配列を持つことが明らかになった。しかし、これら3つのクローンの塩基配列は完全に連続したものとはならず、栽培ナスの2つの Scaffold に対応した領域の完全な塩基配列を明らかにするには至らなかった。このため、さらに fosmid クローン間の塩基配列を約 23kbp 新しく明らかにするとともに、残された配列の決定を進めている (図-4)。その一方で、fosmid クローンで明らかになった塩基配列を利用することによって、(1) で示したように、大規模な花粉稔性分離集団や近縁野生種において、*Rf* 遺伝子と極めて密接に連鎖したDNAマーカーが開発された。また、さらに *Rf* 遺伝子が存在する領域を絞り込むDNAマーカーも開発された。

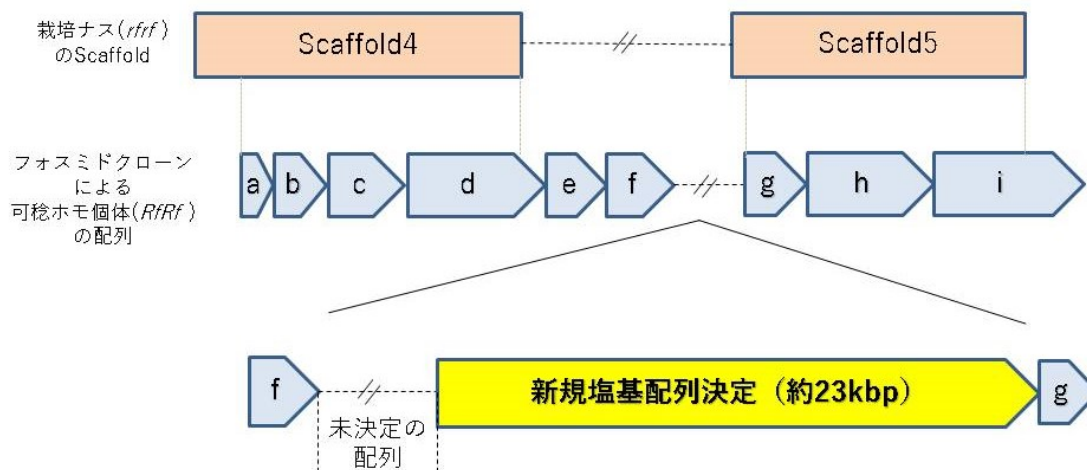


図-4 *Rf*遺伝子を含む領域の塩基配列の決定

なお、フォスミドクローンの解析によって現在までに塩基配列を明らかにした領域には、他の植物で単離されている *Rf* 遺伝子と相同性のある遺伝子は見出されていない。このように、ナス属野生種に由来する *Rf* 遺伝子が存在する領域には、栽培ナスのゲノムと比較して未知の大規模な挿入配列があることが推定された。今後早急にこの領域の全塩基配列を決定することによって新たな *Rf* 遺伝子が単離されることが期待される。

3) 成果活用における留意点

開発されたDNAマーカーは、育種素材として利用するナス属野生種の選択および交雑後代における *Rf* 遺伝子の有無の識別に有効なマーカーである。ただし今回マーカーを開発した遺伝子を含めて *Rf* 遺伝子が、複数存在することに留意する必要がある。

4) 今後の課題

複数存在する *Rf* 遺伝子のうち、1つについてはDNAマーカーが開発され、それらの有効性が示された。しかしもう一方の *Rf* 遺伝子に関しては、存在する領域が推定できたものの、極めて密接に連鎖するマーカーの作出には至っていない。今後この *Rf* 遺伝子についてもマーカーを開発し、*Rf* 遺伝子の有無を高い精度で判定することを可能にする必要がある。

また現在のところ、*Rf* 遺伝子の単離には至っていない。このため今後さらにフォスミドクローンのスクリーニングとその塩基配列の決定を進めることによって、*Rf* 遺伝子を最終的に単離する必要がある。

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成 25～29 年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (HOR)

小課題番号: HOR1006

研究期間: 平成 25～29 年度

小課題名: ダイコンのグルコシノレート含量を制御する遺伝子の単離

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 野菜花き研究部門・野菜育種・ゲノム研究領域・アブラナ科ユニット・吹野伸子

1) 研究目的

ダイコンは作付面積が約 35,000ha と第 1 位の重要野菜であり、生産物の約 6 割が加工業務用途に使用されている。ダイコン根部に含まれる 4-メチルチオ-3 プテニルグルコシノレート (4MTB-GSL) はダイコンの主要なグルコシノレート成分であり、辛味成分 4-メチルチオ-3 プテニルイソチオシアネートの前駆物質として食味に大きく寄与している。平成 24 年度に野菜茶業研究所が育成した「だいこん中間母本農 5 号」は遺伝的に 4MTB-GSL を欠失していることから 4MTB-GSL 合成酵素遺伝子の変異体であることが予想される。4MTB-GSL は辛味成分の前駆物質であると同時に加工・保存時に発生する黄変や硫黄臭の起因物質であるため、4MTB-GSL を全く含有しない「だいこん中間母本農 5 号」は優れた加工適性を持つ新奇な育種素材である。現在、民間種苗メーカー数社において「だいこん中間母本農 5 号」を用いた新品種開発が進行しているが、本形質は劣性遺伝するため高精度選抜マーカーの開発が望まれている。一方、「だいこん中間母本農 5 号」は従来のダイコンでは硫黄臭のために使用出来なかった用途への利用が計画されており、その場合 4MTB-GSL に替わり蓄積するグルコエルシン由来の辛味や微量の硫黄臭が問題となる可能性がある。このことから 4MTB-GSL を欠失した品種開発を行う際には、グルコエルシン含量をコントロールすることが重要である。本研究課題ではダイコンのグルコシノレート組成および含量を制御する遺伝子を単離し、品種開発に有用な DNA マーカーの開発を目的とする。

2) 研究成果

1) 4MTB-GSL 合成酵素遺伝子の単離 (平成 25-26 年度)

1 遺伝子座の劣性変異により 4MTB-GSL を含有しない「だいこん中間母本農 5 号」の兄弟系統 (*grs1-1* 変異体) と、野生型個体の交雑 F₂ ならびに F₃ 集団を使ったポジショナルクローニングにより候補遺伝子を同定し、形質転換による gain-of-function 実験により 4MTB-GSL 合成酵素をコードしていることを確認した。

1-1. ポジショナルクローニング

grs1-1 変異体と野生型個体の分離集団、5,294 個体を使ったポジショナルクローニングにより、4MTB-GSL 合成酵素遺伝子 (*GLUCORAPHASATIN SYNTHASE 1* (*GRS1*)) は、第 1 連鎖群末端の約 23kb の領域に座乗することが予測された (図 1a)。この領域について ORF 予測プログラムである Ausustus (<http://augustus.gobics.de>) による検索を行ったところ、7 つの ORF が推定された。このうち、ORF3 と名付けた領域は *grs1-1* 変異体でほとんど発現が検出されず、*GRS1* の有力な候補遺伝子であると考えられた (図 1b)。

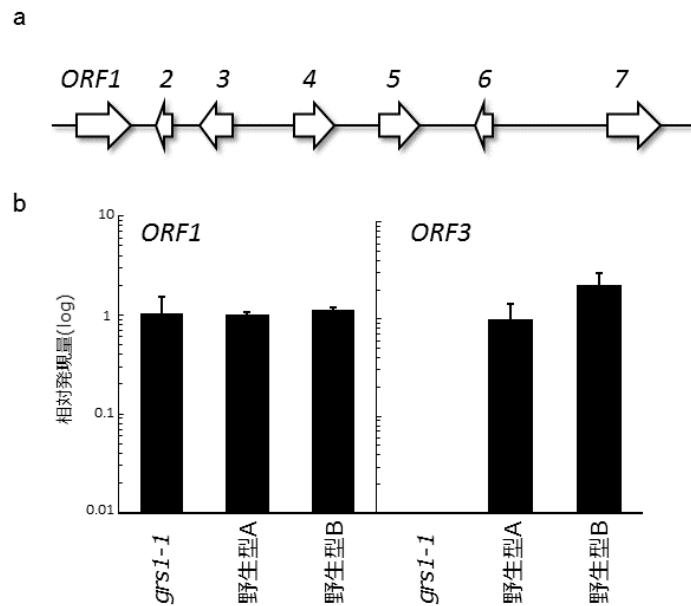


図1. 推定された遺伝子群と発現解析
 (a) ポジショナルクローニングにより同定した23kbの領域内に座乗する推定遺伝子群。(b) 肥大根における *ORF1* および *ORF3* の発現解析。内部標準として *RsACTIN* を用いた。

1 – 2. 形質転換実験

ORF3 の機能を確認するため、シロイヌナズナを使った形質転換実験を行った。シロイヌナズナはダイコンと同じアブラナ科に属し、グルコエルシンと呼ばれるグルコシノレート的一种を蓄積する。*grs1-1* 変異体では、グルコエルシンが過剰蓄積するため、*GRS1* の基質はグルコエルシンであることが示唆されていた。*ORF3* の cDNA を CaMV 35S プロモーターに連結したコンストラクトが導入されたシロイヌナズナでは、本来全く検出されないグルコシノレートである 4MTB-GSL の蓄積が観察された (図 2)。加えて、グルコエルシン含量が低下していたことから、*ORF3* の翻訳産物は、グルコエルシンの側鎖を不飽和化することにより 4MTB-GSL を合成する機能を有していることが推察され、*ORF* が 4MTB-GSL 合成酵素遺伝子・*GRS1* であると結論づけた。

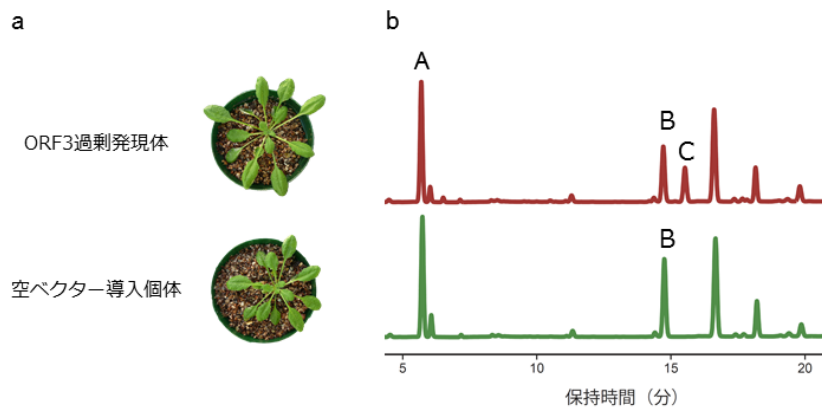


図2. 形質転換によるORF3の機能解析
 (a) ORF3過剰発現体と空ベクター導入個体の草姿
 (b) 形質転換体の本葉から精製したグルコシノレート類のHPLCチャート. A; シニグリン(内部標準)、B; グルコエルシン, C; 4MTB-GSL

1-3. *GRS1*の構造と選抜マーカーの開発

相同性検索の結果、*GRS1*は2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ(2OGD)に属する酵素をコードしていることがわかった。2OGDは動植物や細菌などに広く存在する酵素であり、水酸化や脱メチル化などの様々な酸化反応を触媒する酵素である。*GRS1*遺伝子について、変異体型の対立遺伝子の塩基配列を決定した結果、第1エクソンの約9kbにわたりLTR型レトロトランスポゾンであるTy1-copia様配列の挿入変異が見られ、挿入部位の直下に新たなストップコドンがin-frameで生じていた(図3a)。その結果、変異体では2OGDの活性に必須なドメインを全て欠失している可能性が示唆された。このことにより変異体では*GRS1*の機能が喪失していると推察された。次に、DNAマーカー選抜に利用可能なプライマーの設計を行った。挿入配列をまたぐプライマーセットと、挿入配列上のプライマーの計3種を混合したPCRにより、簡便に遺伝子型を決定できる選抜法を開発した(図3b)。次に「だいこん中間母本農5号」と3系統の固定系統との分離集団(BC₂F₂)をそれぞれ作成し、開発したDNAマーカーにより判別された遺伝子型と表現型が一致することを確認した(表1)。これにより、時間のかかる後代検定や、複雑な操作を必要とするHPLC分析を行うことなく確実に4MTB-GSLの有無を予測することが可能となった。

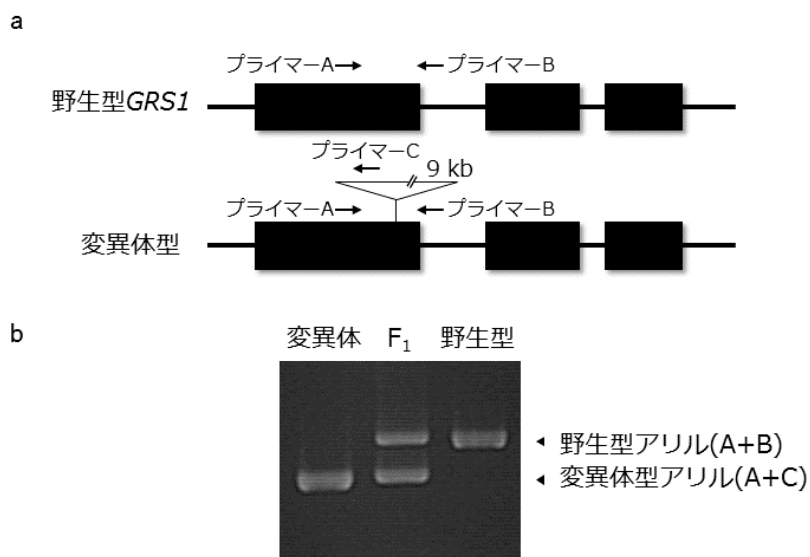


図3. DNAマーカーの設計

(a) 野生型GRS1および変異体型の遺伝子構造。黒い四角はエクソンを示す。(b) 設計したDNAマーカーによる遺伝子型判別。

表1. 分離集団におけるマーカー遺伝子型と4MTB-GSL含量の関係

戻し親	遺伝子型 ¹	個体数	4MTB-GSL含量 ²
IL01	+/+	12	38.5 ± 1.9
	+/-	22	35.4 ± 2.2
	-/-	24	0.3 ± 0.1
IL02	+/+	14	33.4 ± 5.2
	+/-	34	33.4 ± 3.0
	-/-	10	0.4 ± 0.1
IL03	+/+	13	47.8 ± 1.8
	+/-	30	45.4 ± 1.4
	-/-	14	0.6 ± 0.1

1) 野生型(+/+)、変異体型(-/-)、ヘテロ型(+/-)

2) 単位; μ mol/g DW. (平均 ± 標準偏差)

本課題で開発した DNA マーカーによる選抜法については、特許出願済みでありリサーチツール特許として、要請に応じて広く許諾する予定である。

2) グルコエルシン含量を制御する遺伝子の単離

QTL 解析によりゲノム上の位置を調査するとともに、メタボローム解析およびグルコシノレート合成系酵素遺伝子の発現解析により原因遺伝子の推定を行った。さらに、交雑後代系統のマーカー遺伝子型とグルコエルシン含量との関係を解析することにより、QTL 座乗位置の絞り込みを行った。

2-1. QTL 解析

4MTB-GSL を欠失しグルコエルシン含量に差のある両親系統より育成した F_2 364 個体および F_2 の個体別次代 F_3 134 系統を栽培してグルコエルシン含量を測定した。 F_3 系統は、各系統 10 個体を 2 反復で栽培して、平均的な 8 個体について測定を行った。QTL 解析の結果、 F_2 では第 6、7、8 連鎖群に、 F_3 では第 2、3、6、8 連鎖群にピークが検出された (図 4)。

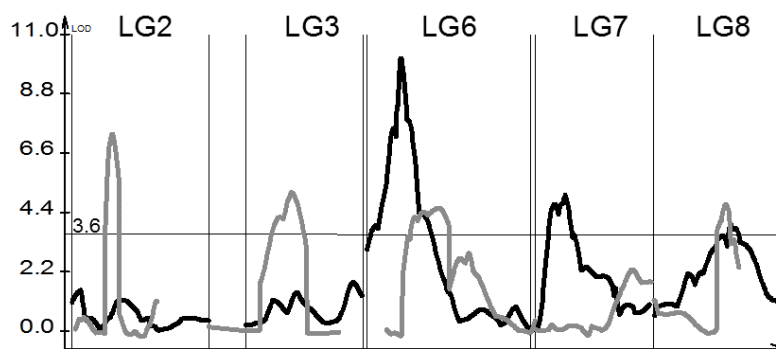


図4. 高グルコエルシン親系統と低グルコエルシン親系統との交雑 F_2 および F_3 で検出されたQTL

黒い線は F_2 、灰色の線は F_3 のQTLを示す。

2-2. メタボローム解析

両親系統それぞれ 3 個体の生育途中および収穫期の葉および根を採取し、グルコシノレートおよび一連の代謝経路の前駆物質、中間体についてメタボローム解析を行った。両親間で有意な差があるピークは最終産物およびその前駆体のみであり、特定の物質の蓄積は見られなかった。このことから、両親系統間でのグルコエルシン量の差異には、合成酵素ではなく転写因子が関与している可能性が示唆された。

2-3. グルコシノレート合成関連遺伝子の連鎖地図上への配置

青首ダイコン自殖系統由来の、76,592 scaffolds (N50: 46,262 bases, total 402 Mb) からなるドラフトゲノム塩基配列 (Kitashiba et al. 2014) は、ダイコン高密度連鎖地図 (2,556 の DNA マーカー、1,156cM、Kitashiba et al. 2014) 上に 1,345 本の scaffold が配置され、ゲノムの

21.8%に相当する116 Mbをカバーする。青首ダイコン由来の次世代シーケンサーで決定し構築された100 kb以上の長さを持つ scaffold のうち、59個の scaffold の両端塩基配列情報からDNA マーカー（CAPS と SNP マーカー）を作成し、高密度連鎖地図構築で使用した F_2 個体に対して遺伝子型分析を行った。その結果、解析した scaffold の9割でその両端が連鎖関係にあることが分かり、scaffold の構築精度が高いことが分かった。このゲノム情報を使い、シロイヌナズナの遺伝子情報から抽出したグルコシノレート代謝に関連する遺伝子をダイコンのドラフト塩基配列に対して検索したところ、26の遺伝子について対応する scaffold が見いだされた。このうち、高密度連鎖地図上に配置されている scaffold との対応関係が分かったものについては連鎖地図上に配置した。また、座乗位置が不明なものについては、scaffold の塩基配列情報を基にDNA マーカーを設計し、高グルコエルシン親系統と低グルコエルシン親系統との交雑 F_2 または F_3 集団の遺伝子型分析を行って連鎖地図上に配置させた。その結果、31個のグルコシノレート合成関連遺伝子の座乗位置が推定された（図5）。検出されたQTLとの連鎖地図上の位置関係を解析したところ、QTL周辺に存在するのはそれぞれ第2および第6連鎖群に座乗する2遺伝子（*B* および *C*）のみであった。なお、転写因子は5つマッピングされたが、いずれもQTL近傍には座乗しなかった。

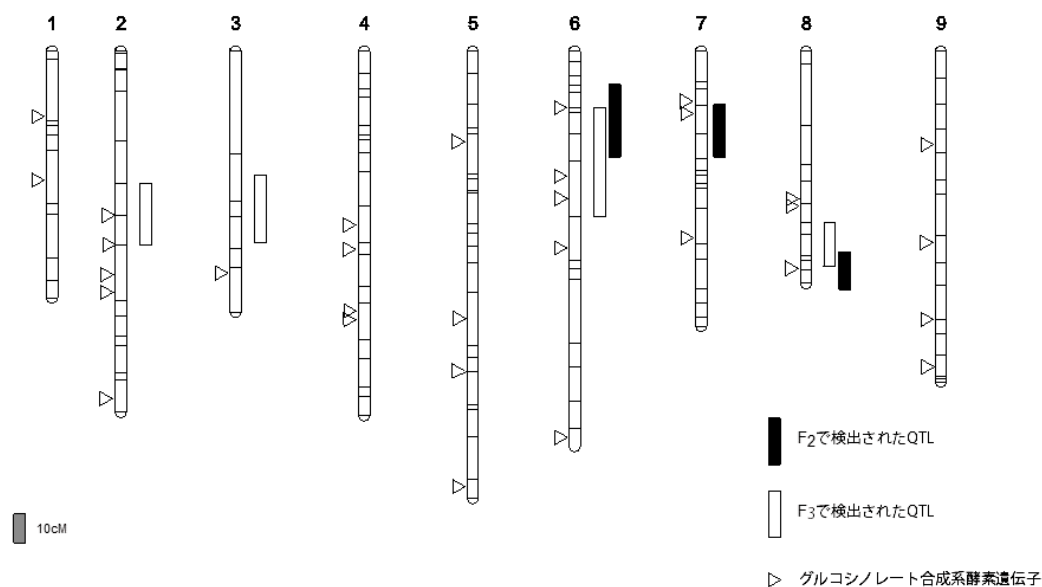


図5. 高グルコエルシン親系統と低グルコエルシン親系統との交雑 F_2 および F_3 において検出されたQTLとグルコシノレート合成酵素系遺伝子の連鎖地図上の位置

2-4. グルコシノレート合成系酵素遺伝子の発現解析

scaffold に座乗したグルコシノレート合成系酵素遺伝子については、そのゲノム塩基配列をもとにプライマーを設計し、高グルコエルシン親系統と低グルコエルシン親系統の根から抽出したRNAから合成したcDNAを鋳型に半定量的RT-PCRにて遺伝子発現を分析した。

その結果、3つの遺伝子 *A*、*B*、*C* で高含有系統と低含有系統間で発現量に差があることが示された（図6a）。*A*、*B*、*C* 遺伝子はそれぞれ第5連鎖群（R5）、第6連鎖群（R6）、第2連

鎖群 (R2) に座乗する (図 6b)。これらの遺伝子がグルコエルシン含量の系統間差に關与する遺伝子の候補と考えられるため、以降で遺伝子の構造を明らかにした。

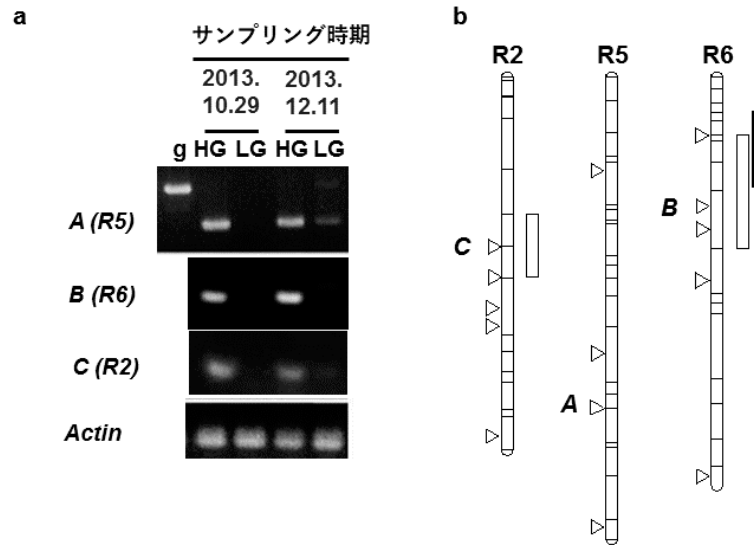


図6. 高グルコエルシン親系統(HG)と低グルコエルシン親系統(LG)の根におけるRT-PCR法によるA、BおよびC遺伝子の発現解析(a)と連鎖地図上の位置(b)
(a)にてgはゲノムDNAを鋳型にしてPCRをしたレーンを示す。黒いボックスおよび白いボックスはグルコエルシン含量に關するQTL

2-5. 候補遺伝子の構造・発現解析および多型マーカー作成

両親間で顕著に根における遺伝子発現差がみられた3つの遺伝子A、B、Cについては、scaffoldのゲノム塩基配列情報をもとにプライマーを設計し、高グルコエルシン親系統と低グルコエルシン親系統のゲノムDNAを鋳型にPCR法にて遺伝子領域を増幅した。両系統由来の塩基配列を決定し、比較解析をした。また、両系統における各遺伝子の挿入・欠失多型を利用し、その領域をPCRで増幅するプライマーをデザインして、高含有系統と低含有系統のゲノムDNAを鋳型にPCRを行い分析した。

A遺伝子はイントロン領域に多数の挿入・欠失が見出され、さらに翻訳開始点より5'側上流では、両系統間で2ヶ所の欠失・挿入多型が見つかった(表2)。後者の挿入断片はトランスポゾン様の特徴を有していた。イントロン領域の挿入・欠失多型を挟み込むようにプライマーをデザインし共優性マーカーを作成した(図7a)。しかしながら、グルコエルシン含量に關するQTLは第5連鎖群には検出されなかったため、以降の解析は中断した。

表2. 各遺伝子の高グルコエルシン親系統と低グルコエルシン親系統間に見られた多型

	5'領域	エキソン	イントロン
A	2ヶ所の挿入・欠失	無し	多数
B	3ヶ所の挿入・欠失	4ヶ所の非同義的置換	多数
C	1SNP	1ヶ所の同義的置換	2 SNPsと466bpの挿入・欠失

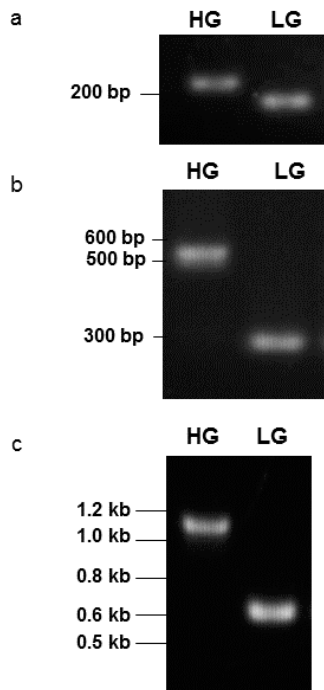


図7. A遺伝子(a)、B遺伝子(b)、C遺伝子(c)のDNAマーカ－化

HG:高グルコエルシン親系統、LG:低グルコエルシン親系統

B 遺伝子の座乗位置周辺に、グルコエルシン含量に関する QTL が検出された (図 6b)。B 遺伝子はダイコンドラフト塩基配列 (Kitashiba et al. 2014) の Rsa1.0_00718 scaffold 上に座乗する。Brassica rapa における B 遺伝子のオルソログ情報と B 遺伝子の塩基配列情報をもとに B 遺伝子の構造を調査すると、その領域からスプライシング位置により 2 種類の転写産物が生じる可能性が示された (B-a, B-b とする)。B-a と B-b それぞれに対する特異的なプライマー対で半定量的 RT-PCR をしたところ、高グルコエルシン親系統においては、根と葉で B-a、B-b

の両転写産物はともに検出され、低グルコエルシン親系統においては、根で両転写産物は検出されず、葉では両転写産物は検出された（図 8a）。ただし、葉ではサイズの異なる 2 つの転写産物が確認された。B 遺伝子のゲノム構造を両系統間で比較した結果、第 2 エキソンに 3ヶ所、第 10 エキソンに 1 箇所の非同義的塩基置換が見出され、さらに翻訳開始点から上流域には、3ヶ所で DNA 断片の挿入・欠失が見られた（表 2）。ここまでの解析から、QTL 領域の B 遺伝子の根での発現差異とグルコエルシン量の高低が相関し、その原因はプロモーター領域に見られる挿入/欠失多型であると考えられた。以上の解析を踏まえて、5' 上流域の挿入・欠失多型を利用し DNA マーカーを作成した（図 7b）。

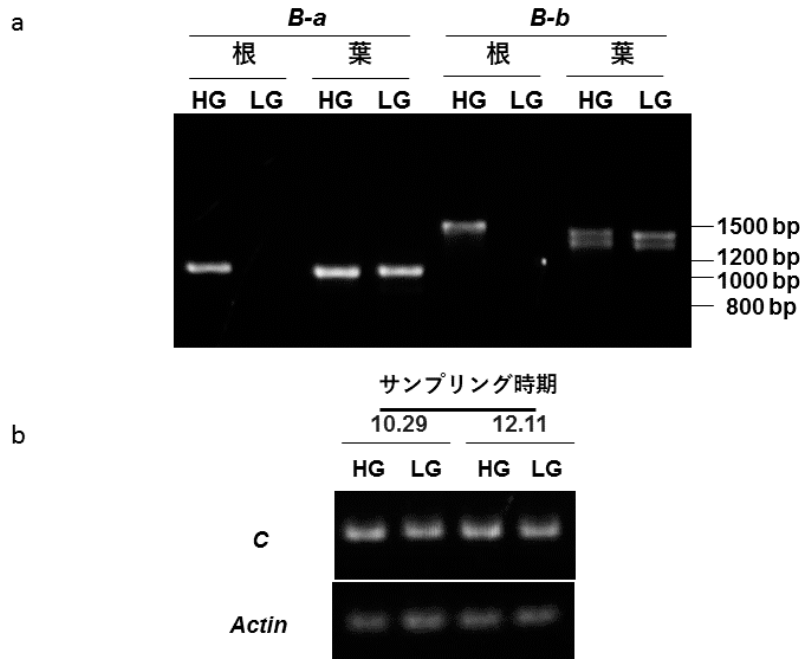


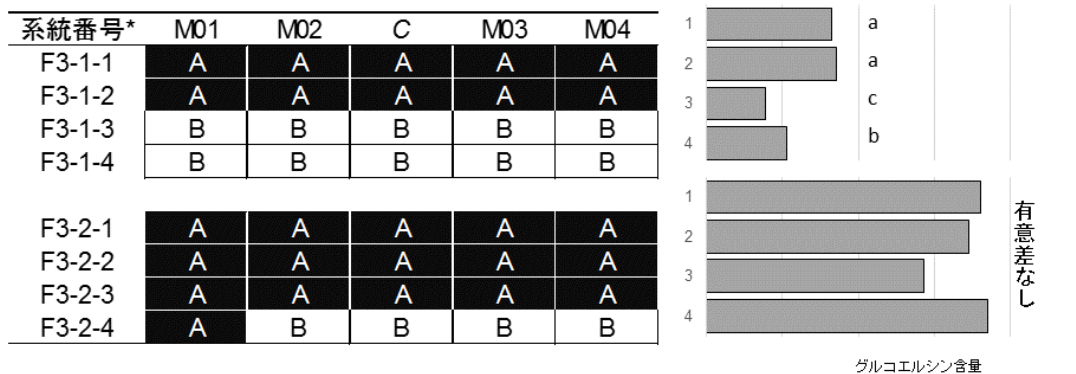
図8. RT-PCRによるB遺伝子の根および葉における発現解析(a)と、葉におけるC遺伝子の発現解析(b)
HG:高グルコエルシン親系統、LG:低グルコエルシン親系統

第 2 連鎖群の C 遺伝子の塩基配列情報からプライマーを設計し、半定量的 RT-PCR をしたところ、根では先の解析（図 6a）と同様に高グルコエルシン親系統でのみ発現が見られ、葉では両系統ともに発現が見られた（図 8b）。遺伝子構造を解析した結果、第 7 イントロンに、高グルコエルシン親系統において 466 bp の挿入が見られた（表 2）。上流約 2kb の塩基配列を両系統間で比較したところ、一塩基多型が 1ヶ所のみであったことから、C 遺伝子の根での発現差異をもたらしている要因として、466 bp の挿入配列の影響が第一に考えられた。以上の多型のうち、466 bp の欠失・挿入多型を利用して DNA マーカーを作成した（図 7c）。

2-6. QTL 座乗領域の絞り込み

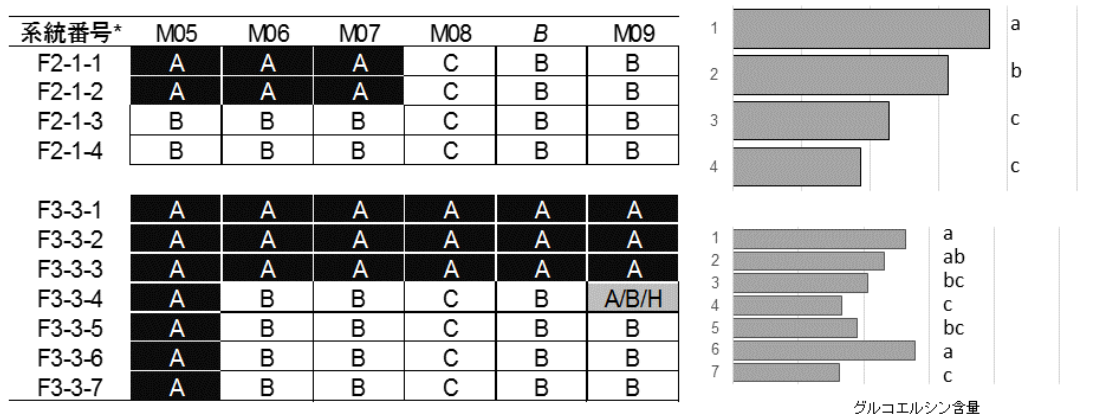
検出された QTL のうち寄与率の高い第 2 および第 6 連鎖群の一部領域について遺伝子型が異なる F₃ 個体別次代 F₄ 系統、および F₄ 個体別次代 F₅ 系統を供試して、QTL 領域のマーカー遺伝子型とグルコエルシン含量を同一個体由来の系統ごとに比較した。その結果、第 2 連鎖群の QTL 領域全体（M01 ~ M04）が高グルコエルシン親系統のアレルである系統は低グルコエルシン親系統のアレルである系統と比較して有意にグルコエルシン含量が大きいこと、並びに

M02 から M04 のマーカー遺伝子型はグルコエルシン含量と関係がないことが示唆された（図9）。第6連鎖群では、M05 から M07 のマーカー遺伝子型が高グルコエルシン親系統のアレルである系統は低グルコエルシン親系統のアレルである系統と比較して有意にグルコエルシン含量が大きいこと、並びに M06 から M09 までのマーカー遺伝子型はグルコエルシン含量と関係がないことが示唆された（図10）。これらより、第2連鎖群の QTL は M01 から M02 の間の約 8cM の領域に、第6連鎖群の QTL は M05 ~ M06 間の約 7cM の領域に座乗すると推測され、当初候補とした C および B 遺伝子が原因遺伝子とは異なる可能性がある。



*各グループ同一F₄個体由来F₃系統。各系統自殖次代16個体と供試してグルコエルシン含量の測定を行った。
左表のマーカー遺伝子型のAは高グルコエルシン親系統のアレル、Bは低グルコエルシン親系統のアレルを示す。
右図のグラフ横の異なるアルファベットはSNK検定で5%水準で有意差があることを示す。

図9. 第2連鎖群のQTL周辺マーカー遺伝子型とグルコエルシン含量



*上は同一F₃個体由来F₄系統、下は同一F₄個体由来F₃系統。各系統自殖次代16個体と供試してグルコエルシン含量の測定を行った。
左表のマーカー遺伝子型のAは高グルコエルシン親系統のアレル、Bは低グルコエルシン親系統のアレルを示す。
右図のグラフ横の異なるアルファベットはSNK検定で5%水準で有意差があることを示す。

図10. 第6連鎖群のQTL周辺マーカー遺伝子型とグルコエルシン含量

2-7. マーカーの汎用性確認

上記で絞り込んだ第2、6連鎖群および第3連鎖群のQTL領域に座乗する5マーカーを用いて市販13品種の遺伝子型を分析したところ、グルコシノレートが高い2品種のうち1品種（市販

品種_02)は供試5マーカー中4マーカーにおいて高グルコエルシン親系統のアレルをホモもしくはヘテロで持っていることがわかった(表3)。もう一方の高グルコシノレート品種(市販品種_01)は低グルコシノレート品種(市販品種_08)と同様3マーカーにおいて高グルコエルシン親系統のアレルをホモもしくはヘテロで持っていた。これらのマーカーの汎用的な利用は困難であるが、用いる育種素材によってはこれらマーカーが利用できる可能性もある。

表3. グルコシノレート含量の異なる13品種のQTL周辺のマーカー遺伝子型

供試材料	グルコシノ レート含量 ^{z)}	マーカー ^{y)} /連鎖群				
		M01/LG2	M14/LG3	M05/LG6	M06/LG6	B/LG6
市販品種_01	高	B/X	A/B	B	A/B	A
市販品種_02	高	A/B	A/B	A	B/X	A
市販品種_03	中	B	A/B	B	A/B	A
市販品種_04	中	B	B	B	A	A
市販品種_05	中	B	B	B	A/X	A/B
市販品種_06	中	B	B	B	A/B	X
市販品種_07	低	B	A/B	B	A	A/X
市販品種_08	低	B	A/B	B	A/B	A
市販品種_09	低	B	A/B	B	A	A/X
市販品種_10	低	B	A/X	X	X	A/X
市販品種_11	低	B	A	B	A	X
市販品種_12	低	A/B	A	A	X	X
市販品種_13	低	B	A/B	A	X	X

z)shida et al. (2012) 高 : 100 μ mol/g, 中 : 50-99, 低 : 49>

y) A: 高グルコエルシン親系統のアレル、B: 低グルコエルシン親系統のアレル、X: 両親系統以外のアレル

3) 成果活用における留意点

- 1) 4MTB-GSL 合成酵素遺伝子から設計したマーカーを用いて選抜した実用品種「悠白」と「サラホワイト」が品種登録されている他、選抜法に関する特許が公開されている。本遺伝子の塩基配列情報はDDBJに登録されている(LC077856)。
- 2) 本研究で開発されたマーカーを利用する際には、用いる材料でのマーカー遺伝子型とグルコシノレート含量の遺伝について確認する必要がある。

4) 今後の課題

本研究で作成したフォスミドライブラリーや現在別のプロジェクト研究で進めている高度化したダイコンゲノム情報を利用してQTL近傍に密にDNAマーカーを設計し、迅速に分析を進めていくことが課題である。

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成 25～29 年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (HOR)

小課題番号: HOR2001

研究期間: 平成 25～29 年度

小課題名: アルタナリア病原菌と宿主植物との分子病理学的解析によるリンゴ斑点落葉病およびナシ黒斑病罹病性原因遺伝子の単離

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 果樹茶業研究部門・品種育成研究領域・ナシ・クリ育種ユニット・寺上伸吾

1) 研究目的

リンゴ斑点落葉病およびニホンナシ黒斑病は、病原菌 *Alternaria alternata* によって引き起こされるリンゴ・ニホンナシ栽培における最重要病害の一つである。その発病メカニズムや宿主範囲は、それぞれの病原菌が生産する宿主特異的毒素によって決定されている。リンゴ斑点落葉病菌、*A. alternata* (リンゴ病原タイプ) は AM トキシンを生産し、栽培の 60%以上を占める主要品種「ふじ」、「王林」、「陸奥」などが罹病性であるため、5月下旬の落花期頃からその年の防除が終了するまで、殺菌剤の散布が欠かせない(我々の試算では約 70 億円の殺菌剤散布が必要)。一方、ニホンナシ黒斑病菌、*A. alternata* (ニホンナシ病原タイプ) は AK トキシンを生産し、「二十世紀」、「巾着」、「南水」などが罹病性である。本研究課題では、リンゴ斑点落葉病およびニホンナシ黒斑病の原因遺伝子の単離と品種育成に有用な DNA マーカーの開発を目的とする。

特筆されるのは、リンゴ斑点落葉病・ニホンナシ黒斑病とも、各々の病原菌が生産する毒素 AM トキシンおよび AK トキシンに罹病性を示す品種のみが発病し、病原菌の毒素 vs. 植物側の原因遺伝子(罹病性が優性)の関係を示す事例として、世界的に注目の高いモデルケースになっていることである。病原菌側の毒素の構造や生合成遺伝子の解析が進む一方、植物側の解析は希少で、遺伝子単離による相互関係のメカニズム解明が喫急の課題である。

2) 研究成果

1) リンゴ斑点落葉病罹病性遺伝子 (*Alt*) の単離

解析集団には、リンゴ斑点落葉病罹病性遺伝子をヘテロに持つ「スターキング・デリシャス」(*Alt/alt*)を片親、異なる抵抗性品種(*alt/alt*)を別の片親とする合計 15 種類の F₁ 集団(合計 797 個体)を用いた。各実生および両親品種の幼葉から、核酸自動分離装置(PI-50)を用いてゲノム DNA を抽出した。「スターキング・デリシャス」×「ジョナサン」の解析集団(114 個体)で、*Alt* との連鎖が認められている Mdo.chr11.27 および Mdo.chr11.44 (図 1)を用いて、*Alt* 近傍領域で染色体の組換えを起こしている実生をスクリーニングした。その結果、23 実生で組換えが確認された。組換えが確認された実生については、Mdo.chr11.27 と Mdo.chr11.44 の間に座乗している SSR によるタイピングを行うとともに、リンゴ斑点落葉病菌の孢子接種により表現型を判定した。斑点落葉病菌の孢子接種検定は、各個体から採取した切離葉 5 枚に対して、 2×10^5 個/mL に調整した斑点落葉病菌 AKI-3 株の孢子懸濁液を噴霧接種した。20 暗黒下で 48 時間保持した後、定法に従い壊死斑の形成程度を調査して葉ごとに 0-5 の 6 段階に区分した。各個体 2 回の反復試験を行い、葉ごとのスコアの平均値を個体のスコアとした。各実生個体について、壊死斑形成程度が 0.5 以下を抵抗性、2.5 以上を罹病性とし、0.5-2.5 の間は中程度抵抗性と判定した。グラフィカルジェノタイプの結果、*Alt* は Mdo.chr11.3 と Mdo.chr11.34 の間に座乗していると考えられた(図 1)。Mdo.chr11.3 と *Alt* の間で組換えを起こした実生が 2 個体、また *Alt* と Mdo.chr11.34 で組換えを起こした実生が 1 個体得られた。リンゴ公開ゲノム配列上における Mdo.chr11.3 と Mdo.chr11.34 の座乗位置はそれぞれ、第 11 連鎖群の 3,064

kb と 3,166 kb であることから、*Alt* 遺伝子座の物理距離は、リンゴ(「ゴールデン・デリシャス」)ゲノムで約 102 kb の領域と推定された(図 1)。

Alt の単離を行うため、「スターキング・デリシャス」の BAC ライブラリーを構築した。「スターキング・デリシャス」の未展開葉から核を単離し、アガロースプラグを作製した。制限酵素 (*Hin* d III) で DNA を部分消化した後、パルスフィールド電気泳動により double-size fractionation を行い、DNA をサイズ分画した。100-180 kb の分画をゲルから切り出し、精製した DNA 断片を pIndigoBAC-5 vector にライゲーションした。エレクトロポレーションにより大腸菌 (DH10B) に形質転換し、BAC ライブラリーを作製した。合計 49,920 クローンからなるリンゴ BAC ライブラリーを得ることができた。パルスフィールドゲル電気泳動から、BAC クローンのインサート長を推定した結果、作成した BAC ライブラリーの平均インサート長は、約 180 kb と推定された。今回構築した BAC ライブラリーは、推定ゲノムサイズ (742.3 Mb) の 12X をカバーすると考えられる。現在、*Alt* の最近傍領域に座乗する Mdo.chr11.3 および Mdo.chr11.34 を起点として、*Alt* 遺伝子座をカバーする BAC コンティグの構築を進めている。

2) ニホンナシ黒斑病罹病性遺伝子 (*Aki*) の単離

ファインマッピングの解析材料として、ニホンナシ黒斑病に抵抗性を示す「豊水」と罹病性である「巾着」の F₁ 実生集団 (621 個体) を用いた。各実生および両親品種の幼葉から NucleoMag Plant を用いてゲノム DNA を抽出した。ニホンナシ黒斑病の接種検定には、 5×10^5 個/mL に調整した孢子懸濁液 (菌株: No. 15A) を用い、各実生の第 2-4 位の展開葉裏面に噴霧接種し、接種 48 時間後に発病を調査した。各実生での病徴の評価は、黒変が現れた個体を罹病性、黒変の現れなかった個体を抵抗性と判定した。接種試験の結果、309 個体は病徴を示さなかったため、抵抗性と判定した。残る 312 個体は黒変を生じたことから罹病性であると判定した。抵抗性個体と罹病性個体の分離比は 1:1 に適合したことから ($\chi^2 = 0.014$, P value = 0.904) 「巾着」の黒斑病罹病性は優性 1 遺伝子支配であることが示された。

既存のリンゴおよびナシの連鎖地図に座乗する SSR マーカーを用いて *Aki* の位置をスクリーニングした結果、第 11 連鎖群の上部に座乗していると考えられた。そこで、リンゴおよびナシの連鎖地図に座乗する SSR マーカー、およびリンゴ「ゴールデン・デリシャス」の公開配列を利用し、第 11 連鎖群上部に設計した SSR マーカー (Mdo.chr11.1-45) を用いて、連鎖解析と連鎖地図の構築を行った。SSR マーカーによる各増幅産物は、DNA シーケンサーにより分離・検出した。連鎖解析と連鎖地図の構築には、JoinMap 4.1 ソフトウェアを用いた。グルーピングは Independence LOD score 7.0 で行い、regression mapping 法により連鎖地図を作製した。遺伝地図距離の推定には Kosambi の地図関数を用いた。連鎖解析の結果、*Aki* は Mdo.chr11.28 と Mdo.chr11.34 のマーカー間、1.5 cM の領域に座乗していることが明らかとなった(図 2A)。また、完全連鎖するマーカー Mdo.chr11.30 を獲得した。Mdo.chr11.28 および Mdo.chr11.34 はリンゴの公開ゲノム配列 (Malus × domestica Whole Genome v1.0; https://www.rosaceae.org/species/malus/malus_x_domestica/genome.v1.0) から開発したマーカーである。それぞれのマーカーを開発したコンティグ (MDC001444.132 および MDC021160.236) 間の物理距離は約 250 kb (2,915-3,165 kb) であった(図 2B)。

ニホンナシのゲノム解読は進んでいないが、近縁のチュウゴクナシではドラフトゲノム配列が公開されている (<http://peargenome.njau.edu.cn/>)。そこで、*Aki* と連鎖が認められた Mdo.chr11.28、Mdo.chr11.30 および Mdo.chr11.34 のマーカー領域を含むチュウゴクナシのスキファールドを検索した。その結果、スキファールド 355.0 に高い配列類似性が認められた。よって、3 マーカー (Mdo.chr11.28、Mdo.chr11.30 および Mdo.chr11.34) で構成される *Aki* 遺

伝子座の物理距離は、チュウゴクナシゲノムで約 107 kb の領域 (272 kb-379 kb) と推定された (図 2C)。

Aki の単離を行うため、「巾着」の BAC ライブラリーを構築した。「巾着」の未展開葉から核を単離し、アガロースプラグを作製した。制限酵素 (*Hin* d III) で DNA を部分消化した後、パルスフィールド電気泳動により double-size fractionation を行い、DNA をサイズ分画した。100-180 kb の分画をゲルから切り出し、精製した DNA 断片を pIndigoBAC-5 vector にライゲーションした。エレクトロポレーションにより大腸菌 (DH10B) に形質転換し、BAC ライブラリーを作製した。合計 68,170 クローンからなるニホンナシ BAC ライブラリーを得ることができた。パルスフィールドゲル電気泳動から、BAC クローンのインサート長を推定した結果、作成した BAC ライブラリーの平均インサート長は、約 123 kb と推定された。ニホンナシの推定ゲノムサイズは明らかとなっていないが、ゲノム解読の終了したチュウゴクナシとほぼ同等であると考えられる。チュウゴクナシの推定ゲノムサイズ (527 Mb) を基にすると、今回構築したニホンナシ BAC ライブラリーは、推定ゲノムサイズの 16X をカバーすると考えられる。

Aki と連鎖が確認された Mdo.chr11.28、Mdo.chr11.30 および Mdo.chr11.34 を起点として、各マーカー領域を含む BAC クローンの単離と、*Aki* 遺伝子座をカバーする BAC コンティグの構築を進めた。その結果、Mdo.chr11.28 と Mdo.chr11.34 のマーカー間は 2 種類のクローンからなる BAC コンティグでカバーすることが出来た。各 BAC クローンは pUC18 にサブクローニング後、サンガー法により塩基配列を決定した。BAC クローンの長さはそれぞれ 132 kb と 129 kb であり、2 種類の BAC クローンから構成される BAC コンティグの配列長は 230 kb であった。現在、アノテーション付けを進めている。

SD.LG11

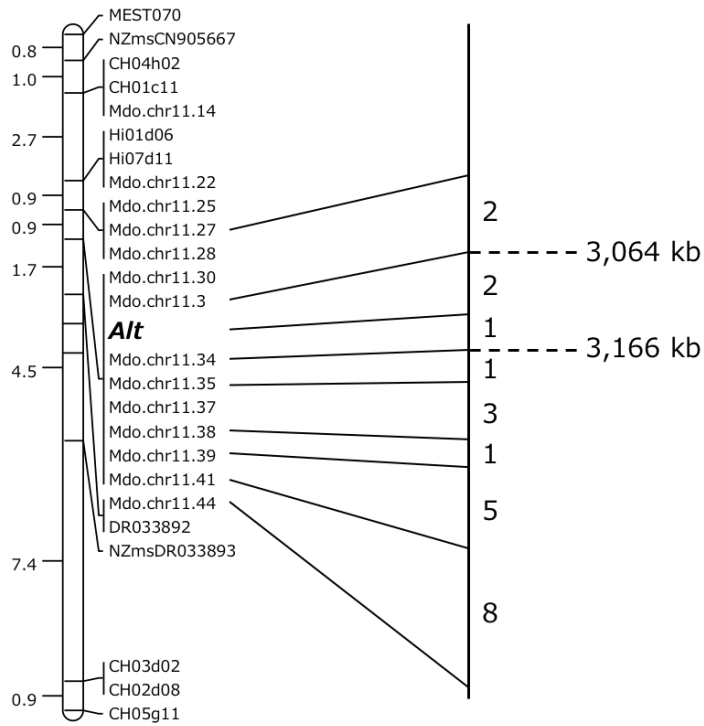


図1. リンゴ斑点落葉病罹病性遺伝子座のファインマッピング

「スターキング・デリシャス」x「ジョナサン」の集団から構築した連鎖地図 (左)。リンゴ斑点落葉病罹病性遺伝子座は*Alt* で示す。各マーカーの左の数値はマーカー間距離 (cM) を示す。*Alt* 近傍領域の組換え個体の数 (右)。マーカーの位置は、リンゴ公開ゲノム配列上のコンティグ順と対応している。

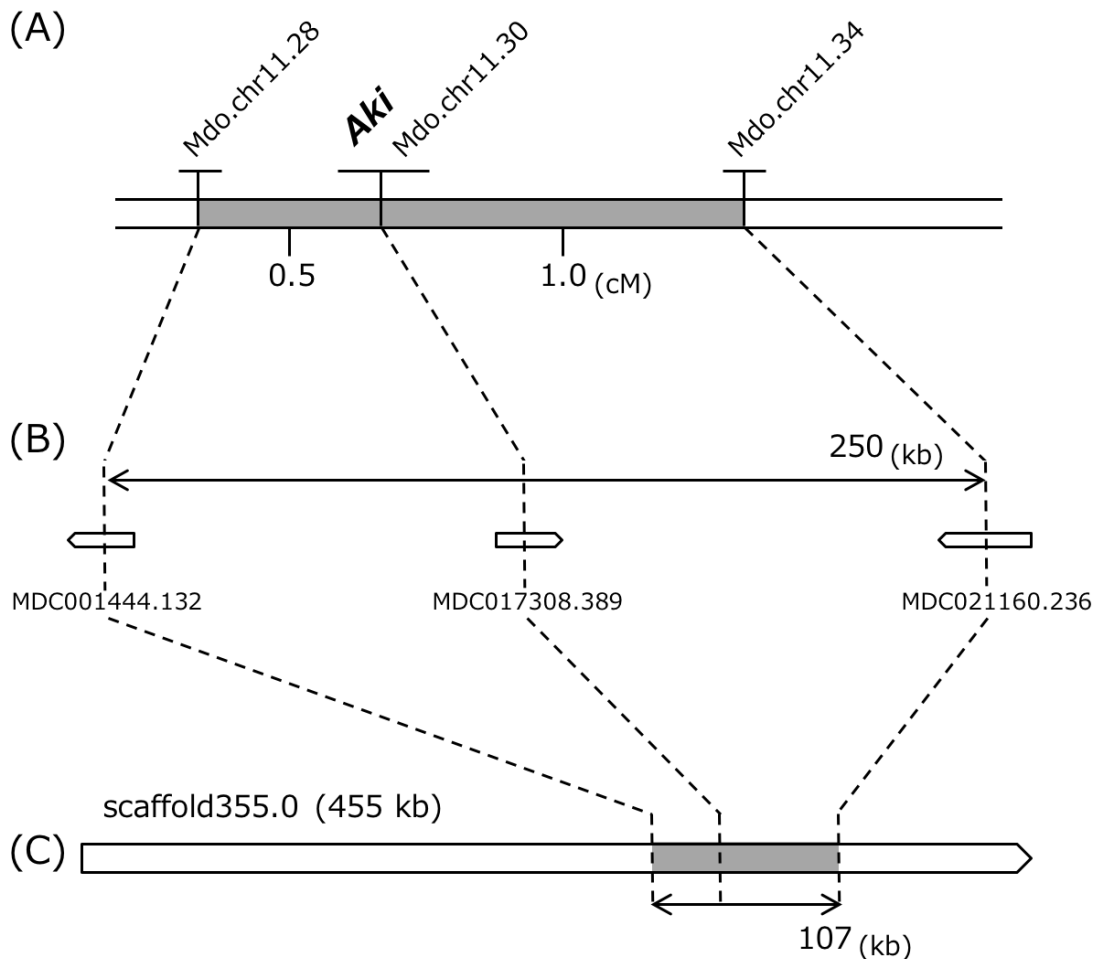


図2. ニホンナシ、リンゴおよびチュウゴクナシにおける比較解析

ニホンナシ黒斑病罹病性遺伝子座近傍領域の連鎖地図 (A)。各連鎖マーカーを作成したリンゴコンティグの座乗位置 (B)。ニホンナシ黒斑病罹病性遺伝子座の近傍領域と配列類似性の高いチュウゴクナシゲノム配列 (C)。

3) 成果活用における留意点

今回開発したマーカーを用いてマーカー選抜を行う際には、交配に用いた両親の多型性を考慮しなければならない。

4) 今後の課題

リンゴ斑点落葉病およびニホンナシ黒斑病の罹病性メカニズムを明らかにするには、原因遺伝子の単離が不可欠である。BAC クローンやゲノム情報を用いた詳細な配列解析および形質転換体による候補遺伝子の機能確認などを進める必要がある。

リンゴやニホンナシには多くの遺伝資源があるが、斑点落葉病や黒斑病に対する表現型が明らかとなっていない品種・系統が多く存在する。よって、マーカー選抜を効率的に行うためには、これら遺伝資源の表現型を網羅的に調査するだけでなく、使用する選抜マーカーの遺伝子型を確認しデータベース化しておく必要がある。

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (HOR)

小課題番号: HOR2002

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: リンゴの省力栽培に適したカラムナー性樹形を制御する原因遺伝子の単離

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 果樹茶業研究部門・リンゴ研究領域・リンゴ育種ユニット・岡田和馬

1) 研究目的

我が国のリンゴ産業は、生産者の減少や高齢化の問題に直面しており、省力栽培できる品種の育成が望まれている。リンゴ品種「McIntosh」の枝変わり(突然変異体)として発見された「Wijcik」は、普通の栽培品種に比べて節間が短く、側枝の発生が少ないため、細長い円柱状の樹形に生長する。この性質はカラムナー(columnar)性と呼ばれ、樹形が単純でコンパクトになるため、「整枝・剪定作業を省力化できる」、「平面的な結実層を持つので、収穫・運搬作業などを機械化できる」と期待されている。

農研機構果樹茶業研究部門では、カラムナー性を示す良食味リンゴの育種を進めているが、カラムナー性の表現型の評価に播種後3年程度を要することが育種の効率化を阻む要因となっている。カラムナー性は単一の優性遺伝子Coによって制御されることから、我々はCo遺伝子のマッピングを進めてきた。本課題では、カラムナー性を制御する原因遺伝子の単離と品種育成に有用なDNAマーカーの開発を目的とする。

2) 研究成果

(1) 「Wijcik」の突然変異箇所の特定

我々はこれまでに、Co遺伝子が第10連鎖群のSSRマーカーMdo.chr10.11-1とMdo.chr10.15の間に座乗することを明らかにしている。Co遺伝子の座乗領域をさらに絞り込むため、Co遺伝子周辺で染色体の乗換えを起こした3個体(9、7-4121、7-4189)を、Co遺伝子に連鎖するSSRマーカー(Bai et al. 2012)を用いて解析した。SSRマーカーC1753-3520、C18470-25831、C7629-22009は3個体の全てでcoと相引に連鎖する染色体由来の遺伝子型を示したことから、Co遺伝子の座乗領域はSSRマーカーMdo.chr10.11-1からC1753-3520の間に絞り込まれた(図1)。この領域は、「ゴールドen・デリシャス」の公開ゲノム配列に換算して、約140 kbに相当していた。

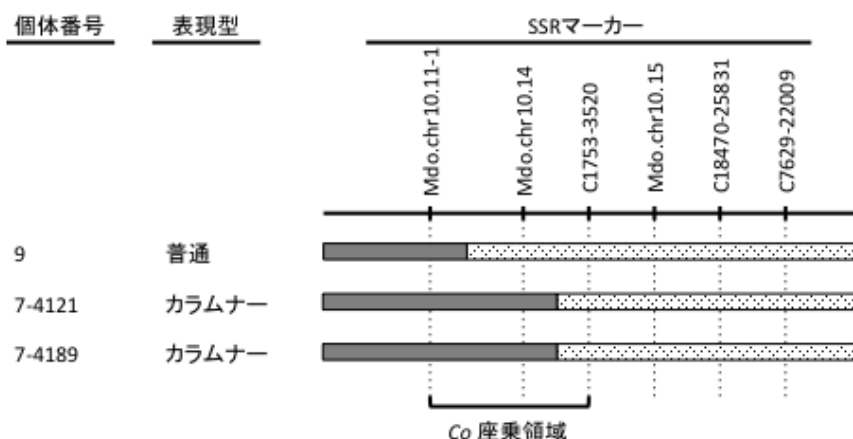


図1 Co遺伝子周辺で染色体の乗換えを起こした個体
 ■: Coと相引に連鎖する染色体, □: coと相引に連鎖する染色体

突然変異箇所を特定するため、「Telamon」(Co/co)のBACライブラリーから単離したCo遺伝子座乗領域全体をカバーするBACクローン116H3の全塩基配列を決定した。また、原品種「McIntosh」(co/co)のBACライブラリーから単離したco遺伝子座乗領域全体をカバーするBACクローン16N16と112G10の全塩基配列を決定した。Coとco遺伝子座乗領域の塩基配列を比較した結果、Co遺伝子座乗領域に約8 kbのLTR型レトロポゾンが挿入されていることが明らかになった(図2)。その他に塩基配列の違いは見られなかったため、カラムナー性はこの挿入変異によって生じたと考えられた。

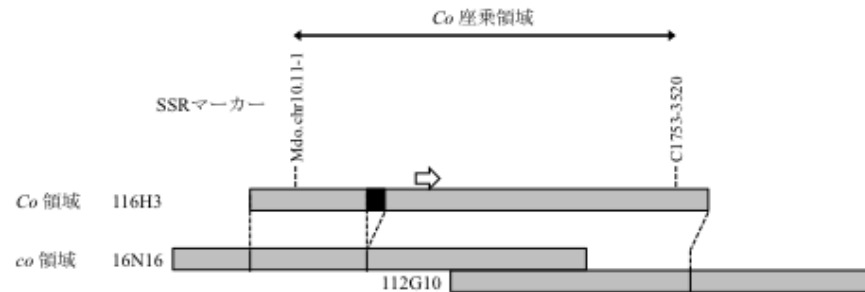


図2 Coとco遺伝子座乗領域のゲノム構造の比較
 灰塗り部分はBACクローンを示す。黒塗り部分は、約8 kbの挿入配列を示す。
 矢印はCo遺伝子の有力候補である91071遺伝子の位置を示す

(2) カラムナー候補遺伝子の単離

Co遺伝子を単離するため、Co遺伝子座乗領域に位置し、「Wijcik」と「McIntosh」の茎頂で発現量に差がある遺伝子を探索した。まず、7月上旬に採取した「Wijcik」と「McIntosh」の茎頂から抽出したmRNAを次世代シーケンサーで解析した。「Wijcik」と「McIntosh」のリードをまとめてde novo assemblyを実施した結果、109,451個のコンティグが作製された。次に、Co遺伝子座乗領域に位置する遺伝子を探索するため、これらのコンティグをBACクローン116H3の塩基配列にマッピングしたところ、116H3と95%以上配列が一致するコンティグが58個見つかった。58個のコンティグのうち「Wijcik」と「McIntosh」で発現量に差がある遺伝子を同定するため、Normalized RPKM値を用いてt検定と倍率変化調査を行った。コンティグ91071、38029、12053、44905、41231は、「Wijcik」と「McIntosh」の2群間で発現レベルに差があり($P < 0.05$)、「Wijcik」において発現レベルが2倍以上に上昇していた(表1)。これらのコンティグの特徴は、Co遺伝子が優性遺伝子であるという特徴と一致していた。コンティグ91071は挿入配列の約16 kb下流に位置し(図2)、blastxで検索した結果、*Medicago truncatula*の2OG-Fe(II) oxygenase family oxidoreductaseと高い相同性(E-value $1e-124$)を示した。一方、コンティグ38029、12053、44905、41231は約8 kbの挿入配列内に位置し、blastxで検索した結果、コンティグ38029は*Malus x domestica*のuncharacterized protein LOC103403681と低い相同性(E-value $4e-06$)を示したが、コンティグ12053、44905、41231と相同性を示す配列は見られなかった。以上の結果から、コンティグ91071(91071遺伝子)がCo遺伝子の最有力候補と考えられた。91071遺伝子は2-oxoglutarate-dependent dioxygenaseをコードすると考えられたが、その機能は不明であった。

表1 'Wjok' と 'McIntosh' の間で発現量に差が見られたコンティグ

コンティグ名	塩基長 (bp)	116H3の塩基配列との相同性 (%)	Wjok			McIntosh			検定 P-value	倍率変化 ²
			サンプル1発現量 (Normalized RPKM)	サンプル2発現量 (Normalized RPKM)	平均発現量 (Normalized RPKM)	サンプル1発現量 (Normalized RPKM)	サンプル2発現量 (Normalized RPKM)	平均発現量 (Normalized RPKM)		
91071	1311	100.0	1.33	1.22	1.28	0.00	0.00	0.00	0.002	-
38029	375	100.0	10.61	9.81	10.21	3.44	3.24	3.34	0.004	3.1
12053	990	100.0	26.18	20.29	23.23	7.11	5.61	6.36	0.031	3.7
44905	318	100.0	13.47	10.56	12.01	5.53	5.37	5.45	0.046	2.2
18023	372	98.9	70.07	67.22	68.65	80.25	83.27	81.76	0.024	0.8
41231	524	97.9	7.91	6.23	7.07	1.95	2.08	2.01	0.027	3.5

² 'Wjok' の平均発現量 / 'McIntosh' の平均発現量を示す

(3) カラムナー選抜マーカーの開発

挿入変異を利用して、カラムナーリングを特異的に選抜できる DNA マーカーの開発を試みた。Co と co 領域に共通の塩基配列からプライマー Normal-F と Normal-R を、Co 領域に挿入されていた約 8 kb の塩基配列からプライマー Columnar-R を設計した (図 3)。これら 3 種類のプライマーを用いた PCR には GoTaq Hot Start Master Mix (Promega) を使用し、94 2分を 1 サイクル、94 30秒、60 30秒、72 1分を 30 サイクル、72 5分を 1 サイクルの条件で反応を行った後、2% アガロースゲルで電気泳動した。「ふじ」(co/co) と「5-12786」(Co/co) の交雑実生のゲノム DNA を鋳型に PCR を行ったところ、表現型がカラムナー性の個体からは約 250 bp と 128 bp の断片が増幅されたが、表現型が普通樹形の個体からは約 250 bp の断片しか増幅されなかった (図 4)。128 bp の断片はカラムナー性の個体に特異的であったことから、カラムナー性の選抜マーカーとして利用することができる。

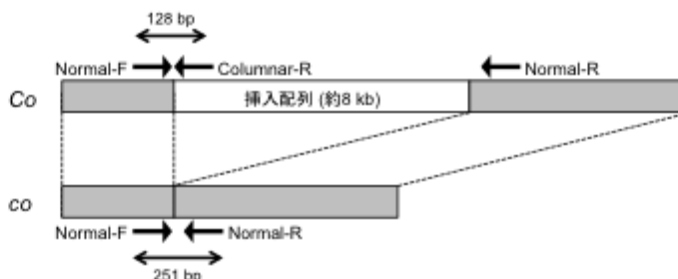


図3 Coとco領域のゲノム構造の模式図
矢印はプライマーを、両矢印はPCRで増幅される領域を示す

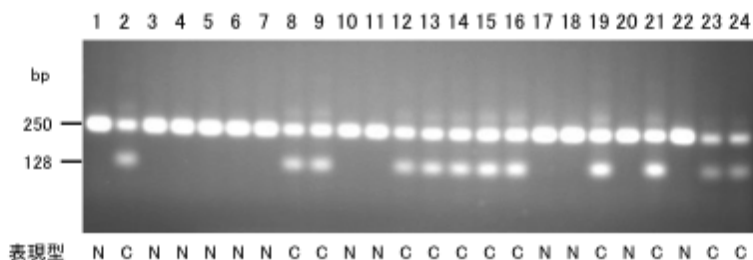


図4 プライマーNormal-F、Normal-RとColumnar-Rを用いたPCRにより増幅された断片
PCRには、「ふじ」(co/co)とカラムナータイプの選抜系統5-12786(Co/co)の交雑実生
24個体のゲノムDNAを使用した。表現型のNは普通樹形、Cはカラムナー性を示す

(4) カラムナー候補遺伝子の機能解析

Co 遺伝子の有力な候補である 91071 遺伝子の発現部位を調査した。普通樹形を示す 4 年生自根苗の co ホモ系統 (co/co) では、91071 遺伝子は主に根で発現しており、葉や茎頂ではほとんど発現していなかった。一方、カラムナー性を示す 4 年生自根苗の Co ホモ系統 (Co/Co) では、91071 遺伝子は葉・茎頂・根で発現していた。以上の結果から、野生型では根で発現していた 91071 遺伝子が、突然変異によって茎頂や葉でも発現するようになり、カラムナー性を引き起こしたと考えられた。

91071 遺伝子の発現部位をさらに詳細に解析するため、in situ hybridization を行った。普通樹形を示す co ホモ系統 (co/co) の根では、側根原基や根の先端で染色が見られた。同様に、カラムナー性を示す系統 (Co/Co、Co/co) の根でも、側根原基や根の先端で染色が見られた。一方、「Wijcik」の茎頂では、メリステムと葉原基が染色されていた。以上の結果から、91071 遺伝子は分化・伸長が盛んな分裂組織で発現していることが明らかになった。

91071 遺伝子の機能を調べるため、91071 遺伝子を 35S プロモーター下に挿入し、アグロバクテリウム法によりタバコ SR1 およびリンゴ JM2 の葉片に形質転換した。カナマイシン耐性の 91071 遺伝子形質転換タバコ T1 世代の表現型は、系統により差が見られた。系統 2-4、2-9、2-12 の草丈と節間長は、対照の SR1 よりも有意に短かった。一方、系統 2-2 と 2-6 の草丈と節間長は、SR1 と有意な差は見られなかった (図 5)。91071 遺伝子の発現は、系統 2-4 と 2-12 で高く、2-9 でやや低く、2-2 と 2-6 では見られなかった。このように、91071 遺伝子の発現量が多い系統ほど、草丈や節間長が短くなることが明らかになった。また、カナマイシン耐性の 91071 遺伝子形質転換リンゴが 6 系統得られた。これら 6 系統は全て節間が短く、91071 遺伝子を強く発現していた。以上のように、91071 遺伝子を過剰発現させたタバコおよびリンゴ形質転換体の結果から、91071 遺伝子は草丈や節間長を短くする機能を持つことが示唆された。

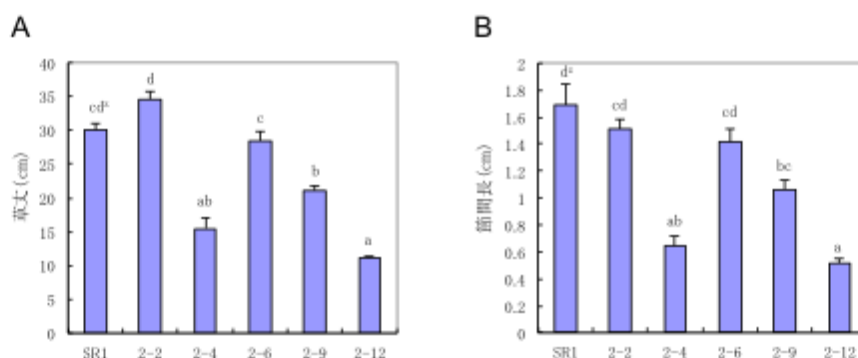


図5 カナマイシン耐性の91071遺伝子形質転換タバコT1世代の草丈(A)および節間長(B)
節間長は上位10節の平均値を示す
*Tukey-Kramerの多重検定により異符号間に5%水準で有意差あり

また、91071 遺伝子の根における役割を調べるため、91071 遺伝子を過剰発現させたリンゴ形質転換体を調査した。系統 3-3 と 3-4 では、コントロールの「JM2」や「NB2-8」に比べて不定根が長く、側根数が増える傾向が見られたが、3-3 の側根数を除いて有意な差は見られず (図 6) 91071 遺伝子の根における役割を明らかにすることはできなかった。非形質転換リンゴの根においても 91071 遺伝子は十分な量が発現していたことから、過剰発現させても顕著な効果が出なかったのかもしれない。

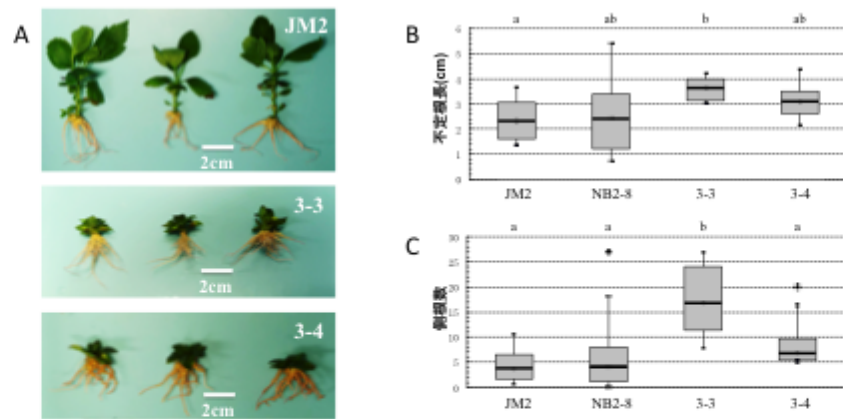


図6 91071遺伝子を過剰発現させたリンゴ形質転換体の根の形態(A)、不定根長(B)と側根数(C)
 JM2: 非形質転換リンゴ (n=12)
 NB2-8: GFP遺伝子過剰発現リンゴ(n=12)
 3-3: 91071遺伝子過剰発現リンゴ(n=8)
 3-4: 91071遺伝子過剰発現リンゴ(n=12)
 異符号はSteel-Dwassの検定により5%水準で有意差があることを示す

3) 成果活用における留意点

本研究で開発したカラムナー選抜マーカーは、アガロースゲル電気泳動により検出できるので、シーケンサーを保有していない研究室でも利用可能である。また、プライマー Normal-F と Normal-R により増幅される約 250 bp の断片は、PCR が成功したかどうかを確かめるポジティブコントロールとして利用できる。

4) 今後の課題

本研究では、下記の2点を明らかにすることができなかった。

- (1) 91071 遺伝子はどのような物質の代謝に関与しているのか？
- (2) 91071 遺伝子は根でどのような役割を果たしているのか？

これらの点を明らかにすることにより、リンゴの樹形や生育を制御する新たな知見が得られることが期待される。

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成25～29年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発(HOR)

小課題番号: HOR2003

研究期間: 平成25～27年度

小課題名: カンキツの β -クリプトキサンチン高含有化のための遺伝子単離

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構果樹茶部門・カンキツ研究領域・カンキツゲノムユニット・島田武彦

1) 研究目的

ウンシュウミカンに豊富に含まれる β -クリプトキサンチンはカロテノイド類の一つで、発がんの抑制、骨粗鬆症や糖尿病などの生活習慣病の予防に役立つことが明らかとなり、 β -クリプトキサンチンの機能性を訴求した商品開発や機能性表示食品制度の活用促進が進められている。一方、近年の国内におけるウンシュウミカン類の消費は低迷し、生産量は最盛期の約4分の1にあたる90万トン推移しており、 β -クリプトキサンチン含有素材を安定的に供給するための生産体制の確立や消費拡大に向けて様々な健康機能性を持つ β -クリプトキサンチンを高含有化した商品性の高い新品種の育成が急務となっている。

カンキツ類におけるカロテノイド類の代謝については生合成経路が解明されており、カロテノイド類の組成や含有量の多様性には、カロテノイドの生合成遺伝子の発現量のバランスが関与し、 β -クリプトキサンチンを高含有する品種や系統では、 β -クリプトキサンチンよりも上流の生合成遺伝子の発現量が高く、下流の生合成遺伝子の発現量が低いことが明らかとなっている。また、カンキツ類にはカロテノイドの代謝遺伝子には配列や発現パターンが異なる複数のアレルが存在することが明らかとなり、カロテノイドの代謝系において最適な遺伝子の組合せを持つ系統を選抜することで β -クリプトキサンチンを高含有する品種の育成が期待できる。本研究課題では、カロテノイドの生合成に関わる5種類の遺伝子の発現量を制御する要因をトランスとシスの両面から解析してカンキツのカロテノイドの代謝制御機構の全貌を解明し、 β -クリプトキサンチンの高含有化に必要な遺伝子を選抜するためのDNAマーカーを開発する。

2) 研究成果

(1) シス因子で制御されるカロテノイド代謝遺伝子のアレルマーカーの開発

農研機構果樹茶業研究部門で育成したカンキツ品種や系統の家系解析を行った結果、14種類の品種が由来親となっていることが明らかとなり、国内で栽培されるカンキツ類の果実のカロテノイド組成や含有量の多様性は、この祖先14品種が保有するカロテノイド代謝遺伝子のアレルの組み合わせにより生じている可能性が示唆された。そこで、遺伝子発現がシス因子で制御されているフィトエン合成酵素遺伝子(PSY)、 β -リングヒドロキシラーゼ(HYb)、ゼアキサンチンエポキシダーゼ遺伝子(ZEP)について祖先14品種の一塩基多型(SNP)情報をシュアセレクト・ターゲット・エンリッチメント・システムで収集し、各遺伝子の翻訳領域内におけるSNP情報を整理した結果、各遺伝子にはそれぞれ、192個、39個、75個のSNPsがみられ、それらの配列上の位置を明らかにした。また、翻訳領域内の配列を比較した結果、祖先14品種における各遺伝子のアレル数はそれぞれ、21個、15個、10個であることを明らかにした。サイバークリーン定量PCRにより果実の遺伝子発現量を調査した結果、PSYはキングマンダリンやクネンボで発現量が高く、HYbやZEPはウンシュウミカンで発現量が低いことが明となり、これらの祖先品種由来のアレルを β -クリプトキサンチン高含有のための候補アレルとして選定した。

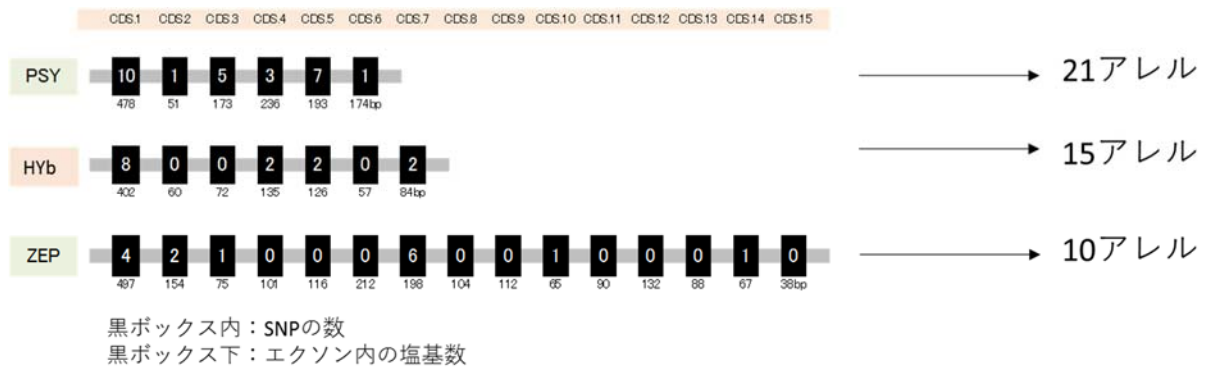


図1. PSY、HYb、ZEPの遺伝子構造と祖先14品種間で見られたエクソン内のSNPとアレル数

(2) トランス因子で制御されるカロテノイド代謝遺伝子のアレルマーカーの開発

クレメンティンのゲノム解読配列から設計したカスタムマイクロアレイを作成し、β-クリプトキサンチンの含有量に分布がみられるA255とG434の交雑実生集団を用いて、全遺伝子を対象とした発現遺伝子の量的形質遺伝子座 (eQTL) 解析をマイクロアレイ解析で実施した。その結果、フィトエンデサチュラーゼ酵素遺伝子 (PDS) とζ-カロテンディサチュラーゼ (ZDS) の遺伝子発現を制御する第8連鎖群のゲノム領域には、新たに色素体の形成に関わるカロテノイドアソシエーションタンパク、カロテノイド酸化開裂酵素遺伝子 (CCD) や約60個の転写調節因子などのeQTLsが座乗することが明らかとなった。このゲノム領域内には、シス因子で制御される約40種類の転写調節因子が存在しており、その中からマーカー候補となる転写因子を複数選定した。

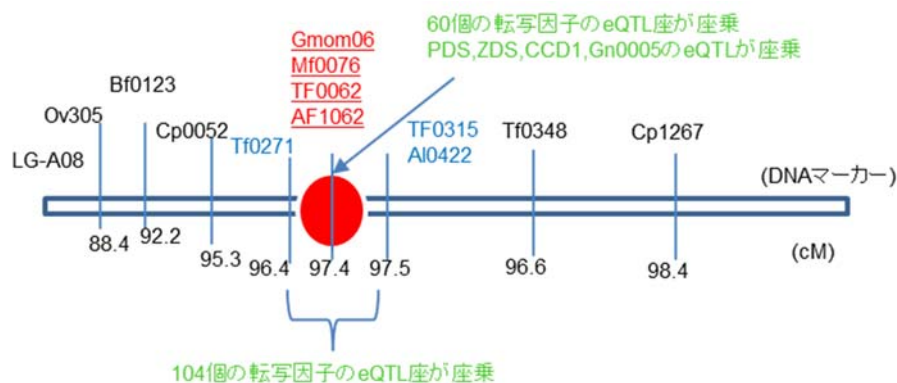


図2. 第8連鎖群に座乗するPDSとZDSの遺伝子発現を制御するゲノム領域

(3) カロテノイド代謝に関与する転写因子遺伝子の機能解析

カンキツのカスタムオリゴアレイを用いたマイクロアレイ解析により、異なる植物ホルモンで処理した果実においてカロテノイド代謝遺伝子と発現相関がみられる遺伝子をスクリーニングし、複数の候補遺伝子を見出した。このうち、ブラシノステロイドのシグナル制御に関わるbHLH型の転写調節因子(CubHLH1)は、カンキツのカロテノイド代謝遺伝子のプロモーター領域に対してDNA結合活性を有することを明らかにした。さらに同遺伝子をアグロバクテリウム法によりトマトで過剰発現させた結果、CubHLH1はトマト果実中のカロテノイド代謝のHYbやCCDなどの遺伝子の発現を高め、リコペンの代謝を下流に進め、アブシジン酸を増加させる機能を有することを明らかにした。また、PDSとZDSの遺伝子発現を制御するゲノム領域に座乗するRNA結合型タンパク質

(Tf0271) をトマトに遺伝子導入した結果、果実中のリコペンβ-リングヒドロキシラーゼ遺伝子 (LCYb) やリコペンε-リングヒドロキシラーゼ遺伝子 (LCYe) の転写を促進し、果実中のカ

ロテンやルテイン含有量の上昇を伴い総カロテノイド量を増加する機能を持つことを明らかにし、トランス因子で制御されるカロテノイド代謝遺伝子のアレルマーカーの候補遺伝子とした。

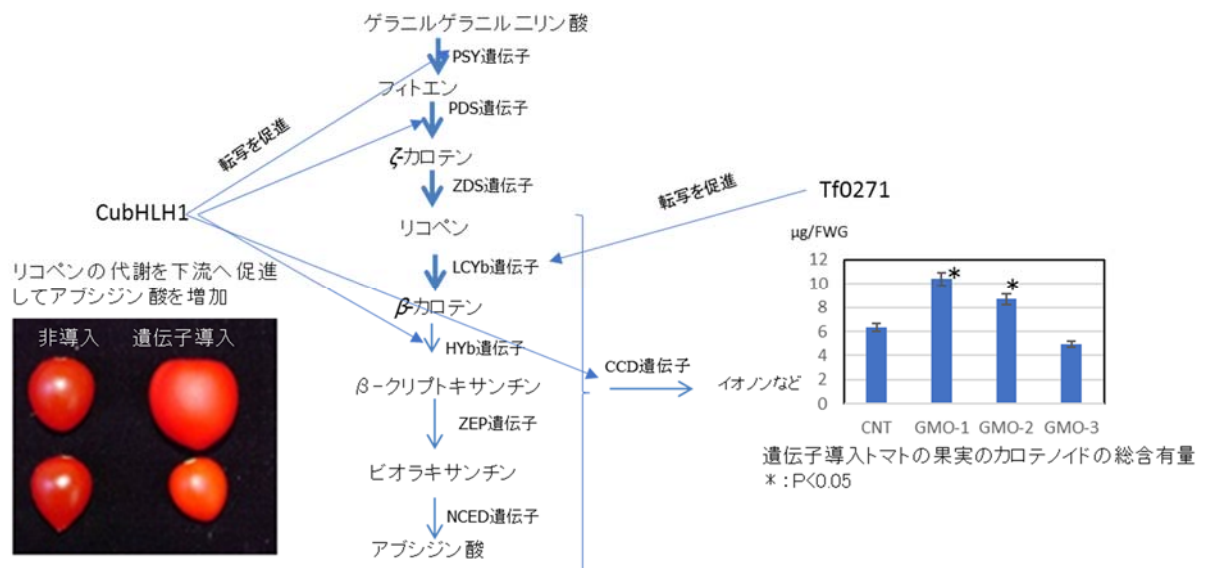


図3. カロテノイド代謝を制御する2種類の転写因子 (CubHLH、Tf271) の制御機構の概要

3) 成果活用における留意点

β-クリプトキササンチンを高含有化した新品種の育成を効率化するためには、高含有化個体を高頻度に出現する親組み合わせを予測する必要があることから、アレル識別マーカーを用いて既存の品種や育種素材のアレル型を併せて調査する必要がある。

4) 今後の課題

β-クリプトキササンチン高含有化のためのアレルマイニングを行い、最適アレルを保持する育種実生の選抜のためのDNAマーカーの開発を進める予定である。

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成 25～29 年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (HOR)

小課題番号: HOR2004

研究期間: 平成 25～29 年度

小課題名: ニホングリ易渋皮剥皮遺伝子の単離

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 果樹茶業研究部門・品種育成研究領域・ナシ・クリ育種ユニット・西尾聡悟

1) 研究目的

農林水産技術会議が策定した「作物育種研究の今後の進め方について」(平成 24 年 5 月 25 日決定)では、クリの重点課題として「ぼろたん」より早生で渋皮がむきやすい品種の開発、改良ターゲットとして「ぼろたん」より早生で渋皮がむきやすい良食味が明記されており、現在のクリ育種において、易渋皮剥皮性は最も重要かつ有用な形質である。

ニホングリは、果実の大きさに優れるが、チュウゴクグリと比べて渋皮が剥きにくいという致命的な欠点がある。果樹研究所(現在の農研機構果樹茶業研究部門)では 2006 年に、果実の渋皮がチュウゴクグリ並みに剥ける易渋皮剥皮性を持つ画期的なニホングリ品種「ぼろたん」を初めて育成した。「ぼろたん」は、電子レンジやオーブンで加熱することにより簡単に渋皮を剥くことができ、食味も優れていることから、今後、和洋菓子などを始めとする新たな需要開拓と国産グリ需要拡大、さらに国内のクリ関連産業の活性化、6 次産業への貢献など攻めの農林水産業への寄与が大いに期待される。今後は、易渋皮剥皮性がニホングリ標準となることと考えられることから、易渋皮剥皮性を持ち、さらに異なる収穫期や食味・果実品質に優れる品種の育成が必要となるが、渋皮剥皮性は果実形質であることから、従来型の選抜では、多大な圃場面積、労力や期間を必要とする。そこで本課題では、ニホングリ易渋皮剥皮遺伝子領域を同定し、近傍領域の配列から、易渋皮剥皮性品種の育成に有効な DNA マーカーを開発することを目的とする。

2) 研究成果

1) ニホングリ標準連鎖地図の構築

ニホングリ標準連鎖地図の構築には、国見×709-34(111 個体)の解析集団を用いた。各実生および両親品種の幼葉から NucleoMag Plant を用いてゲノム DNA を抽出した。供試マーカーには、250 種類のチュウゴクグリ由来 SSR マーカーおよび 374 種類のニホングリ由来 SSR マーカーを用いた。SSR マーカーによる増幅産物は、DNA シーケンサーにより分離・検出するとともに、GeneMapper 5.0 ソフトウェアを用いてサイジングおよびアレルコールを行った。連鎖解析と連鎖地図の構築には、JoinMap 4.1 ソフトウェアを用いた。グルーピングは Independence LOD score 4.0 で行い、regression mapping 法により連鎖地図を作製した。遺伝地図距離の推定には Kosambi の地図関数を用いた。

供試したチュウゴクグリ SSR マーカーの内、239 種類のマーカーはニホングリにおいても増幅が認められた。144 種類のマーカーが、国見および 709-34 の両親間で多型を示した。同様に、ニホングリ由来の SSR マーカーでは、238 種類のマーカーで多型が認められた。連鎖解析により、352 マーカーが座乗するニホングリ連鎖地図を構築することができた(図 1)。12 連鎖群によって構成され、全長 700.3 cM、平均マーカー間距離 1.8 cM である。供試したチュウゴクグリ SSR マーカーは、チュウゴクグリ標準連鎖地図上にマッピングされており、座乗連鎖群が判明している。SSR マーカーの対応付けから、今回構築したニホングリ連鎖地図は、染色体基本数($n=12$)に収束しており、すべての連鎖群でチュウゴクグリ標準連鎖地図との対応付けが可能であった。

HOR2004

渋皮剥皮遺伝子座は PRD58 と PRD52 の間に座乗していることが報告されている。これらのマーカーの座乗位置から、「乙宗」に由来する渋皮剥皮対立遺伝子は第 1 連鎖群の中央付近に座乗していることが示唆された。

2) ニホングリ BAC ライブラリーの構築

易渋皮剥皮対立遺伝子と難剥皮対立遺伝子を有する「丹沢」を用いて BAC ライブラリーの構築を行った。「丹沢」の未展開葉から核を単離し、アガロースプラグを作製した。制限酵素 (*Hind* III) で DNA を部分消化した後、パルスフィールド電気泳動により double-size fractionation を行い、DNA をサイズ分画した。100-200 kb の分画をゲルから切り出し、精製した DNA 断片を pIndigoBAC-5 vector にライゲーションした。エレクトロポレーションにより大腸菌 (DH10B) に形質転換し、BAC ライブラリーを作製した。

合計 69,120 クローンからなるニホングリ BAC ライブラリーを構築した。パルスフィールドゲル電気泳動から、BAC クローンのインサート長を推定した結果、作成した BAC ライブラリーの平均インサート長は、約 159 kb と推定された。ニホングリの推定ゲノムサイズは明らかとなっていないが、チュウゴクグリとほぼ同等であると考えられる。チュウゴクグリの推定ゲノムサイズ (800 Mb) を基にすると、今回構築したニホングリ BAC ライブラリーは、推定ゲノムサイズの 14X をカバーすると考えられる。

3) ニホングリ再分化系確立に向けた条件検討

ヨーロッパグリやアメリカグリでは、未熟胚からの不定胚誘導が報告されていることから、材料として、「筑波」×「ぼろたん」の交配集団より得られた未熟胚を用いた。交配約 6-7 週間 (43-49 日) に毬果から鬼皮を含む子実を取りだし、鬼皮ごと滅菌を行った。滅菌条件は、80%EtOH で 1 分、1%NaClO で 20 分、滅菌蒸留水による洗浄 3 回である。

未熟胚からの不定胚誘導には、ヨーロッパグリ等で再分化の成功報告のある KTI 培地もしくは WD4G 培地を用いた。KTI 培地および WD4G 培地の組成は以下である。KTI 培地：MS + Kinetin (2 mg/L) + TDZ (0.1 mg/L) + IBA (0.01 mg/L) + L-glutamine (250 mg/L) + Sucrose (30 g/L) + gelrite (2.1 g/L) (pH5.8)、WD4G 培地：WPM salts + NN vitamins + 2,4-D (4 mg/L) + L-glutamine (1 g/L) + Sucrose (30 g/L) + gelrite (2.1 g/L) + myo-inositol (100 mg/L) (pH5.8)。

培養時、胚の大きさは 1mm 以下-10mm の範囲に分布していたが、6mm 以下のものが多かった。KTI 培地でのみ不定胚形成が観察され、不定胚形成率は約 60%であった。不定胚形成は、茎頂部に多く観察され、子葉部、下胚軸部分にも散見された (図 2)。下胚軸部分での胚形成の例は少なかった。形成される不定胚数には変動が大きかった。不定胚形成は、茎頂部に多く観察され、子葉部、下胚軸部分にも散見された。不定胚形成は、置床後 3-7 週位まで観察されたが、4-5 週が多かった。置床する胚が大きい (8mm 以上) と、不定胚形成率は低下した。形成された不定胚は、MS ホルモンフリー培地へ移植し、植物体の再分化を試みたが、子葉の肥厚など異常な生育を示し、再分化系の確立には至らなかった。

4) 渋皮剥皮遺伝子座 (*Peeling*) のファインマッピング

渋皮剥皮性が分離する遺伝解析集団 (「ぼろたん」×クリ筑波 43 号、689 個体) について、既存の渋皮剥皮遺伝子座と連鎖するマーカー (PRD58 および PRD52) によるジェノタイプングを行った。「ぼろたん」は易渋皮剥皮性 (*p/p*)、クリ筑波 43 号は難渋皮剥皮性 (*P/p*) である。ジェノタイプングの結果、易渋皮剥皮遺伝子型の実生が 304 個体、難渋皮剥皮遺伝子型の実生が 325 個体、マーカー間で遺伝子型の組み換わっている実生が 60 個体であった。マーカー

間で遺伝子型の組み換わっている 60 実生については圃場に定植し、開花・結実まで維持・管理を行った。また、定植実生および両親品種の幼葉から NucleoMag Plant を用いてゲノム DNA を抽出した。

収穫した果実について、HOP (high-temperature oil peeling) 法により渋皮剥皮性の評価を行った。収穫果実を 4 で 1 ヶ月貯蔵後、個体毎に 10 果実を 190 の油で 4 分揚げ、10 果実の平均渋皮剥皮率を記録した。剥皮処理後に、健全な表皮が表面積全体に占める割合を目視で 0-100 % まで 10% 単位の 11 段階に評価した値の平均値を、各実生の渋皮剥皮率 (%) とした。渋皮剥皮率が 75 % 以上の個体を易渋皮剥皮性、剥皮率が 75 % より低い個体を難渋皮剥皮性と判定した。

これまでに、チュウゴクグリではドラフトゲノム情報 (v1.1) が公開されている (<http://www.hardwoodgenomics.org/chinese-chestnut-genome>)。41,260 scaffolds (N50, 39.6 kb) の総塩基長は 724.0 Mb であり、推定ゲノムサイズの 91.2% をカバーしている。BLAST による配列類似性検索から、渋皮剥皮遺伝子座と連鎖している PRD58 と PRD52 のマーカーが座乗している scaffold を調べたところ、異なる scaffold であった。

渋皮剥皮遺伝子座のファインマッピングのため、更なる連鎖マーカーの獲得を進めた。渋皮剥皮遺伝子座は第 1 連鎖群に座乗していることが明らかとなっているが、チュウゴクグリの各 scaffold は染色体 (連鎖群) との対応が不明である。そこで、既存の連鎖地図に座乗している SSR マーカー領域が含まれていると思われる scaffold を除き、残った scaffold について、Tandem Repeats Finder と Primer3 により SSR マーカーを設計した。多型性を考慮し 2 塩基モチーフの SSR のみに限定し、異なる scaffold から 1,280 種類の SSR マーカーを選定した (CmSSR0001-1280)。

新たに開発したマーカーについて、「ぼろたん」×クリ筑波 43 号における多型性および座乗連鎖群のスクリーニングを行うとともに、渋皮剥皮性との連鎖解析を行った。その結果、24 種類の SSR マーカーが、PRD58 と PRD52 の間に座乗しており、渋皮剥皮遺伝子座の座乗位置は、CmSSR0338 と CmSSR0731 マーカー間、およそ 1.1 cM の間に座乗していることが示唆された (図 3)。また、渋皮剥皮性と完全連鎖するマーカー (CmSSR0055) を獲得した。

渋皮剥皮遺伝子座と連鎖するマーカー、および完全連鎖するマーカーを起点として、渋皮剥皮遺伝子座をカバーする BAC コンティグの構築を進めた。しかしながら、現在保有する BAC ライブラリーでは、一部の領域で該当する BAC クローンが含まれておらず、渋皮剥皮遺伝子座をカバーする BAC コンティグを構築することは出来なかった。

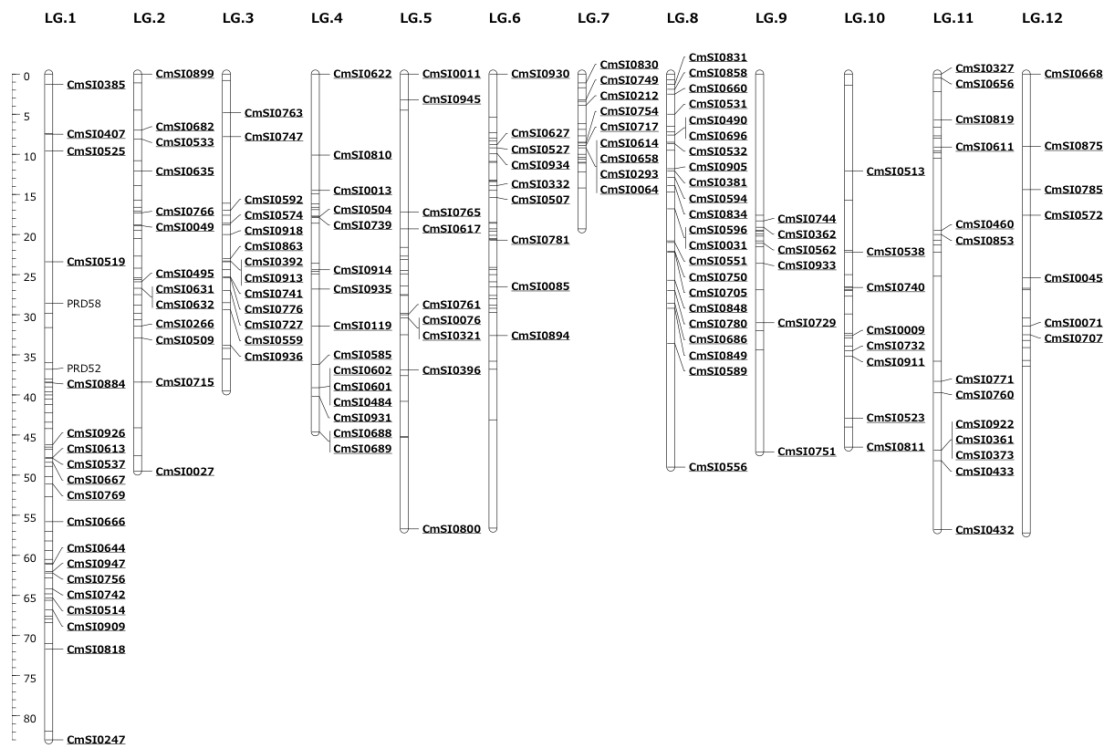


図1. 構築したニホングリ標準連鎖地図

LG (linkage group) は連鎖群を表し、左の数値は地図距離 (cM) を示す。連鎖群番号は、チュウゴクグリの標準連鎖地図と対応している。横線はSSRを表しており、CmSIで始まるマーカーはチュウゴクグリ由来のSSRである。

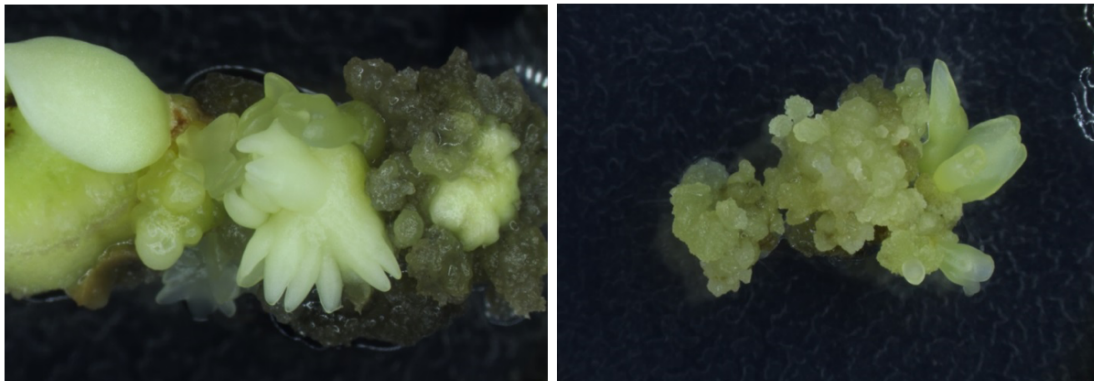


図2. 未熟胚培養により形成された不定胚

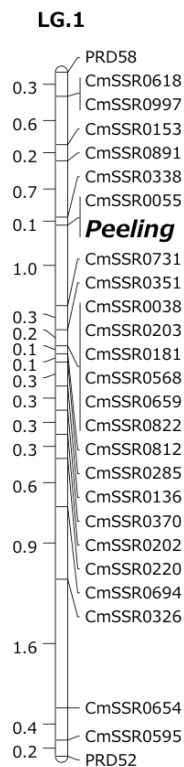


図3. ニホングリ渋皮剥皮遺伝子座近傍の連鎖地図

「ぼろたん」xクリ筑波43号の集団から構築した連鎖地図。ニホングリ渋皮剥皮遺伝子座は*Peeling* で示す。各マーカーの左の数値はマーカー間距離 (cM) を示す。

3) 成果活用における留意点

今回開発したマーカーを用いてマーカー選抜を行う際には、交配に用いた両親の多型性を考慮する必要がある。

4) 今後の課題

今後ロングリード型のシーケンサーなどを用いることで、ニホングリでもゲノム解読が容易となる。渋皮剥皮遺伝子座をカバーするBACコンティグの構築を行うことが出来なかったが、ニホングリおよびその近縁種のゲノム情報を用いることで渋皮剥皮性のメカニズムの解明および原因遺伝子の単離が進むと考えられる。

現在、渋皮が剥けやすいニホングリ品種として、「ぼろたん」および「ぼろすけ」が育成されているが、両品種の有する易渋皮剥皮対立遺伝子はともに在来品種「乙宗」に由来している。また、渋皮の剥けやすい品種育成に利用可能な品種・系統は、すべて「乙宗」由来であることから、これらを用いた交雑を続けることで近交弱勢が生じることが危惧される。よって、様々な在来品種の渋皮剥皮性を調査し、易渋皮剥皮品種の育成に利用可能な育種素材を探索する必要がある。

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (HOR)

小課題番号: HOR2005

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: ニホンナシ果実の糖組成に関する DNA マーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・資源植物学研究室・板井章浩

1) 研究目的

農林水産技術会議が策定した「作物育種研究の今後の進め方について」では、良食味性を基本にして、複合病害抵抗性や自家和合性などの様々な特徴を合わせ持つナシ品種の育成が重点課題となっている。ナシ果実における良食味性は、糖、有機酸、アミノ酸、肉質、香り、色などの要因によって決定されており、生食としての利用が多いニホンナシでは甘味を構成する糖の組成と含量が良食味性を決定する上で最も重要である。一方、ニホンナシでは、糖の含量と組成に関連する遺伝子やその制御機構は十分に解明されておらず、良食味性を選抜するための DNA マーカーも開発されていない。これまでの研究から、ナシ果実における主な糖成分はスクロース（ショ糖）、グルコース、フルクトース、ソルビトールであり、品種間でこれら糖の組成割合は大きく異なることが明らかとなっており、中でもスクロース含量については、品種によっては 50 % を越えるものから、ほとんど蓄積しない 0 % に近い品種まで著しい差異が認められている。特に第二次世界大戦以降に育成された品種では、晩生品種を除いて高いスクロース含量を示すものが多く、良食味性とスクロース含量との関連が強く示唆されている。このため、ニホンナシ良食味品種の育成においては、スクロース蓄積の分子メカニズムを明らかにし、スクロース蓄積型を判別できる DNA マーカーの開発を目的とする。

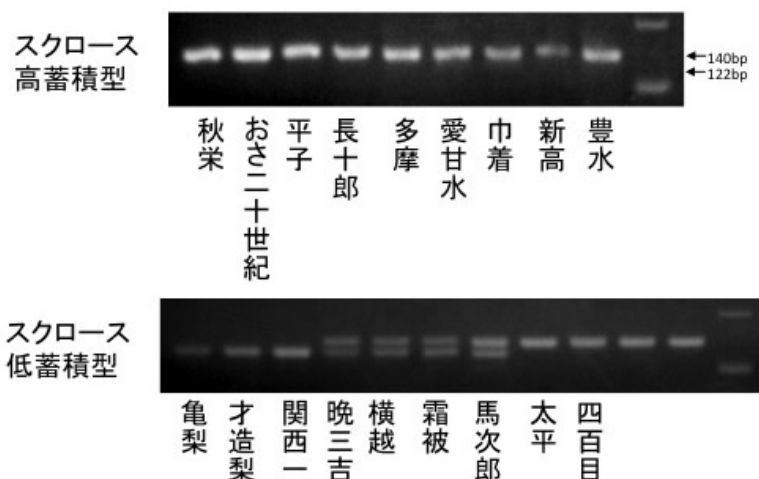
2) 研究成果

1. 酸性インベルターゼ (*PpAIV2*) のゲノム構造の差異による糖組成に関する DNA マーカーの開発と発現調節機構の解析

スクロース高蓄積型を 2 品種、低蓄積型を 4 品種、チュウゴクナシを 2 品種の発育中期から成熟果まで経時的に採取した果実、および収穫適期に採取した 25 品種の果実の糖組成を HPLC により分析した。また、同じサンプルを用いて *PpSPS1* および *PpAIV2* の発現解析を行った。ナシ果実の経時的な糖組成の変化およびスクロース代謝関連酵素遺伝子を調査した結果、スクロース高蓄積型品種は、成熟期に *PpAIV2* の発現が減少する一方、*PpSPS1* の発現が急激に増加していた。低蓄積型品種では、*PpAIV2* の発現が高く、*PpSPS1* の発現が低いことから、*PpAIV2* および *PpSPS1* の発現がスクロース蓄積において関連性が高いことが示唆された。また、チュウゴクナシでは成熟期に *PpAIV2* および *PpSPS1* の発現が高いタイプと常に両遺伝子の発現が低いタイプの 2 タイプがみられ、どちらもスクロース蓄積が生じないことが確認された。そのため、成熟期の *PpSPS1* と *PpAIV2* 発現の高低がスクロース蓄積を決定する最も重要な要因であることが改めて示唆された。

そこで、スクロースの分解に関わる *PpAIV2* について、スクロース高蓄積型品種の「長十郎」由来のクローン 7-5 の配列と、一方、スクロース低蓄積型品種の「晩三吉」由来のクローン 55 の配列を比較し、さらにプロモーター領域について 14 品種でシーケンスを行ったところ、低蓄積型品種でみられた転写開始点より上流約 0.6kb の CAPS サイトは、「太平」、「津軽青」など例外品種を除き、高蓄積型品種にはみられないことが明らかとなった。そこで、スクロース低・中・高蓄積型の 31 品種のプロモーター領域の *Eco* R サイトを増幅するようにプライマーを構築し、増幅断片を *Eco* R で消化する CAPS 法を用いた結果、ゲノムのサザン解析の結果とすべて一致し、スクロース高蓄積型品種は全く切断されず、低蓄積型品種は一部の例外を除きすべて切断された。また、クローン 7-5 にはクローン 55 に比べて、18bp の挿入をみられ、この領域含む配列を増幅した結果、スクロース高

蓄積型品種は長いバンドのみが確認され、スクロース低蓄積型品種は長いバンドと短いバンドのヘテロもしくは短いバンドのホモしか確認されなかった(第1図)。以上の結果から、これらマーカーは、スクロース低・中蓄積型品種のみが切断されることが確認できたため、スクロース低蓄積型判別のマーカーとしての有効であると思われた。また、スクロース分解に関わる *PpAIV2* の発現制御機構において、メチル化状態の違いが明らかになったことから発現に関与するシス因子の同定やエピジェネティックな制御機構の有無について検討し、*PpAIV2* のプロモーターのゲルシフトアッセイを行った結果、糖応答シスエレメントを含む上流 330bp 断片とまた上流 418bp 断片も両品種の核タンパク質との結合が見られたことから、これらの領域が *PpAIV2* の発現制御機構に関与する可能性が示唆された。



第1図 *PpAIV2* 遺伝子プロモーター領域のナシ品種における PCR 分析

2. スクロース合成に関わる *PpSPS1* のマーカー開発

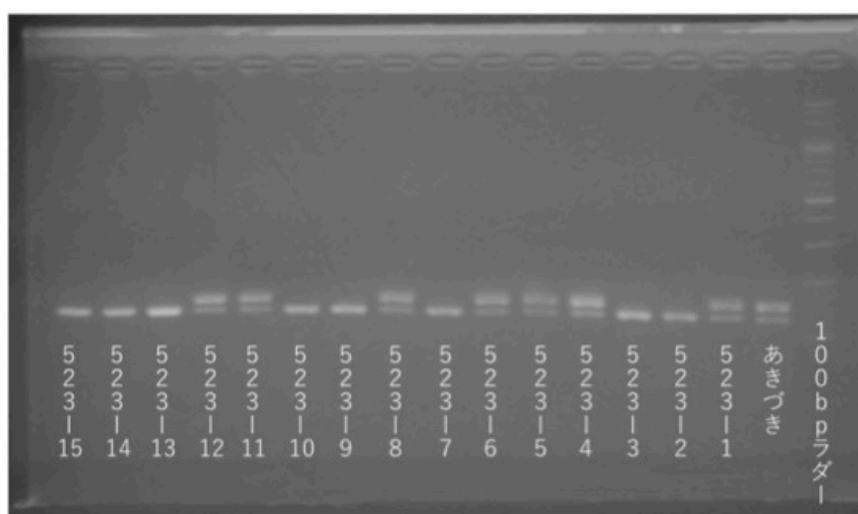
糖蓄積の異なる約 40 品種の成熟果実の cDNA を用いてリアルタイム PCR を行った。その結果、スクロース高蓄積型品種においては、*PpSPS1* の発現量が高い傾向にあった。そこで高発現型および低発現型 *PpSPS1* の塩基配列多型情報より、SNP、CAPS などのマーカー候補を選抜し、選抜したマーカーの多型性を発現解析および糖組成を調査した。糖組成の異なる様々な品種から *PpSPS1* 転写開始点上流約 2,000bp を含む配列を得ることができた。品種間でかなり多数の塩基配列多型が得られた。そのなかで *PpSPS1* の翻訳開始点上流約 200bp の配列には、CT 繰り返しからなる配列 (SSR) が存在し、この領域の長さが品種間で大きくことになっていることが明らかとなった。そこで、配列を増幅するために構築した蛍光プライマーを用いて、フラグメント解析を行ったところ、160bp、152bp、150bp、144bp、141bp、139bp、137bp、135bp の計 8 種類のアリルが得られた。

これらのアリルの違いと糖組成の異なる品種の成熟果実の cDNA を用いてリアルタイム PCR を行った。その結果、160bp のアリルを持つ品種において、発現が多い傾向がみられたものの、その他のアリルを持つ品種でも発現が多いものもあり、一定の傾向が得られなかった。

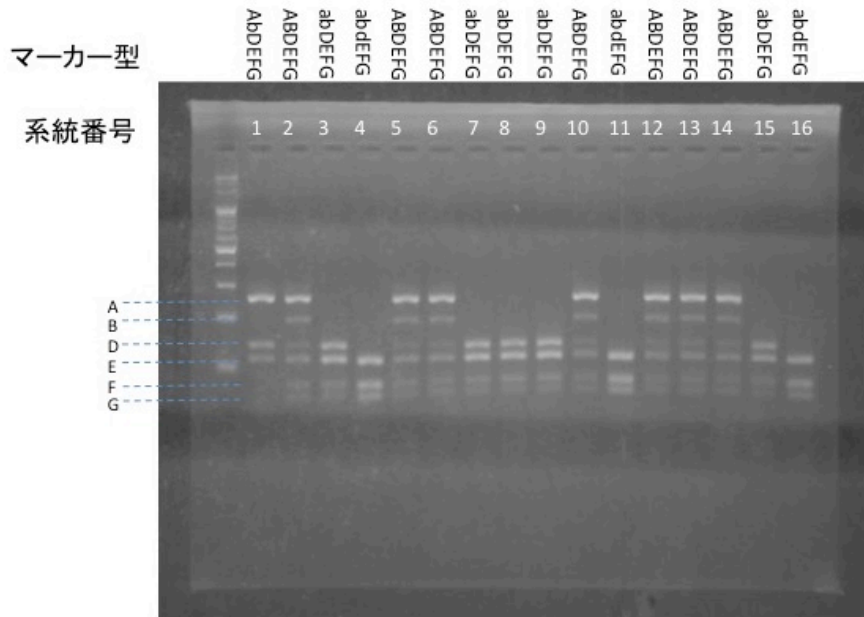
3. 糖組成の異なる実生集団 ('あきづき' x '373-55') におけるマーカー選抜

'あきづき' x '373-55' の 100 系統以上の糖組成を明らかにした結果、スクロース含量はほぼ 0 % から 50 % を越えるものまで系統間で大きな差が見られた。開発した *PpAIV2* 第 1 イントロン部分

の挿入を利用した PCR マーカーと上述の *PpSPS1* 転写開始点上流の SSR を利用したマーカーについて、系統のスクロース含量とマーカーの相関について調査した。結果、*PpAIV2* と *PpSPS1* の両マーカーともスクロース含量の相関が見られなかった。そこで、高スクロース含量系統、中程度の含量の系統および低含量の系統果実から RNA を抽出し、スクロース合成および分解に関与する遺伝子の発現解析を行った。その結果、*PpSPS1* と *PpAIV2* の発現量とスクロース含量の間には、相関が見られなかったのに対して、*PpAIV1* の発現量は、高スクロース蓄積系統では、ほとんど発現が見られず、*PpAIV1* 遺伝子の発現がこの集団では鍵になっていると考えられた。また糖組成に関する QTL 解析を行ったところ第 1,7 連鎖群に QTL を検出した。QTL 領域である第 7 連鎖群においては、*PpAIV1* が存在し、*PpAIV1* が原因遺伝子である可能性が推察された。そこで、'あきづき'および'373-55'において *PpAIV1* プロモーター上流 2 kb についてシーケンス情報を得た結果、50 カ所以上の SNP 情報が得られた。SNP および欠失領域からプライマーを構築し、マーカー開発を行った(第 2 図)。結果、*PpAIV1* プロモーター由来配列マーカーは糖組成に関する QTL のピークの信頼区間に存在し、また成熟果実での発現量とマーカータイプに相関がみられた。また、開発したマーカーを現在の栽培品種および育種親系統の合計約 180 アクセションについて、遺伝子型を決定した。さらに一方の QTL 領域である第 1 連鎖群において、現在原因遺伝子の可能性のある *PpAIV3* についてクローニングを行い、*PpAIV3* プロモーター上流 2 kb についてシーケンス情報を得た結果、20 カ所以上の SNP 情報が得られた。SNP および欠失領域からプライマーを構築し、CAPS マーカー開発を行った(第 3 図)。結果、*PpAIV3* プロモーター由来配列マーカーは糖組成に関する QTL のピークの信頼区間に存在し、また成熟果実での発現量とマーカータイプに相関がみられた。開発したマーカーを現在の栽培品種および育種親系統の合計約 120 アクセションについて、遺伝子型を決定した。これらの情報は、今後の良食味系統育成の際の育種親の決定に有効と考えられた。



第2図 *PpAIV1*遺伝子プロモーター領域の実生集団における PCR分析



第3図 *PpAIV3*遺伝子プロモーター領域の実生集団におけるCAPS分析

4. 実生集団を用いて網羅的発現解析による原因遺伝子の探索

実生集団においてスクロース含量の異なる9系統（高スクロース3系統、中スクロース3系統、低スクロース3系統）の成熟果実よりRNAを抽出し、次世代シーケンス用ライブラリーを作製し、RNA-seq解析を行った。高スクロース系統、中スクロース系統、低スクロース系統の3者間で発現量の異なる遺伝子群の選抜を行い、高スクロース系統、中スクロース系統、低スクロース系統の3者間で明らかに差がみられ、スクロース合成に関与すると考えられる新規SPS遺伝子、スクロース-6-リン酸フォスファターゼ遺伝子、インベルターゼインヒビター遺伝子などを合成の鍵遺伝子候補として選抜した。これらの遺伝子は、今後の良食味品種育成のマーカー開発の候補遺伝子となり得る。

3) 成果活用における留意点

スクロース分解に関わる機構を解明がすすみ、3つのインベルターゼ遺伝子(*PpAIV1, 2, 3*)のDNAマーカーが利用できる状態である。全国のニホンナシの育種に関わる公設試験場でのDNAマーカー選抜育種で利用は可能になる。しかし、*PpAIV2*に関しては、メチル化が関与しており、完全に識別できるマーカーとなっていない点を留意する必要がある。

4) 今後の課題

スクロース分解に関わる機構およびマーカー開発が進み、食味の良くない系統を除外することが可能になりつつある。しかし、スクロース合成に関わる制御機構に関しては候補遺伝子の選抜が行われてはいるが、まだまだ解明が進んでいない部分が存在する。今後、スクロース合成に関わる候補遺伝子を利用してマーカー開発を行い、より正確に良食味品種を選抜する方法を確立する必要がある

「園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405844

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 園芸作物の有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (HOR)

小課題番号: HOR2006

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: ブドウべと病抵抗性のDNAマーカー開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 果樹茶業研究部門・ブドウ・カキ研究領域・ブドウ・カキ育種ユニット・河野淳

1) 研究目的

ブドウべと病は国内外のブドウ生産に大きな被害をもたらしている重要病害であり、近年も主産県で甚大な被害が生じている。特に、平成 22 年のべと病の大発生などにより、主産県である山梨県のブドウ生産量が前年比約 10 % 減となり、同県のワイン生産にも大打撃を与えた。更に、ストロビルリン系殺菌剤やメタラキシルといった薬剤に耐性のべと病菌が山梨県などで確認されており、べと病抵抗性品種の育成が以前にも増して重要な課題となっている。

これまでの研究により、醸造用ブドウを用いたべと病抵抗性 DNA マーカーが欧米諸国で開発されている。一方、日本の生食用ブドウにおけるべと病抵抗性や日本国内のべと病菌系統に関する研究は進んでいない。そこで、本課題では、生食用ブドウ品種マスカットオブアレキサンドリア (アレキ) やキャンベルアーリー (キャンベル) が有する抵抗性について、アレキ×キャンベルの実生集団 (集団 AC) を用いてべと病抵抗性の評価を行い、QTL 解析により抵抗性遺伝子座を検出する。この抵抗性遺伝子座の有効性について、国内から単離した複数のべと病菌株を用いて検証する。その上で、ブドウのゲノム情報を利用して新規マーカーを設計し、抵抗性 QTL を両側から挟み込む DNA マーカーを開発する。上記の解析を通じて、生食用ブドウ新品種育成の際にべと病抵抗性を効率良く選抜するための DNA マーカーを開発することが本研究の目的である。

2) 研究成果

(1) 集団 AC を用いたブドウべと病抵抗性 DNA マーカーの開発

研究方法: べと病抵抗性に関与する QTL を検出するため、アレキ×キャンベル実生集団 (集団 AC) について殺菌剤無散布条件下でべと病抵抗性を 3 年間評価した。抵抗性評価は新梢完全展開葉について分生子 (遊走子嚢) が観察された葉の割合 (発病葉率) および葉の発病程度から算出した品種・系統の発病程度 (発病度) の 2 通りの方法で行った。また、生食用ブドウ品種系統 (27 品種系統) においても同様の調査を 2 年間行った。新梢完全展開葉の葉裏について実体顕微鏡観察結果を基に、毛じ量を 1 ~ 6 段階のスコアで評価した。アークサイン変換した発病葉率および発病度を葉裏毛じ量で線形回帰し決定係数を求めた。集団 AC の抵抗性調査結果および葉裏毛じ量調査結果に関して、MapQTL6 により QTL 解析を行った。

葉裏毛じが非常に多いあるいはほとんど無い品種・系統のリーフディスクを作成し、界面活性剤処理区 (0.01 % (v/v) NP-40 処理後に蒸留水で四回洗浄) と無処理区を設け、べと病菌を両区に接種し界面活性剤の有無で発病に差が生じるか調査した。

研究結果: 葉におけるべと病抵抗性について集団 AC を用いた QTL 解析を行った結果、いずれの抵抗性調査手法においても調査した全ての年次でアレキ由来の効果の高い QTL が検出された (表 1)。この結果はこの座がアレキ由来の罹病性をもたらす座であることを示す。この集団で葉裏毛じ量が大きく変動すること、また以前に葉裏毛じ量がべと病抵抗性に寄与していることが示唆されていたため、この集団における葉裏毛じ量についても同様の QTL 解析を行ったところ、非常に高い寄与率でべと病抵抗性と同じ領域が検出された (表 1)。アレキには葉裏毛じがほとんど無いことから、この座は葉裏毛じ量を著しく減少させる優性の効果を有するといえる。集団 AC 以外にもこの座の効果があるか確認するため、2 つの異なる実生集団について解析したところ、この座における遺伝子型別のゲ

ループ間に大きな毛じ量の差が検出された。以上より、この座がべと病抵抗性に関与する葉裏毛じ量の DNA マーカーとして広く利用可能な座であることが示唆された。

生食用ブドウ品種・系統のべと病抵抗性に毛じが及ぼす影響について解析したところ、発病葉率を毛じ量達観評価値で回帰した決定係数は集団 AC で 0.50、生食用ブドウ品種系統（27 品種系統）で 0.77 となった。キャンベルなどの葉裏に毛じの非常に多い品種では、ほとんど発病が見られなかった。また、寺井と矢野（1977）による 27 品種・系統のべと病発病葉率調査結果を用いて同様の回帰分析を行ったところ、決定係数は 0.71 とやはり高かった。これは、葉裏の毛じ量に応じて発病が抑制されることを示すとともに、少なくとも供試した品種・系統内では毛じ量に起因しない抵抗性の効果は低いと考えられた。ただし、この抵抗性は完全なものでなく、発病の程度を軽減させるいわゆる圃場抵抗性である。

葉裏毛じの撥水性が感染に影響を与えているか異なる手法で確認するため、界面活性剤処理により毛じの撥水効果をなくした条件下での接種試験を行った。その結果、キャンベルなどの通常ほとんど発病しない毛じの非常に多い品種や野生ブドウでも分生子の形成が見られた。これは、毛じの多いブドウにおいて、べと病菌が侵入してしまえば発病する場合があることを示唆した。

以上より、生食用ブドウ集団において、葉裏の毛じによる撥水効果により、べと病菌が気孔から侵入する過程を阻害する構造的な圃場抵抗性（静的抵抗性）が存在することが示された。また、抵抗性に関与する葉裏毛じ量を制御する効果の高い QTL を生食用ブドウ品種から見出した。この QTL 領域は葉裏毛じ量によるべと病圃場抵抗性の DNA マーカーとして用いることが出来る。以上の結果から、5 年間の目的を達成した。

また、集団 AC の過去の果粒重調査結果から、果粒重に関する QTL 解析を行ったところ、葉裏毛じ量制御 QTL の近傍に果粒重 QTL が検出された。そこで、集団 AC における分離を調べたところ、この葉裏毛じ量を減少させるアリルと果粒重を増加させるアリルが連鎖していることを見出した。そこで、農研機構で育成保存している実生個体からこの連鎖の切れた個体を探索したところ、1 個体を見出した。今後はこの個体あるいは新たに見出された組換え個体由来の果粒重のみを増加させ、葉裏毛じ量を減少させないハプロタイプを育種に利用することが望ましいと考えられる。

表1 集団ACにおけるQTL解析結果の概要(複数年次の表現型平均値による結果)

形質	表現型解析手法	連鎖地図	LODピーク値	LOD閾値 $\alpha=0.05$	寄与率	SSRマーカー	クラスカルウォリス 解析結果
べと病抵抗性	発病葉率(アークサイン変換)	アレキ	13.34	2.9	48.7	Nifts5-50363	48.9*****
	発病度	アレキ	10.99	2.9	42.3	Nifts5-50363	41.7*****
	発病葉率(アークサイン変換)	統合	13.48	4.4	49.1	Nifts5-50363	48.9*****
	発病度	統合	11.54	4.3	43.9	Nifts5-50363	41.7*****
葉裏毛じ量	達観調査	アレキ	30.08	3.1	78.5	Nifts5-50363	64.8*****
	画像解析	アレキ	29.25	3.0	77.6	Nifts5-50363	64.5*****
	達観調査	キャンベル	4.04	3.0	18.7	Nifts7-59300	16.3*****
	画像解析	キャンベル	4.03	3.0	18.6	Nifts7-59300	16.7*****
	達観調査	統合	30.20	4.4	78.7	Nifts5-50363	64.8*****
	達観調査	統合	4.49	4.4	20.5	Nifts7-59300	18.2*****
	画像解析	統合	29.31	4.4	77.7	Nifts5-50363	64.5*****
	画像解析	統合	4.43	4.4	20.3	Nifts7-59300	19.6*****

クラスカルウォリス解析での有意水準: ****, 0.005, *****; 0.001, *****, 0.0005, *****, 0.0001.

(2) ブドウ属近縁野生種由来のブドウべと病強度抵抗性 DNA マーカーの開発

研究方法：野生ブドウと既存品種・系統の交雑実生集団のべと病抵抗性の分離について予備的に調べるため、*V. coriace* × リザマート（19 個体）、エビヅル和歌山 × 安芸津 7 号（20 個体）、エビヅル和歌山 × 赤嶺（20 個体）、サンカクヅル × リザマート（55 個体）の実生集団および親品種について

リーフディスクによる接種試験を行った。達観調査は接種7日後に行った。

研究結果：*V. coriacea*の後代はすべて罹病性であり、リザマートの罹病性より遺伝的に上位な優性抵抗性遺伝子は無かった。日本在来の野生ブドウであるエビヅル後代の抵抗性は分離したが、毛じ量と抵抗性に強い相関が観察された。これらすべての実生は野外の殺菌剤無散布圃場で最終的にはすべてべと病に罹病したことから、目的とした強度抵抗性遺伝子はないと判断した。日本在来の野生ブドウであるサンカクヅルにべと病菌を接種したところ、過敏反応様の褐変を生じた。また、殺菌剤無散布条件下の樹も非常に強い抵抗性を示した。*V. coriacea*やエビヅル、ヤマブドウなどの野生ブドウの多くが葉裏に非常に密な毛じを生じるのに対し、サンカクヅルには毛じが全く無い。これはサンカクヅルには毛じとは全く機構の異なる強い抵抗性を有することを意味する。そこで、リーフディスク法によりサンカクヅル×リザマート実生群の55個体について抵抗性を調査したところ、抵抗性は罹病性に偏った分布となり、サンカクヅル並みに抵抗性の強い個体は得られなかった(図1)。これは、この集団から優性の強度べと病抵抗性を分離することは不可能であることを示唆した。プロジェクト3年目(平成27年度)の時点で上記のような研究進展状況であったことから、野生ブドウから強度べと病抵抗性遺伝子座を見出す計画は平成27年度までで終了した。

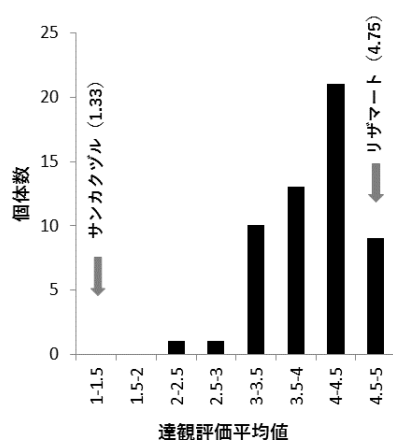


図1 サンカクヅル×リザマート実生群のべと病抵抗性の分離。抵抗性評価はリーフディスク法による

(3) 国内べと病菌系統の収集並びに病原性調査

研究方法：国内各地(青森、秋田、山形、山梨、長野、岡山、佐賀)のブドウ園から計19菌株のべと病菌を収集した。各べと病菌はリザマート葉上で培養し分生子を形成させた。分生子を筆先で集め10%スキムミルク液に懸濁し、-80℃で保存した。凍結保存した分生子はスキムミルクごと凍結乾燥、粉碎し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。上記DNAを用いてITS領域、28SリボゾームRNA遺伝子、アクチン遺伝子、 α -チューブリン遺伝子を増幅し塩基配列を決定した。決定された塩基配列は既報のデータと比較し、国内のべと病菌の所属を検討した。

これまでに収集したべと病菌菌株をブドウ属植物に接種し、反応に差がみられるかどうかを調査するため、ブドウ属植物として、*Vitis vinifera*(欧州ブドウ)4品種、*V. labrusca*(米国野生ブドウ)1系統、*V. sylvestris*(欧州野生ブドウ)2系統、*V. coignetiae*(ヤマブドウ)、メキシコ野生ブドウ(学名不明)を供試した。遊走子囊懸濁液を、接种植物のリーフディスク(1品種あたり10枚)に滴下した。接種したリーフディスクは20℃で培養し、約1週間後に遊走子囊形成程度を達観評価した。

研究結果：収集したべと病菌株のITS領域の部分塩基配列(736bp)から、国内で収集された菌株

はすべてブドウべと病菌 (*Plasmopara viticola*) であることを確認した。28S リボソーム RNA 遺伝子 (629 bp)、アクチン遺伝子 (454 bp)、 β -チューブリン遺伝子 (518 bp) の部分塩基配列から、国内で収集されたブドウべと病菌はすべて既報の B 系統に所属し、単一の系統であると考えられた。

接種に用いたべと病菌には病原力の強いものと弱いものが含まれていた。欧州種ブドウに対しては病原力の強い菌株、弱い菌株のいずれも感染した。*V. labrusca* (米国野生種)、ヤマブドウ、メキシコ野生ブドウは、すべての菌株に感染しなかった。葉裏の毛じが豊富な品種 (*V. labrusca*、メキシコ野生ブドウ) は、いずれもべと病に感染しなかった。これは非常に密な葉裏毛じが、安芸津における菌株のみならず、今回供試した国内で収集された菌株に共通して有効であることを示している。以上の結果から、5年間の目的を達成した。

3) 成果活用における留意点

他国で報告されているべと病抵抗性遺伝子は、アメリカ野生種と欧州ブドウの交雑品種であるフレンチハイブリッドあるいは野生種そのものなどに由来し、国内生食用ブドウ集団には導入されていない。そのため、その利用には遺伝資源の導入あるいは過去に導入されたフレンチハイブリッドなどから交雑により導入する必要がある、非常に長年月がかかる。一方、本研究で見出された葉裏毛じによる圃場抵抗性は生食用ブドウ集団ですぐに応用可能である点で実用性が高い。具体的には、アレキなどに由来する葉裏毛じ量を大きく減少させるアリルを実生集団から排除する方向で育種を進める必要がある。しかし、この抵抗性は発病を完全に抑える抵抗性ではない点には注意が必要である。また、果粒重を増加させる QTL が連鎖していることにも注意が必要であり、単純に毛じ量減少アリルを排除すると果粒重が一定程度減少することが想定される。

4) 今後の課題

アレキに由来する座以外にもキャンベルからも効果は弱いものの葉裏毛じ量を増加すると想定される座が見出されており、その他にも葉裏毛じ量に関与する座がある可能性がある。今後はこうした他の座も考慮しつつ、葉裏毛じ量をキャンベル並みに多い個体を育成・選抜することが、葉裏毛じによるべと病強度抵抗性品種育成に不可欠である。

成果等の集計数

課題 番号	学術論文		学会等発表(口頭 またはポスター)		出版 図書	国内特許権等		国際特許権等		報道件 数	普及しう る成果	発表会 の主催 (シンポ ジウム・ セミナー)	アウト リーチ活 動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得				
13405844	3	9	15	0	1	2	0	0	0	1	2	2	6

(1)学術論文

区分; ①原著論文、②その他論文

整理番 号	区分	機関名	タイトル	著者	掲載誌	巻 (号)	掲載 ペー ジ	発行 年	発行 月
1	①	農研機 構野菜 花き研究 部門	Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables.	Ishida M, M. Hara, N. Fukino, T. Kakizaki and Y. Morimitsu	Breeding Science	64	48-59	2014	
2	①	農研機 構果樹 茶業研 究部門	Construction of a citrus framework genetic map anchored by 708 gene-based markers.	T. Shimada, H. Fujii, T. Endo, T. Ueda, A. Sugiyama, M. Nakano, M. Kita, T. Yoshioka, T. Shimizu, H. Nesumi, Y. Ikoma, T. Moriguchi, M. Omura	Tree Genetics & Genomes	10	1001-1013	2014	
3	①	農研機 構野菜 花き研究 部門	Mapping of quantitative trait loci for Melon yellow spot virus resistance in cucumber (<i>Cucumis sativus</i> L.).	M. Sugiyama, Y. Kawazu, N. Fukino, Y. Yoshioka, K. Shimomura, Y. Sakata, M. Okuda	Euphytica	205	615-625	2015	
4	①	農研機 構果樹 茶業研 究部門	Fine mapping of the susceptible gene to black spot disease in Japanese pear (<i>Pyrus pyrifolia</i>).	Terakami S, S. Moriya, Y. Adachi, M. Kuniyama, C. Nishitani, T. Saito, K. Abe and T. Yamamoto	Breeding Science	66	271-280	2016	
5	①	かずさ DNA研	Genome-wide survey of artificial mutations induced by ethyl methanesulfonate and gamma rays in tomato.	K. Shirasawa, H. Hirakawa, T. Nunome, S. Tabata and S. Isobe	Plant Biotechnology Journal	14	51-60	2016	

6	①	農研機構果樹茶業研究部門	Overexpression of a citrus basic helix-loop-helix transcription factor (CubHLH1), which is homologous to Arabidopsis activation-tagged bri1 suppressor 1 interacting factor genes, modulates carotenoid metabolism in transgenic tomato.	T. Endo, H. Fujii, A. Sugiyama, M. Nakano, N. Nakajima, Y. Ikoma, M. Omura, T. Shimad	Plant Science	243	35-48	2016	
7	①	農研機構野菜花き研究部門	キュウリ黄化えそ病抵抗性を有する'きゅうり中間母本農7号'の育成経過とその特性	杉山 充啓・川頭 洋一・下村 晃一郎・吉岡 洋輔・坂田 好輝・吹野 伸子・野口 裕司	野菜茶業研究所研究報告	15	1-10	2016	
8	②	農研機構野菜花き研究部門	トマト単為結果性pat-2遺伝子	布目司	植物の生長調節	51(1)	37-40	2016	5
9	①	農研機構果樹茶業研究部門	Expression of a putative dioxygenase gene adjacent to an insertion mutation is involved in the short internodes of columnar apples (<i>Malus × domestica</i>)	Okada K, Wada M, Moriya S, Katayose Y, Fujisawa H, Wu J, Kanamori H, Kurita K, Sasaki H, Fujii H, Terakami S, Iwanami H, Yamamoto T, Abe K	J Plant Res	129(6)	1109-1126	2016	11
10	①	農研機構野菜花き研究部門	ダイコンの辛味成分合成遺伝子の同定と育種への利用	柿崎智博、石田正彦	バイオサイエンスとインダストリー	75(6)	522-523	####	11
11	①	農研機構野菜花き研究部門	A 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase Mediates the Biosynthesis of Glucoraphasatin in Radish	Kakizaki T, Kitashiba H, Zou Z, Li F, Fukino N, Ohara T, Nishio T, Ishida M.	Plant Physiol	173(3)	1583-1593	####	3
12	①	岩手大学、農研機構野菜花き研究部門	The tandem repeated organization of NB-LRR genes in the clubroot-resistant CRb locus in <i>Brassica rapa</i> L.	Hatakeyama, K., Niwa, T., Kato, T., Ohara, T., Kakizaki, T., Matsumoto, S.	Mol. Genet. Genomics	292(2)	397-405	####	4

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	Detailed genetic analysis of fertility restorer genes in eggplant.	Y. Gyawali, T.Saito, H.Fukuoka, H.Yamagishi	京都産業大学、農研機構・野菜茶業研究所	日本育種学会第129回講演会	2016	3
2	ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子CRbのゲノム構造	畠山勝徳, 丹羽智久, 加藤文幸, 小原隆由, 柿崎智博, 松元 哲	岩手大学、農研機構野菜花き研究部門、(株)日本農林社、農研機構東北農研	日本育種学会第129回講演会 講演要旨集育種学研究	2016	3
3	ブドウべと病抵抗性に寄与するブドウ葉裏の毛じについて	河野淳, 須崎浩一, 伴雄介, 尾上典之, 佐藤明彦	東京農業大学	園芸学会平成28年度春季大会 園芸学研究	2016	3
4	ダイコンのグルコシノレート合成経路の解明と育種への利用	柿崎智博	農研機構野菜花き研究部門	日本育種学会第130回講演会 講演要旨集 育種学研究	2016	9
5	トマトの単為結果を制御する転写因子	布目司	農研機構野菜花き研究部門	園芸学会平成28年度秋季大会シンポジウム講演要旨 園芸学研究	2016	9
6	ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子の単離と育種への応用	畠山勝徳	岩手大学	日本育種学会第130回講演会 講演要旨集育種学研究	2016	9
7	リンゴ根でのカラムナー候補遺伝子の発現解析	和田雅人, 岡田和馬, 森谷茂樹, 花田俊男, 守谷(田中)友紀, 本多親子, 岩波宏, 阿部和幸	農業・食品産業技術総合研究機構	園芸学会平成28年度秋季大会 講演要旨集 園芸学研究	2016	9

8	アブラナ科野菜育種におけるゲノム育種の現状: 遺伝子同定から品種育成まで	柿崎智博	農研機構野菜花き研究部門	第24回 育種学会中部地区談話会	2016	11
9	ダイコンF3系統を用いたグルコエルシン含量に関するQTLの効果の確認	吹野伸子, 柿崎智博, 西尾剛, 北柴大泰, 板橋悦子, 小原隆由, 石田正彦	農研機構野菜花き研究部門	第24回 育種学会中部地区談話会	2016	11
10	ナス単為結果性に関与する原因候補変異の探索	宮武宏治, 齊藤猛雄, 山本英司, 山口博隆, 大山暁男, 福岡浩之, 布目司	農研機構野菜花き研究部門、タキイ種苗株式会社	育種学会中部地区談話会	2016	11
11	リンゴのカラムナー樹形変異の解析	和田雅人、岡田和馬、岩波宏、森谷茂樹、花田俊男、守谷(田中)友紀、本多親子、清水拓、阿部和幸	農研機構果樹茶業研究部門	第35回日本植物細胞分子生物学会(さいたま)大会講演要旨集	2017	8
12	ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子Crr1bの詳細マッピング	高橋美紗子, 松元哲, 柿崎智博, 湯澤彰太, 高畑義人, 畠山勝徳	岩手大学、農研機構野菜花き研究部門	日本育種学会第132回講演会 講演要旨集育種学研究	2017	10
13	トマト花粉への変異原処理による変異誘導	布目司、白澤健太、宮武宏治、山口博隆	農研機構野菜花き部門	日本育種学会第132回講演会 講演要旨集育種学研究	2017	10
14	ダイコンにおける成分育種: グルコシノレート为例に	柿崎智博	農研機構野菜花き研究部門	平成29年度野菜花き課題別研究会「野菜のゲノム情報を活用した育種選抜の現状と展望」	2017	10
15	ダイコンのグルコエルシン含量に関するQTL座乗位置の絞り込み	吹野伸子、柿崎智博、西尾剛、北柴大泰、小原隆由、板橋悦子、石田正彦	農研機構野菜花き研究部門	育種学会第133回講演会	2018	3

(3) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌(注)(1)学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	②	育種学研究(育種学と農学のこれからを考える32)	吉津祐貴・上原(別所)奏子・矢部志央理・世古智一・宮武宏治	日本育種学会	日本育種学会	2017	3

(4) 国内特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日
1	「きゅうり中間母本農7号」	杉山充啓、川頭洋一、下村晃一郎、吉岡洋輔、坂田好輝、吹野伸子、野口裕司	農業・食品産業技術総合研究機構	農業・食品産業技術総合研究機構	品種登録	第30332号(品種登録出願公表)	2015年10月30日	
2	機能欠損型グルコラファサチン合成酵素遺伝子及びその利用	柿崎智博、石田正彦、小原隆由、吹野伸子	農業・食品産業技術総合研究機構	農業・食品産業技術総合研究機構	特許権	特開2016-086761	公開日 平成28年5月23日(2016.5.23)	

(5) 国際特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	出願国
	「該当無し」								

(6) 報道等

区分: ①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名等	掲載年	掲載月	掲載日	機関名	備考
①	キュウリ黄化えそ病に強いキュウリの育成が可能に！- キュウリ黄化えそ病抵抗性の育種素材の育成 -		2015	12	2		

(7) 普及に移しうる成果

区分:①普及に移されたもの、製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

区分	成果の名称	機関名	普及(製品化) 年月		主な利用場面	普及状況
③	ポスター賞(ナス単為結果性に関与する原因候補変異の探索)	農研機構野菜花き研究部門	2016	11		
③	若手農林水産研究者表彰(ナシとリンゴの省力栽培形質に関するDNAマーカーの開発)	農研機構果樹茶業研究部門	2017	10		

(8) 発表会の主催の状況

(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

整理番号	発表会の名称	年月日			開催場所	参加者数	機関名	備考
1	日本育種学会ワークショップ	2016	9	24	鳥取大学	100	農研機構野菜花き研究部門	
2	野菜花き課題別研究会「ウリ科野菜生産を取り巻く現状と今後の課題」(「黄化えそ病・退緑黄化病抵抗性育種研究の現状と展望」(発表者:杉山充啓)および「ウリ科野菜における選抜マーカー開発の現状と展望」(発表者:川頭洋一))	2016	10	25	アスト津(三重県津市)	219	農研機構 野菜花き研究部門	

(9)アウトリーチ活動の状況

当事業の研究課題におけるアウトリーチ活動の内容は以下のとおり。

区分； ①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、 ②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、
③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者数	主な参加者	機関名	備考
1	①	「果実研究と未来の食料生産シンポジウム2013」(主催:国立大学法人筑波大学)、「トマト単為結果性遺伝子pat-2の同定」(講演者:布目 司)	2013	12	2	筑波大学東京キャンパス文京校舎				
2	①	「果実研究と未来の食料生産シンポジウム2013」(主催:国立大学法人筑波大学)、「ナス単為結果性研究の現状と今後の展望」(講演者:宮武宏治)	2013	12	2	筑波大学東京キャンパス文京校舎				
3	①	園芸学会シンポジウム、園芸作物の多様性を生み出す転写因子遺伝子の機能解明とその利用「トマトの単為結果性を制御する転写因子」(講演者:布目 司)	2016	9	10	名城大学				
4	①	PCR法で植物のDNAの違いを調べてみよう	2017	7	1	岩手大学	10	高校生	岩手大学	
5	①	リンゴのカラムナー樹形を探る - 省力樹形化のメカニズムと育種利用-	2017	11	7	リジュール松山	70	公設試験研究機関、大学、国立研究開発法人、行政・普及組織、生産者	農研機構果樹茶業研究部門	
6	①	農研機構におけるブドウべと病抵抗性育種	2017	11	25	広島大学	60	学生、国公立研究所・大学所属研究者	第9回 中国地域育種談話会	