

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02176

研究課題名(和文) イネ科自家不和合性の二遺伝子座制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism controlling the two-locus self-incompatibility in grasses

研究代表者

掛田 克行 (Kakeda, Katsuyuki)

三重大学・生物資源学研究所・教授

研究者番号：50221867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：オオムギ野生種(*Hordeum bulbosum*)の花粉側S候補遺伝子(DUF247)の機能証明のため、アンチセンスオリゴ(as-oligo)DNAを用いたin vitro花粉バイオアッセイ法を検討した。S1ハプロタイプのas-oligo添加によりS1(自家)花粉管内での不和合性反応の打破が示唆されたが、再現性は確認できなかった。イネ科におけるSおよびZ遺伝子座シンテニー領域の解析から、当該領域にはそれぞれ2種類の異なるDUF247ホモログが密接に連鎖して座乗すること、それらは異なる4種類のクレードに分類されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

課題担当者により発見された、オオムギ野生種の雌蕊側S因子の同定に続き、本研究では、花粉側S遺伝子の同定、さらには新規な雌雄Z遺伝子候補の単離につながる成果が得られた。これらの研究成果は、アブラナ科、ナス科・バラ科、ケシ科等の双子葉植物で同定されてきた既知の自家不和合性遺伝子とは異なるユニークな自他認識因子の発見、さらにイネ科自家不和合性に特有の二遺伝子座制御メカニズムの解明につながる点で高い学術的意義がある。また作物の品種改良において、イネ科の自家不和合性種(ライムギ、ライグラス牧草類)の実際育種への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：An in vitro pollen bioassay using antisense oligo (as-oligo) DNA was investigated to prove the function of the pollen S candidate gene (DUF247) in a wild species of barley (*Hordeum bulbosum*). The addition of as-oligo to the S1-haplotype pollen was suggested to break the incompatibility reaction in the S1 (self) pollen tube, but reproducibility could not be confirmed. Analysis of the S and Z locus synteny regions in Poaceae indicated that two different DUF247 homologs are closely linked and locate in the corresponding regions, respectively, and that they are classified into four different clades.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：自家不和合性 イネ科 二遺伝子座制御 オオムギ野生種 自他認識

1. 研究開始当初の背景

自家不和合性(Self-incompatibility)は、自殖による内婚弱勢を回避するため、他個体の花粉との選択的受精により他殖を促進する被子植物特有の生殖機構である。この機構は、受粉時の雌ずいと花粉の間で起こる自己・非自己の認識反応に基づく。これまでの国内外の研究から、認識特異性を決定する遺伝子 (*S* 遺伝子) の解析が進み、分子レベルで3種類の異なる自家不和合性機構が発見されている。これらに共通の遺伝的特徴は、雌蕊側・花粉側それぞれの認識特異性を決定する遺伝子が密接に連鎖して1つの遺伝的ユニット (*S* ハプロタイプと呼ぶ) を構成し、それらの遺伝子多型が個体の多様な表現型を決定していることである。一方、自他認識の特異性決定因子 (*S* 遺伝子産物) は多様であり、アブラナ科では柱頭レセプター (SRK) と花粉リガンド (SP11/SCR)、ナス科・バラ科では雌蕊内のリボヌクレアゼ (*S*-RNase) と花粉管内の F-box タンパク質 (SLF/SFB)、ケシ科では柱頭リガンド (PrsS) と花粉の新規膜貫通タンパク質 (PrpS) が同定されている。こうした双子葉植物の単一 *S* 遺伝子座支配のシステムに加え、単子葉植物のイネ科・イチゴツナギ亜科 (ムギ類、エンバク、ライグラス等の牧草類が属する) においては、独立二遺伝子座 (*S* および *Z*) の複対立遺伝子支配による自家不和合性 (配偶体型) が見出されている。イネ科自家不和合性植物の交配においては、*S* と *Z* 双方の遺伝子型が雌雄で一致したときのみ不和合となる (図1 参照)。このことから、イネ科自家不和合性の自他認識反応は *S* 遺伝子と *Z* 遺伝子の相補的な相互作用によって起こると推定される。

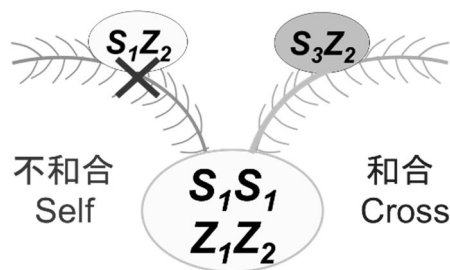


図1 イネ科植物の二遺伝子座自家不和合性

イネ科の *S* および *Z* 遺伝子座は、それぞれ染色体1および染色体2群 (ムギ類および牧草類) にマップされている。各遺伝子座には雌蕊側・花粉側の認識特異性を決定する遺伝子がセットで座乗し、計4種類の認識決定因子が存在すると予測される (図2 参照)。これらのうち、申請者はこれまでに、オオムギ野生種 (*Hordeum bulbosum*) を用いて、新規リガンド様分子をコードする雌蕊側 *S* 遺伝子

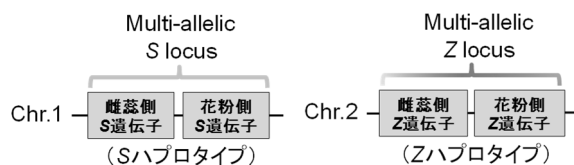


図2 *S* および *Z* 遺伝子座のハプロタイプ構成

(*HPS10* と命名) を同定している。さらに最近、ゲノム・トランスクリプトーム解析の結果を総合し、機能未知であるが膜タンパク質をコードすると予測される新規遺伝子 (以下、*DUF247* 遺伝子と記す) を、花粉側 *S* 遺伝子の有力候補として単離するに至っている。

2. 研究の目的

前項の研究背景に基づき、本研究は、「イネ科独自の二遺伝子座支配による自家不和合性が、いったいどのような認識因子を介して、いかなる自他認識機構によって成り立っているのか」を学術的「問い」とし、以下の2つの観点から、イネ科自家不和合性の自他認識過程における二遺伝子座制御メカニズムの解明を目指すこととした。

- (1) 雌蕊側 *S* 決定因子 (*HPS10*) に続き、花粉側 *S* 決定因子をコードする遺伝子を同定し、これらの雌雄 *S* 因子がイネ科共通の自家不和合性決定因子であることを明らかにする。
- (2) 現在未知の雌雄 *Z* 遺伝子を単離し、イネ科の自家不和合性に関与する4つの認識決定因子の全貌を明らかにする。

著者らによる、オオムギ野生種の雌蕊側 *S* 因子の同定は、イネ科自家不和合性研究の発展の端緒となる画期的な既往成果である。さらに本研究によって、花粉側 *S* 遺伝子の同定から雌雄 *Z* 遺伝子候補の単離を達成することで、アブラナ科、ナス科・バラ科、ケシ科に続く新たな自家不和合性システムの発見、従来未知の二遺伝子座制御機構の解明につながる事が期待される。

3. 研究の方法

(1) オオムギ野生種における花粉側 *S* 遺伝子候補の機能証明

雌蕊側 *S* 因子 (*HPS10*) の機能証明に用いた方法を応用し、花粉側 *S* 因子の機能証明法として以下の *in vitro* バイオアッセイ法を検討した (図3 参照)。花粉側 *S* 候補遺伝子 (*DUF247*) の推定アミノ酸配列 (ca. 530aa) には、*S* ハプロタイプ間で高度な配列多型が集中する領域があり、これらが花粉側の認識特異性を決定すると推測される。そこで、各ハプロタイプの多型領域の塩基配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド (20nt、以下 as-oligo) を合成して *in vitro* 花粉発芽培地に添加し、自家および他家花粉の発芽・管伸長に対する効果を調査した。本アッセイでは、花粉散布後の培地に自家雌蕊の浸出液を加えて *in vitro* 花粉に自家不和合性を誘起する。ここで、as-oligo に効果がなければ不和合性状態が維持され、花粉の発芽・管伸長は停止したままとなる。一方、自己ハプロタイプの as-oligo の存在下で花粉側 *S* 遺伝子の発現がブロックされ、花粉側 *S*

因子の供給がなくなれば、不和合性状態が打破され、花粉の発芽・管伸長が回復すると予測される(図3)。さらに花粉とは異なるハプロタイプ(和合性)の as-oligo には効果がなければ、候補遺伝子がハプロタイプ特異的な自己認識機能を有すると証明できる。こうした評価基準をもとに、花粉側 S 遺伝子の検証を行った。

(2) イネ科における S・Z 遺伝子座シンテニー領域の解析

2 つのイネ科自家不和合性種(ライムギおよびペレニアルライグラス)から単離した *HPS10* オルソログは、オオムギ野生種に匹敵する高度なハプロタイプ間多型性ならびに雌ずい(または小穂)特異的発現性を示し、イネ科共通の雌蕊側 S 遺伝子であることが支持されている。そこで花粉側 S 遺伝子候補(*DUF247*)についても、同様のオルソログ解析を行い、イネ科共通 S 因子としての検証を行った。オオムギ野生種(*H. bulbosum*)に近縁な自家和合性種であるオオムギ(*H. vulgare*)およびコムギ(*Triticum aestivum*)においては高精度な全ゲノム配列データベースの整備が進んでいる。そこで、これらのゲノム情報を用いて、S 遺伝子座とシンテニーを示す領域を同定し、これらのシンテニー領域におけるゲノム構造および雌雄 S 遺伝子オルソログの変異について解析した。イネ科の Z 遺伝子座は染色体 2 群の端部にマップされ、ライムギおよびペレニアルライグラスではかなり精密なマッピングがなされている。これらの Z 遺伝子座を挟み込む flanking マーカーの情報を用いて、コムギ(2A, 2B, 2D)の公開ゲノム配列上で、Z 遺伝子座相同領域の境界範囲内においてアノテーションされている CDS(予測遺伝子)配列を用いて候補遺伝子を探索した。

4. 研究成果

(1) オオムギ野生種における花粉側 S 遺伝子候補 *DUF247* の *in vitro* バイオアッセイ

in vitro バイオアッセイに利用可能な花粉は、開花期の圃場植物からしか採取できず、低温貯蔵もできない。このため、2018-2021年に渡り、毎春開花期にアッセイを繰り返した。*S₁* ハプロタイプ(*S₁-DUF247*)の as-oligo の添加によって、*S₁*(自家)花粉管内での不和合性反応の打破(図4における+♀区から+♀/+as-ODN区への増加)が示唆されたが、再現性を確認することはできなかった(図4参照)。また、as-oligo 処理後の *in vitro* 花粉・花粉管の qRT-PCR から、明確に標的遺伝子の発現抑制を示す結果は得られなかった。以上より、当該 *DUF247* 遺伝子がオオムギ野生種の花粉側 S 遺伝子であることを直接証明するデータは得られなかった。(2)で述べるように、イネ科の花粉側 S 遺伝子に 2 種類の *DUF* 遺伝子が関与する可能性を考慮すると、本アッセイとは異なる手法を再考する必要がある。

(2) イネ科における S・Z 遺伝子座シンテニー領域の解析

オオムギ野生種

から、新たに 4 つ目の花粉側 S 遺伝子候補アレル(*S₄-DUF247*)を単離し、S ハプロタイプ間での高度な配列多型性、S 遺伝子座との連鎖および葯・花粉での優先的発現を確認した。当該 *DUF247* オルソログについて、花粉の自己認識特異性に必要な高い配列多型性を有し、それらがイネ科内で種を超えたハプロタイプのグループを形成することから、当該遺伝子がイネ科共通の花粉側 S 遺伝子であることが示唆された。一方、これとは別のクレードに属し、Z 遺伝子座相同領域に座乗すると予測される *DUF247* ホモログ(*Z-DUF247*)が、Z 遺伝子座領域に対応するコムギの第 2 同

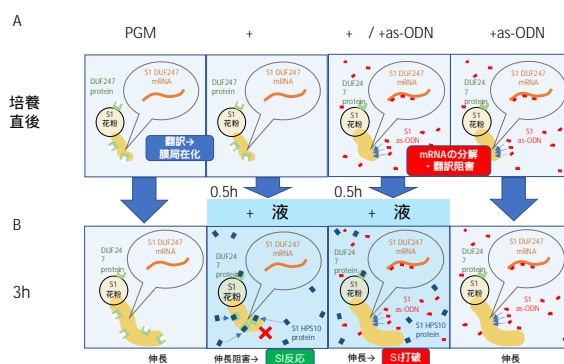


図3 *in vitro* バイオアッセイの模式図。花粉培養開始直後(A)および3時間後(B)

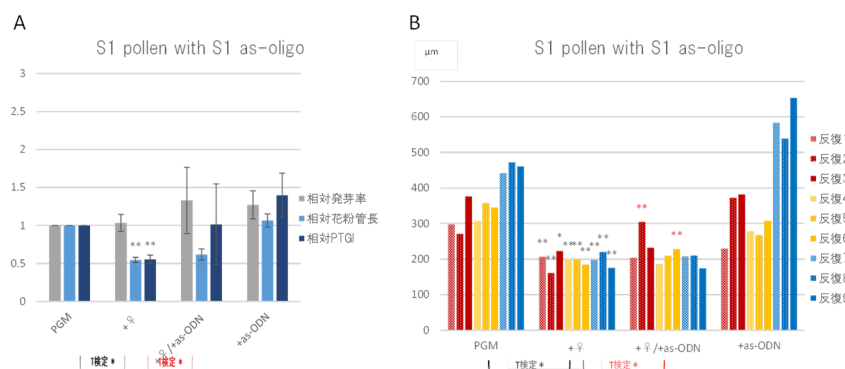


図4 *S₁*花粉に対する *S₁* as-oligo を用いた *in vitro* バイオアッセイの結果 (A) 花粉発芽率/花粉管長/PTGI(総花粉管長/総花粉数)の結果(9反復の平均値)。コントロール培地(PGM)に対する相対値を示す。(B) 各反復の平均花粉管長(絶対値) . ** ; p<0.01, * ; p<0.05

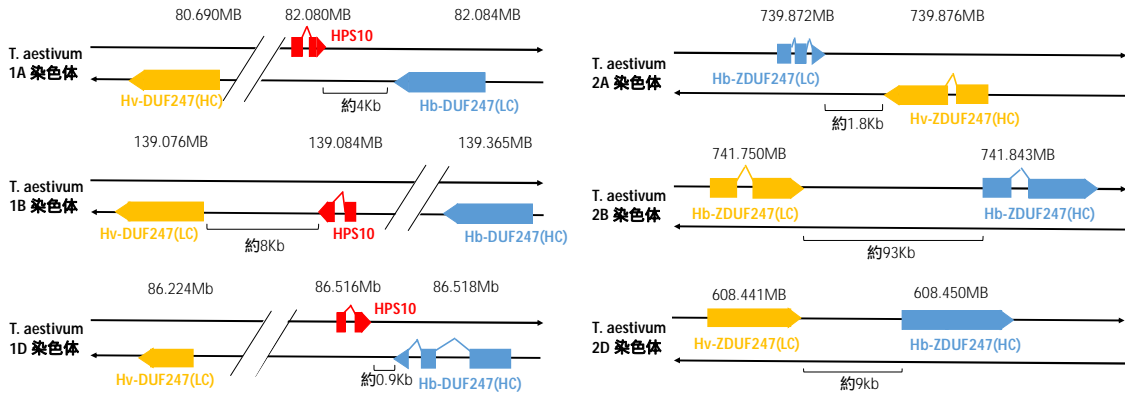


図5 3つのコムギ(*T. aestivum*)サブゲノム(A,B,D)のS遺伝子座(A)およびZ遺伝子座(B)相同領域におけるHPS10およびDUF247相同遺伝子の座乗位置。
 HC: High confidence gene, LC: Low confidence gene

祖群染色体長腕(2AL, 2BL, 2DL)に共通に存在することが新たに発見された(図5B)。さらに興味深いことに、コムギのSおよびZ遺伝子座相同領域において、それぞれ2種類の異なるDUF247ホモログが密接に連鎖して座乗することが見出された(図5A,B)。他のイネ科植物を含むDUF247ホモログの系統解析によって、それらはSHb(本研究の花粉側S遺伝子候補DUF247を含む)、SHV、ZHb、ZHVの4種類のクレードに分類されることが示された(図6)。

最近 *Oryza* 属の自家不和合性種 *O. longistaminata* のゲノム塩基配列解析により、DUF247 遺伝子(図6のSHb)と緊密に連鎖する、もう一つのDUF247ホモログ(図6のSHv)が、新たな花粉側S遺伝子候補として提唱された(文献)。オオムギ野生種においても、当該DUF247ホモログの存在を確認しているが、Sハプロタイプ特異的な配列多型性や花粉発現特異性は調査途中にあり、イネ科の花粉側S決定因子に2個の遺伝子が関与するという新たな仮説の検証は今後の課題である。さらに2022年に入り、Z遺伝子座ゲノム領域に、S遺伝子座上の雌蕊側・花粉側遺伝子(HPS10・DUF247遺伝子)と相同性を有する遺伝子のセットが座乗することが、*Lolium* 属を含む複数のイネ科植物種で示された(文献)。このZ遺伝子座に関する新知見はゲノム配列データのみに基づく情報であり、オオムギ野生種ではまだ検証されていない。今後、これらの新情報に基づく、オオムギ野生種を含むイネ科Z遺伝子候補の解析と機能検証が重要な継続課題である。

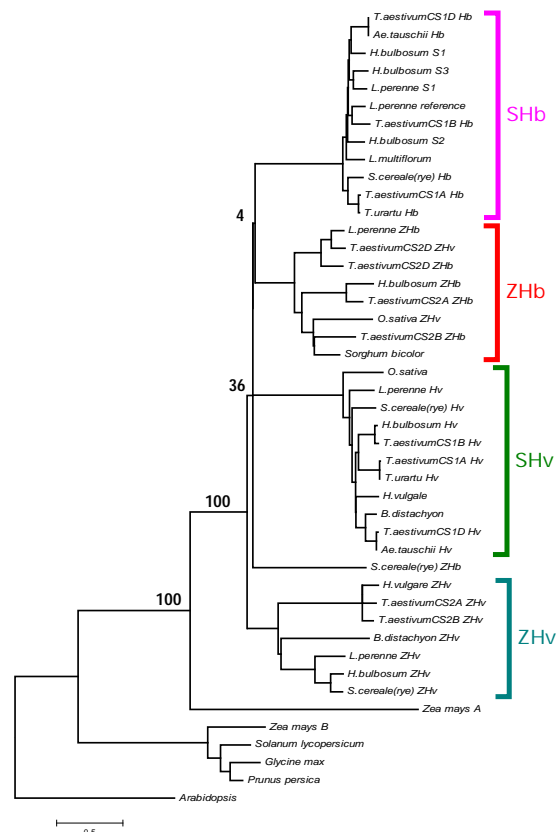


図6 DUF247アミノ酸配列を用いた系統樹(ML法) 数値はブートストラップ値(100回試行)

< 引用文献 >

Lian X, Zhang S, Huang G, Huang L, Zhang J, Hu F (2021) Confirmation of a Gametophytic Self-Incompatibility in *Oryza longistaminata*. *Front Plant Sci.* 2021 12: 576340

Herridge R, McCourt T, Jacobs JME, Mace P, Brownfield L, Macknight R (2022) Identification of the genes at S and Z reveals the molecular basis and evolution of grass self-incompatibility. *Front. Plant Sci.* 13: 1011299.

Rohner M, Manzanares C, Yates S, Thorogood D, Copetti D, Lübberstedt T, Asp T, Studer B (2023) Fine-Mapping and Comparative Genomic Analysis Reveal the Gene Composition at the S and Z Self-incompatibility Loci in Grasses. *Mol Biol Evol.* 40: msac259

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang Ning, Kakeda Katsuyuki, Tomokazu Masahiro, Liu Cheng, Yoshida Megumi, Kawada Naoyuki, Komatsuda Takao	4. 巻 134
2. 論文標題 A novel mutant allele at the Cleistogamy 1 locus in barley	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 3183 ~ 3193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00122-021-03884-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 掛田 克行, 榎部 七海, Agetha Nanape
2. 発表標題 オオムギ開花性変異遺伝子cly1.b4の遺伝解析
3. 学会等名 日本育種学会 第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Nanape, C. Nakashima, K. Kakeda
2. 発表標題 Characterization of floral/spike traits in the wheat AP2 mutants with reference to FHB resistance
3. 学会等名 第16回ムギ類研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Agetha Nanape, Katsuyuki Kakeda
2. 発表標題 Pleiotropic effects of mutation at the miR172 target site in the wheat orthologs of Cly1
3. 学会等名 日本育種学会第141回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nanape Agetha Bigie, 掛田 克行
2. 発表標題 コムギ AP2 変異体の鱗被における 2,4-D 反応性および維管束形成レベルの比較
3. 学会等名 育種学会中部地区談話会第29回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 掛田 克行, 加藤 謙司, 櫛部 七海, Nanape Agetha, 富士原 悠里, 渡邊 聖証, 小松田 隆夫, 佐藤 和広
2. 発表標題 閉花性オオムギから誘発された新規開花性突然変異体
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Nanape, K. Kakeda
2. 発表標題 Evaluation of the effect of mutations in the wheat AP2 homoeologs on cleistogamous flowering using near-isogenic lines
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nanape A., Watanabe K., Haine H., Kakeda K.
2. 発表標題 Accumulation effects of mutant alleles of AP2 homoeologs on cleistogamous flowering in hexaploid wheat
3. 学会等名 ムギ類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nanape A., Watanabe K., Haine H.M., Kakeda K.
2. 発表標題 Accumulation effects of mutations in the wheat AP2 homoeologs on cleistogamous flowering
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Kakeda
2. 発表標題 An open-flowering mutant obtained from the cleistogamous cultivar in barley
3. 学会等名 2nd International Barley Mutants Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 掛田 克行, 長谷川 大起, 榑原 莉子, 井上 彩音, 三科 興平, 小松田 隆夫
2. 発表標題 オオムギ近縁自家不和合性種における花粉側S遺伝子候補の単離と解析
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷昌博, 藤井俊成, 井田千尋, 掛田克行
2. 発表標題 オオムギ野生種の自家不和合性(S)因子の同定に向けたin vitro 花粉バイオアッセイ法の検討
3. 学会等名 ムギ類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 掛田 克行, 渡邊 聖証, Hlaing Moe Haine
2. 発表標題 コムギの開花・閉花性に対するAP2同祖遺伝子変異の集積効果
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大野 陽子 (Oono Youko) (00546369)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究部門・主任研究員 (82111)	2021.4より
研究分担者	小松田 隆夫 (Komatsuda Takao) (60370657)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター・主席研究員 (82111)	2021.3まで(中国の研究機関へ転出)

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------