

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02177

研究課題名(和文) ソバの自家不和合性を打破する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism for breaking down self-incompatibility in buckwheat

研究代表者

安井 康夫 (Yasui, Yasuo)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：70293917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではソバの自殖を可能とするために、二花柱性遺伝子の分子メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、機能欠損型のS-ELF3(S-ELF3-PS1)を開発することにより、S-ELF3がソバの雌蕊の花柱の長さや自家不和合性の両方を制御していることを証明した。また、S-ELF3の制御下で機能すると考えられるFePG1の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題ではS-ELF3-PS1を開発し、ソバの自殖化を可能とした。また自殖性ソバを利用して、chromosomal pseudo-molecules (CPMs)の作成に成功した。これまでにソバではCPMsは作成されておらず、本課題だけでなく今後のソバ育種の貴重なツールとなる。さらに本課題で開発したTILLING集団はS遺伝子以外にももちろん利用可能である。本課題によってソバの遺伝育種学を大きく前進させることができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this project, we tried to elucidate the molecular mechanism of the heterostylous self-incompatibility gene to enable self-fertilization of buckwheat. By developing a functionally deficient allele of S-ELF3 (S-ELF3-PS1), we have demonstrated that S-ELF3 regulates both style length and self-incompatibility of pistils in buckwheat. We also succeeded in identifying FePG1, which is considered to function under the control of S-ELF3.

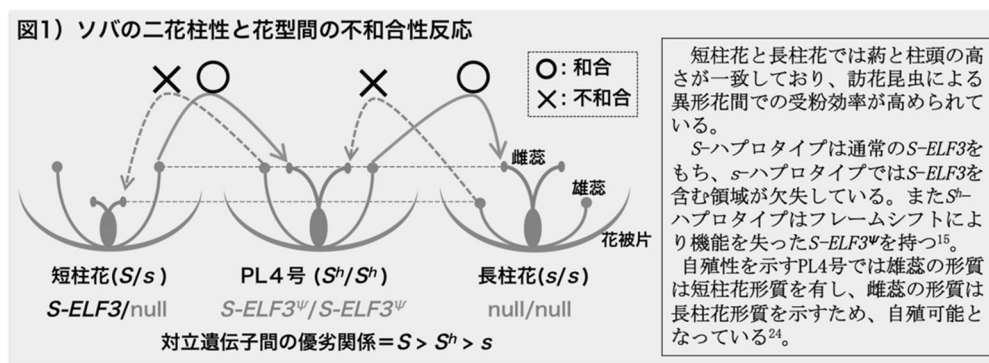
研究分野：植物遺伝学

キーワード：ソバ ゲノム解読 S-ELF3 FePG1 二花柱性 自家不和合性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

高等生物のゲノムには組換えが極端に抑制されている領域が存在する。そこでは、複数の異なる形質を支配する遺伝子群が1つの遺伝子クラスター (supergene) を形成することが可能となり、特定の形質の組み合わせのみが複合適応形質として集団内および種内で観察される。例えば被子植物の二花柱性では自家不和合性および雄蕊・雌蕊の長さを支配する連鎖遺伝子群が SELF-INCOMPATIBILITY locus supergene (*S*-supergene) を形成し、他殖の高効率化に成功している。図1に示すように二花柱性植物では種内に「雌蕊が短く雄蕊の長い花型 (短柱花)」を持つ個体と「雌蕊が長く雄蕊の短い花型 (長柱花)」をもつ個体が存在しており、短柱花と長柱花間ではお互いの葯と柱頭の高さが一致するため、訪花昆虫を介した交配和合間での受粉効率が高められている。



ソバの *S*-supergene には2つの対立遺伝子、*S* (もしくは *S*-ハプロタイプ) および *s* (もしくは *s*-ハプロタイプ) が存在し、短柱花個体の遺伝子型は *S/s*、長柱花個体の遺伝子型は *s/s* である。我々は世界に先駆けて *S*-supergene の構成因子の一つと考えられる転写因子様遺伝子 (*S-LOCUS EARLY FLOWERING 3*, *S-ELF3*) の同定に成功し¹、さらにソバのゲノム解読の結果から 5Mbp 程度の *S*-ハプロタイプ特異的領域の存在を明らかにした²。

一般に他殖性植物では種内に遺伝的変異を保持しやすく、環境の変化に適応的である。しかし、農業生産者の現場では管理・育成に適した均一な農業特性をもつ自殖性作物が求められる。特に他殖性ソバでは稔実に訪花昆虫が必要なことから収量が不安定になり自殖性品種が求められている。また品種育成の現場において、他殖性ソバでは有用形質の固定に多くの時間が必要となり、自家不和合性の打破が求められている。我々は自殖性ソバ品種の作出を進めてきており³、この過程で自殖性を可能とする *Sh*-ハプロタイプを発見し⁴、さらに *S*-supergene の下流で自己・非自己認識を制御する遺伝子 (*SELF-INCOMPATIBILITY MODIFIER*; *S-MOD*) の存在を明らかにした⁵。

2. 研究の目的

本課題では以下の3点を目的とした。

- (1) ソバにおいて複雑な二花柱性の制御機構に関わる遺伝子群の同定を可能とし、ソバの8本の染色体を反映した塩基配列 (chromosomal pseudo-molecules, CPMs) を整備し、さらに誘導突然変異を保持した Targeting Induced Local Lesions in Genomes (TILLING) 集団を整備する。
- (2) *Sh*-ハプロタイプによる自殖性機構の解明を目的とし、*S*-supergene の3つのハプロタイプの塩基配列を比較し、自殖性候補遺伝子をスクリーニングし、最終的に TILLING 集団を用いて *Sh*-ハプロタイプに座乗する自殖性遺伝子を同定する。
- (3) *S-MOD* 遺伝子の機能解明を目的とし、マッピング集団、CPMs および TILLING 集団を用いて自家不和合性を打破する *S-MOD* 遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) Chromosomal pseudomolecules の構築と新規ゲノム解読

NRGene 社が開発した denovoMAGIC 3 を用いてスキャフォールドを作成し、これを連鎖地図上にアンカーすることにより、CPMs を構築した。CPMs 作成には自殖性ソバ系統である PL4 を利用し、連鎖地図の作成には PL4 とボタンソバの交配後代から得られた 111 個体の F_2 個体を利用した。また、Pacific Biosciences 社の Sequel II シーケンサーを利用したロングリードシーケンスを実施し、スキャフォールドのアンカー時のリファレンスとして利用した。また、denovo MAGIC3 を用いて他殖性ソバ個体 (短柱花個体、遺伝子型 *Ss*) の *S*-ハプロタイプを含む長鎖スキャフォールド (*S*-スキャフォールド) を得た。*S*-スキャフォールドと自殖性ソバ PL4 の CPMs を用いて、*S* 遺伝子座周辺の遺伝子とゲノム構造を比較した。またすでに作成していた重イオンビーム照射による *S*-ハプロタイプ欠失変異体の全ゲノム配列 (WGS)

を S-スカフォールドにマップし、S-スカフォールド上での S 遺伝子の座乗位置を絞り込んだ。

(2) NGS-TILLING を可能とする変異誘導集団の作成

EMS を他殖性ソバ (春のいぶき) の種子に処理し、M₁ および M₂ 世代を育成した。最終的に 3,456 個体の M₂ 個体から DNA 抽出と採種を実施した。抽出した DNA を用いて NGS-TILLING を実施し、標的遺伝子である *S-ELF3* および *FePG1* の変異体をスクリーニングした。

(3) *FePG1* 遺伝子のマッピングと発現解析

二次元電気泳動を利用して、短柱花個体の雌蕊に特異的に発現しているタンパク質をスクリーニングし、*S-MOD* 遺伝子の候補と考えられる *FePG1* 遺伝子を同定した。また *FePG1* 遺伝子の染色体上での座乗位置を確認し、転写解析を行った。

4. 研究成果

(1) Chromosomal pseudomolecules の構築と新規ゲノム解読

111 個体からなる F₂ 集団を用い、295 個の Ampliseq マーカーで遺伝子型決定をおこない、また花型 (自家不和合性) の表現型を決定した。この結果、染色体数と同じ 8 本の連鎖地図の作成に成功した。この連鎖地図に denovoMAGC3 により得られた 67 本のスカフォールドをアンカーし、8 本の CPMs を構築した (図 2)。CPMs の累積長は、未確認の塩基数 (N) を除いて 1.21Gb となり、PL4 ゲノムの 96% をカバーすることができた。

また新規ゲノム解読として、denovoMAGC3 を用いて他殖性ソバ個体 (短柱花個体、遺伝子型 Ss) の長鎖スカフォールドを得た。PL4 の CPMs と短柱花個体の長鎖スカフォールドの比較から、PL4 の持つ *Sh* 遺伝子は短柱花個体のもつ *S-supergene* とは異なる染色体に座乗していることがわかった。これまで、*Sh* 遺伝子は *S-supergene* の 1 つのハプロタイプであると考えられてきたが、その仮説を覆す新発見となった。次にこれまでに得られていた重イオンビームによって誘導された *S-supergene* 欠失個体の全ゲノム配列 (WGS) を短柱花個体にマッピングし、*S-supergene* を 2 Mb の領域に絞り込むことができた。本領域には *S-ELF3* 以外にアノテーションがつく構造遺伝子は存在しなかった。

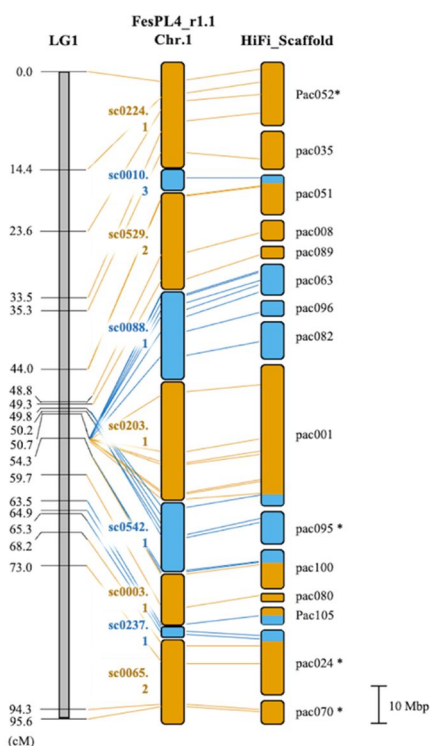


図 2 本課題で作成された chromosomal pseudo-molecule (CPM) の一例 (第 1 染色体) 左側は連鎖地図、中央が CPM、右側が PacBio の HiFi リードによるスカフォールド。

(2) NGS-TILLING を可能とする変異誘導集団の作成

NGS-TILLING によって、約 3,000 個体の M₂ 集団を対象とした機能欠損型の *S-ELF3* 遺伝子のスクリーニングを行った。この結果、エクソン/イントロンのジャンクション部に突然変異を持つ *S-ELF3* 遺伝子を発見し、*S-ELF3-PS1* と名付けた。*S-ELF3-PS1* イントロンは正常にスプライシングされないため、遺伝子の機能が損なわれていると考えられた。そして、*S-ELF3-PS1* 変異遺伝子と s-対立遺伝子をヘテロに持つ個体、および *S-ELF3-PS1* をホモで持つ個体に着花する花では、雄蕊と雌蕊がともに長くなり、なおかつ自殖した。このことから、*S-ELF3* 遺伝子は雌蕊の長さや雌蕊側の自家不和合性の両方を制御していることが分かった。

(3) *FePG1* 遺伝子の同定、マッピングおよび発現解析

二次元電気泳動を用いて、短柱花の雌蕊で発現しているが長柱花の雌蕊では発現していないタンパク質を同定した。このタンパク質をコードする遺伝子はポリガラクトナーゼと相同性の高い配列を有しており、*FePG1* と名付けた。雄蕊と雌蕊がともに短く自殖可能な Pennline 10 系統の雌蕊でも *FePG1* は発現しており、*FePG1* の発現により雌蕊の長さや自家不和合性が制御されていると推定できた。また、連鎖解析から、*FePG1* は *Sh* 遺伝子座とは連鎖しておらず、さらに S-スカフォールドにも存在しなかった。このことから、*FePG1* は *S-supergene* の下流で自己・非自己認識を制御する *S-MOD* 遺伝子の 1 つであると考えられた。残念ながら TILLING による変異スクリーニングでは機能を欠損させる変異を検出することはできなかった。現在、変異集団を拡充しており、今後機能欠損方の *FePG1* 変異遺伝子を検出し、その機能を確認する予定である。

(4)総括

本課題ではソバの自殖を可能とするために、二花柱性遺伝子の分子メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、機能欠損型の *S-ELF3(S-ELF3-PS1)*を開発することにより、*S-ELF3*がソバの二花柱性の自家不和合性と雌蕊の長さの両方を同時に制御していることを証明した。*S-ELF3-PS1*を有するソバは自殖可能となるため、その育種学的価値は非常に高いと考えている（特許出願中）。また、*S-ELF3*の制御下で機能すると考えられる *FePG1*の同定にも成功した。今後、二花柱性の分子機構をより深く理解するため、*FePG1*の変異体の作成が重要であると考えている。

また本課題では自殖性ソバを利用して、CPMsの作成に成功した。これまでにソバではCPMsは開発されておらず、本課題だけでなく今後のソバ育種の貴重なツールとなる。さらに本課題で開発した TILLING 集団は *S* 遺伝子以外にももちろん利用可能であり、すでに本集団を利用してソバにモチ性を付与すると考えられる *GBSS* 遺伝子変異体の作成にも成功している（特許出願中）。本課題によってソバの遺伝育種学を大きく前進させることができたと考えている。

<引用文献>

- (1) Yasui Y, Mori M, Aii J, Abe T, Matsumoto D, Sato S, Hayashi Y, Ohnishi O, Ota T (2012) *S-LOCUS EARLY FLOWERING 3* is exclusively present in the genomes of short-styled buckwheat plants that exhibit heteromorphic self-Incompatibility. *PLoS One* 7: e31264.
- (2) Yasui Y, Hirakawa H, Ueno M, Matsui K, Katsube-Tanaka T, Yang SJ, Aii J, Sato S, Mori M (2016) Assembly of the draft genome of buckwheat and its applications in identifying agronomically useful genes. *DNA Res* 23:215-224.
- (3) 松井勝弘、手塚隆久、原貴洋、森下敏和：自殖性のソバ品種「そば中間母本農1号」の育成とその特性。九州沖縄農業研究センター報告 49, 11-17, 2008.
- (4) Matsui K, Tetsuka T, Nishio T, Hara T (2003) Heteromorphic incompatibility retained self-compatible plants produced by a cross between common and wild buckwheat. *New Phytol* 159:701-708
- (5) Matsui K, Nishio T, Tetsuka T (2004) Genes outside the *S* supergene suppress *S* functions in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Annal Bot* 94: 805-809.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Takeshima Ryoma, Nishio Takeshi, Komatsu Setsuko, Kurauchi Nobuyuki, Matsui Katsuhiko	4. 巻 123
2. 論文標題 Identification of a gene encoding polygalacturonase expressed specifically in short styles in distylous common buckwheat (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heredity	6. 最初と最後の頁 492 ~ 502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41437-019-0227-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mizuno Nobuyuki, Toyoshima Masami, Fujita Miki, Fukuda Shota, Kobayashi Yasufumi, Ueno Mariko, Tanaka Kojiro, Tanaka Tsutomu, Nishihara Eiji, Mizukoshi Hiroharu, Yasui Yasuo, Fujita Yasunari	4. 巻 27
2. 論文標題 The genotype-dependent phenotypic landscape of quinoa in salt tolerance and key growth traits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 dsaa022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsaa022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takeshima Ryoma, Ogiso-Tanaka Eri, Yasui Yasuo, Matsui Katsuhiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Targeted amplicon sequencing + next-generation sequencing-based bulked segregant analysis identified genetic loci associated with preharvest sprouting tolerance in common buckwheat (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Plant Biology	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12870-020-02790-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsui Katsuhiko, Mizuno Nobuyuki, Ueno Mariko, Takeshima Ryoma, Yasui Yasuo	4. 巻 70
2. 論文標題 Development of co-dominant markers linked to a hemizygous region that is related to the self-compatibility locus (<i>sc</i>) in buckwheat (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 112 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuo Yasui	4. 巻 70
2. 論文標題 History of the progressive development of genetic marker systems for common buckwheat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 13-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katsuhiko Matsui, Yasuo Yasui	4. 巻 70
2. 論文標題 Buckwheat heteromorphic self-incompatibility: genetics, genomics and application to breeding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 32-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Nobuyuki, Yasui Yasuo	4. 巻 19
2. 論文標題 Gene flow signature in the S-allele region of cultivated buckwheat	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Plant Biology	6. 最初と最後の頁 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12870-019-1730-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsui Katsuhiko, Yasui Yasuo	4. 巻 133
2. 論文標題 Genetic and genomic research for the development of an efficient breeding system in heterostylous self-incompatible common buckwheat (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 1641 ~ 1653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00122-020-03572-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasuo Yasui
2. 発表標題 High genetic diversity within cultivated common buckwheat: implication of introgression from wild common buckwheat in China
3. 学会等名 2019年第1回西南四省（自治区）遺伝学学会連合会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田竜也, 相井城太郎, 上野まりこ, 大澤良, 齊藤大樹, 齊藤大樹, 白澤健太, 竹島亮馬, 中崎鉄也, 西村和紗, 原尚資, 原尚資, 平川英樹, FAWCETT J, 松井勝弘, 水野信之, 安井康夫
2. 発表標題 ソバにおける異型花型自家不和合性遺伝子座のゲノム解析
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 FAWCETT Jeffrey, 上野まりこ, 大澤良, 大田竜也, 齊藤大樹, 齊藤大樹, 白澤健太, 竹島亮馬, 中崎鉄也, 西村和紗, 原尚資, 原尚資, 平川英樹, 松井勝弘, 水野信之, 安井康夫
2. 発表標題 ソバ属植物におけるゲノムの進化
3. 学会等名 日本遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Yasui, N. Mizuno, J. Aii and T. Ota
2. 発表標題 Identification of genes at the S-locus controlling heteromorphic self-incompatibility in buckwheat through genetic and genomic analyses
3. 学会等名 The Society for Molecular Biology & Evolution (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安井康夫
2. 発表標題 研究者単位でのリファレンスゲノムの時代へ –DeNovoMAGIC を用いたソバのリファレンス配列の作成とその利用について–
3. 学会等名 アグリゲノム産業研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田竜也, 相井城太郎, 上野まりこ, 大澤良, 齊藤大樹, 白澤健太, 竹島亮馬, 中崎鉄也, 西村和紗, 原尚資, 平川英樹, FAWCETT J, 松井勝弘, 水野信之, 安井康夫
2. 発表標題 ソバにおける異型花型自家不和合性遺伝子座のゲノム解析
3. 学会等名 育種学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 FAWCETT Jeffrey, 上野まりこ, 大澤良, 大田竜也, 齊藤大樹, 白澤健太, 竹島亮馬, 中崎鉄也, 西村和紗, 原尚資, 平川英樹, 松井勝弘, 水野信之, 安井康夫
2. 発表標題 ソバ属植物におけるゲノムの進化
3. 学会等名 日本遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹島亮馬, 小木首映里, 安井康夫, 松井勝弘
2. 発表標題 普通ソバにおけるAmpliSeqを利用した効率的な遺伝解析
3. 学会等名 育種学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ソバの自殖を可能とするS-ELF3-PS1遺伝子の開発	発明者 安井康夫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-026492	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 機能欠損型顆粒性澱粉合成酵素遺伝子及びこれを利用したソバ属植物	発明者 安井康夫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-026491	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	松井 勝弘 (Matsui Katsuhiro) (30343974)	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・上級研究員 (82111)	
研究分担者	中崎 鉄也 (Nakazaki Tetsuya) (60217693)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	平川 英樹 (Hirakawa Hideki) (80372746)	公益財団法人かずさDNA研究所・ゲノム情報解析施設・施設長 (82508)	

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
---------	---------