

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05573

研究課題名(和文) サツマイモの効率的な交配育種のための基盤整備

研究課題名(英文) Infrastructure development for efficient crossbreeding of sweetpotato

研究代表者

土屋 亨 (Tsuchiya, Tohru)

三重大学・研究基盤推進機構・准教授

研究者番号：30293806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： サツマイモ栽培種は交配不和合性を有しており、同一の交配不和合群に属する個体間では交配を行えないため、多種多様なサツマイモ栽培種を用いた効率的な交配育種が妨げられている。この交配不和合性の原因となっている自家不和合性の自他認識に関わるタンパク質をコードする遺伝子(S遺伝子)を、種々のヒルガオ科植物から単離・同定を試みた。

種々のヒルガオ科植物の自家不和合性遺伝子座(S遺伝子座)に共通して座乗している遺伝子として、雄側のS遺伝子であるAB2と雌側のS遺伝子であるSEAが同定され、これらがヒルガオ科植物の自家(交配)不和合性において、直接的に自他認識に関与する遺伝子であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、自家(交配)不和合性を示すヒルガオ科植物において、自他認識に直接的に関与するS遺伝子産物をコードするS遺伝子(AB2：雄側、SEA：雌側)を人為的に操作することにより、交配育種の効率を高めることができる可能性が示唆された。形質転換により自家(交配)不和合性の形質を変化させる場合はカルタヘナ法の元での管理が必要であるため、今後はin plantaでのゲノム編集が可能となるかその可能性を模索し、実用に供する予定である。

研究成果の概要(英文)： Sweetpotato cultivars are incompatible with each other and cannot be crossed between individuals belonging to the same incompatibility group, thus preventing efficient crossbreeding among a wide variety of sweetpotato cultivars. We attempted to isolate and identify the gene encoding the protein involved in self-recognition of self-incompatibility (S gene), which is the cause of this mating incompatibility, from various Ipomoea plants.

AB2, a male S gene, and SEA, a female S gene, were identified as common loci at the self-incompatibility locus (S locus) in various Ipomoea plants, indicating that these genes are directly involved in self and other recognition in the self- (hybrid) incompatibility of Ipomoea plants. The results showed that these genes are directly involved in self-recognition in the self (mating) incompatibility of Ipomoea plants.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：ヒルガオ科 サツマイモ 交配育種 自家不和合性 交配不和合性

1. 研究開始当初の背景

(1) 自家不和合性は多くの植物種で認められる、自殖を防ぎ他殖を促進して集団内の遺伝的多様性を維持するメカニズムであるが、その反面、効率的な交配育種を妨げる要因でもある。自家不和合性は、同形花型、異形花型、遅延作用型、潜在型の4種に大別されるが、分子生物学的研究は、同形花型自家不和合性に属し、配偶体型自家不和合性を示すナス科、バラ科、ケシ科、イネ科の植物種、胞子体型自家不和合性を示すアブラナ科の植物種で解析が進んでいる。

同じ型の自家不和合性を示す植物種においても異なる因子が作用していることが知られているが、自家不和合性の自他認識因子遺伝子 (*S* 遺伝子、または *S/Z* 遺伝子) を座乗する *S* (または *S/Z*) 遺伝子座が存在していることに変わりはない。

(2) サツマイモ栽培種を含むヒルガオ科植物は、アブラナ科と同様の胞子体型自家不和合性を示し、ゲノム中に1コピー存在する *S* 遺伝子座により制御されている。研究代表者らのこれまでの研究では、ヒルガオ科植物に属するメキシコアサガオ (*Ipomoea trifida*) の *S* 遺伝子座の単離・同定した。アブラナ科植物の雄側の *S* 遺伝子は *SP11/SCR* であり雌側の *S* 遺伝子が *SRK* であるが、*I.trifida* の *S* 遺伝子座上には、これら遺伝子のホモログは存在せず、ヒルガオ科独自の *S* 遺伝子が利用されていることが示された。

2. 研究の目的

(1) 本研究において、これまでヒルガオ科の *I.trifida* での研究で蓄積してきた自家不和合性遺伝子に関する成果を元に、ヒルガオ科に属する様々な植物種の *S* 遺伝子座 (自家不和合性植物種に関しては *S* 遺伝子座相当領域) の解析を行うことで、ヒルガオ科植物に共通な *S* 遺伝子を同定することを目的として研究に着手した。

(2) これまでに同定した *S* 遺伝子の有力候補の遺伝子が真の *S* 遺伝子であることを証明するために、*S* 遺伝子を導入した形質転換植物を作出して検討することを試みると共に、*I.trifida* と交配可能なサツマイモ栽培種 (*I.batatas*) の *S* 候補遺伝子から *S* 遺伝子を選抜することを試みた。

3. 研究の方法

(1) *S* 候補遺伝子を導入した形質転換体による *S* 遺伝子の証明 :

これまでに同定された *I.trifida* の *S* 候補遺伝子の中から真の *S* 遺伝子を決定するために、*S₁-S* 候補遺伝子である *S₁-AB2*, *S₁-SE2*, *S₁-SEA* の約 2kbp のプロモーター領域、約 1.5kbp のターミネーター領域を含む構造遺伝子を PCR により増幅し、バイナリーベクター上に導入した後に *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 に導入し、既報[1]に基づき *I.trifida* の *Sc* ホモ型系統 (自家不和合性突然変異系統) から誘導した胚性カルスに導入し、再分化個体を得た。

(2) 自家不和合性および自家不和合性のヒルガオ科植物の *S* 遺伝子座の比較解析 :

これまでに得られている *I.trifida* の *S₁*, *S₁₀-S* 遺伝子座の配列に加え、新たに自家不和合性系統の *S₂₉*, *S₃-S* 遺伝子座、自家不和合性系統の *Sc-S* 遺伝子座の領域を単離し、リシークエンスにより各 *S* 遺伝子座の配列を明らかにした (一部にギャップあり)。これらに加え、アサガオ (*I.nil*) [2]、ホシアサガオ (*I.triloba*) [3] などのゲノム配列から *S* 遺伝子座領域の外側に位置する両端のマーカー遺伝子 (*AAM68*, *AB3*) [4] 間の配列を抽出し、ORF・遺伝子の同定を行い比較検討した。

(3) サツマイモ栽培種の *S* 遺伝子の同定 :

サツマイモ栽培種 (*I.batatas*) の開花 2 週間前の葯から total RNA を抽出して poly(A) RNA に精製した後に、次世代シーケンサー (NGS : Illumina HiSeq) により RNA-seq を行った。得られたリードを元に Blast データベースを構築し、*I.trifida* の *AB2* (*S* 候補遺

伝子) および *AB3* (非 *S* 候補遺伝子) の 5'末端領域と相同性のある配列を抽出した。抽出されたリードをアラインメントにかけ、その 3'末端領域 50nt を使用して再度 Blast データベースに対して検索を行うことを繰り返し、各サツマイモ栽培種の開花 2 週間前の葯で発現する *AB2* 遺伝子を抽出した。得られた *AB2* 遺伝子の配列から各遺伝子がコードするタンパク質配列を推定し、*I. trifida* の *AB2* 配列との比較検討を行った。

(4) 高次倍数体 *I. trifida* のゲノム配列の解析：

I. trifida は 2 倍体、3 倍体、4 倍体、6 倍体の植物種から構成される複合群であることが知られている。元来、6 倍体の *I. trifida* から *I. batatas* が派生したという説がある[5]が、近年の研究により *I. batatas* は *I. trifida* (自家不和合性) と *I. triloba* (自家和合性) のゲノムを有することが指摘されている[6]。そこで、*I. trifida* 複合群内の植物のゲノム配列を解析してそれぞれの持つ *S* 遺伝子を調査し、*I. trifida* 複合群内に *I. triloba* のゲノムが導入されているか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) *S* 候補遺伝子を導入した形質転換体の作出

*S*₁ ホモ型系統の *S*₁-*S* 候補遺伝子である *S*₁-*AB2*, *S*₁-*SE2*, *S*₁-*SEA* の遺伝子を PCR で増幅 (図 1) し、アグロバクテリウムを介して *I. trifida* の *Sc* ホモ型系統 (Mx2-18 self) に導入した。

しかし形質転換個体は複数獲得できたものの、カルス誘導～感染 (遺伝子導入)～選抜～再分化に至る過程が 12 ヶ月程度と長期に渡ったためか、得られた再分化個体が雄性不稔となり、結果的に交配による真の *S* 遺伝子の決定には至らなかった。現在、*I. trifida* の迅速な形質転換系の作出を行っているとともに、*I. trifida* 以外の植物種を利用した *S* 遺伝子決定を進めている。

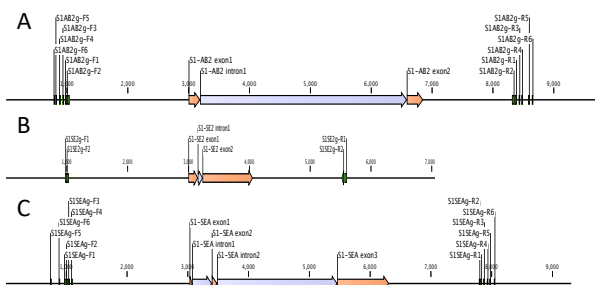


図 1. PCR 増幅した *S*₁-*S* 候補遺伝子の構造
A: *S*₁-*AB2*, B: *S*₁-*SE2*, C: *S*₁-*SEA*. 両端の矢印は PCR プライマー、中央の橙色矢印はエクソン、青色矢印はイントロンを示す。

(2) 自家不和合性および自家和合性のヒルガオ科植物の *S* 遺伝子座の比較解析

研究代表者らが以前解析した *I. trifida* の *S*₁-, *S*₁₀-*S* 遺伝子座の配列に加え、新たに自家不和合性系統の *S*₂₉-, *S*₃-*S* 遺伝子座、自家和合性系統の *Sc*-*S* 遺伝子座の領域を解析し、更に報告されているアサガオ (*I. nil*) やホシアサガオ (*I. triloba*) などのヒルガオ科植物の *S* 遺伝子座相当領域を抽出し比較検討を行った (図 2)。

その結果、*I. trifida* の *S* 遺伝子座の解析から推定された *S* 候補遺伝子のうち、雄側の *AB2*、雌側の *SE2*, *SEA* はヒルガオ科植物の自家和合性系統の *S* 遺伝子座相当領域には存在せず、いずれも偽遺伝子となっており、更に、自家和合性系統の *I. trifida* の *S*₃ 系統の *SE2* は破壊されていた (*AAM68* と *AB3* は *S* 遺伝子座の外側に存在する遺伝子)。以上のことから、ヒルガオ科植物の *S* 遺伝子は雄側の *AB2* と雌側の *SEA* に絞

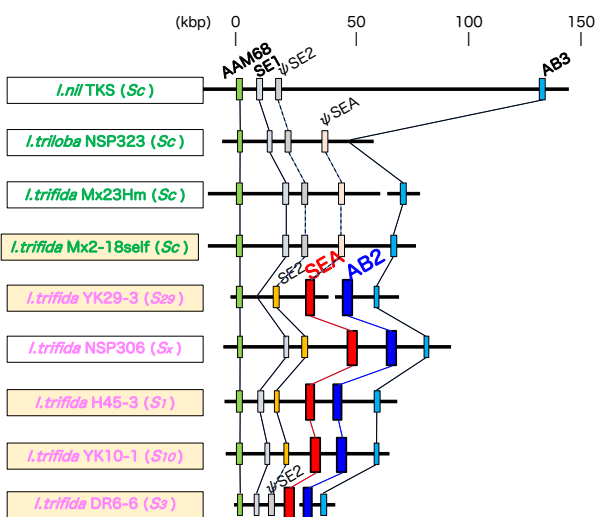


図 2. 各種ヒルガオ科植物の *S* 遺伝子座領域の構造
系統名が緑色の系統は自家和合性、桃色の系統は自家不和合性。系統名背景が着色してある系統は、研究代表者による解析。「φ」は偽遺伝子を示す。

り込むことができた。

(3) サツマイモ栽培種の *S* 遺伝子の同定

サツマイモ栽培種 (*I.batatas*) に最も近縁な野生植物は *I.trifida* とされており、特定の交配では不和合性を示すものの交配は可能である。しかし *I.batatas* は 6 倍体であることから、1 個体内に最大で 6 つの *S* 遺伝子座を持つことも可能であり、その複雑な遺伝子構成のために、これまで研究対象とはしていなかった。

しかし、改めて *I.trifida* の *S* 遺伝子の発現について RT-PCR で解析してみると (図 3)、*S* ヘテロ系統 (優劣関係は $S_7 > S_{10}$) においては雄側の *AB2* は転写レベルで、雌側の *SEA* は転写後レベルで劣性側の遺伝子の発現が抑制されていることが明らかになった。

そこで、雄側の *AB2* について、*I.batatas* の各品種の開花 2 週間前の葯の RNA-seq を行い、*AB2* および *AB3* を抽出してコードするタンパク質の配列を解析した (図 4)。

解析に供した *I.batatas* の品種は、ベニセンガン、千系 681-2、F53-6、元気、セトアカ、ベニアズマだが、非 *S* 遺伝子である *AB3* は複数発現しているにも関わらず、*S* 遺伝子である *AB2* はベニアズマ (交配不和合群 : A 群)、セトアカ (同 : B 群)、F53-6 (同 : I 群) で 1 種類のみであり、*I.trifida* と同様の優劣性の制御が為されていることが確認できた。*AB2* と *AB3* の配列は類似しているものの、系統関係を見ると (図 5)、配列が極めて類似している *AB3* は 1 箇所 (図中の左側) にクレードを形成しており、*S* 遺伝子産物として多型性を示す *AB2* は図の右側に散在していることが判る。更に、図中に矢印で示した、*I.trifida* の *S₁₀-AB2* (*ItfS₁₀-AB2*) と *I.batatas* (品種:セトアカ) の *IbS_B-AB2* は配列が完全に一致していた。この結果は、*I.trifida* の *S₁₀* ホモ型系統と *I.batatas* cv. Setoaka が交配不和合であった過去の研究成果とも合致しており、*AB2* がヒルガオ科植物の自家 (交配) 不和合性における雄側の *S* 遺伝子であることが明らかになった。

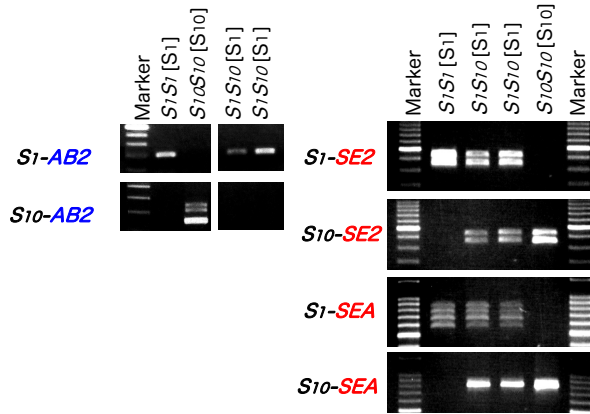


図 3. *I.trifida* の *S* 候補遺伝子の発現
各レーン上部には遺伝子型 ([]内は表現型) を示した。

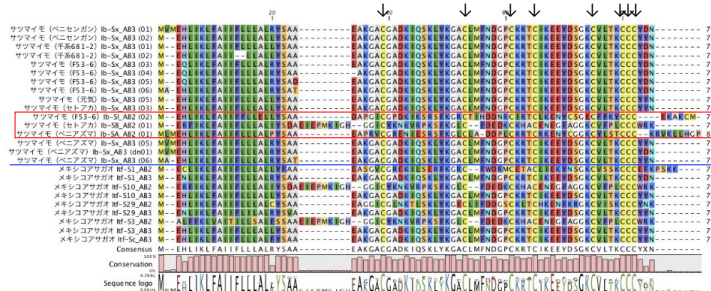


図 4. *I.batatas* と *I.trifida* の *AB2* と *AB3* タンパク質
赤枠内が *I.batatas* の *AB2*、青線の上部分が *I.batatas* の *AB2* と *AB3*。
矢印は保存された Cys 残基。

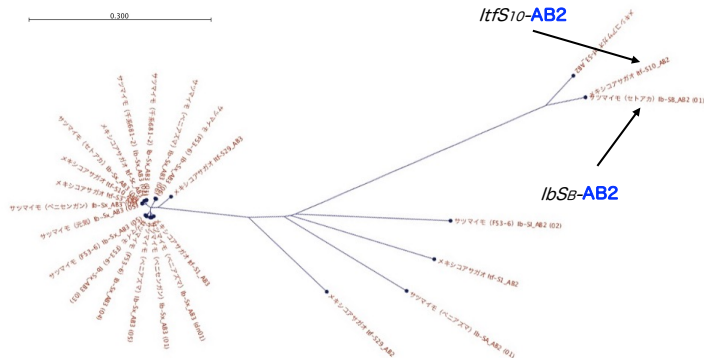


図 5. *I.batatas* と *I.trifida* の *AB2* と *AB3* タンパク質の系統関係

(4) 高次倍数体 *I.trifida* のゲノム配列の解析

I. trifida は 2 倍体、3 倍体、4 倍体、6 倍体の植物種から構成される複合群であることが知られている。元来、6 倍体の *I. trifida* から *I. batatas* が派生したという説があるが、近年の研究により *I. batatas* は *I. trifida* (自家不和合性) と *I. triloba* (自家和合性) のゲノムを有することが指摘されている。

そこで、*I. trifida* 複合群内の植物である K222-2 (3 倍体)、K233-1 (4 倍体)、K123-1 (6 倍体) の全ゲノム解析を行い、その配列から雌側の *S* 遺伝子である *SEA* を抽出しその翻訳結果を、これまでに解析した 2 倍体の *I. trifida* (*S*₁-, *S*₁₀-, *S*₂₉-, *S*₃-, *S*_c-) の *SEA* と比較解析した (図 6)。

その結果、2 倍体および高次倍数体の *I. trifida* のゲノム中の *S* 候補遺伝子である *SEA* は存在せず、また非 *S* 候補遺伝子であり *SEA* に配列が類似している *SE1*、*SE2* も破壊されていない(ヒルガオ科の自家和合性種の一部において *SE2* は破壊されている:図 2 参照) ことから、*I. trifida* 複合群の形成に、自家和合性のヒルガオ科植物は関与していないことが示された。

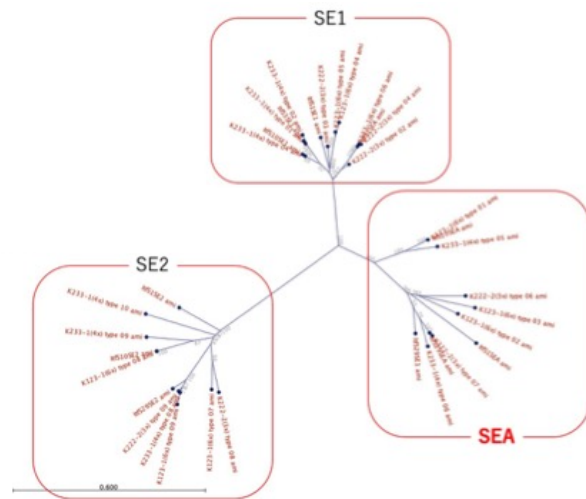


図 6. *I. trifida* の複合群の植物が持つ SE1、SE2、SEA

引用文献

- [1] Kakeda K. et al., Agrobacterium-mediated transformation of *Ipomoea trifida*, a diploid relative of sweet potato. *Breed Sci* 59: 95-98, 2009.
- [2] Hoshino A. et al., Genome sequence and analysis of the Japanese morning glory *Ipomoea nil*. *Nat Commun* 7: 13295, 2016.
- [3] <http://sweetpotato.uga.edu>
- [4] Tomita R.N. et al., Molecular Characterization of a 313-kb Genomic Region Containing the Self-incompatibility Locus of *Ipomoea trifida*, a Diploid Relative of Sweet Potato. *Breed Sci* 54: 165-175, 2004.
- [5] 塩谷 格 サツマイモの遍歴 – 野生種から近代品種まで – 法政大学出版局
- [6] Wu S. et al., Genome sequences of two diploid wild relatives of cultivated sweetpotato reveal targets for genetic improvement. *Nat Commun* 9: 4580 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 安井 瞭・畠中 幸・土屋 亨	4. 巻 19
2. 論文標題 伊勢湾沿岸地域において同時期に確認されたグンバイヒルガオ実生個体	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 漂着物学会誌	6. 最初と最後の頁 15-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hiroshi Ehara, Toshiki Yamamoto, Tohru Tsuchiya, Hitoshi Naito, John L. Dowe, Will C. McClatchey, Takashi Mishima, Akemi Itaya, Chitoshi Mizota, YuliusB.Pasolon, PhilimonAla, MarikaTuiwawa, Alivereti Naikatini, Issac A. Rounds, Talie Foliga, Siosinamele Lui and Samantha Kwan	4. 巻 26
2. 論文標題 Phylogenetic Study of Metroxylon Palms in Southeast Asia and Oceania Based on 5S nrDNA Spacer Sequence Data	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SAGO PALM	6. 最初と最後の頁 34-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.57279/driftological.19.0_15	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

1. 著者名 Vina Rizkawati, Kazuma Sakai, Tohru Tsuchiya, Morio Tsukada	4. 巻 58
2. 論文標題 Different egg size in the chrysanthemum lace bug <i>Corythucha marmorata</i> (Hemiptera: Tingidae) in response to novel host plant cultivars	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 93-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13355-022-00808-3	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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