

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05609

研究課題名(和文) ホウレンソウにおける雄性化/雌性化抑制の分子機構解明

研究課題名(英文) Studies on the masculinization mechanism of spinach.

研究代表者

小野寺 康之 (Onodera, Yasuyuki)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：80374619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ホウレンソウは雌雄異株植物として知られるが、間性株(雌雄異花同株)も見出される本研究では雄性因子(Y)と間性因子(M)の候補遺伝子の同定および発現・機能解析を試みた。RNAseq解析によって、Y候補遺伝子(Y-orf)が同定された。Y-orfはSpinacia属全体で雄株に固有な遺伝子であり、雄株茎頂の髄状分裂組織および形成層で発現していることが判明した。一方、M候補遺伝子は、葯および胚珠で特異的に発現することが判明した。しかしながら、シロイヌナズナおよびタバコにY-orfおよびM-orfを導入したが、両遺伝子が雌性化抑制の機能を持つことを示唆する明確な証拠は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホウレンソウの経済的F1採種には、種子親および花粉親それぞれに適した性形質を備えた親系統が用いられている。本研究はホウレンソウのF1育種の効率化に向けて、性決定の仕組みを理解するために性決定候補遺伝子として同定されたY-orf および M-orf の発現および機能解析を行なった。本研究では、発現解析からは、両遺伝子が生殖器官形成に関与する可能性が示唆されたが、性決定遺伝子としての機能を持つことを示唆する十分な証拠を得るには至らなかった。今後は、両候補遺伝子の特徴づけおよび他の候補遺伝子の探索を通じて性決定機構を解明することにより、優れたホウレンソウF1品種を効率的に育成することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Spinach is known as a dioecious species, but certain varieties, lines and populations produce monoecious plants bearing both pistillate and staminate flowers. In this study, the candidate (Y-orf) for male determining gene was identified based on RNA-seq analysis and found to be expressed in a rib zone and cambium layers of an early inflorescence apex in a male plant. The candidate gene, M-orf, for monoecism were shown to be expressed in anthers and ovules in early staminate and pistillate florets. To evaluate function of the candidate genes, transgenic Arabidopsis and tobacco plants containing Y-orf and M-orf were produced. Some of transgenic plants produced morphologically altered flowers, however, which did not clearly suggested female-suppressing function of the candidate genes.

研究分野：植物育種

キーワード：ホウレンソウ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ハウレンソウは雌雄異株植物として知られるが、実際には雌花および雄花（または両性花）を様々な比率で着生する間性株（雌雄異花同株）も見出される。ハウレンソウの示す多様な「性」は株あたりの雌花割合（雌性率）の変異として捉えられ、経済的 F<sub>1</sub> 採種に不可欠な受粉制御に利用される重要形質である。これまでに、申請者は雄性決定遺伝子 (*Y*) と間性主働遺伝子 (*M*) は約 10 cM の距離で連鎖していることを明らかにした。さらに、遺伝子型と性表現型の関係に基づいて、両遺伝子はいずれも雄性化および雌性化抑制の機能を併せ持ち、その機能の強弱によって両者が特徴づけられることが推定された。申請者が実施したトランスクリプトーム解析および遺伝・ゲノム解析によって同定した *Y* および *M* の候補遺伝子 (*Y-orf* および *M-orf*) は同じファミリーに属する転写因子をコードしており、両者の分子機能は類似している可能性が強く示唆された。

### 2. 研究の目的

ハウレンソウの雌性率は、雄性決定遺伝子 (*Y*) と間性主働遺伝子 (*M*) が持つ雄性化および雌性化抑制機能に支配されていると筆者は仮説を立てた。本研究は、この仮説を検証するために、*Y* および *M* の候補遺伝子 (*Y-orf* および *M-orf*) の詳細な発現解析および形質転換系を用いた相補性試験を通じて、当該候補遺伝子の機能評価を試みた。

### 3. 研究の方法

- (1) ハウレンソウ雌雄異株系統 03-009 の雄株および雌株並びに系統 03-009 の遺伝的背景を持つ間性系統 (NIL-M) の栄養器官、茎頂および花序から取得した RNAseq リードから、雄特異的な k-mer (35 mer) を抽出した。次いで、雄特異的な k-mer を持つ RNAseq リードをハウレンソウのトランスクリプトーム配列にマップして、雄特異的な遺伝子の探索を行なった。
- (2) ハウレンソウ雌雄異株系統 03-009 雄株のゲノムアセンブリ構築: 03-009 雄株のゲノム DNA をロングリードシーケンサー Sequel II を用いてリードを取得した。リードのアセンブリにはソフトウェア FALCON を用いた。また、03-009 の雄株および雌株のゲノム DNA のペアエンドリード (250-bp x2) を取得し、これらをゲノムアセンブリにマップした。マッピングおよびマップされたリードのカウントにはソフトウェア Bowtie2 および Samtools を用いた。
- (3) トランスクリプトーム解析: 発現パターンの類似性に基づいて、上述の RNAseq リードから構築された 37843 個の unigene のクラスター解析を行なった。
- (4) 形質転換体の作出: バイナリーベクター pFGC5941 の 35S-CaMV プロモーターの下流に *Y-orf* および *M-orf* のコード配列を挿入して融合遺伝子を構築した。アグロバクテリウムを用いて、融合遺伝子 35S-CaMVpro-*Y-orf* および 35S-CaMVpro-*M-orf* をタバコ (SR-1) およびシロイヌナズナ (col-0) に導入した。

### 4. 研究成果

#### (1) 雄特異的遺伝子の再探索

*Y-orf* 以外の雄決定候補遺伝子を探索するために、雄特異的 k-mer を含む RNA-seq リード

をゲノムおよびトランスクリプトームへマップした。その結果、*Y-orf*の他に bZIP 型転写因子 (*Y-bZIP* と命名) が雄株に固有な遺伝子として同定された。

ハウレンソウ雄株のゲノムを解読し、ゲノムアセンブリ (508 本, 総全長 934.3 Mb,  $N_{50} = 6.7$  Mb) を構築した。雄株 (XY) および雌株 (XX) ゲノムのショートリード (250-bp PE) をマップし、各 contig にマップされた雄株と雌株リード数の比 (M/F 比) を調査した結果、M/F 比 = 0.5 ~ 24.2 (平均 1.4) を示した。雄特異的マーカー配列 (Kudoh et al. 2018) を用いて同定した雄特異的 Y 染色体領域に相当する 4 本の primary contig はいずれも高い M/F 比 (5.9 ~ 8.6) を示し、M/F 比は雄特異的 Y 染色体領域を同定するための指標として有効であることが確認された。上述の *k-mer* 解析で同定された雄株に固有な遺伝子は、高い M/F 比 (6.0, 7.57) を備えた雄特異的 Y 染色体領域に相当する contig にマップされた。

次に、互いに由来を異にする *Spinacia* 属植物 3 種 (*S. oleracea*, *S. turkestanica*, *S. terandra*) の品種・系統・遺伝資源アクセシオンを用いた連関解析によって、*Y-orf* および *Y-bZIP* は同属全体において雄特異的に保存されていることが判明した。しかし、*Y-bZIP* はいずれの器官・組織における発現レベルが低く雄決定遺伝子の候補から外し、生殖成長開始時期の茎頂で比較的強く発現している可能性が示された *Y-orf* を有力な候補として選出した。

トランスクリプトーム解析： 雄性化/雌性化抑制に関わる遺伝子群の同定に向けて、雌株と比べて雄株および間性株のいずれにおいても高い発現を示す遺伝子群 (420 個) をトランスクリプトームから選出した。次に、雄株のトランスクリプトームデータを用いて、遺伝子発現プロファイルのクラスタリング解析を行い、*M-orf* および *Y-orf* と類似した発現パターンを示す遺伝子の抽出を試みた。*M-orf* が分類されたクラスターの遺伝子群には、B クラスに分類される花器官形成遺伝子 *SpPI* および *SpAP3* に加えて、花粉壁の形成に関わるスポロポレニン合成関連遺伝子が含まれていた。最近、ハウレンソウの B クラス遺伝子が雌蕊形成抑制機能を担う可能性が示されており、一つの可能性として *M-orf1* が B クラス遺伝子の発現の活性化を介して雄性化/雌性抑制に寄与していることが考えられた。一方、*Y-orf* を含むクラスターにはシロイヌナズナにおいて花芽の分裂組織形成を制御する *LFY* のホモログ (*SpLFY*) が含まれていた。

## (2) *Y-orf* および *M-orf* の発現解析

*Y-orf* は雄特異的に発現することが RT-PCR によって確認された。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション解析によって、同遺伝子は茎頂の髄状分裂組織および形成層で発現していることが判明した。

RT-qPCR 解析に基づいて、*M-orf* は間性株の他に雄株の花序において高い発現を示し、雄性化/雌性抑制に関与している可能性が示された。また、雄花形成率が高い間性系統において *M-orf* の高発現が確認された。次に、栄養器官および花器官ごとに発現レベルを調査した結果、*M-orf1* は栄養器官の葉および茎では発現しておらず、花における発現が確認された。さらに、雄花における *M-orf1* 発現量は、両性花および雌花と比べて顕著に高く、雄花器官の中では雄蕊における発現が高いことが明らかになった。*in situ* ハイブリダイゼーション解析によって、*M-orf* は雄花における未熟葯の胞原細胞において発現する一方で、雌花の胚珠においても発現することが判明し、生殖器官形成に関与することが示唆された。

## (3) *M-lnc RNA* の特徴づけ

*M-orf* 座には雌雄異株系統と間性系統間で構造変異が存在しないが、この遺伝子座とオ

ーオーバーラップする長鎖非コード RNA (M-lnc RNA と命名した) の転写領域には, 比較的大きな系統間構造変異が見出される. 雌雄異株系統および間性系統における *M-orf* および M-lnc RNA の発現を調査した結果, 少なくとも花序組織において両者の発現量の間にも負の相関性が見出され, *M-orf* は M-lnc RNA による負の発現制御を受けている可能性が示された.

(4) ホウレンソウの近縁植物における *Y-orf* および *M-orf* のホモログの特徴づけ

ホウレンソウと同属の雌雄異株 *Spinacia terandra* においても, *Y-orf* ホモログは雄特異的に生殖器官において優位に発現していることがわかった. 一方, *M-orf* ホモログについても同植物の雄株における生殖器官 (花序) で優位な発現が見出された. つまり, 両遺伝子は発現パターンおよび機能が *Spinacia* 属内で保存されている可能性が示された. ホウレンソウと同じヒユ科作物のテンサイ (両性花植物) における *M-orf* カウンターパートは, 栄養器官 (葉) よりも生殖器官 (花序) において有意に高発現していることがわかった.

(5) 形質転換解析

シロイヌナズナおよびタバコに *Y-orf* および *M-orf* を導入した形質転換体を作成した. *M-orf* を導入した形質転換体の一部において, 花粉の部分不稔および葯の本数減少が観察されたが, 性決定遺伝子として期待された雌性抑制を示唆する形態の変化を見出すことはできなかった. *Y-orf* 導入植物においても, 当該遺伝子が雌性抑制機能を有する可能性は示唆されなかった.

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hangil Kim, Yasuyuki Onodera and Chikara Masuta	4. 巻 37
2. 論文標題 Application of cucumber mosaic virus to efficient induction and long-term maintenance of virus-induced gene silencing in spinach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 83-88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.19.1227a	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 Okazaki Yosuke, Takahata Satoshi, Hirakawa Hideki, Suzuki Yutaka, Onodera Yasuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular evidence for recent divergence of X- and Y-linked gene pairs in Spinacia oleracea L.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0214949-0214949
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0214949	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 Hirakawa H, Toyoda A, Itoh T, Suzuki Y, Nagano AJ, Sugiyama S, Onodera Y	4. 巻 未定
2. 論文標題 A spinach genome assembly with remarkable completeness, and its use for rapid identification of candidate genes for agronomic traits.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsab004	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長部高之, 岩淵恵佑, 平川英樹, 鈴木穰, 小野寺康之
2. 発表標題 ホウレンソウの性決定候補遺伝子の探索
3. 学会等名 日本育種学会 第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤有紀, 長部高之, 平川 英樹, 鈴木穰, 小野寺康之
2. 発表標題 ハウレンソウ性決定候補遺伝子の発現解析
3. 学会等名 日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎洋助, 平川英樹, 小野 寺康之
2. 発表標題 Spinacia属における性決定候補遺 伝子の探索および構造解析
3. 学会等名 日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野寺康之・須藤有紀・平川英樹・鈴木穰
2. 発表標題 ハウレンソウ性決定候補遺伝子の特徴付け
3. 学会等名 園芸学会 令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須藤有紀, 長部高之, 平川 英樹, 鈴木穰, 小野寺康之
2. 発表標題 ハウレンソウ性決定候補遺伝子の発現パターンの解析
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田拓希, 高橋光彦, 小野寺 康之
2. 発表標題 Spinacia属種間雑種後代を用いた花序形質の遺伝解析
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎 洋助, 平川 英樹, 鈴木 穰, 小野寺 康之
2. 発表標題 ホウレンソウの性染色体における組換え抑制領域の進化年代の推定
3. 学会等名 日本育種学会 第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡崎 洋助, 平川 英樹, 鈴木 穰, 小野寺 康之
2. 発表標題 ホウレンソウY染色体雄特異的領域の座乗遺伝子同定および進化年代推定
3. 学会等名 園芸学会 平成31年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平川英樹、豊田敦、伊藤武彦、鈴木穰、永野惇、杉山優、小野寺康之
2. 発表標題 ホウレンソウ育種の効率化に向けた Pseudomolecule の構築
3. 学会等名 日本育種学会 第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野寺康之, 杉山優, 豊田敦, 伊藤武彦, 鈴木穰, 永野惇, 平川英樹
2. 発表標題 新規ホウレンソウ pseudomolecule を用いた重要育種形質の QTL 解析
3. 学会等名 日本育種学会 第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田拓希, 杉山優, 岡崎洋助, 小野寺康之
2. 発表標題 ホウレンソウ近縁野生種のY染色体における組換え抑制領域の同定
3. 学会等名 日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会
4. 発表年 2020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	星野 洋一郎  (Hoshino Yoichiro)  (50301875)	北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授   (10101)	

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