

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05619

研究課題名(和文)キクタニギク自家和合性変異の分子機構解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism for self-compatibility in *Chrysanthemum seticuspe*

研究代表者

中野 道治 (Nakano, Michiharu)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・特任助教

研究者番号：40705159

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)：キクタニギクのAEV02系統に見つかった自家和合性遺伝子座Csc1の原因遺伝子同定を目指した。自家不和合性系統との交雑に由来するBC1F1集団等を用いて解析を進めた結果、Csc1遺伝子座候補領域は850kbの範囲に絞り込まれた。この領域には18個の遺伝子があり、その中にはシロイヌナズナでS遺伝子座をコードするSRKのホモログが2個含まれていた。SRKホモログの一つSLPK_Rは柱頭で発現し、その発現は自家和合性系統では見られなかった。また自家和合性系統のSLPK_Rコード領域にナンセンス変異と考えられる変異が見つかった。これらの結果より、SLPK_Rが原因遺伝子候補として考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キク属は自家不和合性であり、このことがキク育種を困難としている一因である。以前の研究で自家和合性変異体を単離し、その変異を利用することで純系化したモデル系統Gojo-0の育成が行われてきたが、変異の実体は不明であった。本研究によりキク属で初めての自家和合性変異の実体解明に近づくことができたが、今後、この変異に関わる詳細な機構を明らかにすることができれば、キク育種に自家和合性を導入することで新たな育種システムの開発につながると期待される。またキク科では自家不和合性の詳細なメカニズムは明らかにされておらず、本研究の結果を元にキク科の自家不和合性機構の解明につながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the molecular mechanism related to Csc1, a self-compatibility locus found in a strain AEV02 of *Chrysanthemum seticuspe*. Using the BC1F1 population derived from crosses a cross between self-incompatible(SI) strain and AEV02-derived self-compatible(SC) strain, the candidate region for the Csc1 locus was narrowed to 850 kb. This region contains 18 genes, including two homologs of SRK, which encodes the S locus in *Arabidopsis*. One of those SRK homologs, SLPK_R expressed in the style of SI strains, but not expressed in the style of SC strains. Furthermore, SLPK_R had a possible nonsense mutation specifically for SC strains in the coding region. These results indicated SLPK_R is an important candidate for the Csc1 locus.

研究分野：園芸育種

キーワード：キク 野生種 自家和合性 ポジショナルクローニング 自然変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キクは観賞用花きとして世界で最も重要な花きの一つであるが、高次倍数性、自家不和合性が障害となり、重要形質の遺伝解析は進んでいない。近年、二倍体種であるキクタニギク (*Chrysanthemum seticuspe*) が分子遺伝学的実験に用いられているが、我々のグループではキクタニギク遺伝資源より自家和合性系統 AEV02 を単離し、その自家和合性を利用することでゲノム全体が純系化したモデル系統 Gojo-0 を育成した。AEV02 の持つ自家和合性は自殖を繰り返しても安定に伝達されることから、栽培ギクに自家和合性を導入するための重要な遺伝子資源であり、原因遺伝子の同定は栽培ギクへの応用のみならず、キク科で明らかにされていない自家不和合性のメカニズム解明にもつながると期待される。キク属ではゲノム配列、DNA マーカー情報などの解析基盤が整備されていなかったが、近年ドラフトゲノム配列が決定され、分子遺伝学的アプローチが可能となった。申請段階において、自家和合性は劣性変異であること、BC₁F₁ 集団において自家和合性と自家不和合性が 1:1 の期待比に適合する分離比であることから、ラフマッピングを行ったところ完全連鎖する DNA マーカーが同定された。この遺伝子座は *Csc1* と命名され、キクタニギクを用いることでポジショナルクローニングによる *Csc1* の解析が可能であると考えられたため、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、AEV02 に見出された自家和合性遺伝子座 *Csc1* について、整備の進められているゲノム基盤を活用してポジショナルクローニングによる原因遺伝子同定を目指す。まず、*Csc1* 遺伝子座を正確に連鎖地図上に位置付けるため、必要とされる分離集団を育成すると共に、*Csc1* 遺伝子座周辺領域の DNA マーカーを高密度化する。それらの分離集団と DNA マーカー情報を用いて、*Csc1* 遺伝子座の候補領域を狭めていく。キクタニギクにおいて自家不和合性の発現に関わる遺伝子を同定するため、柱頭、葯を用いた RNA-seq 解析を行う。また、AEV02 とその他のキクタニギク野生系統の全ゲノムリシーケンス解析を行い、*Csc1* 候補領域の変異を明らかにする。これらの情報を元に、*Csc1* 候補領域を特徴づけると共に、発現遺伝子との関連を明らかにすることで原因遺伝子候補の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 分離集団の育成

キクタニギク野生株である AEV12 系統に自家和合性のモデル系統 Gojo-0 を交配した F₁ である XMTW02 系統を中心とし、再度 Gojo-0 を交配することで戻し交雑集団を育成した。その内訳は、BC₁F₁ 世代 111 系統、BC₁F₂ 世代 102 系統、BC₂F₁ 世代 68 系統の合計 281 系統である。

(2) 使用したゲノム配列

本研究の実施期間中に発表された Hirakawa *et al.* (2019) のドラフトゲノム配列に加えて、期間中に整備が進められたキクタニギクモデル系統 Gojo-0 の全ゲノム配列 (Gojo-0_v1) を使用した。Gojo-0_v1 配列は、ショートリードとロングリードデータを用いたアセンブルと Hi-C 法を用いたスキャフォールドリングによって作成されたが、その全長は 3.05Gb となり、その内、2.98Gb はキクタニギクの染色体数に相当する 9 本のスキャフォールドに収束する染色体スケールの配列が得られている。全ゲノム配列を用いた遺伝子予測の結果、ゲノム全体で約 74,000 個の遺伝子が予測された。

(2) DNA マーカーの高密度化とマッピング

Hirakawa *et al.* (2019) の SSR マーカーセットを bwa-aln を用いて Gojo-0 の全ゲノム配列に対してマッピングを行ったところ、6,370 マーカーが全 9 連鎖群に位置付けられた。その内、ラフマッピングで連鎖が認められたマーカーが座乗する連鎖群において約 1Mb 間隔でマーカーを設計し、XMTW02 がヘテロ、Gojo-0 がホモの多型を示すものを選抜した後、分離集団の各個体の遺伝子型を調べた。個々のマーカー遺伝子型は、表現型との関連を調べると共に、ゲノム上での位置情報を元に整列化を行い原因遺伝子座周辺での組換え個体を同定した。

(3) RNA-seq 解析

BC₁F₁ 集団の自家和合性 3 系統のバルク (SI_bulk)、自家不和合性 2 系統のバルク (SC_bulk) の柱頭及び葯より約 1µg の total RNA を得て、ライブラリー構築と Novaseq6000 を用いた Paired-end リード (PE150) を取得した。得られた配列は Trim Galore を用いてトリミングを行った後、Gojo-0 の全ゲノム配列及び予測遺伝子セットに対して STAR を用いてマッピングし featureCounts により数値化及び IGV により可視化した。

(4) 全ゲノムリシーケンス解析

キクタニギク 3 系統 (AEV02 (自家和合性)、AEV12 (自家不和合性)、AEV13 (自家不和合性))、いずれも奈良県五條市より採集) の葉よりゲノム DNA を抽出し、ライブラリー構築と Novaseq6000 を用いた Paired-end リード (PE150) を取得した。得られた配列は Trim Galore を用いてトリミングを行った後、Gojo-0 の全ゲノム配列に対して bwa-mem によりマッピングし、GATK の HaplotypeCaller を用いて多型検出を行った。多型情報は snpEff を用いてアノテーション付けした。

4. 研究成果

(1) *Csc1* 遺伝子座のマッピング

ラフマッピングにより連鎖が認められた連鎖群における正確な位置を決定するため、座乗連鎖群のマーカーを用いてマッピングを進めた。BC₁F₁、BC₂F₁ 集団では候補領域を約 100Mb 程度までしか絞り込むことはできなかったが、その後、BC₁F₂ 集団を用いてマッピングを進めた結果、候補領域を 850kb 区間まで絞り込むことができた(図 1)。この領域には 18 個の遺伝子が予測されており、この中にはシロイヌナズナで *S* 遺伝子をコードしている SRK 遺伝子に高い相同性を示すホモログが 2 個含まれていた。この SRK ホモログを SLPK_L、SLPK_R と命名した(図 2)。

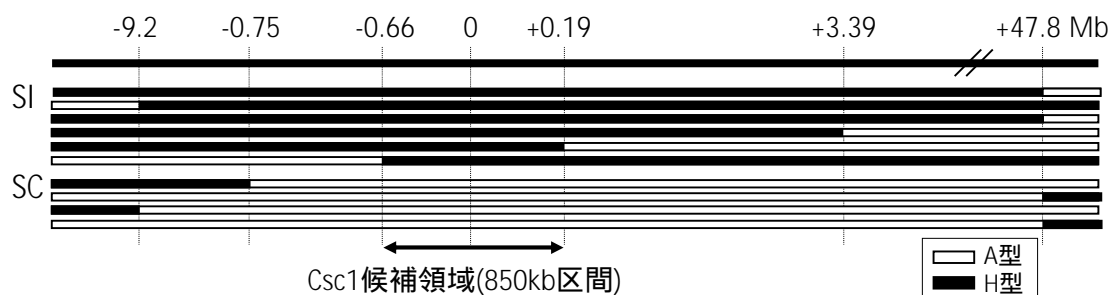


図 1 *Csc1* 遺伝子座のマッピング

Gojo-0_v1 ゲノムの位置に対して BC₁F₂ 集団において出現した組換え個体の遺伝子型を示す

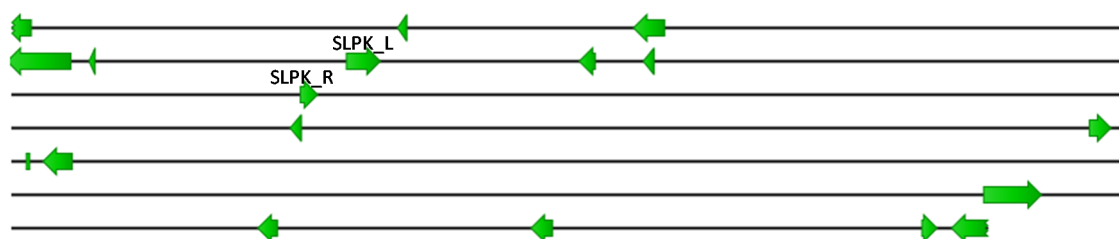


図 2 候補領域内の予測遺伝子

候補領域内の SLPK ホモログの位置を示す

(2) RNA-seq 解析

表 1 RNA-seq 解析の結果

	SI_anther	SC_anther	SI_style	SC_style
1	4.1	3.1	0.0	0.7
2	6.8	3.1	0.0	0.7
3	0.0	0.0	0.0	0.0
4	0.0	0.0	0.0	0.0
5	21.9	7.9	275.9	315.9
6	0.0	0.0	0.0	0.0
7_SLPK_L	5.5	23.6	0.5	0.0
8_SLPK_R	4.1	0.0	14.9	0.0
9	12.3	18.9	9.2	10.1
10	0.0	0.0	0.0	0.0
11	47.8	39.4	83.2	110.4
12	1.4	0.0	0.0	1.4
13	996.3	2485.7	8.7	48.3
14	27.3	31.5	145.9	153.6
15	21.9	20.5	9.2	10.1
16	144.9	107.0	256.9	196.9
17	39.6	133.8	21.1	17.3
18	214.6	218.8	154.6	150.0

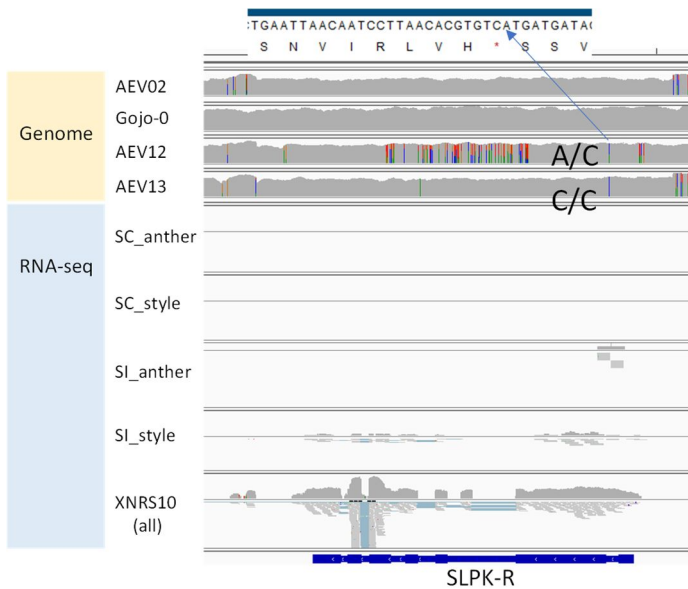
候補領域の 18 遺伝子について、RNA-seq で の発現パターンを調べたところ、SLPK_L は薬 で高い発現を示したが自家不和合性(SI)と自家和合性(SC)の間では差が認められなかった。一方、SLPK_R は薬・柱頭の両方で発現し、自家不和合性特異的な発現が認められた。自家和合性系統では柱頭において花粉発芽が起こらず、また自家和合性が劣性で変異であることから、自家不和合性系統の柱頭で発現している遺伝子が自家和合性系統では発現が失われている可能性が考えられる。候補領域内の 18 遺伝子中、SLPK_R のみが不和合性と和合性の間で発現差を示した。

(3) 全ゲノムリシーケンス解析

自家不和合性 2 系統と AEV02 についてゲノムの約 30 倍をカバーする配列データを取得し、Gojo-0_v1 配列に対してマッピングと変異検出を行った。その結果、SLPK_R の領域では Gojo-0 の予測遺伝子では第一イントロンとされる領域において、自家不和合性の AEV12 でヘテロ、AEV13 がホモとなる SNP が認められた。RNA-seq の遺伝子発現パターンを見ると以前にドラフト配列の決定に使用された XMRS10 系統のデータ(葉・SAM 等を中心とした組織に由来)では、この位置はイントロンとは考えにくく、コード領域の変異を回避する形で遺伝子予測が行われたものと考えられ、Gojo-0 においてナンセンス変異が起こっている可能性が考えられた(図 3)。

(4) 候補遺伝子の決定

これらの解析をまとめると、SLPK_R が *Csc1* 遺伝子座の原因遺伝子候補と考えられる。この遺伝子は柱頭において自家不和合性系統と自家和合性系統の間で発現差が認められた。この遺伝子内にナンセンス変異を起こす可能性のある SNP が見つかったが、この変異は自家不和合性である AEV12 においてヘテロとなっていた。SLPK_R は、アブラナ科で S 遺伝子座の実体である SRK のホモログであることから興味深いデータであり原因遺伝子候補として重要なものではあるが、次世代シーケンス手法には拠らない手法での確認と、更に系統数を増やした調査が必要であり、今後の検証を進めて行く。また、現段階での *Csc1* 候補領域は 850kb と広く、より確実に候補を決定するためには分離集団個体数の増加と更なる調査が必要である。



以上の結果より、本研究ではキクタニギク AEV02 系統に見出された自家和合性変異 *Csc1* の実体に迫る結果が得られた。これまで、キク属において安定な自家和合性変異の実体を明らかにした例はなく、初めての成果となることが期待される。

自家不和合性のメカニズムはアブラナ科などでは詳細な解析が進められているが、植物で最も大きな科であるキク科ではそのメカニズムが明らかにされた例はない。今後、*Csc1* 遺伝子座の更なる解析と *Csc1* 遺伝子座を端緒として自家不和合性メカニズムの解析を進めることで多大なインパクトを持つ成果となることが期待される。

図 3 SLPK_R に見つかった変異と遺伝子構造

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakano Michiharu, Taniguchi Kenji, Masuda Yu, Kozuka Toshiaki, Aruga Yuki, Han Jin, Motohara Koichiro, Nakata Masashi, Sumitomo Katsuhiko, Hisamatsu Tamotsu, Nakano Yoshihiro, Yagi Masafumi, Hirakawa Hideki, Isobe Sachiko N, Shirasawa Kenta, Nagashima Yumi, Na Haiyan, Chen Li, Liang Guolu, Chen Ruiyan, Kusaba Makoto	4. 巻 287
2. 論文標題 A pure line derived from a self-compatible Chrysanthemum seticuspe mutant as a model strain in the genus Chrysanthemum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 110174 ~ 110174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plantsci.2019.110174	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 中野道治、増田優、谷口研至、草場信	4. 巻 10
2. 論文標題 NBRP広義キク属: キク属モデル系統の開発と植物多様性研究への展開	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BSJ-Review	6. 最初と最後の頁 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.10c6.00166	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 Hideki, Sumitomo Katsuhiko, Hisamatsu Tamotsu, Nagano Soichiro, Shirasawa Kenta, Higuchi Yohei, Kusaba Makoto, Koshioka Masaji, Nakano Yoshihiro, Yagi Masafumi, Yamaguchi Hiroyasu, Taniguchi Kenji, Nakano Michiharu, Isobe Sachiko N	4. 巻 26
2. 論文標題 De novo whole-genome assembly in Chrysanthemum seticuspe, a model species of Chrysanthemums, and its application to genetic and gene discovery analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 195-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsy048	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Michiharu Nakano, Kenji Taniguchi, Yu Masuda, Yuki Aruga, Toshiaki Kozuka, Makoto Kusaba
2. 発表標題 A pure line derived from the self-compatible Chrysanthemum seticuspe mutant as a model strain in the genus Chrysanthemum
3. 学会等名 26th International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals: EDITING NOVELTY (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野道治・谷口研至・増田優・住友克彦・八木雅史・中野善公・久松完・磯部祥子・草場信
2. 発表標題 キクタニギクゲノム情報を活用したChrysanthemum self-compatible1遺伝子座のマッピング
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野道治・谷口研至・住友克彦・八木雅史・中野善公・久松完・磯部祥子・草場信
2. 発表標題 キクタニギクにおける自家和合性の遺伝解析
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 中野道治・平川英樹・豊田敦・伊藤武彦・白澤健太・磯部祥子・谷口研至・草場信
2. 発表標題 キク属モデル系統Gojo-0 の高精度全ゲノム配列決定とポジショナルクローニングへの活用
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021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	草場 信	広島大学・統合生命科学研究科(理)・教授	
	(Kusaba Makoto)		
	(20370653)	(15401)	

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