

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06178

研究課題名(和文) 植物の生殖を制御する非自己認識遺伝子座の進化をドライブするメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism to drive the evolution of non self-recognizing loci controlling plant reproduction

研究代表者

久保 健一 (Kubo, Ken-ichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：60403359

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)：ナス科ペチュニアのゲノムDNAについて、ロングリードシーケンシングを行った。自家不和合性において自他識別の特異性を制御する雌ずい側発現S-RNase遺伝子と、20個前後存在する花粉側発現SLFs遺伝子の複数の対立遺伝子に対し、それぞれ周辺領域100kb以上を含む精度の高いコンティグを得た。自他識別において異なる特異性を示すS-ハプロタイプ間での遺伝子周辺領域の比較から、S遺伝子座間で大規模なゲノム断片の組換えや転座が起きている様子を明らかにすることができた。S遺伝子座は、大規模なゲノム断片間の組換えを介して、自他識別に都合の良いSLF遺伝子を獲得することで進化してきたと示唆することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自他識別特異性を維持するためには、雌ずい側因子と花粉側因子はユニットとして遺伝する必要がある。そのため、これまでS遺伝子座内では、組換えが抑制されていると考えられてきた。しかしながら、実際にはナス科のS遺伝子座はSハプロタイプ間での組換えを積極的に利用し、より効率的に非自己S-RNaseを解毒するSLFレパートリーを獲得し、受精の効率を最適化していることが判った。動物の獲得免疫にも似たメカニズムを、植物が集団レベルでどのように進化させてきたのか、理解が深まったと言える。植物がどのように生物多様性を持続させているのか、重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)： Long-read sequencing was performed on the genomic DNA of Petunia (Solanaceae). We obtained accurate contigs containing more than 100 kb peripheral region of the alleles of the pistil-expressed S-RNase and the pollen-expressed multiple SLFs gene, which control the specificity of self-incompatibility.

Comparison of peripheral regions of S-genes between different S-haplotypes revealed the evidences of large-scale genomic recombination and translocation between S loci. We suggest that the S locus has evolved through recombination between large genomic fragments to acquire SLF genes that are convenient for self and non-self discrimination.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：自他識別 協調的非自己認識 自家不和合性 分子進化 ゲノム生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の多くは自家不和合性によって交配相手の自他を識別し、近親交配を回避して種の遺伝的多様性を維持している。ナス科の自家不和合性植物では、雌ずい側で発現する細胞毒性 *S*-RNase (*Stylar-Ribonuclease*) によって、自己花粉を特異的に排除することで、自己花粉による受精を阻害している。一方で非自己花粉は、自己由来 *S*-RNase を除く、非自己由来の全ての *S*-RNase バリエーションを解毒することで、他家受粉時の受精能力を保証している。応募者は、ナス科植物の自家不和合性は、非自己 *S*-RNase のバリエーションの一部に対して限られた認識特異性を持つ花粉因子 *SLF* (*S*-locus *F*-box) を複数用い、非自己由来 *S*-RNase の全バリエーションを協調的に認識、解毒するという、「協調的非自己認識」機構であることを、世界で初めて証明した (Kubo, *Science* 330, 796, 2010)。自家不和合性を制御する *S*-遺伝子座は組換えの抑制された染色体領域であり、1 つの雌ずい因子と複数の花粉因子をコードする (Kubo, *Nat.Plants* 1, 14005, 2015)。自家不和合性を維持するためには、花粉因子 *SLF* のレパートリーは、非自己雌ずい因子の膨大なバラエティーを認識標的とする一方で、自己の因子と相互作用するものは一つも含まないという条件を満たす必要がある。このような都合の良いレパートリーを維持しつつ進化させてきた過程は、自家不和合性の進化における最大の謎であった。

S-RNase 遺伝子と複数の *SLFs* 遺伝子は、*S*-遺伝子座と呼ばれる染色体領域内に物理的に隣接して位置し、1 つのユニットとして遺伝するため、それぞれのユニットは *S*-ハプロタイプと呼ばれる。ペチュニアのドラフトゲノム配列は 2016 年に公開されていたが (Bombarely, *Nat.Plants* 2, 16074, 2016)、*S*-遺伝子座はリピート配列が極めて多いため、既存のショートリードシーケンスではアセンブリすることができず、その全体構造は依然として不明のままであった。

同じ *S*-RNase 型自家不和合性を持つバラ科リンゴ、ナシにおいては、*S*-遺伝子座のシーケンスは既に試みられていた (Minamikawa, *Plant Mol.Biol.* 74, 143, 2010; Okada, *J.Exp.Bot.* 62, 1887, 2011)。しかし、上述と同様の理由で複数の *S*-ハプロタイプについて配列を決定し比較することは困難であり、これまで *SLFs* 獲得の分子進化上のメカニズム解明を目的とした比較解析は行われていなかった。だが、既存のショートリードシーケンスに変わる新規な技術として、Nanopore や PacBio などのロングリードシーケンス技術が登場し、精度やリード長が向上してきたことで、*S*-遺伝子座の配列解読が可能となる目処がたってきていた。

そこで本研究では、ペチュニアの *S*-遺伝子座に着目し、複数の *S*-ハプロタイプ間での配列決定、比較研究を行うことにした。本研究から、*S*-遺伝子座の進化について先駆的な成果が得られるものと期待できた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、協調的非自己認識機構における認識特異性を支配する *S*-遺伝子座の進化をドライブし、認識分子間の共進化過程に参与するゲノム配列構造の変化の仕組みを明らかにすることである。そのためにナス科植物ペチュニアの *S*-遺伝子座に着目し、次世代シーケンスによって複数の機能性 *S*-遺伝子座について全長の配列構造を解読する。

3. 研究の方法

応募者が保有する 4 つの自家不和合性 *S*-ハプロタイプ、および 2 つの自家和合性ハプロタイプについて、最近開発されてきたロングリードシーケンサーである PacBio Sequel-II (平均リード長 10 kb 以上) を用い、リピート配列を多く含むために既存のショートリード技術では困難とされた *S*-遺伝子座の *de novo* アセンブリを行う方法を検討し、得られた配列の比較解析を行う。特に、一部の、複数の *S*-ハプロタイプにおいて共有されている *SLF* 遺伝子の周辺領域を比較する。さらに、*S*₁₇-および *S*₂₂-ハプロタイプは *S*_{C2}-および *S*_{22m}-ハプロタイプとそれぞれ同じ *S*-RNases を持つにも関わらず、*SLFs* 遺伝子のレパートリーに違いが見られることから、最近起きた *SLFs* 獲得イベントの前後に相当するバリエーションと考えられる (Kubo, *Nat.Plants* 1, 14005, 2015)。このような *SLFs* 遺伝子の周辺領域について比較し、リピート配列など特徴的な痕跡配列を探索する。

4. 研究成果

ナス科ペチュニアの 5 つの *S*-ハプロタイプについてホモの個体のゲノム DNA について、PacBio Sequel-II を用いたロングリードシーケンスを行った。それぞれについて、総塩基数 5 Gb、総リード数 40 万、平均リード長 13 kb のシーケンス情報を得た。これはペチュニアゲノムの約 4 倍程度にすぎないため、染色体全体をつなぐことは出来なかったが、*S*-RNase と 20 個前後ある *SLFs* のそれぞれの周辺 100-800 kb を含む精度の高いコンティグを得ることができた。

異なる *S*-ハプロタイプ間で広く共有される *SLF1* 遺伝子に着目し、そのゲノム周辺領域を数 100 kb に渡って比較した。特に、*SLF1* 対立遺伝子の一部には、自他識別において異なる特異性

を示す *S*-ハプロタイプ間において、配列の完全な一致を示すものがあり（同一性 100%の）、そのような対立遺伝子間では周辺領域が 100kb 以上にわたって保存されていることを明らかにした。このことは、特異性が異なる *S*-ハプロタイプの *S*-遺伝子座間で、大規模なゲノム断片の組換えや転座が起きていることを示している。*S*-遺伝子座が非自己 *S*-RNase の解毒に都合の良い SLF を獲得するメカニズムには、RNA 逆転写を介したレトロ転移や、短いゲノム断片の組換えによるジーンコンバージョンではなく、大規模なゲノム断片間の組換えが関与していることを示唆することができた。

自他識別特異性を維持するためには、雌ずい側因子と花粉側因子はユニットとして遺伝する必要がある。そのためこれまで、*S* 遺伝子座内では、組換えは抑制されていて起こらないと考えられてきた。しかしながら、実際にはナス科の *S* 遺伝子座は *S* ハプロタイプ間での組換えを積極的に利用し、より効率的に非自己 *S*-RNase を解毒する SLFs レパートリーを獲得し、受精の効率を動的に最適化していることが判った。動物の獲得免疫にも似たメカニズムを、植物が集団レベルでどのように進化させてきたのか、理解が深まったと言える。植物がどのように生物多様性を持続させているのか、重要な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 久保健一
2. 発表標題 Non-self-recognition system in S-RNase-based self-incompatibility in Petunia: Molecular mechanism to avoid inbreeding.
3. 学会等名 第15回 日本ナス科コンソーシアム年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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