

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05963

研究課題名(和文) アブラナ科植物の花粉・柱頭不和合性機構に関わる因子の遺伝育種学的研究

研究課題名(英文) Genetic analysis of the pollen-stigma incompatibility in *Brassica rapa*.

研究代表者

高田 美信 (Takada, Yoshinobu)

東北大学・生命科学研究科・技術専門職員

研究者番号：30451610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アブラナ科植物の受粉時不和合性機構解明を目標に、自家和合性変異体からの原因遺伝子解明、新規一側性不和合性現象の遺伝的特徴づけを行った。異なる2系統の自家和合性変異体を用いた解析では *Brassica rapa* 第7染色体と第10染色体にそれぞれ原因因子が存在することを明らかにした。また、新規一側性不和合性を示す雌雄両親個体を用いた遺伝分析の結果、原因遺伝子は我々が以前に報告済みである一側性不和合性遺伝子座に座することを明らかにした。一側性不和合性制御遺伝子の配列多型によって複雑な不和合性認識が成立している可能性を示唆する結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自家和合性変異体の解析より明らかになった遺伝子座はいずれも新規因子と考えられた。また、一側性不和合性制御遺伝子の多型により新規な組み合わせでの不和合性現象が生じることが予測され、今後特定の組み合わせで受粉時不和合性を生み出すことができるようになるかもしれない。これら技術は、ハクサイ・カブ等アブラナ科野菜のF1採種効率を上げることに貢献すると考えられる。以上より、今後のアブラナ科植物受粉時不和合性研究において極めて重要な進展を遂げることができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the incompatibility mechanism during pollination in *Brassica rapa* by explaining the causal genes from self-compatible mutants and genetically characterizing a novel unilateral incompatibility (UI) phenomenon. Mapping of two different self-compatible mutant lines revealed the presence of causal factors on chromosomes 7 and 10 of *Brassica rapa*, respectively. Genetic analysis of male and female parents showing a novel UI revealed that the regulating genes locate at the previously reported unilaterally incompatibility locus. This result suggests complex incompatibility recognition may be established by sequence polymorphisms of the UI-regulating genes.

研究分野：植物育種学

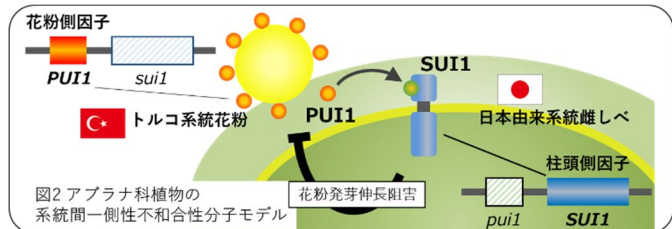
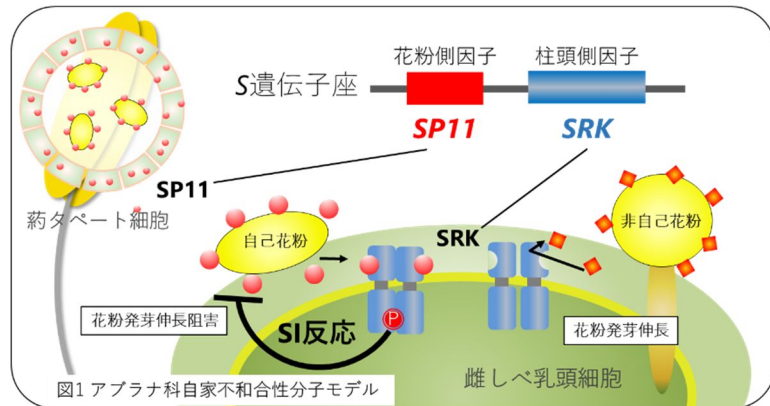
キーワード：アブラナ科植物 自家不和合性 一側性不和合性 柱頭・花粉情報伝達 有性生殖 F1採種

アブラナ科植物の花粉・柱頭不和合性機構に関わる因子の遺伝育種学的研究

1. 研究開始当初の背景

植物にとっては、雌ずいに無作為に運ばれてくる花粉の中から、適切な交配相手を積極的に選択することが集団内の遺伝的多様性を維持しつつ、次世代を安定的に産出するために必要不可欠である。花粉・柱頭情報伝達の結果として起こる**受粉時の交雑不和合性**に関する研究は、作物育種への応用のみならず、生物界における生殖的隔離機構にも関わることから、古くから多くの研究者の興味を引いてきた。この分野の分子機構に関わる研究は自家不和合性(Self-incompatibility, SI)を中心に行われ、現在では多くの植物種で自他認識を担う因子(S遺伝子)が明らかになっている。アブラナ科植物のSIは1遺伝子座(S遺伝子座)に存在する雌ずい因子SRKと花粉因子SP11がそれぞれ受容体・リガンドとして働き、自家受粉時にSアレル特異的に結合することにより、花粉拒絶シグナルが発せられ、結果として自己花粉は柱頭乳頭細胞上に拒絶されることが分かっている(図1)。異なるSアレルを持つ非自己花粉は、SRKとSP11の結合が起こらないため、和合と判断され花粉が発芽し花粉管が伸長する。アブラナ科植物のSI分子機構については、上述したSRK-SP11によるSIシグナルの下流は一部明らかになっているものの、大部分が未解明のままである。これは、SIに関わる因子の単離解析が現状において不十分であることに起因する大きな問題である。

また近年、我々はSI制御遺伝子(SRKとSP11)の遺伝子重複と相互機能喪失による他家花粉認識・拒絶機構を明らかにした。日本由来の特定の系統をめしべ親、トルコ自然集団由来系統を花粉親にしたときに生じるこの他者間不和合性は、雌雄逆交雑では受精に至ることから一方向性の一側性不和合性(UI)であった(図2)。トルコ系統では雌しべ側因子が、日本由来系統では花粉側因子がそれぞれ配列多型や機能喪失といった原因によりリガンド-受容体認識が起こらないと考えられている。自己ではなく他者を認識し拒絶する機構がSI様機構による制御を受けるという興味深い結果といえる。



実用面において、Sハプロタイプの異なる親系統を利用したF₁採種は、古くからアブラナ科植物で広く行われてきた。この採種方法ではSIの強度が非常に重要な形質となる。F₁種子の採取時、自殖種子の混入を避けるための強いSI強度を持つ親系統植物の育成に加えて、親系統の大量採種時にはSI形質を打破する必要がある。つまり、自殖と他殖を高度に制御することでF₁採種が成り立っているといえる。しかしながら、実際の育種現場においてはSI強度の弱体化や、Sハプロタイプ関係を無視した想定外の不和合性が生じ、問題となることが知られている。これら原因の多くは未解決であり、上述したSI分子機構の詳細な解明を含む、アブラナ科植物の受粉時における花粉-柱頭認識、拒絶反応の全体像を明らかにすることが効果的なアプローチと言える。

研究開始当初、我々が独自にハクサイ栽培系統内に見出したSC系統' SC1 'ならびに' SC2 'はS遺伝子ホモ系統との分離世代を育成しており、遺伝分析を開始できる状況であった(図3)。また、花粉側UI形質がホモ遺伝子型でのみ表現型

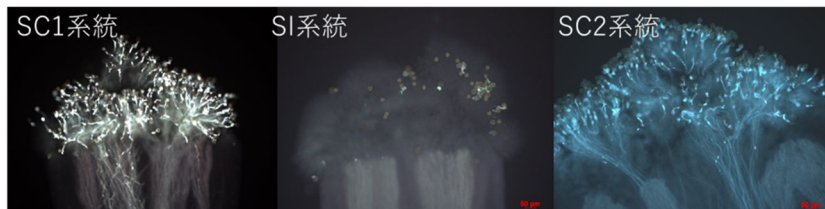
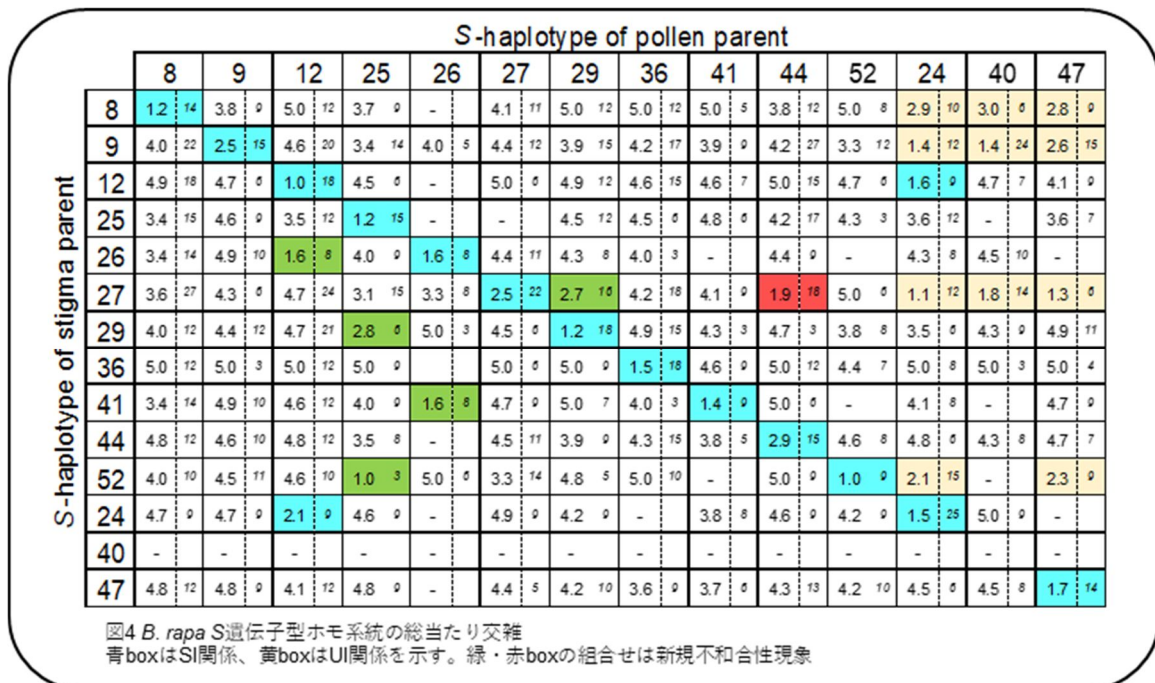


図3 SC変異体SC1, SC2系統自殖時の受粉時表現型

現れるという特徴をもとに、高度に近交化した系統間の検定交配によって、これまでの自家不和合性研究では見出すことができなかった新たな不和合性形質が単離できるのではないかと考えた。そこで、6-7世代の自殖による近交化を経た S 遺伝子型ホモ系統間の総当たり交雑を行い、SI、あるいは既に報告済みの一側性不和合性関係とは異なる新規な不和合性現象を見出していた(図 4)。



2. 研究の目的

本研究では、アブラナ科植物の花粉・柱頭認識、情報伝達系の解明の足がかりとして、自家和合性(Self-compatibility; SC)変異体の原因遺伝子の探索を行った。さらにこれまで全く報告されていない新規な不和合性現象を見出し、その遺伝分析を行った。SC 変異体を用いた研究はまさに、不和合性研究の本流をなすものであり、今後新規な知見を得られると期待できる。また、これまでの S 遺伝子を基盤にした花粉・柱頭認識機構研究では見つけることができなかった新規な不和合現象は、我々が独自の観点で多くの時間をかけて準備・発見したものであり、創造的であるといえる。以上の研究を通してアブラナ科植物の受粉時不和合性現象に關与する遺伝因子を探索し、新たな知見を与えることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、(1)ハクサイ栽培系統中に見出した SC 変異体の原因遺伝子の単離・解析、ならびに、(2) S 遺伝子座に非依存の新規不和合性現象の遺伝分析・マッピングを行った。(1)では我々独自のスクリーニングから得られた SC を示す 2 系統を材料としてそれぞれ 200 個体からなる分離世代の表現型解析と遺伝子型解析を行った。次に、原因遺伝子探索のため QTL-seq 解析を行った。さらに柱頭サンプルを用いたトランスクリプトーム解析を行った。(2)では、新規一側性不和合性(UI)を制御する柱頭側・花粉側双方の因子探索のため、既知の UI 遺伝子座、S 遺伝子座との連鎖解析を行うとともに、SI 関連遺伝子変異体との遺伝分析を行った。

4. 研究成果

(1)ハクサイ栽培系統中に見出した SC 変異体の原因遺伝子の単離・解析

SC1 系統に関しては、SI を示す S²⁷ 系統との分離世代(F₂)の表現型分離比が SI:SC = 10:1 となり複数の原因因子の關与を示唆する結果となった。先行研究において異なる SI 系統を SI 親とした F₂ の解析時には SI:SC = 3:1 と見える結果が得られていたが、個体内の遺伝的多様性、あるいは表現型の評価方法の違い等により、矛盾する結果になったと考えられた。SC2 系統に関してもまた、SI を示す S²⁷ 系統との F₂ の表現型分離比が SI:SC = 10:1 となり複数の原因因子の關与を示唆する結果となった。これら結果から SC1, SC2 系統が同一遺伝子の変異を原因とする SC 化が起こったのではないかと考えられたため、SC1 と SC2 の交雑次代(F₁)の表現型を調査したところ、その表現型は SI となり、SC1 と SC2 は独立した原因因子の変異による SC 系統であることが明らかとなった。

次に分離集団から SI, SC のそれぞれの表現型が強く見られた 15 個体ずつを用い

て、QTL-seq解析を行った。QTL-seq解析に先駆けて、SC1, SC2, S^{27} 系統それぞれの塩基配列を次世代シーケンサーにより決定した。解析の結果、SC1系統は *Brassica rapa* A07染色体に鋭いピークが得られた。A07染色体には *B. rapa* の *S*遺伝子座が座上していることが知られているが、その物理距離と得られたピークとの間は物理的に離れていた(図5)。*S*遺伝子自身との関連を示すため、SP11遺伝子の多型をもとにDNAマーカーを作成し分離世代の遺伝子型を調査したところ、SC表現型と分離する個体が出現したことから、このSC原因遺伝子が *S*遺伝子座に座上する遺伝子ではないことが示された。得られたQTL(SC1)は約1.1Mbの距離にわたっており、この領域には現状では100以上の遺伝子が座上していた。先行研究において、圃場環境下での自殖種子結実率を指標にしたQTL解析から *S*遺伝子座近傍領域にSC化に関連する遺伝子領域が座上することが報告されていた(Hatakeyama *et al.* 2010; DOI, 10.1139/G10-001)。本研究で使用したSC1系統はこの先行研究と同様の位置に原因遺伝子がマップされたことから同一の遺伝子を原因とする可能性が高い。次に同様にSC2系統のQTL-seq解析の結果、A10染色体に有意なピークが得られた。これまでのSI研究において、A10染色体にSI関連因子がマップされたとの報告はなく、完全に新規な遺伝子が関与するものと考えられる。

次に、SC1, SC2系統のめしべ柱頭を用いたトランスクリプトーム解析を行いQTL領域内において柱頭で発現する遺伝子群の探索を行った。発現量・遺伝子内SNPsの有無を指標に原因遺伝子候補をそれぞれ単離した。

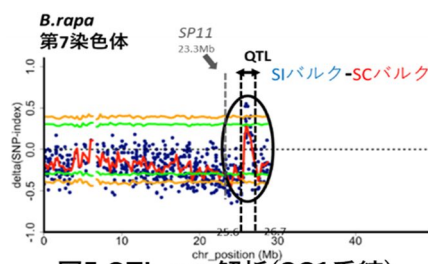


図5 QTL-seq解析(SC1系統)

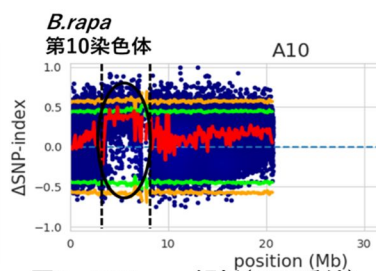


図6 QTL-seq解析(SC2系統)

(2) *S*遺伝子座に非依存の新規不和合性現象の遺伝分析・マッピング

自生・野生集団由来 *B. rapa* の近交系統の育成、総当たり交雑により、異なる *S* 遺伝子型の交配であるにも関わらず、不和合性となる複数の組み合わせを見出した(図4, 青・赤)。これら交雑組合せについて19年度に追試を行った結果、安定した不和合性形質が検出できる一つの組合せ、花粉親 S^{44} 系統、柱頭親 S^{27} 系統を見出した。興味深いことに、 S^{27} 系統柱頭はトルコ系統に対して不和合性を示す UI を持つことを既に明らかにしていた(Takada *et al.* 2017)。つまり、 S^{27} 系統柱頭はトルコ系統花粉以外に S^{44} 花粉を拒絶する機能を有していること。一方で S^{44} 花粉は S^8 , S^9 , S^{62} という他のトルコ系統花粉に対して UI を示す系統に対して、和合性を示すことから、日本とトルコ系統間の UI 現象と本研究で見出した S^{44} 花粉・ S^{27} 柱頭間の UI 現象を区別して解析することが必要であった。そこで、既報の UI を $UI\alpha$ 、新規の UI 現象を $UI\beta$ と名付けた(図7)。次に、 $UI\beta$ 形質に関する遺伝分析を行うため分離世代を育成し、既報の UI 原因遺伝子型、*S* 遺伝子型と表現型の分離を解析し、以下の点について明らかにした。

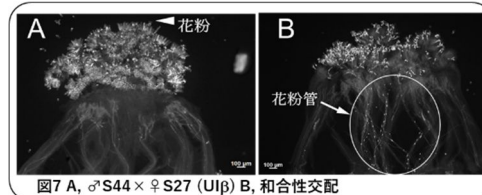


図7 A, ♂S44 × ♀S27 (UIβ) B, 和合性交配

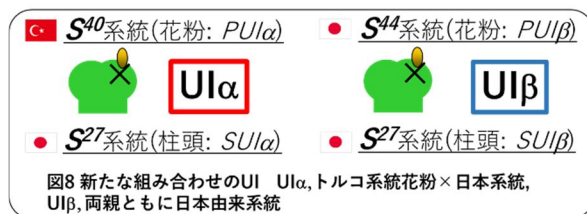
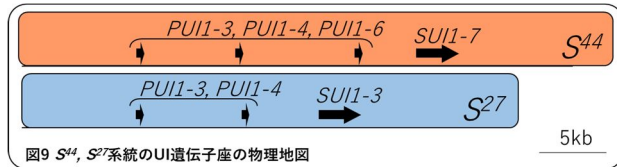


図8 新たな組み合わせの UI $UI\alpha$, トルコ系統花粉 × 日本系統, $UI\beta$, 両親ともに日本由来系統

- $UI\beta$ 形質の花粉側・柱頭側両原因遺伝子は *S* 遺伝子座とは独立の1遺伝子座により制御される。その原因遺伝子領域は $UI\alpha$ 形質の原因遺伝子座である UI 遺伝子座の極近傍に座上。
- 柱頭側 $UI\beta$ 因子は交雑相手に依存して交雑次代 (F_1) での表現型が顕性、潜性と変化
- SI 関連遺伝子の *MLPK* 変異体との連鎖解析により *mlpk/mlpk* 変異体背景では UI 表現型が消失することから、不和合性反応は SI 機構と共通。

以上の結果から、UI β の原因遺伝子は既報のUI 遺伝子そのものではないかと考えられた。そこで両系統のUI 遺伝子座領域の塩基配列をナノポアシーケンスによりけていた(図8)。驚くべきことに、花粉側因子 *PUI1* はゲノム中にタンDEM重複が見られ、花粉側UI β 因子を持つ *S*⁴⁴ 系統では3つの *PUI1* が



座乗することが明らかとなった。いずれかの *PUI1* 単体がUI β の原因遺伝子であるのか?あるいは複数なのかについて、現在までに結論付けられてはいない。しかしながら、*S*⁴⁴ 系統の薬を用いた発現解析を行ったところ、*PUI1-6* 遺伝子は1塩基置換により正常なタンパク質の翻訳がされていないと考えられた。また、*PUI1-3* は *PUI1-4* と比較して発現量が低かったことから、*PUI1-4* 遺伝子がUI β の原因遺伝子として最も有力な候補であると考えられた。現在、SI 関連因子並びにUI 対立遺伝子の機能証明のため遺伝子導入による機能付与、CRISPR/CAS9によるゲノム編集を用いたノックアウト変異体作成に取り掛かっている。

上述した様に、柱頭側原因遺伝子候補となる *SUI1-3* はUI α 形質の花粉側原因遺伝子型である *PUI1-1* を持つ花粉を拒絶する機能があることを既に報告している。従って、*SUI1-3* 遺伝子型は、*PUI1-1* 花粉に加えて *PUI1-4* 花粉を拒絶することを示唆する結果であった。現在までに明らかにしているUI 関連遺伝子 *SUI1*, *PUI1* の遺伝子型間多型性は、*S* 遺伝子 *SRK*, *SP11* に比べてはるかに低いことが分かっている。*PUI1-1* と *PUI1-4* はわずか6アミノ酸の違いであることから、受粉時花粉・柱頭認識に関わる受容体・リガンドの認識特異性について研究するための重要なツールとして利用可能と考えられる。

以上の様に本研究では、新規SI 関連因子の解析ならびに新規UI 形質の遺伝分析を行った。残念ながら世界的な新型コロナウイルス蔓延にともなう研究遅延などの影響を受け、本研究期間内に目的遺伝子の単離にまでは至らなかったが、いずれの形質に関しても、候補遺伝子の選別をすることができた。今後、形質転換、生化学的研究による機能証明につなぐ重要な成果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mayu Ohata, Yoshinobu Takada, Yui Sato, Takumi Okamoto, Kohji Murase, Seiji Takayama, Go Suzuki, Masao Watanabe	4. 巻 -
2. 論文標題 MLPK function is not required for self-incompatibility in the S29 haplotype of Brassica rapa L.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Reproduction	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00497-023-00463-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 Yoshinobu Takada, Atsuki Mihara, Yuhui He, Haolin Xie, Yusuke Ozaki, Hikari Nishida, Seongmin Hong, Yong-Pyo Lim, Seiji Takayama, Go Suzuki, Masao Watanabe	4. 巻 10
2. 論文標題 Genetic Diversity of Genes Controlling Unilateral Incompatibility in Japanese Cultivars of Chinese Cabbage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 2467 ~ 2467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants10112467	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 該当する
1. 著者名 Kazuki Fukushima, Toko Kanomata, Aoi Kon, Hiromi Masuko-Suzuki, Kana Ito, Sadayoshi Ogata, Yoshinobu Takada, Yukihiro Komatsubara, Tsuyoshi Nakamura, Takumi Watanabe, Saori Koizumi, Hitoshi Sanuki, Jong-In Park, Satoshi Niikura, Keita Suwabe, Sota Fujii, Kohji Murase, Seiji Takayama, Go Suzuki, Masao Watanabe	4. 巻 96
2. 論文標題 Spatio-genetic characterization of S receptor kinase (SRK) alleles in naturalized populations of Raphanus sativus L. var. raphanistroides on Yakushima island	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 129 ~ 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.20-00066	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 Takumi Okamoto, Misaki Okamoto, Eri Hikichi, Moena Ogawa, Yoshinobu Takada, Go Suzuki, Seiji Takayama, Masao Watanabe	4. 巻 95
2. 論文標題 Characterization of self-incompatible Brassica napus lines lacking SP11 expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.19-00050	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田美信、清水元樹、鈴木剛、渡辺正夫
2. 発表標題 Brassica rapa の系統間一側性不適合性を支配するUI遺伝子座のゲノム構造比較解析
3. 学会等名 第17回東北育種研究集会2022年11月
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金 あおい, 高田 美信, 清水 元樹, 高山 誠司, 鈴木 剛, 小林 恭士, 渡辺 正夫
2. 発表標題 Brassica rapaにおける小国カブの近交系統間で起きる一側性不適合性を制御する雌雄因子の同定に向けた遺伝学的解析
3. 学会等名 日本育種学会 第141回講演会2022年3月
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金 あおい, 高田 美信, 清水 元樹, 高山 誠司, 鈴木 剛, 小林 恭士, 渡辺 正夫
2. 発表標題 B. rapa近交系統間交雑時に生じた新規受粉時一側性不適合性現象の解析
3. 学会等名 日本育種学会 第140回講演会2021年9月
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

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		
韓国	Sunchon National University	Chungnam National University	