

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06764

研究課題名(和文)非組換え領域S遺伝子座における組換えと非自己認識システムの分子進化

研究課題名(英文)Recombination at apple S locus and molecular evolution of non-self-recognition systems

研究代表者

菊池 真司(KIKUCHI, Shinji)

千葉大学・大学院園芸学研究院・准教授

研究者番号：80457168

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)：本研究は、1 Mbを超え、雄性側の遺伝子のクラスターが存在するリンゴS-locusの組換え頻度を明らかにすることを目的とした。BAC-FISH解析から、減数分裂におけるリンゴS-locus内の組換えが可視化された。次に花粉を1粒ずつからDNAを抽出し、アレル特異的なPCRでジェノタイピングを行うと、減数分裂よりも低い割合で、組換えSハプロタイプを持った花粉が見つかった。さらに、交雑実生のジェノタイピングを行ったところ、組換えSハプロタイプを持つ個体は見つからなかった。この潜在的なS-locusの組み換えは、S-locusの多様性の創成と非自己認識システムの維持に与える可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自家不和合性遺伝子座における雄性側の遺伝子と雌性側の遺伝子は、自他認識システムの崩壊につながるために、それらの間では遺伝的な組換えが抑制されている。しかし、協調的非自己認識システムを持つ植物では、新たに出現した雌性側因子を認識するために、雄性側の因子を多様化し、ハプロイド間で共有する必要がある。これに遺伝的な組換えが必要であると考えた。先行研究と同様、後代で組換えSハプロタイプは見つからなかった(完全連鎖)。一方、減数分裂や花粉で組換えSハプロタイプを発見し、潜在的に自家不和合性遺伝子座内で遺伝的な組換えが起こることを初めて示した。これは、非自己認識機構の分子進化の解明につながる成果と言える。

研究成果の概要(英文)：Self-incompatibility "S-locus" contains male and female specific genes for self/non-self recognition, which are strongly linked. The aim of this study was to clarify the frequency of recombination in ~1 Mb of the apple S-locus, where there is a cluster of male-specific F-box genes, and to discuss the molecular evolution of male-specific genes in the non-self-recognition system. The BAC-FISH analysis visualized recombination within the apple S-locus during meiosis. Next, DNA was extracted from each pollen grain and genotyped by allele-specific PCR. As a result, pollen with recombinant S-haplotype was found at a lower rate than in meiosis. Further genotyping of the cross seedlings did not reveal any individuals with the recombinant S-haplotype. This potential S-locus recombination may be involved in the creation of S-locus diversity and the maintenance of the non-self-recognition system.

研究分野：遺伝育種学、細胞遺伝学

キーワード：自家不和合性 遺伝的組換え 減数分裂 FISH 花粉 ASP-PCR

1. 研究開始当初の背景

自家不和合性遺伝子座 *S*-locus 内では、遺伝的な組換えは起こりにくい。それは、自家受精への変換をもたらすために、自他認識と組換え抑制が一緒に進化したからと考えられる。実際に、リンゴの *S*-locus のなかで遺伝的な組換えを起こした個体は出現しない (Minamikawa et al. 2010)。

リンゴは協調的非自己認識システムを持っていると予想されているが (Kakui et al. 2011)、*S*-locus にある雄性側の遺伝子 *SLFs/SFBBs* (*FBXs*) が進化プロセスの中でどのように生じて、*S* ハプロタイプ間で共有されるのか、その仕組みは十分に分かっていなかった。ペチュニアでは、遺伝的な組換えと同じ分子機構の中にある遺伝子変換が最近まで起こっていたことが明らかになり、*SLFs/SFBBs* の多様化に貢献した可能性が示されていた (Kubo et al. 2015)。

2. 研究の目的

本研究は、*S-RNase* と *SFBBs* 遺伝子を内包し、1Mb を超えるリンゴの *S*-locus (*S3*、*S9* ハプロタイプ) の内での遺伝的な組換えの頻度を明らかにすることを目的とした。交雑実生だけではなく、減数分裂や花粉も解析に加えることで、減数分裂から配偶子 (花粉) 形成、生殖・発生までの中で組換え *S* ハプロタイプの伝達率を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リンゴ品種フロリーナ (*S3S9*) の幼蕾から減数分裂第一分裂終期の染色体標本を作製し、BAC-FISH 解析により、染色体上の *SFBB* 遺伝子をマルチカラー蛍光染色し、*S*-locus 内での組換えを可視化する。

(2) フロリーナ (*S3S9*) の花粉 1 個ずつから DNA を抽出し、全ゲノム増幅の後に、アレル特異的プライマーでそれぞれの花粉がもつ *SFBBs* の遺伝子型を決定する。遺伝子型の決定から、組換え *S* ハプロタイプの有無が明らかになる。

(3) フロリーナ (*S3S9*) の花粉を異なる *S* ハプロタイプを持つ王林 (*S2S7*) の雌蕊に人工受粉し、交雑実生を養成する。各実生から DNA を抽出し、*SFBBs* の遺伝子型を決定する。遺伝子型の決定から、組換え *S* ハプロタイプの有無が明らかになる。

4. 研究成果

(1) はじめに、*S-RNase* または *SFBB* 遺伝子配列を含む *S9* ハプロタイプの BAC から、特異的なシグナルを形成する BAC を選び出した。非特異的なシグナルが形成される BAC については、ブロッキング DNA の使用等、条件検討を行った。

減数分裂第一分裂終期～二分子の細胞に対して BAC-FISH 解析を行ったところ、多くの細胞で *S9* ハプロタイプの BACs が連鎖し、一つの娘細胞へ伝達される様子が観察された (図 1)。一方、染色体末端に近い *S*-locus と動原体の間で組換えが生じ、*S9* ハプロタイプの BAC シグナルが 2 つの娘細胞に分かれて検出された細胞も観察された (図 1)。さらに、動原体に近い *S*-locus の BAC シグナルのみ 2 つの娘細胞に連鎖している細胞も見つかった (図 1)。これは減数分裂において、*S9* ハプロタイプ内で遺伝的な組換えが生じたことを示している。

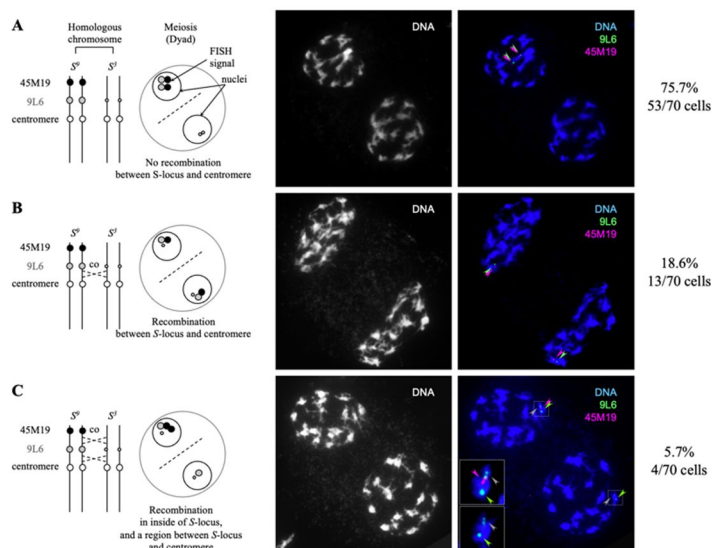


図 1. リンゴ品種フロリーナ (*S3S9*) の減数分裂第一分裂終期における BAC-FISH 解析

BAC-FISH 解析により、*S*-locus (*S9* ハプロタイプ) の両端に位置する BAC を緑と赤で検出している。(A) *S*-locus 内と *S*-locus と動原体の間で組換えが起こっていない細胞。(B) *S*-locus 内では組換えが起こっていないが、*S*-locus と動原体の間で組換えが起こっている細胞。(C) *S*-locus 内と、*S*-locus と動原体の間で組換えが起こっている細胞。灰色の矢頭は、*S3* ハプロタイプで検出される非特異的な 9L6 のシグナル。

(2) 減数分裂細胞で見つかった組換え *S* ハプロタイプが配偶子(花粉)に伝達されているかを調査した。この実験のために、アレル特異的プライマー (ASP) を開発した(図2)。

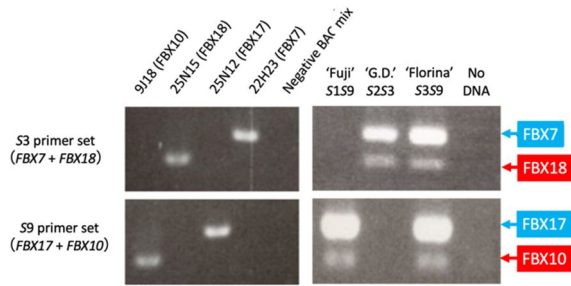


図2 . リンゴ *SFBB* (*FBX*) のアレル特異的プライマー (ASP) の開発

S3 のプライマーセットは、*S3* の *FBX18* と *FBX7* を特異的に増幅する。一方、*S9* プライマーセットは、*S9* の *FBX17* と *FBX10* を特異的に増幅する。

次に、フロリーナ (*S3S9*) の花粉 1 粒ずつを PCR チューブに移し(図3A)、DNA を抽出・ゲノム増幅した後に、ASP-PCR を行った。その結果、ほとんどの花粉は、*S3* または *S9* のハプロタイプを持っていたが、*S3* と *S9* の間の組換え *S* ハプロタイプを持つ花粉も見つかった(図3)。

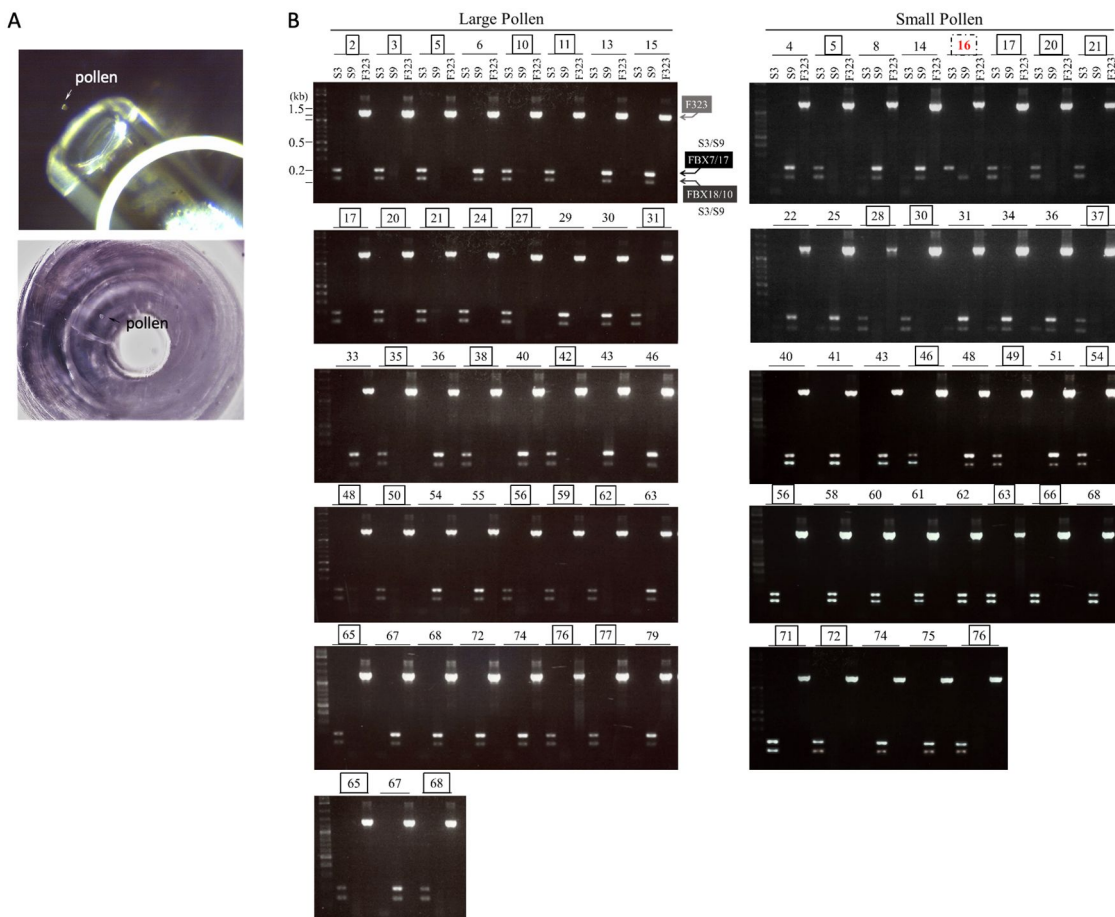


図3 . ASP-PCR 法によるフロリーナ花粉の *SFBB* (*FBX*) 遺伝子のジェノタイプピング
(A) PCR チューブに 1 個の花粉を入れている様子。(B) フロリーナ花粉のジェノタイプピング。
赤字の#16 の花粉が組換え *S* ハプロタイプを持つ花粉

(3) ASP-PCR 法を用いて、フロリーナ花粉 (*S3S9*) を王林 (*S2S7*) に交配して得られた実生の *SFBBs* (*FBXs*) のジェノタイプピングを行った。その結果、*S3* と *S9* ハプロタイプが伝わった実生が分離して現れるなか、これまでに組換え *S* ハプロタイプが伝達された実生は見つからない。解析数を増やしたり、*S3S9* の遺伝子型を持つフロリーナ以外の品種も交雑に用いて実験を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院園芸研究科遺伝育種学研究グループのwebページ
<https://lab-genetics-and-plant-breeding-chiba-univ.jimdosite.com/>

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