

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05564

研究課題名(和文)キクタニギク自家不和合性遺伝子座Csc1原因遺伝子の解析

研究課題名(英文)Characterization of the causative gene of Csc1, an self-compatible locus of *Chrysanthemum seticospe*

研究代表者

中野 道治 (NAKANO, Michiharu)

高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・准教授

研究者番号：40705159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：キクは高次倍数性、自家不和合性のため重要形質の遺伝解析は進んでいない。本研究ではGojo-0ゲノム情報を活用し自家不和合性変異の機構解明を目指した。以前に862kbと狭められた候補領域について解析を進めたところさらに下流の領域が候補と考えられ、この領域内のLRK遺伝子にトランスポゾン挿入が見つかったため候補として解析を進めた。このLRK遺伝子は柱頭で高く発現しており、挿入変異が同一産地内の自家不和合性系統に見られず重要な候補遺伝子と考えられた。Csc1遺伝子がS遺伝子であるかModifier遺伝子であるかを遺伝学的に解析したところ、S遺伝子として作用することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Csc1遺伝子座はキク属において初めての自家不和合性遺伝子であり、その解明はキク育種への貢献だけでなくキク科の自家不和合性機構の解明につながると期待される。本研究でCsc1の理解が進んだが、特にCsc1がS遺伝子として作用することが明らかとなったことは、植物最大の科であるキク科における初めての自家不和合性メカニズムの解明に向けて重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Genetic analysis of important traits in *Chrysanthemum* has not progressed due to polyploidy and self-incompatibility. Our group isolated the self-compatible mutant line AEV02 from the genetic resources of *Chrysanthemum seticospe*. To determine the molecular function of Csc1, a single recessive locus that determines self-compatibility in AEV02, we performed genetic analysis using the recently determined genome sequence of Gojo-0. As a result of genetic analysis using segregating populations, the candidate genomic region was redefined but 862 kb of the previously narrowed genomic region was excluded. In the redefined genomic region, an LTR-type retrotransposon was inserted into an LRK gene, which was highly expressed in the style. We considered it a candidate for an important causative gene and are undergoing transformation experiments. In addition, genetic analysis of whether the Csc1 gene is an S gene or a modifier gene revealed that Csc1 acts as an S gene.

研究分野：園芸学

キーワード：野生ギク 自家不和合性 ポジショナルクローニング

1. 研究開始当初の背景

キクは観賞用花きとして最も重要な花きの一つであるが、高次倍数性、自家不和合性により重要形質の遺伝解析は進んでいない。二倍体種のキクタニギクは分子遺伝学研究の実験材料として用いられているが、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 を育成して研究に利用してきた。AEV02 の有する自家和合性変異(*Csc1*)は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育種への応用、キク科における自家不和合性メカニズムの解明につながると期待される。そのため、これまでに遺伝学的解析を進めることで *Csc1* は劣性で作用する単一遺伝子座に支配されることを明らかにし、ラフマッピングにより原因遺伝子座を連鎖地図上に位置付け、その後の解析により原因遺伝子座候補領域を 862kbp の範囲に絞り込んだ。これらの解析を進めて *Csc1* の分子の実体を明らかにすることを目指して研究を進めた。

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、ポジショナルクローニングによる原因遺伝子同定と関連する機構の解明を目指す。ポジショナルクローニングの解析基盤として Gojo-0 の全ゲノム配列決定を用いて *Csc1* 候補領域の更なるマッピングを行うこと、*Csc1* 遺伝子座が *S* 遺伝子であるか *Modifier* 遺伝子であるかを遺伝学的解析により明らかにすることを目的とする。キク科においては自家不和合性の分子機構は明らかにされておらず、本研究を進めることで園芸学・植物学におけるインパクトの高い成果を挙げることを目指す。

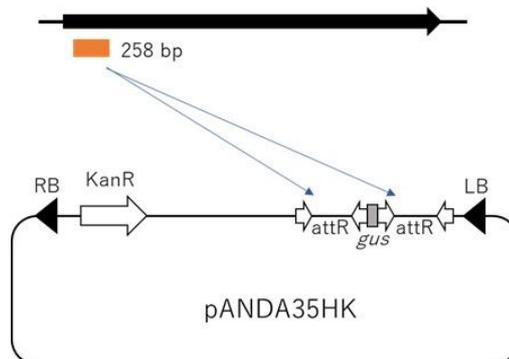
3. 研究の方法

(1) 遺伝学的解析

キクタニギクの野生株である AEV12 系統に自家和合性であるモデル系統 Gojo-0 を交配した F₁ 系統に Gojo-0 もしくは AEV02 系統を交配して作成した BC₁F₁ 集団 539 系統及び BC₂F₁ 集団 100 系統を利用した。

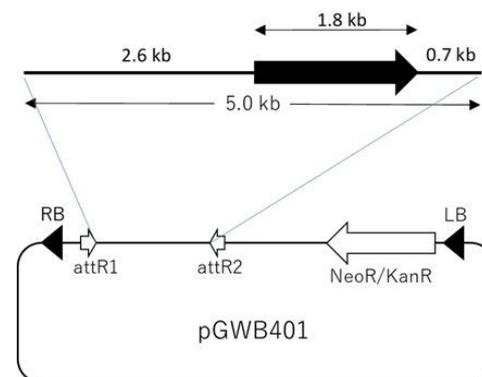
(2) ゲノム解析と遺伝的マッピング

本研究の実施期間中に発表された Nakano *et al.* (Communications biology 4: 1167, 2021) により公表された全ゲノム配列 CsGojo-0_v1 をリファレンスとして用いた。自家不和合性の AEV12 系統、自家和合性の AEV02 系統、Gojo-0 系統のリシーケンスデータを bwa-mem2 によりマッピングし VARSCAN により検出された多型情報に基づき dCAPS、SNP マーカーを設計し *Csc1* 候補領域周辺のマーカー高密度化を進めた。設計されたマーカーを用いて近傍における組換え個体の調査を行った。*Csc1* のマッピングのために 分離集団全体を用いた解析、分離集団の内、自家和合性個体のみを用いた解析の 2 パターンを行い、候補領域の絞り込みを進めた。



(3) コンストラクション

LRK 遺伝子の機能を解析するために RNAi による機能抑制とゲノム断片による相補性検定用のコンストラクトを AEV12 系統のゲノム DNA を利用して作成した (図 1)。RNAi 用コンストラクトとしては pANDA-35HK ベクターを使用し、LRK 遺伝子の 258bp をトリガー配列として導入した。一方、相補性検定用コンストラクトとしては、pGWB401 ベクターを使用し、開始コドンの上流 2.6kbp 及び終止コドンの下流 700bp までを含む約 5kb のゲノム断片を導入した。



(4) *Csc1* 遺伝子座の遺伝的振る舞いの解析

Csc1 遺伝子座が *S* 遺伝子であるか *M* 遺伝子であるかを調べるため、AEV12 × Gojo-1 の F₁ 個体と AEV02 とを使用し、F₁ × AEV02、AEV02 × F₁、F₁ 自殖の 3 通りの交配を行った。交配は自殖を避けるために開花前に葯を有する管状花を除去して舌状花のみとし、舌状花に対してそれぞれの花粉を授粉した。交配後、3 週間以上経過してから頭状花を回収し、種子を乾燥させた後、瘦果数を数えた。

図 1 作成したコンストラクトの構造

4. 研究成果

(1) *Csc1* 遺伝子座候補領域の解析

以前の研究により *Csc1* 遺伝子座は約 862kb の区間に絞り込まれ、本研究開始時点では候補領域内に含まれる SLPK 遺伝子を候補とした。しかしながら、全ゲノム配列決定に伴う新たに予測された遺伝子構造及び発現遺伝子の構造では、SLPK に見られたアミノ酸置換と考えられた変異はイントロンに存在することが確認されたことから周辺領域を含めて変異を再調査した。特に候補領域を制限する個体は組換え個体 1 個体によるものであり更なる組換え個体を得るために分離集団の個体数を増加させて解析を進めた。分離集団を拡大して調査する中で、自家不和合性と評価した系統で花粉形成が少ないために種子が形成されない例があったことから、分離集団の内、自家和合性を示す系統のみを用いてマッピングを進めた。その結果、新たに得られた組換え個体 1 個体により 862kb の範囲が除外されて候補領域の右側の領域が候補となる可能性が示されたため(図 2)、この領域に位置する遺伝子の変異を調べた。その結果、元々の候補領域から約 3Mbp 下流の位置に Gojo-0 ゲノム配列においてエキソン内にレトロトランスポゾンが挿入された遺伝子が存在することが確認された。この変異は AEV02 では変異ホモ型となっていたが、AEV12、AEV13 では変異は存在しておらず AEV02 に固有の変異であると考えられた(図 3)。

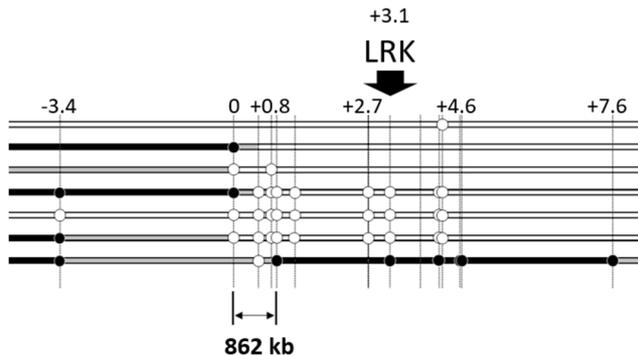


図 2 自家和合性個体を用いた組換え点の検出

はヘテロ型、 はホモ型を示す

Gojo-0 全ゲノム配列の決定において、頭状花序の個々の花が葉状の構造となった *shiboridama* 変異体では *LEAFY* 遺伝子にレトロトランスポゾンが挿入されていることが示されている。このトランスポゾンは LTR 型の sbd-RT として報告しているが、sbd-RT は両 LTR 配列間に多型がなく近代において転移した活性型のレトロトランスポゾンであると考えられた。変異の見つかった LRK 遺伝子について Gojo-0 の配列を調べたところ、約 10kb の挿入を含んでいた。この挿入により LRK 遺伝子は C 末端が欠けるタンパク質をコードすることが予測されると共に、挿入配列の全長は sbd-RT に対して高い相同性を示した。同一産地の自家不和合性系統である AEV12、AEV13 はこの挿入を有しておらず(図 3)、AEV02 の自家和合化に sbd-RT の挿入が関与する可能性が考えられた。この LRK 遺伝子について RNA-seq 解析により各組織での発現を調べたところ柱頭において高い発現が認められ、特に自家不和合性系統(SI)では高く自家和合性系統(SC)では発現が低かったことから *Csc1* の原因遺伝子である可能性が考えられた(図 4)。

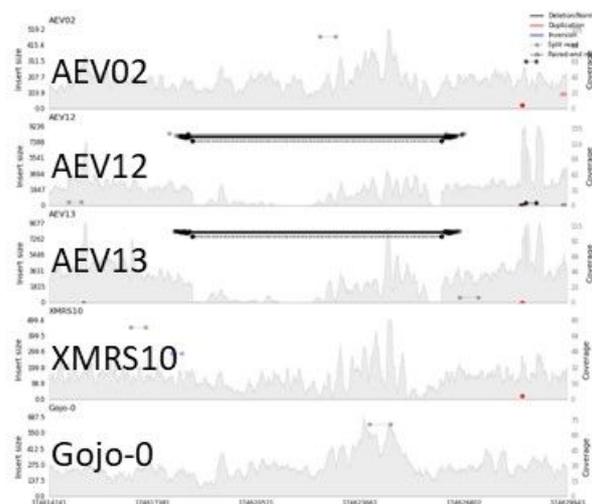


図 3 samplot を用いた構造変異の検出

これらの結果から LRK 遺伝子の関与を明らかにするために相補性検定及びノックアウト作出によりその関連を明らかにすることを目指した。図 1 のコンストラクト 2 種を作成し、pANDA ベクターを用いた RNAi 用コンストラクトは AEV12 系統、相補性検定コンストラクトは Gojo-0 系統に対してアグロバクテリウムを用いたリーフディスク法による導入を試みた。しかしながら、形質転換体を得ることができておらず、これまでのところ LRK の関与を明らかにすることはできていない。

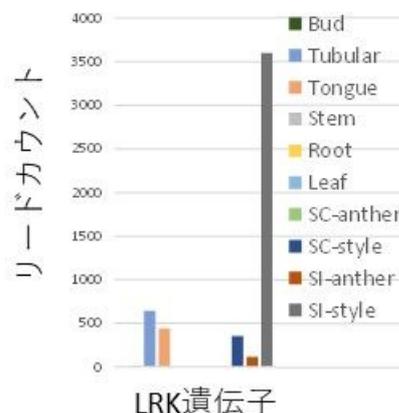


図 4 LRK 遺伝子の組織特異的発現

(2) *Csc1* 遺伝子座が *S* 遺伝子座であるか否か

Csc1 遺伝子座の変異は自家和合性となるが、この変異が *S* 遺伝子によるものか *Modifier* 遺伝子によるものかは明らかではないため、遺伝学的に検証することを目指した。*Csc1* が孢子体型として作用する *S* 遺伝子であると仮定すると AEV02、Gojo-0、Gojo-1 の遺伝子型は S_0S_0 と考えられる。一方、AEV12 × Gojo-1 の F_1 は、 S_1S_0 もしくは S_2S_0 となる。この時、 F_1 × AEV02、

AEV02 × F_1 、 F_1 自殖の 3 種の交雑において、 F_1 × AEV02、AEV02 × F_1 、 F_1 自殖では S_0S_0 との交配となるため種子が形成されるのに対して、 F_1 自殖では同じ *S* 遺伝子型での自殖となるため種子が形成されない。これに対して *M* 遺伝子座の場合は (A)花粉・配偶体型、(B)花粉・孢子体型、(C)雌ずいでの作用の 3 パターンが想定されるが、変異型のアレルがホモ型で作用する場合のみ種子が形成されるため、(A)では F_1 × AEV02、AEV02 × F_1 の全てで種子が形成、(B)では F_1 自殖のみで種子が形成、(C)では F_1 自殖のみで種子が形成となることが想定される。舌状花を用いた交雑試験の結果、 F_1 × AEV02、AEV02 × F_1 では交雑により種子が形成されたが、 F_1 自殖では種子が形成されず、2 系統の独立した試験で同様の結果となった。この結果は孢子体型で作用する *S* 遺伝子を仮定したものと合致しており、*Csc1* は *S* 遺伝子であることが明らかとなった。

表 1 交雑試験の結果

系統1	舌状花数	瘦果数	種子形成率	交雑成否
F_1 × AEV02	151	54	35.8%	yes
AEV02 × F_1	149	13	8.7%	yes
F_1 自殖	62	0	0.0%	no
系統2	舌状花数	瘦果数	種子形成率	交雑成否
F_1 × AEV02	151	77	51.0%	yes
AEV02 × F_1	57	20	35.1%	yes
F_1 自殖	96	0	0.0%	no

以上の研究により、*Csc1* のポジショナルクローニングに向けた解析が進捗し、原因遺伝子候補を得ることができた。この遺伝子に関するコンストラクトを作成し形質転換実験を進めたが、これまでのところ形質転換体を得ることができていない。その理由としてキクタニギクを用いた形質転換技術を研究室内で確立できていないことが挙げられ、再分化過程の条件最適化を進めている。本研究を進めた結果では、これまでに *Csc1* の候補領域とした 862kbp が除外されることとなり更なる解析が必要となった。更なる遺伝学的解析による候補領域の再検討が必要となるが、そのためには新たに自家不和合性系統のゲノム配列をリファレンスとして用いて解析を行うことで改善が期待される。リファレンスとして用いた Gojo-0 全ゲノム配列は自家和合性系統であり、変異により自家不和合性に関わる遺伝子領域を欠失している可能性が考えられる。マッピングにおいて自家不和合性アレルの供与親となった AEV12 の全ゲノム配列を決定してリファレンスとして用いることで正確なマッピングが行える可能性がある。

Csc1 は *S* 遺伝子をコードしていることが明らかとなったが、キク科の *S* 遺伝子の実体はこれまで明らかにされていない。チコリーにおいては、Palumbo *et al.* (2023, *Front. Plant Sci.*, DOI 10.3389/fpls.2023.1204538) により *MIK2* 遺伝子が候補遺伝子として挙げられているが検証にまでは至っていない。今後、*Csc1* 遺伝子座の更なる解析により *S* 遺伝子座の実体が明らかになることでキク科における自家不和合性メカニズムの解明につながれば多大なインパクトを持つ成果となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakano Michiharu, Hirakawa Hideki, Fukai Eigo, Toyoda Atsushi, Kajitani Rei, Minakuchi Yohei, Itoh Takehiko, Higuchi Yohei, Kozuka Toshiaki, Bono Hidemasa, Shirasawa Kenta, Shiraiwa Ippei, Sumitomo Katsuhiko, Hisamatsu Tamotsu, Shibata Michio, Isobe Sachiko, Taniguchi Kenji, Kusaba Makoto	4. 巻 4
2. 論文標題 A chromosome-level genome sequence of Chrysanthemum seticuspe, a model species for hexaploid cultivated chrysanthemum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02704-y	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0件

〔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 (Kusaba Makoto) (20370653)	広島大学・統合生命科学研究科（理）・教授 (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