

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580003

研究課題名（和文）ソバにおける自家不和合性の遺伝的基盤の解明

研究課題名（英文）Clarification of the genetic basis of the buckwheat self-incompatibility

研究代表者

安井 康夫（YASUI YASUO）

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：70293917

研究成果の概要（和文）：ソバ（*Fagopyrum esculentum*）は自家不和合性として知られる栽培上の欠点を持つ。このため他の自殖性の主要穀物と比較して、その収量は低く、不安定である。本研究では次世代シーケンスによる mRNA の配列比較をはじめとする複数の分子遺伝学的手法を利用し、ソバの自家不和合性遺伝子と考えられる新規の遺伝子、*S-LOCUS EARLY FLOWERING 3 (S-ELF3)* の同定に成功した。本研究成果は自殖性ソバ品種の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) has a defective breeding trait, known as self-incompatibility. Thus, the yield of buckwheat is low and unstable comparing with other major self-fertilizing crops. In this study, by using multiple molecular genetic approaches such as mRNA sequence comparisons by new generation sequencing, we identified a new gene, *S-LOCUS EARLY FLOWERING 3 (S-ELF3)* which is the most promising candidate gene for buckwheat self-incompatibility system. Our knowledge obtained from this study will enable to develop self-fertilizing buckwheat cultivars.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物育種・植物遺伝・植物生殖様式

1. 研究開始当初の背景

ソバ（*Fagopyrum esculentum*）は二花柱型自家不和合性を有しており、雌蕊が長く雄蕊の短い長柱花を持つ個体と雌蕊が短く雄蕊の長い短柱花を持つ個体が存在し、異なる

型の花を持つ個体間でのみ交配が可能である（次頁図参照）。この形質は自家不和合性を決定する遺伝子と花型を決定する遺伝子とが緊密に連鎖した2対の*S*対立遺伝子(群)(*S*と*s*)により支配されていると考えられている。

短柱花の遺伝子型は *S/s*、長柱花の遺伝子型は *s/s* であり、短柱花と長柱花の交雑後代には両花型が 1:1 に分離する。これまでに分子遺伝学的な研究が進んでいるアブラナ科、ナス科の同型花型自家不和合性とソバの二花柱型自家不和合性を比較すると、ソバの自家不和合性は孢子体型であるにも関わらず、自己認識の場所が花柱内であること、および表現型を決定する対立遺伝子数が圧倒的に少ないことが分かる。このことからソバにおける自家不和合性の遺伝的基盤の解明は植物の新規の自己・非自己認識機構の発見に繋がると考えられる。



2. 研究の目的

本研究の目的は全く未知である二花柱型自家不和合性に関与する遺伝子群を同定し、植物における新規な自己・非自己認識機構を解明する点にある。また本研究の特色はサクラソウやツルネラとは異なり、世界的に広く栽培されている重要作物を材料として用いる点にある。ソバの育種はその農業上の重要性にも関わらずほとんど進んでいない。これはソバが他殖性であるため、収量が少なく、品種の維持が困難なためである。これまでに日本において *F. esculentum* と自殖性野生種 *F. homotropicum* との雑種後代から自殖性中間品種(九州 PL4 号)が得られているが、実用的な品種は未だに作出されていない。これは *S* 遺伝子関連領域では組換えが極端に抑制されており、*F. homotropicum* 由来のゲノム領域を完全に取り除くことができないためであると考えられる。*S* 遺伝子本体の同定は本研究から得られる最大の結果であり、この結果を TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes)法に応用すれば、即座に *S* 遺伝子のみをノックアウトした栽培自殖性ソバの作出が可能となる。本研究は自殖性ソバの作出による品種改良と品種維持を可能とし、ソバ育種への新たな道を切り開くものである。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンシングを利用した RNA 配列の比較

短柱花および長柱花個体の雌蕊からそれぞれ RNA を抽出し、cDNA 化した後にイルミナ次世代シーケンサーGAIIx で塩基配列を決

定した。アセンブルプログラムで作成した短柱花の雌蕊の cDNA 配列のコンティグと長柱花の雌蕊より得られた cDNA 配列とを比較することにより、短柱花個体特異的なコンティグを得た。さらに、これらのコンティグ上に PCR プライマーを設計し、RT-PCR により短柱花個体特異的に発現する遺伝子 (*SSGs*) のスクリーニングを行った。

(2) 重イオンビーム変異体の作成

ネオンイオン (^{20}Ne 135 MeV/u) を 75~100 Gy で照射し、照射当代 (M_1 世代) の 1,400 個体を栽培し、花型を調査した。

(3) *SSG2* および *SSG3* を用いたサザンハイブリダイゼーション

SSG2 および *SSG3* の断片をプローブとして用い、短柱花および長柱花個体より抽出した total DNA に対してサザンハイブリダイゼーションを行った。

(4) *SSG2* および *SSG3* のマッピング

1,373 個体の集団を用いて *SSG2* および *SSG3* のマッピングを行い、花型との連鎖関係を調査した。

(5) アソシエーション解析

ソバの種内における *SSG2* および *SSG3* の有無と花型形質間のアソシエーション (関連) を調査するため、ブータン (6 集団)、中国 (20 集団)、インド (14 集団)、ネパール (14 集団)、パキスタン (14 集団)、日本 (12 集団)、ヨーロッパ (14 集団) の各集団から短柱花および長柱花個体を任意に 1 対ずつ選び、PCR により *SSG3* の有無を調査した。

(6) 各器官での *SSG2* および *SSG3* の転写パターンの調査

短柱花個体の根、茎、葉、雄蕊、雌蕊の各器官より RNA を抽出し、RT-PCR により *SSG2* および *SSG3* の転写パターンを調査した。

(7) 分子進化的解析

ソバに近縁な 2 種の二花柱型自家不和合性を持つ野生種、*F. cymosum* と *F. urophyllum*、および自殖性野生種 *F. tataricum* と自殖性中間品種 (九州 PL4 号) を材料とし、PCR およびサザンハイブリダイゼーションを用いた *SSG3* (*S-ELF3*) の検出を行い、それらの塩基配列決定と比較を行った。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンシングを利用した RNA 配列の比較

次世代シーケンシングより得られた短柱花および長柱花個体の cDNA 配列を比較することにより、15 本の短柱花個体特異的なコ

ンティグが得られた。これらの 15 コンティグの発現を RT-PCR で確認・比較したところ、4 本のコンティグ (SSG1- SSG4) が短柱花の雌蕊においてのみ、発現していることが分かった。

(2) 重イオンビーム変異体の作成

短柱花個体でありながら、側枝の花形態が長柱花形質に枝変わりしたキメラ変異体を 1 個体得ることに成功した。キメラ変異体の長柱花部位ではゲノム上の *S* 遺伝子座を含む領域に欠失が生じたため、短柱花から長柱花へと形質がシフトしたと考えられる。本変異体の短柱花部位および長柱花部位から DNA を抽出し、(1) で得られた SSG1- SSG4 のプライマーを用いて PCR 増幅を試みたところ、SSG1 および SSG4 では短柱花部位でも、長柱花部位でも PCR 増幅が確認され、SSG2 および SSG3 では短柱花部位でのみ、PCR 増幅が確認された。このため、SSG1 および SSG4 はソバの二花柱型自家不和合性形質には関係ないと結論づけた。さらに SSG2 および SSG3 の全長をクローニングし、塩基配列を確認した。BLASTX 検索の結果、SSG2 と同一性の高い配列は検出されなかったが、SSG3 はアラビドプシスの転写因子 EARLY FLOWEING 3 と同一性を示した。

(3) SSG2 および SSG3 を用いたサザンハイブリダイゼーション

SSG2 および SSG3 の断片をプローブとして用い、短柱花および長柱花個体より抽出した total DNA に対してサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、SSG2 および SSG3 はソバの短柱花ゲノムに特異的に存在することが分かった。この結果は SSG2 および SSG3 が *S* 対立遺伝子特異的に存在することを示す。また SSG2 においてはサイズの異なる複数のバンドが長柱花個体でも検出され、SSG2 と同様の働きを持つと予想されるホモログ遺伝子の存在が示された。一方、SSG3 ではバンドは 1 本しか検出されず、SSG3 が短柱花個体にしか存在しない単一遺伝子であることが示された。

(4) SSG2 および SSG3 のマッピング

1,373 個体の集団を用いてマッピングを行ったところ、全ての短柱花個体において SSG2 および SSG3 の増幅がみられ、全ての長柱花個体で増幅は見られなかった。このことから SSG3 の遺伝子座は *S* 遺伝子座と非常に強く連鎖していることが分かった (遺伝距離 = 0.0-0.4 cM)。

(5) アソシエーション解析

世界の集団から収集した 47 個体の短柱花および長柱花個体を対象として、SSG2 および

SSG3 断片を PCR 増幅したところ、すべての短柱花個体で PCR 増幅が見られ、全ての長柱花個体で PCR 増幅が見られなかった。アソシエーション解析の結果と上述の重イオンビームによるキメラ変異体の解析、サザンハイブリダイゼーション解析、およびマッピング解析の結果を併せて、EARLY FLOWEING 3 と同一性を持つ SSG3 は *S* 遺伝子座に存在すると考え、SSG3 を *S-LOCUS EARLY FLOWEING 3 (S-ELF3)* と命名した。

(6) 各器官での SSG2 および S-ELF3 (SSG3) の転写パターンの調査

短柱花個体の根、茎、葉、雄蕊、雌蕊の各器官より RNA を抽出し、SSG2 および S-ELF3 の転写パターンを調査したところ、SSG2 では全ての器官で転写が見られ、S-ELF3 では雄蕊および雌蕊の生殖器官でのみ転写が見られた。S-ELF3 は単一遺伝子であり、短柱花ゲノム (*S* 対立遺伝子) にしか存在しないことを併せると、S-ELF3 はソバの短柱花形質を制御する因子であると考えられた。

(7) 分子進化的解析

PCR 増幅およびサザンハイブリダイゼーションの結果、ソバに近縁な 2 種の二花柱型自家不和合性を持つ野生種、*F. cymosum* および *F. urophyllum* においても S-ELF3 は短柱花ゲノムに特異的に存在することが分かった。これら 2 種のソバ属植物はソバ属の成立した約 1,350 万年前に分岐したと考えられ、進化的に非常に長い時間において S-ELF3 は短柱花ゲノムにのみ存在してきたことが分かった。また、自殖性野生種 *F. tataricum* では S-ELF3 にレトロトランスポソンの挿入とナンセンス変異が生じており、さらに自殖性中間品種 (九州 PL4 号) においても S-ELF3 にナンセンス変異が生じていることから、S-ELF3 は自殖性種にとって不要な遺伝子であることが分かった。

以上の結果から S-ELF3 はソバの短柱花形質の発現に重要な役割を果たしていることが分かった。また自殖性中間品種 (九州 PL4 号) において S-ELF3 にナンセンス変異が生じていることから、重イオンビームや EMS による突然変異を栽培品種の S-ELF3 に誘導することにより、新たな自殖性ソバ品種を作出できる可能性が高いこと期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Tomiyoshi M, Yasui Y, Ohsako T, Li C, Ohnishi O (2012) Phylogenetic analysis of *AGAMOUS* sequences reveals the origin

of the diploid and tetraploid forms of self-pollinating wild buckwheat, *Fagopyrum homotropicum* Ohnishi. *Breed Sci* 62: 241-247. (査読あり)
doi: 10.1270/jsbbs.62.241

② Yasui Y, Mori M, Aii J, Abe T, Matsumoto D, Sato S, Hayashi Y, Ohnishi O, Ota T (2012) *S-LOCUS EARLY FLOWERING 3* is exclusively present in the genomes of short-styled buckwheat plants that exhibit heteromorphic self-incompatibility. *PLoS ONE* 7: e31264. (査読あり)
doi:10.1371/journal.pone.0031264

③ Yoshida Y, Ueno S, Honjo M, Kitamoto N, Nagai M, Washitani I, Tsumura Y, Yasui Y, Ohsawa R (2011) QTL analysis of heterostyly in *Primula sieboldii* and its application for morph identification in wild populations. *Ann Bot* 108: 133-142. (査読あり)
doi: 10.1093/aob/mcr117

[学会発表] (計 4 件)

① 安井康夫、「次世代シーケンスを利用したソバの二花柱性関連遺伝子の同定」、第 25 回植物バイオテクノロジーシンポジウム「植物遺伝学とバイオテクノロジー」(招待講演)、2012 年 12 月 10 日、京都産業大学(京都市)

② 相井城太郎、「ソバの二花柱性関連遺伝子 *S-LOCUS EARLY FLOWERING 3* の同定」、日本育種学会第 122 回講演会、2012 年 9 月 15 日、京都産業大学(京都市)

③ 安井康夫、「ソバ属の自殖性植物における *S-LOCUS EARLY FLOWERING 3* 遺伝子の崩壊」、日本育種学会第 122 回講演会、2012 年 9 月 15 日、京都産業大学(京都市)

④ 安井康夫、「重イオンビームを利用したソバの二花柱型自家不和合性遺伝子領域の同定」、理研シンポジウム「重イオンビーム利用の新展開」(招待講演)、2012 年 1 月 20 日、独立行政法人理化学研究所(和光市)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①名称：自家不和合性制御因子をコードする核酸

発明者：安井康夫、森正之

権利者：国立大学法人京都大学、石川県公立大学法人

種類：特許権

番号：PCT/JP2012/075055

出願年月日：2012 年 9 月 28 日

国内外の別：国外

②名称：自家不和合性制御因子をコードする核酸

発明者：安井康夫、森正之

権利者：国立大学法人京都大学・石川県公立大学法人

種類：特許権

番号：特願 2011-212758

取得年月日：2011.9.28

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.kyoto-u.ac.jp/contentarea/ja/issue/research_activities/documents/2012/no.3/p22.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 康夫 (YASUI YASUO)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：70293917

(2) 研究分担者

森 正之 (MORI MASASHI)

石川県立大学・生物資源工学研究所・准教授

研究者番号：00320911

相井城太郎 (AII JOTARO)

新潟薬科大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：10391591

(3) 連携研究者

大田 竜也 (OTA TATSUYA)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・准教授

研究者番号：30322100