

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450002

研究課題名(和文) サツマイモ野生2倍体種の自家不和合性における自他認識因子の決定

研究課題名(英文) Identification of S genes of *Ipomoea trifida*, a wild relative of sweetpotato

研究代表者

土屋 亨 (Tsuchiya, Tohru)

三重大学・地域イノベーション推進機構・准教授

研究者番号：30293806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：サツマイモ野生2倍体種は孢子体型自家不和合性を示し、S候補遺伝子としてAB2、SE2、SEAが同定されている。雄側S遺伝子を決定するために、S1-AB2ペプチドを合成して受粉時に供するバイオアッセイを行ったところ、S1柱頭にS1-AB2ペプチドを処理した際にS3花粉が拒絶されたことから、AB2が雄側のS遺伝子である可能性が強く示唆された。雌側S遺伝子を決定するためにS1-S候補遺伝子をS10系統に導入したが交配実験には至らなかった。そこで自家不和合性系統4系統と自家和合性系統2系統の*I. trifida*と*I. nil*のS遺伝子座を比較したところ、SEAが雌側のS遺伝子である可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ipomoea trifida have sporophytic self-incompatibility system. In *I. trifida*, AB2 gene were identified as male S-candidate gene, SE2 and SEA genes were identified as female S-candidate genes. To determine male S-gene of *I. trifida*, S1-AB2 peptides were chemically synthesized and applied to S1 homozygous stigma before pollination with S3 pollen. According to this bioassay, it is strongly suggested that AB2 may act as male S-gene, because pollinated S3 pollen were not germinated on the S1 stigma. To determine female S-gene of *I. trifida*, S1-S candidate genes were introduced into S10 homozygous *I. trifida*, however, S-gene was not determined by this experiment because of low fertility of transgenic pollen grains. To determine S-genes of *I. trifida*, comparative analysis were carried out with S-loci sequences from 4 self-incompatible *I. trifida* lines and 2 self-compatible *I. trifida* and *I. nil* lines. From this analysis, AB2 and SEA genes were identified as predominant genes for S-genes in *I. trifida*.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：自家不和合性 サツマイモ野生種 自他認識 S遺伝子

1. 研究開始当初の背景

江戸時代に救荒作物として日本各地に広まったヒルガオ科 (*Convolvulaceae*) に属するサツマイモ栽培種 (*Ipomoea batatas*) は交配不和合性を示すため、同一の不和合群に属する品種・系統間の交配は不可能であることから、効率的な交配育種の妨げとなっている。高等植物の自家不和合性は、雌雄の生殖器官が正常に発達するにも関わらず、自殖および同一の自家不和合性表現型 (*S* 表現型) を示す個体間の交配を行った際に種子が得られない現象である。この自他認識は多くの場合、単一の自家不和合性複対立遺伝子座 (*S* 遺伝子座) に座乗する雌雄それぞれの自他認識因子をコードする遺伝子 (*S* 遺伝子) によって制御されている。

I. batatas の交配不和合性は、その祖先種であるサツマイモ野生 2 倍体種 (*I. trifida*) で認められる胞子体型自家不和合性と同一の機構により制御され、自殖した際には花粉管の発芽が抑制されるが、その分子的機構は既に研究が進んでいるアブラナ科植物 (*Brassicaceae*) とは異なり、アブラナ科植物で適用可能な人為的な自家不和合性打破 (CO_2 処理や蕾受粉など) を適用することはできない。

このことから、ヒルガオ科独自の自家不和合性機構を解明することは、自家不和合性の進化・獲得・多様化のメカニズムを解明するのみならず、農業上重要な *I. batatas* の自家不和合性の人為的打破により効率的な交配育種をもたらすことに繋がる。

2. 研究の目的

本研究の研究代表者らの過去の研究により、中南米に自生する *I. trifida* の集団より 49 の *S* 遺伝子型が同定され、*S* 遺伝子座上に座乗し、自家不和合性の自他認識に直接的に関与すると考えられる、雌雄生殖器官で特異的に発現する *S* 候補遺伝子 (雄側: *AB2*、雌側: *SE2*, *SEA*) を同定した。本研究では、これら *S* 候補遺伝子から *S* 遺伝子を絞り込み、将来的に *I. batatas* の自家不和合性の人為的制御を行うための基礎的知見を得ることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

雄側の *S* 候補遺伝子である *AB2* が真の *S* 遺伝子であることを決定するために、*Sr-AB2* のアミノ酸配列を 6 つの断片に分けて合成し、受粉時に供するバイオアッセイを行うことにより合成したペプチド配列が自他認識に関与するか否かを確認した。

また、*SrS* 候補遺伝子である *Sr-AB2*, *Sr-SE2*, *Sr-SEA* の各遺伝子について、2kbp

のプロモーター領域から 1.5kbp のターミナー領域までの遺伝子領域を PCR により増幅してバイナリーベクターに導入し、アグロバクテリウムを介して *I. trifida* に導入した。この *I. trifida* への形質転換実験の報告は過去に 1 報のみであったことから、同じヒルガオ科に属するアサガオ (*I. nil*) やサツマイモ (*I. batatas*) の形質転換条件を参考に、効率的な形質転換系の確立を同時に行った。

更に、塩基配列レベルから真の *S* 遺伝子を探るべく、既に明らかになっていた *S₁* および *S₁₀S* 遺伝子座領域に加え、新たに、自家不和合性系統である *S₃*, *S₂₉*、自家和合性突然変異系統である *S_c* の *S* 遺伝子座を解析し、これに本研究期間内に決定・発表された自家和合性を示すアサガオの全ゲノム配列より *S* 遺伝子座相当領域を抽出し、比較ゲノム解析を行った。

4. 研究成果

Sr-AB2 の cDNA 配列から推定される成熟アミノ酸配列に基づき 6 種のペプチドを合成した (図 1)。これら 6 種のペプチド溶液 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を受粉前の *S₁* 柱頭に供した後に *S₃* 花粉を受粉するバイオアッセイを行ったところ、花粉管伸長の抑制が観察された (図 2) ことから、*AB2* が雄側の *S* 遺伝子である可能性が強く示された。



図 1. 合成した *Sr-AB2* ペプチド配列

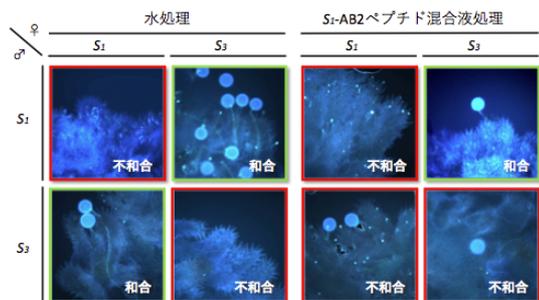


図 2. *Sr-AB2* ペプチドを供したバイオアッセイ

S 遺伝子として機能する *S₁-S* 候補遺伝子を *S₁₀* ホモ型系統に導入した場合、*S₁* は *S₁₀* に対して優性であるため、形質転換体において優劣性の制御が正確に働いた場合は *S₁* の表現型に、働かない場合は *S₁* と *S₁₀* の表現型を示すはずである。そこで、*S₁-S* 候補遺伝子を PCR により増幅し、バイナリーベクターの T-DNA 上に、全身発現性のプロモーターにより制御される GFP 遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子

とともに導入した (図 3)。

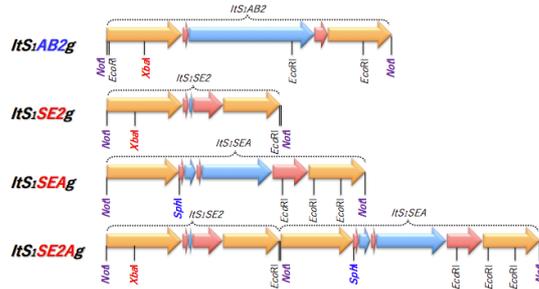


図 3. パイナリーベクター上に導入した *S* 候補遺伝子

この遺伝子を *I. trifida* に導入するための諸条件を検討したところ、基本培地を 1/2MS 培地とし、胚性カルス誘導期間:6 週間以内、共存培養期間:4 日、選抜培養期間:28 日、不定胚誘導期間:4~8 週間が最適であることが示され、各遺伝子を導入した形質転換体を獲得するに至った (図 4)。しかし長期の培養の影響によるためか花粉稔性が低く交配実験に至らず、現在、花粉稔性を回復中である。

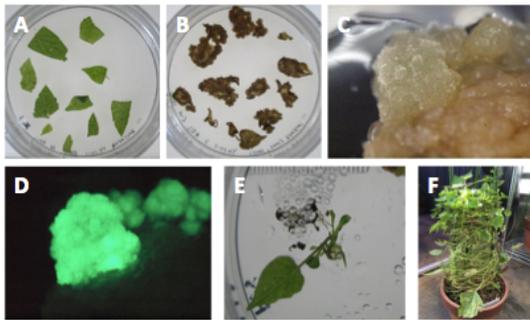


図 4. *I. trifida* への *S*₁-*S* 候補遺伝子の導入

A: 共存培養、B: 胚性カルス誘導、C: 胚性カルス
D: 胚性カルスでの GFP 発現、E, F: 再分化個体

I. trifida の *S* 遺伝子座領域および *Inil* の *S* 遺伝子座相当領域のゲノム配列を比較解析したところ、自家不和合性系統においては *S* 遺伝子座領域中の多型性に富む領域が自家不和合性系統に比べて長く、雌雄の *S* 遺伝子の強い連鎖から開放されている可能性が示唆された (図 5)。また、*S* 候補遺伝子のうち *AB2* と *SEA* は全ての自家不和合性系統に存在していたものの *SE2* は *S*₃ 系統には存在せず、また自家不和合性系統において *S* 候補遺伝子の多くが破壊されていたものの、*Inil* には *SE2* が機能する形で存在していた (図 5)。以上の結果より、ヒルガオ科の *S* 遺伝子を *AB2* (雄側) と *SEA* (雌側) と判断したが、その決定は形質転換体の交配実験後に行う。

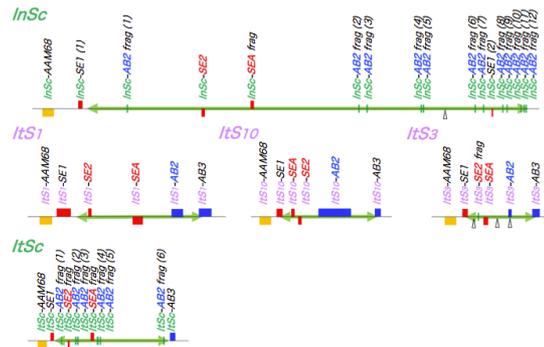


図 5. ヒルガオ科植物の *S* 遺伝子座領域の構造
矢印が多型性に富む領域、*frag* は各遺伝子の断片を示す

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 1 件)

- ① Taeko Miyazaki, Sergei L. Kondrashev, Tohru Tsuchiya. Visual pigment genes and absorbance spectra in the Japanese sardine *Sardinops melanostictus* (Teleostei: Clupeiformes). *Comparative Biochem Physiol, Part B*. 218, 54–63, 2018. DOI: 10.1016/j.cbpb.2018.02.006. 【査読有】

[学会発表] (計 3 件)

- ① 土屋 亨. ヒルガオ科植物の自殖性と他殖性. 第 81 回日本植物学会 (招待講演). 2017 年 9 月. 東京理科大学
- ② 土屋 亨・畠中 幸・地割 聖. ヒルガオ科植物の自家不和合性遺伝子座の再解析. 第 9 回アサガオ研究集会. 2017 年 3 月. 名城大学
- ③ 土屋 亨. サツマイモ野生 2 倍体種の自家不和合性研究の現状. 第 8 回アサガオ研究集会. 2015 年 3 月. 筑波大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

土屋 亨 (TSUCHIYA, Tohru)
三重大学・地域イノベーション推進機構・
准教授
研究者番号：30293806

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()