

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006-2008  
 課題番号：18380006  
 研究課題名 (和文) ソバ二花柱型自家不和合性の分子機構の解明とその進化的解析  
 研究課題名 (英文) Clarification of the molecular mechanism of the buckwheat distyly system and evolutionary analysis on it  
 研究代表者  
 安井 康夫 (YASUI YASUO)  
 京都大学・農学研究科・助教  
 助研究者番号：70293917

研究成果の概要：他殖性植物であるソバは自家花粉を受精することができない。このため品種の純化が難しく、イネやコムギなどと比べてその育種は進んでいない。われわれは自殖性ソバの作出の基盤を築くため、ソバの他殖性遺伝子の同定を試みた。本研究により、ソバの他殖性遺伝子はほとんど組換えを起こさない染色体領域に座上することが明らかになり、さらに本遺伝子を含むか、もしくはその極近傍の領域の同定に成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	11,600,000	3,480,000	15,080,000

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・遺伝・植物生殖様式の進化

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 二花柱型自家不和合性の分子機構

自家不和合性は植物で頻繁に観察される生殖機構であり、自家花粉の受精を花柱内もしくは花柱上で阻止し、種内の遺伝的な多様性を維持している。自家不和合性には①花の形態が複数存在し、異なる型の花を持つ個体間でのみ交配 (受精) が可能な異型花型と②花の形態には多型のない同型花型が見られる。さらに異型花型自家不和合性は2つの花型が見られる二花柱型と3つの花型が見られる三花柱型とに分類される。ソバ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。古典遺伝学的な研究から二花柱型自家不和合性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対のハプロタイプ ( $S$ と  $s$  対立遺伝子) 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  $Ss$ 、長柱花の遺伝子型は  $ss$  であり、短柱花と長柱花の交雑後代には両方の花型が1:1に分離する。これまでに同型花型自家不和合性に関する分子遺伝学的な研究がアブラナ科、ナス科を中心に進められてお

り、*S*遺伝子座には数多くの対立遺伝子が存在することが分かっている（例えばアブラナでは 100 程度）。これは突然変異により新しく生じた対立遺伝子が、平衡淘汰により集団中に維持されやすいためと考えられる。ソバの *S*遺伝子座にはたった 2 種類 (*S*と *s*) しか対立遺伝子が存在しないことから、ソバの *S*遺伝子では自家不和合性に関して新たな形質を持つ対立遺伝子が生じたいと言える。ソバの自家不和合性における自己・非自己の認識機構が同型花型自家不和合性の機構と異なるため、対立遺伝子数に大きな差が生じるのであろう。事実、ソバの自家不和合性は胞子体型で、配偶体型であるナス科の自家不和合性とは自家不和合性の分子機構は異なっており、さらにソバと同じく胞子体型自家不和合性を示すアブラナ科とは自家花粉の認識の場が異なる（ソバは花柱内、アブラナは柱頭上）。これらの差異から二花柱型自家不和合性と同型花型自家不和合性とは、その分子機構が異なっており、ソバの二花柱型自家不和合性にはこれまでに発見されていない新規の自己・非自己認識機構が関与していると考えられる。

## (2) ソバ育種の現状と自殖性ソバ作成の重要性

ソバは栽培期間が短く、やせ地においても生育力、生産量が落ちないことから世界の温帯地域で広く栽培されている。また子実中に良質のタンパク質や血圧降下作用をもつルチンを多量に含むことから、機能性食品としても注目されている。しかしながらこのような農業上の重要性にも関わらず、ソバの育種はこれまでほとんど行われてこなかった。ソバは収量が少ないとともに、他殖性植物であるため品種の維持が困難であることが大きな要因であると考えられる。ソバの二花柱型自家不和合性の分子機構の解明は、自殖性ソバ品種の作出を可能としソバ育種に大きく貢献する。さらに *S*対立遺伝子と除草剤抵抗性遺伝子を密に連鎖させた組換え体を作成すれば、*S*遺伝子に関して常にヘテロである短柱花個体の選抜、ひいてはソバの一代雑種育種が可能となる。

## (3) ソバ属植物の繁殖様式の進化

我々の研究グループを中心に、これまでに様々な繁殖様式を示すソバ属植物の存在が明らかにされ、それらの種間の系統関係が調査されてきた。これらの中には同型花型自家不和合性を示す種 (*F. homotropicum* 等の 3 種)、二花柱型自家不和合性を示す種 (*F. callianthum* 等の 3 種) が存在し、花柱性と自家不和合性が複数回にわたって失われて

いることが明らかにされている。このようなユニークな花柱性を持つソバ属植物を用いることにより、植物における生殖様式の多様性および自己・非自己認識システムの進化機構について、分子レベルでその変遷を解明することができる。

## 2. 研究の目的

C. Darwin の著書「Different forms of flowers」に掲載されているように、多くの植物において花の形態多型は自家不和合性と密接に関係している。しかしながら、その分子遺伝学的な機構は全く明らかにされていない。本研究の最大の目的はダーウィンの時代より多くの生物学者の謎であった二花柱型自家不和合性の分子機構の解明にある。これまでの古典遺伝学的手法を用いた研究により、二花柱型自家不和合性には自家不和合性を決定する遺伝子と雄しべと雌しべの形態を制御する遺伝子が関与し、これらの遺伝子が緊密に連鎖して *S complex locus* を形成していると考えられている。このため我々は連鎖した複数の遺伝子群を一度にクローニングすることが可能なポジショナルクローニング法により、ソバの *S*遺伝子群の同定を試みた。また転写産物の空間的・時間的な発現を明らかにし、その分子機構の詳細を解明することを試みた。本研究の成果は植物生殖システムにおける分子進化学的研究を新たな視点から展開可能とするものである。さらに本研究から得られる知見は今後のソバ育種の要となる自殖性品種作出と一代雑種育種の基盤となるであろう。

## 3. 研究の方法

(1) ポジショナルクローニングのため、以下の 3 点を行った。

### ① マッピング集団の構築

1 対の親個体由来する BC<sub>1</sub>-F<sub>3</sub> 集団から 8 個体ごとに長柱花個体をバルクし、総計 1,840 個体から total DNA を抽出した。さらに BC<sub>1</sub>-F<sub>4</sub> および BC<sub>1</sub>-F<sub>5</sub> 集団からそれぞれ 4,416 および 1,392 個体の total DNA を抽出した。

### ② 連鎖マーカーの作成

Genomic-AFLP により *S* 遺伝子に連鎖するマーカーを調査した。また短柱花個体および長柱花個体の雌しべより抽出した cDNA をテンプレートに用いて cDNA-AFLP を行い、*S* 遺伝子に連鎖するマーカーを調査した。

### ③ ゲノミックウォーキング

ゲノムカベレッジ 7.6 倍の BAC ライブラリーを用いてゲノミックウォーキングを行った。ウォーキングの基点には Genomic-AFLP、cDNA-AFLP およびゲノミ

ックウォーキングの過程により得られた3つの完全連鎖マーカーを用いた。尚、ウォーキング時のライブラリスクリーニングには BAC クローンのエンド配列から設計された短柱花個体に特異的な増幅を示す PCR プライマーを用いた。

## (2) アソシエーション解析

*S* 遺伝子と完全連鎖する 3 つの PCR マーカー (#dM1、#Y3、#Y5) およびゲノミックウォーキングにより得られた短柱花個体に特異的な増幅がみられる PCR マーカーを利用してアソシエーション解析を行った。中国 (10 集団)、ヨーロッパ (7 集団)、インド (7 集団)、日本 (6 集団)、ネパール (6 集団)、パキスタン (6 集団) およびブータン (3 集団) から短柱花および長柱花個体を 1 個体ずつ任意に選び、total DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。

## (3) 次世代シーケンサーによる BAC コンティグの塩基配列決定

二花柱性とアソシエーションが見られた Y3 マーカー周辺の BAC コンティグ (15 クローン) の塩基配列を次世代シーケンサー (Solexa 1G シーケンサー) を用いて断片的に決定した。得られた塩基配列をアセンブルした後、BLAST 解析による相同性検索を行った。

## (4) cDNA-AFLP

長柱花と短柱花の雌しべでの転写産物の差を比較するため、両花の雌しべから得られた cDNA をテンプレートに用いた cDNA-AFLP を行った。

## (5) ソバの形質転換

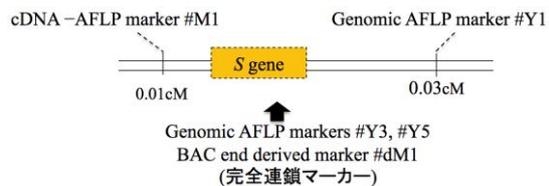
小島等(2000)の *in planta* 形質転換法に従ってソバの形質転換を行ったが、形質転換個体を作成するに至らなかった。現在は脱分化-再分化系の構築とアグロバクテリウムを用いた再現性の高い形質転換系の構築を試みている。

## 4. 研究成果

### (1) ポジショナルクローニング

*S* 遺伝子と連鎖する genomic-AFLP および cDNA-AFLP マーカーの作成と約 7,600 個体のマッピング集団を用いた連鎖解析の結果、*S* 遺伝子を 0.04cM の範囲に限定することができた (下図)。さらに 3 つの *S* 遺伝子完全連鎖マーカー (#Y3、#Y5、#dM1) を得ることができた。得られた 3 つの完全連鎖マーカーよりゲノミックウォーキングを行った。#Y3、#Y5 および #dM1 からそれぞれ 15、25 および 5 つの BAC クローンからなるコンティグ

を作成することができた。



### (2) アソシエーション解析

*S* 遺伝子と完全連鎖する #dM1、#Y5 マーカーとこれらの周辺の短柱花特異的プライマーを用いた場合、花柱性と PCR の増幅には有意な相関が見られなかった。このことから #dM1 および #Y5 マーカー周辺の領域は *S* 遺伝子との間で組み換えを起こしていることが示唆された。これらのマーカーの近傍領域には *S* 遺伝子は座していないと考えられる。しかしながら #Y3 およびその周辺の短柱花特異的 PCR マーカーを用いた場合、多くの短柱花個体で PCR 増幅が見られ、ほとんどの長柱花個体では増幅が見られなかった ( $P < 10^{-10}$ )。このことは #Y3 周辺のゲノム領域では組み換えが極端に抑えられており、この領域内もしくは極近傍に *S* 遺伝子が座していることを示している。

### (3) 次世代シーケンサーによる BAC コンティグの塩基配列決定

アソシエーション解析により、#Y3 マーカー周辺に *S* 遺伝子が座する可能性が高いことが示されたため、その周辺の BAC コンティグ (15 クローン) の塩基配列決定を行った。Solexa 1G シーケンサーにより 9,128,484 本の 36 mer の断片を得ることができた。これらの配列を Velvet (Zerbino and Birney, 2008) を用いてアセンブルした結果、6,181 本のコンティグ (総塩基数 612,861bp) が得られた。これらの配列を BLAST 検索したところ、タンパクをコードする 5 つの遺伝子 (N-グリカン合成関連遺伝子、リパーゼ遺伝子、タンパク質輸送遺伝子、メチルトランスフェラーゼ遺伝子、転写因子) の断片が存在することが明らかになった。ただし、これらの遺伝子の一部は偽遺伝子化していることが示され、現在個々の遺伝子について詳細を検査している。

### (4) cDNA-AFLP

cDNA-AFLP の電気泳動において総計約 6,400 本の DNA 断片を検出した。このうち 9 断片で短柱花に強いシグナルが見られた。これらの DNA 断片の内部配列を用いて RT-PCR を行ったところ、2 組のプライマーでは短柱花に強いシグナルが見られた。これらの 2 つの遺伝子は細胞壁の合成とペクチン分解に

関与する遺伝子であり、花柱の成長や花粉管伸長の阻害などを担っている可能性が示された。今後、マッピングを行いS遺伝子との連鎖関係を調査する必要がある。

#### (5) ソバの形質転換

アグロバクテリウムを用いた安定的なソバの形質転換を確立することを目指し、まずソバの脱分化—再分化系を確立した。子葉と胚軸を材料に用いたところ、胚軸を用いた場合に脱分化および再分化の効率が高いことが分かった。脱分化時の植物ホルモンの濃度を2,4-D 1mg/L、再分化時ではBA 2mg/LおよびIAA 0.1mg/Lとした場合にその効率が高いことが示された。

#### (6) 研究総括と今後の課題

本研究において AFLP 法により S 遺伝子の極近傍マーカーを得ることができた。SNPs のようにゲノム情報を、また SSR のように多額の開発コストを必要としない AFLP では迅速に大量の DNA マーカーのスクリーニングが行える。本研究においてもその威力を遺憾なく発揮することができ、7,600 個体のマッピング集団において S 遺伝子と完全連鎖するマーカーを得ることができた。またマッピングとアソシエーション解析の結果、S 遺伝子は #Y3 マーカー周辺に座上することが明らかとなり、そのゲノム領域では遺伝的な組換えが他の領域と比べ極端に抑えられていることが分かった。今回のように非常に長い領域でほとんど組み換えが起こらない例は性染色体以外には知られていない。他の植物の自家不和合性の領域と比べても遺伝的な組換えが抑えられており、マッピングとゲノミックウォーキングに予想外の時間とコストを費やすこととなってしまった。しかしながら S 遺伝子がこの領域内（もしくは極近傍）に存在することは間違いなく、今回見つけた5つの遺伝子のいくつかが S 遺伝子の一つである可能性も十分に考えられる。今後、これらの遺伝子の転写解析を行い、cDNA ライブラリーを用いて転写産物のスクリーニングを行う必要がある。同時に #Y3 マーカー周辺のゲノミックウォーキングを継続し、次世代シーケンサーを利用した塩基配列の決定を行うことが重要であろう。今回次世代シーケンサーには比較的成本のかからない Solexa 1G シーケンサーを採用したが、非常に短い配列 (36bp) しかリードできないため、長鎖のコンティグを得ることができなかった (平均 100bp 程度)。今後は 1 リードあたり 300bp 程度の解読が可能なパイロシーケンサー (Life Science 社 GS-FLX System 等) を用いて塩基配列決定を行う必要があると痛感した。パイロシーケンサーは Solexa 1G シーケンサーに比べエラーが多く見られ

ることから、両技術を併用し欠点を補完していくことが望まれる。今回の研究からマッピングおよびアソシエーション解析で S 遺伝子を数 kbp の範囲に限定することは不可能であると分かった。しかしながら本領域は遺伝子密度が非常に低い (600kbp にわずか 5 遺伝子)、塩基配列データから S 遺伝子を数個の候補遺伝子に絞り込むことは十分に可能であると考えられる。さらにこれらの結果から得られた候補遺伝子の絞込みには転写解析とソバの形質転換が必要不可欠である。転写解析に関してはすでに雌しべの cDNA ライブラリーの構築と cDNA-AFLP を行っており、技術的に問題は無い。一方でソバでは再現性の高い安定した形質転換系がいまだに報告されておらず、今後早急に対処しなければならない問題の一つとして残された。

本補助金により我々は BAC ライブラリーの構築、ソバの S 遺伝子のマッピング、および S 遺伝子周辺の BAC のコンティグ作成に成功し、C. Darwin の時代より、多くの研究者の謎であった二花柱型自家不和合性の分子レベルでの解明まであと一歩に迫ることができた。現在、サクラソウ (University of Leeds, England) およびツルネラ (York University, Canada) においても二花柱型自家不和合性遺伝子の同定が行われつつある。これらの海外の研究機関の後塵を踏むことにならぬよう、なんとしても近年中に世界に先駆けて S 遺伝子の全貌を明らかにしたい。

#### 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 Yasuo Yasui, Masashi Mori, Daiki Matsumoto, Ohmi Ohnishi, Clayton G. Campbell and Tatsuya Ota Construction of a BAC library for buckwheat genome research: an application to positional cloning of agriculturally valuable traits. *Genes & Genetic Systems* 83: 393-401 (2008). 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① 大田竜也 「ソバ異花柱型自家不和合性遺伝子のポジショナル・クローニング」 日本遺伝学会 (第 78 回大会) 2006 年 9 月 27 日 つくば国際会議場
- ② 大田竜也 「ソバ二花柱型自家不和合性遺伝子のポジショナル・クローニングにむけて」 日本進化学会 (第 9 回大会) 2007 年 9 月 1 日 京都大学
- ③ 安井康夫 「ソバにおける二花柱型自家不和合性遺伝子および半わい性遺伝子のポジショナルクローニングに向けて」 日本

育種学会（第 112 回大会） 2007 年 9 月  
22 日 山形大学

- ④ 大田竜也 「ソバにおける自家不和合性に関する遺伝子の探究」 染色体学会（第 58 回大会）・染色体コロキウム（第 17 回大会）2007 年合同年会 2007 年 11 月 28 日 総合研究大学院大学・葉山キャンパス
- ⑤ 大田竜也 「Positional cloning of *self-incompatibility complex loci in buckwheat *Fagopyrum esculentum**」 遺伝研国際シンポジウム ゲノム進化の新視点から基礎生命活動を探る 2008 年 3 月 27 日 如水会館
- ⑥ 大田竜也 「植物における自家不和合性について」 国立遺伝学研究所研究会<中立進化論の現在> 2008 年 7 月 28 日 国立遺伝学研究所

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大西 近江 (OHNISHI OHMI) (2006 年度)  
京都大学・農学研究科・教授  
研究者番号：20109044  
安井 康夫 (YASUI YASUO) (2007-2008 年度)  
京都大学・農学研究科・助教  
研究者番号：70293917

### (2) 研究分担者

安井 康夫 (YASUI YASUO) (2006 年度)  
京都大学・農学研究科・助教  
研究者番号：70293917  
大田 竜也 (OTA TATSUYA) (2006-2007 年度)  
総合研究大学院大学・先導科学研究科・准教授  
研究者番号：30322100  
森 正之 (MORI MASASHI) (2006-2008 年度)  
石川県立大学・生物資源工学研究所・准教授  
研究者番号：00320911

### (3) 連携研究者

大田 竜也 (OTA TATSUYA) (2008 年度)  
総合研究大学院大学・先導科学研究科・准教授  
研究者番号：30322100

### (4) 研究協力者

森 真理 (MORI MARI) (2006-2007 年度)  
天津地域農業改良普及センター・農業経営課・主査