

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380002

研究課題名(和文) 種間不和合性・雑種胚崩壊性関与遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of genes responsible for interspecific incompatibility and hybrid embryo breakdown

研究代表者

西尾 剛(Nishio, Takeshi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30301039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：Brassica rapaのBrassica oleracea花粉に対する種間不和合性のQTLを第2染色体の3.7 Mb領域内に絞り込み、その領域の遺伝子の塩基配列分析により種間不和合性遺伝子の候補として3つの遺伝子を見出した。B. rapaのRaphanus sativusとの属間交雑における雑種胚崩壊性に関わる2つのQTLを複数年の調査により明らかにし、QTL領域にある雑種胚崩壊性遺伝子の候補としてBrFIEaとBrMS11aを明らかにした。興味深いことに、これらのQTLはBrassica napusやBrassica nigraとの種間交雑における雑種胚崩壊にも関わる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：A QTL for interspecific incompatibility of Brassica rapa to Brassica oleracea pollen was delimited to 3.7-Mb region on chromosome 2, and three genes were found to be candidates for the interspecific-incompatibility gene by nucleotide sequencing of genes in this region. Two QTLs for hybrid embryo breakdown of B. rapa in intergeneric hybridization with Raphanus sativus were detected in repeated investigations, and BrFIEa and BrMS11a were identified as candidates for the genes participating in hybrid embryo breakdown. Interestingly, these QTLs may also be responsible for embryo breakdown in interspecific hybridization with Brassica napus and Brassica nigra.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：種間交雑 生殖的隔離 不和合性 胚発達 アブラナ

## 1. 研究開始当初の背景

種間不和合性や雑種胚崩壊、雑種不稔等の生殖的隔離機構は、種の分化や成立機構に関わる重要な特性であるが、雑種不稔については過去の細胞遺伝学的研究の蓄積があるものの、種間不和合性についての研究はこれまでほとんどなされていない。分子機構の解明が植物の多くの特性について進んでいるが、それらの研究においては、関与遺伝子の同定により分子機構の解明が進んだ例が多い。受精時の花粉管誘引に関わる遺伝子が見出されている (Okuda et al 2009, Juan-Miguel et al. 2009) が、種間不和合性については、古典遺伝学的解析もほとんどなされてこなかったため、本特性に関わる遺伝子や分子機構は明らかになっていない。

種間不和合性は、異種間で受粉されても受精できない特性で、異種花粉管の伸長阻害の様子が自家不和合性と類似し、自己花粉管が柱頭組織への侵入阻害を受ける自家不和合植物では異種花粉管も柱頭組織への侵入阻害を受け、花柱内で自己花粉管が伸長阻害を受ける自家不和合種では異種花粉管も花柱内で伸長阻害を受ける。アブラナ類では自家不和合性の分子遺伝学的解析が進んでおり、自己認識機構に関わる花粉側と柱頭側の認識分子遺伝子が同定された (Stein et al. 1991, Suzuki et al. 1999)。研究代表者らは、*Brassica oleracea* 花粉に対して不和合性を示す *Brassica rapa* 品種と和合性を示す *B. rapa* 品種を用いた遺伝分析により、種間不和合性は量的形質であり、QTL は自家不和合性に関与する *S* 遺伝子や *M* 遺伝子近傍には検出されず、第 2 連鎖群にあることを明らかにした (Udagawa et al. 2010)。

雑種胚崩壊も多くの植物種で広く見られる現象であるが、アブラナ類ではそれを克服するための胚培養技術が古くから開発され、種・属間雑種の作出に利用されてきた。アブラナの種・属間雑種作出の研究で、雑種胚崩壊が起らず胚培養なしに種・属間雑種が得られる組合せが見出されている。*Brassica* 属とその近縁植物は、交配が容易な上、生殖機構の研究が進んでおり、かつシロイヌナズナのゲノム情報を活用できるため、生殖的隔離

機構の研究を行う上で優れた研究材料である。*B. rapa* ではゲノムの塩基配列が部分的に解読された (*Brassica rapa* Genome Sequencing Project Consortium 2011)。研究代表者らは、シロイヌナズナゲノムとのシンテニーを明らかにする上で有用な EST-SNP マーカーを多数作成し、その連鎖地図も構築してきた (Li et al. 2009)。これらのことから、種間不和合性や雑種胚崩壊性の遺伝子が解明できる条件が整ってきた。

## 2. 研究の目的

生殖的隔離機構、特に種間不和合性と雑種胚崩壊の分子機構を明らかにするため、これら特性についての研究が進んでおり、独自の研究材料があり、ゲノム研究の情報が蓄積してきたアブラナ類を材料として、その特性に関わる遺伝子を同定する。具体的には、種間不和合性の *Brassica rapa* 種内の雌側系統間差の QTL を既に見出しているため、その遺伝子領域を絞り込み原因遺伝子を解明して、その機能を明らかにすると共に、同じ遺伝子が他種との生殖的隔離にも関与しているかどうかを明らかにする。また、これまでに見出した雑種胚崩壊性に関わる QTL を確認し、その遺伝子領域を絞り込み、遺伝子の同定を図る。

## 3. 研究の方法

### (1) 種間不和合性 QTL 領域の絞り込み

*B. oleracea* 花粉に対し *B. rapa* の ' はるさかり P04 ' 系統の柱頭は強度の種間不和合性を示すが、STS32 系統は種間不和合性を示さない。柱頭の種間不和合性の強度は量的形質であり、その強度に関わる *B. rapa* の QTL を第 2 連鎖群に見出しているため、*Brassica rapa* Genome Sequencing Project Consortium 2011 の塩基配列情報を利用して多数の SNP マーカーを作成した。SNP マーカーの分析は、研究代表者らが独自に開発した Dot-blot-SNP 法を用いた。戻し交雑集団から、その領域全体あるいは一部をヘテロで持ち、その他ゲノム領域がほとんど反復親型 (STS32 型) ホモの個体を選抜した。

### (2) 雑種胚崩壊性 QTL の検証と領域の絞り込み

チーフハクサイはダイコンとの交雑にお

いて強度の雑種胚崩壊性を示すが、聖護院カブはその程度が低く、胚培養なしでも属間雑種が得られる。チーフハクサイと聖護院カブの F<sub>2</sub> を用いて雑種胚崩壊性の QTL 解析を行い、第 1 連鎖群に作用力の大きい QTL を見出しているが、用いたマーカー数が少なく、反復試験を行っていないため、300 程度の DNA マーカー(主として SNP マーカー)を作成し、別の F<sub>2</sub> 集団を用いて属間雑種で得られる雑種種子数を調査し、QTL の検証を行った。

### (3) QTL 領域における遺伝子の発現と変異の解析

絞り込んだ原因遺伝子を含む領域の遺伝子をそれぞれ特異的に増幅するプライマー対を作成し、リアルタイム PCR により柱頭や胚珠における遺伝子発現を調査した。また、同じプライマー対を用いて両親のゲノム DNA を増幅し、塩基配列を決定して変異を解析した。

### (4) 種間不和合性 QTL と雑種胚崩壊性 QTL における原因遺伝子の推定

QTL 領域にある遺伝子の変異を SNP マーカーとし、染色体部分置換系統の後代でマーカー間の組換え型個体を選抜し、種間不和合性及び雑種胚崩壊性の評価を行って、系統間差の原因遺伝子の領域を更に絞り込む。

### (5) 種間不和合性の候補遺伝子の機能の証明と解析

種間不和合性関与遺伝子の候補を植物体に導入するためのベクターを作成し、反復親の形質転換を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 種間不和合性 QTL 領域の絞り込み

*Brassica rapa* の柱頭の *Brassica oleracea* 花粉に対する種間不和合性の QTL の領域を絞り込むため、第 2 染色体の QTL の領域に 20~300kb 間隔で 14 の SNP マーカーを作成した。種間不和合性 QTL の効果を確認するため、QTL 領域が 1 回親(はるさかり P04 型)でその他が反復親型の系統を作成し、2 回戻し交雑して BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub> 世代を得た。作成した 14 の SNP マーカーを用い、QTL 領域が 1 回親でその他が反復親型の系統を作成したが、夏期の異常高温により枯死したため、もとの親系統に戻り、再度系統の作り直しを行った。

BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 世代の 296 個体を用い、QTL 領域の 8 の SNP マーカーで遺伝子型を決定し、組換えが見られた 36 個体を得た。これらについて、更に 10 の SNP マーカーで遺伝子型を決定した。これらの個体を用いて *B. oleracea* 花粉に対する種間不和合性を調査し、SNP マーカーごとに遺伝子型別に種間不和合性強度を比較し、5% レベルで有意差が見られた SNP マーカーが Bra026529 から KBrS003M22s の 2.5 Mb 領域であったため、これらの両隣のマーカー Chr2\_847 から Bra026650 間の約 3.7 Mb が種間不和合性の原因遺伝子を含むと考えられた(図 1)。

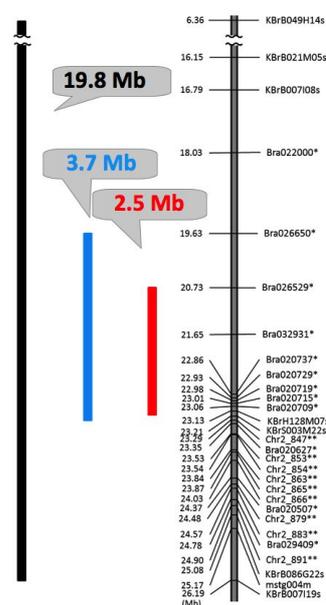


図 1. 種間不和合性遺伝子の座乗領域

### (2) 雑種胚崩壊性 QTL の検証と領域の絞り込み

*B. rapa* とダイコンで属間交雑を行うと、多くの組合せでは雑種種子が得られず、雑種胚が途中で退化するが、聖護院カブではわずかながら小さな種子が得られ、その種子は発芽して雑種個体を得られる(図 2)。*B. rapa* とダイコンの属間交雑における雑種形成能の QTL 解析の反復試験のため、2010 年に雑種形成能評価を行った F<sub>2</sub> 個体の SNP マーカーの遺伝子型分析と QTL 解析を行った。これまで、第 1、第 3、第 10 連鎖群に QTL を検出していたが、その内の第 1 と第 10 連鎖群の QTL を再度検出した。第 1 連鎖群の QTL はチーフハ

クサイ型が、第 10 連鎖群の QTL は聖護院カブ型が雑種形成能を高める相加効果を持ち、第 1 と第 10 連鎖群の QTL はエピスタシスを示し、第 1 連鎖群 QTL はチーフハクサイ型で第 10 連鎖群 QTL が聖護院カブ型の場合に、著しく高い雑種形成能が示された (図 3)。第 1 と第 10 連鎖群の QTL 内の遺伝子で SNP マーカーを作成し、*B. rapa* の 15 系統のこれら遺伝子の遺伝子型を分析し、属間交雑での雑種子形成能を調査したところ、遺伝子型によって雑種子形成能に差があることが分かり、これら QTL の効果が *B. rapa* の異なる系統でも確認できた。

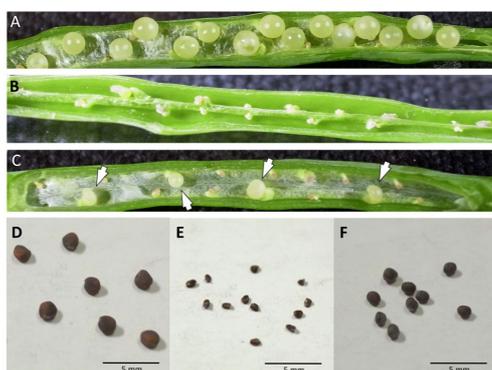


図 2. *Brassica rapa* の種子の発達  
A, D: 種内交雑、B, E: チーフハクサイ × ダイコン花粉 C, F: 聖護院カブ × ダイコン花粉

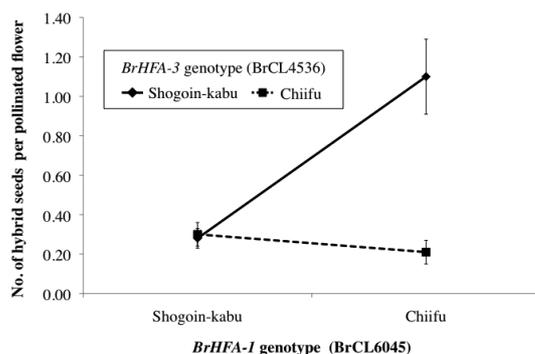


図 3. 属間交雑種子形成における 2 つの遺伝子座のエピスタシス効果

### (3) QTL 領域における遺伝子の発現と変異の解析

種間不和合性 QTL 領域の Chr2\_847 から Bra026650 間の約 3.7 Mb に対応するシロイヌナズナゲノム領域には、450 遺伝子が座乗していた。自家不和合性の雌蕊側の認識には受

容体プロテインキナーゼが自己花粉の認識に関わることから、受容体プロテインキナーゼを中心に、その他関連が示唆される遺伝子を合わせて、21 の遺伝子を候補とした。その内の 1 つは、塩基配列の特異性がなく増幅用のプライマーを設計できなかったが、他の 20 遺伝子について、特異的プライマーを設計し、RT-PCR で柱頭と葉における遺伝子発現を解析した。その結果、*Bra033053*、*Bra026610*、*Bra033085*、*Bra032942* では、種間不和合系統と種間和合系統の間で柱頭における発現レベルに顕著な差が見られた。*Bra033085* は、シロイヌナズナで植物の代謝、エネルギーバランスを制御していることが知られている AKIN11 をコードする遺伝子のオルソログであり、種間不和合性に関わる可能性は低いと考えられた。*Bra033053* では、種間和合系統の対立遺伝子の発現レベルが著しく低かったが、開始コドンの上流約 1.6 kb の位置に約 2 kb の挿入が見出された。*Bra026610* は種間不和合系統で発現レベルが低かったが、開始コドンの上流約 1.9 kb の位置で、種間和合系統では 183bp の塩基配列があるのに対し、種間不和合系統では 20 bp となっていた。*Bra032942* は、種間和合系統でゲノム DNA も増幅しなかったことから、コード領域を調べたところ、エキソン 6 からエキソン 7 の領域が種間和合系統で欠失していることが分かった。*Bra033053*、*Bra026610*、*Bra032942* のいずれも受容体プロテインキナーゼをコードする遺伝子であり、種間不和合性に関わる可能性が示唆された。

第 1 と第 10 連鎖群の QTL はシロイヌナズナで胚発生に関与することが知られている *FIE* と *MSII* が座乗するシロイヌナズナゲノム領域とシンテニーがあるため、*B. rapa* のオルソログ遺伝子 *BrFIEa* および *BrMSIIa* を単離した。F<sub>2</sub> の両親間でこれら遺伝子の塩基配列を比較したところ、聖護院カブは *BrFIEa* 遺伝子に、チーフハクサイは *BrMSIIa* 遺伝子にそれぞれフレームシフト変異を持つが、チーフハクサイの *BrFIEa* 遺伝子と聖護院カブの *BrFIEa* 遺伝子は正常であることを見出した (図 4、図 5)。これらの遺伝子を正常型ホモで持つ個体は、両方が変異型ホモの個体

よりもダイコンの属間交雑で有意に多数の雑種種子を形成することが分かった。

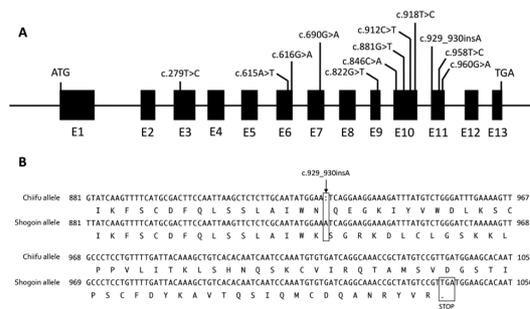


図 4. *BrFIEa* 遺伝子の構造と変異

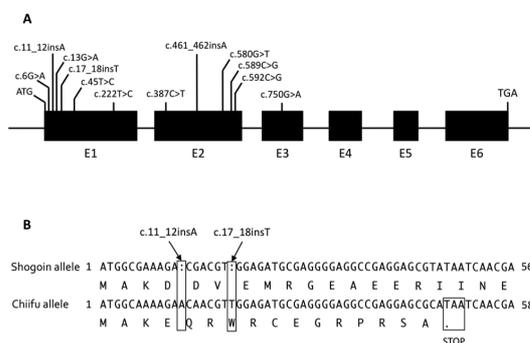


図 5. *BrMSIIa* 遺伝子の構造と変異

#### (4)種間不和合性 QTL と雑種胚崩壊性 QTL における原因遺伝子の推定

*Bra033053*、*Bra026610*、及び*Bra032942*で種間不和合系統と種間和合系統の間のDNA多型を検出できるDNAマーカーを作成したが、更に原因遺伝子の領域を絞り込むための系統作成は、2013年の夏期の高温により系統を失ったため、進まなかった。

ダイコンとの属間交雑における*B. rapa*の雑種形成能の第1と第10連鎖群のQTLにそれぞれ座乗する*BrFIEa*と*BrMSIIa*のフレームシフト変異を検出するDNAマーカーを用い、*B. rapa*の15系統の遺伝子型を分析し、遺伝子型が異なる3系統を選んで*B. nigra*、*B. oleracea*、*B. napus*の花粉で種間交配を行い、雑種種子形成能を調査した。*B. oleracea*では雑種種子は得られなかったが、ダイコンとの属間交雑で高い雑種種子形成能を示した遺伝子型のハクサイ系統が、*B. nigra*や*B. napus*との種間交雑で

も高い雑種形成能を持つことを見出した。特に、*B. napus*との種間交雑では、高い雑種種子形成能の系統では1莢あたり11.5粒の種子が得られたのに対し、‘聖護院カブ’では1莢あたり1.1粒と大きな差が見られた。しかしながら、次年度の2度の反復調査の内の1回で、ダイコンとの属間交雑で高い雑種種子形成能を示した遺伝子型のハクサイ系統が*B. napus*との種間交雑で高い雑種形成能を示さなかったことから、再度の反復調査が必要となった。

*BrFIEa* と *BrMSIIa* にはそれぞれ別に2つのパラログがあるため、それらの遺伝子発現を調査した。いずれも2つの内1つが発現しており、それらをそれぞれ *BrFIEb*、*BrMSIIb* と名付けた。シロイヌナズナでは *FIE* と *MSII* の機能を失った突然変異はいずれも不稔であるが、*B. rapa* では、*BrFIEa* と *BrMSIIa* にフレームシフト変異があっても、*BrFIEb*、*BrMSIIb* により補われることで種子が得られるものと考えられた。

#### (5)種間不和合性の候補遺伝子の機能の証明と解析

*BrFIEa* と *BrMSIIa* の機能型の対立遺伝子をそれぞれの機能欠失型系統に導入した形質転換体を作成するため、*BrFIEa* と *BrMSIIa* の機能型対立遺伝子のcDNAをそれぞれのプロモーターにつないで形質転換用ベクターに挿入したコンストラクトを作成し、形質転換体作成を試みている。*BrMSIIa* のチーフハクサイへの導入は、チーフハクサイの再分化能が低いことから、困難であった。そのため、チーフハクサイと同じ遺伝子型で、形質転換可能な品種をスクリーニング中である。*BrFIEa* をコマツナ‘おそめ’に導入するための培養は実施中である。

#### 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 7件)

(1)Tonosaki K, Akaba M, Bang SW, Kitashiba H, Kaneko Y, Nishio T: The use of species-specific DNA markers for assessing alien chromosome transfer in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea* monosomic additions of *Raphanus sativus*. Mol

Breed 34: 1301-1311, 2014 査読有

(2)Yamamoto M, Nishio T: Commonalities and differences between *Brassica* and *Arabidopsis* self-incompatibility. Hort Res 1: 14054, 2014 査読有

(3)Kitashiba H, Nasrallah JB: Self-incompatibility in Brassicaceae crops: lessons for interspecific incompatibility. Breed Sci 64: 23-27, 2014 査読有

(4)Yamamoto M, Tantikanjana T, Nishio, T, Nasrallah ME, Nasrallah JB: Site-specific N-glycosylation of the S-locus receptor kinase and its role in the self-incompatibility response of the Brassicaceae. Plant Cell 26: 4749-4762, 2014 査読有

(5)Wang C-L, Zhang Z-P, Tonosaki K, Kitashiba H, Nishio T: S genotyping in Japanese plum and sweet cherry by allele-specific hybridization using streptavidin-coated magnetic beads. Plant Cell Rep 32: 567-576, 2013 査読有

(6)Tonosaki K, Michiba K, Bang SW, Kitashiba H, Kaneko Y, Nishio T: Genetic analysis of hybrid seed formation ability of *Brassica rapa* in intergeneric crossings with *Raphanus sativus*. Theor Appl Genet 126:837-846, 2013 査読有

(7)Tonosaki K, Kudo J, Kitashiba H, Nishio T: Allele-specific hybridization using streptavidin-coated magnetic beads for species identification, S genotyping, and SNP analysis in plants. Mol Breed 31, 419-428, 2013 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

(1)山本雅也・Tantikanjana T・西尾剛・Nasrallah ME, Nasrallah JB The role of N-glycosylation of SRK in the self-incompatibility response of the Brassicaceae 第 56 回日本植物生理学会 2015 年 3 月 16 日 東京農業大学

(2)殿崎薫・北柴大泰・金子幸雄・西尾剛 *Brassica napus* との種間雑種形成能に関する *BrFIEa* 及び *BrMSI1a* の変異 日本育種学会 2013 年 10 月 13 日 鹿児島大学

(3)殿崎薫・北柴大泰・金子幸雄・西尾剛 *Brassica rapa* の属間雑種形成能 QTL 領域内に座乗する遺伝子の解析 日本育種学会 2013 年 3 月 27 日 東京農業大学

(4)Tonosaki K., Kitashiba H., Kaneko Y., Nishio T.: Epistatic effect between two QTL enhances hybrid seed formation ability of *Brassica rapa* in intergeneric hybridization with *Raphanus sativus* (International Symposium “Comparative Genomics and Breeding of Brassicaceae crops”, Sendai International Center, Sendai, Japan, 2012. Oct. 11th)

(5)殿崎薫・北柴大泰・金子幸雄・西尾剛 *Raphanus sativus* との種間交雑における *Brassica rapa* の雑種種子形成能の遺伝分析、(日本育種学会第 122 回講演会 京都産業大学、2012 年 9 月 14 日)

〔図書〕(計 2 件)

(1)阿部美幸・伊藤豊彰・大串由紀江・大村道夫・北柴大泰・齋藤雅典・中井裕・南條正巳・西尾剛(2014)菜の花サイエンス 東北大学出版会 p118

(2)Kitashiba H, Nishio T (2013) Self-incompatibility. In “Biotechnology of Crucifers” ed. by Gupta SK p241 (pp187-208)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西尾 剛 (NISHIO TAKESHI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：30301039

### (2)研究分担者

北柴大泰 (KITASHIBA HIROYASU)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：80431542

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：