

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292023

研究課題名(和文)ゲノミクス・トランスクリプトミクスのアプローチによる異形花型不和合性の機構解明

研究課題名(英文)Molecular Analysis for heterostyly by using genomics and transcriptomics approaches

研究代表者

牛島 幸一郎 (Ushijima, Koichiro)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：20379720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：異形花型自家不和合性(HetSI)は自己花粉を排除する自家不和合性形質と花の形(花型)と連鎖した現象である。アマ科植物のHetSIの機構解明のために原因遺伝子であるS遺伝子候補の単離とS遺伝子座領域の解析を行った。トランスクリプトームの解析からは、あらたに4つの候補遺伝子の単離に成功した。ゲノム解析からS遺伝子座領域が1Mbp以上にわたることを明らかとした。すべての候補遺伝子はこの領域に含まれるが、その相対的な配置は明らかになっていない。そこで、ペニバナアマのゲノム配列を明らかにするためにショットガンシークエンシングとde novo assemblyを行い、今後の新たな研究基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：Heterostyly is one of self-incompatibility that is a genetic system to reject the self-pollen and be linked to floral morph polymorphism. In this study, to elucidate the molecular mechanism of Linum heterostyly, we isolated the candidate gene controlling heterostyly and characterized the S locus region. Four candidate gene were newly isolated by transcriptome analysis. Genome analysis revealed the S haplotype specific region at least reached more than 1 Mbp. All candidate genes were included in this region but the relative locations were unclear. We further shotgun sequenced the genome of Linum grandiflorum and de novo assembly. The assembled contigs will give new insights on the study of heterostyly.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：異形花型自家不和合性

1. 研究開始当初の背景

自家不和合性は自己の花粉では受精・種子形成に至らない現象である。種子形成には他の個体の花粉が必要であり、多くの場合種子や果実が生産物である農作物では、その受粉・受精制御は非常に重要な課題である。本研究で解析する異形花型自家不和合性 (HetSI) は自家不和合性の中でも、交雑の成否と花の形態が連鎖した珍しい現象である。集団内に thrum と pin と呼ばれる個体があり、前者は雌ずいが短く雄ずいが長く、後者はその逆の構造の花を有している。HetSI 植物では thrum と pin の間でしか受精に至らない。この現象は古くはダーウィンが研究していたことで有名であるが、その分子機構は未だに明らかとなっていない。

2. 研究の目的

これまでに本研究グループでは HetSI アマ科植物であるベニバナアマ (*Linum grandiflorum*) を材料に、候補遺伝子の単離を試み、TSS1 など幾つかの遺伝子を単離してきたが、十分に網羅的な解析が出来ていたとは言いがたい。そこで、本研究では次世代シーケンサー (NGS) を利用したゲノム、トランスクリプトームの網羅的解析を行い、ベニバナアマの生殖器官における全転写産物の同定と、S 遺伝子座に連鎖した遺伝子の単離を行う。これらの情報から、候補遺伝子の絞り込みと遺伝子組換えによる機能証明を行う。

3. 研究の方法

(1) 材料

岡山大学で育成したベニバナアマ異品種 'Flax Scarlet' から雌ずいおよび雄ずいの各器官・組織を経時的に採取し、RNA のサンプリングのための材料とした。また、葉に関しては PacBio のロングシーケンシング用のサンプルとした。

山形大学において 'Flax Scarlet' と 'Bright Eye' の交雑集団から作成した F1 集団 AB14 集団を作成し、kmer 比較解析に利用した。また分離集団の花柱や雄ずいの長さや花の色などを計測し、遺伝解析に用いた。

(2) RNA-seq 解析

thrum および pin の葯や花粉、花柱、不和合・和合受粉した花柱の計 10 の器官・処理区から RNA を単離し、ライブラリーを構築した。Illumina 社の Genome Analyzer IIx で解読し、RNA-seq 解析に供試した。

GAII にて解読したイルミナショートリードについて、Trinity による *de novo* assembly を行い発現遺伝子のコンティグを構築しデータベース (LGR12) とした。リードをコンティグにマッピングし、リード数のカウントと rpkm を産出し花型間での発現量の比較を行った。

(3) kmer 比較解析

AB14 集団の thrum および pin それぞれ 16 個体ずつから、葯と花柱の RNA を単離し RNA-seq 用のライブラリーを作成した。また、AB14 集団の thrum25 個体、pin25 個体については DNA-seq 用ライブラリーを作成した。RNA-seq と DNA-seq ライブラリーは、HiSeq2500 で解読した。

得られたリードは thrum 特異的なリードの特定に利用した。具体的には thrum および pin のリードプールのリードを 35 mer のサブリード (k-mer) に分割し花型間で比較して、thrum のプールにのみ存在する特異的 k-mer を特定した。thrum 特異的 k-mer を含むリードを thrum リードプールから抽出し、CLC genomic workbench で *de novo* assembly を行った。

(4) ゲノムの *de novo* assembly

ベニバナアマのゲノム配列を明らかにするために、ゲノムのショットガンシーケンシングを行い *de novo* assembly を行った。シーケンシングは PacBio 社の PacBio RSII および Sequel にてゲノム DNA のショットガンライブラリーを解読した。得られたリードを用いて、canu や ABrujin といったソフトウェアを用いて *de novo* assembly を行った。

(5) 植物の遺伝子組換え

モデル植物であるシロイヌナズナとタバコを用いて、形質転換実験を行った。pFAST-G02 に候補遺伝子の CDS 配列を導入し、恒常発現の遺伝子組換え体の作成を試みた。シロイヌナズナに関しては floral dip 法、タバコに関してはリーフディスク法を用いた。T1 もしくは T2 個体において雌ずいおよび葯の長さを計測した。

4. 研究成果

(1) アマ科植物 HetSI の遺伝的制御

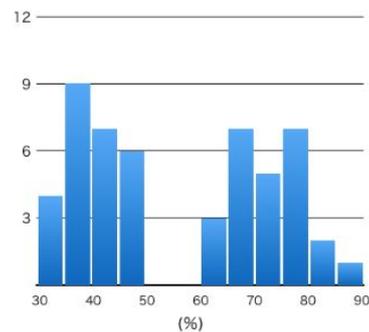
ベニバナアマの HetSI は他の科と同様に単一遺伝子座支配で、thrum が Ss のヘテロ、pin が ss の劣性ホモと考えられている。しかし、それを証明する遺伝解析が成されていないため、まず遺伝様式に関する実験を行った。

F1 集団

AB14 の 51 個体について、花柱長と雄ずい長を計測し、その比のヒストグラムを作成した。結果、雄

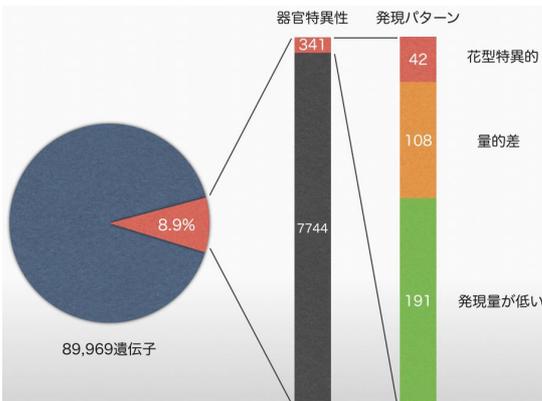
ずい長の 50%~60% の長さあたりが境界となって、雌ずい長が 2 極化した。雄ずい長の 50%

C. 比 (花柱長/雄ずい長)



以下の長さの花柱を持つ個体を thrum, 60%より長い個体を pin として分離比を検討した所, thrum : pin = 26:25 であり, 1 : 1 に分離し, 1 遺伝子座支配であると期待された。さらに, thrum 特異的な遺伝子配列の存在から, 優性の S 遺伝子をヘテロで有するのが thrum 個体であると考えられた。また, 花弁色について同時に解析したところ, 赤 : 桃 : 白 = 1 : 2 : 1 に分離しており, 赤花弁は thrum のみ, 白花弁は pin のみに見出された。このことは花弁色を決める R 遺伝子が S 遺伝子座周辺に座乗することを意味すると考えられる。

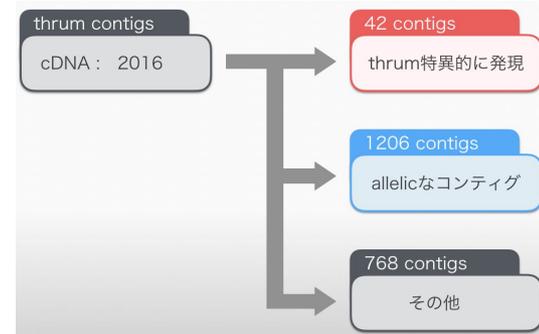
(2) RNA-seq 解析によるトランスクリプトームの比較
 本研究グループではこれまでに候補遺伝子として TSS1 を単離したが, その発現パターンから, TSS1 は雌ずい側の因子と考えられる。HetS1 の S 遺伝子座には雄ずい側の自家不和合性因子に加え, 花型を決定する遺伝子など他の遺伝子も連鎖して座乗していると考えられている。従って, 他の候補遺伝子を単離する必要がある。そこで, RNA-seq 解析をおこなって, 候補遺伝子の探索を行った。



ベニバナアマには参照配列は存在しないので, RNA-seq を行いトランスクリプトームの de novo assembly を行った。その結果, 約 9 万コンティグが得られた。それらに, RNA-seq のリードをマップして発現量を推測し花型間で比較を行った。その結果, 花形特異的な 42 遺伝子, さらに量的な差をしめす 108 遺伝子を同定した。この中には既に候補遺伝子として上げている TSS1 も含まれ, 本実験の有効性が確認できる。一方, 42 もの遺伝子が特異的と特定されたが, 本実験のデータだけではこれ以上の絞り込みは無理と判断された。そこで, AB14 集団を用いた遺伝解析を行い S 遺伝子座に座乗する遺伝子の特定を試みることにした。

(3) k-mer 比較解析に因る S 遺伝子候補の特定
 AB14 集団において雌ずいと雄ずいの RNA-seq を行った。得られたリードを 35 mer の kmer に分割し, 花形間の比較から thrum 特異的な

リードを特定して, 特異配列のみからなる de novo assembly を行った。RNA-seq のリードを用いて, kmer 比較おこなったところ, 約



2000 の thrum コンティグが得られた。この thrum コンティグに thrum および pin の RNA-seq リードをマップしたところ, 42 の遺伝子が真に thrum 特異的遺伝子であると考えられた。

RNA-seq のリードを用いて thrum 特異的なコンティグを構築したので, 42 コンティグの遺伝子は thrum 特異的に発現している遺伝子であり, かならずしも染色体上で S 遺伝子座領域に存在するとは限らない。実際には遺伝解析が必要である。そこで, DNA-seq のリードについても kmer 比較から thrum 特異的リードを抽出し, de novo assembly を行った。その結果, 約 15,000 のコンティグが得られ, マッピングの結果, 800 以上のコンティグが thrum ゲノムにしか存在しない非常に特異性の高い配列であると考えられた。RNA-seq で得られたコンティグと比較したところ, 8 つの遺伝子が RNA-seq と DNA-seq 両方の解析に共通する遺伝子であった。このうち 2 つはレトロトランスポゾン様配列であり, 候補遺伝子から外れる。また, これまでの解析で候補遺伝子として上げられていた, TSS1 はこの最終リストに含まれていた。また, 雌ずい側の因子として新たに TSW4 が単離された。雄ずい側に関しては幾つか候補は挙げられるが, ORF が不明であるなど, 今後の検証が必要であると考えられた。

contig No.	RPKM	器官	annotation	ORF
LG14Km0009.01	26.9	♀	TSS1	yes
LG14Km0026.01	8.1	♀	TSW4	yes
LG14Km0295.01	4.1	♀	TSW4	yes
LG14Km0057.02	9.7	♂	RING-finger	no
LG14Km0485.01	1.8	♂, ♀	unknown	no
LG14Km0828.01	2	♂	retrotransposon	nd
LG14Km1125.01	3.1	♀	retrotransposon	nd
LG14Km1194.01	2.3	♂	unknown	no

(4) de novo assembly によるベニバナアマゲノム配列の構築と S 遺伝子座領域の単離
 DNA-seq の kmer 比較で 800 以上のコンティグが S 遺伝子座領域由来と考えられた。コンティグ群の総塩基数は 1Mbp を越えており, 非

常に大きな領域がS対立遺伝子特異的であると考えられた。一方、これらはイルミナのショートリードから構築したため、平均長が2 kbpに及ばない短い断片であるため、S遺伝子座内での各遺伝子の位置関係などは不明である。そこで、ショットガンシーケンシングによるde novo assemblyを行った。

De novo assemblyに先だって、フローサイトメトリーを用いてゲノムサイズの推定を行った。ベニバナアマに加えて、近縁種の宿根アマ(Linum perenne)と栽培種のアマ(L. usitatissimum)も同時に解析した。その結果、ベニバナアマは700mbp/C程度の大きさであり、L. usitatissimum(400 mbp/C)よりも大きいことが明らかとなった。染色体数はベニバナアマはL. usitatissimumの半分程度である事を考慮すると、近年、何らかの理由でゲノムサイズが倍以上に増加したと考えられる。

PacBioのRSIIとSequelを用いてゲノム配列の解読を行った。600万リード、60x以上のカバレッジに相当する45Gbp塩基のデータをえている。この配列を利用して、canuやABRuijnといったロングリード用のアセンブリソフトウェアを利用してde novo assemblyをおこなった。その結果、現在の所N50が100kbpを越えるコンティグ群を得ている。これらのコンティグには先の解析で得られた候補遺伝子がすべて含まれており、今後の解析に利用できると期待される。一方、カバレッジに対してN50が想定された方では向上しなかった。これは急激なゲノム増加が転移因子を含む反復配列に因るもので、ショットガンシーケンシングだけではコンティグ間のscaffoldingや連結が困難であると考えられる。

(5)候補遺伝子の機能解析

本研究にて、TSS1に加えTSW4といった新たな雌ずい側因子の候補が得られた。そこで、それらについて機能解析を行った。具体的には遺伝子組換えが容易な、アラビドプシスやタバコなどを宿主とし、35Sプロモーターに因る恒常発現をおこなった。その結果、僅かであるが、雌ずい長に変化が見られる個体を得られた。しかし、その長さの変化は僅かであり、直ちにこれらの遺伝子がHetSIに関与するとは結論づけることは出来なかった。今後は、やはりベニバナアマでの遺伝子組む換えが必要であると考えられる。

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1件)

(1) Ushijima, K., Ikeda, K., Nakano, R., Matsubara, M., Tsuda, Y., Kubo, Y. Genetic control of floral morph and petal pigmentation

in *Linum grandiflorum* Desf., a heterostylous flax The Horticulture Journal 2015年 84: 261-268 査読有り 10.2503/hortj.MI-045

[学会発表](計8件)

(1) 牛島幸一郎 他 NGS 大量リードデータのサブリード比較によるアマ科植物の異形花型自家不和合性遺伝子座の解析 園芸学会 2016年9月10日 名城大学

(2) 牛島幸一郎 他 アマ科植物の異形花型自家不和合性遺伝子座領域に座乗する遺伝子の同定 育種学会 2016年9月24日 鳥取大学

(3) 牛島幸一郎 異形花型自家不和合性の制御因子の探索日本育種学会中四国談話会(招待講演) 2015年12月19日 岡山大学

(4) 牛島幸一郎 他 大量シーケンシングデータのサブリード比較によるアマ科異形花型自家不和合性関連遺伝子の単離園芸学会 2015年9月26日 徳島大学

(5) 牛島幸一郎 他 次世代シーケンシングの kmer 比較を利用したアマ科異形花型自家不和合性の花粉側候補遺伝子の探索 育種学会 2015年9月11日 新潟大学

(6) 牛島幸一郎 他 アマ科異形花型自家不和合性植物の花器官の形態的特徴と遺伝様式 園芸学会中四国支部会 2014年7月21日 徳島県立農林水産総合技術センター

(7) 牛島幸一郎 他 ベニバナアマにおける異形花型自家不和合性の解析 V: 次世代シーケンサーを用いた新規S遺伝子候補の探索 園芸学会 2013年10月12日 鹿児島大学

(8) 牛島幸一郎 他 アマ科植物の異形花型自家不和合性の解析 VI. de novo assembly 解析による花形特異的発現遺伝子の同定 育種学会 2013年9月21日 岩手大学

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

牛島 幸一郎 (USHIJIMA, Koichiro)
岡山大学・大学院環境生命科学研究所・准教授
研究者番号: 20379720

(2)研究分担者

鈴木 孝征 (SUZUKI, Takamasa)
中部大学・大学院応用生物学研究科・講師
研究者番号：50535797

池田 和生 (IKEDA, Kazuo)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号：80555269

赤木 剛士 (AKAGI, Takeshi)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：50611919