

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292003

研究課題名(和文) イネ科S-Z型自家不和合性の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the S-Z type self-incompatibility in Poaceae

研究代表者

掛田 克行 (Kakeda, Katsuyuki)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：50221867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科植物の自家不和合性には独立二遺伝子座(S、Z)支配のユニークな遺伝機構が見出されている。本研究では、オオムギ野生種(*Hordeum bulbosum*)において、未知の花粉側(雄性)S遺伝子の単離・同定を目的とした。すでに同定された雌ずい側(雌性)S遺伝子のオルソログ(相同遺伝子)を基点として、オオムギおよびコムギのゲノムデータベースを解析し、S遺伝子座相同ゲノム領域の境界範囲を明らかにした。最終的に、この境界範囲内に存在するオオムギ野生種オルソログの中から、雌性S遺伝子との物理的連鎖、配列多型性、花粉優先的発現パターンなどに基づき、花粉側S遺伝子のきわめて有力な候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：The grasses (Poaceae) possess a unique self-incompatibility system controlled by two unlinked loci S and Z. This study aimed to isolate and identify an unknown pollen (male) S gene in a wild species of barley (*Hordeum bulbosum*). Informatics analysis using orthologous sequences of the already-identified pistil (female) S gene successfully delimited the genomic region homologous to the S locus on the barley and wheat chromosomes. Among the *H. bulbosum* orthologs residing within the delimited region, a promising pollen S gene candidate was finally identified based on physical linkage to the female S gene, sequence polymorphisms and preferential expression in the pollen.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：自家不和合性

#### 1. 研究開始当初の背景

イネ科植物の自家不和合性には独立二遺伝子座 (*S*、*Z*) 支配のコニークな遺伝機構が見出されている。研究代表者は、オオムギ野生種 (*Hordeum bulbosum*) において、*S* 遺伝子特異的転写産物の解析から、雌ずい側 *S* 遺伝子の有力候補として、分泌型・親水性の新規なりガンド様分子をコードする *HPS10* (*Hordeum pistil S-specific 10*) 遺伝子を単離した。さらに、*HPS10* ペプチドを用いた *in vitro* 花粉バイオアッセイ法を用いて、*HPS10* タンパク質が *S* ハプロタイプ特異的な花粉阻害効果をもつことを明らかにした。これにより、*HPS10* がオオムギ野生種の自家不和合性における雌ずい側の *S* 認識特異性を決定する因子 (雌性 *S* 決定因子) であることを証明した。

#### 2. 研究の目的

本研究では、雌性 *S* 決定因子 (*HPS10*) の同定に続き、オオムギ野生種の花粉側 (雄性) *S* 遺伝子を単離・同定し、雌雄 *S* 決定因子間の自他認識機構を解明することを目的とした。また、同定された *S* 遺伝子のイネ科オルソログの解析に基づき、オオムギ野生種の雌雄 *S* 因子がイネ科共通の自家不和合性因子であるかどうかを検証した。

#### 3. 研究の方法

##### (1) トランスクリプトーム解析による花粉側 *S* 遺伝子候補の探索

オオムギ野生種において、*S1* および *S3* ハプロタイプの花粉および雌ずいトランスクリプトームの比較解析によって、花粉特異的かつ *S* ハプロタイプ特異的なコンティグをスクリーニングした。これらのうち、配列多型性、花粉発現特異性、推定座乗染色体、推定コードタンパク質の分類・機能などの観点から、さらに候補遺伝子の絞り込みを行った。

##### (2) イネ科における *S* 遺伝子オルソログおよび *S* 遺伝子座相同ゲノム領域の解析

2 つのイネ科自家不和合性種ライムギおよびイタリアンライグラスにおいて、オオムギ野生種の雌ずい側 *S* 遺伝子 (*HPS10*) オルソログを単離するため、縮重プライマーを用いて小穂 cDNA の RT-PCR を行った。さらに RACE 法によりコード領域全長の塩基配列を決定し、それらのハプロタイプ間多型性および発現パターンを調査した。

次に、コムギとその近縁種のゲノムデータベース情報を用いて、*HPS10* 遺伝子オルソログを基点としたシテニー領域の解析を行い、*S* 遺伝子座相同ゲノム領域の同定を試みた。さらに、これらのシテニー領域内で *S* 遺伝子座の境界範囲を特定し、その中に存在するオオムギ野生種遺伝子オルソログの解析から新たな花粉側 *S* 遺伝子候補の探索を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) オオムギ野生種の雌ずいおよび花粉トランスクリプトームデータから得られた計 48,589 個のコンティグのうち、花粉特異的コンティグとして 11,924 個が選抜された。このうち、*S* ハプロタイプ特異的コンティグとして 1,553 個 (*S1* 特異的 632 個、*S3* 特異的 921 個) が選抜され、これらを予測コードタンパク質別にみると、トランスポゾン様配列を除き、874 種類にグループ化された。

花粉側 *S* 遺伝子候補のスクリーニングには、まず *S1* および *S3* 特異的コンティグのうち、それぞれリード比上位 50 番以内のコンティグを対象として推定アミノ酸配列の比較解析を行った。これら 100 個のコンティグは、レトロトランスポゾン様配列と 2 つのハプロタイプ間での重複を除き、合計 78 種類のコンティグにグループ化された。それらの予測タンパク質の中には、タンパク質間相互作用ドメインを含む膜アンカー型タンパク質や種々のレセプター様プロテインキナーゼなど、自家不和合性認識反応への関与が期待されるものが見出された。

配列多型可能性、花粉発現特異性、推定座乗染色体、推定コードタンパク質の分類・機能などの観点から、8 つのコンティグを花粉側 *S* 遺伝子の候補としてさらに絞り込み、*S1*、*S3* 両ハプロタイプの対立遺伝子の全長配列を PCR 増幅により決定した。しかし、推定アミノ酸配列の比較解析から、*S* 遺伝子の認識特異性をもたらすような高度なハプロタイプ間多型性を示す候補遺伝子は見出されなかった。

(2) 自家不和合性種のライムギおよびイタリアンライグラスにおいて、オオムギ野生種の *HPS10* オルソログを PCR 増幅し、それぞれ 3 種類および 5 種類の塩基配列を決定した。これらは、オオムギ野生種の *HPS10* と同等の高度なアミノ酸配列多型性 (aa 同一性: 40 ~ 60%) を示し、それぞれの種の品種・系統が保有する、異なる *S* ハプロタイプに由来する対立遺伝子と考えられた。また、両種の *HPS10* オルソログともに、開花期の小穂 (ライムギの一種では雌ずい) において特異的な発現が確認された。以上のことから、*HPS10* 遺伝子がイネ科共通の雌ずい側 *S* 遺伝子であることが強く裏付けられた。

一方、自家和合性のコムギ (*Triticum aestivum*) とその近縁種の *HPS10* オルソログ (A および D ゲノム同祖遺伝子) においては、品種・系統間でほとんど多型性のないことが示された。これに対して、オオムギ (栽培種 *Hordeum vulgare*、自家和合性) では、ゲノム配列中に *HPS10* 遺伝子オルソログが存在せず、実験的にも PCR による増幅が認められなかった。これより、この雌ずい側 *S* 遺伝子オルソログの欠損がオオムギの自家和合性化に関与した可能性が示唆された。

(3) コムギにおいて、新たに整備されたゲノムデータベースの塩基配列情報(2017年に限定公開)を用いて、*HPS10* オルソログを基点に *S* 遺伝子座とシンテニー関係を示す領域を探索した。その結果、1A、1B および 1D 染色体上によく保存された当該シンテニー領域のあることが明らかになった。また 2016 年に入って、自家不和合性のイネ科牧草ペレニアルライグラス(*Lolium perenne*)において、大規模集団を用いた精密マッピングによって、連鎖群 1(LG1)のゲノム領域上で、*S* 遺伝子座の境界範囲が新たに特定された(Manzanares et al. 2016)。この新情報を利用することで、上記のコムギ 1A、1B および 1D 染色体に加え、オオムギ 1H 染色体における *S* 遺伝子座相同ゲノム領域の境界範囲を同定することができた(図 1)。

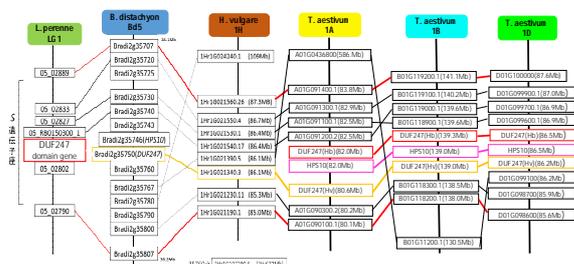


図1 イネ科種間における*S*遺伝子座相同ゲノム領域のシンテニー関係

(4) 前述(1)のトランスクリプトーム解析で得られたオオムギ野生種の候補遺伝子(コンテイング)の中には、オオムギ 1H 染色体の *S* 遺伝子座相同ゲノム領域の境界範囲内にマッピングされるものはなかった。このことから、当該候補遺伝子中には花粉側 *S* 遺伝子が含まれていないことが確認された。

一方、*S* 遺伝子座相同ゲノム領域内でイネ科共通に存在する一遺伝子(*DUF247*)のオオムギ野生種オルソログが、*S1* および *S3* ハプロタイプにおいて、*HPS10* 遺伝子のごく近傍に隣接して存在することが明らかとなった(図 2)。

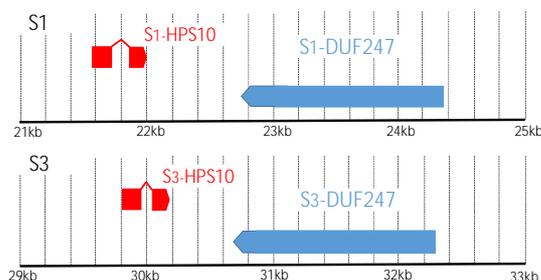


図2 *H. bulbosum*における*HPS10*および*DUF247*遺伝子の位置関係

興味深いことに、この遺伝子オルソログはコムギの 3 つのサブゲノムにおいても各 *HPS10* オルソログとセットで座乗していることがわかった(図 1 参照)。オオムギ野生種において、*S2* ハプロタイプの当該遺伝子(座乗位置は未知)を含め、3 つの *S* ハプロタイプ

間で推定アミノ酸配列を比較したところ、全体では互いに約 80%の相同性がみられたが、ハプロタイプ間で高い配列多型性を示す可変領域のあることが明らかとなった。さらに、この遺伝子は花粉優先的な発現を示すことから、花粉側 *S* 遺伝子の要件を満たすことが確認された。この遺伝子産物の機能は未知であるが、強い疎水性領域を含み、膜結合型のタンパク質であることが予測された。このため、分泌型リガンドと予測される雌ずい側因子 *HPS10* を、花粉表面上で認識するタンパク質として機能する可能性が示唆された。今後、この候補遺伝子が自家不和合性における花粉側の認識特異性を決定するかどうかを明らかにするため、オオムギ野生種において花粉パイオアッセイ法を用いた機能証明実験の検討を進めていく予定である。

#### <引用文献>

Manzanares, C., Barth, S., Thorogood, D., Byrne, S.L., Yates, S., Czaban, A., Asp, T., Yang, B., Studer, B., A gene encoding a DUF247 domain protein cosegregates with the *S* self-incompatibility locus in perennial ryegrass, *Mol. Biol. Evol.* 33: 870-884 (2016)

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

掛田克行・佐々英徳・土屋 亨・相井城太郎、新規な自家不和合性機構解明への挑戦、育種学研究 16: 53-60 (2014)、査読無

〔学会発表〕(計 12 件)

長谷川大起・榊原莉子・井上彩音・掛田克行、オオムギ野生種の花粉側 *S* 遺伝子候補の解析、育種学会中部地区談話会 (2017)

K. Kakeda, The two-locus self-incompatibility system in Triticeae, 8th International Triticeae Symposium (2017), Wernigerode, Germany

掛田 克行、平松 拓実、村上 愛、イネ科における雌蕊側 *S* 遺伝子オルソログの多様性解析、日本育種学会 (2016)

K. Kakeda, R. Asahara, The molecular basis of self-incompatibility in *Hordeum bulbosum*, 12th International Barley Genetics Symposium (IBGS) (2016), Minneapolis, USA

掛田 克行・友員 正博・王 寧・劉 成・小松田 隆夫、オオムギ *cly1* 座における閉花性から開花性への復帰突然変異の解析、日本育種学会 (2016)

浅原 亮介・村上 愛・井上彩音・掛田 克行、オオムギ野生種の雌性 *S* 決定因子および *S* 遺伝子座領域の解析、育種学会中部地区談話会 (2015)

浅原 亮介・米田 年豊・橋本 翔・掛田 克行、オオムギ近縁自家不和合性種におけるトランスクリプトーム解析による花粉側 *S* 遺伝子候補のスクリーニング、日本育種学

会 (2015)

掛田克行・平松拓実・村上愛・清多佳子、  
イネ科自家不和合性種における雌蕊側 S 遺  
伝子の多型性解析、日本草地学会 (2015)

K. Kakeda, S. Hashimoto, M. Iwano,  
Molecular characterization of  
self-incompatibility factors in the grass,  
*Hordeum bulbosum*, 23rd International  
Congress on Sexual Plant Reproduction (2014),  
Porto, Portugal

他

〔図書〕(計 2 件)

掛田克行、2 編 植物という生き物-4 章  
植物の配偶子形成と受精、鷺谷いずみ(監  
修)、森誠・江原宏(共編)、ライフサイエ  
ンスのための生物学：培風館、2015、  
241(83-87)

岩野恵・掛田克行・土屋亨、6 章 被子植  
物の受精 1 - 自家不和合性因子の多様性と  
共通原理 -、澤田均編、動植物の受精学 共  
通機構と多様性：化学同人、2014、  
332(88-102)

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

掛田 克行 (KAKEDA, Katsuyuki)  
三重大学・生物資源学研究科・教授  
研究者番号：50221867

### (2) 研究分担者

小松田 隆夫 (KOMATSUDA, Takao)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構・次世代作物開発研究センター・  
主席研究員  
研究者番号：60370657