

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14599

研究課題名（和文）非組換え領域S遺伝子座における組換えの顕微観察

研究課題名（英文）Meiotic recombination in the S locus of apple

研究代表者

菊池 真司（KIKUCHI, SHINJI）

千葉大学・大学院園芸学研究科・助教

研究者番号：80457168

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：1Mbpを超えると考えられるバラ科リンゴのS遺伝子座においてハプロタイプ間で組換えが生じていることが減数分裂細胞におけるBAC-FISH解析で明らかになった。さらに花粉においても組換えSハプロタイプの存在が確認された。一方、交雑後の実生においては組換えSハプロタイプは確認されていない。一般に非組換え領域と考えられているS遺伝子座において一定数の組換えが生じていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Our BAC-FISH analysis indicated a relatively large number of meiotic recombinations in the >1 Mbp S-locus of apple. The recombinant S-haplotype was also found in the pollen. However, we could not find the recombinant S-haplotype in the segregants from cross with the pollen. The results suggest a certain meiotic recombination in apple S-locus.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：S-locus 組換え リンゴ

## 1. 研究開始当初の背景

バラ科リンゴの自家不和合性は、複数の雄性側因子の F-box 遺伝子 (SFB) が非自己の雌性側因子の S-RNase 遺伝子を認識する多因子非自己認識機構を持つことが示されている。S3 と S9 ハプロタイプには 20 以上の F-box 遺伝子が S-RNase と連鎖して存在している。一般に雄性側因子と雌性側因子のあいだでは組換えが起きず、S ハプロタイプを構成する。リンゴにおいても、これまでの研究でそれらの S-RNase と F-box のあいだでは組換えは生じないことが分かっていた。私達は BAC-FISH 解析から S9 ハプロタイプに含まれる S-RNase や 10 以上の F-box 遺伝子の並びを明らかにし、ハプロタイプ間で遺伝子の並びが異なることや、ヘテロクロマチン化や DNA メチル化が組換え抑制に関与している可能性を示した。一方、ユークロマチックなヒストン修飾が観察されたり、減数分裂細胞で組換えが生じたと考えられる FISH シグナルが予備実験から観察された。減数分裂細胞や花粉において、S-RNase と F-box 遺伝子の組換え頻度を調べた研究はこれまでなく、詳細な解析が必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、リンゴ品種 ‘フロリーナ’ (S3S9 ハプロタイプ) において組換えが生じているか、またその頻度を決定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(リンゴ品種フロリーナ (S3S9) の減数分裂第一分裂終期の細胞に対して、S 遺伝子座 (S9 ハプロタイプ) の両端にある BAC クローンをプローブにした FISH 解析を行い、シグナルパターンから組換えの有無と頻度を算出した。

加えて、S3 と S9 の両端にある F-box 遺伝子それぞれで、一塩基多型 (SNP) と人為的 mismatches を利用したアレル特異的プライマーを開発し、フロリーナの単一花粉からそれぞれ抽出した DNA を鋳型に PCR 解析を行

って遺伝子型を決定することで、組換えが生じた S ハプロタイプを含む花粉が存在するか、またその頻度を明らかにする。

受精競争や発生が完了した後の実生において組換え S 遺伝子を持つ個体が存在するかを明らかにするために、王林 (S2S7) にフロリーナ (S3S9) の花粉を受粉して実生を養成し、アレル特異的プライマーでそれぞれの実生が持つ F-box 遺伝子の遺伝子型を決定する。

## 4. 研究成果

フロリーナの減数分裂細胞へ S-RNase や F-box 遺伝子を含む BAC-DNA をプローブに FISH 解析を行うと、一部の BAC プローブは非特異的なシグナルを形成した。内在の繰り返し配列が原因と考えられる。ブロッキング DNA を加えるなどの条件検討により特異的シグナルの識別が可能になった。

減数分裂第一分裂終期～二分体の細胞で BAC-FISH 解析を試みると、S 遺伝子座内で組換えが起こらず S 遺伝子座の両端の F-box 遺伝子が揃って一つの娘細胞に分配される様子が観察された一方で、比較的多数の細胞で組換えを示すシグナルパターンが観察された。組換えが生じたキメラ S ハプロタイプは四分体でも観察され、減数分裂が正常に進行していることが分かった。

SNP を 3' 末端とし、さらに 3' 末端付近に人為的 mismatches を作ることで、アレル特異的プライマーを開発した。複数のリンゴ品種や BAC-DNA を鋳型に PCR を行って、目的の F-box アレルのみで増幅されることを確認した。

フロリーナの花粉を一つずつ PCR チューブに入れ、DNA 抽出およびゲノム DNA 増幅を行った。多数の花粉に対して遺伝子型の決定を行ったところ、S3 と S9 ハプロタイプの F-box 遺伝子を併せ持った組換え S ハプロタイプを保有する花粉が存在することが分かった。一方、減数分裂細胞の BAC-FISH 解析で明らかになった組換え頻度に比べると、組換え S ハプロタイプを含む花粉の頻度は約 1/4 まで減少した。原因は今のところ不明であるが、組換え S ハプロタイプが花粉の形成に与える影響を解析する必要があるかもしれない。

フロリーナ花粉を王林に交配して得られた実生においてジェノタイピングを進めているが、現在のところ組換え S ハプロタイプは見つかっていない。S3 ハプロタイプ、S9 ハプロタイプは期待値どおりに 1:1 で実生に分離していた。減数分裂細胞や花粉で見られた組換え S ハプロタイプが実生では見つからない理由はまだ不明であるが、受精競争や発生に組換え S 遺伝子が与える影響を解析する必要がある。新たに多数の実生を養成して、組換え S 遺伝子を含む実生が存在しないか、さらに解析を進めているところである。

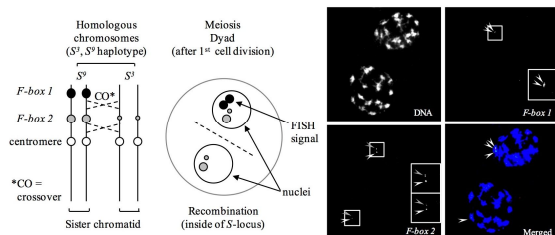


図 1. S 遺伝子座内の組換えの模式図 (左) と BAC-FISH による組換えシグナルパターンの検出 (右)

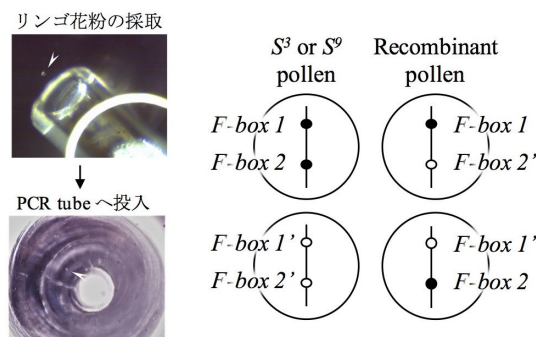


図 2. 単一のリンゴ花粉の採取 (左) と花粉で検出される対立遺伝子の組み合わせの模式図 (右)

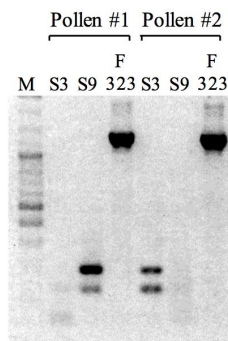


図 3. 花粉のジェノタイピング. Pollen #1 で

S9 ハプロタイプの 2 つの F-box 遺伝子のみが検出されている。一方、pollen #2 では S3 の F-box 遺伝子のみが検出されている。組換えハプロタイプをもつ花粉では、低分子のバンドを一つずつ併せ持っていた。F323 は S 遺伝子座が座乗する染色体にある DNA マーカー。

## 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)

[学会発表](計 4 件)

① 菊池真司、王三紅、佐々英徳、木庭卓人 (2017) BAC-FISH 解析による非組換え領域 S 遺伝子座における組換えの顕微観察. 染色体学会 第 68 回年会 (広島大学)

② 上沢洸太、菊池真司、南川舞、佐々英徳、木庭卓人 (2017) アレル特異的 PCR によるリンゴ S 遺伝子座における組換え頻度の測定. 染色体学会第 68 回年会 (広島大学)

③ Kikuchi Shinji, Minamikawa F. Ma, Wang Sanhong, Takato Koba, Sassa Hidenori (2016) Cytological structure and recombination suppression of the S locus of apple. Korea-Japan Joint Symposium 5th Symposium of Korean Chromosomal Research Colloquium p48, South Korea

④ 上沢洸太、菊池真司、佐々英徳、木庭卓人 (2016) アレル特異的 PCR によるリンゴ S 遺伝子座の組換え頻度の測定. 染色体学会第 67 回年会 (分科会 3) (東京大学)

ホームページ等

<http://www.h.chiba-u.jp/lab/iden/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

菊池 真司 (KIKUCHI SHINJI)

千葉大学・大学院園芸学研究科・助教

研究者番号：80457168