

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H03747

研究課題名(和文) コムギに染色体切断を誘発する配偶子致死遺伝子のクローニングと機能解析

研究課題名(英文) Cloning and characterization of the gametocidal genes that break chromosomes in wheat

研究代表者

那須田 周平 (Nasuda, Shuhei)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：10273492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：パンコムギに近縁属のAegilopsから導入された特定の染色体(配偶子致死染色体)は配偶子形成過程で自己を持たない配偶子に染色体切断を誘発し、自己を優先的に後代へ伝達させる利己的な遺伝子である。本研究は、配偶子致死遺伝子をクローニングし、同遺伝子による染色体切断の分子機構を解明することを目的として行った。具体的には、ゲノミクス的手法を駆使してマップベースドクローニングの手法で同遺伝子の候補配列を単離した。EMS 突然変異個体の配列解析、発現解析によって絞り込み、コムギに形質転換することでターゲット遺伝子の同定を行った。さらに、発現解析を行なって遺伝子の発現部位を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で同定した配偶子致死遺伝子は染色体切断を起こす遺伝子で、ゲノムを改変するツールとして応用可能である。実際に、この遺伝子を活用してコムギに染色体構造変異を誘発し、不良形質遺伝子を除去することに成功している。この遺伝子と関連する遺伝子群の同定により、遺伝子発現をコントロールして、望むステージで適切な規模でゲノム再編を引き起こすことも視野に入ってきた。私たちは、この遺伝子がモデル植物である、シロイヌナズナやイネでも機能する可能性を示す証拠を得ており、コムギだけでなく多くの植物のゲノム改変のツールにすることを将来的な目標にできるところまで研究を進めることができた。

研究成果の概要(英文)：Gametocidal gene in wheat causes chromosome breakage in the gametophyte without itself and thus causing selective transmission of the chromosome carrying it. The objective of the study was to identify the gene through the map-based cloning approaches. Through various approaches of molecular genetics and genomics, we have successfully identified the candidate sequence. We have genetically proved that the candidate sequence encodes the chromosome-breaking function. We have tried to identify the tissues and stages of the wheat plant where the candidate gene is expressing, however, all our efforts of RNA in situ hybridization of the candidate sequence and immunostaining with the antibody raised against the whole protein sequence produced failed to identify its specificity. Through our analyses, we recognized that the other factor is required for full function of the candidate sequence.

研究分野：遺伝育種学

キーワード：染色体切断 ゲノム再編 配偶子形成 利己的遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

パンコムギに近縁属の *Aegilops* から導入された特定の染色体（配偶子致死染色体）は配偶子形成過程で自己を持たない配偶子に染色体切断を誘発し、その受精能力を著しく低下させる。したがって、配偶子致死染色体をもつ配偶子が優先的に受精に関与する。すなわち、配偶子致死染色体は自己を後代へ優先的に伝達させる利己的遺伝因子と言える。配偶子致死染色体には配偶子致死遺伝子が座乗していて、メンデルの法則に従って単一遺伝子座として振る舞うことが知られている。また我々はこの遺伝子には、染色体切断機能と保護機能の2因子がコードされていると推定していて、実際に切断機能を失った突然変異体を単離している。本遺伝子を使ってゲノム再編を誘発して育成した染色体端部欠失系統はゲノミクスの基本材料として世界で利用されている。一方で、この遺伝子の作用機作については分子レベルでほとんど情報がなく、その解明により、染色体切断の誘発により分離歪みを引き起こす利己的因子の分子基盤を明らかにすることが長く望まれてきた。また、分子基盤の解明は、配偶子致死遺伝子を利用したゲノム再編システムを将来的に広い植物種で応用するためにも大切なステップである。

2. 研究の目的

遺伝子機能の推定には、発現遺伝子解析や生化学など様々なアプローチが考えられるが、本研究は、配偶子致死遺伝子をポジショナルクローニングし、遺伝子機能の特定から同遺伝子による染色体切断の分子機構を解明することを企画した。申請者が入念に準備した実験材料に対しゲノミクスの研究手法を適用して、コムギでしか報告されていないユニークな生命現象である「配偶子致死」の原因遺伝子をクローニングし機能解析することを目指した。具体的には、以下の2点を目指して掲げた。

(1) 配偶子致死遺伝子のマップベースクローニングによる原因遺伝子の単離

(2) 単離した遺伝子の機能解析による、配偶子致死作用の分子基盤の解明

以上のマイルストーンを達し、配偶子致死遺伝子による遺伝的染色体切断誘発の機構を統合的に理解すること、そして、将来的なゲノム再編ツールとしての確立に道を開くことを目標とした。

3. 研究の方法

先行研究において我々の行ったラフマッピングの結果に基づいて推定した座乗染色体領域のイネ科植物のシンテニー情報を研究の出発点とした。マップ情報に基づいて、当該遺伝子のゲノム配列の中での推定を可能にするよう、分離集団を用いて1 cM以下の距離に配偶子致死遺伝子の最近傍マーカーを特定するよう、コムギ近縁種のゲノム情報に基づいたマーカー作成を行なった。近傍にマップされたマーカーについては、マーカーの消失パターンと表現型との相関を確認した。さらに、EMSで誘発した突然変異系統3系統での配列を決定し、突然変異系統で共通の遺伝子に独立の変異が導入されていることを検証した。並行して、発現遺伝子の解析を行い候補配列が当該の組織・ステージで発現していることを確認した。これらを受けて、候補遺伝子配列が目的の遺伝子であることを確認する実験に注力し、遺伝学的な検証実験を完了した。遺伝子発現解析については、定法に従ってqRT-PCR実験とRNAseq解析で発現量の調査をした。それに加えて、組織・特異性についての詳細な解析を行うため、RNA in situ hybridization実験と候補配列の全長タンパク質を抗原として調整したポリクローナル抗体を用いた免疫染色実験を行った。

4. 研究成果

ゲノミクスの手法を駆使してマップベースクローニングの手法で同遺伝子の候補配列を単離に成功した。具体的には、大規模分離集団から当該遺伝子を挟む領域での組換え個体のみを選抜しファインマッピング用のサブグループとした、それらに対しオオムギを含むムギ類、そして、イネとのゲノム配列の共線性（シンテニー）を利用して、マーカーを設計し、分離を調査した。この結果、イネゲノム配列とのシンテニーに基づき、遺伝子の座乗領域をゲノム配列に紐づいたマーカーで狭めることができた。しかしイネゲノムとのシンテニーは巨視的には保たれていたが、微視的なシンテニーは両種の比較において各所で破綻しており、当該遺伝子に近接すれば近接するほど新規マーカーを設計するのが困難になった。そこで、配偶子致死遺伝子をホモ、ヘテロ、ヌルで持つ個体の花粉体細胞分裂期の葯から抽出したRNAの網羅的解析を行い、配偶子致死系統でだけ発現している遺伝子配列を探索した。この解析で抽出した配列をマーカー化し、連鎖解析したところ表現型から推定される配偶子致死遺伝子座と完全連鎖した。このマーカーを最近傍マーカーとしたマーカー探索作業を終了した。

次に、我々が持つ複数系統の独立したEMS突然変異個体において、このマーカーの設計元とな

った遺伝子配列をサンガーシーケンシングで決定し配列比較解析を行った。その結果、突然変異系統が同一遺伝子にそれぞれの系統で独立の SNPs を確認した。変異は、アミノ酸の非同義置換を起こし、PROVEAN 解析によれば機能欠損につながる有害な変異と評価された。残りの一つはナンセンス変異で、premature なストップコドンを生じていた。さらに、当該遺伝子を保有する系統の植物体各部位（種子根、シュート、成葉、幼穂、成熟花粉を含む葯）から抽出した RNA を鋳型に qRT-PCR を行い、野生型の同遺伝子を持つ個体で遺伝子が発現していることを確認した。

この配列を配偶子致死遺伝子の候補配列として、コムギ植物体の形質転換による遺伝学的同定を進めた。アグロバクテリウム形質転換法で易形質転換コムギ系統 'Fielder' を形質転換し、T1 及びその検定交雑後代の表現型調査を行った。導入遺伝子をヘミで持つ個体の花粉体細胞分裂期の染色体像を観察し、候補配列が配偶子致死遺伝子に予想される染色体切断因子をコードしていることを遺伝学的に証明した。一方で、この形質転換実験によって、我々が単離した遺伝子には配偶子致死遺伝子の切断機能から自身を守る保護因子はコードされていないことが示された。配偶子致死現象の全容の解明には保護因子の同定が必須である。そこで、2つのゲノミクス的アプローチを選択した。一つ目は、六倍体コムギの配偶子致死系統自体のリシーケンシングを行い切断因子をコードする遺伝子近傍のコンティグ長の延長を図った。二つ目は配偶子致死遺伝子のドナーとなった二倍体祖先野生種のゲノムアセンブルで、PacBio シーケンサーによるロングリードシーケンシングのリードをアセンブルすることで、二倍体種のほぼ前ゲノムをカバーするドラフトゲノム配列を獲得した。我々は両ゲノムリソースを活用し、分離集団に検出した遺伝的組換えを定義するマーカーの配列のゲノム配列上の位置を特定し、配偶子致死遺伝子の切断因子と保護因子の両方をカバーするコンティグを特定した。このコンティグに葯で発現する遺伝子の RNAseq 解析のリードをマッピングし、転写が認められる 30 以下の遺伝子配列にこの因子の候補配列を限定することに成功した。研究期間終了までに候補配列のクローニングを進めたので、今後、アグロバクテリウム法での形質転換実験を行って、保護因子としての機能を有するか検証していく。

遺伝子機能の特定には発現する組織とステージ特異性の確認は必須である我々は、RNA in situ hybridization と免疫染色法でこの課題に挑んだ。両実験とも、減数分裂期から花粉形成期の葯の横断切片に対して行った。候補遺伝子配列から作製した RNA プローブを用いた in situ hybridization 実験位においては、不明瞭なシグナルが得られたが、ネガティブコントロールとして用いた逆鎖の RNA プローブでも同様なシグナルが得られた。候補遺伝子配列の全長タンパク質を抗原として作成したポリクローナル抗体による間接免疫染色法で調査したが、こちらでも明瞭なシグナルは得られなかった。抗体が in vitro 発現させたタンパク質を認識することをウエスタンで確認している。植物体からの粗抽出タンパク質に対するウエスタンブロット解析を進め、再度チャレンジすることを計画している。同時に蛍光タンパク質との組換えタンパク質を作成するコンストラクションも進めており、より直接的に遺伝子産物の組織・ステージ特異性を調査できるよう準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murata Kazuki、Watanabe Shota、Tsujiimoto Hisashi、Nasuda Shuhei	4. 巻 93
2. 論文標題 Cytological observation of chromosome breakage in wheat male gametophytes caused by gametocidal action of Aegilops triuncialis-derived chromosome 3Ct	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 111～118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.18-00010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉岡 資洋・山田 創・那須田 周平
2. 発表標題 配偶子致死遺伝子Gc2-4Sshの染色体切断作用が遺伝的組換えに与える影響の評価
3. 学会等名 日本遺伝学会 第89回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田 創・那須田 周平
2. 発表標題 配偶子致死遺伝子 Gc2-4Sshによる接合体における染色体切断作用の解析
3. 学会等名 日本育種学会 第133回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村田 和樹・那須田 周平
2. 発表標題 配偶子致死染色体3Ctによる染色体切断作用とその抑制遺伝子Igc1との相互作用の解析
3. 学会等名 日本育種学会 第133回講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	カンザス州立大学			