

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07599

研究課題名(和文)ダイコン変異体の解析による自家不和合性反応に関与する未知因子の同定

研究課題名(英文) Identification of unknown factors involved in self-incompatibility reaction by analysis of a radish self-compatible mutant

研究代表者

北柴 大泰 (Kitashiba, Hiroyasu)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：80431542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：独自に見出されたダイコンの自家和合性変異体は、自家不和合性に関与する未知因子の発見や新たな分子機構の解明につながる。そこで、自家和合性の原因を探った。ダイコンSハプロタイプの分析、既知の遺伝子の塩基配列、それらの遺伝子発現解析と連鎖解析から、これらが自家和合性に関与する可能性は考えられなかった。ゲノム全体のSNPを利用して遺伝解析を進めた結果、関連すると考えられる候補遺伝子座を新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自家不和合性反応に未知の因子が関与する可能性が示された。このことから、自家不和合性反応の詳細が今後明らかになると期待される。また、見出されたダイコン自家和合性変異体は一代雑種育種での採種過程において有用な遺伝資源となりうる。育種学的観点からの継続的研究が今後も重要である。また、本研究ではダイコンSハプロタイプ遺伝子の同定が進み、世界標準のSハプロタイプ情報を更新し提供することができた。この情報は自家不和合性を利用した育種技術の改善に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：A self-compatibility mutant of Brassica crops leads to the discovery of unknown factors involved in self-incompatibility and the elucidation of new molecular mechanisms. Therefore, the uniquely found self-compatibility radish mutant was analyzed in order to clarify causes of the trait in the mutant. Results of the analysis of S haplotype, the nucleotide sequences of known genes, their gene expression analyses and linkage analyses suggested that the examined genes might not be involved in self-compatibility of the mutant. Another genetic analysis using SNPs of the entire genome of the mutant detected new candidate loci considered to be involved in.

研究分野：植物遺伝育種

キーワード：Raphanus sativus ダイコン アブラナ科 自家不和合性 S ハプロタイプ シグナル経路

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アブラナ科野菜は他殖性を示し、カブやハクサイなどの *Brassica rapa* 種や、キャベツやブロッコリーなどの *B. oleracea* 種と同様にダイコンの *Raphanus sativus* 種は自家不和合性を示す。これらの品種育成の過程では F<sub>1</sub> 育種技術が取り入れられているが、特に F<sub>1</sub> 採種において、細胞質雄性不稔性とならんで自家不和合性の特性が利用され、遺伝的に均一な F<sub>1</sub> 種子を供給している。しかしながら、自家不和合性の程度に強弱がある、高温や老化によってもその程度が弱まるなど、育種の効率や供給する種子の純度に影響を及ぼす問題が生じている。これらの問題を解決するには、自家不和合性反応機構の全容を解明することが重要である。このためには、自家不和合性変異体の利用が効果的である。これまでも自家不和合性変異体の解析により、自家不和合性の認識機構、自己認識以降のシグナル経路の因子の同定などが進んできた。

自家不和合性は *S* と呼ばれる遺伝子座に支配されている。*S* 遺伝子座には自己認識に関わる *SCR/SP11* (*S*-locus cysteine rich protein/*S*-locus protein 11, 以降 *SCR*) 遺伝子と *SRK* (*S*-receptor kinase) 遺伝子が座乗し、*SLG* (*S*-locus glycoprotein) 遺伝子とともに、それぞれで多くの複対立遺伝子が報告されてきた。連鎖関係にある *SCR* 遺伝子、*SRK* 遺伝子および *SLG* 遺伝子のセットは *S* ハプロタイプと呼ばれている。我々は *B. rapa* と *B. oleracea* においては 40~50 の *S* ハプロタイプの遺伝子情報をこれまでに整備してきた。ダイコンでも同様に整備を進めてきたが、その過程で、自家不和合性になった変異体を見出した。この特性は自殖により世代を繰り返しても安定して自家不和合性を示した。そこで、この突然変異体の原因を突き止めることとした。

### 2. 研究の目的

見出したダイコン自家不和合性変異体の原因となる遺伝子、あるいは遺伝子座の同定を行うことを目的とした。*R. sativus* 種の *S* ハプロタイプの整備とともに、自家不和合性変異体の *S* ハプロタイプをはじめに決定することとした。その後、*S* ハプロタイプ遺伝子における変異の有無を検証し、次に自家不和合性反応における既報のシグナル経路に関わる遺伝子の関与の可能性を検証することとした。さらに、未知の因子の関与の可能性を考え、変異体とその由来品種のゲノム塩基配列の比較や、遺伝解析を進め、自家不和合性の要因を同定することとした。候補遺伝子が同定された場合には、さらにその機能を詳細に明らかにするための解析を進めることとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ダイコン *S* ハプロタイプの整備

独自に整備した *R. sativus* の 24 種類の *S* ハプロタイプのホモ系統を材料に、それぞれの *SCR*、*SRK* 遺伝子を PCR 法で増幅し、増幅断片の塩基配列を決定した。既知のプライマーや本研究で得た情報をもとにして新たにプライマーを設計し、PCR 反応に供試した。整備した情報をもとに、*S* ハプロタイプを同定する DNA マーカーを作製し、自家不和合性変異体の *S* ハプロタイプ同定を行なった。

#### (2) 自家不和合性変異体の *S* ハプロタイプ遺伝子および既報の自家不和合性関連遺伝子の解析

自家不和合性変異体のゲノム DNA または、蒴および柱頭から合成した cDNA を鋳型に、*SCR* 遺伝子および *SRK* 遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。5' 側の塩基配列は RACE 法を利用して決定した。*MLPK* 遺伝子も同様に増幅用のプライマーを設計し、PCR を行い、増幅断片の塩基配列を決定した。各対象遺伝子の一部を特異的に増幅するプライマーをデザインし、蒴または柱頭から合成した cDNA を用いて semi-qRT-PCR により遺伝子発現解析を行なった。

#### (3) リ・シーケンスによる DNA 多型の探索

自家不和合性変異体とその由来となった品種のゲノム DNA を次世代シーケンサーにより Illumina HiSeq2000 でリ・シーケンスした。得られたリードの配列をダイコンのドラフトゲノム塩基配列にマッピングし、その後両者の塩基配列を比較して多型を検出した。

#### (4) 遺伝解析

自家不和合性変異体と *S* ハプロタイプが異なる *S* ホモ系統や所有のハマダイコン系統と交雑し、F<sub>2</sub> 世代の集団を作出した。各 F<sub>2</sub> 集団を使い交配試験による花粉管伸長を観察し、和合・不和合検定を行った。また、各種 DNA マーカー分析で得られた遺伝子型データと和合・不和合の表現型データを用いて遺伝解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ダイコン *S* ハプロタイプの整備

独自に揃えた 24 種類の *S* ハプロタイプについてのホモ系統のうち、12 の *S* ハプロタイプについては、*SCR*、*SRK* または *SLG* 対立遺伝子の塩基配列決定を進めていた。残り 12 についてそれぞれの対立遺伝子の塩基配列決定を試みた。既報のプライマーおよび新規にプライマーをデザインし、ホモ系統ゲノム DNA または cDNA を鋳型に PCR を行い、*SCR*、*SRK* または *SLG* の増幅断片の全て、またはいずれかの塩基配列を決定した。これにより 24 の *S* ハプロタイプの参照配列を整備することができた (表 1)。さらに、これらの *S* ハプロタイプを同定する特異的プライマー対を

SCR 対立遺伝子の配列を基に設計し、Sハプロタイプ同定が可能となった。SRK対立遺伝子を利用して判定する方法も開発した。本手法を用いて、自家和合性変異体のS遺伝子型を調査した結果、S-23ハプロタイプをもつことが分かった。自殖後代において全てがS-23を持つことから、S-23のホモに固定されていることが分かった。

変異体とS-23ホモ系統間で相互に交配をして和合・不和合検定を行った。その結果、変異体の自殖でのみ和合となり、それ以外は不和合であった。このことから、花粉側と雌蕊側の両方が原因で自家和合性になると推測された(表2)。

表1 *R. sativus*にて同定されたSハプロタイプ

Sハプロタイプ	class	SCR	SRK		SLG
			SD	KD	
<i>RsS-1</i>	I	Okamoto et al. 2004	Okamoto et al. 2004	本研究	Sakamoto et al.1998
<i>RsS-2</i>	I	Okamoto et al. 2004	Okamoto et al. 2004	本研究	Sakamoto et al.1998
<i>RsS-3</i>	I	本研究			Sakamoto et al.1998
<i>RsS-4</i>	I	Okamoto et al. 2004	Okamoto et al. 2004	本研究	Sakamoto et al.1998
<i>RsS-5</i>	I	本研究	本研究	本研究	Sakamoto et al.1998
<i>RsS-6</i>	I	Okamoto et al. 2004	Okamoto et al. 2004	本研究	Sakamoto et al.1998
<i>RsS-7</i>	I				Sakamoto et al.1998
<i>RsS-8</i>	I	Okamoto et al. 2004	Okamoto et al. 2004		Sakamoto et al.1998
<i>RsS-9</i>	II	Okamoto et al. 2004	Okamoto et al. 2004		本研究
<i>RsS-11</i>	II	本研究	本研究		本研究
<i>RsS-14</i>	I	本研究			
<i>RsS-15</i>	II	本研究	本研究	本研究	NA
<i>RsS-17</i>	I	本研究	本研究	本研究	NA
<i>RsS-18</i>	I	Okamoto et al. 2004	Okamoto et al. 2004	本研究	本研究
<i>RsS-19</i>	I	Okamoto et al. 2004	Okamoto et al. 2004	本研究	本研究
<i>RsS-21</i>	I	Okamoto et al. 2004	Okamoto et al. 2004	本研究	NA
<i>RsS-22</i>	I	本研究	本研究	本研究	本研究
<i>RsS-23</i>	I	本研究	本研究	本研究	NA
<i>RsS-25</i>	I	本研究			本研究
<i>RsS-26</i>	II	本研究	本研究		本研究
<i>RsS-28</i>	II	本研究			
<i>RsS-29</i>	II	本研究	本研究		本研究
<i>RsS-30</i>	I	本研究	本研究	本研究	本研究
<i>RsS-31</i>	I	本研究	本研究	本研究	本研究

NAはPCRで増幅しなかったことを示す。SDはSRKのSDメインを、KDはSRKのキナーゼドメインを示す。

(2) 既報の自家不和合性関連遺伝子の検証

①S-23ハプロタイプのSCR, SRK遺伝子の解析

変異体がS-23ハプロタイプを持つことが分かったことから、SCR遺伝子およびSRK遺伝子のcDNAの塩基配列の決定を行った。S-23ホモ系統(野生型)が持つSCRの塩基配列と変異体が持つSCRの塩基配列間には、コーディング領域のシグナルペプチド領域において1塩基の置換が見出され、ロイシンからセリンへのアミノ酸置換が生じていた。*R. sativus*と近縁の*Brassica rapa*種や*B. oleracea*種で報告されているSCR配列では対象部位ではロイシンが保存されており、変異体が持つアミノ酸は他と異なることが分かった。シグナルペプチド領域は疎水性に富む領域であるため、疎水性程度が変化するかをSOSUIプログラムで調査した。しかしながら、程度に大きな差異は見られなかった。そのため、変異体由来のSCRタンパク質は機能欠損していないと考えられた。SRKのcDNA塩基配列も決定し同様に比較した。その結果、キナーゼドメインに1塩基の置換が見出された。しかし、同義置換であったことから、SRKの機能には差異がないと推測された。SCRおよびSRK遺伝子の発現を調査した。変異体の葯におけるSCR遺伝子の発現および柱頭におけるSRK遺伝子の発現は、野生型と比較していずれの遺伝子も差が見られなかった(図1)。また、変異体と異なるSハプロタイプを交雑したF<sub>1</sub>を自殖してF<sub>2</sub>世代の集団を育成した。F<sub>2</sub>集団におけるS遺伝子型の分離比はメンデル遺伝の分離比に従った。それぞれのF<sub>2</sub>個体における自家和合・不和合性検定を行なった結果、自家和合性とS-23の遺伝子型との間に連鎖関係は示されなかった。以上の結果から、変異体の自家和合性の原因は変異体が持つSハプロタイプは関与しないことが考えられた。

表2 自家和合性変異体の交配試験

		花粉側	
		RsS-23	SC
井 淵 運	RsS-23	---	---
	SC	---	+++

RsS-23は*Raphanus sativus* S-23ホモ系統、SCは自家和合性変異体  
+: 和合、-: 不和合を示す。交配試験は1度に3花を用いて、3反復行った。

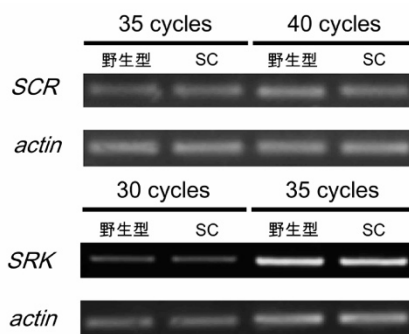


図1 半定量的RT-PCRによる遺伝子発現の結果

②自家不和合性シグナル経路に関与する既知の遺伝子の解析

自家不和合性シグナル経路に関与する既知の遺伝子として、現在までにMLPK1, ARC1, Exo70A1遺伝子が報告されている。これらの遺伝子の雌蕊における発現をRT-PCR法により調査した。その結果、ARC1, Exo70A1, THL1およびTHL2の遺伝子は自家和合性変異体で発現し、野生型との差は見られなかった(図2)。MLPK遺伝子については、野生型と比較して低下が見られた(図2)。PCRのサイクル数を変えて解析した結果、どのサイクル時でも自家和合性系統で遺伝子の発現が低いことが示された。

変異体もつMLPK遺伝子の塩基配列の決定を試みた。その結果、form1型のMLPKにフレームシフトを引き起こす1塩基挿入が見られた。しかしながら、この1塩基多型は自家不和合性を示すダイコンの他の系統にも存在することがDNA分析によって分かり、よって自家和合性を引き起こす原因となる多型ではないと考えられた。一方、柱頭特異的とされているform2型は正常な塩基配列を有していた。変異体もつMLPKの5'側のTATAボックス周辺では、野生型もつ

*MLPK* と比較して 8 塩基の挿入が見られた。

また、上記シグナル経路の遺伝子に近接する領域の DNA マーカーを用いて自家和合性との連鎖解析を行った。その結果いずれも連鎖関係は示されなかった。以上のことから、調査した遺伝子は変異体の自家和合性には関与しないと考えられた。

### (3) リ・シーケンスによる DNA 多型の探索

自家和合性変異体と、そのもとになった品種 (元品種) のゲノム塩基配列を、次世代シーケンスにより決定した。変異体と元品種のそれぞれから 2 個体を供試し、72.58 Gb の品質の高い塩基配列情報を得た。得られたリードの配列をダイコンゲノムのリファレンス配列にマッピングした結果、95~97% の率でマッピングされた。その情報をもとに、リファレンス塩基配列に対する SNP を検出し、さらにそれら SNP 座における変異体と野生型品種間の SNP を調査した。その結果、コーディング領域において、変異体 2 個体間で再現性があり、かつ、非同義的置換を引き起こす 3,723 の SNP が見出された。しかしながら予想より多くの SNP が検出されたことから、本調査のみで自家和合性の原因となる SNP 検出は困難であると判断し、もう一方の研究戦略として考えていた遺伝解析を行うこととした。

### (4) 遺伝解析

自家和合性変異体と自家不和合性を示すハマダイコンを交雑親とする F<sub>2</sub> 分離世代を得、F<sub>2</sub> 世代の 108 個体 (分離集団) を栽培し、自家不和合性の程度を調査した。F<sub>2</sub> 世代の分離集団は明確に自家不和合性と自家和合性のどちらかを示し、その分離比が 9:7 と推定された。一方で、F<sub>2</sub> 集団のゲノムワイドな多型を得るために ddRAD-seq 分析をし、ゲノム網羅的に 5,867 の SNP 座について、SNP の遺伝子型と和合・不和合との表現型との関連性を調査した。その結果、関連性のある遺伝子座が、第 2 染色体上と第 5 染色体の末端部に座乗すると推定された。いずれも自家不和合性に関与する既知の遺伝子の座乗位置とは異なっていた。これらのことから、2 つの遺伝子座に座乗する遺伝子の劣性対立遺伝子が自家和合性を引き起こす原因であると推測された。

### <展望>

本研究で対象にした自家和合性変異体の自家和合性の原因は、*S* 遺伝子や既知のシグナル経路に関与する遺伝子とは異なることが示された。つまりこれらとは別の未知の因子が自家不和合性に関与することが示唆された。今後はさらに遺伝解析によるデータの再現性を取りながら、また異なるアプローチも取り入れることで未知の自家不和合性関与遺伝子の単離・同定を目指していく。本研究の継続により、さらに自家不和合性の経路およびその分子機構の詳細が明らかになると期待される。

また、本研究ではダイコン *S* ホモ系統の *S* ハプロタイプ遺伝子の同定も進み、これにより世界標準の *S* ハプロタイプ情報を更新し提供することができた。この情報は自家不和合性を利用した育種技術の改善に役立つと考えている。また、貴重な遺伝資源であることから、保全に努める必要がある。

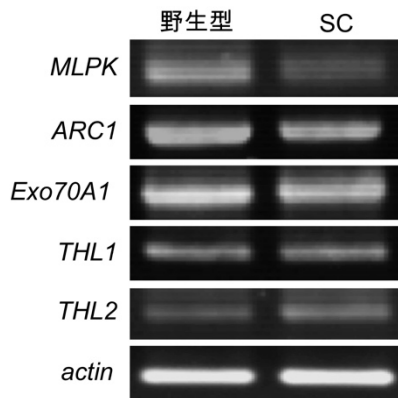


図 2 既知のシグナル経路遺伝子の柱頭での発現解析。  
(半定量的 RT-PCR 法による解析)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Haseyama Y, Kitashiba H. Okamoto S. Tonouchi E, Sakamoto K, Nishio T.	4. 巻 38
2. 論文標題 Nucleotide sequence analysis of S-locus genes to unify S haplotype nomenclature in radish.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Breeding	6. 最初と最後の頁 116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11032-018-0874-2	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 -

1. 著者名 土松隆志、安田晋輔、高田美信、北柴大泰、新倉聡、藤本龍、柿崎智博	4. 巻 21
2. 論文標題 アブラナ科植物における自家不和合性研究の最前線と育種現場での利用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 育種学研究	6. 最初と最後の頁 61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbr.21.W03	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷山祐里恵、北柴大泰、岡本俊介、坂本浩司、西尾剛
2. 発表標題 ダイコンF1品種におけるSハプロタイプ収集に基づくdot-blot Sハプロタイプ同定法の開発
3. 学会等名 日本育種学会第132回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷山祐里恵、北柴大泰
2. 発表標題 ダイコン在来品種におけるSハプロタイプ頻度の現状調査
3. 学会等名 第12回東北育種研究集会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----