

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580006

研究課題名（和文）オオムギ野生種における S 遺伝子座領域のゲノム解析と認識決定因子の同定

研究課題名（英文） Genomic analysis of the S-locus region and identification of the S determinant in wild barley, *Hordeum bulbosum*

研究代表者

掛田 克行（KAKEDA KATSUYUKI）

三重大学・大学院生物資源学研究科・教授

研究者番号：50221867

研究成果の概要（和文）：オオムギ野生種 (*Hordeum bulbosum*) は、独立二遺伝子座 (S および Z) 支配の自家不和合性を有している。本研究では、新たな花粉側 S 遺伝子候補を探索するため、雌ずい側 S 遺伝子の有力候補 *HPS10* 遺伝子周辺のゲノム塩基配列解析を行った。S₁ および S₃ ハプロタイプから単離した当該ゲノム領域のクローンコンティグ (50kb および 67kb) の全塩基配列を決定し、遺伝子の予測および発現解析を行った。その結果、*HPS10* 遺伝子近傍にはハプロタイプ間で多型に富むゲノム領域が存在すること、また当該領域内に生殖器官で発現している遺伝子のあることが明らかとなった。さらに、上記のゲノムシーケンスデータを用いた花粉タンパク質のプロテオーム解析から、自家不和合性の認識因子として機能しうる推定タンパク質が新たに見出された。

研究成果の概要（英文）： *Hordeum bulbosum*, a wild species of barley, possesses self-incompatibility (SI) controlled by unlinked two loci, S and Z. To search for a new candidate gene encoding the pollen S determinant, we conducted sequence analysis of the genomic region around the *HPS10* gene, a promising candidate of the pistil S gene. DNA sequences of genomic clone contigs obtained from S₁ and S₃ haplotypes (50kb and 67kb, respectively) were completely determined and then subjected for prediction of genes and expression analysis. The results showed the presence of polymorphic genomic regions around *HPS10* gene between two S haplotypes, where several genes expressed in reproductive tissues were detected. Furthermore, proteome analysis of the pollen proteins combined with the above-mentioned sequence data newly identified putative pollen proteins that may function as a recognition molecule of the SI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：自家不和合性・イネ科・S 遺伝子・ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

自家不和合性は、自己と非自己の花粉を識別し、非自己花粉での選択的な受精により他殖を促進する被子植物特有の生殖機構である。いくつかの双子葉植物では自家不和合性の認識特異性を決定する遺伝子 (S 遺伝子) の実体が明らかとなり、分子レベルで3種類の異なる自家不和合性機構が発見されている。これらの機構において、雌ずい側と花粉側の認識特異性を決定する遺伝子は異なり、 S 遺伝子座はそれら2種類の遺伝子が座乗する複合遺伝子座であることが明らかとなっている。一方、単子葉植物の自家不和合性遺伝子の単離・同定はなされていない。イネ科 (Poaceae) の自家不和合性は、ムギ類、エンバク、ライグラス (牧草) などが属するイチゴツナギ亜科内にみられ、独立二遺伝子座の S および Z 複対立遺伝子支配による配偶体型の遺伝様式を示すことが知られている。この二遺伝子座 $S-Z$ 型の自家不和合性では、 S 遺伝子と Z 遺伝子の相補的な相互作用によって自家不和合性の自他認識が決定される (S 、 Z 双方の遺伝子型が雌雄で一致すると不和合となる)。この独自の遺伝機構と単子葉植物の進化的位置を考えあわせると、イネ科植物の自家不和合性には、前述の双子葉植物の単一 S 遺伝子座のシステムとは異なる新たな自他認識機構が関与していると推定される。以上の観点に基づき、申請者は、オオムギ近縁野生種、*Hordeum bulbosum* (二倍体) を用いて、自家不和合性遺伝子、とくに S 遺伝子の単離・同定を目指して研究を進めてきた。

2. 研究の目的

イネ科植物に固有の自家不和合性遺伝子を同定し、植物の自家不和合性における新たな自他認識機構を発見・解明すること、さらに栽培化遺伝子としての視点から自家不和合性遺伝子の多様性を進化遺伝学的に解析し、イネ科作物、とくにムギ類における野生種から栽培種への進化に関する新知見を得ることが研究全体の目的である。その中で本研究課題では、オオムギ野生種 (*Hordeum bulbosum*) から単離した雌ずい側 S 遺伝子の有力候補 ($HPS10$) を起点として、当該遺伝子座周辺のゲノム塩基配列の網羅的解析を行うことで花粉側 S 遺伝子候補の単離を進めるとともに、候補遺伝子の自家不和合性における認識決定因子としての機能証明を目指す。

3. 研究の方法

(1) S 遺伝子座周辺領域のゲノムシーケンス解析。オオムギ野生種 (*H. bulbosum*) の S_1 および S_3 ハプロタイプから単離した候補 S 遺伝子 ($HPS10$) を含むゲノム DNA 領域 (コスミドコンティグ) の全シーケンスを決定する。2

つのゲノムシーケンスの比較から、多型に富む領域と保存領域との境界を検出し、 S 遺伝子座が座乗するゲノム領域を絞り込む。

(2) 新たな候補遺伝子の探索と単離。(1) で決定したゲノムシーケンスの遺伝子予測および発現解析に基づき、新たな花粉側 S 遺伝子候補を探索し、得られた候補遺伝子の cDNA クローンの単離および S ハプロタイプ間での配列多型性の調査を行い、 S 遺伝子候補としての妥当性を検証する。

(3) 花粉タンパク質のプロテオーム解析。新たな花粉側 S 因子同定のためのアプローチとして、 S_1 および S_3 ハプロタイプの成熟花粉から抽出したタンパク質を、疎膜画分および細胞質画分に分画した後、ESI-MS/MS 装置を用いて分析し、花粉タンパク質のプロテオーム解析を行う。

4. 研究成果

(1) S 遺伝子座周辺領域のゲノムシーケンス解析。 S_1 および S_3 ハプロタイプの $HPS10$ 遺伝子周辺ゲノム領域のクローンコンティグの全塩基配列 (50kb および 67kb) を決定した。Harr plot 解析により、2つの S ハプロタイプ間で相同性が高い4つの領域が検出されるとともに、 $HPS10$ 遺伝子近傍に多型に富む領域の存在することが明らかとなった。

(2) 新たな候補遺伝子の探索と単離。

① GeneMark および RiceGAAS プログラムによって推定された ORF のうち、 S_1 および S_3 においてそれぞれ4個の ORF の発現を確認した。このうちの1つ S1-GM13 は、発現量は低いものの薬特異的発現を示し、 $HPS10$ 近傍に位置することから、花粉側 S 遺伝子の候補となる可能性が示唆された。

② $HPS10$ 遺伝子に隣接し、生殖器官で発現する $DUF247$ 遺伝子 (S_1 および S_3 - $DUF247$) について、実際の転写領域が推定 ORF 領域とは異なることが判明した。この $DUF247$ 遺伝子の転写領域を決定するため、3' RACE 解析を行った結果、1つのエキソンからなる転写産物 ($DUF247a$) と、2つのエキソン構造を持つ転写産物 ($DUF247b$) の主に2種類の転写産物が存在することが明らかとなった。また、 $DUF247b$ の第2エキソンは $HPS10$ mRNA の相補鎖に部分的にオーバーラップすることが示された。

③ $DUF247$ 遺伝子の各転写産物から翻訳される推定アミノ酸配列を S_1 および S_3 ハプロタイプ間で比較すると、 $DUF247a$ は79%の相同性を示しC末端領域が保存されていたのに対して、 $DUF247b$ では第2エキソンにコードされるC末端部分に多型領域のあることが示された。また発現パターンに関して、 $DUF247a$ が全組織で発現するのに対して、 $DUF247b$ は生殖器官特異的 (S_1 では雌ずい、 S_3 では薬と雌ずい) 発現を示した。さらに、 S_1 ハプロタイプ

では葯で特異的に発現するもう1つの転写産物(DUF247c)が存在することが示された。これらの結果から、生殖器官特異的に発現する転写産物にコードされるDUF247タンパク質は新たなS決定因子の候補になりうるが、花粉側S因子の候補と考えるには、 S_1 -DUF247cのような葯特異的なスプライシング産物が他のSハプロタイプにも存在するかどうか、今後さらに詳しく調査する必要があると考えられた。

(3) 花粉タンパク質のプロテオーム解析。 S_1 および S_2 ハプロタイプの成熟花粉から抽出したタンパク質を、疎膜画分および細胞質画分に分画した後、ESI-MS/MS分析を行った。(1)で決定したHPS10遺伝子周辺ゲノム領域の塩基配列をデータベースに用いてMASCOT検索を行った結果、当該ゲノム領域上にあるいくつかのペプチド配列が同定された。これらの配列の相同性検索を行ったところ、ゲノム塩基配列のみを用いて解析した際に予測された既知のORFとは異なる新規ORFが多数検出された。また、これらの翻訳タンパク質の中には、シグナル伝達や細胞間認識に関与し、自家不和合性の認識因子として機能する可能性のあるタンパク質が新たに見出された。これらの新たなORF情報は、今後、各Sハプロタイプの花粉で発現しているcDNAの解析から花粉側S遺伝子候補を絞り込むために有効であると考えられた。

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4件)

- ① K. Kakeda, N. Ishihara, Y. Izumi, K. Sato, S. Taketa, Expression and functional analysis of the barley *Nud* gene using transgenic rice, *Breeding Science*, 査読有、Vol. 61: 35-42 (2011)
- ② K. Kakeda, M. Tsutsumi, Y. Kowyama, Deletion mutations of the self-incompatibility (*S*) locus induced by gamma irradiation in a wild diploid species of sweet potato, *Ipomoea trifida*, *JARQ*, 査読有、Vol. 44: 127-131 (2010)
- ③ K. Kakeda, S. Taketa, T. Komatsuda, Molecular phylogeny of the genus *Hordeum* using thioredoxin-like gene sequences, *Breeding Science*, 査読有、Vol. 59: 595-601 (2009)
- ④ K. Kakeda, *S* locus-linked F-box genes expressed in anthers of *Hordeum bulbosum*, *Plant Cell Reports*, 査読有、Vol. 28: 1453-1460 (2009)

[学会発表] (計10件)

- ① 掛田克行、BSMV-VIGSによるオオムギ *Nud* 遺伝子の発現抑制と皮裸性の変化、日本育種学会第121回講演会、2012.3.30、宇都宮市
- ② 橋本 翔、オオムギ野生種における雌蕊側S因子候補HPS10の*in vitro*花粉発芽阻害効果の検定、育種学会中部地区談話会第19回講演会、2011.12.10、津市
- ③ 掛田克行、イネ科植物の受粉過程における二遺伝子座自家不和合性システム、日本分子生物学会第33回年会、2010.12.7、神戸市
- ④ 掛田克行、オオムギ属野生種における*ClyI*ホモログの解析、日本育種学会第118回講演会、2010.9.25、秋田市
- ⑤ K. Kakeda、Molecular and genomic analysis of the *S* locus region in wild barley, *Hordeum bulbosum*, 11th International Congress on Sexual Plant Reproduction, 2010.8.5、Bristol(UK)
- ⑥ K. Kakeda、Two-locus allorecognition system in the self-incompatibility of wild barley, *Hordeum bulbosum*, International Symposium Intercellular recognition and allogeneric authentication, 2010.1.14、Nagoya
- ⑦ 石原倫光、オオムギ皮裸性遺伝子(*Nud*)を導入した形質転換イネの組織化学的解析、育種学会中部地区談話会第17回講演会、2009.12.5、静岡市
- ⑧ K. Kakeda、Comparative analysis of the *S* locus region in wild barley, *Hordeum bulbosum*, 9th International Plant Molecular Biology Congress, 2009.10.28、St. Louis (USA)
- ⑨ 石原倫光、オオムギ属における穎花の開閉性に関する種間変異、日本育種学会第116回講演会、2009.9.25、札幌市
- ⑩ K. Kakeda、Molecular phylogeny of the genus *Hordeum* using thioredoxin-like gene sequences, 6th International Triticeae Symposium, 2009.6.1、Kyoto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

掛田 克行 (KAKEDA KATSUYUKI)
三重大学・大学院生物資源学研究所・教授
研究者番号：50221867

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小松田 隆夫 (KOMATSUDA TAKAO)

独立行政法人農業生物資源研究所・基盤研究領域植物ゲノム研究ユニット・上級研究員

研究者番号：60370657