

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450011

研究課題名(和文)ソバにおける自家不和合性の雄性因子の同定

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of buckwheat stamens to identify the genes involved in heteromorphic self-incompatibility

研究代表者

相井 城太郎 (All, JOTARO)

新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：10391591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：フツウソバの生殖は、虫媒による異形花型自家不和合性に基づき行われる。ソバにおける異形花型自家不和合性は、作柄不安定の一因ともなっている。本研究では、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析と突然変異体の解析によって、ソバにおける異形花型自家不和合性の花形と花粉の自他認識の制御に関わると考えられる2つの遺伝子を見出した。花粉の自他認識制御に関わると考えられる遺伝子の欠損変異体を育種素材として利用することによって、訪花昆虫を必要としない自殖性ソバ品種の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Common buckwheat, *Fagopyrum esculentum*, is a heteromorphic self-incompatibility (SI) species. Its yield is relatively unstable compared to other major self-fertilizing crops due to heteromorphic SI. In this study, we attempted to identify the genes involved in heteromorphic SI of buckwheat. Noble two genes were found by transcriptome and genomic analyses, which were located to the S locus and to be expressed in the short-styled flower. These two genes are suitable candidate genes for the control of the short-styled phenotype of buckwheat plants. Our knowledge obtained from this study will enable to develop self-fertilizing buckwheat cultivars.

研究分野：農学

キーワード：自家不和合性 生殖様式

1. 研究開始当初の背景

自家不和合性は、同種異個体の交配では受精が成立するのに対して、自家受粉では受精できない現象である。自家受粉したときに受精が起きない原因としては、花粉の不発芽、花柱内での花粉管伸長抑制などが知られている。自家不和合性には、花の形態には多型を示さない同形花型と、花の形態が複数型あり異なる形の花に由来する配偶子間でのみ受精が成立する異形花型自家不和合性が知られる。前者においては、花粉の自他認識に関わる因子（雌性側 S 因子と雄性側 S 因子：S 遺伝子）が同定され、雌蕊における自家花粉と他家花粉の認識・識別機構モデルが提唱されている。一方後者においては、S 遺伝子は単に花粉の自他を認識するだけでなく、葯、雌蕊の物理的位置関係も制御することから、大きな遺伝子複合体 (S-supergene) になっていると考えられている (図 1) が、自他認識

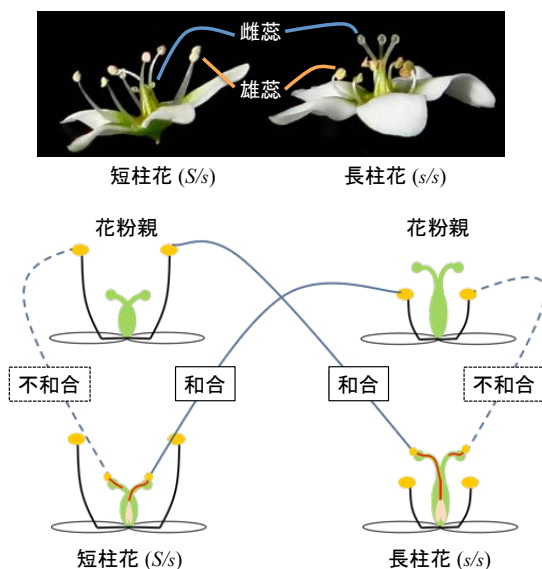


図 1 ソバにみられる異形花型自家不和合性

を決定する因子は未だ明らかとなっていない。したがって、ソバにおける自家不和合性の解明は、植物の新規の自己・非自己認識機構の発見に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ソバの異形花型自家不和合性の雄性因子を同定することで、C. Darwin の時代より謎である植物の異形花型自家不和合性機構を解明する点にある。自家不和合性は高等植物の多くで取り入れられているが、その機構が明らかとなっているのは同形花型自家不和合性を示す数種の植物にすぎない。自家不和合性という形質がどのように植物種に取り入れられ、進化・種分化したかを考察するうえでの知見獲得を目指す。

また、これまで日本においてフツウソバ (*Fagopyrum esculentum*) と自殖性野生種 *F. homotropicum* との雑種後代から自殖性ソバ

が得られているが、実用的な自殖性品種は未だに作出されていない。これは S 関連領域では組換えが極端に抑制されており、*F. homotropicum* 由来のゲノム領域を完全に取り除くことができないためである。本研究は、ソバにおける自家不和合性の雄性因子を同定し、逆遺伝学的手法による自家和合性変異体単離に応用することで、訪花昆虫を必要としない自殖性ソバの品種開発の基盤を作ること目標とする。

3. 研究の方法

(1) 雄性器官のトランスクリプトーム解析
フツウソバの短柱花と長柱花及び雄性（花粉）側に変異を有する自家和合性突然変異体の短柱花と長柱花の雄性器官における RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を実施した。ソバゲノムのドラフト配列を参照とし、S 座より発現する遺伝子の絞り込みを行った。

(2) 雄性側 S 遺伝子候補の発現解析

トランスクリプトーム解析により短柱花及び長柱花個体で強発現をしていると考えられる遺伝子については、RT-PCR による発現特異性の確認を行った。

(3) 変異体を用いた雄性側 S 遺伝子候補の機能検証

自家和合性変異体及び短柱花から長柱花へ花形が変化したキメラ変異体を用いて、雄性側 S 遺伝子候補の配列解析及び発現解析を行った。

(4) アソシエーション解析

ソバの種内における雄性側 S 遺伝子候補の有無と花形質問のアソシエーション（関連）を調査するため、ブータン (6 集団)、中国 (20 集団)、インド (14 集団)、ネパール (14 集団) パキスタン (14 集団)、日本 (12 集団)、ヨーロッパ (14 集団) の各集団から短柱花及び長柱花を示す個体より DNA を抽出し、PCR による解析を行った。

4. 研究成果

(1) 雄性器官のトランスクリプトーム解析
フツウソバの短柱花および長柱花雄蕊の total RNA を HiSeq2000 に供試し、得られたリードを Velvet でアセンブルし CD-HIT/TGICL により、123,863 個の Unigene を得た。これらの Unigene について RSEM および edgeR を用いてフツウソバの短柱花および長柱花雄蕊における発現量の推定および比較をしたところ、発現量差異が 2⁷ 倍以上ある Unigenes および短柱花または長柱花のみで発現が予測される Unigenes が 34 個得られた。そのうち、22 の Unigenes が短柱花個体で強発現していると推定された (図 2)。

短柱花個体で強発現していると推定された 22 の Unigenes について、BLAST による相

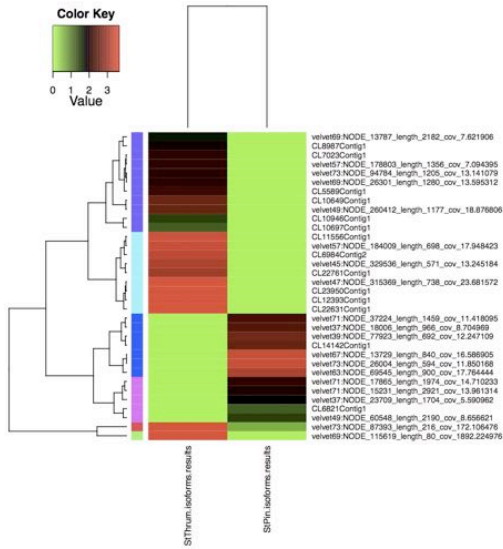


図2 短柱花及び長柱花個体の雄蕊における遺伝子発現量の比較解析

同姓検索を行ったところ、4つのUnigenesが注釈付けられた。そのうち1つは、すでに我々が報告している短柱花特異的な遺伝子である *S-ELF3* であったため、本発現解析は妥当な結果が得られていると考えられる。

さらに、ソバゲノムのドラフト配列を参照することにより、3つのUnigenesがS座あるいはその近傍より転写されることが示された。また、そのうち1つについては、*S-ELF3* の新規転写産物であることが示された。これらより、雄性側S遺伝子候補を3つまで絞り込むことができた。

(2) 雄性側S遺伝子候補の発現解析

雄性側S遺伝子候補として絞り込まれた3つのUnigenesについて、RT-PCRによる発現解析を行ったところ、2つのUnigene (NODE184009及び*S-ELF3v4*)が短柱花個体の雄蕊特異的に発現していることが示された(図3)。

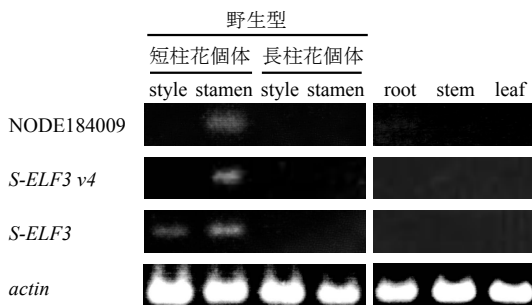


図3 RT-PCRによる雄性側S遺伝子候補の発現解析

(3) 変異体を用いた雄性側S遺伝子候補の機能検証

① NODE184009の機能検証

NODE184009の雄性側S遺伝子としての妥当性を検証するために、フツウソバの短柱花個体に対するイオンビーム照射によって得られたキメラ個体の短柱花部分および長柱花部分のゲノムDNAを鋳型としたPCR解析を行った(図4)。その結果、キメラ個体の短柱

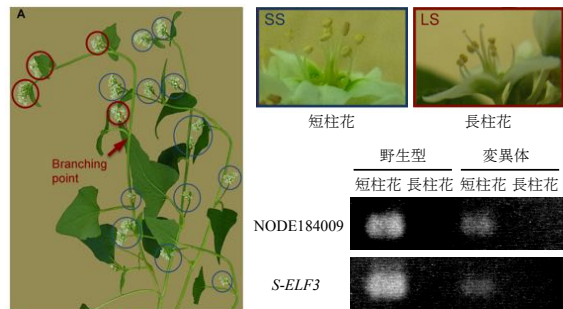


図4 S遺伝子座が欠失したキメラ変異体を用いたNODE184009の機能検証

花部分より抽出したDNAを鋳型としたPCRでは増幅産物が確認できたが、長柱花部分より抽出したDNAを鋳型として用いた場合では増幅産物が確認できなかった。そのため、NODE184009は短柱花の表現型の決定に重要な遺伝子であることが示唆された。

さらに、雄性(花粉)側に変異を有し、短柱花個体においてのみ自殖する変異体を用いて、NODE184009がソバにおける異形花型自家不和合性の花形制御あるいは花粉の自己認識に関わるのかを調査した。RT-PCRによる発現解析を行ったところ、NODE184009は、野生型及び自家和合性変異体の双方の雄蕊において発現していることが示された(図5)。

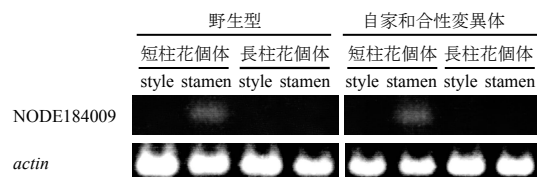


図5 自家和合性変異体を用いたNODE184009の機能検証

また、両者におけるNODE184009の塩基配列には差異が認められなかった。これらの結果は、NODE184009は、ソバにおける異形花型自家不和合性の短柱花の雄蕊の表現型決定に関与することを示すものである。

② *S-ELF3v4*の機能検証

*S-ELF3*の新規転写産物である*S-ELF3v4*の

雄性側 *S* 遺伝子としての妥当性を検証するために、雄性（花粉）側に変異を有し、短柱花個体においてのみ自殖する変異体を用いて RT-PCR による発現解析を行った。その結果、*S-ELF3v4* は野生型短柱花個体の雄蕊で発現するものの、本変異体の短柱花個体の雄蕊においては発現が認められなかった（図 6）。



図 6 自家和合性変異体を用いた *S-ELF3v4* の機能検証

本変異体は、花形の変化を伴わず短柱花個体においてのみ自殖することから、雄性側 *S* 遺伝子の発現量低下あるいは発現していないと考えられる。したがって、*S-ELF3* より転写される *S-ELF3v4* は、ソバにおける自家不和合性の花粉自他認識を制御する因子であると考えられた。

(4) アソシエーション解析

世界の集団から収集した 47 個体の短柱花及び長柱花個体を対象として、NODE184009 を PCR により増幅したところ、すべての短柱花個体で増幅が確認され、長柱花個体においては確認することができなかった。したがって、NODE184009 は、以前我々が報告した *S-ELF3* 同様に単一遺伝子であり、短柱花ゲノム (*S* 対立遺伝子) にしか存在しないことが示された。

以上の結果から、本研究で見出された NODE184009 と *S-ELF3v4* は、ソバの短柱花形質の発現に重要な役割を果たしていることがわかった。雄性因子変異体は室内栽培で自家受粉率が高く、屋外での栽培でも訪花昆虫を必要としない。*S-ELF3* を標的とした逆遺伝学的手法による変異体単離を行うことで、これまでない収量の増収性と安定性を併せ持つ自殖性ソバ品種育成につながり、ソバ育種への新たな展開が期待される。

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 2 件)

- ① Yasuo Yasui, Hideki Hirakawa, Mariko Ueno, Katsuhiko Matsui, Tomoyuki Katube-Tanaka, Soo Jung Yang, Jotaro Aii, Shingo Sato and Masashi Mori

(2016) Assembly of the draft genome of buckwheat and its applications in identifying agronomically useful genes. DNA res.

DOI:10.1093/dnares/dsw012 (査読有り)

- ② 掛田克行、佐々英徳、土屋亨、相井城太郎 (2014) 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 (査読なし)

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① Hideki Hirakawa, Yasuo Yasui, Mariko Ueno, Katsuhiko Matsui, Tomoyuki Katube-Tanaka, Soo Jung Yang, Jotaro Aii, Shingo Sato and Masashi Mori 「Draft genome sequencing of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and application for identifying agronomically useful genes」 International Plant and Animal Genome XXVI, 2017 年 1 月 13 日~18 日、(San Diego, CA, USA)
- ② 大田竜也、相井城太郎、安井康夫「フツウソバにおける異形花型自家不和合性-ゲノム・トランスクリプトーム解析を踏まえて-」国立遺伝学研究所ワークショップ 分子進化学の現状と今後の展望、2016 年 8 月 20 日~21 日、国立遺伝学研究所 (静岡)
- ③ 相井城太郎、安井康夫、佐藤真吾、田巻茜、中野絢菜、森正之、田中宥司、大田竜也「異形花型自家不和合性を示すソバにおけるトランスクリプトーム解析」日本進化学会第 18 回東京大会、2016 年 8 月 25 日~28 日、東京工業大学 (東京)
- ④ 相井城太郎「ゲノム科学によるソバ育種研究の進展と最近の進歩」バイオサイエンス in 新潟、2016 年 8 月 29 日、新潟市
- ⑤ 相井城太郎、大田達也、安井康夫、森正之、佐藤真吾、田巻茜、中野絢菜、キャンベル・クレイトン、長野美緒、田中宥司「異形花型自家不和合性を示すソバの雄蕊におけるトランスクリプトーム解析」日本育種学会第 130 回講演会、2016 年 9 月 24 日~25 日、鳥取大学 (鳥取県、鳥取市)
- ⑥ 相井城太郎、佐藤真吾、田巻茜、長野美緒、キャンベル・クレイトン、安井康夫、森正之、大田竜也、田中宥司「RNA-seq 解析によるソバ異形花型自家不和合性の雄性因子の探索」日本育種学会第 126 回講演会、2014 年 9 月 26 日~27 日、南九州大学 (宮崎県、都城市)
- ⑦ 相井城太郎、佐藤真吾、佐藤祐也、中野絢菜、田中宥司「ソバの異形花型自家不和合性機構」日本育種学会第 124 回講演会、2013 年 10 月 12 日~13 日、鹿児島大学 (鹿児島県、鹿児島市)
- ⑧ Yasuo Yasui, Masashi Mori, Jotaro Aii, Shingo Sato, Ohmi Ohnishi, Tomoko Abe,

Yoriko Hayashi, Daiki Matsumoto and Tatsuya Ota「Intact S-ELF3 is exclusive to heteromorphic SI species in Fagopyrum」第12回国際ソバシンポジウム、2013年8月21日～25日(ラシュコ、スロベニア)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

- ① 2016年4月20日「京大と石川県立大、かずさDNA研など、ソバのゲノムを解読」日経バイオテク
(<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/news/pl/16/04/19/00579/>)
- ② 2016年4月13日京都大学研究成果報告ホームページ「世界初となるソバの全ゲノム解析に成功」
(http://www.kyoto-uac.jp/ja/research/research_results/2015/160331_1.html)
- ③ 2016年4月1日新潟薬科大学ホームページ「世界初となるソバの全ゲノム解析に成功」
(<http://www.nupals.ac.jp/news/2016/04/post-197.html>)
- ④ 読売新聞(2016年4月1日29面)にソバゲノム解読に関する記事が掲載
- ⑤ 新潟日報朝刊(2016年3月31日34面)「新潟薬科大学と京都大学、石川県立大学などの研究グループがソバゲノムを世界で初めて解読」
- ⑥ 朝日新聞(2016年3月31日37面)、京都新聞(2016年3月31日33面)、産経新聞(2016年3月31日14面)にソバゲノム解読に関する記事が掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相井 城太郎(AII JOTARO)
新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授
研究者番号：10391591

(2) 研究分担者

森 正之(MORI MASASHI)
石川県立大学・生物資源環境学部・准教授
研究者番号：00320911

大田 竜也(OTA TATSUYA)
総合研究大学院大学・先導科学研究科・准教授
研究者番号：30322100

(3) 連携研究者

安井 康夫(YASUI YASUO)
京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教
研究者番号：70293917

(4) 研究協力者

なし()