

機関番号：14101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580004
 研究課題名（和文）：サツマイモ野生種・栽培種の自家・交配不和合性における自他認識機構の解明
 研究課題名（英文）：Study of self/non-self recognition system in self/cross incompatibility of wild type and cultivated sweet potato
 研究代表者
 土屋 亨（Tohru TSUCHIYA）
 三重大学・生命科学支援センター・准教授
 研究者番号：30293806

研究成果の概要（和文）：

本研究では、サツマイモ野生種 (*Ipomoea trifida*) の自家不和合性における自他認識に直接的に関わる *S* 遺伝子の同定を試みた。複数の *S* 遺伝子座を単離して解析したところ、*S* 遺伝子座周辺領域長は、*S* 遺伝子の優劣性に従って優性のものほど長くなっていた。また、自家和合性突然変異体の解析から、*S* 候補遺伝子のうち、*AB2*（♂側）と *SEA*（♀側）が有力な候補であることが示された。サツマイモ栽培種 (*I.batatas*) も、*I.trifida* の自家不和合性と同一の分子基盤に基づく不和合性を有しており、その解析の結果、*I.trifida* の *S*₃ 遺伝子型は、*I.batatas* にも保存されていることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Wild type sweet potato (*Ipomoea trifida*) has sporophytic self-incompatibility (SSI) system, but this system is not based on the *SP11/SCR* and *SRK* system, which is observed in Brassica. To identify *S* genes of *Ipomoea* SSI system, *S*-locus genomic regions from several *S*-haplotypes, including self-compatible (*Sc*) mutant, were isolated and analyzed. According to the shotgun sequencing of *S*-locus genomic regions from four *S*-haplotypes, the length of the *S*-locus genomic region was parallel to the dominant-recessive hierarchy of *S*-genes; longer in dominants, shorter in recessives. In the *Sc* mutant line, all *S*-candidate genes; *AB2* for male, and *SE2* and *SEA* for female; were located in the *Sc*-*S*-locus, however, *AB2* and *SEA* genes were duplicated, and two *SEA* genes indicated ectopic expression in the male reproductive organs. It is possible to consider that this ectopic expression of *SEA* genes make *Sc* line as self-compatible. *S*-candidate gene analyses of wild type (*I.trifida*) and cultivated (*I.batatas*) indicated that *S*₃ haplotype of *I.trifida* is conserved in the *I.batatas*. This result indicates that the self/cross-incompatibility in cultivated sweet potato is based on the same molecular mechanism as in the self-incompatibility of *I.trifida*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：植物分子育種

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：自家不和合性、サツマイモ野生種、*Ipomoea trifida*、交配不和合性、自他認識
Ipomoea batatas、*S* 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

サツマイモ栽培種 (*Ipomoea batatas*) の交配不和合性は、サツマイモ野生種 (*I. trifida*) の自家不和合性と根源的には同一の機構によるものであり、現在までに 20 種以上の交配不和合群が確認されている。

自家不和合性は、多くの被子植物において認められる現象であり、雌雄の生殖器官が正常に発達するにも関わらず、自家受粉および同一 *S* ハプロタイプ間での交配を行った際には受精に至ることができない現象である。サツマイモは孢子体型自家不和合性を示し、1 遺伝子座の *S* 複対立遺伝子により制御されており、自家受粉の際に花粉管の不発芽として観察される。

サツマイモ栽培種 (*I. batatas*) は 6 倍体であるため分子生物学的解析には向かない。申請者らは 2 倍体のサツマイモ野生種 (*I. trifida*) を用いて研究を行い、その自家不和合性に関連して以下の事実を明らかにした。

- ① サツマイモ野生種の自家不和合性が孢子体型であること
- ② *S* 遺伝子座近傍のタンパク質遺伝子 (*SSP*) を単離した
- ③ *S* 遺伝子座周辺領域のマーカーを AMF 法により単離した
- ④ *S*₁, *S*₁₀, *S*₃, *S*₂₉, *S*_c の *S* 遺伝子座周辺領域を単離し、*S*₁ および *S*₁₀-*S* 遺伝子座については配列の決定を行った
- ⑤ *S* 遺伝子座周辺領域に座乗する生殖器官特異的遺伝子および非特異的遺伝子を同定し、それらの発現動態を解析した
- ⑥ *S*_c 系統は自家不和合性でありながら *S* 遺伝子座上に各 *S* 候補遺伝子が座乗している
- ⑦ 現存する最劣性の系統から優性系統が派生した
- ⑧ 優劣性に基づきヘテロ系統の花粉側 *S* 候補遺伝子では劣性遺伝子が転写されない

これまでのゲノム・転写産物レベルの解析では、真の *S* 遺伝子に対するアプローチは不完全であった。そこで、本研究においては、これまでに解明された *S*₁ および *S*₁₀-*S* 遺伝子型の *S* 遺伝子座に加え、最優性の *S*₂₉、最劣性の *S*₃、更に自家不和合性突然変異体である *S*_c の各 *S* 遺伝子座を単離し、その構造解析を行うことにより、真の *S* 遺伝子を同定することを試みた。

自家不和合性を人為的に制御し農業現場への応用を図る上で、本形質の分子生物学的・遺伝的解明は必須である。これまでの自家不和合性研究は、アブラナ科、ナス科、バラ科、ケシ科などの植物で行われているが、これら 4 植物種の成果では全ての自家不和合性機構を説明できない。前述の 4 植物種においては、自他認識に関わる遺伝子が単離され

ている (アブラナ科: *SCR/SP11*, *SRK*、ナス科・バラ科: *SFB*, *S-RNase*、ケシ科: *PrpS*, *PrsS*; いずれも♂側, ♀側の *S* 遺伝子) が、サツマイモ野生種の *S* 遺伝子座周辺領域上には、*SP11/SCR* に類似した遺伝子 (*AB2*, *AB3*) を除き相同な遺伝子は存在しない。また、同じ孢子体型自家不和合性を示すアブラナ科植物と比較しても、サツマイモ野生種の自家不和合性は独特のものであると考えられる。

2. 研究の目的

これまでのサツマイモ野生種 (*I. trifida*) の孢子体型自家不和合性の研究で、申請者らは自家不和合性 2 系統の *S* 遺伝子座周辺領域のゲノム解析を完了すると共に、当該領域に座乗する *S* 候補遺伝子を同定した。その結果、サツマイモ野生種の自家不和合性においては、アブラナ科植物とは異なる遺伝子群が関与していることが示された。

本研究においては、これまでのゲノム・転写産物レベルの解析を踏まえ、他の *S* 遺伝子型における *S* 候補遺伝子の構造および発現を確認して真の *S* 遺伝子の決定へのアプローチを行うと共に、タンパク質レベルからの *S* 遺伝子の決定を試みた。

また、サツマイモ栽培種 (*I. batatas*) の交配不和合性は、サツマイモ野生種 (*I. trifida*) の自家不和合性に立脚し、その分子的制御機構も同一であると考えられていることから、サツマイモ栽培種においても、*S* 候補遺伝子が存在し発現しているはずである。そこで、サツマイモ栽培種における、これら自家不和合性関連遺伝子の存在と発現動態について検討した。

3. 研究の方法

実験植物の栽培

サツマイモ栽培種 (*I. batatas*) とサツマイモ野生種 (*I. trifida*) は、いずれも冬季は温室内 (27~28°C: 自然日長) で、夏季は自然条件下で栽培した。また、各品種系統 (*I. batatas*: 20 品種/系統、*I. trifida*: 36 系統) は、無菌条件下での系統維持を植物インキュベーター内で行った (14 時間日長: 昼温 28°C、夜温 22°C)。

ゲノム DNA の単離

サツマイモ各品種系統のゲノム DNA は、各々の葉より、Thomas らの方法 (TAG, 86, 2-3, 173-180, 1993) を改変して単離精製した。

生殖器官 mRNA の調製

サツマイモ各品種系統の開花 2 週間前、開

花1週間前、開花前日の蕾より、葯と柱頭を単離し、液体窒素で凍結後-80°Cで凍結保存した。これら試料からの mRNA の単離精製は、Quick Prep Micro mRNA Isolation Kit (GE lifesciences) を用いて行った。

各種ライブラリーの調製

サツマイモ野生種各系統の S 遺伝子の単離解析を行うために、上記方法により単離したゲノム DNA を超音波により断片化し末端処理を行った後に、パルスフィールドゲル電気泳動により分離し、40kbp 内外の DNA 断片を精製後、CopyControl Fosmid Library Production Kit (Epicentre) を用いてクローニングしライブラリーとした。

またサツマイモ各品種系統より単離した mRNA を元に、First-strand cDNA synthesis kit (GE lifesciences) を用いて1本鎖 cDNA を合成すると共に、ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene) を用いて、各 cDNA ライブラリーを調製した。

PCR による目的 DNA 断片の増幅

ライブラリースクリーニングのプロープテンプレートの調製並びに既知の S 候補遺伝子の完全長 cDNA の単離、サツマイモ栽培種の S 候補遺伝子の単離のため、上記で調製・合成した1本鎖 cDNA、ゲノム DNA を鋳型として PCR (Takara, Eppendorf) による目的断片の増幅を行った。

ライブラリーのスクリーニング

ゲノムおよび cDNA ライブラリーのスクリーニングは常法に従って行った。尚、スクリーニング時に使用したプロープは、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) を用いて調製し、シグナルの検出には、同社の CDP-Star を用いた化学発光法を使用した。

塩基配列の決定

S 遺伝子座の塩基配列の決定には、DNA sequencer 3100 (Applied Biosystems) を用いて行った。その他の塩基配列決定も、同様の解析方法を適用した。

タンパク質の in vivo 合成

サツマイモ野生種の S 候補遺伝子のタンパク質合成には、PCR 増幅した当該 DNA 断片を Flexi ベクター (Promega) にサブクローニングし、大腸菌体内での合成を行った。

遺伝子発現解析

S 候補遺伝子の発現解析は、前述の通り単離・合成した mRNA・1本鎖 cDNA を用いた

ノーザン分析または RT-PCR 分析により行った。ノーザン分析のプロープは、前述の通り合成した。

4. 研究成果

サツマイモ野生種の S 遺伝子座の構造解析

本研究で新たに単離した、 S_{29} (最優性)、 S_3 (最劣性)、および Sc (自家和合性変異体) の S 遺伝子座領域の塩基配列の決定を行い、これまでに得られている S_1 および S_{10} -S 遺伝子座領域との比較を行った (図1)。

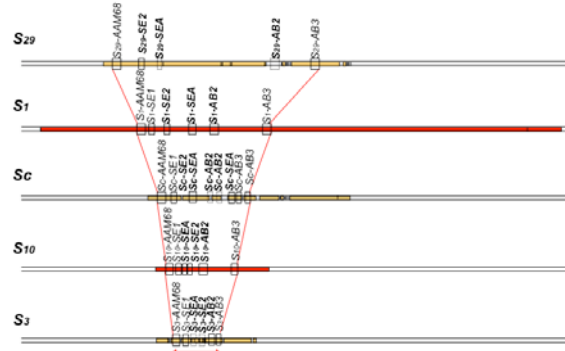


図1. S 遺伝子座周辺領域の構造解析

現段階では、 S_{29} 、 S_3 、 Sc の各 S 遺伝子座周辺領域は完全には連結しておらず、各々数カ所のギャップが存在している。しかしながら、S 遺伝子座周辺領域中に存在する可変領域 (SDR : S-diversity region) の長さは、優性側から S_{29} が約 150kbp、 S_1 が 96kbp、 S_{10} が 60kbp、 S_3 が約 45kbp となっており、自家和合性の突然変異体である Sc が約 70kbp であった。

自家和合性系統 Sc は、自家和合性でありながら、自家不和合性の優劣性を支配する遺伝子に関しては変異が起きておらず、自家不和合性の優劣性の階層中に位置付けることができ、優劣関係は、 $S_{29} > S_1 > Sc > S_{10} > S_3$ である。この Sc 系統についても同様に S 遺伝子座周辺領域を単離し解析を行ったところ、推定 SDR 長が約 70kbp であることが明らかになった。

従って、サツマイモ野生種の自家不和合性に関して、SDR 長が優劣性の関係に従っており、優性側が長く、劣性側ほど短くなっていた。このことは、サツマイモ野生種の自家不和合性において、S 遺伝子が劣性側から優性側へと進化した可能性を含んでいる。

一方で、自家和合性系統 Sc においては、S 候補遺伝子である $AB2$ (♂側候補) および SEA (♀側候補) に関して、重複して存在していることが塩基配列の解析より明らかになった。これら遺伝子の重複により Sc 系統を自家和合性に行っている可能性が考えられたため、発現解析を行った。

サツマイモ野生種 *S* 候補遺伝子の発現解析

これまでに明らかになったサツマイモ野生種の S_1 および S_{10} -*S* 候補遺伝子の発現は、♂側候補である *AB2* に関しては開花 2~1 週間前の葯のタペート組織で、♀側候補である *SE2* と *SEA* に関しては開花 1 週間前~前日の柱頭の乳頭細胞で、各々特異的であった。これら *S* 候補遺伝子の発現を、RT-PCR により S_{29} (最優性)、 S_3 (最劣性) および *Sc* (自家和合性) の各系統において、再度確認を行った (図 2)。

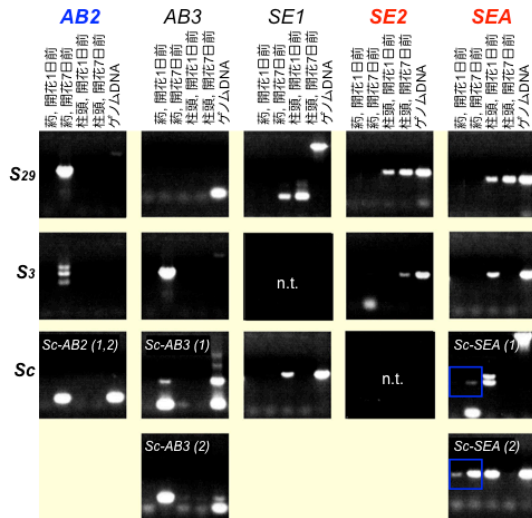


図 2. *S* 候補遺伝子の発現解析

Sc において重複が認められた *AB2* と *SEA* のうち、*AB2* に関しては配列が完全に同一であり区別して検出することはできなかったが、*SEA* (および *AB3*: *S* 候補遺伝子ではない) については各々区別して検出することができた。

S 候補遺伝子である *AB2* と *SEA* に関しては、 S_{29} , S_3 の自家不和合性系統でも、既に解析が住んでいた S_1 , S_{10} 系統と同様の発現が認められた。また、*Sc* 系統においても正常に発現していたことから、*Sc* 系統の自家不和合性化の原因は、*S* (候補) 遺伝子の重複にはないことが示された。しかしながら、*Sc* 系統の♀側 *S* 候補遺伝子である *SEA* に関しては、重複していた 2 つの *SEA* とも、葯における異所的発現が確認された。

本研究を進める際の作業仮説として、サツマイモ野生種の自家不和合性における自他認識は、アブラナ科植物同様の認識が行われると考えている。すなわち、葯のタペート組織で発現する♂側 *S* 遺伝子産物が花粉表面に沈着し、受粉時に柱頭表面上に存在する♀側 *S* 遺伝子産物によって受容され、柱頭内部で自他認識反応が誘発されるというモデルである (図 3)。

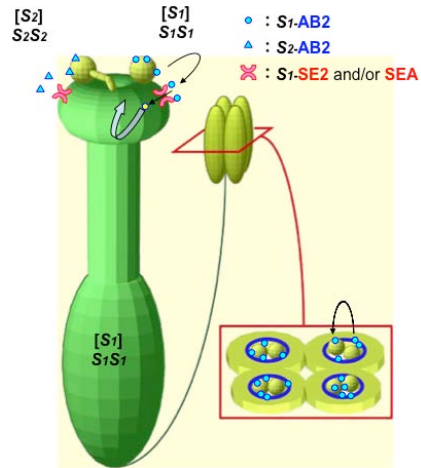


図 3. サツマイモ野生種の自家不和合性モデル

発現解析の結果から、*Sc* 系統が自家和合性化した 1 つの可能性として、葯における *SEA* の異所的発現が考えられる。この場合、自家不和合性の自他認識に寄与する♂側因子である *AB2* が、葯で異所発現した♀側因子である *SEA* によって受容され、機能しうる (フリーの) *AB2* が花粉表面に沈着せず、結果的に、受粉時において自己認識が完結しなかったために、非自己として認識された可能性が考えられる。これらを踏まえると、*AB2* (♂側) と *SEA* (♀側) が *S* 遺伝子の最有力候補であると考えられることができる。

S 候補遺伝子産物の解析

これまでの解析により、*S* 候補遺伝子として、*AB2* (♂側)、*SE2* および *SEA* (♀側) を同定した。*AB2* は細胞外分泌のシグナルペプチドを有する *PCP-A1* ファミリーに属する *Defensin* 様のタンパク質をコードしており、リガンドとして機能することが予想される。また *SE2* と *SEA* は 3~4 の膜貫通ドメインを有する細胞膜タンパク質であると予想され、花粉側からのリガンドのリセプターまたはチャンネルとして機能すると考えられる (図 3)。

これら遺伝子のいずれも、選択的スプライシングによる複数の転写産物を合成していることが確認されている。複数の転写産物のいずれが、機能するタンパク質をコードしているのかは、未だ不明である。

そこで、各 *S* 候補遺伝子産物のペプチドを合成し、これらに対する抗体を作成した。この抗体を用いて、各 *S* 候補遺伝子産物をサツマイモ花器官より精製し、TOF/MS を用いたアミノ酸配列の決定を試みた。一部の抗体については *S* 候補遺伝子産物との結合が認められたがその特異性が低いなど、効率的な精製を行うことができなかった。この原因として、抗体作成の際にデザインしたエピトープが、不適切であったことが考えられ、現在、この

点を改良しつつ、新たな抗体の作成を行っている。

また、PCRにより増幅したS候補遺伝子の完全長cDNAを発現ベクターに組み込み、大腸菌体内で発現させ、その産物を抗体作成および受粉時に供試するバイオアッセイに用いることを試みた。しかしながら、合成したタンパク質が大腸菌体内で分解される現象が見出された。更に、AB2に関しては8個のCys残基による複雑なS-S結合の形成がその活性発現に必要であると予想されること、またSE2, SEAに関しては膜タンパク質であると考えられており大腸菌体内での合成が困難であることが考えられ、現在、他の方法によるタンパク質合成を検討中である。

サツマイモ栽培種のS遺伝子型の解析

これまでに明らかにできたS候補遺伝子の配列を元に、PCR, RT-PCRによる増幅やライブラリーのスクリーニングから、複数のサツマイモ栽培種 (*I.batatas*) のS候補遺伝子を単離した。これら遺伝子と、これまでに明らかになっているサツマイモ野生種 (*I.trifida*) のS候補遺伝子の配列を比較したところ、*I.trifida* の最劣性のS₃遺伝子型が、*I.batatas* にも存在していることが確認できた。*I.batatas* より見出された他の遺伝子型については、*I.trifida* のS遺伝子型との対応関係は未だ明らかになっていない。

しかしながら、最劣性のS₃遺伝子型がサツマイモの栽培種と野生種の間で共通して保存されていることは重要な知見である。サツマイモ栽培種 (*I.batatas*) は、サツマイモ野生種 (2倍体 *I.trifida*) の自然倍化 (4倍体 *I.trifida*) 系統の出現とこれら間の交雑種の倍化 (6倍体 *I.trifida*) から発生したと考えられることが報告されている。この中で、最劣性の自家不和合性遺伝子型は維持されやすいと考えられ、また、*I.trifida* が *I.batatas* の祖先種であることも示唆している。

今後、この成果を元に、サツマイモ栽培種の各品種系統のS遺伝子型を明らかにすることで交配不和合群の遺伝的背景を明確にし、交配育種への利用を進める予定である。

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 3 件)

1. Koltunow A., Johnson S., Rodrigues J., Okada T., Yingkao H., Tsuchiya T., Wilson S., Fletcher P., Ito K., Suzuki G., Mukai Y., Fehrer J., Bicknell R. Sexual reproduction is the default mode in apomictic *Hieracium*

subgenus *Pilosella* where two dominant loci function to enable apomixes. *Plant J. in press*. 【査読有】

2. Araki Y., Karita S., Tsuchiya T., Kondo M. and Goto M. Family 17 and 28 Carbohydrate-Binding Modules Discriminate Different Cell Wall Sites in Sweet Potato Roots. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 802-805, 2010. 【査読有】
3. Endo M., Tsuchiya T., Hamada K., Kawamura S., Yano K., Ohshima M., Higashitani A., Watanabe M. Kawagishi-Kobayashi M. High Temperatures Cause Male Sterility in Rice Plants with Transcriptional Alterations During Pollen Development. *Plant Cell Physiol.* 50, 1911-1922, 2009. 【査読有】

[学会発表] (計 2 件)

1. 土屋 亨. サツマイモ野生種 (*Ipomoea trifida*) の自家不和合性におけるS遺伝子の同定に向けたアプローチ. 基礎生物学研究所研究集会「アサガオ研究集会」2010年11月13日. 基礎生物学研究所・岡崎コンファレンスセンター.
2. Tsuchiya T. Sporophytic self-incompatibility system in *Ipomoea trifida*, a close relative of sweet potato. International symposium of intercellular recognition and allogeneic authentication: perspectives of reproduction mechanisms shared by animals and plants. 2010年1月13日. サーウインストンホテル・名古屋

[図書] (計 2 件)

1. Kowiyama Y., Tsuchiya T., Kakeda K. Self-Incompatibility in Flowering Plants - Evolution, Diversity and Mechanisms (Franklin-Tong VE. ed.) Chapter 12: Molecular Genetics of Sporophytic Self-Incompatibility in *Ipomoea*, a Member of the Convolvulaceae. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 259-274, 2008.
2. Watanabe M., Endo M., Hakozaiki H., Masuko H., Park J-I., Kawagishi-Kobayashi M., Tsuchiya T. Handbook of

New Technologies for Genetic
Improvement of Legumes (Kirti PB *ed.*).
Chapter 31 “Gene Expression Analysis with
DNA Array Technology in Legumes” CRC
Press (Taylor & Francis Group). pp. 467-
476, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 亨 (Tohru TSUCHIYA)
三重大学・生命科学研究支援センター
准教授
研究者番号：30293806

(2) 研究分担者

なし
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし
研究者番号：