

研 究 報 告 書

「遺伝育種の拡張に向けた種間隔離メカニズムの解明」

研究タイプ：通常型

研究期間：2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者：藤井 壮太

1. 研究のねらい

育種は遺伝資源を活用し、生物を遺伝的に改良するプロセスである。人類は育種によって困難な環境での作物栽培を可能にしてきた。しかしその一方で、栽培種は人為的選抜によって必ず強烈な遺伝的ボトルネックを経験しているため、遺伝的多様性の多くが失われている。そのため野生種との種間交雑による有用遺伝子の栽培種への移植が作物改良の主たる戦略である。さらに昨今の世界規模での気候変動や人口増加の結果、これまで以上に非耕作地に適応した作物の育種が求められている。従って野生の遺伝資源の利用は世界的なトレンドであり、これまで以上に雑種作出技術の需要は高い。また、倍数性育種による種間ハイブリッド作出は多種多様な耕地へ作物の適応を可能にしており、コムギ、セイヨウアブラナ、ワタなど成功例は枚挙にいとまがない。広い遺伝資源の活用が育種の本質であり、種苗は今後も農業分野をリードする市場になると考えられる。

それにもかかわらず種間雑種の作出が実証されてきた組み合わせパターンは極めて限定されており、また、これまでの研究ではなぜ(不)可能なのかという疑問を説明できる分子は多く同定されてこなかった。そして種間障壁は多次元の生理機構が関与する複雑な現象であり、システマティックにメカニズムを解明する試みが不足していた。Stebbins (1958) によって植物の様々なステージで生じる種間障壁が総括されており、この分類体系は現在でも本質的に変わっていない。一般に、種間の隔離障壁は、(1)受精前、(2)受精後の胚発生、(3)雑種生育や雑種不稔性等の生理要因に分解できる。例えば、2 種の類縁が遠い場合は雌雄配偶子の受精すら不可能である。近縁種間で雑種が形成された場合でも生育不能や弱勢、そして不稔性が隔離障壁となる。

そこで本研究では、種間のハードルを自在に超越できる育種学の新展開を目指し、体系的な研究構成で種間の障壁の要因を特定する事を目標とした。種間の受精、雑種胚形成効率、あるいは雑種の生育能力に関与する障壁遺伝因子を同定することで、アブラナ科植物の種間交雑育種の基盤知識とすることを目的とした。

2. 研究成果

(1)概要

研究テーマ A: 自然変異を用いた種間障壁因子の同定

本研究ではモデル植物のシロイヌナズナを用いることで、種間障壁機構の解明を目指した。シロイヌナズナと近縁アブラナ科植物の自然変異コレクションと、ゲノムワイド関連解析を用いて複数の生理機構における種間障壁因子の同定を行った。種間の受精、雑種胚形成効率、あるいは雑種の生育能力について全ゲノム SNP 情報が利用できる約 300 のシロイヌナズナ系統の形質評価を行った。GWAS によりいくつかの候補遺伝子座を見出し、ノックアウトを

利用して遺伝学的に機能証明を行った。明らかにすることができた遺伝子については機能解析を行い、種間障壁因子としての特徴づけを行った。

研究テーマ B: 新奇スクリーニング系による同種認識シグナル因子の同定

種間障壁のメカニズムの裏側には、そもそもどのようにして同種の花粉が雌蕊に受け入れられるのかという基礎的な疑問がある。特にアブラナ科の雌蕊は”dry stigma”に分類されており、受粉時に雌蕊が水分を供給する事で花粉が初めて発芽できる仕組みである。このメカニズムの解明は種間不和合性の仕組みを紐解く鍵となる。そこで本研究では、雌蕊からの水分供給を引き起こす花粉成分を「同種シグナル因子」と位置づけ、その単離同定を目指した。

これまでの研究で、花粉の表層成分を感知して雌蕊が発光するレポーターシステム(Pollen Coat Compatibility Factor: PCCF アッセイ)を開発してきた。本研究では PCCF アッセイを用いて、同種シグナル因子の同定を目指した。変異源処理したシロイヌナズナの花粉をレポーターラインに受粉し、プレートリーダーを用いてシグナル活性を欠損した変異体のスクリーニングを行なった。得られた変異体について並列シーケンサーを用いて原因遺伝子を同定した。そして変異体と原因遺伝子の機能解析を行った。

(2) 詳細

研究テーマ A: 自然変異を用いた種間障壁因子の同定

GWAS 解析により、シロイヌナズナの雌蕊において近縁アブラナ科種サンドストックの花粉管侵入に関わる *SPR11*

(*Stigmatic Privacy 1*)を見出した(図 1)。シロイヌナズナの *SPR11* をノックアウトしたところ、通常の野生系統はサンドストックの花粉の侵入を許さないが、*spr11* 変異体では花粉管が伸長することが明らかとなった。これは想定外ではあったが、植物が花粉管の侵入を負に制御するメカニズムを備えていることを示唆している。その他のアブラナ科種の花粉を *spr11* 変異体に交雑したところ、多くの種の花粉が侵入しやすくなっていることが明らかとなった。従って *SPR11* は花粉排除に広く関わっていることが考えられた。

植物種の半数以上は、同種内でも自己の花粉とは受精せず、非自己のみと受精して子孫を残す自家不和合性という性質を持っている。自家不和合種の雌蕊は自己の花粉で受精する自家和合種の花粉は受け入れないが、自家和合種は自家不和合種の花粉を受け入れる「種の一側性不和合性」という現象が古くから知られていた。本研究ではシロイヌナズナの進化の過程で少なくとも6回の独立の進化イベント

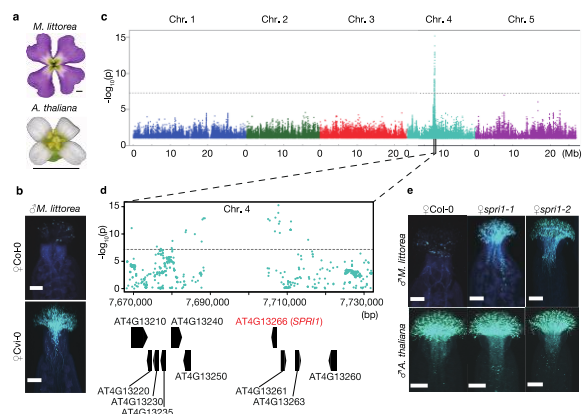


図 1 *SPR11* 遺伝子の同定 a. サンドストックとシロイヌナズナの花。bar = 2 mm. b. Col-0 と Cvi-0 にサンドストックを受粉し、アニリンブルー染色により花粉管を観察した。c. GWAS の結果。d. GWAS の結果の詳細図。ピーク直下に第 4 染色体の At4g13266 遺伝子(*SPR11*)が座乗していた。e. *spr11* 変異体ではサンドストック花粉の伸長が見られた。

トにより *SPRI1* 遺伝子の機能が失われたことを見出した。*SPRI1* は種間の一側性不和合性を分子レベルで説明できる遺伝子であると考えられた。また、ゲノム編集法により、*SPRI1* タンパク質は自家不和合性を引き起こす分子メカニズムとは完全に独立した働きを持つことを示した。

SPRI1 タンパク質の機能を破壊した系統に、自種の花粉を受粉させるより前に異種の花粉を受粉しておくことで著しく受精効率が下がった。*SPRI1* タンパク質は異種の花粉が混在する野外環境下での種間のせめぎあいにおいて重要な役割を果たしていると考えられた。本成果について論文をまとめ、受理された(Fujii et al. *Nature Plants* 2019)。

研究テーマ B: 新奇スクリーニング系による同種認識シグナル因子の同定

PCCF アッセイによるスクリーニングより、変異体 7 系統を見出した。シーケンス解析を行い、これら全ての変異体について原因遺伝子を特定した。そのうち 4 つの系統が細胞内膜の制御に関わる同一の遺伝子内に変異を持っており、原因遺伝子であることが示された。

3. 今後の展開

近年、農業への期待は多様化しており、収量、品質、機能性などの向上や変動する地球環境に適応した作物の開発が求められている。種の壁を司る *SPRI1* 遺伝子をゲノム編集や遺伝子組換えによって人為的に改変し、新しいハイブリッドを作出する技術の発展を目指したい。また、*SPRI1* タンパク質の機能を特異的に阻害する化合物を用いることにより、種の壁を化学的に制御することも目指している。*SPRI1* は花粉を排除する新しいメカニズムであるため、さらに機能を解明することでハイブリッドを作出するための新しい技術に発展する可能性もあると考えている。*SPRI1* の発見を足場とし、育種の効率の向上と新たな機能を備えた有用作物開発のための技術基盤確立を目指す。

4. 自己評価

・研究目的の達成状況、研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究では、*SPRI1* という新規分子を見出すことができ、植物生殖の新たな側面を見出すことができた。また、現在解析中ではあるが、*SPRI1* の他にも複数、種の障壁となる因子を発見している。これらの成果は当初提案した遺伝学的なアプローチが妥当であったことを証明している。特に *SPRI1* は植物学のみならず今後の生物学において鍵分子となると考えている。研究には開始から学生を含め述べ 6 名の実験補助者が関わったが、現在準備中で未発表の成果も鑑みるとチームの運営は効果的であったと考えられる。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

SPRI1 の発見は植物分野では最も権威が高い *Nature Plants* 誌に掲載され、朝日新聞社を含む複数の機関において報道された。また、植物学分野で最も大きな学会のひとつである International Conference for Arabidopsis Research の 2021 年シアトル開催大会他、複数の研究集会においてスピーカーとして招待されている。種の壁を説明できる分子を初めて同定した社会的なインパクトは大きいと考えており、品種作出、知財など直接的な経済活動につながる可能性は十分に高いと考えている。

論文公表後、*SPRI1* の解析と制御に関して国際的な競争が始まったと認識している。材料や解析の進展において当該研究チームに大きな利があると考えているが、昨今の科学界の

事情を鑑みるとアメリカと中国の研究チームの追従が想定される。特に雌蕊因子 SPRI1 に対する花粉因子の同定は大きな目標であり、実現に向けて力を入れている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Fujii S. et al. 「Parallel evolution of dominant pistil-side self-incompatibility suppressors in <i>Arabidopsis</i> .」 Nature Communications 2020, 11, 1404. |
| 2. Fujii S. et al. 「A stigmatic gene confers interspecies incompatibility in the Brassicaceae.」 Nature Plants 2019, 5, 731-74. |
| 3. Fujii S., Shioto Y. 「Molecular identification of the causal locus for the petaloid phenotype in <i>Daucus carota</i> .」 Breeding Science 2019, 69, 186-188. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Fujii S., Takayama S. 「Expanding the RNase world」 **Nature Plants**, 2020, 6, 53-54.
2. 藤井壮太, 高山誠司 「植物が異種の花粉を排除する仕組みを発見」 **バイオサイエンスとインダストリー**, 2020, 20, 14-17.
3. 藤井壮太 「ゲノムワイド関連解析による異種花粉識別分子の発見」 第51回種生物学シンポジウム、宮崎、2019/12/6-8 (招待講演)
4. 藤井壮太 「異種の花粉を選択的に排除する分子メカニズム」 第42回日本分子生物学会年会、福岡 2019/12/3-6 (招待講演)
5. プレスリリース 「同種と異種の花粉を区別する分子を発見 ～種の壁を自在に制御する技術の開発に期待～」 2019年7月2日 (関連する新聞記事: 奈良新聞(2019/7/3)、農業共済新聞(2019/7/3)、日経産業新聞(2019/7/6)、朝日新聞(2019/9/12、2020/1/12))