

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02431

研究課題名(和文)バラ科サクラ属に特異な自家不和合性認識機構とその進化遺伝学的な成立過程の解明

研究課題名(英文) Studies on the molecular basis and evolution of Prunus-specific self-incompatibility recognition system

研究代表者

田尾 龍太郎 (Tao, Ryutaro)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：10211997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、バラ科サクラ属に特異なS-RNase依存性配偶体型自家不和合性の成立過程ならびにその特異な不和合性認識機構の分子基盤の解明を試みたものであり、以下の結果を得た。1) サクラ属の花粉SであるF-box遺伝子(SFB)は、バラ科リンゴ亜連、ナス科、オオバコ科植物の花粉S遺伝子のF-box遺伝子とは異なる進化を遂げており、これがサクラ属特異な自家不和合性機構の確立を駆動した可能性を示した。2) 生化学的な実験から、サクラ属のS遺伝子座近傍に座乗する花粉発現のF-box遺伝子(SLFLs)がサクラ属の不和合性認識モデルの中で重要な役割を果たすジェネラルインヒビターである可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、バラ科サクラ属におけるS-RNase型自家不和合性の認識機構が、S-RNase型の自家不和合性を示す他の植物の認識機構とは、大きく異なるという科学的な謎に対して、進化学的な見地から一つの答えを示した。また、本研究で行われた進化学的な研究と生化学的な研究で得た結果を総合考察し、サクラ属果樹の自家不和合性認識機構を説明するための仮説モデルにおけるジェネラルインヒビターの分子実体が、サクラ属不和合性S遺伝子座近傍に座乗する遺伝子にコードされるF-boxタンパク質であることを示唆した。これらは、サクラ属果樹の生産上の大きな障壁である自家不和合性の打破に活用できる有力な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide analysis of the evolutionary radiation of S locus-related F-box genes were conducted to elucidate the evolutionary path to the establishment of the Prunus-specific S-RNase-based gametophytic self-incompatibility (GSI) system. The analysis indicated that the Prunus pollen S F-box gene, SFB, diverged from pollen S F-box genes of the Malinae (Rosaceae), Solanaceae, and Plantaginaceae, early after the establishment of the Eudicots. The analysis also indicated the Prunus SFB gene originated in a recent Prunus-specific gene duplication event, which could contribute to the establishment of the Prunus-specific GSI recognition mechanism. Both evolutionary and biochemical analyses conducted strongly indicated that pollen expressed F-box genes (SLFLs) located close to the S locus of Prunus may be the so-called general inhibitor (GI) of the GI model explaining Prunus-specific GSI recognition mechanism.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹園芸学 園芸学 受粉受精 自家不和合性 果樹ゲノム解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物が自殖による近交弱勢を防ぎ、遺伝的多様性を確保するために獲得してきた遺伝的機構の一つに自家不和合性がある。自家不和合性とは雌ずいが自己花粉を認識して、自己花粉による受精を抑制する機構であり、雌ずい S 遺伝子と花粉の S 遺伝子によってその反応特性が決定されている。

自家不和合性には多くのタイプが存在するが、バラ科サクラ属の示す自家不和合性は S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性である。S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性は、ナス科やオオバコ科植物にもみられる。ナス科植物において 1980 年代に初めて雌ずい S タンパク質が同定され、その後この S タンパク質が RNase 活性を持つことが明らかにされた。以来、S タンパク質は S-RNase とよばれるようになった。バラ科サクラ属の S-RNase は、1990 年代中盤から後半に行われた本研究代表者の田尾らの一連の研究によって同定された。

雌ずい S 遺伝子が同定された後の研究の興味は花粉 S 遺伝子の同定へと移った。花粉 S 遺伝子に関する最初の手がかりは、オオバコ科のキンギョソウで得られた。2002 年にキンギョソウの S 遺伝子座に花粉で発現する F-box 遺伝子が存在することが明らかにされたのだ。しかしながら、この研究では、その F-box 遺伝子の機能は不明であった。そのような中、我々の研究グループを含めた我国の 2 つの異なる研究グループによって、バラ科サクラ属の S 遺伝子座に座乗する F-box 遺伝子 (SFB) が花粉 S 遺伝子の候補として同定された。その後引き続いて、バラ科リンゴ亜連、ナス科、オオバコ科の自家不和合性の花粉 S 遺伝子も F-box 遺伝子であることが明らかにされた。

バラ科を含む 3 科の植物で雌ずい S 遺伝子と花粉 S 遺伝子が同定されたことから、次の研究の興味は、雌ずいと花粉の自己非自己の認識機構の解明へと移った。しかしながら、未だ自己非自己認識機構に関して統一的な見解は出されておらず、多くの仮説モデルが提唱され検証されている段階にある。そのような中、バラ科サクラ属の自家不和合性認識機構の特異性が明確になってきた。

ナス科植物では、花粉 S 遺伝子に変異が生じるとその花粉は自家他家不和合性を示し、受精できなくなる。しかしながら、サクラ属では、花粉側認識機構に変異の生じた一側性の自家不和合性 S ハプロタイプの多くで SFB に挿入や欠失変異が生じている。また、ナス科植物では花粉 S 遺伝子をヘテロでもつ花粉には自家他家不和合性を示す競合的阻害作用と呼ばれる現象が生じるが、サクラ属植物ではこの競合的阻害作用がみられない。さらにサクラ属に特異的にみられる花粉側の共通因子の変異による自家不和合性個体の存在がオウトウおよびアンズで報告されており、サクラ属植物における自家不和合性認識反応の特異性が広く認識される状況にある。

サクラ属の自家不和合性の特異性を説明するためには、ナス科、オオバコ科、バラ科リンゴ亜連植物とサクラ属植物の花粉 S 因子の機能の違いを想定することが必須である。すなわちナス科、オオバコ科、リンゴ亜連植物の花粉 S 因子は、花粉管内で細胞毒として働く S-RNase を、非自己の場合は不活化し、自己の場合は活性化 (あるいは活性保持) するが、サクラ属の花粉 S 因子は自己の S-RNase の活性化機能のみを持ち、非自己 S-RNase の不活性化は第 3 の分子種 (S-RNase 不活化因子) に委ねていると考える必要がある。しかしながら第 3 の分子種の実体は不明である。

このような状況の中、サクラ属の自家不和合性共通因子を同定するための手掛かりが、ナス科植物やバラ科リンゴ亜連植物における研究で得られた。ナス科では花粉 S 遺伝子は単一ではなく、S 遺伝子座に座乗する複数の F-box 遺伝子が協調して働くことで、細胞毒である S-RNase を分解し、不活化していることが明らかになったのだ。同様にリンゴ亜連植物の S 遺伝子座にも F-box 遺伝子が複数存在し、これらの一つが欠失すると不和合性反応の特異性が変化することから、リンゴ亜連植物の花粉 S 遺伝子も複数の F-box 遺伝子であると考えられている。

サクラ属の S 遺伝子座近傍にも SLFLs とよばれる花粉で発現する F-box 遺伝子が複数個存在しているが、その機能は不明であった。ペチュニアやリンゴ亜連植物における研究は S-RNase 不活化因子 (上記の第 3 の分子種) が SLFLs であることを強く示唆するものである。S-RNase 不活化因子が S 遺伝子座に存在する必然性はないことから、SLFLs はその候補として注目されてこなかったが、ナス科やリンゴ亜連植物における研究から新たな可能性が急浮上したことになる。

以上が、本研究を開始した当初のバラ科サクラ属の S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性研究の背景である。

### 2. 研究の目的

オウトウやウメ、スモモやアンズ、アーモンドなど、バラ科サクラ属果樹の多くは S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性を示す。このためサクラ属果樹の栽培現場では、授粉樹の混植とミツバチの導入や人工授粉が必要となる。また交雑育種を行う際には、交雑の組み合わせが制限されるなど、自家不和合性はサクラ属果樹の栽培と育種の大きな障壁となっている。

本研究の研究代表者の田尾は、共同研究者とともに、これまでサクラ属果樹における自家不和合性の分子機構を解明し、得られた知見を園芸・育種学的に利用しようとして研究を進めてきた。本研究は、これまでの研究から得た知見および他のグループが論文等で発表してきた結果に基づいて構築した自家不和合性認識反応の作業仮説を検証する形で研究を進め、サクラ属に特異な自己非自己認識の分子機構を明らかにし、さらにその進化遺伝学的な成立過程を解き

明かすために立案された。また得られた基礎的な知見を活用して、不和合性現象を人為制御するための技術開発や育種法の開発につなげることを目的とする。

本研究では、研究期間の終わりまでに、上記の我々および他の研究グループが明らかにしてきた事実に基づいて研究をさらに発展させ、サクラ属において SLFLs が S-RNase 不活化因子として S-RNase を分解制御することを証明する。またサクラ属に特異な花粉側因子の変異体の解析を通じて、雌ずい S 因子 (S-RNase) と花粉 S 因子 (SFB) の役割を明確にし、サクラ属に特異な自己非自己認識の分子機構を明らかにし、さらにその進化遺伝学的な成立過程を解き明かす。本研究で得られる成果は不和合性現象を人為制御するための技術開発や育種法の開発に利用できるばかりでなく、進化遺伝学や植物生理学など基礎生物学の発展にも貢献することになる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 花粉 S と雌ずい S 遺伝子の進化学的解析

インターネット上にある遺伝子データベース Phytozome 上に登録されている 31 の被子植物ゲノムから、カンカオウトウ SFB-S4, SLFL2-S4 に対して、相同性 (<e-19) を示す遺伝子を同定して、その系統解析を行った。またバラ科サクラ属とリンゴ亜連、ナス科やオオバコ科の S-RNase 遺伝子配列を用いた系統解析も行った。

#### (2) サクラ属 SLFLs と SFB の解析

サクラ属の S 遺伝子座近傍に座乗する SLFLs 遺伝子にコードされる F-box タンパク質が作業仮説の中のジェネラルインヒビターとして働くかどうかを検討するために、SLFLs ならびにサクラ属の花粉 S である SFB が Skp1 や Cullin1 と結合して SCF 複合体を形成するかどうかをプルダウンアッセイを行った。また SLFLs と S-RNase の結合も *in vitro* binding assay により検出した。

#### (3) 形質転換実験

SLFLs がジェネラルインヒビターであれば、ナス科植物の S-RNase を分解誘導し、不活化できる可能性がある。そこで自家不和合性ペチュニアをサクラ属の SLFLs で形質転換し不和合性形質の変化を観察した。

#### (4) 自家不和合性共通因子の解析

サクラ属には、ナス科やオオバコ科では報告例のない、花粉側共通因子の変異が報告されている。この共通因子を同定することで、サクラ属に特異な不和合性認識機構解明のための重要な手がかりが得られる可能性がある。そこで、研究代表者らが開発した k-mer 分析を応用した新たな mRNA-Seq 分析とオウトウやウメのドラフトゲノム情報を組み合わせて利用して、サクラ属に特異的に存在する花粉側共通因子を同定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 花粉 S と雌ずい S 遺伝子の進化学的解析

系統解析の結果、サクラ属の花粉 S である SFB と他の S-RNase 型自家不和合性を示す植物の花粉 S の F-box 遺伝子の分岐は、真性双子葉類の成立の初期にまで遡ることが明らかになった。一方、サクラ属の S 遺伝子座近傍に座乗し、花粉発現の F-box 遺伝子をコードする SLFLs は、バラ科リンゴ亜連、ナス科、オオバコ科植物の花粉 S 遺伝子と最近共通祖先遺伝子を共有するオーソログの関係にあることが明らかになった。このことは、SLFLs が、リンゴ亜連、ナス科、オオバコ科の花粉 S と同じ機能、すなわち S-RNase の分解機能を持つことを示唆することから、SLFLs がジェネラルインヒビターの有力候補であることを示すものである。一方、S-RNase の系統解析からは、リンゴ亜連とサクラ属の持つ S-RNase はバラ科の共通祖先において既に重複していたことが示され、さらに重複した S-RNase 様遺伝子の近傍には、リンゴ亜連およびナス科の花粉 F-box と高い相同性を示す F-box 遺伝子が座乗しており、S-RNase および花粉 F-box 遺伝子が座乗する S 遺伝子座全体が重複した可能性が推察された。全ゲノム解析から、サクラ属の SFB は、第 3 染色体から第 6 染色体への染色体間遺伝子重複により転座して、S 遺伝子座に座乗するようになったことが示された。すなわち、バラ科における S 遺伝子座の重複と染色体間の遺伝子重複などが、サクラ属に特異な不和合性認識機構の成立に寄与したことが明らかになった。

#### (2) サクラ属 SLFLs と SFB の解析

プルダウンアッセイの結果、SLFLs および SFB はともに Skp1 および Cullin1 のサクラ属における相同遺伝子 (それぞれ SSK1 および Cul1) と結合することが示された。S-RNase 型の自家不和合性を示す他の植物種では、花粉 S の F-box タンパク質は、SBP1 と結合して、ユビキチンリガーゼとして働くことが報告されているが、サクラ属の SLFLs と SFB とともに、サクラ属の SBP1 と結合した。これらの結果は、SLFLs および SFB が、ユビキチンリガーゼのサブユニットとして働き、プロテアソーム系のタンパク質分解制御に関わることを強く示唆するものである。そこで SLFLs および SFB の S-RNase との結合能を *in vitro* binding assay により調査した。その結果、SLFLs と S-RNase の結合は確認されたが、SFB と S-RNase の結合は確認出来なかった。以上の結果は、SLFLs がタンパク質分解制御機能を通じて、ジェネラルインヒビターとして働くことを示唆するものである。不和合性反応の認識物質である SFB と S-RNase はそれぞれ何らかの形で相互作用しなければならないので、SFB と S-RNase の結合が確認出来なかったのは、

第3の分子種がSFBとS-RNaseの相互作用に必要である可能性を示すものであるかもしれない。

### (3) 形質転換実験

バラ科, ナス科, オオバコ科のS-RNaseが単系統であるとするサクラ属の全てのS-RNaseを分解する機能を持つGIの候補であるSLFLsはナス科のS-RNaseを分解する機能を持つ可能性がある。すなわち自家不和合性のペチュニアの花粉管でSLFLsを発現させれば, 自家和合化する可能性がある。そこで自家不和合性のペチュニアにカンカオウトウの花粉管発現誘導プロモーターLAT52制御のSLFL1, SLFL2, SLFL3を単独で, あるいはそれぞれを組み合わせて自家不和合性ペチュニアに組み込んで不和合性表現型の変化を観察した。また同時にサクラ属におけるSkp1のホモログであるSSK1を組み込む区も設けた。しかしながら何れの形質転換体においても, 組換えによる自家和合化や不和合受粉後の花粉管伸長の促進作用はみられなかった。

### (4) 自家不和合性共通因子の解析

サクラ属のカンカオウトウにおいて第3染色体上の花粉側共通因子が変異して自家和合化した品種Cristobalinaが存在する。この花粉側共通因子は, サクラ属特異的に存在することが示唆されており, 花粉側共通因子の同定とその機能解明により, サクラ属に特異的な自家不和合性認識反応の分子基盤が明らかにできる可能性がある。そこでF1後代および既存品種の全ゲノムシーケンス解析によりこの花粉側共通因子の同定を試みた。大量シーケンス解析の結果から, 第3染色体のM遺伝子座領域にマッピングされたコンティグの近傍に座乗して, 花粉で発現するGlutathione S-transferase (GST) 様遺伝子 (MGST) をこの花粉側共通因子の最有力候補遺伝子として同定することができた。MGSTのプロモーター領域にはトランスポゾン様配列がSC特異的に挿入されており, これがMGST発現に影響してSIが打破される可能性が考えられた。タバコにおいてチオレドキシシンがS-RNaseの酸化還元を制御する可能性が示唆されているが, MGSTはチオレドキシシンドメインを有するため, S-RNase活性化によりSI反応を制御する可能性が考えられる。また, GSTは免疫反応への関与も示唆されており, MGSTが非自己花粉の拒絶に関与する可能性も考えられる。今後, MGSTの機能解明によりサクラ属特異的なSI機構の詳細が明確になり, その人為制御法の開発につながる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

①Morimoto, T. and R. Tao. 2019. Recent advances in our understanding of the S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus*. Acta. Hort. 1235: 359-364.  
DOI 10.17660/ActaHortic.2019.1235.49

②Ono, K., T. Akagi, T. Morimoto, A. Wunsch, and R. Tao. 2018. Genome re-sequencing of diverse sweet cherry (*Prunus avium*) individuals reveals a modifier gene mutation conferring pollen-part self-compatibility. Plant and Cell Physiol. 59: 1265-1275.  
DOI:10.1093/pcp/pcy068

③Matumoto, D. and R. Tao. 2016. Distinct self-recognition in the *Prunus* S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system. Hort. J. 85: 289-305.  
DOI:10.2503/hortj.MI-IR06

④Matsumoto, D. and R. Tao. 2016. Recognition of a wide-range of S-RNases by S locus F-box like 2, a general-inhibitor candidate in *Prunus*-specific S-RNase-based self-incompatibility system. Plant Mol. Biol. 91: 459-469.  
DOI:10.1007/s11103-016-0479-2

⑤Akagi, T., I. M. Henry, T. Morimoto, and R. Tao. 2016. Insight into the *Prunus*-specific S-RNase-based self-incompatibility system from a genome-wide analysis of the evolutionary radiation of S locus-related F-box genes. Plant and Cell Physiol. 57: 1281-1294.  
DOI:10.1093/pcp/pcw077

⑥Kawai, T., A. Gonoi, M. Nitta, N. Yamagishi, N. Yoshikawa, and R. Tao. 2016. Virus-induced gene silencing in various *Prunus* species with the Apple latent spherical virus vector. Sci. Hort. 199: 103-113.  
DOI:10.1016/j.scienta.2015.12.031

⑦Morimoto, T., T. Akagi, and R. Tao. 2015. Evolutionary analysis of genes for S-RNase-based self-incompatibility reveals S locus duplications in ancestral Rosaceae. Hort. J. 84: 233 - 242.  
DOI:10.2503/hortj.MI-119

[学会発表] (計10件)

①Tao, R. 2018. New insights into the distinct S-RNase-based self-incompatibility mechanisms in *Prunus*. The 30th International Horticulture Congress (Istanbul, Turkey)

②Ono, K., T. Morimoto, T. Akagi, A. Wunsch and R. Tao. 2018. Characterization of the pollen-part modifier gene involved in self-incompatibility reaction in sweet cherry. (Istanbul, Turkey)

③Tao, R. 2018. New insights into the evolution and mechanisms of the S-RNase-based

self-incompatibility in *Prunus* obtained based on the genome-wide DNA sequencing analysis. The 9th International Rosaceae Genomics Conference (Nanjing, China)

④Ono, K., T. Akagi, T. Morimoto, A. Wunsch and R. Tao. 2018. Genome re-sequencing of diverse sweet cherry (*Prunus avium*) individuals reveals a modifier gene mutation conferring pollen-part self-compatibility. The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (Gifu, Japan)

⑤Morimoto, T., T. Akagi and R. Tao. 2017. Insights into the evolution and establishment of the *Prunus*-specific self-incompatibility recognition mechanism. ISHS 8th International Cherry Symposium (Yamagata, Japan)

⑥Ono, K., T. Morimoto, T. Akagi, Ana Wunsch and R. Tao. 2017. Whole genome sequencing approach to identify pollen-part modifier conferring self-compatibility in sweet cherry 'Cristobalina'. ISHS 8th International Cherry Symposium (Yamagata, Japan)

⑦Tao, R. 2018. Recent advances in our understanding of the S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus*. ISHS 8th International Cherry Symposium (Yamagata, Japan)

⑧Tao, R. Molecular basis of gametophytic self-incompatibility in *Prunus*. 2017. Annual Meeting of the Thailand Society for Horticultural Science (Phisanulok, Thailand).

⑨Morimoto, T., A. Wunsch, M. Watanabe, T. Akagi, and R. Tao. 2016. Next generation sequencing analysis to identify modifier gene candidates conferring pollen-part self-compatibility in sweet cherry 'Cristobalina'. The 8th International Rosaceae Genomics Conference (Angers, France)

⑩Morimoto, T., T. Akagi and R. Tao. 2015. Evolutionary dynamics of the specificity determinant genes for the S-RNase-based self-incompatibility in the Rosaceae. XIV Eucarpia Fruit breeding and genetics symposium (Bologna, Italy)

[その他]

WEB サイト <http://www.pomology.kais.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：赤木剛士

ローマ字氏名：AKAGI, Takashi

所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：50611919

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。