

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H00941

研究課題名（和文）バラ科サクラ属に特異な自己認識型自家不和合性機構の解明とその園芸育種学的応用研究

研究課題名（英文）Discovery of the Prunus-specific self-incompatibility recognition system and its horticultural applications

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） 34,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、バラ科サクラ属の不和合反応の枢要を担う花粉S因子とS-RNase不活化因子の機能を明らかにし、さらに不和合性花粉側共通因子の機能も明確にしようとしたものであり、本研究によりSFBが花粉側因子として機能することを実験的に証明することができた。一方で、S-RNase不活化因子であると想定したSLFLsやSFBLによるS-RNaseのポリユビキチン化の証拠はいずれの実験からも得られず、我々の作業仮説を再考する必要性が示された。アンチセンスオリゴを用いた実験結果は、不和合性花粉側共通因子であるMGSTとSFBの機能証明となると同時に自家不和合性の人為打破法の開発に向けた可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、バラ科サクラ属の不和合反応の枢要を担う花粉S因子SFBの機能の一端が実験的に証明された。さらに不和合性花粉側共通因子のS-RNase活性化機能を示唆する結果も得られた。これらは、進化遺伝学や植物生理学など基礎生物学の発展に寄与するものである。他方で、アンチセンスオリゴを用いた実験結果は、自家不和合性の人為打破法の開発に向けた可能性を明確に示しており、サクラ属の自家不和合性を人為制御するための栽培技術や育種法の開発の可能性を示した実用的な成果である。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the functions of the pollen S determinant SFB, which plays a crucial role in the self-incompatibility response, and the general inhibitor inactivating pistil S determinant S-RNase in Prunus fruit trees. Additionally, it sought to clarify the function of pollen part modifier MGST in Prunus. Through this research, we were able to experimentally demonstrate that SFB functions as a pollen S determinant. On the other hand, we found no evidence from any of the experiments for the polyubiquitination of S-RNase by SLFLs or SFBL, which were hypothesized to be general inhibitor inactivating S-RNase, indicating the need to reconsider our working hypothesis. The experimental results using antisense oligonucleotides not only demonstrated the functions of MGST and SFB but also suggested potential methods for artificially breaking self-incompatibility.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹 受粉受精 自家不和合性 果樹ゲノム科学 組換え遺伝子

1. 研究開始当初の背景

植物の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。このタイプの自家不和合性における自他認識は、S 遺伝子座に座乗する S-ribonuclease (S-RNase) 遺伝子と F-box タンパク質 (SFB/SLF) 遺伝子によって決定されていることが明らかになってきた。不和合性反応における自己非自己認識機構に関しては、バラ科リンゴ亜連、ナス科、オオバコ科の花粉 S 因子 SLF/SFBB が細胞毒である S-RNase を非自己特異的に分解誘導することで、非自己特異的に花粉管伸長を促すとした非自己認識モデルが構築されており、このモデルを支持する実験的な証拠も得られていた。バラ科サクラ属の自家不和合性認識機構は、自己認識型の反応であり、他の S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性の認識反応とは正反対の反応であり、サクラ属特異的であることが明らかになってきた。しかしながら、その詳細は明確ではなく、いくつかの作業仮説が提唱されている状況にあった。

我々の研究グループは、サクラ属に特異的な自家不和合性反応を説明するためには、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ていた。この S-RNase 不活化因子の候補は、サクラ属の S 遺伝子座近傍に存在する SLFLs とよばれる花粉で発現する F-box 遺伝子であると推定していた。SLFLs は、ペチュニアやリンゴ亜連植物において S-RNase 不活化する花粉側因子と相同性が高い F-box 遺伝子であることから、このように推定していたのだが、SLFLs による S-RNase の分解は実験的には示されていなかった。

そのような状況の中、サクラ属に特異的に存在し、不和合反応に必須な花粉側共通因子である M locus glutathion S transferase (MGST) が同定された。MGST はサクラ属特異的な遺伝子重複により生じた遺伝子であるが、MGST が変異すると、花粉は自己 S-RNase に毒性を発揮させることなく自家和合化する。そのため、サクラ属に特異な自己認識機構である SFB による S-RNase の細胞毒性誘導には、MGST が関与している可能性を想定していたが、この仮説を支持する実験結果も得られていない状況にあった。

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

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。このためオウトウやアーモンド、スモモやウメなどの自家不和合性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。このため、バラ科サクラ属の自家不和合性機構の解明とその知見に基づいた不和合性の人為打破法の開発が古くから求められてきた。

本研究では、研究代表者らの研究グループが長年の研究で得た知見をもとに構築した自家不和合性認識反応の作業仮説を証明するために、サクラ属の S 遺伝子座に座乗する S-RNase 不活化因子候補と花粉 S 因子、すなわち SLFLs と SFB の分子機能を明らかにし、さらに自家不和合性花粉側共通因子 MGST の機能についても明確にすることを主目的とした。またこれらの小課題を通じて、本研究課題の核心をなす学問的問い、すなわち分類学上広範な植物が共有する S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性認識機構において、如何にしてサクラ属においてのみ異なる特異な認識機構が成立したのかという進化遺伝学上の謎を解明し、さらにその特異な不和合性認識機構の分子基盤を明らかにすることも目的とした。また研究過程で開発された技術と得られた新知見を応用し、自家不和合性を人為制御するための栽培技術や育種法の開発も行うことも本研究の目的であった。

3. 研究の方法

本研究では、我々が構築したサクラ属の自家不和合性認識反応に関する作業仮説中の 3 種類の仮説である「不和合性共通反応に関する仮説」、「和合性反応に関する仮説」、および「不和合性反応に関する仮説」をそれぞれ検証する形で研究を進め、またアンチセンスオリゴを用いた仮説検証実験もおこなった。そのそれぞれについて以下の研究を行った。

(共通反応に関する仮説検証実験)

サクラ属特異的に存在する MGST は雌ずい S 因子 S-RNase のフォールディングに機能し、S-RNase の花粉管内での活性化と細胞毒性の発揮を担うと推定している。この仮説検証のため、S-RNase 抗体および組換え MGST タンパク質を用いた免疫共沈降実験により MGST の S-RNase 結合能を検証した。加えて S-RNase 抗体および組換え MGST タンパク質を用いた免疫共沈降実験を行った、さらに組換え MGST のグルタチオン抱合活性やチオレドキシ活性、そして S-RNase の活性制御についても検討した。また組換え MGST のチオレドキシ活性および MGST による S-RNase の活性制御についても検討した。さらに in silico における MGST の

構造予測を行い、MGST と S-RNase の結合部位や結合様式を予測して、MGST の機能を推定した。MGST と協働して働くタンパク質の存在の可能性についても、酵母のツーハイブリッドスクリーニングを行って検討した。

(和合反応に関する仮説検証実験)

サクラ属の S locus F-box likes (SLFLs) は S-RNase を不活化するジェネラルインヒビターとして働くと想定しており、SLFLs が S-RNase のポリユビキチン化とプロテアソーム系による分解誘導に機能することの直接的な証拠を得るために、*in vitro* ポリユビキチン化実験とタバコ葉での一過的発現系を利用した *in vivo* 実験によって、SLFLs による S-RNase のポリユビキチン化を検証した。また同様に、S locus には座乗していないが、S-RNase との結合が示されている S haplotype-specific F-box like (SFBL) がジェネラルインヒビターとして働く可能性についても検討した。この際、SLFLs と SFBL の SCF 複合体形成能についても調査した。

(不和合反応に関する仮説検証実験)

花粉 S 因子 SFB と S-RNase は不和合性反応の特異性規定因子であるので相互作用するはずであるが、両者の相互作用はこれまで実験的に示されていない。そこでブルダウンアッセイとタバコ葉での一過的発現系を利用した実験によって、SFB と S-RNase 間の相互作用を検証した。また MGST による S-RNase の酸化的フォールディングが、S-RNase と SFB の相互作用に必須である可能性があるため、MGST の存在下における SFB と S-RNase の相互作用についても検証した。

(アンチセンスオリゴを用いた検証実験)

MGST, SLFL, および SFB の生化学的調査に基づく上記の検証実験に加え、それら仮説を最終的に確認するために、MGST および SFB の発現を抑制した花粉が和合化するか調査した。モデル植物で成功例のある各種花粉発現遺伝子のアンチセンスオリゴを用いたノックダウン実験を行い、サクラ属花粉における至適な実験条件を検討した。次に *in vitro* 花粉管伸長試験による不和合性反応再現系の開発を試みた。また、より効率的に実験を行うために、不和合反応を再現するためのマイクロデバイスのデザインも試みた。

4. 研究成果

(共通反応に関する仮説検証実験)

サクラ属に特異的に存在する M locus GST (MGST) は雌ずい S 因子 S-RNase のフォールディングに機能し、S-RNase の花粉管内での活性化と細胞毒性の発揮を担うとした我々の作業仮説の検証に必要な組換え MGST を大腸菌により作製するとともに、MGST のペプチド抗体を作製した。また同様に、組み換え S-RNase を昆虫細胞で作製した。作製した MGST のペプチド抗体を用いて、雌ずい粗抽出タンパク質のブルダウンアッセイを試みたが、MGST 存在条件でのブルダウン溶出画分のみを検出されるタンパク質はなく、MGST と他の花粉管タンパク質との相互作用は確認出来なかった。作製した MGST 抗体の力価が高くないためにこのような結果となった可能性もあるので、新たにペプチド抗体を作製したが、同様の結果であった。一方、昆虫細胞で作製した組換え S-RNase を用いて共免疫沈降実験を行ったところ S-RNase と MGST の結合が確認された。また新たに DnaJ 様タンパク質や SFB と S-RNase の結合も示された。MGST の立体構造を *in silico* で検証したところ、チオレドキシン活性を持つ可能性が高いことを示唆する結果が得られた。しかしながら、我々が行った条件では MGST にチオレドキシン活性はみられず、またグルタチオン抱合活性も認められなかった。さらには組み換え MGST による S-RNase の活性化も認められなかった。MGST と S-RNase の結合は、組み換え S-RNase をベイトにした花粉抽出液の免疫沈降実験でのみ確認されており、組み換え S-RNase と組み換え MGST 間の一対一の反応も確認出来ていない。両者の結合に第 3 の因子が必要な可能性を考え、MGST をベイトとして花粉発現遺伝子に対する酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、いくつかの酸化還元酵素と SFB が MGST と結合するタンパク質候補として検出された。

(和合反応に関する仮説検証実験)

S locus F-box likes (SLFLs) および S haplotype-specific F box likes (SFBLs) の SCF 複合体形成能および S-RNase のポリユビキチン化活性を検証したところ、我々が行った実験条件では、いずれの方法、いずれの条件でも S-RNase のポリユビキチン化活性は確認出来なかった。一方で、これら F-box タンパク質の SCF 複合体系性能は確認された。

(不和合反応に関する仮説検証実験)

大腸菌で MGST の組換えタンパク質を作製し、MGST の存在下での S-RNase と SFB の相互作用を検証したが、S-RNase と SFB の相互作用は検出されなかった。しかしながら、ウメで行った組み換え S-RNase を用いたブルダウンアッセイで SFB が溶出画分に確認された。雌ずい S 因子 S-RNase と花粉 S 因子 SFB の結合が確認された初めての例であるので、この検証実験を今後進めていくために、数種の S ハプロタイプ由来の S-RNase の組換えタンパク質を作製し、将来の研究のための基盤を整備した。

(アンチセンスオリゴを用いた検証実験)

MGST および SFB のアンチセンスオリゴを用いたノックダウン実験を行うために、サクラ属花粉における至適条件を明らかにした。あわせて、*in vitro* 花粉管伸長試験による不和合性反応再現系を開発することに成功した。しかしながら、効率的な *in vitro* 実験を進めるために、開発

を試みたマイクロデバイスを用いた不和合性反応の再現系は、シロイヌナズナやトマトなどと異なり、サクラ属の花粉管慎重には多量の酸素が必要であるようであり、マイクロデバイス内の花粉管伸長が抑制され、うまく不和合性反応を再現できなかった。開発した *in vitro* 実験系を利用して、また圃場での受粉試験 (*in vivo* 実験) で、アンチセンスオリゴを用いて MGST と SFB のノックダウンを試みたところ、率は低いが不和合性反応の打破が認められた。今後、詳細な条件検討を行うことで、MGST と SFB の不和合性反応に対する機能証明を行うことが可能になると同時に人為的な不和合性打破法の開発も可能になることが示された。S-RNase によるプルダウンによって昨年度までの実験で S-RNase との結合が確認された SDJ の発現を抑制するためのオリゴヌクレオチドをデザインし、*in vitro* での検証実験をしたが、不和合性反応の抑制効果は明確ではなかった。

以上の研究結果を総括すると SFB が花粉側因子として機能することの実験的証拠が得られたことが本研究の大きな成果の一つであると言える。一方で、S-RNase 不活化因子であると想定した SLFLs や SFBL による S-RNase のポリユビキチン化の実験的証拠はいずれの実験からも得られず、我々の作業仮説を再考する必要性が生じたとも言える。アンチセンスオリゴを用いた実験結果は、MGST と SFB の機能証明実験となると同時に自家不和合性の人為打破法の開発に向けた可能性を示したものであり実用的な利用可能性を示したものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ono, K., D. Matsumoto, and R. Tao	4. 巻 306
2. 論文標題 Characterization of the molecular function of MGST, the pollen-part modifier of the gametophytic self-incompatibility in <i>Prunus</i> species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Hortic	6. 最初と最後の頁 245-252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17660/ActaHortic.2022.1342.35	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ono, K., K. Masui, and R. Tao	4. 巻 91
2. 論文標題 Artificial control of the <i>Prunus</i> self-incompatibility system using antisense oligonucleotides against pollen genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hort J	6. 最初と最後の頁 437-447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.QH-002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ono, K., E.T. Chang, S. Nishiyama, A. Wunsch, and R. Tao	4. 巻 1312
2. 論文標題 Characterization of a gene co-expression network associated with MGST, the pollen modifier gene of gametophytic self-incompatibility in sweet cherry (<i>Prunus avium</i> L.)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Horticulturæ	6. 最初と最後の頁 117-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17660/ActaHortic.2021.1312.2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto, D. and R. Tao	4. 巻 100
2. 論文標題 Recognition of S-RNases by an S locus F-box protein and an S haplotype-specific F-box like protein in the <i>Prunus</i> -specific self-incompatibility system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 367-378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-019-00860-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Tao, R.
2. 発表標題 S-RNase based gametophytic self-incompatibility system in Prunus
3. 学会等名 International Symposium of Horticulture and Plant Biology of Huazhong Agricultural University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tao, R.
2. 発表標題 Prunus-specific recognition mechanisms of the S-RNase based gametophytic self-incompatibility system
3. 学会等名 International Symposium for the 120th Anniversary of Nanjing Agricultural University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tao, R.
2. 発表標題 Overview of sweet cherry production in Japan
3. 学会等名 International Cherry School (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増井果歩・金岡雅浩・松本大生・大野健太郎・田尾龍太郎
2. 発表標題 サクランボ属における自家不和合性で機能する花粉側共通因子MGSTの解析
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ono, K. and R. Tao
2. 発表標題 Characterization of a gene co-expression network associated with MGST, the pollen modifier gene of gametophytic self-incompatibility in sweet cherry (<i>Prunus avium</i> L.)
3. 学会等名 3rd Asian Horticulture Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野健太郎, 田尾龍太郎
2. 発表標題 アンチセンスオリゴを用いた花粉側遺伝子の一過的発現抑制によるサクラ属の自家不和合性の人為制御試験
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tao, R.
2. 発表標題 Discovery of the <i>Prunus</i> -specific self-incompatibility recognition system and its horticultural applications
3. 学会等名 Annual Spring Conference of the Korean Society for Horticultural Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tao, R.
2. 発表標題 Sweet Cherry Production in Japan: History, Characteristics and Future Perspective
3. 学会等名 Cherry Section of China Society for Horticultural Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	金岡 雅浩 (Kanaoka Masahiro) (10467277)	県立広島大学・生物資源科学部・教授 (25406)	
研究 分担者	松本 大生 (Matumoto Daiki) (30632129)	福井県立大学・生物資源学部・准教授 (23401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------