

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02946

研究課題名（和文）ナシ属自家不和合性における花粉側因子SFBBのS-RNaseに対する特異性の解明

研究課題名（英文）Comprehensive analysis SFBB for S-RNase in self-incompatibility of Japanese pear

研究代表者

安田 剛志（高崎剛志）（Yasuda, Takeshi）

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：30314511

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：ニホンナシS2-、S3-、S4-RNase周辺 1.1kb-1.5MbをカバーするBACコンティグのDNA配列を決定し、3つのSハプロタイプがコードするSFBB遺伝子群を掌握した。加えて、mRNA-seqとRT-PCRクローニングにより、ニホン・セイヨウナシの9ハプロタイプがコードするSFBB遺伝子群を同定した。12つのナシ属ハプロタイプがコードするSFBBタンパク質は23のタイプに分類され、同一タイプに属するSFBBは類似した非自己S-RNase認識特異性をもつと推察された。各タイプ内のSFBB対立遺伝子の在・不在から、9タイプのSFBBがターゲットとする非自己S-RNaseを予測できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナシ属は雌しべと雌しべをもつ両性花を着生するが、自家不和合性を示すため自家花粉では受精・結実しないため、果実生産には他品種の花粉を人工受粉する必要がある。この雌しべと花粉間の自他認識の仕組みを解明することができれば、果樹の生産や育種では障害となっている自家不和合性の打破技術の開発や自家和合性品種の育成に繋がる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we sequenced the BAC contigs of 1.1 kb-1.5 Mb around S2-, S3- and S4-RNases of Japanese pear to find all the SFBB genes encoded by the three S-haplotypes. Using mRNA-sequences and RT-PCR cloning on the pollen derived from seven S-homozygous trees of Japanese pear and three cultivars of Japanese and European pear, other nine haplotypes were analyzed to identify the complete suite of SFBB genes in each haplotype. The SFBB proteins encoded by a total of 12 S-haplotypes of Pyrus species, were classified into 23 types. The same type of SFBB protein share higher degrees of amino acid sequence identity than those of S-RNase, suggesting that the same type SFBB recognize the same non-self S-RNases. The presence or absence of SFBB alleles in each type could predict the non-S-RNases that nine types of SFBBs target.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：自家不和合性 ニホンナシ セイヨウナシ S-RNase SFBB

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ナシ属は両性花を着生するが、自家受粉では受精・結実しない。この現象は自家不和合性と呼ばれ、配偶体的に機能する *S* ハプロタイプにより制御されている。*S* ハプロタイプには雌ずい側因子 *S*-RNase と花粉側因子がコードされ、*S*-RNase は雌ずいと同じ *S* をもつ不和合花粉管内で RNA 分解酵素として働き、花粉管を伸長停止に導き、異なる *S* をもつ和合花粉管内では花粉側因子によって無毒化されると考えられている。

我々は、ニホンナシの *S4* ホモ系統と‘長十郎’ (*S2S3*) から BAC ライブラリーを作製し、*S*-RNase を起点とした染色体歩行を続け、BAC コンティグ配列上に花粉側因子候補となる F-box タンパク質 (SFBB) 遺伝子群を探索し、これまでに、*S2*-RNase 上流 341kb から下流 480kb には 18 個の *S2*-SFBB、*S4*-RNase 上流 500kb から下流 835kb には 20 個の *S4*-SFBB、*S3*-RNase 上流 390kb~下流 366kb とその上流に計 14 個の *S3*-SFBB を見出している。SFBB は F-box ドメインで Cullin1, Rbx が結合した SSK1 と SCF 複合体を形成し、非自己 *S*-RNase をポリユビキチン化し、26S プロテアソーム系を介して無毒化することで、和合花粉管の伸長停止が回避されると考えられている。

SFBB 群内にはハプロタイプ間で 89%以上の同一性を示す SFBB 対立遺伝子が存在している。高い同一性を示す SFBB 対立遺伝子産物は非自己 *S*-RNase に対する類似した認識特異性を持ち、各タイプの SFBB が異なる非自己 *S*-RNase を分担して認識・無毒化している可能性が示唆され、ナス科植物で提案されている「協調的非自己 *S*-RNase 認識モデル (Kubo et al. 2010)」がナシ属にも適用できる。このモデルでは、各ハプロタイプには自己 *S*-RNase を無毒化する SFBB は存在せず、また 1 個の SLF が複数の *S*-RNase を識別する。ナシ属 SFBB 群の *S*-RNase に対する認識特異性は不明であるが、*S4*-RNase と *4-d1* (*S4*-SFBB1b) を含む 236 kb を欠失した *S4<sup>m</sup>* 花粉が *S1* 雌ずいにも拒絶されることから、*S4*-SFBB20 が *S1*-RNase をターゲットとすると推定されている。

一方で、和合花粉管の伸長および不和合花粉管の伸長停止の過程を明らかにするため、透過型電子顕微鏡観察し続けてきた。不和合花粉管内先端部において、オルガネラの膨張・崩壊や分泌小胞の減少・消失が観察されている。先端部の全貌を厚さ 0.1  $\mu$ m の超薄切片の二次元画像だけで捉えること難しい。

## 2. 研究の目的

ナシ属の SFBB 群がどのように分担して非自己 *S*-RNase を認識し、無毒化しているのかを明らかにすることを目的とした。ニホンナシの *S2*、*S3*、*S4*-RNase 周辺領域の BAC コンティグ配列を解読し、これら *S* ハプロタイプにコードされる SFBB 群を掌握するとともに、他の *S* をもつ *S* ホモ系統や品種の花粉 mRNA-seq データから SFBB コンティグ配列を構築し、クローニングする。SFBB 群配列をタイプ分けし、タイプ分布とタイプ内の SFBB 対立遺伝子の在・不在から SFBB の *S*-RNase に対する認識特異性を予測する。その予測を立証するための SFBB 融合タンパク質発現系を開発する。一方で、自己 *S*-RNase はどのように花粉管を伸長停止に導くのかを解き明かすために、電子線トモグラフィ法を用いた花粉管先端部の三次元構造を構築する。

## 3. 研究の方法

### (1) BAC コンティグの配列解析

ニホンナシ *S2*、*S3*、*S4*-RNase 周辺領域の BAC コンティグ配列内外に存在する未解読 BAC クローンを次世代シーケンサー PacBioRSII プラットフォームで解析した。取得したロングリード配列を HGAP でアセンブリすることで、BAC クローンの全長配列を解読し、既知のコンティグに統合した。コンティグ配列に対して HMMER および MEGANTE によるアノテーション解析を実施し、SFBB 配列を探索した。lastz-AliTV を用いたシンテニー解析を行い、ハプロタイプ間のゲノム構造を比較した。ニホンナシ *S2*、*S3*、*S4*、*S4<sup>m</sup>* ホモ花粉から抽出した Total RNA を用いて mRNA-seq 解析を実施した。取得した mRNA-seq データを BAC コンティグ配列にマッピングすることで、コンティグ配列上の遺伝子の花粉における発現を解析した。

### (2) SFBB 群コンティグ配列の構築

*S1*、*S5*、*S6*、*S7*、*S8*、*S9* ホモ花粉の Total RNA から取得した mRNA-seq データを既知の SFBB 配列にマッピングすることで、これらハプロタイプがコードする SFBB 群コンティグ配列を構築し

た。各 *SFBB* の非翻訳領域から設計したプライマーセットを用いた RT-PCR 増幅断片を TA クローニングして、塩基配列を解析することで、コンティグ配列の存在を確認した。同様に、ニホンナシ品種‘巾着’ (*S4Sk*)、ニホンナシとセイヨウナシとの交雑品種フロンティア (*S5S101*)、交雑実生 (*S2S118*) の花粉から取得した mRNA-seq データを既知の *SFBB* 配列にマッピングすることで、*Sk-*, *S101-*, *S118-SFBB* 群コンティグ配列を構築し、RT-PCR によりそれらの配列を確認した。

### (3) *SBBB* のタイプ分けと対立遺伝子の不在判定

リンゴの *SFBB* 群は 24 つのタイプ (*MdSFBB1*~*24*) にタイプ分けされている (Pratas et al. 2018, *Sci. Rep.* 8:1717)。これら配列に取得したナシ属の *SFBB* 配列を加えたデータから MEGAX を用いて分子系統樹を作成し、ナシ属の *SFBB* 群をタイプ分けした。*S1*, *S5*, *S6*, *S7*, *S8*, *S9* ホモ個体の葉からゲノム DNA を抽出し、全ゲノムリシーケンス解析により取得したショートリードをマッピングすることで、*SFBB* 対立遺伝子の在・不在をゲノムレベルで検証した。

### (4) ペチュニア形質転換系を用いた *SFBB* 発現系の検討

花粉特異的発現を誘導する *LAT52* プロモーターの後ろに *FLAG* タグ配列とペチュニアの *S7-SLF2* の F-box ドメインを連結したバイナリーベクター *pSLF2F* を久保健一 (東京大学助教) から分譲を受けた。*S7-SLF2* の F-box ドメインの後ろにニホンナシの F-box ドメインを欠いた *S1-SFBB20* および *S4-SFBB20* を連結したベクターを構築し、アグロバクテリウム法を用いて自家不和合性のペチュニアのリーフディスクに導入した。形質転換体の花粉 total RNA を鋳型にした RT-PCR を行い、*SFBB* の転写を確認した。形質転換体の花粉粗タンパク質抽出液に対して抗 *FLAG* 抗体を用いたイムノブロット解析を行い、*SFBB* 融合タンパク質を検出した。更に、花粉粗タンパク質抽出液を抗 *FLAG* 抗体アフィニティーゲルで精製した後、ペチュニアの抗 *Cullin1-P* 抗体を用いたイムノブロット解析を行い、*SCF* 複合体を検出した。

### (3) 電子線トモグラフィー法

ニホンナシ *S3* ホモ系統に *S3* または *S4* ホモ花粉を受粉し、受粉 24 時間後の花柱をハーフカルノフスキー液とオスミウム溶液で固定した。脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。包埋ブロックから厚さ 2.5 $\mu$ m の連続厚切り切片を作製し、1 枚おきに脱樹脂した後、アニリンブルー染色で花粉管を特定した。花粉管が見つかった前後切片を倒立包埋し、超薄切片を作製し、*TI* ブルー・鉛の電子二重染色をした後、加速電圧 80kV の TEM で観察した。二次元 TEM 観察で花粉管最先端部が同定された超薄切片を取得したブロックから、400nm 厚の切片を作製した。切片をウラン・鉛のマイクロウェーブ照射による電子二重染色をした後、加速電圧 200kV の高圧 TEM で $\pm 60^\circ$ 傾斜像撮影し、三次元像を構築した。

## 4. 研究成果

### (1) *S* 遺伝子座の全貌解明

ニホンナシ *S2*, *S3*, *S4-RNase* 周辺領域をカバーする BAC コンティグ配列内外に存在する未解読の BAC クローン配列を解析し、既築の BAC コンティグ配列に統合した。BAC コンティグ配列は *S2-RNase* 上流 578kb~下流 481kb, *S3-RNase* 上流 824kb~下流 471kb, *S4-RNase* 上流 935kb~下流 538kb まで拡張された。これらコンティグ配列上には 18 個の *S2-SFBB*, 19 個の *S3-SFBB*, 20 個の *S4-SFBB* が見つかった。加えて各コンティグには 4- 5 個の *SFBB* 偽遺伝子が見出された。*S2*, *S3*, *S4*, *S4<sup>m</sup>* ホモ花粉の mRNA-seq データを BAC コンティグ配列にマッピングして、コンティグ配列上の遺伝子の花粉での発現を解析したところ、*S2-*, *S3-*, *S4-SFBB* 群と各群 1 個の *SFBB* 偽遺伝子の発現が確認された。

ハプロタイプ間のシンテニーを lastz-AliTV を用いて解析した結果、各コンティグの両外縁部のシンテニーは高く、*SFBB* は同一順序、同一転写方向で配置された。この領域の外側には *SFBB* 様配列は検出されなかったことから、*S2*, *S3*, *S4* ハプロタイプにコードされる *SFBB* を掌握できたと判断した (図 1)。

*S2-*, *S3-*, *S4-SFBB* 群、偽遺伝子の配列に 24 タイプのリンゴ *SFBB* 配列を加えたデータから MEGAX を用いて分子系統樹を作成し、*SFBB* 群をタイプ分けした。*S2-*, *S3-*, *S4-SFBB* 群の大半は

SFBB1~17, 20, 22 に、花粉で発現していた偽遺伝子は SFBB18 に帰属した。SFBB1~24 いずれにも帰属しなかった SFBB を SFBB25, 26 と名付けた。また、*S3-SFBB4* と *SFBB13*, *S4-SFBB14* には重複により生じたと思われるパラログが見出された。

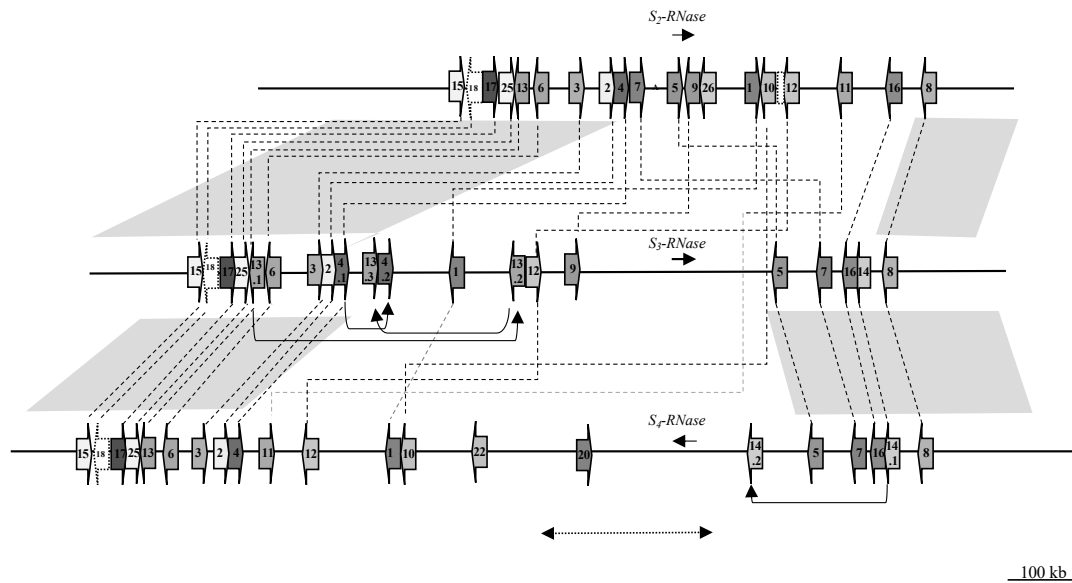


図 1. ニホンナシ *S2*-, *S3*-, *S4*-RNase (→) 周辺領域の BAC コンテイング上の SFBB 群 (■) SFBB 群は 22 のタイプ (1~18, 20, 22, 25, 26) に分類され、同じタイプに属する SFBB を点線で結んだ。遺伝子重複により派生したパラログを ---▶ で結んだ。花粉で発現している偽遺伝子は □ で表示した。S4<sup>sm</sup> における欠失領域を ←--▶ で示した。コンテイング間で高いシンテニーを示した両外縁領域を灰色塗りで表示した。

(2) mRNA-seq データからの SFBB コンテイング配列の構築と RT-PCR クローニング

*S1*, *S5*, *S6*, *S7*, *S8*, *S9* ホモ花粉から取得した mRNA-seq データを既知のニホンナシとリンゴの 26 タイプの SFBB 配列にマッピングすることで、*S1*-, *S5*-, *S6*-, *S7*-, *S8*-, *S9*-SFBB 群コンテイング配列を構築した。コンテイング配列の存在を各 SFBB の非翻訳領域から設計したプライマーセットを用いた RT-PCR クローニングにより確認した。*S1*-, *S5*-, *S6*-, *S7*-, *S8*-, *S9*-SFBB 群を加えたニホンナシ *S1*~*S9*-SFBB 群は 23 のタイプ (SFBB 1~18, 20, 22, 25, 26, 27) に分類された。SFBB のタイプ分布を調べたところ、90%以上の高い同一性を示す S-RNase をコードしている *S1* と *S4*, *S3* と *S5* ハプロタイプは類似していた。

「協調的非自己 S-RNase 認識モデル」では各ハプロタイプに自己 S-RNase を認識・無毒化する SFBB はコードされていない。SFBB2 タイプは *S9* ハプロタイプに由来する SFBB を欠いていたことから、SFBB2 タイプのターゲットは *S9*-RNase であると予測された。対立遺伝子の欠失に基づいた予測の信頼性を高めるため、*S1*, *S5*, *S6*, *S7*, *S8*, *S9* ホモ個体の全ゲノムリシーケンス解析を行い、取得したショートリードを 26 タイプの SFBB 配列にマッピングすることで、ゲノムレベルでも対立遺伝子の在・不在を検証した。そして、タイプ内の SFBB 対立遺伝子の在・不在から、5つのタイプの SFBB のターゲットとなる非自己 S-RNase を予測した (図 2)。SFBB2 タイプは *S9*-RNase, SFBB9 タイプは *S1*-, *S4*-RNase, SFBB11 タイプは *S3*-RNase, SFBB14 タイプは *S2*-, *S5*-RNase, SFBB25 タイプは *S6*-と *S8*-RNase をターゲットとすると予測された。また、*S1* ハプロタイプには *S1*-RNase を認識すると予測された *S4*-SFBB20 の対立遺伝子となる *S1*-SFBB20 が見出されたが、*S1*-SFBB20 は *S4*-SFBB20 との同一性は 87%と低く、*S1*-RNase を認識しないと推測された。

未予測タイプの SFBB の認識特異性を推定するため、*S1*~*S9* 以外の SFBB 群を解析することにした。しかし、*S* をヘテロにもつ品種の花粉 mRNA-seq データからの同一性が高い SFBB 対立遺伝子のコンテイング配列を構築するのは難しい。そこで、SFBB 群が掌握された *S* と未解析の *S* を共有するニホンナシ品種 ‘巾着’ (*S4Sk*)、ニホンナシとセイヨウナシとの交雑品種フロンティア (*S5S101*)、交雑実生 (*S2S118*) を選択した。花粉 mRNA-seq データから既知の SFBB 群配列を

除外した後、残った配列をマッピングすることで、*Sk-*, *S101-*, *S118-SFBB* 群コンティグ配列を構築した。これらコンティグ配列の存在を RT-PCR クローニングにより確認した後、タイプ分けした。その結果、*SFBB1* タイプが *Sk-*, *S101-RNase* を認識すると予測され、リンゴでは機能していた *SFBB18* が、ナシ属では偽遺伝子化していることが明らかになった。

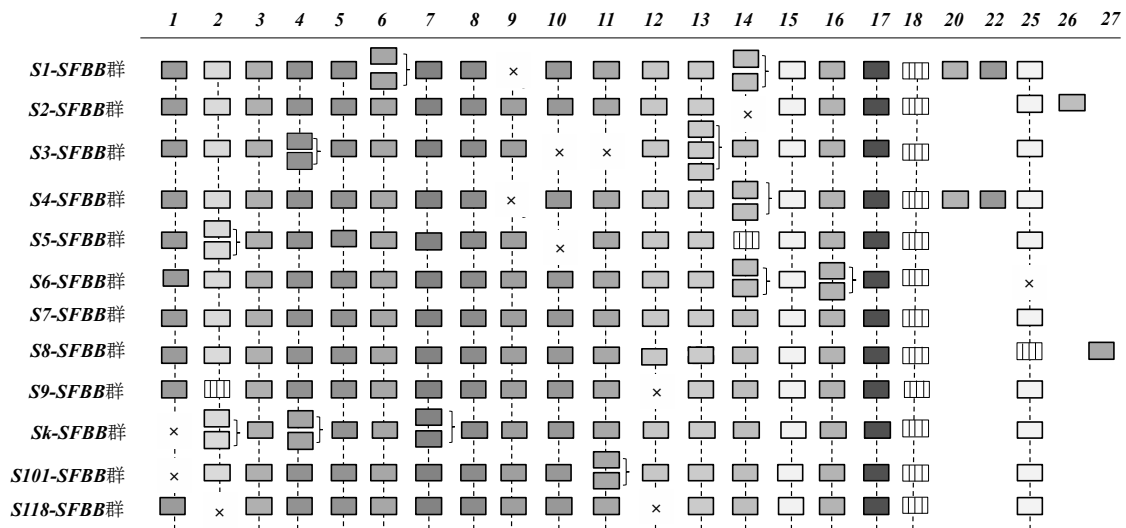



図 2. ナシ属の 12 ハプロタイプがコードする *SFBB* 群のタイプ分けと対立遺伝子の分布。偽遺伝子を  で、対立遺伝子不在を **X** で表示した。パラログを **]** で括った。

### (3) ペチュニア形質転換系を用いた *SFBB* 発現系の開発

上記の *SFBB* の非自己 S-RNase に対する認識特異性の予測を証明するには、*SFBB* 導入したナシの形質転換体を作成し、交配実験により競合相互作用を検出する必要があるが、ナシの形質転換系は確立されていない。そこで、*SFBB* をペチュニアの花粉で発現させ、内在の *SSK1*, *Cullin1-P* と *SCF* 複合体を形成させる系を開発し、複合体と S-RNase とのタンパク質結合解析を計画した。*S4-SFBB20* は *S1-RNase* を認識するが、その対立遺伝子 *S1-SFBB20* の産物は認識しないことを証明するために、バイナリーベクター *pSLF2F* の *S7-SLF2F-box* ドメインの後ろに *F-box* ドメインを欠いた *S4*-および *S1-SFBB20* を連結したベクターを構築した。*S4-SFBB20* および *S1-SFBB20* を導入したペチュニア形質転換を 15 個体と 11 個体をそれぞれ作出した。形質転換体の花粉において、*S4*-および *S1-SFBB20* 発現は確認できたものの、イムノブロット解析でいずれの個体でも *SFBB* 融合タンパク質は検出されなかった。

### (4) 電子線トモグラフィー法による花粉管三次元構造の構築

80nm の超薄切片で花粉管先端部を確認できたブロックから 400nm 厚の切片を作製し、電子線トモグラフィー観察した。取得した傾斜画像から三次元構造像を構築することができたが、コントラストが低く、内部構造も不明瞭であった。技術的な課題を多く残した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西村遼太郎, 溝口桃香, 張 競月, 藤本龍, 安田（高崎）剛志
2. 発表標題 ニホンナシS2, S3, S4 ハプロタイプのゲノム構造解析とSFBB の探索
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野木彩未・高畑宏基・西村遼太郎・藤本龍・安田（高崎）剛志
2. 発表標題 ナシホモ系統の花粉RNAからのPpSFBB配列の再構築とクローニング
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野環太・久保健一・藤本龍・高山誠司・安田（高崎）剛志
2. 発表標題 ペチュニア花粉におけるニホンナシSFBB融合タンパク質発現系の開発
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue, K., Ibuchi, Y., Park, P., Hikichi, Y.
2. 発表標題 Cytological analysis on morphological differentiation of <i>Ralstonia solanacearum</i> during the infection process.
3. 学会等名 8th Congress of European Microbiologists (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	井上 加奈子  (Inoue Kanako)  (00647737)	大阪大学・超高压電子顕微鏡センター・講師   (14401)	
研究 分担者	藤本 龍  (Fujimoto Ryo)  (60620375)	神戸大学・農学研究科・准教授   (14501)	

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
---------	---------