

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02949

研究課題名(和文)カンキツ属植物の自家不和合性はS-RNaseに支配されているのか？

研究課題名(英文)Is self-incompatibility in Citrus spp. governed by S-RNase?

研究代表者

本勝 千歳 (Honsho, Chitose)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：30381057

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)：カンキツ属植物の自家不和合性(SI)機構を明らかにするために、S-RNase様T2 RNase遺伝子のSIへの関与に対する検証を行った。ヒュウガナツより得たT2 RNaseの一種を大腸菌で発現させた組換えタンパク質を、*in vitro*での発芽花粉に処理したところ花粉管伸長の抑制効果が見られた。また、交雑実生を用いた遺伝解析により、いくつかのT2 RNase遺伝子がS対立遺伝子の遺伝様式と一致することを確認した。さらに、カンキツ属植物でのT2 RNase遺伝子の多様性を明らかにした。以上よりこれらのT2 RNase遺伝子がカンキツ属植物のSIを支配するS-RNaseであると結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンキツ属植物の自家不和合性については、その現象は古くから知られていたもののメカニズムに関する研究は長らく進展してこなかったが、本研究によってS-RNaseによって支配されているということが明らかになった。カンキツ属植物の自家不和合性は自家受粉による種子形成を制限するため、単為結果性カンキツを栽培する際の無核果生産に有用となる形質である。今後カンキツ属植物のS-RNase遺伝子型がより明らかになりDNAマーカーが開発されれば、新たな無核性カンキツ品種の育種の効率化が期待されるなど、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of self-incompatibility (SI) in Citrus species, the involvement of S-RNase-like T2 RNase genes in SI was examined. Recombinant protein of T2 RNase obtained from 'Hyuganatsu' was expressed in *Escherichia coli* and treated with germinated pollen *in vitro*, and it was observed that pollen tube elongation was inhibited. Genetic analysis of using seedlings obtained by out-cross of parents sharing one S allele confirmed that inheritance of several T2 RNase genes were consistent with the mode of the S allele inheritance. In addition, allelic diversity of T2 RNase genes were identified using 41 citrus varieties. Finally, it was concluded that these T2 RNase genes are S-RNase which regulates the SI of citrus plants.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：カンキツ 自家不和合性 S-RNase 果樹

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物における自家不和合性とは、花の雌雄器官の機能がそれぞれ正常であるにもかかわらず、自家受粉（あるいは同じ自家不和合性遺伝子型をもつ個体間での受粉）を行うと、何らかの生理的拒絶反応が生じ、受精に至らない現象のことである。特に果樹においては、収穫物は開花・結実を経て形成される果実であるために、自家不和合性はその生産性に直結する重要な生理現象である。これまでに果樹作物においては、配偶体型自家不和合性（花粉のS表現型が花粉自身のS遺伝子型によって決定される自家不和合性）を示すリンゴ・ナン・オウトウ・ウメなどのバラ科果樹において、分子レベルでのメカニズム解明が行われてきた。

一方でカンキツ属植物では、ポメロ、マンダリン、雑柑類などのいくつかの種が配偶体型自家不和合性を示すものの、そのメカニズム解明については進展していない。単為結果性を持たない自家不和合性カンキツ種では、結実安定のために10%程度の交雑和合種の混植や、人工受粉が必要となり、自家不和合性によってもたらされる生産性・生産効率の低下は大きい。一方で、単為結果性と自家不和合性の両者が備わった場合、自家受粉による種子形成が回避され安定的に無核果を生産できるので、自家不和合性は無核性カンキツ品種育成のための有用な特性としても捉えられている。これらの点から、カンキツ属における自家不和合性は果実生産・無核果系統育種の両面から重要な形質であるといえる。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに自家不和合性を示すカンキツ属植物の‘ヒュウガナツ’からS-RNase様T2RNase遺伝子配列を獲得してきた。本研究課題においては、これらのS-RNase様T2RNase遺伝子について、その組換えタンパク質を用いた機能解析や、交雑実生を用いた遺伝様式の解析、さらに多数のカンキツ属植物を供試したジェノタイピングを通じて、これらのS-RNase様T2RNase遺伝子が、カンキツ属植物の自家不和合性に関与しているかどうかを検証することを、研究の目的としている。

3. 研究の方法

(1) 組換えタンパク質を利用した *in vitro* 花粉管伸長阻害

‘ヒュウガナツ’から単離したS-RNase様T2RNase (HY9350)のcDNAをpET系プラスミドに挿入し、大腸菌 (*E. coli* B株)に導入した。目的遺伝子を導入した大腸菌で組換えタンパク質を発現させて回収した。開花期に‘ヒュウガナツ’および‘ハッサク’の花粉を収集し、液体花粉発芽培地上で、数時間培養した後に、得られた組換えタンパク質溶液を追加で添加して、さらに培養を行った。その後、顕微鏡下で花粉管伸長を観察し、画像撮影を行った。撮影した画像を使用して、花粉管長をImageJにより測定した。

(2) カンキツ品種におけるS-RNase様T2RNase遺伝子の分布の調査と、新規S-RNase様T2RNase遺伝子の獲得

宮崎大学農学部果樹園芸学研究室圃場および宮崎県総合農業試験場果樹部に植栽されているカンキツ属植物47品種の新葉を使用した。これらから、NucleoSpin Plant-II (Macherey-Nagel)を使用してDNAを抽出した。これまでに同定されているS-RNase様T2RNase遺伝子10種に対して、それぞれ特異的なプライマーを用いてPCRを行った。PCR反応液を1%アガロースゲルを用いて電気泳動し、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色して、紫外線照射下で増幅産物の有無を確認した。

‘金柑子’と‘黄金柑’の花から花柱を採取しtotal RNAを抽出した。これを供試してRNA-Seqを行った。取得したRNA-seqリードについて品種毎に *de novo assembly* を行い、各転写産物についてblastxとInterProScanによるアノテーション付与を行った。これをもとにT2RNaseを検索し、抽出した。

(3) 交雑実生を用いたSハプロタイプとT2RNaseの遺伝解析

‘ヒュウガナツ’と‘トサブentan’の正逆交雑実生群（‘ヒュウガナツ’×‘トサブentan’、‘トサブentan’×‘ヒュウガナツ’）を作成し、これを実験に供試した。それぞれの実生およびそれらの親個体からDNAを抽出し、PCR増幅により6種類のS-RNase様T2RNase遺伝子の有無を検出し、親個体から後代実生群への遺伝様式の調査を行った。

同様にアメリカで育成された品種‘フォーチュン’に対して、その親個体であるクレメンティンと‘オーランド’を戻し交雑して交雑後代を得た。この個体群について、7種類のS-RNase様T2RNase遺伝子に対して各交雑後代個体における有無を調査し、親植物から交雑実生への遺伝様式を調査した。

4. 研究成果

(1) 組換えタンパク質を利用した *in vitro* 花粉管伸長阻害

作成された組換えタンパク質はRNA分解酵素活性を示した。これを *in vitro* での発芽花粉に

添加したところ、花粉管伸長阻害が確認され、組換えタンパク質処理区においては、未処理区に比較して有意に花粉管長が短くなり、組換えタンパク質の花粉管伸長抑制効果が確認された。また、花粉管の形態にもねじれや破裂が生じているものが観察された。

(2) カンキツ品種における S-RNase 様 T2 RNase 遺伝子の分布の調査と、新規 S-RNase 様 T2 RNase 遺伝子の獲得

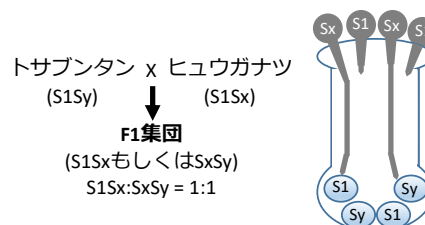
供試した 47 品種・系統のうち、39 品種・系統において、検証した S-RNase 様遺伝子 10 種類のうちの二つを保持していた。残りの 8 品種・系統については、7 品種・系統は検証した S-RNase 様遺伝子の一つだけが検出され、1 品種（‘チャンドラー’ポメロ）については、どれも有していなかった。S-RNase 様遺伝子が二つ検出されなかった品種のうち‘黄金柑’と‘金柑子’について、花柱より抽出した RNA を供試した RNAseq を行い、*de novo assembly* ならびに *blastx* による機能予測を行うことによって、花柱で発現している T2 RNase 遺伝子配列を複数獲得した。これらの中から新規に 2 種類の S-RNase 様 T2 RNase 遺伝子を獲得した。これらの分布についても調査を行った結果、最終的に 41 品種・系統について、それらが保持している S-RNase 様遺伝子のジェノタイプが明らかとなった。

(3) 交雑実生を用いた S ハプロタイプと T2 RNase の遺伝解析

過去の研究より‘ヒュウガナツ’と‘トサブentan’は、S 対立遺伝子を一つ共有していることがわかっている (Kim et al., 2011)。ここで‘ヒュウガナツ’と‘トサブentan’の S 遺伝子型を $S1Sx$ 、 $S1Sy$ としたとき、これらの個体間で交雑を行うと、自家不和合性反応により‘トサブentan’ ($S1Sy$) × ‘ヒュウガナツ’ ($S1Sx$) では全ての後代に Sx が遺伝し (第 1 図)、『ヒュウガナツ’

($S1Sx$) × ‘トサブentan’ ($S1Sy$) では全ての後代に Sy が遺伝する。各後代における S-RNase 様 T2 RNase 遺伝子の有無を確認したところ、‘ヒュウガナツ’より単離した HY9350 が Sx 対立遺伝子の遺伝様式に合致し、また‘トサブentan’より単離した TBN21475 が Sy 対立遺伝子の遺伝様式に合致した (第 1 表)。

また、‘ヒュウガナツ’より単離した HY11692 は、HY9350 および TBN21475 と同一遺伝子座上に存在する対立遺伝子であることが強く示唆され、 $S1$ 対立遺伝子に相当するものと考えられた。



第 1 図 S ハプロタイプを共有するトサブentan と‘ヒュウガナツ’を交配したときの花柱における不和合反応と後代集団での S ハプロタイプの分離様式。

第1表 ヒュウガナツとトサブentanの正逆交雑後代実生群におけるS-RNase様T2 RNase遺伝子の遺伝と分離 (Honsho et al., 2021)

S-RNase様T2 RNase 遺伝子	ヒュウガナツ トサブentan		ヒュウガナツ x トサブentan 実生個体群				トサブentan x ヒュウガナツ 実生個体群			
	ヒュウガナツ	トサブentan	有り	無し	P value (χ^2 test)		有り	無し	P value (χ^2 test)	
					1:1	3:1			1:1	3:1
HY16290	+	+	58	23	0.0001007	0.4804	71	22	3.75E-07	0.7647
HY11692	+	+	43	38	0.5785	5.25E-06	42	51	0.3507	3.02E-11
HY8523	+	+	81	0	< 2.2E-16	2.04E-07	93	0	< 2.2E-16	2.58E-08
HY9350	+	-	38	43	0.5785	5.29E-09	93	0	< 2.2E-16	2.58E-08
TBN10176	-	+	39	42	0.7389	2.39E-08	38	55	0.07793	2.89E-14
TBN21475	-	+	81	0	< 2.2E-16	2.04E-07	51	42	0.3507	7.118E-06

‘フォーチュン’も親個体であるクレメンティン、‘オーランド’とそれぞれ S 対立遺伝子を一つずつ共有している。検証に供試した 7 種類の S-RNase 様 T2 RNase 遺伝子のうち、NUL54227、OLD73566、OLD39583、NUL77026 が S 対立遺伝子の遺伝様式と合致した。

以上得られた結果は、全てカンキツ属植物の自家不和合性の雌ずい側因子が S-RNase であることに矛盾しない。よって、カンキツ属植物の自家不和合性は S-RNase によって支配されているものと結論づけた。また、中国の研究グループによっても同様の結論が報告されている (Liang et al., 2020)。Liang et al. (2020)では、 $S1$ ~ $S14$ -RNase 遺伝子が報告されており、本研究課題によって新たに HY9350 を $S15$ -RNase、TBN21475 を $S16$ -RNase、さらにこれまでに‘ハッサク’より単離していた HSK19371 を $S17$ -RNase と命名した。

<引用文献>

Kim, J.-H., T. Mori, A. Wakana, B. X. Ngo, K. Sakai and K. Kajiwara. 2011. Determination of self-incompatible citrus cultivars with S_1 and/or S_2 alleles by pollination with homozygous S_1 seedlings (S_1S_1 or S_2S_2) of ‘Banpeiyu’ pummelo. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 80: 404-413.

Liang, M., Z. Cao, A. Zhu, Y. Liu, M. Tao, H. Yang, Q. Xu, Jr., S. Wang, J. Liu, Y. Li, C. Chen, Z. Xie, C. Deng, J. Ye, W. Guo, Q. Xu, R. Xia, R. M. Larkin, X. Deng, M. Bosch, V. E. Franklin-Tong and L. Chai. 2020. Evolution of self-compatibility by a mutant *Sm-RNase* in citrus. Nature Plants 6: 131-142.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Honsho Chitose, Ushijima Koichiro, Anraku Misa, Ishimura Shuji, Yu Qibin, Gmitter Frederick G., Tetsumura Takuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Association of T2/S-RNase with self-incompatibility of Japanese citrus accessions examined by transcriptomic, phylogenetic, and genetic approaches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 638321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.638321	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 該当する

1. 著者名 Honsho Chitose	4. 巻 92
2. 論文標題 Self-incompatibility Related to Seedless Fruit Production in Citrus Plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.QH-R001	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chitose Honsho, Koichiro Ushijima, Shuji Ishimura, Takuya Tetsumura
2. 発表標題 Survey of candidate genes for citrus S-RNase from genomic and transcriptomic data
3. 学会等名 1st International Symposium on Reproductive Biology of Fruit Tree Species（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本勝千歳, 田邊秀和, 石村修司, 鉄村琢哉, Krishan Kumar, Qibin Yu, Fred Gmitter
2. 発表標題 クレメンティン, 'オーランド', 'フォーチュン' におけるS-RNase遺伝子の探索
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本勝千歳・牛島幸一郎・石村修司・鉄村琢哉
2. 発表標題 カンキツ属植物から得られたT2 RNaseの系統解析と一次構造の特徴
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 本勝千歳・安楽美桜・中川華菜・古川大・石村修司・鉄村琢哉
2. 発表標題 カンキツ属植物における自家不和合性 S ハプロタイプと一致した分離を示す T2 RNase 遺伝子
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河村奈歩・石村修司・鉄村琢哉・本勝千歳
2. 発表標題 自家不和合性カンキツのクレメンティンにおけるS遺伝子座に存在する遺伝子の特徴
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022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	稲葉 丈人 (Inaba Takehito) (00400185)	宮崎大学・農学部・准教授 (17601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	牛島 幸一郎 (Ushijima Koichiro) (20379720)	岡山大学・環境生命科学学域・准教授 (15301)	

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			
米国	University of Florida			