

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20380003

研究課題名（和文） 配偶体型自家不和合性の分子機構・起源・多様性の解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanism, origin and diversity of gametophytic self-incompatibility systems

研究代表者

佐々 英徳 (SASSA HIDENORI)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：50295507

研究成果の概要（和文）：配偶体型自家不和合性を示すバラ科植物、ナシ・リンゴにおいて、花粉側自家不和合性因子の実態解明を試みた。その結果、ナシ・リンゴは同じバラ科のサクラ属と異なり、*SFBB* と名付けた類似した複数の F-box 遺伝子が協調的に「非自己」の雌ずい側因子 S-RNase を無毒化している可能性が示唆された。また、ナス科のペチュニアにおいては、非 S 因子である HT-B を解析し、その極端な発現抑制を行なっても自家不和合性表現型は部分的にしか影響を受けないことを示した。

研究成果の概要（英文）：Analysis of candidates for pollen-determinant in Japanese pear and apple of Rosaceae suggested that multiple and related F-box genes, SFBB, are collaboratively detoxify non-self pistil determinant, S-RNase. Isolation and functional analysis of HT-B gene, a non-S-specific self-incompatibility factor, of petunia showed that, unlike other solanaceous species, even a dramatic suppression of *HT-B* transcript resulted in partial breakdown of self-incompatibility in petunia. This may suggest slight functional divergence of *HT-B* gene in different species of Solanaceae.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：遺伝子・タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

雌ずい側の特異性因子が S-RNase と呼ばれる RNase である型の自家不和合性はバラ科、ナス科、ゴマノハグサ科に見られ、被子植物において最も古い起源の自家不和合性タイプであると考えられていた。しかし、バラ科のサクラ属(サクラ亜科)とナシ亜科(ナ

シ・リンゴ) では花粉側の特異性因子の機能が異なる可能性が変異体の解析などから示唆され、サクラ亜科とナシ亜科の自家不和合性機構の異同と進化的関係について関心が高まっていた。だが、サクラ亜科では花粉側特異性因子は我々のグループなどの研究により SFB と名付けられた F-box タンパク

質であることが見出されていたが、ナシ亜科の花粉側特異性因子は SFBB とは性質の異なる F-box タンパク質 SFBB が有力候補として我々により見出されたばかりで、その機能やサクラ亜科とナシ亜科の自家不和合性機構の進化的関係を解明するには知見が不十分であった。

ナス科においては自家不和合性機構解明は進められていたが、S-RNase と花粉側特異性因子 SLF がどのように機能し、自家不和合性を引き起こしているのか、その詳細は不明であった。さらに、自家不和合性は S-RNase と SLF だけでは不十分で、S 遺伝子座以外の「非 S 因子」も必要と考えられていたものの、非 S 因子に関する知見は限定的であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、S-RNase 型自家不和合性の機構をバラ科とナス科植物について解析し、その異同を明らかにするとともに、進化的関係についても知見を得ることを目的としている。バラ科では特に、ナシ亜科とサクラ亜科の間で花粉側特異性因子の機能が異なることが示唆されている点を分子レベルで解明するため、知見の乏しいナシ亜科の花粉側特異性因子の実態解明を試みた。ナス科については、非 S 因子に注目して研究を行った。

## 3. 研究の方法

ナシ亜科の花粉側特異性因子の実態を解明するため、まず BAC ライブラリーの利用可能なリングを用いて、花粉側特異性因子候補 SFBB の網羅的な単離と解析を行った。次に、S 遺伝子座領域の変異を持つナシの突然変異体を利用し、ナシの SFBB の機能の推定を試みた。

ナス科の非 S 因子についてはペチュニアを材料とし、まず他のナス科植物で知られている非 S 因子、HT-B の単離と機能解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) バラ科ナシ亜科の花粉 S 遺伝子の解析

リングの BAC ライブラリーを既に単離していた SFBB 遺伝子でスクリーニングしたところ、多数のポジティブクローンが得られた。以前には単一 S ハプロタイプには 2 つの SFBB の存在のみが知られていたが、得られた BAC クローンから SFBB 遺伝子を単離し、配列を決定したところ、S ハプロタイプには 10 以上の互いに相同性の高い SFBB 遺伝子が存在することが示された (文献③)。200 個体以上の集団を用いた遺伝解析で、それらは全て S-RNase 遺伝子と完全に連鎖していた。さらに、新たに同定された SFBB 遺伝子は何れも花粉特異的に発現していることが判った。従って、リング S ハプロタイプには当初知られ

ていたよりもはるかに多くの SFBB 遺伝子が存在することが示されたが、それらのいずれも花粉 S 遺伝子候補として否定されない性質を示したため、これら多数の SFBB の全て、あるいは一部が花粉 S 遺伝子であるか、あるいは何れも自家不和合性に関与しないのか、この時点では不明であった (文献③)。しかし、ナシ亜科では非常に多数の有力な花粉 S 遺伝子候補が単一 S ハプロタイプに存在するという発見は、花粉 S 遺伝子が S ハプロタイプに一つのサクラ亜科とは大きく異なり、両亜科の花粉 S 遺伝子機能の相違と関係している可能性が示唆された。

本研究課題を進める中で、奈良先端大・ペンシルバニア州立大のグループから、ナス科ペチュニアにおいては花粉 S 遺伝子は単一ではなく、複数の F-box 遺伝子がそれぞれ少数の非自己 S-RNase 遺伝子の不活化に関わるという「協調的非自己認識モデル」が提唱された。バラ科ナシ亜科はナス科と同様に四倍体などで花粉側で自家不和合性が失われるが、バラ科サクラ亜科では四倍体での自家不和合性が見られないことが報告されていること、ナシ亜科は複数の SFBB が花粉 S 遺伝子候補として同定されたことから、ナス科と類似のモデルがナシ亜科でも支持される可能性が示唆された。そこで次に、ナシを用いて SFBB の解析を進めた。

多数の S ハプロタイプから SFBB を単離し配列を比較したところ、異なるハプロタイプから由来する対立遺伝子と考えられる幾つかのタイプに別れることが示された。同じハプロタイプ内での異なるタイプ間の配列相同性は同じタイプ内の対立遺伝子間の相同性より低かった。このことは、単一ハプロタイプに由来する複数の F-box タンパク質がそれぞれ異なる「非自己」S-RNase を認識・無毒化するという、ナス科の新しいモデルと適合的と考えられた。さらに、Okada ら (2008) によって SFBB 遺伝子が一つ欠失していることが報告された変異ハプロタイプ S4sm の解析を行った。S4 に由来する S4sm は S4-RNase を含む長いゲノム領域が欠失しており、当初はそのため雌ずい側だけで自家不和合化した突然変異体と考えられていた (Sassa et al., 1997)。しかしその後、結実率の調査より、S4sm 花粉は S1 雌ずいにも拒絶される可能性が示唆された (斎藤ら 2002)。圃場で行われる授粉試験は環境条件により大きく影響されるため、S4sm 花粉を用いた遺伝解析により、S1 雌ずいでの拒絶の有無を解析した。その結果、S4sm 花粉は S3 や S5 雌ずいには正常に受容されるものの、S1 雌ずいには拒絶されることが示された。これらの結果より、ナシはナス科ペチュニアと同様「多因子非自己認識」型の自家不和合性を示し、単一 S ハプロタイプに複数存在する SFBB の多くが花粉 S

因子として、それぞれ異なる「非自己」S-RNase の認識・無毒化に関わっていることが示唆された。S4sm で欠失している SFBBI-S4 は S1-RNase の認識・無毒化を行う唯一の因子であると推定された (文献①)。これはバラ科サクラ亜科で提唱されている「単因子自己認識モデル」(Ushijima, Sassa ら 2003) とは異なり、バラ科の中でナシ亜科とサクラ亜科では花粉 S 遺伝子の機能が異なることを裏付ける結果となった。

#### (2) ナス科自家不和合性非 S 因子の解析

タバコ属、ナス属で解析されていた雌ずい側の非 S 因子、HT-B について、ペチュニアからの遺伝子単離と機能解析を行った。以前の試みでは、HT-B と相同性があるものの HT-B に特徴的な機能未知のモチーフ、アスパラギン・アスパラギン酸リッチドメイン (N/D-rich domain) を欠く HT-like (HTL) 遺伝子のみがペチュニアからは単離され、HTL は自家不和合性には関与していないことが示唆されていた (Sassa ら 2006)。HTL 単離に用いたものとは異なるプライマーを設計し HT-B の単離を試みたところ、タバコ属・ナス属の HT-B に類似し N/D-rich domain を持つ遺伝子が単離された。遺伝解析の結果、HT-B と HTL は完全に連鎖しており、BAC ライブラリーをスクリーニングしたところ、両者を同時に含むクローンが得られた。更に解析を進めたところ、HT-B は HTL の上流 4.5 kb に位置し、両者の転写方向は同じであることが明らかになった (文献⑤)。

ペチュニア HT-B 遺伝子の機能解析のため、RNAi による遺伝子発現抑制実験を行った。複数の RNAi 形質転換体を得て表現系の解析を行ったところ、HT-B 転写産物量が野生型の約 1/100 に低下した系統では正常な自家不和合性表現型を示し、1/1000 以下に低下した系統でのみ、部分的な自家和合性化が見られるにとどまった。タバコ属やナス属での機能解析ではほぼ完全な自家和合性系統が得られており、タバコ属での実験は RNAi より遺伝子発現抑制効率が低いと考えられるアンチセンス法で行われている (McClure ら 1999)。これらのことから、ペチュニアでは HT-B はタバコ属やナス属と異なり、自家不和合性において主要な役割を担っていない可能性が示唆された (文献④)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Uchida, A., Sassa, H., Takenaka, S., Sakakibara, Y., Suiko, M. and Kunitake, H.

Identification of self-incompatibility related proteins in the pistil of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.)) by proteome analysis. Plant Omics (in press) (査読有り)

② Kakui, H., Kato, M., Ushijima, K., Kitaguchi, M., Kato, S. and Sassa, H.

Sequence divergence and loss-of-function phenotypes of *S* locus *F*-box brothers (*SFBB*) genes are consistent with non-self recognition by multiple pollen determinants in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). Plant J. 68: 1028-1038 (2011) (査読有り)

③ Minamikawa, M., Kakui, H., Wang, S., Kotoda, N., Kikuchi, S., Koba, T. and Sassa, H.

Apple *S* locus region represents a large cluster of related, polymorphic and pollen-specific *F*-box genes. Plant Mol. Biol. 74: 143-154 (2010) (査読有り)

④ Puerta, A. R., Ushijima, K., Koba, T. and Sassa, H.

Identification and functional analysis of pistil-part self-incompatibility factor *HT-B* of *Petunia*. J. Exp. Bot. 60: 1309-1318 (2009) (査読有り)

⑤ Puerta, A. R., Takagawa, M. and Sassa, H.

Pistil non-*S*-specific self-incompatibility factor *HT-B* is tightly linked to the *HT*-like gene *HTL* in *Petunia*. Breed. Sci. 59: 99-101 (2009) (査読有り)

⑥ Kim, H., Kakui, H., Kotoda, N., Hirata, Y., Koba, T. and Sassa, H.

Determination of partial genomic sequences and development of a CAPS system of the *S*-RNase gene for the identification of 22 *S* haplotypes of apple (*Malus × domestica*)

Borkh.). **Mol. Breed.** 23: 463-472 (2009)  
(査読有り)

[学会発表] (計 12 件)

- ① Sassa, H., Kakui, H., Kato, M. and Ushijima, K. Non-self recognition by multiple F-box genes in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). Plant and Animal Genome XX (San Diego, CA, USA). January, 2012 (招待講演)
- ② 加藤雅樹、加藤修、北口美代子、佐々英徳. ニホンナシ品種「なつひかり」の弱い自家不和合性の解析. 日本育種学会第120回講演会 (福井県立大学) (2011)
- ③ Sassa H., Wang, S., Minamikawa, M., Kakui, H., Kikuchi, S. and Koba, T. Structural features of the *S* locus of apple. Floral Biology and S-incompatibility in fruit species (San Michele all' Adige, Italy). June, 2011 (招待講演)
- ④ Wang, S., Kakui, H., Kikuchi, S., Koba, T. and Sassa H. *S-RNase* and *SFBB* family F-box genes are located in sub-teromeric and heterochromatic chromosomal region in apple. XXI International Congress on Sexual Plant Reproduction (Bristol, UK). PSR6.22, Abstract p 64 (2010)
- ⑤ Minamikawa, M., Kakui, H., Wang, S., Kotoda, N., Kikuchi, S., Koba, T. and Sassa, H. Characterization of the F-box gene cluster linked to the *S* locus of apple. XXI International Congress on Sexual Plant Reproduction (Bristol, UK). PSR6.23, Abstract p 64 (2010)
- ⑥ Kakui, H., Sassa H., Kitaguchi, M., Kato, S. and Kato, M. Analysis of pollen-part *S* specificity of *S4sm*, a stylar-part self-compatible *S* haplotype in Japanese pear. XXI International Congress on Sexual

Plant Reproduction (Bristol, UK). PSR6.25, Abstract p 65 (2010)

- ⑦ 藤井大輔、角井宏行、古藤田信博、牛島幸一郎、佐々英徳. リンゴにおける自家不和合性関連遺伝子 SBP1 (*S-RNase* binding protein 1) ホモログの同定と解析. 日本育種学会第 118 回講演会 (秋田県立大学) (2010)
  - ⑧ 角井宏行、加藤雅樹、加藤修、北口美代子、佐々英徳. ニホンナシにおける雌ずい側自家和合性変異ハプロタイプ *S4sm* の花粉側特異性の解析. 日本育種学会第 118 回講演会 (秋田県立大学) (2010)
  - ⑨ Puerta AR, Ushijima K, Koba T, Sassa H. Identification and functional analysis of non-*S*-specific pistil-part self-incompatibility factor *HT-B* of *Petunia*. 日本育種学会第 115 回講演会 (つくば国際会議場) (2009)
  - ⑩ 南川舞、角井宏行、古藤田信博、佐々英徳. リンゴ *S* 遺伝子座に連鎖する F-box 遺伝子群の解析. 日本育種学会第 116 回講演会 (北海道大学) (2009)
  - ⑪ Kim HT、角井宏行、古藤田信博、木庭卓人、佐々英徳. *S-RNase* 遺伝子の CAPS 分析によるリンゴ品種の *S* 対立遺伝子 22 種類の識別. 日本育種学会第 114 回講演会 (滋賀県立大学) (2008)
  - ⑫ Sassa, H., Kakui, H., Minamikawa, M. : Characterization of multiple F-box genes linked to the *S* locus of apple and Japanese pear. Frontiers of Sexual Plant Reproduction III (Tucson, USA), October, 2008, Abstract p 56. (招待講演)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
佐々 英徳 (SASSA HIDENORI)  
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授  
研究者番号 : 50295507
  - (2) 研究分担者  
牛島 幸一郎 (USHIJIMA KOICHIRO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教  
研究者番号：20379720

(3)連携研究者

古藤田 信博 (KOTODA NOBUHIRO)  
(独) 農業・食品産業技術研究機構・果樹  
研究所・主任研究員  
研究者番号：50355426