

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05979

研究課題名（和文）アブラナ科自家不和合性柱頭因子SRKの自家不和合性形質発現への影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of the relationship of the self-incompatibility stigma factor, SRK, between the intensity of the self-incompatibility in Brassicaceae

研究代表者

山本 雅也（Yamamoto, Masaya）

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70732543

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：アブラナ科野菜の自家不和合性は育種や採種と深く関係する重要な農業形質である。自家不和合性の程度（強度）は系統間で差があることや、栽培環境により変化することが知られていたが、その分子機構の詳細は明らかになっていない。本研究では、自家不和合性の柱頭因子であるSRKに注目し、アブラナ科植物の自家不和合性程度の解明を試みた。本研究の成果により自家不和合性程度が安定的なS遺伝子系統を見いだすと共に、SRKの細胞膜局在率とある程度相関することを見いだした。また、アブラナ科野菜である*B. rapa*種の自家不和合性認識特異性をモデル植物であるシロイヌナズナに付与することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

流通するアブラナ科野菜のほとんどは異なる親株の後代であるF1品種であり、その採種の一部には自家不和合性が利用されている。しかし、自家不和合性程度の低さによる自殖種子混入が問題となっている。本研究では、自家不和合性程度が安定的なS遺伝子系統を見いだした。見いだした安定的な系統を利用することで自家不和合性程度が安定で高F1純度を達成できる品種の育成に寄与する。また、シロイヌナズナで*B. rapa*の認識特異性を付与する実験系を構築できたため、今後、*B. rapa*で蓄積した知見とシロイヌナズナの実験の簡易さを利用することで、自家不和合性研究の加速が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Self-incompatibility of Brassica vegetables is an important agronomic trait related to breeding and seed production. It has been known that the intensity of self-incompatibility varies between strains and varies depending on the cultivation environment, but the molecular mechanism has remained unclear. In this study, we examined the intensity of self-incompatibility of Brassicaceae plants by focusing on SRK, the stigmatic factor of self-incompatibility. As a result of this study, we found that the intensity of self-incompatibility is stable in the S strains and that it correlates to some extent with the plasma membrane localization of SRK. In addition, we were able to confer the self-incompatibility recognition specificity of *B. rapa* to *Arabidopsis thaliana*, as an experimental model plant.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：自家不和合性 アブラナ科 受容体キナーゼ SRK

1. 研究開始当初の背景

植物が他殖を実現するための機構の1つとして自家不和合性がある。アブラナ科植物の自家不和合性では、*S* 遺伝子座に座乗する2つの遺伝子、*S-locus receptor kinase (SRK)* と *S-locus cysteine-rich protein / S-locus protein 11 (SCR / SP11)*、以下 *SCR* が重要な役割を果たす。*SRK*は雌しべ柱頭の細胞膜に局在する受容体キナーゼを、*SCR*は花粉表面に沈着するペプチドリガンドをコードしている。*SRK*と*SCR*はゲノムの近接領域に座乗し、種内に多数の対立遺伝子が存在する。それら対立遺伝子は1つのセットとして遺伝し、このセットを*S*ハプロタイプとよぶ。*SRK*は同じ*S*ハプロタイプの*SCR*と相互作用し、自己を認識して自家不和合性反応を引き起こすことで、花粉発芽や花粉管伸長を阻害する。

アブラナ科野菜のF₁品種採種の一部に自家不和合性は利用され、採種現場では自家不和合性形質の強弱や、高温時の自家不和合性能力低下が観察されている。また*S* 遺伝子座がヘテロ接合時の、自家不和合性程度の低下や (Thompson 1972)、*S* 対立遺伝子間での表現型優劣性も知られている (Thompson and Taylor 1966)。これら現象はF₁品種採種時の自殖種子混入の原因となりうる。そのため、自己認識機構の理解に加えて、自家不和合性の程度などの理解も育種上重要な課題である。

柱頭側因子 *SRK* は、リボソームで合成され小胞体内で*N*結合型糖鎖修飾を受けた後にゴルジ体を経由して、細胞表層である細胞膜へと運ばれる。自家不和合性シロイヌナズナを用いた研究から、申請者は合成された *SRK* の一部のみが細胞膜に局在し、細胞膜に局在している *SRK* の割合が *S*ハプロタイプ間で異なることを明らかにした。また、高温時や *SRK* 変異体の自家不和合性能力低下の原因が、細胞膜に局在する *SRK* 量の減少である可能性を見いだした。

モデル植物であるシロイヌナズナは、*S* 遺伝子が欠損しているため、自家和合性である。近縁種である *Arabidopsis lyrata* の *S* 遺伝子を導入すると自家不和合性となるが、アブラナ科野菜である *B. rapa* の *S* 遺伝子を導入しても自家不和合性とはならないことが知られていた。

2. 研究の目的

本研究では所属研究室が維持・管理しているアブラナ科野菜 (*B. rapa*) *S* 遺伝子系統を材料に、自家不和合性程度と柱頭因子である *SRK* の細胞膜局在率の関係に注目し解析した。さらに *B. rapa* の *S* 遺伝子がモデル植物であるシロイヌナズナで機能できない原因の解明も試みた。

3. 研究の方法

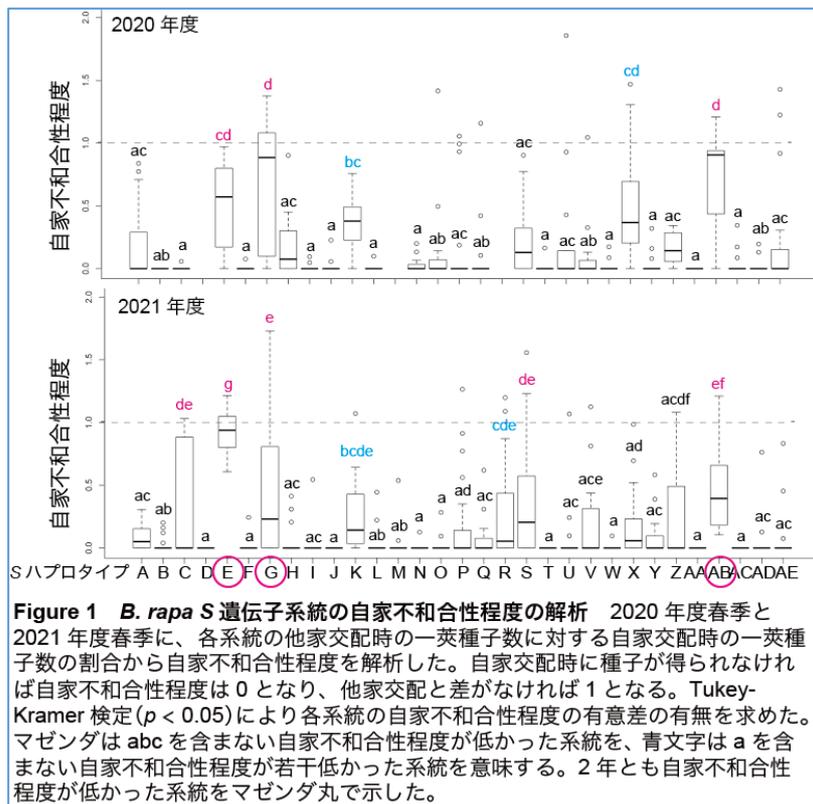
2019年冬季-2020年春季および2020年冬季-2021年春季の期間、東北大学農学部圃場(仙台市青葉区)に設置したガラス室で栽培した *B. rapa* *S* 遺伝子系統の自家不和合性程度を自家交配時の一莢種子数で解析した。この時、他家交配を同時に行い、自家交配時の一莢種子数を他家交配時の一莢種子数の平均で割ることで、自家不和合性程度 (SI index) とした。

B. rapa 柱頭因子である *SRK* の細胞膜局在率を明らかにするため、*B. rapa* *SRK* の抗体の作製およびシロイヌナズナでPAタグを付加した *B. rapa* *SRK* を発現する形質転換体を作製した。*B. rapa* *SRK* の細胞膜局在は、細胞膜局在型 *SRK* と非局在型(小胞体局在型) *SRK* の糖鎖切断酵素 endoglycosidase H (endo H) に対する感受性の違いで解析した。

B. rapa *S* 遺伝子がシロイヌナズナに自家不和合性能力を付与できない原因を明らかにするため、*B. rapa* *SRK* 遺伝子と *SCR* 遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナおよび *B. rapa* *SRK* 変異遺伝子と *SCR* 遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを作製した。自家不和合性能力は自家受粉時の花粉管数で解析した。花粉管数が9本以下の時を自家不和合性、30本以上の時を自家和合性10-29本の時を弱自家不和合性とした。

4. 研究成果

(1) 2020年春季および2021年春季に研究代表者の所属研究室が保有する *B. rapa* *S* 遺伝子系統の自家不和合性程度を一莢種子数で解析した。約30系統を解析したところ、解析した2カ年共に自家不和合性程度が低かった系統を3つ見いだした (Figure 1)。自家不和合性程度が低かった系統 AB は晩抽性であり、開花期の気温が上昇していたため、自家不和合性程度の低さの原因として高温の影響が考えられた。そこで、気温の上がらない冬季に22°Cに設定した野外型人工気象室で栽培し、一莢種子数で自家不和合性程度を解析した。結果、人工気象室栽培時も自家不和合性程度は低く、自家不和合性程度が低かった原因は栽培温度の高温化ではないことが示唆された。



(2) *B. rapa* SRK の細胞膜局在性を解析するため、*B. rapa* SRK のキナーゼドメインや受容体ドメインを認識するウサギポリクローナル抗体を作製した。しかし、*B. rapa* 柱頭から抽出したタンパク質画分を用いたウエスタンブロットを行なったところ、SRK 様タンパク質も認識し、SRK に特異的な抗体は作製できなかった。そこで、*B. rapa* SRK を発現する形質転換シロイヌナズナを作製した。*B. rapa* SRK を検出するため、*B. rapa* SRK の C 末端に PA タグを付加した。*B. rapa* S-9 ハプロタイプを含めて、10 *B. rapa* S ハプロタイプに関して、形質転換シロイヌナズナを作製した。作製した形質転換シロイヌナズナを用いて各 S ハプロタイプの *B. rapa* SRK の細胞膜局在率を解析したところ、細胞膜局在率は S ハプロタイプ間で異なっていた。例えば、*B. rapa* SRK9 はほとんどの分子種が細胞膜に局在していたが、自家不和合性程度が低かった E 系統 (S-E ハプロタイプ) の SRK は細胞膜に局在する分子種が検出限界以下であった。また、(1) の結果と比較すると、自家不和合性程度が低かった系統 (S ハプロタイプ) の SRK の細胞膜局在率は低い傾向が見られた。今後、より多くの S ハプロタイプの SRK 細胞膜局在性を解析することや、*B. rapa* の内在性 SRK の細胞膜局在性を解析することで、SRK 細胞膜局在率が自家不和合性程度のバイオマーカーになるか検証していく。

(3) 同じアブラナ科植物であるにも関わらず、*B. rapa* の S 遺伝子を自家和合性のシロイヌナズナに導入しても自家不和合性とはならない。ブラシカ属では自家不和合性に *MLPK* 遺伝子が必要な遺伝子であり、その翻訳産物は SRK と相互作用する膜結合型キナーゼである。しかし、*MLPK* 遺伝子はブラシカ属および近縁種などゲノムが三倍化した種のみにもみられる。そのため、*B. rapa* S 遺伝子がシロイヌナズナで機能できない原因は SRK のキナーゼドメインにあると考え、*B. rapa* SRK のキナーゼドメインをシロイヌナズナ近縁種である *A. lyrata* SRK に置換したキメラ *B. rapa* SRK と *B. rapa* SCR を発現する形質転換シロイヌナズナを作製した。結果、*B. rapa* S-9 ハプロタイプのキメラ SRK と SCR を発現する形質転換シロイヌナズナは自家不和合性となり、*B. rapa* S 遺伝子がシロイヌナズナで機能できない原因は *B. rapa* SRK のキナーゼドメインにあることが明らかとなった (Figure 2)。一方で、キナーゼドメインを置換してもシロイヌナズナに自家不和合性能力を付与できない *B. rapa* S ハプロタイプ (*BrS-29*, *BrS-44*, *BrS-60* ハプロタイプなど) もあり、シロイヌナズナで機能できない原因がキナーゼドメイン以外にもあることが示唆された。

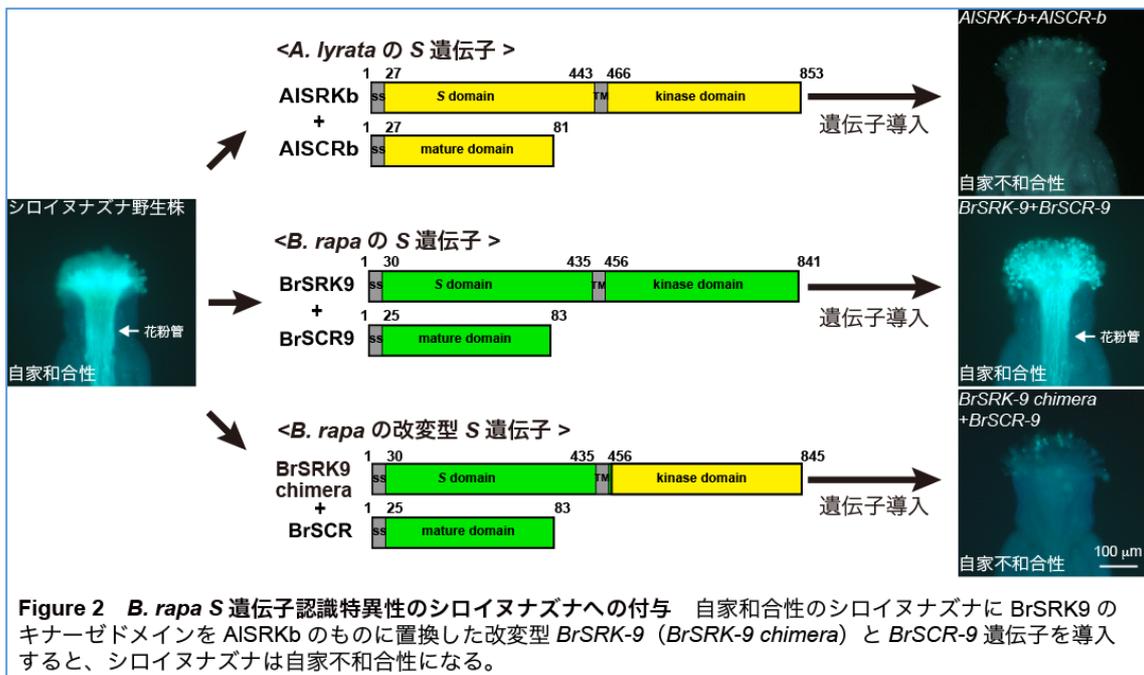


Figure 2 *B. rapa* S 遺伝子認識特異性のシロイヌナズナへの付与 自家和合性のシロイヌナズナに BrSRK9 のキナーゼドメインを AISRKb のものに置換した改変型 *BrSRK-9* (*BrSRK-9 chimera*) と *BrSCR-9* 遺伝子を導入すると、シロイヌナズナは自家不和合性になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Yamamoto Masaya, Kitashiba Hiroyasu, Nishio Takeshi	4. 巻 111
2. 論文標題 Generation of Arabidopsis thaliana transformants showing the self recognition activity of Brassica rapa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 496 ~ 507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15811	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 Yamamoto M., Kitashiba H., Nishio, T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of Arabidopsis thaliana transformants showing the self-recognition activity of Brassica rapa.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 0件）

1. 発表者名 山本雅也、小倉真里奈、北柴大泰
2. 発表標題 Brassica rapa Sホモ系統の自家不和合性程度の解析
3. 学会等名 日本育種学会第142 回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本雅也、大竹章太郎、篠澤章久、城田松之、三井裕樹、北柴大泰
2. 発表標題 AISRkb 受容体ドメインに起きた機能欠損を引き起こす変異の特徴の抽出
3. 学会等名 超分野植物科学研究会 (TDPS) 第 1 回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本雅也、大竹章太郎、篠澤 章久、城田 松之、三井裕樹、北柴大泰
2. 発表標題 AISRKb受容体ドメインに存在する自家不和合性反応に必須なアミノ酸残基の特徴の解析
3. 学会等名 日本育種学会第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 雅也, 大竹 章太郎, 篠澤 章久, 三井 裕樹, 北柴 大泰
2. 発表標題 Error-prone PCR 法を用いて導入した AISRK-b への変異の自家不和合性への影響の解析
3. 学会等名 日本育種学会第 138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本雅也・大竹章太郎・篠澤章久・城田松之・三井裕樹・北柴大泰
2. 発表標題 AISRKbに生じた機能欠損を引き起こす変異のタンパク質合成への影響の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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