

## 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6月4日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21248014

研究課題名（和文） アブラナ科およびナス科植物の自家不和合性の分子機構解明

研究課題名（英文） Molecular studies on the self-incompatibility systems in the Brassicaceae and the Solanaceae

研究代表者

高山 誠司（TAKAYAMA SEIJI）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：70273836

研究成果の概要（和文）：アブラナ科およびナス科植物の自家不和合性の分子機構解明を目的とした。アブラナ科では、主に雌ずい因子（SRK 受容体キナーゼ）による花粉因子（SP11 リガンド）の受容以降の情報伝達系の解明を進め、新たな因子候補の同定や変異株の取得に成功した。ナス科植物では、花粉因子（SLF）が複数の F-box タンパク質群からなることを発見し、これらが非自己の雌ずい因子（S-RNase）を分担して認識するとする「協調的非自己認識モデル」を提唱した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to reveal the molecular mechanisms of self-incompatibility in the Brassicaceae and the Solanaceae. In the Brassicaceae, we have analyzed the downstream signaling cascades after the perception of the pollen determinant (SP11 ligand) by the pistil determinant (SRK receptor kinase), and identified some candidate molecules and some mutants related to the cascades. In the Solanaceae, we have revealed that the pollen determinant comprises multiple types of F-box proteins (SLFs), and proposed the "collaborative non-self recognition model" suggesting that SLFs collectively recognize and detoxify entire suite of non-self S-RNases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
2010年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2011年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
年度			
年度			
総計	36,300,000	10,890,000	47,190,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：情報伝達、植物生殖、自家不和合性、アブラナ科、ナス科

## 1. 研究開始当初の背景

自家不和合性は、植物が自殖（近親交配）を回避し、種の遺伝的多様性を保持していく上で極めて重要な性質である。植物が自己・非自己をいかに識別しているのか、自己の花粉

をいかに選択的に排除するのか、という基礎的課題に答えるため、これまで多くの研究者が機構解明に取り組んできた。

まず、古典的な遺伝学的解析により、自家不和合性の自他識別が S 遺伝子座上のハプロタイプ ( $S_1$ ,  $S_2$ , ...,  $S_n$ ) により制御されて

いることが明らかとなった。すなわち、花粉と雌ずいと同じ *S*ハプロタイプを有する時に「自己」と認識され、何らかの形でその受精が阻害されることが示された。近年、我々を含む複数の研究グループにより、アブラナ科およびナス科植物の *S* 遺伝子座の解明が進められ、各 *S*ハプロタイプは自他識別に関わる花粉因子と雌ずい因子の両者をコードしていることが示されてきた。しかし、両因子の性状は両科で全く異なっており、以下の様に各々独自の自他識別機構を進化させたものと推察されるに至っている。

まず、アブラナ科の植物においては、雌ずい因子は受容体型キナーゼ SRK であり、花粉因子はリガンド様小型タンパク質 SP11 であることが示された。我々は同一 *S*ハプロタイプにコードされる SP11 と SRK が特異的に結合して、SRK が活性化(自己リン酸化)されることを明らかにした。また、自家和合性変異株の解析を通じ、膜アンカー型細胞質キナーゼ MLPK が SRK と共に SP11 に対する受容体複合体を形成している可能性を明らかにした。しかし、SRK/MLPK に伝達された自己花粉の情報、いかにして乳頭細胞内を伝達され、自己花粉の吸水・発芽を阻害するのか、その分子機構の全体像は未解明のまま残されていた。

一方、ナス科植物においては、雌ずい因子は RNA 分解酵素 S-RNase であり、自己花粉に対する細胞毒として機能する可能性が古くから示唆されてきた。一方、花粉因子は、同じ自家不和合性機構を有すると考えられているバラ科・オオバコ科の *S* 遺伝子座の解析から、F-box 蛋白質 SLF である可能性が示唆されてきた。F-box 蛋白質としての一般的性質から類推して、SLF が花粉管に侵入してくる非自己 S-RNase をユビキチン化し解毒するという非自己認識モデルが提唱された。しかし、アブラナ科と逆の非自己の因子を認識するというモデルはコンセンサスが得られず、果たして SLF が多様な非自己の S-RNase を全て認識することが可能かどうか疑問視されていた。

この様に、アブラナ科およびナス科植物の自家不和合性に関しては、*S* 遺伝子座の解析から自他識別に関わる花粉因子および雌ずい因子候補が見出されてきていたが、両者において認識分子の性状や推定される認識機構は全く異なっており、実際の自己花粉排除に至る分子機構は未解明の状態であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、アブラナ科およびナス科植物を対象に、これまで明らかにされてきた花粉因子および雌ずい因子を手掛かりに、これら植物の自家不和合性機構を分子レベルで解

明することを目的とした。アブラナ科植物においては、受容体キナーゼ SRK を介した花粉リガンド SP11 の受容から、自己花粉の吸水・発芽阻害に至るまでの乳頭細胞内の情報伝達経路の解明を中心課題とした。ナス科植物においては、花粉因子 SLF 類の網羅的機能解析と雌ずい因子 S-RNase との相互作用の解明を中心課題とした。

## 3. 研究の方法

アブラナ科の日本ナタネ *Brassica rapa* およびシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana*、ナス科の相互交配可能な 3 種のペチュニア *Petunia hybrida*, *Petunia inflata* および *Petunia axillaris* を実験材料として、主に以下の項目について研究を実施した。

### (1) アブラナ科植物の自家不和合性機構

- ①SRK 受容体の活性化機構の解明
- ②シロイヌナズナの自家和合性の原因解明
- ③SRK の下流で機能する因子の探索
- ④SRK 下流因子の遺伝学的探索
- ⑤*S*ハプロタイプ間の優劣性制御機構の解明
- ⑥受粉時の乳頭細胞内の生理的変化の解析

### (2) ナス科植物の自家不和合性機構

- ①S-RNase と SLF の塩基配列の比較解析
- ②花粉因子候補 SLF 群の網羅的探索
- ③SLFs と雌ずい因子 S-RNase との相互作用

## 4. 研究成果

### (1) アブラナ科植物の自家不和合性機構

①SRK 受容体の活性化機構の解明  
SRK のキナーゼ領域のリコンビナントタンパク質を大腸菌を用いて作製し、*in vitro* 条件下における自己リン酸化残基を質量分析計を用いて複数同定した。この同定された Ser/Thr 残基を Ala など他のアミノ酸残基に置換した変異型 SRK を以下に述べるシロイヌナズナの雌ずいに発現させたが、いずれも自己 SP11 による自己花粉の情報を乳頭細胞内に伝達し、異常を示さなかった。今回用いた *in vitro* 系では SRK の重要なリン酸化標的部を同定出来ていない可能性、情報伝達に必須のリン酸化残基に冗長性がある可能性などが示唆された。

### ②シロイヌナズナの自家和合性の原因解明

チューリッヒ大学の清水博士らとの共同研究において、欧州に自生するシロイヌナズナが、*SP11* 遺伝子上に起きた変異(逆位)を契機に自家和合性に変化したことを明らかにした。また、この変異を修復した *SP11* を導入したシロイヌナズナが自家不和合性を再獲得することを示し、*S* 遺伝子座以外の自家不和合性の情報伝達系を保持していること

を確認した。

### ③SRKの下流で機能する因子の探索

S遺伝子座の導入により作製した自家不和合性シロイヌナズナを利用し、和合・不和合受粉時に雌ずい表層の乳頭細胞内で発現する遺伝子類をマイクロディセクション-マイクロアレイ法により探索した。いずれの受粉過程でも発現上昇する多数の遺伝子類に加え、両受粉過程で異なる発現パターンを示す複数の遺伝子類を見出した。

### ④SRK下流因子の遺伝学的探索

東北大学との共同研究により、自家和合性の日本ナタネの自然変異株を解析し、未知の遺伝子座領域に原因遺伝子を持つ株を複数取得した。さらに、上記自家不和合性シロイヌナズナを変異源処理し、自家和合性に変化した復帰突然変異株を複数取得した。今後これらの変異遺伝子の解明を進めることで、自家不和合性の情報伝達機構の理解が進むものと期待される。

### ⑤Sハプロタイプ間の優劣性制御機構の解明

本科植物では花粉因子 SP11 が孢子体の葯タペート組織で生合成されるため、自他識別における花粉の表現型は、2つの SP11 複対立遺伝子間の優劣性関係によって最終決定される。SP11 対立遺伝子間の優劣性制御の分子機構について解析したところ、劣性側 SP11 対立遺伝子のプロモーター領域が、優性側 SP11 対立遺伝子近傍の逆位反復配列に由来する低分子RNAによってメチル化修飾を受け、発現が抑制されていることを発見した。

### ⑥受粉時の乳頭細胞内の生理的変化の解析

乳頭細胞内に Ca<sup>2+</sup>センサーであるイエローカメレオンを発現させた系を利用し、和合・不和合受粉時に Ca<sup>2+</sup>が異なる挙動を示すことを発見した。Ca<sup>2+</sup>が自己・非自己花粉の情報を乳頭細胞内に伝達するセカンドメッセンジャーとして機能し、初期受粉過程をコントロールしている可能性が示唆された。

## (2)ナス科植物の自家不和合性機構

### ①S-RNaseとSLFの塩基配列の比較解析

ナス科植物ペチュニアの9個のSハプロタイプからS-RNaseとSLFを取得し塩基配列を比較したところ、異なるS-RNaseを持つ2つのSハプロタイプが、100%同一のSLFを持つ場合があることを発見した。これら2つのSハプロタイプは異なる自他識別特異性を示すことが確認され、SLFを唯一の花粉因子と仮定するとこれらSハプロタイプ間の認識特異性を説明出来ないことが示された。

### ②花粉因子候補SLF群の網羅的探索

最初に同定されたSLF以外にも花粉因子として機能する分子が存在することを予測し、花粉で発現するSLF様因子を網羅的に再検索した。その結果、少なくとも6種類のS遺伝子座に連鎖するSLF様因子(SLFs)が花粉で

特異的に発現していることを見出した。形質転換の手法を用い、これらの内の3種類のSLFsについて花粉因子としての機能を解析したところ、各々が一部の非自己SハプロタイプのS-RNaseを解毒する能力を保持していることが示された。

### ③SLFsと雌ずい因子S-RNaseとの相互作用

標識を付加したSLFを花粉で発現させ、雌ずい抽出物と混合して共沈させたところ、各々のSLFは解毒効果を示す特定の非自己S-RNaseとのみ特異的に結合することが確認された。また、花粉内でSLFがE3ユビキチンリガー様の複合体を構成していることも示された。上記機能解析結果と合わせて、SLFsが分担して全ての非自己S-RNaseを認識し解毒するとする「協調的自他認識」モデルを新たに提唱した。

## 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12件)

① Iwano, M., and Takayama, S. Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 78-83, 2012, 査読有

② Shiba, H., and Takayama, S. Epigenetic regulation of monoallelic gene expression. *Develop. Growth Differ.* 54, 120-128, 2012, 査読有

③ Tarutani, Y., and Takayama, S. Monoallelic gene expression and its mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 608-613, 2011, 査読有

④ Kubo, K., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A.M., Hua, Z., Toyoda, M., Kawashima, S., Ando, T., Isogai, A., Kao, T.-h., and Takayama, S. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science* 330, 796-799, 2010, 査読有

⑤ Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. *Trans*-acting small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility. *Nature* 466, 983-986, 2010, 査読有

⑥ Tsuchimatsu, T., Suwabe, K., Shimizu-Inatsugi, R., Isokawa, S., Pavlidis, P., Städler, T., Suzuki, G., Takayama, S., Watanabe, M., and Shimizu, K.K. Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male

specificity gene. Nature 464, 1342-1346, 2010, 査読有

⑦ Isokawa, S., Osaka, M., Shirasawa, A., Kikuta, R., Komatsu, S., Horisaki, A., Niikura, S., Takada, Y., Shiba, H., Isogai, A., Takayama, S., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. Novel self-compatible lines of *Brassica rapa* L. isolated from the Japanese bulk-populations. Genes Genet. Syst. 85, 87-96, 2010, 査読有

⑧ Iwano, M., Entani, T., Shiba, H., Kakita, M., Nagai, T., Miyawaki, A., Shoji, T., Kubo, K., Isogai, A., and Takayama, S. Fine-tuning of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration is essential for pollen tube growth. Plant Physiol. 150, 1-13, 2009, 査読有

[学会発表] (計5 2件)

① Tarutani, Y., Miura, E., Shiba, H., and Takayama, S. Noncoding RNA and epigenetics in self, non-self recognition in fertilization. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Nuclear Events in Plant Gene Expression and Signaling", 2012.3.10, Taos, USA

② Iwano, M., Ito, K., and Takayama, S. Molecular mechanisms of self-incompatibility in Brassicaceae. 22nd International Congress of Sexual Plant Reproduction, 2012.2.14, Melbourne, Australia

③ Shiba, H., Tarutani, Y., Miura, E., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. Epigenetic regulation of dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility alleles. Workshop in The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2011.12.13, Yokohama

④ Kubo, K., Entani, T., and Takayama, S. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Joint Conference (SOL & ICuGI 2011), 2011.11.30, Kobe

⑤ Takayama, S. Self/non-self discrimination in plant self-incompatibility. NAIST Global COE International Symposium "Achievements and Future", 2011.11.08, Nara

⑥ Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. Regulation of dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility alleles. Cold Spring

Harbor Asia Conference, 2010.10.27, Suzhou, China

⑦ Takayama, S. Molecular mechanisms of self-incompatibility in the Brassicaceae. XXI International Congress on Sexual Plant Reproduction (21st ICSPR), 2010.8.5, Bristol, UK

⑧ Kubo, K., Entani, T., Takara, A., Isogai, A., Kao, T.-h., and Takayama, S. Analysis of S-locus F-box genes in *Petunia*. XXI International Congress on Sexual Plant Reproduction (21st ICSPR), 2010.8.5, Bristol, UK

⑨ Shiba, H., Kayabe, T., Yano, K., Yazaki, J., Chen, H., Suzuki, Y., Fujita, M., Kurata, N., Isogai, A., Ecker, J.R., and Takayama, S. Genome-wide analyses of allele-specific expression and DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. 21st International Conference on *Arabidopsis* Research, 2010.06.8, Yokohama

⑩ Takayama, S. Self-incompatibility signaling in the Brassicaceae. International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction - from pollination to fertilization -, 2010.03.11, Nara

⑪ Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. Regulation of dominance relationships between self-incompatibility alleles in *Brassica* via de novo DNA methylation. International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction - from pollination to fertilization -, 2010.03.11, Nara

⑫ Kubo, K., Entani, T., Kawashima, S., Watanabe, H., Ando, T., Kao, T.-h., Isogai, A., and Takayama, S. Analysis of the self-incompatibility mechanisms in *Petunia*. International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction - from pollination to fertilization -, 2010.03.11, Nara

⑬ Tsuchimatsu, T., Suwabe, K., Shimizu-Inatsugi, R., Isokawa, S., Pavlidis, P., Stadler, T., Suzuki, G., Takayama, S., Watanabe, M., and Shimizu, K.K. Evolution of breeding systems in *Arabidopsis* relatives. International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction - from pollination to fertilization -, 2010.03.11, Nara

⑭ Takada, Y., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A., and Watanabe, M. Unilateral incompatibility in *Brassica rapa* leading to a novel pollen-stigma

recognition mechanism. International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction - from pollination to fertilization -, 2010.03.11, Nara

⑮Osaka, M., Isokawa, S., Shirasawa, A., Kikuta, R., Komatsu, S., Niikura, S., Takada, Y., Shiba, H., Isogai, A., Takayama, S., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. Novel self-compatible lines of *Brassica rapa* L. isolated from the Japanese bulk-populations. International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction - from pollination to fertilization -, 2010.03.11, Nara

⑯ Takayama, S. Self-incompatibility signaling in the Brassicaceae. 9th International Plant Molecular Biology Congress (IPMB), 2009.10.28, St. Louis, USA

⑰Iwano, M., Isogai, A., and Takayama, S. Fine tuning of the cytoplasmic calcium concentration is essential for pollen tube growth. 9th International Plant Molecular Biology Congress (IPMB), 2009.10.28, St. Louis, USA

⑱ Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. Regulation of dominance relationships between self-incompatibility alleles via *de novo* DNA methylation. 9th International Plant Molecular Biology Congress (IPMB), 2009.10.28, St. Louis, USA

⑲ Iwano, M., Matoba, K., Hasegawa, T., Takaoka, A., Isogai, A., and Takayama, S. Three dimensional analysis of the vacuolar structure in papilla cells during self- and cross-pollination in Brassicaceae. 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology 2009, 2009.07.17, Kobe

⑳ Nagai, R., Iwano, M., Kajimura, N., Hasegawa, T., Takaoka, A., Isogai, A., and Takayama, S. Three-dimensional analysis of intracellular organelles in a papilla cell of *Brassica rapa*. 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology 2009, 2009.07.17, Kobe

㉑Suwabe, K., Isokawa, S., Shirasawa, A., Takada, Y., Suzuki, G., Isogai, A., Takayama S., and Watanabe, M. Genetic characterization of self-compatible mutants in *Brassica rapa*. Plant Biology 2009, 2009.07.17, Hawaii, USA

㉒ Takada, Y., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A., and Watanabe, M.

Unilateral incompatibility in *Brassica rapa* lead to a novel pollen-stigma recognition mechanism. Plant Biology 2009, 2009.07.17, Hawaii, USA

〔図書〕 (計2件)

①Nakayama, P., Isogai, A., and Takayama, S. Self-incompatibility systems in flowering plants. In "Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives: Volume 1" (Edited by Pua, E.C., and Davey, M.R.), Springer, Heidelberg, Germany. 459-485, 2009

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページアドレス

<http://bsw3.naist.jp/takayama/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高山 誠司 (TAKAYAMA SEIJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：70273836

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

平野 良憲 (HIRANO YOSHINORI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50452529

前島 正義 (MAESHIMA MASAYOSHI)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：80181577

永井 健治 (NAGAI TAKEHARU)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：20311350

中園 幹生 (NAKAZONO MIKIO)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：70282697

倉田 のり (KURATA NORI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：90178088