

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380018

研究課題名(和文)ニホンナシ自家不和合性における花粉側S特異性の新展開

研究課題名(英文)Development of pollen S-specificity in self-incompatibility in Japanese pear

研究代表者

安田 剛志(高崎剛志)(TAKASAKI-YASUDA, TAKESHI)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30314511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：ニホンナシの自家不和合性はSハプロタイプにコードされる雌ずい側因子であるS-RNaseと花粉側因子であるF-boxタンパク質(PpSFBB)群により制御される。本研究では、S-RNase 周辺領域のBACコンティグを拡張し、S2には少なくとも17種類のPpSFBB2がコードされていた。各種類のホモログはハプロタイプ間で89%以上の同一性を示したことから、花粉側S特異性は「協調的非自己S-RNase認識モデル」で説明できることが示唆された。また、免疫電子顕微鏡観察によりS-RNaseはエンドサイトーシスにより和合・不和合花粉管に取り込まれた後、エンドゾームを介して輸送されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Self-incompatibility in Japanese pear is controlled by S-haplotype at the S-locus, which code a pistil S determinant, S-RNase, and pollen S determinants, S-locus F-box brothers (PpSFBBs). In this study, we expanded BAC contigs around S-RNase to find at least 17 PpSFBB2s coded by S2-haplotype. PpSFBB2 homologs cloned from pollen of S homozygous lines had high identity between haplotypes, which predicts that the collaborative non-self S-RNase recognition model in Solanaceae species fits the S-RNase-based SI systems in the Japanese pear. Using the immune microscopy, we confirmed endocytic uptake of S-RNase into pollen tube, and subsequent trafficking via endosomes.

研究分野：農学

キーワード：自家不和合性 ナシ 果樹園芸学 分子遺伝学 細胞組織学

1. 研究開始当初の背景

ニホンナシの自家不和合性における雌ずいと花粉間の自他認識反応は *S* 遺伝子座上の *S* ハプロタイプにコードされる雌ずい側と花粉側因子の相互作用によって起こる。雌ずい側因子である *S*-RNase は和合・不和合花粉管に取り込まれ、自己 *S*-RNase は不和合花粉管の rRNA を分解し、花粉管伸長を停止させると考えられている。我々は花粉側因子を同定するため、*S*-RNase 近傍の BAC コンティグを構築し、花粉側因子候補となる F-box タンパク質遺伝子(*PpSFBB*)がクラスターを形成していることを見出した。これまでに *PpSFBB* は *S2*-RNase 周辺に 10 種類、*S4*-RNase 周辺に 6 種類、*S3*-RNase 周辺に 2 種類見出され、これら *PpSFBB* 群が分担して非自己 *S*-RNase をユビキチン化し、26S プロテアソームを介して分解に導いていると推測している (Okada et al. 2011)。

ニホンナシと同じ *S*-RNase 型自家不和合性を持つナス科植物のペチュニアでは、複数の F-box タンパク質遺伝子 (SLF) が分担して非自己 *S*-RNase を認識していたことから、「協調的非自己 *S*-RNase 認識モデル」が提案されている (Kubo et al. 2010)。一方で、細胞組織学的解析から花粉管に取り込まれた *S*-RNase は液胞に隔離された後、不和合反応により液胞から放出されることから、「*S*-RNase 液胞隔離モデル」が提案されている (Goldraji et al. 2006)。これらモデルがニホンナシに対して適応できるかは不明である。

2. 研究の目的

ニホンナシの *S*-RNase 周辺領域の BAC コンティグの拡張により、*S* ハプロタイプにコードされる *PpSFBB* の種類を掌握するとともに、他の *S* ホモ花粉から *PpSFBB* をクローニングし、それら *PpSFBB* 群の推定アミノ酸配列を比較・分類することで、各 *PpSFBB* の *S*-RNase に対する認識特異性を推測することを目的とする。一方で、*S*-RNase と自家不和合性に関与しない non-*S*-RNase の花粉管への取り込み、および花粉管内挙動を(免疫)電子顕微鏡観察することで、これら RNase が和合性花粉管の液胞に隔離されているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *S* 遺伝子座のゲノム構造解析

BAC クローンの末端配列から設計したプライマーセットを用いて‘長十郎’(*S2S3*)と *S4* ホモ系統の BAC ライブラリーをスクリーニングすることで染色体歩行を行い、*S2*-と *S4*-RNase 周辺領域の BAC コンティグを拡張した。*PpSFBB* をプローブとしたサザンブロット解析によりコンティグ上の *PpSFBB* 様配列の有無を確認した後、BAC クローン上の *PpSFBB* の塩基配列を決定した。

(2) *PpSFBB* 群の RT-PCR クローニング

PpSFBB の非翻訳領域と翻訳領域から *PpSFBB* の全長および部分配列を特異的に増幅するプライマーセットを設計した。これらプライマーセットを用いた PCR により、*S1*~*S9* ホモ系統の花粉 cDNA から *PpSFBB* 様配列を増幅し、塩基配列を解析して推定アミノ酸配列を比較した。

(3) 組織学的解析

ニホンナシ品種と *S* ホモ系統の未受粉の花柱、および和合・不和合受粉した花柱を供試試料とし、蛍光顕微鏡と透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。電子顕微鏡試料は常法により固定・包埋し、花柱縦断面の超薄切片を作製して TEM 観察した。*S*-と non-*S*-RNase の局在は、これら RNase 抗体と金コロイド標識 IgG 抗体を反応させた切片を TEM 観察し、調べた。検出された金コロイドの密度 (粒子数/ μm^2) を算出し、RNase 量を定量化した。

(4) *S*-RNase のユビキチン化解析

S ホモ系統の未受粉、自家受粉、他家受粉した花柱から粗タンパク質を抽出し、抗 *S3*-RNase 抗体、抗 non-*S*-RNase 抗体、ユビキチン抗体を用いてイムノブロット解析を行った。

4. 研究成果

(1) *S* 遺伝子座のゲノム構造解析

染色体歩行により *S2*-RNase 周辺領域の BAC コンティグは上流約 530kb と下流約 500kb まで拡張された。上流拡張域に 5 種類の *PpSFBB2*-u6~11 が、下流拡張域に 2 種類の *PpSFBB2*-d6~7 が新たに見出された。

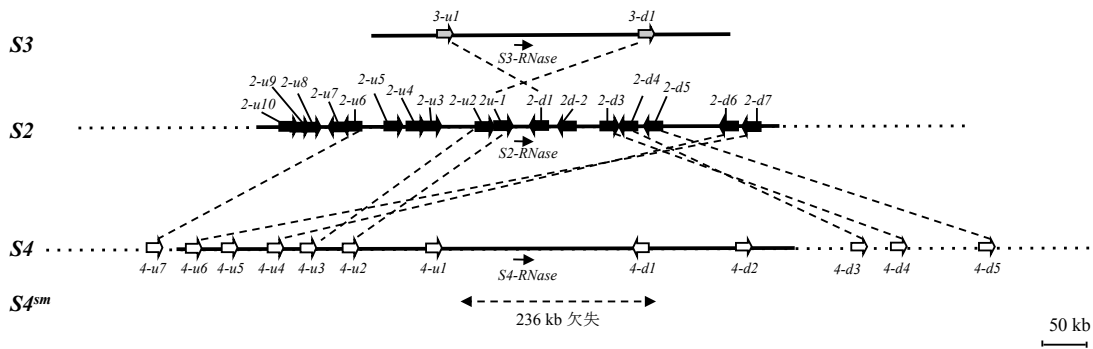


図 1. *S2*-, *S3*-と *S4*-*RNase* (←→) 周辺領域の BAC コンテイング上の *PpSFBB* 群 (■) *PpSFBB* を *S*-*RNase* の上流域 (upstream) と下流域 (downstream) に分け、*S*-*RNase* の近傍から 1, 2, 3 · · · とそれぞれ名付けた. 89% 以上の高い同一性を示す (同じ *S*-*RNase* 認識特異性を有すると推測される) *PpSFBB* を点線で結んだ. *S4sm* における欠失領域を ◀---▶ で示した.

PpSFBB をプローブとしたサザンブロット解析の結果、上流 280kb と下流 374kb より外側の BAC クローンには *PpSFBB* 様配列は検出されなかったことから、*S2* ハプロタイプは 17 種類の *PpSFBB2* をコードすることが明らかになった。一方、*S4*-*RNase* 周辺領域の BAC コンテイングは上流約 544kb と下流 654kb まで拡張された。上流拡張域に 3 種類の *PpSFBB4*-u5~8 が、下流拡張域に 3 種類の *PpSFBB4*-d3~5 が新たに見出された。*S4* ハプロタイプには少なくとも 12 個の *PpSFBB4* をコードしていると考えられた。*PpSFBB2* と 4 群の推定アミノ酸配列を比較し、両群間で 8 種類の *PpSFBB* がアミノ酸レベルで 89% 以上の高い同一性を示した (図 1)。

(2) *PpSFBB* ホモログのクローニング

S2-*RNase* 上流の *PpSFBB2*-u1~u6、下流の *PpSFBB2*-d1~d6 に対する特異的プライマーセットを作成した。12 種類の *PpSFBB2* のホモログを *S1*~*S9* ホモ系統の花粉から RT-PCR によりクローニングし、推定アミノ酸配列を比較した。同じプライマーセットで増幅されたホモログ群はハプロタイプ間で 89% 以上の同一性を示し、多型性に乏しかった。従って、ニホンナシの花粉側 *S* 特異性も「協調的非自己 *S*-*RNase* 認識モデル」で説明できることが示唆された。

「協調的非自己 *S*-*RNase* 認識モデル」では、各ハプロタイプは自己 *S*-*RNase* をユビキチン化する *PpSFBB* を持っていない。12 種類の *PpSFBB2* の内、6 種類は全ての *S* ホモ花粉からホモログが増幅されたことから、これらホモログ群は *S1*~*S9*-*RNase* 以外の *S*-*RNase* を認識している可能性があるとして推測された。

残りの 6 種類の *PpSFBB2* に関してはホモログが複数の *S* ホモ花粉から増幅されず、これらホモログの *S*-*RNase* に対する認識特異性を推定するには至っていない。

‘二十世紀’ (*S2S4*) の枝変わり、自家和合になった ‘おさ二十世紀’ (*S2S4sm*) の *S4sm* は *S4*-*RNase* と *PpSFBB4*-d1 を含む 236kb を欠失している (Okada et al. 2011)。*S4sm* ホモ花粉は *S1* を持つ雌ずいに拒絶されることから、*PpSFBB4*-d1 は *S1*-*RNase* を認識すると推測されている (Saito et al. 2012)。しかし、*PpSFBB4*-d1 のホモログは *PpSFBB2* 群中には存在せず、*PpSFBB4*-d1 特異的プライマーセットを用いた RT-PCR でもホモログは 2 つの *S* ホモ花粉からしか増幅されなかった。*PpSFBB4*-d1 が *S1*-*RNase* を認識することを裏付けることはまだできていない。

(3) 組織学的解析

開花 10 日前~開花日までの蕾と花から採取した柱頭・花柱に対して免疫電顕観察を行い、金コロイド密度から *S*-*RNase* と自家不和合性に関与しない non-*S*-*RNase* の量的変化を調べ、これら合成・分泌過程を明らかにした。*S*-と non-*S*-*RNase* は開花 1~2 日前の乳頭細胞、柱頭分泌細胞と花粉管誘導細胞で最も多く合成・分泌されていた。ニホンナシの柱頭表面は開花時に浸出液で覆われ、受粉した花粉は浸出液を吸収して発芽し、花粉管を伸長させる。*S*-と non-*S*-*RNase* は柱頭浸出液中にも検出され、このことはイムノブロット解析でも確認された。よって、*S*-*RNase* は花粉発芽後に花粉管に取り込まれ、自家不和合性反応は受粉後早い段階で始まると推測された。

そこで、和合・不和合受粉 30、60、90 分、

2、3 時間後における花粉の発芽率と花粉管長を蛍光顕微鏡で調査した。和合花粉は受粉後 60 分で発芽したのに対し、不和合花粉の発芽は受粉 90 分後なになってから発芽した。しかし、その後急速に伸長し、受粉 3 時間後には和合・不和合花粉管長の間には有意な差は認められなかった。

受粉 3 時間後の花粉管先端部を免疫 TEM 観察したところ、S-RNase は和合・不和合花粉管にエンドサイトーシスにより取り込まれていた。S-RNase は細胞質に均一に分布し、エンドゾーム内にも局在していたが、液胞内に特に大量に検出されることはなかった。和合・不和合花粉管の微細構造に差異は認められなかったことから、不和合花粉は発芽遅延するが、受粉後 3 時間までは不和合反応を生じていないと判断された。また、non-S-RNase の和合・不和合花粉管への取り込みも確認され、S-RNase と同様の分布を示した。

受粉後 3、6、12 時間の和合・不和合花粉管先端部を(免疫)TEM 観察した。受粉 6 時間後の不和合花粉管のミトコンドリアは膨張し、内部クリステ構造が破壊していた。不和合花粉管の微細構造の崩壊は受粉 6 時間後から始まると推察された。花粉管内の S-RNase 量 (金コロイド密度)は、不和合花粉管では受粉後 3 時間から増加したのに対し、和合花粉管では受粉後 3 時間以降もほぼ一定量に維持されていた。

これらの結果から、S-および non-S-RNase は発芽直後に不和合・和合花粉管にエンドサイトーシスを介して取り込まれ、エンドゾームに被覆されて花粉管内を輸送されることが明らかになった。その後、非自己 S-RNase と non-S-RNase は分解または隔離されていると推察されるが、液胞内容物を固定することを難しく、「S-RNase 液胞隔離モデル」を支持できるデータはこれまでのところ得られていない。

(4) S-RNase のユビキチン化解析

和合受粉した花柱を抗 S-RNase と抗ユビキチン抗体を用いたイムノブロット解析した。検出感度を高める方法非自己 S-RNase のユビキチン化を示す明瞭なバンドを検出することは出来なかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Takasaki-Yasuda, T., Nomura, N., Moriya, Y., Okada, K., Iwanami, H. and Bessho, H. (2013) Cloning an *S-RNase* allele, including the longest intron, from cultivars of European pear (*Pyrus communis* L.). *J. Hortic. Sci. Biotech.* 88: 427-432. 査読有り.
- ② Takasaki-Yasuda, T., Nomura, N., Moriya, Y., Okada, K., Iwanami, H. and Bessho, H. (2013) *S-RNase*-based genotyping of triploid cultivars of European pear (*Pyrus communis* L.) *J. Hortic. Sci. Biotech.* 88: 751-755. 査読有り.
- ③ Saito, T., Sato, Y., Sawamura, Y., Shoda, M., Takasaki-Yasuda, T. and Kotobuki, K. (2012) Dual recognition of S_1 and S_4 pistils by S_4^{sm} pollen in self-incompatibility of Japanese pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai) *Tree Genetics & Genomes*, 8: 689-694. (DOI 10.1007/s11295-011-0456-5) 査読有り.
- ④ Okada, K., Tonaka, N., Taguchi, T., Ichikawa, T., Sawamura, Y., Nakanishi, T. and Takasaki-Yasuda, T. (2011) Related polymorphic F-box protein genes between haplotypes clustering in the BAC contig sequences around *S-RNase* of Japanese pear. *J. Exp. Bot.* 62: 1887-1902. (DOI:10.1093/jxb/erq381) 査読有り.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 時安美奈・李麗怡・岡村彩葉・藤本龍・安田(高崎)剛志、ニホンナシ non-S-RNase の花柱組織における蓄積と花粉管への取り込み、2014.9.28、園芸学会平成 26 年度秋季大会 佐賀大学(佐賀県)
- ② 李麗怡・時安美奈・藤本龍・安田(高崎)剛志、ニホンナシ和合・不和合花粉管への S-RNase の取り込み 2014.9.28、園芸学会平成 26 年度秋季大会 佐賀大学(佐賀県)
- ③ 安藤肇・山下翔人・藤本龍・安田(高崎)剛志、ニホンナシ *S4-RNase* 周辺 BAC コンティグの拡張による PpSFBB 遺伝子群の探索、2014.9.28、園芸学会平成 26 年度秋季大会 佐賀大学(佐賀県)
- ④ 西村遼太郎・今村剛士・加藤大貴・藤本龍・安田(高崎)剛志、ニホンナシ S ホモ系統の花粉 cDNA からの PpSFBB2 ホモログのクローニング、2014.9.28、園芸学会平成 26 年度秋季大会 佐賀大学(佐賀県)
- ⑤ 岡田和馬・市川雄彦・安田(高崎)剛志 ニホンナシ *S4-RNase* 周辺 BAC コンティグの拡張による新規 PpSFBB4 遺伝子の探索、2013. 3. 23、園芸学会平成 25 年度春季大会

東京農工大学（東京都）

- ⑥ 李麗怡・時安美奈・朴杓允・安田（高崎）剛志、ニホンナシにおける自家・他家受粉後の花粉管微細構造の変化、2013.9.20、園芸学会平成 25 年度秋季大会、岩手大学（岩手県）
- ⑦ 藤田裕樹・ズムラット クルバン・齋藤寿広・安田（高崎）剛志、S2-RNase 周辺 BAC コンティグの拡張による PpSFBB 遺伝子群の探索 II、2013.9.20、園芸学会平成 25 年度秋季大会、岩手大学（岩手県）
- ⑧ 岡村彩葉・李リ怡・石水毅・安田（高崎）剛志、ニホンナシ花柱組織の発育に伴う S-RNase の蓄積、2012.9.23、園芸学会平成 24 年度秋季大会、福井県立大学（福井県）
- ⑨ 藤田裕樹・安田（高崎）剛志、S2-RNase 周辺 BAC コンティグの拡張による PpSFBB 遺伝子群の探索、2012.9.23、園芸学会平成 24 年度秋季大会、福井県立大学（福井県）
- ⑩ 岡村彩葉・柏木由夏・李リ怡・朴杓允・安田（高崎）剛志、ニホンナシ花柱組織の発育に伴う微細構造の変化、2011.9.25、園芸学会平成 23 年度秋季大会、岡山大学（岡山県）
- ⑪ 木村穰・太田文清・石水毅・安田（高崎）剛志、ニホンナシの柱頭浸出液中にも S-RNase が含まれている、2011.9.25、園芸学会平成 23 年度秋季大会、岡山大学（岡山県）
- ⑫ 山下翔人・安田（高崎）剛志、ニホンナシにおける不和合花粉の発芽伸長は和合花粉に比べ遅延する、2011.9.25、園芸学会平成 23 年度秋季大会、岡山大学（岡山県）
- ⑬ 野村直希・田中（守谷）友紀・安田（高崎）剛志、セイヨウナシ数品種からの新規 Sx-RNase のクローニング、2011.9.25、園芸学会平成 23 年度秋季大会、岡山大学（岡山県）

〔図書〕（計 2 件）

- ① 安田（高崎）剛志・田村文男、文英堂、果樹園芸学 第 5 章ナシ、2015、125-158
- ② 安田（高崎）剛志・中西テツ、文英堂、果樹園芸学 第 10 章果樹園芸学の発展に多大な貢献をした人々、2015、295-296

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田（高崎）剛志
(TAKASAKI-YASUDA, Takeshi)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：30314511

(2) 研究分担者

石水 毅 (ISHIMIZU, Takeshi)
立命館大学・生命科学部・准教授
研究者番号：30314355
(平成 23～25 年度まで分担者)

(3) 連携研究者

石水 毅 (ISHIMIZU, Takeshi)
立命館大学・生命科学部・准教授
研究者番号：30314355
(平成 26 年度)