

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25252021

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 mechanisms of self-incompatibility 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,800,000円

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。アブラナ科は、花粉SP11リガンドと雌ずいSRKリセプターとの「自己」特異的な結合を介して自己を認識している。今回SRK下流で、雌ずい細胞内にグルタミン酸受容体を介したCa²⁺の流入が起き、これにより自己花粉の発芽が阻害されていることを明らかにした。ナス科では、雌ずいの細胞毒(S-RNase)と花粉F-box蛋白質(SLFs)との「自己」特異的な非相互作用により自己花粉を排除している。今回ペチュニアで18種類のSLFsがSCF複合体を形成し、協調的に全ての非自己S-RNaseを無毒化していることを明らかにした。

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, SI is mediated by a "self (= same S-haplotype)" specific interaction between pollen ligand (SP11) and its stigmatic receptor (SRK). We found that calcium signaling mediated by glutamate receptor is the major downstream event of SI signaling that triggers rejection of self-pollen. In the Solanaceae, SI is mediated by the absence of "self" specific interaction between style ribonuclease (S-RNase) and pollen F-box proteins (SLFs). S-RNase exerts cytotoxicity inside self-pollen tube to inhibit its growth. We found in Petunia that 18 types of SLFs form SCF E3 ubiquitin ligase complexes and collaboratively recognize and detoxify entire suite of "non-self" S-RNases.

研究分野：細胞間情報学

キーワード：植物 シグナル伝達 細胞間認識 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するために極めて重要な性質である。また、F₁種子生産の際に利用されるなど農業上の重要形質でもある。このため、植物がいかにして自己・非自己の花粉を識別しているのか、自己の花粉をいかに選択的に排除しているか、という課題に答えるために多くの研究が行われてきた。まず古典的な遺伝学的解析により、自家不和合性における自己識別の多くが、S 遺伝子座上のハプロタイプ(S₁, S₂, ..., S_n)により制御されていることが示された。すなわち、受粉の際、同じ S ハプロタイプを持つ花粉と雌ずいが会すると不和合となり、異なれば和合となることが示された。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 ハプロタイプは自己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た。しかし、以下に示す様に、両因子の性状は両科植物で全く異なっており、各々独自の自己識別機構を進化させてきたことが示されてきている。

(1) アブラナ科植物の自家不和合性

本科植物の花粉因子はリガンド様蛋白質(SPI1)であり、雌ずい因子は受容体型キナーゼ(SRK)である。我々は、雌ずい乳頭細胞膜上の SRK が、自己(=同じ S ハプロタイプ)の SPI1 と特異的に結合することで活性化(自己リン酸化)し、乳頭細胞に不和合反応を誘起し、自己花粉の吸水・発芽を阻害していることを明らかにしてきた。しかし、自己花粉の排除に至るまでの SRK 下流の情報伝達系はほとんど解明が進んでいなかった。唯一カナダのグループが、SRK/MLPK により ARC1 というユビキチンリガーゼが活性化され、これが小胞輸送に関わる Exo70A1 の分解を促進するために花粉への物質供給が停止するという独自のモデルを提唱したが、これら因子の関与を否定する報告も出され、コンセンサスを得るには至っていなかった。

こうした中、我々は研究開始時において、自家不和合性を付与したモデル植物 *Arabidopsis thaliana* を利用することで、乳頭細胞内の Ca²⁺ が自家受粉時に特異的に上昇することを発見し、情報伝達経路解明にむけた新たな手掛かりを得た状況にあった。

その他の情報伝達系解明につながる可能性のある手掛かりとして、自家不和合性が高濃度 CO₂ ガス処理により打破されることが古くから知られてきた。実際この方法は、F₁ 育種に用いる純系(近交系)の自殖種子生産において利用されてきたが、何故自家不和合性が打破されるのか、その理由は全く不明の状態であった。

(2) ナス科植物の自家不和合性

本科植物では、雌ずい因子はリボヌクレアーゼ(S-RNase)であり、自己花粉の RNA を分解する「細胞毒」として機能していることが

古くから示されてきた。しかし、花粉因子の実体が不明であり、何故 S-RNase により非自己の花粉内の RNA が分解されないのかは長年の謎であった。

こうした中、我々は研究開始時において、ペチュニアの S 遺伝子座上に 6 種類以上の F-box 蛋白質群(SLFs)がコードされていることを発見すると共に、これらが、特定の非自己の S-RNase を解毒する作用を持つ証拠を形質転換実験により得ていた。すなわち、SLFs が分担してすべての非自己 S-RNase を認識し解毒するという「協調的非自己認識モデル」を世界に先駆けて提唱した時期にあった。しかし、SLFs が一体何分子存在するのかは不明であり、S-RNase の非自己特異的なユビキチン化も実証されておらず、SLF が形成すると予想された SCF 複合体の構成因子も未解明であった。また、他家花粉中で S-RNase が液胞状の構造体の中に隔離されているという観察結果も報告されており、S-RNase の解毒機構は全く未解明の状態であった。

2. 研究の目的

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について、我々が独自に見出した手掛かりをもとに、以下の項目に焦点を絞り、本研究期間内での解明を目指した。

(1) アブラナ科植物の自家不和合性

自家受粉時の乳頭細胞内 Ca²⁺ 上昇に関わる輸送体の解明

乳頭細胞内の自家不和合性情報伝達に関わる因子の解明

高濃度 CO₂ 処理による自家不和合性打破の機構解明

(2) ナス科植物の自家不和合性

花粉因子複合体(SCF-complex)の構成因子の機能解明

雌ずい因子(S-RNase)の無毒化機構の解明

3. 研究の方法

(1) アブラナ科植物の自家不和合性

および *A. thaliana* では、自家不和合性を付与した *A. thaliana* を利用して、分子生物学的手法、薬理学的的手法、遺伝学的手法等を用いて解明した。 *A. thaliana* では、CO₂ 処理に対し感受性および非感受性の *Brassica rapa* を対象として遺伝学的に原因遺伝子座を追求した。

(2) ナス科植物の自家不和合性

S. tuberosum では、網羅的な遺伝子発現解析と分子生物学的手法、生化学的手法をくみあわせて解析した。 *S. tuberosum* では、S-RNase の挙動を免疫組織化学的に追跡した。

4. 研究成果

(1) アブラナ科植物の自家不和合性

自家受粉時の乳頭細胞内 Ca²⁺ 上昇に関わる輸送体の解明

自家不和合性種 *A. lyrata* の SRK および SPI1 遺伝子を導入することで自家不和合性を付与した *A. thaliana* C24 系統を用い、乳頭細胞

など有性生殖に関わる各種細胞内に Ca^{2+} センサー蛋白質の Yellowameleon 3.60 (YC3.60) 等を発現させて、和合および不和合受粉時の細胞内 Ca^{2+} 濃度をモニターした。また、Calcium Green という非浸透性の Ca^{2+} 指示薬を乳頭細胞外に塗布することで、乳頭細胞外へ流出してくる Ca^{2+} をモニターした。その結果、まず和合受粉時には乳頭細胞外に Ca^{2+} を含む水が流出してくることを見出した。また、この反応は、和合性花粉（野生型花粉）の花粉表層物質（pollen coat, PC）を乳頭細胞に付着させるだけで誘導されることが示された。さらに、和合花粉受粉後あるいは和合花粉 PC 処理後に発現誘導される Ca^{2+} 輸送体をマイクロアレイ解析により探索し、自己阻害型 Ca^{2+} ポンプ ACA13 を候補として見出した。ACA13 遺伝子が破壊された T-DNA タグラインでは、和合受粉後の乳頭細胞外への Ca^{2+} の流出が抑制され、花粉の発芽が阻害されることが示された。また和合受粉時には、ACA13 を含む乳頭細胞膜直下の細胞内小胞が細胞膜と速やかに融合することで Ca^{2+} が細胞外に放出され、これが花粉の発芽を促進している可能性が示された。すなわち、PC 中には同種の乳頭細胞に作用して、ACA13 の発現を誘導すると共に、ACA13 を含む細胞内小胞の開口分泌を促進する未知の和合性シグナルが含まれ、これによって花粉の発芽に必要な Ca^{2+} が乳頭細胞から花粉に供給されていることが強く示唆された (Iwano *et al.*, Plant Cell, 2014)。

一方、不和合受粉時には（自己 SP11 を発現させた花粉を受粉した時には）、この細胞外への Ca^{2+} 輸送が全く誘導されず、逆に乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度が急上昇することが示された。柱頭から乳頭細胞のプロトプラストを作製する手法を独自に確立し、自己 SP11 タンパク質を添加したところ、プロトプラスト内の Ca^{2+} 濃度が上昇することが示され、この反応が SP11-SRK 相互作用の下流で直接的に誘導されていることが明らかとなった。さらにマイクロインジェクション装置を用いて乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度を不和合受粉時と同程度まで上昇させると、和合性花粉を受粉させても発芽できなくなることが示され、この Ca^{2+} 上昇が自家不和合性情報伝達系の主経路として機能していることが示唆された。また、チャンネル阻害剤を用いた薬理学的実験から、この Ca^{2+} 上昇にグルタミン酸受容体 GLR が関与する可能性が示唆された。実際、乳頭細胞で特に強く発現する GLR3.7 や GLR3.5 のナンセンス変異株を TILLING 法により探索して解析した結果、SP11 処理後の Ca^{2+} 上昇が抑制されることが示された。以上の結果より、自家受粉時には SP11-SRK 相互作用の下流で GLR3.5/3.7 などのグルタミン酸受容体が活性化され、乳頭細胞内への Ca^{2+} 流入が誘起され、正常な和合反応が阻害されている可能性が示唆された (Iwano *et al.*, Nature Plants, 2015)。

乳頭細胞内の自家不和合性情報伝達に関わる因子の解明

自家不和合性を付与した *A. thaliana* の種子を EMS 処理あるいは重イオンビーム処理により変異を誘発し、その自殖後代の中から、自家和合性に戻り自殖種子をつけるようになった和合性復帰突然変異株を探索した。

得られた複数の和合性復帰変異株の中から EMS 処理により得られた 1 株と、重イオンビーム処理により得られた 1 株を選択し、野生株と交配して得た F_1 世代の総性を調べたところ、いずれも自家不和合性を示し、劣性の変異であることが確認された。次に、 F_2 後代を自家不和合性株と和合性株に分類しバルク化し、次世代シーケンサーにより原因遺伝子の推定を行った結果、いずれの株も *NRPD1a* 遺伝子にナンセンス変異を持つことが明らかとなった。同遺伝子の変異が、自家不和合性を付与した *A. thaliana* Col-0 株を自家和合性に变化させることがすでに報告されており (Strickler *et al.*, G3 (Bethesda), 3: 315, 2013) λ *NRPD1a* が *A. thaliana* における自家不和合性獲得に必須であることが確実となった。*NRPD1a* は RNA ポリメラーゼ a 複合体の構成要素であるが、本因子が自家不和合性に何故必要であるかは全くの謎である。今後さらに解析を続けていく必要がある。

高濃度 CO_2 処理による自家不和合性打破の機構解明

高濃度 CO_2 処理は、アブラナ科野菜類の F_1 採取に用いる親株（近交系）の維持において自家不和合性を打破して自殖種子を得るための方法として古くから応用されてきたが、自家不和合性打破の仕組みは不明である。また、近交系の中には高濃度 CO_2 処理により容易に自家不和合性が打破される感受性株となかなか打破されない非感受性株が存在することが経験的に知られてきたが、感受性を規定する仕組みも不明であった。そこで、本研究では *B. rapa* の近交系の中から感受性株と非感受性株を選択し、それらの後代の表現型とゲノムの関係を遺伝学的に追求することで、 CO_2 感受性を規定する遺伝子を特定し、 CO_2 により自家不和合性が打破される仕組みを解明することを目指した。まず、相互交配実験から、 CO_2 感受性は雌ずい側で発現する遺伝子が規定すること、打破の際には、乳頭細胞からの Ca^{2+} の流出など和合受粉時に特異的な生理反応が誘導されることを明らかにした。また、両系統間の F_1 後代は、中間的な CO_2 感受性を示すこと、 F_2 後代は多様な CO_2 感受性株に分離することを示し、 CO_2 感受性が複数遺伝子座の量的形質により決定されていることを明らかにした。さらに、 F_2 後代 110 個体を対象に、両系統で多型を示す 123 の遺伝マーカーを用いて QTL 解析を進め、染色体 5 番と 3 番に位置する 2 箇所の QTL が相加的に CO_2 感受性を規定していることを明らかにした (Lao *et al.*, J. Exp. Bot., 2014)。今後、同染色体領域に含まれる原因遺伝子を同定し、 CO_2 感受性を決める仕組み、 CO_2 により自家不和合性が打破される仕組みを明らか

にしていく予定である。

(2) ナス科植物の自家不和合性

花粉因子複合体(SCF-complex)の構成因子の機能解明

FLAG タグを付加した SLF 蛋白質をナス科植物 *Petunia* の花粉内に発現させた後、タグ配列を抗原とする免疫沈降法により SCF^{SLF} 複合体を回収し、含まれる構成因子を質量分析計により同定した。その結果、SLF は、花粉特異的な SKP1 (SSK1) と、同じく花粉特異的な CUL1 (CUL1-P)、さらに RBX1 と複合体を作っていることが明らかとなった (Entani *et al.*, *Plant J.*, 2014)。さらに、この複合体にヒトの E1, E2 およびユビキチンを添加することにより、*in vitro* において本複合体が、形質転換実験から予測された非自己の標的 S-RNase に特異的に結合し、ポリユビキチン化することが示された。また、得られたポリユビキチン化 S-RNase は、花粉抽出物中で速やかに分解されること、その分解は 26S プロテアソーム阻害剤 MG-132 の添加により阻害されることが示された。以上の結果から、非自己の花粉管の中では、花粉因子 SLFs が協調的に非自己 S-RNase を認識、ポリユビキチン化し、恐らく 26S プロテアソーム系を介して分解していることが明らかとなった。

さらに、*Petunia* の 8 つの不和合性 S ハプロタイプ ($S_5, S_7, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{17}, S_{19}, S_{22}$) と 2 つの和合性 S ハプロタイプ (S_m, S_{0m}) にコードされた SLFs を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に同定した。その結果、*Petunia* の自家不和合性が合計 18 種類の SLFs による協調的な非自己 S-RNase 認識・無毒化機構により制御されていることがほぼ明らかとなった (Kubo *et al.*, *Nature Plants*, 2015)。また、SLFs と S-RNase の系統樹解析から、この「協調的な非自己認識機構」が誕生したのはキク亜綱とバラ亜綱が分岐する以前に遡り、1 つの共通祖先に由来すること、この仕組みが現在のナス科、バラ科、オオバコ科などに引き継がれてきていることを明らかにした。また、gene conversion 等により、S ハプロタイプ間で SLFs の受け渡しが行われる中で、新たな S ハプロタイプが次々と生み出されてくることを明らかにした (Fujii *et al.*, *Nature Plants*, 印刷中)。

雌ずい因子(S-RNase)の無毒化機構の解明

和合受粉時および不和合受粉時の花柱を伸長中の花粉管内における S-RNase の時空間的な挙動を免疫組織化学的手法を用いて詳細に解析した。その結果、特に非自己の花粉管の先端部分において、S-RNase の濃度分布が自己花粉管の同部位に比べ、有意に低下していることが確認された。今後、さらに花粉管全体における S-RNase の分布を経時的に精査し、無毒化機構を明らかにしていく予定である。

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 17 件)

Fujii S, Kubo K-i, Takayama S. Non-self and self-recognition models in plant self-incompatibility. *Nature Plants* 2, 2016, 査読有, 印刷中.

Murase K, Hirano Y, Takayama S, Hakoshima T. Efficient expression of SRK intracellular domain by a modeling-based protein engineering. *Protein Expr. Purif.*, 2015, 査読有, 印刷中 DOI: 10.1016/j.pep.2015.09.020.

Iwano M, Ito K, Fujii S, Kakita M, Asano-Shimosato H, Igarashi M, Kaothien-Nakayama P, Entani T, Kanatani A, Takehisa M, Tanaka M, Komatsu K, Shiba H, Nagai T, Miyawaki A, Isogai A, Takayama S. Calcium signalling mediates self-incompatibility response in the Brassicaceae. *Nature Plants* 1, 15128, 2015, 査読有, DOI: 10.1038/nplants.2015.128.

Matsuda T, Matsushima M, Nabemoto M, Osaka M, Sakazono S, Masuko-Suzuki H, Takahashi H, Nakazono M, Iwano M, Takayama S, Shimizu KK, Okumura K, Suzuki G, Watanabe M, Suwabe K. Transcriptional characteristics and differences in Arabidopsis stigmatic papilla cells pre- and post-pollination. *Plant Cell Physiol.* 56, 663-673, 2015, 査読有, DOI: 10.1093/pcp/pcu209.

Kubo K, Paape T, Hatakeyama M, Entani T, Takara A, Kajihara K, Tsukahara M, Shimizu-Inatsugi R, Shimizu KK, Takayama S. Gene duplication and genetic exchange drive the evolution of S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*. *Nature Plants* 1, 14005, 2015, 査読有, DOI: 10.1038/nplants.2014.5.

Entani T, Kubo K, Isogai S, Fukao Y, Shirakawa M, Isogai A, Takayama S. Ubiquitin-proteasome-mediated degradation of S-RNase in a solanaceous cross-compatibility reaction. *Plant J.* 78,1014-1021, 2014, 査読有, DOI: 10.1111/tpj.12528.

Kaya H, Nakajima R, Iwano M, Kanaoka MM, Kimura S, Takeda S, Kawarazaki T, Senzaki E, Hamamura Y, Higashiyama T, Takayama S, Abe M, Kuchitsu K. Ca²⁺-activated reactive oxygen species production by Arabidopsis RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell.* 26,1069-1080, 2014(3), 査読有, DOI:10.1105/tpc.113.121350.

Lao X, Suwabe K, Niikura S, Kakita M, Iwano M, Takayama S. Physiological and genetic analysis of CO₂-induced breakdown of self-incompatibility in *Brassica rapa*. *J. Exp. Bot.* 65, 939-951, 2014, 査読有, DOI: 10.1093/jxb/ert438.

Iwano M, Igarashi M, Tarutani Y, Kaothien-Nakayama P, Nakayama H, Moriyama H, Yakabe R, Entani T, Shimosato-Asano H, Ueki M, Tamiya G, Takayama S. A pollen coat-inducible autoinhibited Ca^{2+} -ATPase expressed in stigmatic papilla cells is required for compatible pollination in the Brassicaceae. *Plant Cell* 26, 636-649, 2014, 査読有, DOI: 10.1105/tpc.113.121350.

Osaka M, Matsuda T, Sakazono S, Masuko-Suzuki H, Maeda S, Sewaki M, Sone M, Takahashi H, Nakazono M, Iwano M, Takayama S, Shimizu KK, Yano K, Lim YP, Suzuki G, Suwabe K, Watanabe M. Cell type-specific transcriptome of Brassicaceae stigmatic papilla cells from a combination of laser microdissection and RNA sequencing. *Plant Cell Physiol.* 54, 1894-1906, 2013(11), 査読有, DOI: 10.1093/pcp/pct133.

Takada Y, Sato T, Suzuki G, Shiba H, Takayama S, Watanabe M. Involvement of MLPK pathway in intraspecific unilateral incompatibility regulated by a single locus with stigma and pollen factors. *G3 (Bethesda)*, 3: 719-726 2013, 査読有, DOI:10.1534/g3.113.005892.

〔学会発表〕(計 17 件)

高山誠司. 自家不和合性の分子機構. 国立遺伝学研究所研究会「植物の生殖成長期の発生を制御する分子機構」, 2015 年 11 月 7 日, 遺伝学研究所 (静岡県・三島市)

Takayama S. Allelic variants of small RNA control dominance hierarchy among self-incompatibility alleles in *Brassica rapa*. International Symposium "Establishing Next-Generation Genes", 2015 年 5 月 28 日, 奈良春日野国際フォーラム薨 (奈良県・奈良市)

Tsukahara M, Takayama S. Molecular mechanism for S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*. International Symposium "Signaling and Coordination in Plant Development", 2013 年 11 月 29 日, NAIST (奈良県・生駒市)

Ito K, Takayama S. Analysis of intracellular signaling pathway in *Brassica* self-incompatibility. International Symposium "Signaling and Coordination in Plant Development", 2013 年 11 月 29 日, NAIST (奈良県・生駒市)

高山誠司. 自家不和合性の優劣性を制御する低分子 RNA, 第 35 回日本分子生物学会ワークショップ, 2012 年 12 月 11 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

Entani T, Takayama S. Ubiquitin-proteasome system-mediated self/non-self discrimination in solanaceous self-incompatibility, NAIST International Symposium "A New Generation

of Plant Embryo Research", 2012 年 10 月 29 日, NAIST (奈良県・生駒市)

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 年 3 月 10 日, Taos (USA)

Iwano M, Takayama S. Molecular mechanisms of self-incompatibility in Brassicaceae. 22nd International Congress on Sexual Plant Reproduction, 2012 年 2 月 14 日, Melbourne (Australia)

Shiba H, Takayama S. Epigenetic regulation of dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility alleles. 第 34 回日本分子生物学会ワークショップ, 2011 年 12 月 13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Kubo K, Takayama S. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Joint Conference, 2011 年 11 月 29 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 2 件)

Iwano M, Ito K, Shimosato-Asano H, Lai K-S, Takayama S. Self-Incompatibility in the Brassicaceae, "Sexual Reproduction in Animals and Plants", Eds. Sawada H, Inoue N, Iwano M, Springer, pp.245-254, 2014, DOI: 10.1007/978-4-431-54589-7_21.

〔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

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

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

なし