

令和元年6月7日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04451

研究課題名(和文)ニホンナシ自家不和合性における花粉管の伸長および伸長停止機構の包括的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis on the pollen tube growth and inhibition in self-incompatibility of Japanese pear

研究代表者

安田 剛志(高崎剛志)(YASUDA, TAKESHI)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：30314511

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文):ニホンナシのS-RNase 周辺領域のBACコンテグを拡張することで、S2とS4ハプロタイプがそれぞれ18個と20個のSFBB遺伝子をコードしていることを明らかにした。S1, S3, S5, S6, S7ホモ花粉から取得したmRNA-seqデータを既知のSFBB配列にマッピングすることで、85個のSFBB配列が構築された。計124個のSFBBは推定アミノ酸配列から作製した分子系統樹上で18のタイプに分類された。各タイプ内のSFBB対立遺伝子の有無から2つのタイプのSFBBが標的とするS-RNaseを予測できた。Sホモ系統の花柱内で不和合花粉管が伸長停止する部位を組織学的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニホンナシは雌しべと雄しべをもつ両性花を着生するが、自家不和合性を示すため自家花粉では受精・結実しない。安定的な果実生産のために他品種の花粉の人工受粉が実施されている。自家不和合性の仕組み、すなわち雌しべと花粉間の自他認識の仕組みを解明することで、自家不和合性打破技術の開発や自家和合性品種の育成に繋げることができる。

研究成果の概要(英文):We expanded the BAC contigs around the S-RNase of Japanese pear to find 18 and 20 SFBB genes coded by S2- and S4-haplotypes, respectively. The mRNA-seq reads derived from the pollen of S1-, S3-, S5-, S6-, S7-homozygotes were mapped into our finding SFBBs, assembling 85 SFBB contig sequences. The reduced amino acid sequences of total 124 SFBBs were classed into 18 types using phylogenetic analyses. The presence or absence of alleles in each type of SFBB could predict the S-RNases that two types of SFBBs target. Histological analysis revealed the region where incompatible pollen tube arrested in the style of an S homozygote.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：自家不和合性 ニホンナシ ゲノム 花粉管

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニホンナシは雌ずいと雄ずいをもつ両性花を着生するが、配偶体型自家不和合性を示すため、自家受粉では受精・結実しない。この自家不和合性は *S* 遺伝子座の対立ハプロタイプより制御され、ハプロタイプには雌ずい側因子 *S*-RNase と花粉側因子がコードされている。*S*-RNase は雌ずいと同一 *S* をもつ不和合花粉管内で RNA 分解酵素として機能することで、花粉管を伸長停止に導き、異なる *S* をもつ和合花粉管内では花粉側因子によって無毒化されると考えられてきた。

我々は、花粉側因子を探索するため、*S4* ホモ系統と‘長十郎’ (*S2S3*) から BAC ライブラリーを作製し、*S*-RNase を起点とした染色体歩行を続けてきた (Okada et al. 2011)。*S*-RNase 周辺領域をカバーする BAC コンテグ配列上に、花粉側因子候補となる F-box タンパク質 (SFBB) 遺伝子を *S2*-RNase 周辺 642kb に 17 個、*S3*-RNase 周辺 340kb に 2 個、*S4*-RNase 周辺 900kb に 13 個を見出した。SFBB は F-box ドメインで Cullin1, Rbx が結合した SSK1 と SCF 複合体を形成し、和合花粉管内では非自己 *S*-RNase をポリユビキチン化し、プロテアソームによる分解することで、*S*-RNase を無毒化していると推測された。加えて、ハプロタイプ間で高い相同性を示す SFBB 対立遺伝子が存在していたことから、ナス科植物で提案されている「協調的非自己 *S*-RNase 認識モデル (Kubo et al. 2010)」がニホンナシにも適応できると考えた。「協調的非自己 *S*-RNase 分解モデル」では、各ハプロタイプに自己 *S*-RNase を無毒化する SFBB はコードされない。各 SFBB の *S*-RNase に対する認識特性は未だ不明であるが、*S4*-RNase と SFBB4-d1 を含む 236 kb を欠失した *S4^m* をもつ花粉が *S1* 雌ずいにも拒絶されることを見出し、SFBB4-d1 は *S1*-RNase を標的としていると予測された (Okada et al. 2008, Saito et al. 2012)。

一方で、和合花粉管の伸長および不和合花粉管の伸長停止の過程を明らかにするため、透過型電子顕微鏡で花粉先端部を観察してきた。不和合花粉管内先端部において、オルガネラの膨張・崩壊や分泌小胞の減少・消失が起こっていることを見出した。しかし、いくつかの和合花粉管でも類似した微細構造の崩壊が観察された。

2. 研究の目的

ニホンナシの *S2*-, *S3*-, *S4*-RNase 周辺領域の BAC コンテグの拡張により、*S* ハプロタイプにコードされる SFBB 群を掌握するとともに、他の *S* ホモ花粉から SFBB をクローニングし、それら SFBB の推定アミノ酸配列を比較・分類することで、各 SFBB の *S*-RNase に対する認識特異性を予測するとともに、和合・不和合花粉管の伸長ならび伸長停止の過程を組織学的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BAC コンテグの拡張と配列解析

既築の BAC コンテグの末端配列または SFBB 特異的な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 PCR スクリーニングし、ポジティブクローンを単離した。ポジティブ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た PCR により BAC クローンの整列化および既築の BAC コンテグへの統合を行い、BAC コンテグを拡張した。拡張領域を含む BAC クローンを次世代シーケンサー PacBioRSII で解析し、取得したロングリード配列を HGAP でアセンブリすることで、BAC クローンの全長配列を決定し、コンテグ配列を拡張した。コンテグ配列に対して HMMER および MEGANTE によるアノテーション

オン解析を実施し、*SFBB* 配列を探索した。GenomeMatcher を用いたシンテニー解析を行い、ハプロタイプ間でゲノム構造を比較した。

(2) mRNA-seq および RT-PCR 解析

S1, S2, S3, S4, S4sm, S5, S6, S7 ホモ花粉およびの花柱、および未展開葉から RNA を抽出した。RNA-Seq 用ライブラリーを構築し、Illumina HiSeq4000 (PE=100)で mRNA-seq データを取得した。mRNA-seq データを BAC コンティグ配列にマッピングすることで、コンティグ配列上の遺伝子の花粉、花柱、葉における発現を解析した。一方で、*S1, S3, S5, S6, S7* ホモ花粉から取得した mRNA-seq データを既知の *SFBB* 配列にマッピングすることで、これらハプロタイプがコードする *SFBB* 配列を構築した。各 *SFBB* の非翻訳領域から設計したプライマーセットを用いた RT-PCR により構築した *SFBB* 配列を増幅し、塩基配列を解析した。

(3) 細胞組織形態学的解析

ニホンナシの *S3* ホモ系統の柱頭に *S1* ホモ花粉および *S3* ホモ花粉を受粉した。受粉 24, 48, 72, 96, 120 時間後の花柱をグルタルアルデヒドと四酸化オスミウム (OsO_4)で固定し、エタノール脱水後、パラプラストに包埋した。マイクロトームで柱頭直下 (0mm) ~ 花柱基部 (8mm) までの横断切片を 1mm ごとに作製した。脱パラフィン後、アニリンブルー染色し、蛍光顕微鏡で花粉管誘導組織内の花粉管数を調査した。

FIB-SEM 用試料作製のため、 OsO_4 固定後の試料を 0.1%カテキンに浸漬し、再度 OsO_4 を反応させた。エタノール脱水後、スパー樹脂に包埋した。ブロックをヒストナイフで多数の花粉管が観察できる領域まで切削した。収束イオンビーム搭載走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) を用いてブロックの表面を 100nm の厚さで切削し、切削面を観察した。切削と SEM 観察を繰り返し、取得画像から三次元画像を再構築した。

4. 研究成果

(1) *S* ハプロタイプのゲノム構造と遺伝子発現

BAC コンティグの末端配列を用いて BAC ライブラリーを PCR スクリーニングし、BAC コンティグを拡張した。*S2*BAC コンティグ配列は *S2-RNase* 上流 341kb から下流 480kb まで拡張され、*S2-RNase* の上流域に *2-u1* ~ *-u10*, 下流域に *2-d1* ~ *-d8* の計 18 個の *SFBB2* が見出された。*S4*BAC コンティグ配列は *S4-RNase* 上流 500kb から下流 835kb まで拡張され、*S4-RNase* の上流域に 6 個、下流域に 14 個の計 20 個の *SFBB4* が検出された。*S3*BAC コンティグ配列は *S3-RNase* 上流 390kb~下流 366kb まで拡張され、8 個の *SFBB3* が見つかったが、染色体歩行でそれ以上拡張することができなかった。そこで、未だ見出されていない *SFBB* を増幅するプライマーセットを用いてスクリーニングすることで、235kb のサブコンティグを構築した。その中に 4 個の *SFBB3* が見つかった (図)。コンティグ上に検出された *SFBB* の推定アミノ酸配列をハプロタイプ間で比較したところ、*S2* と *S4* ハプロタイプ間では 80%以上の相同性を示す組み合わせが 17 対見出された。*S4* の残り 3 個の *SFBB4* (*4d2, 4d1, 4u1*) はそれぞれ *SFBB4-2d4, -2d3, -2d2* から重複により生じたパラログであると推測された。

コンティグ配列を GenomeMatcher で解析し、ハプロタイプ間のゲノム構造を比較した。コンティグ両外縁部にはハプロタイプ間で類似したゲノム構造領域が存在すること明らかになり、その領域では *SFBB* が同一順序、同一転写方向で配列していた。この領域の更に外側には *SFBB*

様配列は検出されていないことから、*S2* と *S4* にコードされる *SFBB* はほぼ掌握できたと考えられた。

S ハプロタイプにコードされる遺伝子の発現を調査するため、*S2*, *S3*, *S4* ホモ系統の花粉、花柱、および未展開葉の mRNA-seq データを *S2*, *S3* と *S4*BAC コンティグ配列にマッピングした。コンティグ上に検出された全ての *SFBB* は花粉特異的に発現していた。*SFBB4-d1* を欠失している *S4sm* ホモ花粉の mRNA-seq データを *SFBB4* 群配列へのマッピングした結果、*SFBB4-d1* 以外の *SFBB4* 群は発現しており、それらの配列に変異が認められなかったことから、4-d1 の標的が *S1*-RNase であることが強く示唆された。

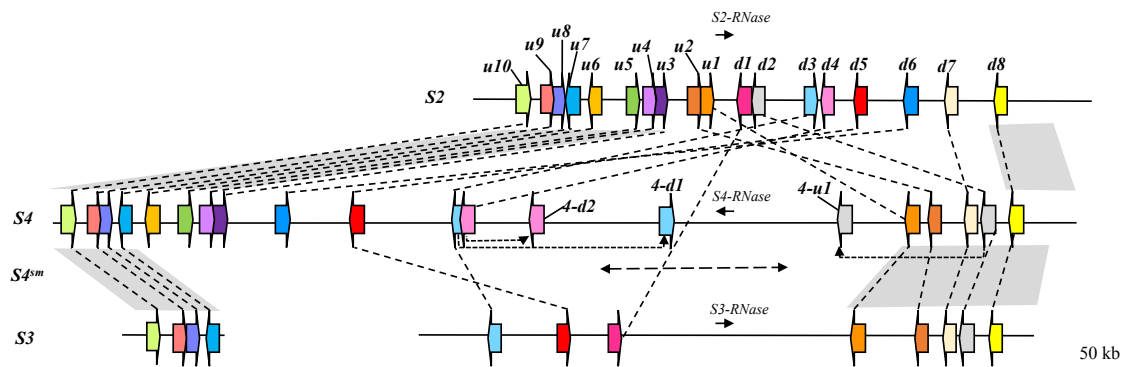


図. *S2*-, *S3*-と *S4*-RNase (→) 周辺領域の BAC コンティグ配列上の *SFBB* 群 (■) *SFBB* を *S*-RNase の上流域 (upstream) と下流域 (downstream) に分け、*S2*-RNase の近傍から 1, 2, 3... とそれぞれ名付けた。ハプロタイプ間で 80% 以上の高い相同性を示す *SFBB* を点線で結び、類似したゲノム構造を示す領域を灰色で示した。波線矢印の先は重複により生じたパラログを示す。*S4sm* における 236kb の欠失領域を ←--→ で示した。

(2) mRNA-seq データからの *SFBB* 配列の構築

S1, *S3*, *S5*, *S6*, *S7* ホモ花粉から取得した mRNA-seq データを既知の *SFBB* 配列にマッピングし、*SFBB* 配列を構築したところ、*SFBB1*, 3, 5, 6, 7 群の配列をそれぞれ 19 個, 16 個, 16 個, 17 個, 18 個得ることができた。*SFBB2* と 4 群を含めた 124 の *SFBB* 配列からアミノ酸配列を推定し、分子系統樹を作製したところ、*SFBB* は 18 のタイプに分類された。各タイプ内の *SFBB* 対立遺伝子の有無から 2 つのタイプが標的とする *S*-RNase を予測することができた。

各グループの非翻訳領域から設計したプライマーセットを用いた RT-PCR を実施し、*SFBB* 配列のクローニングを進め、mRNA-seq データから構築された *SFBB* 配列のうち、約 80% の存在を確認した。

(3) 和合・不和合花粉管の伸長・停止過程

ニホンナシの *S3* ホモ系統に *S1* ホモ花粉および *S3* ホモ花粉を受粉し、受粉 24, 48, 72, 96, 120 時間後の花柱各部位における和合・不和合花粉管数を調査した。和合花粉管は花柱基部まで達していたが、その多くが花粉管誘導組織面積の減少に伴い、花柱途中で伸長停止していた。この和合花粉管の伸長停止は花粉管の通り道である細胞間隙の減少によるものと考えられた。一方、不和合花粉管は柱頭直下 0mm まで和合花粉管とほぼ同数伸長していたが、柱頭直下 6mm までに徐々に停止していた。柱頭直下 1mm~6mm に観察された不和合花粉管数は和合花粉管より有意に少なかったことから、不和合花粉管の伸長抑制は和合花粉管のような物理的制限ではなく、不和合反応で引き起こされることが明らかになった。このことは、不和合反応によって不和合花粉管先端部の微細構造の崩壊が引き起こされていることを強く示唆した。不和合花粉管は

Sをヘテロにもつ栽培品種では花柱基部まで到達しているのに対し、Sホモ系統では途中で停止していた。これは、ヘテロ花柱の2倍量のS3-RNase量を含むS3ホモ系統の花柱内では強い不和合反応が起こったためと推測された。

FIB-SEMを用いて花粉管の3次元構造微細構造の解析を試みた。OsO4後固定後、カテキンを介してOsO4を反応させ、コントラストを増強する固定法を確立した。和合・不和合受粉24時間後の花柱ブロックをFIB-SEMで観察した。切削部位内に偶然存在していた花粉管を捉えることができた。しかし、切削が広範囲に及んだため、解像度が低く、微細構造の解析には至らなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Li, L., Okamura, A., Nakanishi, T., Fujimoto, R., Takasaki-Yasuda, T. (2016)
Ultrastructural Changes in the stigma and upper style during floral development of Japanese pear. J. Electr. Microsc. Technol. Med. Biol. 29 (2) : 1-7. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 高橋侑也, 藤本龍, 安田(高崎)剛志. ニホンナシSホモ系統における花柱内の和合・不和合花粉管伸長. 園芸学会平成30年度秋季大会, 鹿児島大学, 2018.9.22-23.
- ② 張競月, 武矢悠太郎, 藤本龍, 安田(高崎)剛志. ニホンナシS3-RNase周辺領域のBACコンテイングの拡張によるPpSFBB3の探索, 平成30年度園芸学会近畿支部会, 大阪府立大学, 2018.9.7.
- ③ 西村遼太郎, 藤本龍, 安田(高崎)剛志. ニホンナシS2およびS4ハプロタイプ間のゲノム構造比較, 園芸学会平成28年度秋季大会, 酪農学園大学, 2017.9.2-3.
- ④ 高橋侑也, 李麗怡, 岡村彩葉, 藤本龍, 安田(高崎)剛志. ニホンナシ柱頭の表面および微細構造の変化と柱頭浸出液の出現について, 医学生物学電子顕微鏡技術学会第33回学術講演会, 神戸大学, 2017.5.12-14.
- ⑤ 西村遼太郎, 藤本龍, 安田(高崎)剛志. ニホンナシS2遺伝子座のゲノム構造および発現遺伝子解析 園芸学会平成28年度秋季大会, 名城大学, 2016.9.9-10
- ⑥ 武矢悠太郎, 野村直希, 藤本龍, 安田(高崎)剛志. ニホンナシS3-RNase周辺BACコンテイングの塩基配列解析, 園芸学会平成28年度秋季大会, 名城大学, 2016.9.9-10
- ⑦ 西村遼太郎, 藤本龍, 安田(高崎)剛志. ニホンナシS2-RNase周辺領域663kbのゲノム構造解析, 平成28年度園芸学会近畿支部会, 神戸大学, 2016.8.31.
- ⑧ 武矢悠太郎, 野村直希, 藤本龍, 安田(高崎)剛志. ニホンナシS3-RNase周辺領域451kbのゲノム構造解析, 平成28年度園芸学会近畿支部会, 神戸大学, 2016.8.31.
- ⑨ 西村遼太郎, 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II, 園芸学会平成27年度秋季大会, 徳島大学, 2015.9.26

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ans.kobe-u.ac.jp/kenkyuuka/sigen/engeisyokubutu.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤本 龍

ローマ字氏名： (FUJIMOTO, ryo)

所属研究機関名：神戸大学

部局名：農学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60620375

(2)研究協力者

研究協力者氏名：朴杓允

ローマ字氏名： (Park, pyoyun)

所属研究機関名：神戸大学

部局名：農学研究科

職名：名誉教授

研究者番号（8桁）：20147094