

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5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20248004

研究課題名（和文）バラ科サクラ属に特異な S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性認識機構の解明

研究課題名（英文）MOLECULAR BASIS OF S-RNASE-BASED GAMETOPHYTIC SELF-INCOMPATIBILITY IN PRUNUS IN THE ROSACEAE

研究代表者

田尾 龍太郎（TAO RYUTARO）

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：10211997

研究成果の概要（和文）：バラ科サクラ属植物の多くは配偶体型自家不和合性を示し、このことがサクラ属果樹の栽培や育種を行う上での障壁となっている。本研究はサクラ属果樹における自家不和合性反応の分子機構を解明しようとしたものであり、まずサクラ属果樹の自家不和合性反応の雌ずい S 因子である S-RNase と結合するアクチンを同定した。引き続き花粉 S 因子である SFB と結合する Skp1 様タンパク質（SSK1）を同定し、さらに SFB や SSK1 とともに SCF 複合体を形成する Cul1 を同定することにも成功した。これらの結果に基づいて、バラ科サクラ属果における自家不和合性反応の分子認識機構に関する作業仮説を構築した。

研究成果の概要（英文）：*Prunus* in the Rosaceae show the gametophytic self-incompatibility system, which hinders effective fruit production and breeding in *Prunus*. This study was started to elucidate the molecular basis of the gametophytic self-incompatibility in *Prunus*. We identified pollen expressed actin that binds to the pistil *S* determinant, S-RNase. Furthermore, we identified a Skp1-like protein called SSK1 that binds to the pollen *S* determinant, SFB. We have cloned Cul1 that forms the SCF complex with SSK1 and SFB. Based on the results obtained, we have developed the working hypothesis for the molecular recognition of the gametophytic self-incompatibility in *Prunus*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
総計	30,100,000	9,030,000	39,130,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学，園芸学・造園学

キーワード：アーモンド，アンズ，ウメ，オウトウ，核果類，スモモ，S-RNase，SFB

1. 研究開始当初の背景

バラ科サクラ属果樹の多くは配偶体型自家不和合性を示す。自家不和合性は、栽培や育種を行う上での大きな障壁となっている。我々は、サクラ属果樹における自家不和合性反応の分子機構を解明し、得られた知見を園芸・育種学的に利用しようとして研究を進めてきた。

研究開始時点までに、雌ずい *S* 遺伝子の *S-RNase* を同定しており、さらに DNA 分析による *S* 遺伝子型の判別法の開発にも成功していた。また花粉 *S* 遺伝子である *S* ハプロタイプ特異的 F-box タンパク質遺伝子 (*SFB*) のクローニングにも成功しており、さらに一連の自家和合性変異体の解析結果から、バラ科サクラ属は、ナス科植物やキンギョソウ、そしてバラ科ナシ亜科など、他の *S-RNase* 依存性配偶体型自家不和合性を示す植物とは異なり、花粉側因子の変異によって自家和合化することが明らかになっていた。加えて、他の *S-RNase* 依存性配偶体型自家不和合性を示す植物が示す競合的相互作用による自家和合化現象がみられないことも明らかになっており、バラ科サクラ属における自家不和合性反応の特異性が明らかになってきていた。しかしながら、バラ科サクラ属における自家不和合性認識の分子機構は全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らが長年にわたって続けてきた、サクラ属の示す *S-RNase* 依存性配偶体型自家不和合性に関する研究をさらに発展させるために立案されたもの

である。生化学的・分子生物学的手法を利用して、バラ科において未同定の自家不和合性共通因子の同定を試みるとともに、バラ科サクラ属の自家不和合性機構における自己非自己認識の分子機構に関する作業仮説を構築するとともに、得られた知見を園芸・育種学的に利用しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 雌ずい側 *S* 因子である *S-RNase* と相互作用するタンパク質の同定

カンカオウトウ (*Prunus avium*) の *S⁶-RNase* の N 末部分および C 末部分をベイトとした酵母のツーハイブリッドスクリーニング (Y2H) により、カンカオウトウ‘佐藤錦’の花粉 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。ポジティブクローンのうち、アクチン様遺伝子について、花粉 cDNA をテンプレートとし、RACE 法により全長を単離し、その配列を決定した。GST 融合 PavAct1 を大腸菌発現系により、また粗精製 *S-RNase* をカンカオウトウ‘紅秀峰’花柱タンパク質の陽イオン交換クロマトグラフィーにより、それぞれ調製し、グルタチオンセファロースを用いた GST プルダウンアッセイに供した。GST プルダウンアッセイにおいては、100mM DTT による還元処理を行った Pav*S-RNase* およびこの還元処理を行わない (非還元処理) Pav*S-RNase* を供試した。還元処理 *S-RNase* とウサギ骨格筋由来アクチンを用いた EDC-クロスリンク分析および多量体アクチン共分離分析により、それぞれ還元処理 Pav*S-RNase* の単量体アクチン結合能と多量体アクチン

結合能を調査した。各分析を行う際のタンパク質の検出は、SDS-PAGE による分画後に、イムノブロット分析により行った。イムノブロット分析の1次抗体には、PavS4-RNase 抗体、PavS6-RNase 抗体、またはアクチン抗体を用いた。

(2) 花粉側 S 因子である SFB と相互作用するタンパク質の同定

カンカオウトウの SFB⁶ の N 末部分をベイトとした Y2H により、カンカオウトウ‘佐藤錦’の花粉 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、Skp1 様タンパク質遺伝子をクローニングした。またモモゲノムデータベース上の Cul1 様配列情報を基に PavCul1A および PavCul1B をクローニングした。Y2H により PavSSK1 と PavSFB3,6, PavCul1A, PavCul1B 間の相互作用を調査した。また生化学的にこれらタンパク質の相互作用を検証するため、cMyc-PavSFB3, cMyc-PavSFB6, PavCul1A-3xHA, PavCul1B-3xHA, GST-PavSSK1 の各種融合タンパク質を作出し、Glutathione Sepharose を用いたプルダウンアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 雌ずい側 S 因子である S-RNase と相互作用するタンパク質の同定

Y2H スクリーニングにより得たアクチン遺伝子様配列の全長 CDS を決定したところ *Arabidopsis Actin11* と高い相同性 (98.6%) を示したため、この遺伝子を PavAct1 と命名した。GST 融合 PavAct1 は非還元処理 PavS4,6-RNase との相互作用は検出されなかったが、還元処理 PavS4,6-RNase とは相互作用は検出されたため、還元された S-RNase

は S-ハプロタイプ非依存的にアクチンと結合することが示唆された。アクチンは塩濃度や他タンパク質の制御により単量体もしくは多量体の形をとること、そして単量体と多量体アクチンでは結合タンパク質が異なることが知られているため、還元処理 PavS-RNase がどちらのアクチンフォームと結合するかさらに詳細に調査を行った。ウサギ骨格筋アクチンを用いての EDC-クロスリンク分析および多量体アクチン共分離分析により、還元処理 S-RNase はどちらのアクチンフォームとも結合することが確認された。以上の結果よりバラ科サクラ属の自家不和合性反応において、花粉管細胞質に取り込まれ還元的環境に曝された S-RNase はアクチン結合能を獲得し、花粉管内アクチン動態の攪乱を介して細胞毒性を発揮する可能性が推察された。

(2) 花粉側 S 因子である SFB と相互作用するタンパク質の同定

Y2H において PavSSK1 は PavSFB3,6 およびその他の花粉で発現する F-box タンパク質との相互作用が確認され、またその相互作用には PavSSK1 の N 末端 helix (H0) が必要であることが示唆された。

o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside

(ONPG) を基質とした Y2H の β gal 活性調査により、PavSSK1 の H0 は PavSFB との相互作用を強めていることが確認された。

Peach Genome Database 上には2つの Cul1 様 Coding Sequence (CDS) が予測されており、ともに‘佐藤錦’花粉での発現が認められた。Y2H を行ったところ、PavCul1-likes はともに PavSSK1 と相互作用を示した。更にその相互作用にも H0 が必要であったことから、H0 は F-box タンパク質だけでなく Cul1 との結合にも関与することが示唆された。次

に GST-PavSSK1, GST-PavSSK1ΔH0 を用いて PavCul1-likes-3xHA もしくは cMyc-PavSFB3,6 の GST プルダウンアッセイを行ったところ, PavCul1-likes-3xHA および cMyc-PavSFB3,6 は両 GST 融合タンパク質と結合することが確認された. 以上の結果より, SSK1 は SFB および Cul1-likes と結合し SCF 複合体構成要素として機能すること, また SSK1 の H0 はその相互作用を正に制御するが必ずしも必要でないことが示された. さらに, SFB が SCF 複合体として機能し, 何らかの基質を分解誘導する可能性が推察された.

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 7 件)

- ①Matumoto, D., H. Yamane, K. Abe, and R. Tao. 2012. Identification of a Skp1-like protein interacting with SFB, the pollen *S* determinant of the gametophytic self-incompatibility in *Prunus*. Plant Physiology DOI:10.1104/pp.112.197343. (査読有り)
- ② Matsumoto, D. and R. Tao. 2012. Isolation of pollen-expressed actin as a candidate protein interacting with S-RNase in *Prunus avium* L. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 81: 41-47. (査読有り)
- ③Tsukamoto, T., N.R. Hauck, R. Tao, N. Jiang, and A.F. Iezzoni. 2010. Molecular and genetic analyses of four non-functional *S* haplotype variant derived from a common ancestral *S* haplotype identified in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). Genetics 184:411-427. (査読有り)
- ④Yamane, H. and R. Tao. 2009. Molecular basis of self-(in)compatibility and current status of *S*-genotyping in rosaceous fruit trees. J. Japan. Hort. Sci. 78:137-157. (査読有り)
- ⑤Fernandez i Marti, A., T. Hanada, J.M. Alonso, H. Yamane, R. Tao, and R. Socias i Company. 2009. A modifier locus affecting the expression of the *S*-RNase gene could be the cause of breakdown of self-incompatibility in almond. Sex. Plant Reprod. 22: 179-186. (査読有り)
- ⑥Hanada, T., K. Fukuta., H. Yamane, T. Esumi, and R. Tao. 2009. Cloning and characterization of a self-compatible *S^f* haplotype in almond (*Prunus dulcis* (mill.) D. A. Webb. syn. *P. amygladus* Batsch) to resolve previous confusion in its *S^f*-RNase sequence. HortScience 44:609-613. (査読有り)
- ⑦Matsumoto, D., H. Yamane, and R. Tao. 2008. Characterization of *SLFL1*, a pollen-expressed F-box gene located in the *Prunus S* locus. Sex. Plant Reprod. 21:113-121. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

- ①松本大生・田尾龍太郎. 2012. バラ科サクハラ属における自家不和合性花粉側因子 SFB と SCF 複合体構成要素間の相互作用解析. 平成 24 年度園芸学会春季大会 (大阪府立大学中百舌鳥キャンパス・平成 24 年 3 月 28-29 日).
- ②羽生剛・尾畑智哉・田尾龍太郎. 2012. 不和合および和合受粉したウメ雌ずいの RNA-seq 解析. 平成 24 年度園芸学会春季大会 (大阪府立大学中百舌鳥キャンパス)

ス・平成 24 年 3 月 28–29 日).

- ③松本大生・田尾龍太郎. 2011. カンカオウトウにおける *S*-RNase 結合花粉タンパク質としてのアクチンホモログの単離. 平成 23 年度園芸学会秋季大会 (岡山大学津島キャンパス・平成 23 年 9 月 24–26 日).
- ④赤木剛士・花田俊男・八重垣英明・山口正己・田尾龍太郎. 2011. 育種・栽培化に伴うモモの *S* locus の進化. 平成 23 年度園芸学会秋季大会 (岡山大学津島キャンパス・平成 23 年 9 月 24–26 日).
- ⑤田尾龍太郎・Fernandez, A. ・赤木剛士・花田俊男・Alonso, J.・Socias i Company, R. 2009. アーモンドの自家和合性に関わる *S* ハプロタイプの解析. 平成 22 年度園芸学会秋季大会 (大分大学旦野原キャンパス・平成 22 年 9 月 19–20 日).
- ⑥花田俊男・木部隆則・江角智也・山根久代・笹辺幸男・八重垣秀明・山口正己・Dandekar, A.M., Gradziel, T.M.・田尾龍太郎. 2009. モモとモモ近縁種における *S* ハプロタイプの共通性. 平成 21 年度園芸学会秋季大会 (秋田大学手形キャンパス・平成 21 年 9 月 26–28 日)..
- ⑦花田俊男・木部隆則・渡晶子・江角智也・山根久代・笹辺幸男・八重垣秀明・山口正己・Dandekar・A.M., Gradziel・T.M., Wunschi, A. ・田尾龍太郎. 2009. *S* ハプロタイプの解析により示唆されたモモの自家和合化機構. 平成 21 年度園芸学会秋季大会 (秋田大学手形キャンパス・平成 21 年 9 月 26–28 日).
- ⑧花田俊男・渡晶子・笹辺幸男・八重垣秀明・山口正己・田尾龍太郎. 2009. モモにおける自家和合性 *S* ハプロタイプのクローニングと塩基配列解析. 平成 21 年度

園芸学会春季大会 (明治大学駿河台キャンパス・平成 21 年 3 月 19–20 日).

- ⑨松本大生・山根久代・田尾龍太郎. 2008. サクラ属果樹における花粉側因子 SFB と相互作用する Skp1 の同定. 平成 20 年度園芸学会秋季大会 (三重大学生物資源学部・平成 20 年 9 月 27–29 日).

6. 研究組織

(1)研究代表者

田尾 龍太郎 (TAO RYUTARO)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：102111997

(2)研究分担者

山根 久代 (YAMANE HISAYO)
京都大学・大学院農学研究科・講師
研究者番号：80335306

羽生 剛 (HABU TSUYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：60335304

(3)連携研究者

なし