

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24248007

研究課題名(和文)バラ科サクラ属に特異な自家不和合性認識機構に関する作業仮説の構築とその検証

研究課題名(英文) Development of working model for distinct recognition mechanism for the self-incompatibility system in Prunus (Rosaceae)

研究代表者

田尾 龍太郎 (TAO, Ryutaro)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10211997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 27,800,000円

研究成果の概要(和文)：バラ科サクラ属はS-RNase依存性配偶体型自家不和合性を示し、サクラ属果樹の栽培や育種を行う上で大きな障壁となっている。本研究では、サクラ属のS遺伝子座に座乗し花粉で発現するSLFLs遺伝子がS-RNaseを非特異的に分解誘導するジェネラルインヒビターとして機能することで、サクラ属に特異な自家不和合性認識機構が成り立っているとの仮説を立てて、それを検証する形でタンパク質の相互作用や形質転換実験を行った。得られた結果は、SLFLsがジェネラルインヒビターであるとの仮説を支持するものであったが、一方でSLFLsがジェネラルインヒビターであることの確証を得るには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Prunus (Rosaceae) exhibits the S-ribonuclease (S-RNase)-based gametophytic self-incompatibility (GSI), which hinders effective fruit production and breeding in Prunus fruit trees. This system is also present in the families Plantaginaceae and Solanaceae and the tribe Maleae of the family Rosaceae. The consequences of pollen S gene mutations and heterodiallelic pollen production differ between Prunus species and other plants, suggesting there are different pollen S functions during self/nonself-recognition. This study tested the working hypothesis that pollen expressed SLFLs located around the Prunus S locus region work as general inhibitor to detoxify all S-RNase. Results obtained have supported the working hypothesis but firm direct evidence has not been obtained.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹 受粉受精 園芸ゲノム科学 遺伝子解析 組換え遺伝子 オウトウ ウメ 生殖隔離

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った。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しており、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解明されていなかった。

2. 研究の目的

植物が近交弱勢を防ぎ、遺伝的多様性を確保するために獲得してきた遺伝的機構の一つに自家不和合性がある。自家不和合性の存在を初めて示したのが進化論で有名なチャールズ・ダーウィンであり、その後、多くの植物で自家不和合性現象が認められている。自家不和合性現象は進化遺伝学的、植物学的に興味を持たれる現象であるのみならず、果樹を含む作物生産に大きく関わる現象であることから、自家不和合性を題材にした数多くの研究が精力的に進められてきた。

自家不和合性には多くのタイプが存在するが、バラ科サクラ属の示す自家不和合性は S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性である。S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性は、バラ科以外にも、ナス科やオオバコ科植物にみられる。この中で最も研究が進んでいるのがナス科植物である。ナス科植物において 1986 年に初めて雌ずい S タンパク質が同定され、その後この S タンパク質が RNase 活性を持つことが明らかにされた。以来、S タンパク質は S-RNase とよばれるようになった。バラ科サクラ属の S-RNase は 1990 年代中盤から後半に行われた我々の一連の研究によって同定された。S-RNase 遺伝子の配列が明らかにされたことにより、S 遺伝子型の分子タイピングが可能になり、現在、世界的にサクラ属果樹の S 遺伝子型の整理が行われている。

雌ずい S 遺伝子が同定されたことから、そ

の後の研究の興味は花粉 S 遺伝子の同定へと移った。しかしながら、ナス科植物で雌ずい S 遺伝子が同定されて以来 20 年近く、花粉 S 遺伝子の実体は明らかではなかった。花粉 S 遺伝子に関する最初の手がかりは、オオバコ科のキンギョソウで得られた。2002 年にキンギョソウの S 遺伝子座に花粉で発現する F-box 遺伝子が存在することが明らかにされたのだ。しかしながら、この研究では、その F-box 遺伝子の機能は不明であった。そのような中、我々の研究グループを含めた我が国の 2 つの異なる研究グループによって、バラ科サクラ属の S 遺伝子座に座乗する F-box 遺伝子 (S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, あるいは S locus F-box protein gene, SLF) が花粉 S 遺伝子の候補として同定された。

その後我々が行った SFB から推定されるタンパク質の一次構造の解析や突然変異体の解析により、現在では SFB がサクラ属の花粉 S 遺伝子であると考えられるようになった。また同じバラ科のナシ亜科植物の花粉 S 遺伝子の候補として、S 遺伝子座に存在し、互いに高い配列相同性を示す一連の F-box 遺伝子群 (S locus F-box brothers, SFBB) が同定されている。しかしながら、これら SFBB 全てが協調して花粉における特異性を与えるのか、あるいはそれらの中の一部が花粉 S 遺伝子であるのかは明らかになっていない。

バラ科を含む 3 科の植物で雌ずい S 遺伝子と花粉 S 遺伝子が同定されたことから、次の研究の興味は、雌ずいと花粉の自己非自己の認識機構の解明へと移った。そのような中、我々が以前から指摘し続けてきたバラ科サクラ属の自家不和合性認識機構の特異性が明確になってきた。

S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性に関する研究が最も進んでいるナス科植物では、花粉 S 遺伝子に変異が生じるとその花粉は自家他家不和合性を示し、受精できなくなることが示されている。しかしながら、サクラ属では、花粉側認識機構に変異の生じた一側性の自家和合性 S ハプロタイプの多くで SFB に挿入や欠失変異が生じていることが、我々の研究グループやイギリスの研究グループの研究により明らかになってきたのだ。また、ナス科植物では花粉 S をヘテロでもつ花粉には自家他家和合性を示す競合的阻害作用と呼ばれる現象が生じるが、サクラ属植物ではこの競合的阻害作用がみられないことも、4 倍体サンカオウトウを用いた我々の研究によって明らかになっている。興味深いことに、サクラ属と同じバラ科に属するナシ亜科植物では、倍数化に伴う競合的阻害作用による自家和合化の事例が多数報告されている。

以上の事実から、ナス科、オオバコ科、ナシ亜科植物の花粉 S 因子は、花粉管内で細胞毒として働く S-RNase 活性を、非自己の場合には不活性化し、自己の場合は活性化（ある

いは活性保持)するが、サクラ属植物の花粉 S 因子は自己の S-RNase の活性化機能のみを持ち、非自己 S-RNase の不活性化機能は第3の分子種(自家不和合性共通因子)に委ねているものと考えられる。第3の分子種は雌ずい S 因子の S-RNase と相互作用し S-RNase 活性を阻害するか、あるいは SFB と相互作用し S-RNase を活性化するタンパク質であると推定することができる。しかしながら、その実体は不明である。

本研究は、これまでの研究によって発見されたこの第3の分子種をコードすると考えられる遺伝子の解析や花柱と花粉のタンパク質解析を通じて、第3の分子種を同定し解析していく予定である。この解析を通じて、バラ科サクラ属の S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性の認識機構の全貌を明らかにするとともに、得られた知見の園芸・育種的な利用を図る。

以上の通り、本研究は、未知の部分が多い植物の細胞間認識に関わる自家不和合性現象を分子レベルで解明しようとするものであり、得られた知見はバラ科サクラ属果樹の栽培現場における大きな障壁である自家不和合性現象を人為制御するための技術開発や育種法の開発に利用できるばかりでなく、進化遺伝学や植物生理学など基礎生物学にも貢献することになる。

3. 研究の方法

バラ科サクラ属の S 遺伝子座に座乗する SLFLs が S-RNase を非特異的に分解誘導する機能を担うジェネラルインヒビターであると想定した仮説を立てて、それを検証するために以下の実験を行った。

和合および不和合受粉を行ったウメの雌ずいの次世代シーケンシングによるトランスクリプトーム解析をした。

SLFLs と SFB の SCF 複合体形成能を免疫共沈降法により検討した。

SLFLs および SFB と S-RNase の相互作用を免疫共沈降法により検討した。

ペチュニアを用いた形質転換実験により SLFLs の機能解析を行った。

アグロバクテリウムによる形質転換の困難なサクラ属において遺伝子の機能解析を行うためにウイルスベクターを利用した遺伝子評価系の開発を検討した。

4. 研究成果

以下の実験結果はそのいずれもが、バラ科サクラ属の S 遺伝子座に座乗する SLFLs が S-RNase を非特異的に分解誘導する機能を担うジェネラルインヒビターであるとの仮説に矛盾する結果ではないが、一方で SLFLs がジェネラルインヒビターであることの確証を得るには至らなかった。

無受粉、和合受粉ならびに不和合受粉を行ったウメ、南高の雌ずいから RNA を抽出し、454 ならびに Illumina Genome Analyzer を用

いた mRNA-Seq によるトランスクリプトーム解析の結果、総計 40,061 のユニゾンが得られた。その中に、サクラ属と同じ S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性を示すナス科植物で不和合性反応の必須因子とされている HT-B や 120K のホモログ遺伝子は見られず、サクラ属果樹類の不和合性反応の特異性が明確となった。

サクラ属の S 遺伝子座領域に座乗する花粉で発現する F-box 遺伝子である SLFLs と花粉側因子の F-box 遺伝子である SFB はそのいずれもが、Cul1 および Skp1 と結合することが酵母のツーハイブリッド解析および免疫沈降実験によって示された。このことはプロテアソームによるタンパク質分解系がバラ科サクラ属の自家不和合性反応にも関与することを強く示唆するものであり、また同時に SLFLs が S-RNase のジェネラルインヒビターであることを示唆するものである。

SLFLs と S-RNase の結合が免疫共沈降実験により示された。また SLFL2 が他の SLFLs と比較して、より幅広い S-RNase と結合することが明らかになった。このことは SLFL2 がジェネラルインヒビターであることを強く示唆するものである。

S-RNase のジェネラルインヒビターであることが示唆される SLFLs を用いてペチュニアの形質転換実験を行い、その不和合性反応に変化が生じないかどうか検討したが、形質変化は全く見られなかった。サクラ属の SLFLs がナス科のペチュニアの S-RNase をうまく認識しないためにこのような結果が得られた可能性がある。

今後、アグロバクテリウム法による形質転換の困難なサクラ属果樹において、遺伝子の機能評価を行っていく必要があるため、リング小球形ウイルスを用いた virus induced gene silencing (VIGS) 法を検討し、phytoene desaturase の VIGS に成功した。

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8件)

Kawai, T., A. Gono, M. Nitta, N. Yamagishi, N. Yoshikawa, and R. Tao. 2016. Virus-induced gene silencing in various Prunus species with the Apple latent spherical virus vector. *Sci. Hort.* 199: 103-113.

Morimoto, T., T. Akagai, and R. Tao. 2015. Evolutionary analysis of genes for S-RNase-based self-incompatibility reveals S locus duplications in ancestral Rosaceae. *Hort. J.* 84: 233 - 242.

Hanada, T., A. Watari, T. Kibe, H. Yamane, A. Wunsch, T. M. Gradziel, Y. Sasabe, H. Yaegaki, M. Yamaguchi, and R. Tao. 2014. Two novel self-compatible S haplotypes in

peach (*Prunus persica*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 83: 203 - 213.

Habu, T. and R. Tao. 2014. Transcriptome analysis of self- and cross-pollinated pistils of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 83: 95 - 107.

Kawai, T., A. Gono, M. Nitta, M. Kaido, N. Yamagishi, N. Yoshikawa, and R. Tao. 2014. Virus-induced gene silencing in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and Japanese apricot (*P. mume* Siebold & Zucc.) with the Apple Latent Spherical Virus vector system. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 83: 23 - 31.

Matsumoto, D. and R. Tao. 2012. Yest two-hybrid screening for the general inhibitor detoxifying S-RNase in *Prunus*. *Acta Hort.* 967: 167 - 170.

Beppu, K., M. Kumai, H. Yamane, R. Tao, and I. Kataoka. 2012. Molecular and genetic analyses of the S-haplotype of the self-compatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lind.) 'Methley'. *J. Hort. Sci. & Biotech.* 87: 493-498.

Matsumoto, 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 Physiol.* 159: 1252 - 1262.

[学会発表](計16件)

森本拓也・Ana Wunsch・渡邊美佳子・赤木剛士・田尾龍太郎. 全ゲノムワイド連鎖・発現解析によるカンカオウトウにおける花粉側 non-S 自家和合化因子の探索園. 園芸学会平成 28 年度春季大会 (2016.3.26-27, 東京農業大)

Morimoto, T., T. Akagi and R. Tao. Evolutionary dynamics of the specificity determinant genes for the S-RNase-based self-incompatibility in the Rosaceae. XIV Eucarpia Fruit breeding and genetics symposium (June 14-18th, 2015, Bologna, Italy)

松本大生・田尾龍太郎. サクラ属の自家不和合性における general inhibitor 候補 SLFL1-3 のタンパク質間相互作用. 園芸学会平成 27 年度秋季大会 (2015.9.26-28, 徳島大)

森本拓也・赤木剛士・田尾龍太郎. サクラ属およびリンゴ亜連植物における S 遺伝子の進化系統解析. 園芸学会平成 27 年度秋季大会 (2015.9.26-28, 徳島大)

田尾龍太郎. バラ科サクラ属果樹類における S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性. 食品酵素化学研究会第 15 回学術講演会 (2015.9.12, 京都大)

赤木剛士・森本拓也・渡邊美佳子・田尾龍太郎. 花粉 F-box 遺伝子の進化様式から示さ

れたサクラ属特異的な自家不和合性機構の成立. 園芸学会平成 27 年度春季大会 (2015.3.28-29, 千葉大)

Kawai, T., M. Nitta, A. Gono and R. Tao. Development of ALSV-mediated VIGS in *Prunus* fruit trees. 7th Rosaceae Genomics Conference (June 24-26th, 2014, Seattle, USA)

Matsumoto, D. and R. Tao. Formation of the SCF complex with the F-box proteins encoded by genes linked to the S locus in *Prunus*. 7th Rosaceae Genomics Conference (June 24-26th, 2014, Seattle, USA)

Tao, R., M. Watanabe and T. Akagi. Phylogenetic analysis of F-box genes homologous to the pollen S determinant F-box genes in the S-RNase-based self-incompatibility system. 7th Rosaceae Genomics Conference (June 24-26th, 2014, Seattle, USA)

松本大生・田尾龍太郎. サクラ属の S 遺伝子座に連鎖する遺伝子にコードされた F-box タンパク質の SCF 複合体形成能の調査. 園芸学会平成 26 年度春季大会 (2014.3.29-30, 筑波大)

河井 崇・五ノ井彩子・山岸紀子・吉川信幸・海道真典・田尾龍太郎. リンゴ小球形潜在ウイルスベクターを用いたアズノの遺伝子機能評価系の開発. 園芸学会平成 25 年度春季大会 (2013.3.23-24, 東京農工大)

Matsumoto, D., H. Yamane, K. Abe and R. Tao. Identification of a Skp1-like protein interacting with SFB, the pollen S determinant of GSI in *Prunus*. 6th International Rosaceae Genomics Conference (Sep. 30 - Oct 4th, 2012, Mezzocorona-Palartari, Italy)

Kawai, T., E. Nagayama, T. Akagi, H. Yamane and R. Tao. Development of the ALSV-mediated gene evaluation system for *Prunus*. Plant and Animal Genome Conference XX (Jan. 14-18th, 2012, San Diego, USA)

松本大生・田尾龍太郎. バラ科サク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の解析. 園芸学会平成 24 年度春季大会 (2012.3.28-29, 大阪府立大学)

羽生 剛・尾畑智哉・田尾龍太郎. 不和合および和合受粉したウメ雌ずいの RNA-seq 解析. 園芸学会平成 24 年度春季大会 (2012.3.28-29, 大阪府立大学)

河井 崇*・長山枝里香・赤木剛士・山根久代・山岸紀子・吉川信幸・田尾龍太郎. リンゴ小球形潜在ウイルスベクターを用いたサクラ属果樹の遺伝子機能評価系の開発. 園芸学会平成 24 年度春季大会 (2012.3.28-29, 大阪府立大学)

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

京都大学アカデミックデイ 2015

<http://research.kyoto-u.ac.jp/academic-day/2015/19/>

京都大学農学研究科果樹園芸学研究室 WEB
ページ（日本語ページと英語ページ）

<http://www.pomology.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田尾龍太郎 (TAO, Ryutaro)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号： 1 0 2 1 1 9 9 7

(2) 研究分担者

山根久代 (YAMANE, Hisayo)

京都大学・農学研究科・講師

研究者番号： 8 0 3 3 5 3 0 4

羽生 剛 (HABU, Tsuyoshi)

愛媛大学・農学部・助教

研究者番号： 6 0 3 3 5 3 0 4

(3) 連携研究者

なし