

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24380004

研究課題名(和文)バラ科の異なる自家不和合性機構の比較解析～多因子非自己認識型と単因子自己認識型

研究課題名(英文) Different mechanisms of self-incompatibility in Rosaceae: non-self recognition by multiple factors type and self recognition by single factor type

研究代表者

佐々 英徳 (SASSA, Hidenori)

千葉大学・園芸学研究科・准教授

研究者番号：50295507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴにおいて、花粉で発現するSBP1とSSK1の相同遺伝子を単離し、MdSBP1およびMdSSK1と名付けた。これらと、リンゴSFBBタンパク質との相互作用を解析したところ、どちらのタンパク質もSFBBと結合することが判った。しかしさらなる解析により、MdSSK1の方がSFBBに強く結合し、更に遺伝子発現量も遥かにMdSBP1よりも高いことが示された。SFBBと強く結合し発現量も高いMdSSK1が、SFBBとともに主要な複合体を形成して自家不和合性機能に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pollen-expressed apple homologs of SBP1 and SSK1 were cloned and named MdSBP1 and MdSSK1, respectively, and subjected to further analyses. Both MdSBP1 and MdSSK1 interacted with SFBB. Further analyses showed that interaction of MdSSK1 with SFBB is stronger than that of MdSBP1, and that mRNA of MdSSK1 is much abundant than MdSBP1. Together, the results suggest that MdSSK1 containing SCFSFBB complex would play a major role in self-incompatibility in apple.

研究分野：遺伝・育種学

キーワード：自家不和合性 バラ科 花粉 雌ずい RNase F-box

1. 研究開始当初の背景

自家不和合性は、雌ずい側因子が S-RNase である RNase 型が最も進化的起源が古く、様々な分類群に広く分布しているとされている。バラ科においてはサクラ連（オウトウなど）では単一の花粉側因子 SFB が自己 S-RNase を認識する「単因子自己認識型」を示すが、興味深いことに我々は、ナシ連（ナシ、リンゴ）では複数の花粉側因子 SFBB が非自己の S-RNase を認識する「多因子非自己認識型」を示すことを見出した。だが、これら 2 タイプは分子レベルでどのように異なり、なぜバラ科に共存しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、ナシ連の「多因子非自己認識型」機構に関与する因子の特定と機能解析を進め「単因子自己認識型」との異同の分子基盤と、バラ科におけるこれらの 2 タイプの進化的関係を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

「多因子非自己認識型」の自家不和合性を示すナシ連の花粉側 S 因子の生物学的機能解析と生化学的機能解析を中心に行った。生物学的機能解析としては、タバコなどにナシ雌ずい側 S 因子 S-RNase と、花粉側 S 因子 SFBB を導入することで、S-RNase 発現雌ずいが対応する SFBB 発現花粉のみを受容する現象見られるかどうか、解析を試みた。また、自家不和合性の弱いナシ品種「なつひかり」を解析し、自家不和合性の弱い原因の特定を試みた。生化学的機能解析としては、組換え SFBB タンパク質を発現させ、相互作用するタンパク質の特定を試みた。

さらに、複数の花粉側 S 因子が S 遺伝子座領域に密接に連鎖して遺伝する基盤を解明するため、S 遺伝子座領域の細胞遺伝学的解析を行った。

4. 研究成果

ナシ花粉側 S 因子の生物学的機能解析を目的としてナシ S-RNase および SFBB 遺伝子をタバコに導入したが、対応するタンパク質を蓄積する形質転換体は得られなかった。原因は不明だが、ナス科植物を用いたバラ科自家不和合性遺伝子の生物学的機能解析は困難である可能性が示唆された。弱い自家不和合性を示すナシ品種「なつひかり」を解析したところ、S-RNase は遺伝子配列、mRNA およびタンパク質の蓄積量について、正常な自家不和合性を示す品種と同一であることが判った。花粉側 S 因子のうち既知の SFBB1-8 を解析したところ、これらの遺伝子も「なつひかり」のものと同様に自家不和合性を示す品種との間で違いは見られなかった。S 遺伝子座には更に未解析の SFBB が存在すると考えられるが、これらの結果は、「なつひかり」の弱い自家不和合性の原因は S 遺伝子座以外の因子が原因である可能性を示唆するものと思われた。

ナス科植物においては花粉側 S 因子である SLF とタンパク質間相互作用する因子として SBP1 (S-RNase binding protein 1) と SSK1 (SLF-interacting Skp1-like protein 1) が報告されていた。リンゴにおいて、花粉で発現するこれらの相同遺伝子を単離し、MdSBP1 および MdSSK1 と名付けた。これらと、リンゴ SFBB タンパク質との相互作用を解析したところ、どちらのタンパク質も SFBB と結合することが判った。しかし、競合的なタンパク質間相互作用解析と、遺伝子発現解析を行ったところ、MdSSK1 の方が SFBB に強く結合し、更に遺伝子発現量も遥かに MdSBP1 よりも高いことが示された。これらの結果から、SFBB と強く結合し発現量も高い MdSSK1 が、SFBB とともに主要な複合体を形成して自家不和合性機能に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。リンゴ S 遺伝子座領域の細胞遺伝学的解

析を行ったところ、S 遺伝子座は染色体の凝縮したヘテロクロマチン領域内にあることが示された。また、SFBB を含む複数の BAC クローンを用いて染色体スライドに対する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、SFBB の相対的配置は S ハプロタイプ間で異なることが示された。S 遺伝子座領域がヘテロクロマチン領域内にあり、さらに遺伝子の配列がハプロタイプ間で異なることは、ハプロタイプ間での組換えを抑制し、自家不和合性の遺伝的な安定性の維持に寄与しているものと考えられた。

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 5 件)

Sassa, H. Molecular mechanism of the S-RNase-based gametophytic self-incompatibility in fruit trees of Rosaceae. **Breed. Sci.** 66: 116-121 (2016)

Minamikawa, F. M., Koyano, R., Kikuchi, S., Koba, T. and *Sassa, H. Identification of SFBB-containing canonical and noncanonical SCF complexes in pollen of apple (*Malus × domestica*). **PLoS ONE** 9: e97642 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0097642

Minamikawa, F. M., Fujii, D., Kakui, H., Kotoda, N. and *Sassa, H. Identification of an S-RNase binding protein1 (SBP1) homolog of apple (*Malus × domestica*). **Plant Biotech.** 30: 119-123 (2013) DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.0109a

Kato, M., Kato, S. and *Sassa, H. Polyacrylamide gel electrophoresis of S-RNase fragments for identification of S-genotypes of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). **Breed. Sci.** 62: 348-351 (2012) doi:10.1270/jsbbs.62.000

Wang, S., Kakui, H., Kikuchi, S., Koba, T. and Sassa, H. Interhaplotypic heterogeneity and heterochromatic features may contribute to recombination suppression at the S locus in apple (*Malus × domestica*). **J. Exp. Bot.** 63: 4983-4990 (2012) doi:10.1093/jxb/err313

[学会発表](計 6 件)

Minamikawa, F.M., Koyano, R., Kikuchi, S., Koba, T., Sassa, H.

SFBB-containing canonical and noncanonical SCF complexes in pollen of apple (*Malus × domestica*). 23rd International Congress on Sexual Plant Reproduction. 2014 年 7 月 14 日 ポルト (ポルトガル)

平岡 崇志・南川 舞・加藤 雅樹・佐々英徳 弱い自家不和合性を示すニホンナシ品種 ' なつひ かり ' における花粉 S 遺伝子候補 SFBB の解析. 日本育学会 2013 年 10 月 13 日鹿児島大学(鹿児島県、鹿児島市)

佐々英徳・南川舞・角井宏行 パラ科果樹の自家不和合性における自己認識と非自己認識. 日本育学会 2013 年 10 月 13 日鹿児島大学(鹿児島県、鹿児島市)

南川舞・佐々英徳 リンゴ花粉側 S 因子候補 SFBB と SSK1 (Skp1-like1) および SBP1 (S-RNase binding protein1) のタンパク質間相互作用解析. 日本育学会 2013 年 10 月 13 日鹿児島大学(鹿児島県、鹿児島市)

南川舞・小谷野瑠璃子・藤井大輔・佐々英徳 リンゴにおける Cullin1 ホモログと MdSBP1 (*Malus × domestica* S-RNase binding protein1) のタンパク質間相互作用解析. 日本育学会 2012 年 9 月 15 日京都産業大学(京都府、京都市)

王三紅・角井宏行・菊池真司・木庭卓人・佐々英徳 リンゴ S 遺伝子座のハプロタイプ間配列多様性とヘテロクロマチン化. 日本育学会 2012 年 9 月 15 日京都産業大学(京都府、京都市)

[図書](計 1 件)

佐々英徳 (2013) 第 9 章 植物改造の過去・現在・未来. 「農学入門」安田弘法 他編著, 養賢堂, 東京, 221-246.

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々 英徳 (SASSA, Hidenori)
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号：50295507

(2) 研究分担者

牛島 幸一郎 (USHIJIMA, Koichiro)
岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授
研究者番号：20379720

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()