

研究種目：学術創成研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16GS0316

研究課題名（和文） 植物自家不和合性の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular basis of plant self-incompatibility

研究代表者

磯貝 彰 (ISOGAI AKIRA)

奈良先端科学技術大学院大学・学長

研究者番号：20011992

研究成果の概要:植物の多くは自家不和合性を有し、自殖を抑制することで遺伝的多様性を保持している。自家不和合性における自他識別の分子機構を、アブラナ科植物とナス科・バラ科植物を対象として解明することを目的とした。いずれの植物も1座位にコードされた花粉側および雌ずい側の認識分子を介して自他識別を行うという共通性が明らかにされると同時に、全く性質の異なる分子を利用して独自の自他識別機構を進化させてきた実態が明らかにされた。

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	77,500,000	23,250,000	100,750,000
2005年度	85,700,000	25,710,000	111,410,000
2006年度	79,900,000	23,970,000	103,870,000
2007年度	78,200,000	23,460,000	101,660,000
2008年度	81,200,000	24,360,000	105,560,000
総計	402,500,000	120,750,000	523,250,000

研究分野:生物系農学

科研費の分科・細目:農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード:植物、自家不和合性、分子認識、有性生殖、情報伝達

1. 研究開始当初の背景

植物の自家不和合性における自他識別反応は、基本的に *S* と名付けられた1つの遺伝子座に制御されていることが示されてきた。実際、アブラナ科植物とナス科・バラ科植物において、*S* 遺伝子座上にコードされた花粉側と雌ずい側の認識物質候補が各々同定されてきたが、それらがどのように相互作用して情報を伝え、自己の花粉の発芽・伸長を阻害しているのか、自家不和合性反応の全容は未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、アブラナ科植物とナス科・バラ科植物を対象として、花粉因子と雌ずい因子間の特異的相互作用から花粉の発芽・伸長停止に至るまでの自家不和合性反応の分子機構解明を目的とした。

3. 研究の方法

- (1)アブラナ科植物の花粉因子 SP11 と雌ずい因子 SRK 受容体複合体の相互作用解析と下流情報伝達因子の探索
- (2)和合・不和合性受粉時における雌ずい乳頭細胞内の生理変化の比較解析
- (3)シロイヌナズナの自家和合性の原因解明と

自家不和合性シロイヌナズナの作出

(4) 自家不和合性対立遺伝子間に認められる優劣性における劣性側対立遺伝子の特異的発現抑制機構の解析

(5) ナス科植物ペチュニアの花粉因子候補の探索と遺伝子導入試験、および雌ずい因子 S-RNase との相互作用解析

4. 研究成果

(1) アブラナ科植物では、SRK 受容体型キナーゼが、雌ずい乳頭細胞膜上で低親和性の単量体と高親和性の二量体の平衡状態にあり、花粉因子 SP11 との結合により活性型の二量体構造が安定化することが示唆された。また、自家和合性変異株の原因遺伝子の解析により見出された細胞質キナーゼ MLPK は、2つのアイソフォームを持つが、いずれも異なる機構で乳頭細胞膜上に局在し、SRK と受容体複合体を形成してその活性化を補助していることが示された。また、受粉後の遺伝子発現変動解析や酵母 Two-hybrid 法等の相互作用解析により SRK/MLPK 下流の情報伝達因子を探索した結果、複数の下流因子候補が選抜されてきた。これらの中には細胞内小胞輸送に関わる因子が複数含まれており、自家不和合受粉時に認められる乳頭細胞内の生理反応との関連が示唆された。

(2) 細胞骨格や Ca^{2+} 動態を on time に観察する系を構築して和合・不和合受粉時の乳頭細胞内の生理変化を解析した。その結果、和合受粉時には、花粉表層物質中に存在する何らかの因子の働きにより、花粉付着部位に向けてアクチンフィラメントの再編成が起き、 Ca^{2+} を含んだ水が乳頭細胞外へと移動することが示された。一方、自家受粉時の乳頭細胞では、花粉直下の部分においてアクチンフィラメントが消失し、管状の小胞構造が破壊される共に、細胞外への水の移動が停止することが示された。

(3) 近縁の自家不和合性種 *Arabidopsis halleri* の S 遺伝子座との比較解析により、欧州のシロイヌナズナ *A. thaliana* の多くの系統が SP11 遺伝子に 213-bp の逆位を持つことが示された。その内のいくつかの系統は機能性の SRK を保持していることが示され、シロイヌナズナはまずこの逆位が引き金となって自家不和合性が打破され、その変異が氷河期以降広範囲に拡散し優位に保持された実態が明らかになった。実際、この逆位を修正した SP11 遺伝子を導入すると、自家不和合性のシロイヌナズナを作出できることも証明された。

(4) アブラナ科の花粉因子 SP11 は、孢子体 (2n) である葯タペト組織で作られるため、花粉は基本的に 2 種類の S ハプロタイプを表現型として持つ (共優性)。しかし、特定の S ハプロタイプの組み合わせでは片側の S ハプロタイプの表現型しか示さない花粉が生じる場合がある (優劣性)。この優劣性の発現機構を解析した結

果、劣性側の S ハプロタイプの SP11 プロモーター領域が葯において特異的に DNA メチル化修飾を受けていることが示された。また、このメチル化には、優性側の S ハプロタイプ由来の small RNA が関与していることが示唆された。

(5) ナス科植物ペチュニアの花粉因子 SLF の同定を進めたところ、雌ずい因子の S-RNase 遺伝子と組み換えを起こさない S 遺伝子座領域に 8 種類以上の SLF 様因子がコードされており、いずれも花粉および花粉管で特異的に発現していることが確認された。また、形質転換実験と S-RNase との相互作用解析により、これら SLF 様因子が、分担して非自己の S-RNase の認識に当たっていることが示唆された。

以上述べてきた様に、アブラナ科植物の自家不和合性については、花粉因子の受容から花粉の吸水阻害に至るまでの自家不和合性反応の全体像をかなり明確にすることが出来た。植物は、極めて多くの受容体型キナーゼを有し、外界の様々な情報を細胞内に伝えているにも関わらず、情報伝達経路の解明は遅れている。本系が情報伝達解明に向けた優れたモデル系となることが期待される。また、対立遺伝子間の優劣性制御に関して、全く新しい機構の存在を提示することが出来た。本研究は、優劣性という古典的な遺伝学の現象にエピジェネティックな遺伝子発現制御が関与する例を初めて見出した点で世界的に注目されている。ポストゲノム研究によりヒトなどにおいても片側の対立遺伝子のみ発現する例が極めて多いことが示されてきており、本研究がこうした遺伝子発現制御機構解明の手がかりとなることが期待される。

ナス科植物の自家不和合性においては、複数の SLF 様因子が分担して非自己の S-RNase の認識に関与する可能性を初めて明らかにした。植物における、動物の免疫系にも似た非自己認識システムの存在を示唆する新たな研究成果として、植物以外の研究領域からも注目されるものと期待される。

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 23 件)

① Isokawa, S., Osaka, M., Shirasawa, A., Kikuta, R., Komatsu, S., Horisaki, A., Niikura, S., Takada, Y., Shiba, H., Isogai, A., Takayama, S., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M., Novel self-compatible lines of *Brassica rapa* L. isolated from the Japanese bulk-populations. *Genes Genet. Syst.*, 2010, in press, 査読有

② Tsuchimatsu, T., Suwabe, K., Shimizu-Inatsugi, R., Isokawa, S., Pavlidis, P.,

Stadler, T., Suzuki, G., Takayama, S., Watanabe, M., and Shimizu, K.K. Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene. *Nature*, 464, 1342–1346, 2010, 査読有

③ Iwano, M., Entani, T., Shiba, H., Kakita, M., Nagai, T., Miyawaki, A., Shoji, T., Kubo, K., Isogai, A., and Takayama, S., Fine-tuning of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiol.*, 150, 1–13, 2009, 査読有

④ Iwano, M., Shiba, H., Matoba, K., Miwa, T., Funato, M., Entani, T., Nakayama, P., Shimosato, H., Takaoka, A., Isogai, A., and Takayama, S. Actin dynamics in papilla cells of *Brassica rapa* during self- and cross-pollination. *Plant Physiol.*, 144, 71–81, 2007, 査読有

⑤ Kakita, M., Murase, K., Iwano, M., Matsumoto, T., Watanabe, M., Shiba, H., Isogai, A., and Takayama, S. Two distinct forms of *M*-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with *S*-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell*, 19, 3961–3973, 2007, 査読有

⑥ Shimosato, H., Yokota, N., Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., Che, F.-S., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. Characterization of the SP11/SCR high-affinity binding site involved in self/nonself recognition in *Brassica* self-incompatibility. *Plant Cell*, 19, 107–117, 2007, 査読有

⑦ Kakita, M., Shimosato, H., Murase, K., Isogai, A., and Takayama, S., Direct interaction between *S*-locus receptor kinase and *M*-locus protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Plant Biotechnol.*, 24, 185–190, 2007, 査読有

⑧ Shiba, H., Kakizaki, T., Iwano, M., Tarutani, Y., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. Dominance relationships between self-incompatibility alleles controlled by DNA methylation. *Nature Genet.*, 38, 297–299, 2006, 査読有

⑨ Kakizaki, T., Takada, Y., Fujioka, T., Suzuki, G., Satta, Y., Shiba, H., Isogai, A., Takayama, S., and Watanabe, M., Comparative analysis of the *S*-intergenic region in class-II *S* haplotypes of self-incompatible *Brassica rapa* (syn. *campestris*). *Genes Genet. Syst.*, 81, 63–67, 2006, 査読有

⑩ Takada, Y., Nakanowatari, T., Sato, J., Hatakeyama, K., Kakizaki, T., Ito, A., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A., and Watanabe, M., Genetic analysis of novel intra-species unilateral incompatibility in

Brassica rapa (syn. *campestris*) L.. *Sex. Plant Reprod.*, 17, 211–217, 2005, 査読有

⑪ Iwano, M., Shiba, H., Miwa, T., Che, F.-S., Takayama, S., Nagai, T., Miyawaki, A., and Isogai, A., Ca²⁺ dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 136, 3562–3571, 2004, 査読有

[学会発表] (計 115 件)

① Takayama, S., Self-incompatibility signaling in the Brassicaceae, International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction, Nara, March 11–12, 2010.

② Tsuchimatsu, T., Suwabe, K., Shimizu-Inatsugi, R., Isokawa, S., Pavlidis, P., Städler, T., Suzuki, G., Takayama, S., Watanabe, M., and Shimizu, K. K., Evolution of breeding systems in *Arabidopsis* relatives, International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction, Nara, March 11–12, 2010.

③ Shiba, H., Kayabe, T., Yano, K., Yazaki, J., Chen, H., Isogai, A., Ecker, J.R., and Takayama, S., Genome-wide analyses of allele-specific expression and DNA methylation in *Arabidopsis* species, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology “RNA Silencing Mechanisms in Plants”, Santa-Fe, February 21–26, 2010.

④ Takayama, S., Self-incompatibility signaling in *Brassica*, Symposium “Pollen/Self-incompatibility” in 9th International Plant Molecular Biology (IPMB), St. Louis, USA, October 25–30, 2009.

⑤ Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S., Regulation of dominance relationships between self-incompatibility alleles via de novo DNA methylation, 9th International Plant Molecular Biology (IPMB), St. Louis, USA, October 25–30, 2009.

⑥ Iwano, M., Matoba, K., Hasegawa, T., Takaoka, A., Isogai, A., Takayama, S., Three dimensional analysis of the vacuolar structure in papilla cells during self- and cross-pollination in Brassicaceae. 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology 2009, Kobe, September 16–18, 2009.

⑦ Suwabe, K., Isokawa, S., Shirasawa, A., Takada, Y., Suzuki, G., Isogai, A., Takayama, S., and Watanabe, M., Genetic characterization of self-compatible mutants in *Brassica rapa*, Plant Biology 2009, Hawaii, USA, July 17–23, 2009.

⑧ Iwano, M., Shiba, H., Matoba, K., Takaoka, A., Isogai, A., and Takayama, S., Actin dynamics in papilla cells of *Brassica rapa* during self- and cross-pollination, 9th Asia Pacific Microscopy Conference, Jeju, Korea, November 2–7, 2008.

⑨ Kubo K., Entani T., Kawashima S., Iwano M., Isogai, A., and Takayama S., Identification and characterization of the *S*-locus linked F-box genes in petunia hybrida, 8th International Congress of Plant Molecular Biology, Adelaide, Australia, August 20-25, 2006.

⑩ Takayama, S., and Isogai, A., *S* receptor kinase signaling in the *Brassica* self-incompatibility, Protein Phosphorylation in Plant Signaling 2005, Tsukuba, October 20-21, 2005.

[図書] (計 14 件)

① Kaothien-Nakayama, P., Isogai, A., and Takayama, S., Self-incompatibility systems in flowering plants, in “Plant Developmental Biology- Biotechnological Perspectives, Vol. 1”, Springer, pp. 459-485, 2009.

② Watanabe, M., Suzuki, G., and Takayama S., Milestones identifying self-incompatibility genes in *Brassica* species: from old stories to new findings, in “Self-Incompatibility in Flowering Plants”, Springer-Verlag, pp. 151-172, 2008.

③ 柴博史, 高山誠司, 対立遺伝子間の優劣性発現調節, 植物のエピジェネティクス, 植物細胞工学シリーズ 24, 秀潤社, pp. 120-128, 2008.

④ 渡辺正夫, 鈴木剛, 柴博史, 高山誠司, アブラナ科植物の自家不和合性にみられる花粉側優劣性発現機構とDNAメチル化. 生物の科学 遺伝別冊, 21, 株式会社エヌ・ティー・エス, pp. 225-229, 2007.

⑤ 柴博史, 渡辺正夫, 高山誠司, 自家不和合のエピジェネティックな制御機構. 植物の生長調節, 42, 植物化学調節学会, 113-120, 2007.

⑥ Watanabe, M., Suzuki, G., Shiba, H., and Takayama, S., Molecular mechanisms of self-incompatibility in Brassicaceae, in “Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1st Edition)”, Global Science Books, pp. 552-555, 2006.

⑦ Takayama, S., and Isogai, A., Self-incompatibility in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, pp. 467-489, 2005.

[その他]

ホームページアドレス

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯貝 彰 (ISOGAI AKIRA)

奈良先端科学技術大学院大学・学長

研究者番号:20011992

(2)研究分担者

柴 博史 (SHIBA HIROSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・

バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号:20294283

岩野 恵 (IWANO MEGUMI)

奈良先端科学技術大学院大学・

バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号:50160130

円谷 徹之 (ENTANI TETSUYUKI)

奈良先端科学技術大学院大学・

バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号:50379533

渡辺 正夫 (WATANABE MASAO)

東北大学大学院・生命科学研究所・教授

研究者番号:90240522

蔡 晃植 (CHE FANG-SIK)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・

教授

研究者番号:00263442

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

(3)研究協力者

清水 健太郎 (SHIMIZU KENTARO)

チューリッヒ大学・理学部・准教授