

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15208

研究課題名(和文) アブラナ科植物における受粉時不和合性を支配する新たなリガンド・受容体分子の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel ligand-receptor set controlling pollen-stigma incompatibility in Brassica

研究代表者

高田 美信 (Takada, Yoshinobu)

東北大学・生命科学研究科・技術専門職員

研究者番号：30451610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アブラナ科植物*B. rapa*における日本とトルコ由来系統間で特異的に引き起こされる一側性不和合性を支配する柱頭認識因子SU11、花粉認識因子PU11の単離解析について報告した。さらにSU11遺伝子の配列多型解析から機能型のSU11遺伝子が日本で栽培される多くの白菜品種中に存在することを示した。また、花粉側因子PU11は、自家不和合性の花粉側認識因子SP11とは異なり、主として花粉自体で発現し、配偶体的に機能する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アブラナ科植物の育種・採種現場においては、花粉と柱頭間の情報伝達・認識機構の結果として起こる不和合性は非常に重要な形質である。本研究で対象としたアブラナ科植物の新規一側性不和合性機構の解析により、より詳細な人為的受粉受精制御が可能となる。本研究によりもたらされた日本品種内での遺伝子多型情報は、直接国内のアブラナ育種研究者にとって有益な情報となると考えられる。さらに進化的側面からも同一種内でありながら他者を認識し、拒絶するこの機構の解析は興味深いものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we reported isolation and characterization of stigma recognition factor SU11 and pollen recognition factor PU11 that control unilateral incompatibility occurs between Japanese and Turkish strains in the *B. rapa*. Furthermore, sequence polymorphism analysis of the SU11 genes showed that the functional SU11 genes are present in many Chinese cabbage varieties grown in Japan. In addition, the pollen side factor PU11 was mainly expressed in the pollen itself, unlike the SP11 which is the pollen side recognition factor of self-incompatibility, and it was revealed that it may function as a gametophytically.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：アブラナ科植物 自家不和合性 一側性不和合性 花粉・柱頭情報伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多くの高等生物は、有性生殖により、集団の遺伝的多様性を維持すると同時に、種の同一性を維持することで進化してきた。自ら動いて生殖することの出来ない植物にとって、無作為に運ばれてくる花粉の中から適切な交雑相手を選択することは、種の存続に極めて重要である。そのため、植物は交雑相手を選別するための様々な機構を発達させてきた。なかでも、自己と非自己の花粉を識別し自殖を避ける自家不和合性(self-incompatibility, SI)は、種内の遺伝的多様性を維持するための重要な形質であり、多くの研究がなされてきた。アブラナ科植物の自家不和合性は、S 遺伝子座上に存在する、柱頭側因子である受容体型キナーゼをコードする SRK と、花粉側因子であるリガンドペプチドをコードする SP11 によって制御されている。

一方で、種間不和合性もまた種の同一性を維持するための重要な形質である。種間不和合性は多くの場合、自家和合性(SC)種の雌蕊は SI 種の花粉を受け入れるのに対し、その逆は不和合になるといった一側性不和合性(Unilateral incompatibility, UI)として観察されている。そして近年我々は、アブラナ科植物において、日本由来系統とトルコ由来系統間に種内での一側性不和合性を示す組み合わせが発見されている。この種内一側性不和合性は、花粉側リガンド PUI1、柱頭側受容体型キナーゼ SUI1 を単離同定していた(図 1)。PUI1、SUI1 は SI 花粉側因子 SP11、柱頭側因子 SRK に類似した構造をもち、SP11、SRK を含む S 遺伝子座の遺伝子重複の結果生み出されたものと考えられた。さらに、Arabidopsis 属に SUI1-PUI1 領域が存在しないことも明らかになっていることから、S 遺伝子座の遺伝子重複は Arabidopsis 属と Brassica 属が分化したのちに起こったと考えられた。自家不和合性認識因子の遺伝子重複とそれによる他者認識機構の形成は、アブラナ科植物の進化を紐解く上で一つのヒントになり得る現象であった。

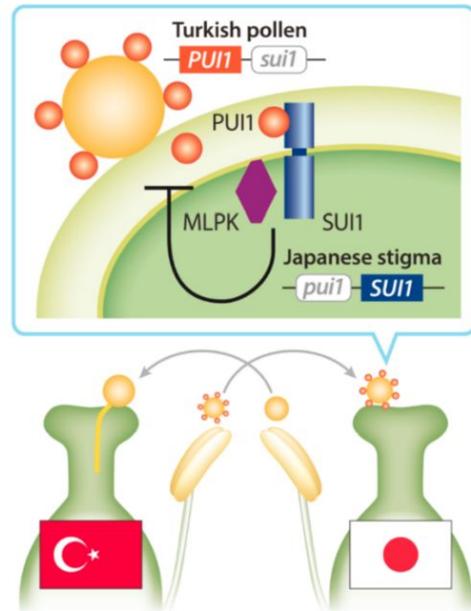


図 1 B. rapa における UI 認識モデル

### 2. 研究の目的

本研究は、アブラナ科植物(B. rapa)における新規な種内一側性不和合性の認識制御機構を解明することにより、植物の受粉反応時において自家不和合性とは異なる雌雄情報伝達に関する新機軸を構築し、花粉と柱頭間の細胞間情報伝達機構の全体像を解明するという構想に沿ったものである。柱頭側・花粉側両制御因子をそれぞれ単離済みであり、機能証明を含めて報告するとともに、両因子の認識特異性・遺伝子多型、ならびに花粉側因子の優劣性の決定機構の解明を行う。

### 3. 研究の方法

PUI1/pui1ヘテロ個体が UI を示さない原因、つまり PUI1 の優劣性発現機構解明のため、詳細な発現解析を行う。さらに核相 n である花粉粒と 2n である葯組織に分離し、PUI1 の発現解析を行う。SP11 同様の発現抑制が確認された場合には、葯組織における bisulfite sequence 解析、small RNA sequence を行う。SUI1、PUI1 遺伝子の B. rapa 種内多型性を調査するとともに、各遺伝子型の系統化し、検定交配を行うことで、異常な不和合性反応の有無を確認する。

### 4. 研究成果

PUI1 の発現量解析より、PUI1-1/pui1-6ヘテロ個体において PUI1-1 の発現が抑制されているという結果は得られなかった。この結果から、PUI1 が配偶体的に機能する可能性が考えられた。つまり、PUI1 が配偶体的に機能する場合、PUI1 はタペート細胞ではなく花粉粒において発現するはずである。初めに、PUI1 のプロモーター解析を行うため、PUI1 プロモーター領域を単離し、GUS 遺伝子を連結したコンストラクトを構築した。これを B. rapa および A. thaliana に形質転換を行い、GUS 染色する

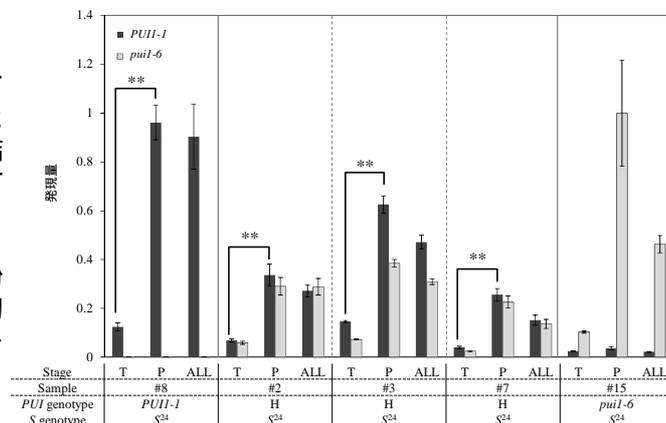


図 2 qRT-PCR による葯組織・花粉粒・葯全体における PUI1 の発現解析

ことで、GUS 遺伝子の発現を観察したところ、PUII プロモーターは花粉粒およびタペート細胞において活性を示した。次に、葯組織と花粉粒を分離し、それぞれから抽出した RNA を用いて qRT-PCR を行うことで、葯組織、花粉粒、葯全体での PUII-1、pui1-6 の発現量を確かめた。結果、各個体において PUII は花粉粒において最も発現しており、タペート細胞を含む葯組織において発現量は少量であった (図 2)。よって、PUII は花粉粒において強く発現し、配偶体的に機能している可能性が示唆された。現在までに明らかになっている機能型の PUII アレルは一種類のみである。PUII が配偶体的機能を持つ場合、花粉側から遺伝する機能型アレルは、後代に遺伝しないこととなる。つまりこの PUII アレルが集団内に存在し続けるためには、複数のアレルペアが存在するもしくは存在したと考えるられる。今後、配偶体型制御の程度を遺伝分析によって確認することが必要である。

表 1 ハクサイ品種の SUI 表現型

番号	種苗会社	品種名	表現型
1	トキタ	舞の海	SUI
2	タキイ	ブチヒリ	SUI
4	サカタ	黄味小町	SUI
5	タキイ	チヒリ70	sui
6	タキイ	晩輝	SUI
8	クラギ	花心白菜	SUI
9	ワタナベ	めんこい	SUI
11	カネコ	黄月77	SUI
14	カネコ	菜黄	SUI
16	カネコ	萌黄	SUI
17	カネコ	かすみ白菜	sui
19	ワタナベ	ストロングCR75	SUI
33	宇治	力(ちから)	SUI
35	大和農園	黄よろこび白菜	SUI
43	タキイ	黄ごころ75	SUI
49	みかど協和	CR黄健	SUI
50	みかど協和	白菜白菜	sui
58	イシイ	CR清雅65	SUI
63	タキイ	無双	SUI
74	トーホク	大福	SUI
80	ナント	CR金鱈75	SUI
83	ナント	耐性アポロ	sui
84	日本農林	黄久娘65	SUI
88	日本農林	スーパーCR新理想	sui

次に、SUI1, PUI1 の *B. rapa* 種内における多型性を調査した。日本国内のハクサイ 52 品種、コマツナ 5 品種、カブ 5 品種について、SUI1 の表現型・遺伝子型を明らかにし、約 90% の品種に機能的な SUI1 が保持されていることを明らかにした。白菜の代表的品種を表 1 に示した。これら品種について、SUI1 遺伝子型を単離解析したところ、SUI 表現型を持つ品種はすべて機能型アレルである SUI1-2 を有していた。また、解析した品種のうち、sui 表現型 (PUI 花粉に対して不和合性) を示した 5 品種のうち、チヒリ 70 (タキイ種苗) は SUI1 の第 6 エキソンに 10 b p の挿入のため、フレームシフトが生じる不完全な SUI1 をコードしていたため、非機能型であると判断した。興味深いことに、かすみ白菜 (カネコ種苗)、白菜白菜 (みかど協和種苗)、耐性アポロ (ナント種苗) は機能型の SUI1-2 と新規に単離した SUI1-10 アレルとのヘテロ接合

であることが分かった。SUI1 は通常優性の機能を持つことが明らかになっているが、これら 4 品種は表現型が発現しなかった。SUI1-10 は SUI1 のタンパク質構造上、重要な役割を持つと考えられる細胞外領域の 12 個のシステインの最後システインに対する 1 アミノ酸置換が起こっていた。さらに、耐性アポロの自殖後代の遺伝分析により、SUI1-10/SUI1-10 ホモ個体、SUI1-2/SUI1-10 ヘテロ個体では SUI 表現型が現れないことを見出した。つまり、SUI1-10 アレルは機能型の SUI1-2 に対してドミナント・ネガティブ効果を示すことが明らかになった。この結果は、SUI1 が自家不和合性の自他認識因子である SRK と同様に二量体で機能することを示唆するものである。本研究成果の応用により、これまでに報告のない、SRK のドミナント・ネガティブアレルの作成、さらには自家不和合性によって育成された F<sub>1</sub> 世代において自家和合性となる新品種を作り出すことが可能であろうと考えられる。

本研究期間内にアブラナ科植物の受粉時における柱頭・花粉側の両認識因子である、それぞれ SUI1, PUI1 を基軸とした認識機構と花粉拒絶機構の実態を明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Takada, Y. et al. (2017) Duplicated pollen-pistil recognition loci control intraspecific unilateral incompatibility in *Brassica rapa*. *Nature plants*, 3(7): 17096. DOI:10.1038/nplants.2017.96 < 査読有 >

高田美信, 鈴木 剛, 渡辺正夫 (2017) アブラナ科植物において自他を認識する遺伝子の遺伝子重複と相互の機能喪失により生じた新たな生殖障壁. *ライフサイエンス新着論文レビュー* DOI:10.7875/first.author.2017.074 < 査読無 >

高田美信, 鈴木剛, 渡辺正夫 (2017) コマツナ栽培品種とトルコ由来系統間の交雑に生じた一側性不和合性の認識機構. *アグリバイオ* 1: 60-62. < 査読無 >

[学会発表](計 11 件)

佐藤優衣, 高田美信, 和田七夕子, 高山誠司, 鈴木剛, 渡辺正夫 (2019) *Brassica rapa* における種内一側性不和合性を支配する花粉側因子 PUI1 の遺伝子発現機構の解析. 日本育種学会 135 回講演会, 千葉市, 2019/03/16-17.

Takada, Y., Murase, K., Shimosato-Adano, H., Sato, T., Nakanishi, H., Suwabe, K., Shimizu, K. K., Lim, Y. P., Takayama, S., Suzuki, G., and Watanabe, M. (2018) Novel unilateral incompatibility in *Brassica rapa* is regulated by duplicated self-incompatibility genes, PUI1 and SUI1. International Plant & Animal Genome XXVI, San Diego, USA, 2018/01/13-16.

村瀬浩司, 森智行, 劉瀟, 真坂知帆, 平野良憲, 浅野(下里)裕子, 高田美信, 渡辺正夫, 磯貝彰, 箱嶋敏雄, 高山誠司 (2018) アブラナ科植物の自家不和合性におけるリガンド受容体複合体の結晶構造. 日本農芸化学会 2018 年度名古屋大会, 名古屋市, 2018/03/15-19

大畠麻由, 高田美信, 村瀬浩司, 柴博史, 高山誠司, 鈴木剛, 渡辺正夫 (2018) *Brassica rapa* における *MLPK* 非依存的な自家不和合性機構. 日本育種学会第 133 回講演会, 福岡市, 2018/03/25-26.

佐藤優衣, 高田美信, 大坂正明, 高山誠司, 鈴木剛, 渡辺正夫 (2018) *Brassica rapa* の一側性不和合性花粉側因子 *PUI1* の発現解析. 日本育種学会第 133 回講演会, 福岡市, 2018/03/25-26.

Takada, Y., Murase, K., Shimosato-Asano, H., Sato, T., Nakanishi, H., Mihara, A., He, Y., Suwabe, K., Shimizu, K. K., Lim, Y. P., Takayama, S., Suzuki, G., and Watanabe, M. (2018) Inter-ecotype pollen-stigma incompatibility is determined by duplicated self-recognition genes in *Brassica rapa*. The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction, 岐阜市, 2018/06/12-15

高田美信, 鈴木剛, 村瀬浩司, 浅野(下里)裕子, 佐藤陽洋, 中西ほのか, 諏訪部圭太, Lim Yong Pyo, 清水健太郎, 高山誠司, 渡辺正夫 (2017) *Brassica rapa* の種内一側性不和合性を制御する SUI1-PUI1 遺伝子. 日本植物細胞分子生物学会, さいたま市, 2017/08/29-31.

高田美信, 鈴木剛, 中西ほのか, 村瀬浩司, 浅野(下里)裕子, 佐藤陽洋, 諏訪部圭太, Lim Yong Pyo, 清水健太郎, 高山誠司, 渡辺正夫 (2017) 自己花粉を認識するリガンド・レセプター遺伝子セットの重複が非自己花粉の拒絶を引き起こす. 日本遺伝学会, 岡山市, 2017/09/13-16.

高田美信, 中西ほのか, 村瀬浩司, 浅野(下里)裕子, 佐藤陽洋, Yong Pyo Lim, 清水健太郎, 高山誠司, 諏訪部圭太, 鈴木剛, 渡辺正夫 (2017) *Brassica rapa* の A04 染色体には新規生殖障壁遺伝子が存在する. 日本染色体学会. 東広島市, 2017/10/5-7.

高田美信, 村瀬浩二, 浅野(下里)裕子, 佐藤陽洋, 中西ほのか, 諏訪部圭太, Lim Yong Pyo, 清水健太郎, 高山誠司, 鈴木剛, 渡辺正夫 (2017) *Brassica rapa* の種内一側性不和合性を支配する花粉・柱頭認識因子の決定. 日本育種学会第 132 回講演会, 盛岡市, 2017/10/07-08.

Takada, Y., Murase, K., Shimosato-Adano, H., Sato, T., Nakanishi, H., Suwabe, K., Shimizu, K. K., Lim, Y. P., Takayama, S., Suzuki, G., and Watanabe, M. (2017) Identification and characterization of the novel pollen-stigma recognition factors for unilateral incompatibility in *Brassica rapa*. Taiwan-Japan Plant Biology 2017, Taipei, Taiwan, 2017/11/3-6.

〔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

## 6．研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：渡辺 正夫  
ローマ字氏名：Masao Watanabe

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。