

平成 22 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380020
 研究課題名 (和文) ニホンナシ自家不和合性を制御する S 遺伝子座の分子遺伝学的・組織学的解剖
 研究課題名 (英文) Molecular genetical and cytological analyses on S-locus controlled self-incompatibility in Japanese pear
 研究代表者
 安田 剛志 (高崎 剛志) (TAKASAKI-YASUDA TAKESHI)
 神戸大学・農学研究科・准教授
 研究者番号：30314511

研究成果の概要 (和文)：

ニホンナシの自家不和合性は S 遺伝子座の雌しべ側 S 遺伝子である *S-RNase* と花粉側 S 遺伝子によって制御されている。本研究では、*S-RNase* 周辺領域に S ハプロタイプ間で異なるアミノ酸配列をもつ F-box タンパク質がクラスターを形成し、そのうちの数個が花粉側 S 候補となることを示唆した。また、S-RNase が和合・不和合花粉管の両方に取り込まれること、花柱内の不和合花粉管が伸長停止に向かう過程を組織学的に明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Japanese pear exhibits self-incompatibility, which is controlled by the pistil *S* gene encoding a ribonuclease (*S-RNase*) and the pollen *S* gene at the *S*-locus. In this study, The F-box protein genes that were polymorphic between haplotypes were clustered around *S-RNases*. Among them, some were good candidates for pollen *S* possibly, Using the cytological approaches, we revealed *S-RNase* uptake in compatible and incompatible pollen tube, and the process of incompatible-pollen tube arrest in style.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2008 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：自家不和合性、ニホンナシ、S-RNase、花粉側 S 遺伝子、F-box タンパク質

1. 研究開始当初の背景

バラ科果樹は S ハプロタイプにより制御される配偶体型自家不和合性を示し、不和合花粉管は花柱の花粉管誘導組織内で伸長を停止する。不和合・和合 (自己・非自己) 花

粉の認識は、雌しべと花粉間の自他認識は雌しべ側 S 遺伝子産物である S-RNase と花粉側 S 遺伝子産物の相互作用により起こる。サクラ亜科では、花粉側 S としてユビキチン/プロテアソーム分解系に關与する F-box

タンパク質遺伝子 (*SFB/SLF*) が *S-RNase* の近傍に同定されて、*S-RNase* 依存型自家不和合性の認識モデルとして、*SFB/SLF* による 26S プロテアソームを介した非自己 *S-RNase* 分解系が提案されている。

ナシ亜科 (ナシ, リンゴ) の花粉側 *S* も F-box タンパク質遺伝子であると考えられるが、未だ同定されていない。我々は、ニホンナシ花粉側 *S* をポジショナルクローニングするため、‘二十世紀’ (*S2S4*) 由来の *S4* ホモ系統から BAC ライブラリーを作製した。PCR スクリーニングによる *S4-RNase* を起点とした染色体歩行を行い、*S4-RNase* の上流 395 kb と下流 615 kb をカバーする *S4* BAC コンティグを構築した。‘二十世紀’ (*S2S4*) の枝変わり種で、自家和合性の ‘おさ二十世紀’ (*S2S4sm*) の *S4sm* は *S4-RNase* を欠失し、*S4* の雌しべ側機能を喪失しているが、花粉側機能を保持している。*S4sm* は *S4-RNase* を含む 236kb を欠失していた。この欠失領域には 1 個の F-box タンパク質遺伝子 (*S4F-box0*) が見出されたが、花粉側 *S4* は欠失領域外に存在すると考えられた。

バラ科果樹と同じ *S-RNase* 依存型自家不和合性を示すナス科植物では、*S-RNase* は非 *S* 特異的に花粉管内に取り込まれ、不和合性反応に必須な HT-B と 120K タンパク質ともに液胞に蓄積される。不和合反応では *S-RNase* が液胞から放出された後、花粉管の rRNA を分解することで、花粉管伸長が停止すると考えられている。*S-RNase* 依存型自家不和合性の自他認識機構の解明には細胞組織を包括した解析が求められている。

2. 研究の目的

花粉側 *S* 産物は自己・非自己 *S-RNase* を識別するため、*S* ハプロタイプ間で多型性を有する。すなわち、アミノ酸配列の変異に富んだ領域を保持しなければならない。本研究では、*S4sm* の欠失領域外に存在する F-box タンパク質遺伝子を探索すると同時に、*S2* と *S3* 遺伝子座ゲノム構造を解析し、*S4* を含めた 3 つのハプロタイプ上の F-box タンパク質遺伝子の発現パターン・アミノ酸配列の比較から、花粉側 *S* を同定することを目的とした。一方で、不和合花粉管の伸長停止過程と *S-RNase* の花粉管への取り

込み、および花粉管内挙動を (免疫) 電子顕微鏡観察した。

3. 研究の方法

(1) *S* 遺伝子座のゲノム構造解析

‘長十郎’ (*S2S3*) の核 DNA を *HindIII* で部分消化した後、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) で分画した。145-205 kb 断片を CopyControl pCC1BAC Cloning-Ready vector (Epicentre) にライゲーション後、大腸菌に形質転換し、‘長十郎’ の BAC ライブラリーを作製した。

S-RNase 特異的プライマーを用いた PCR により、*S-RNase* を含む BAC クローンを単離した。BAC クローンの両末端配列から設計したプライマーセットを用いた PCR による染色体歩行を行い、*S2* および *S3-RNase* 周辺領域の BAC コンティグを構築した。

S2、*S3*、*S4-RNase* 周辺領域をカバーする BAC プラスミドを *HindIII* あるいは *EcoRI* で切断後、pBluescript II SK+ ベクターにライゲーションし、サブクローニングした。これらサブクローンの塩基配列をプライマーウォーキングにより決定した後、アセンブルしてクローン同士を連結するとともに、ギャップ領域を PCR で増幅して塩基配列を完全に決定した。

GENSCAN により *S-RNase* 周辺領域の BAC コンティグ配列中のオープンリーディングフレーム (ORF) を予測した。ORF を BLASTX により相同性検索し、F-box タンパク質遺伝子を特定した。各 F-box タンパク質遺伝子の花粉特異的発現を成熟花粉、花柱と葉 total RNA を鋳型にした RT-PCR により解析した。

(2) 和合・不和合花粉管先端部における微細構造の変化と *S-RNase* の局在

S3、*S4* と *S9* ホモ系統の花を供試材料として用いた。*S4* 雌しべに *S4* 花粉 (不和合) あるいは、*S9* 花粉 (和合) を受粉した 12 時間後の花柱を 2.5% グルタルアルデヒド・1% 四酸化オスミウムで二重固定した。脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。花柱縦断面の連続厚切り切片を作製し、アニリンブルー・カルコフローの二重染色より花粉

管先端部を含む切片を特定した。花粉管先端付近が確認された前後の切片をエポキシ樹脂に倒立包埋し、超薄切片を作製した。塩化ハフニウム・酢酸鉛染色後、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

ニホンナシ *S3* ホモ系統の雌しべに *S4* 花粉 (和合) あるいは, *S3* 花粉 (不和合) を受粉した 12 時間後の花柱をパラフォルムアルデヒド・グルタルアルデヒドで固定

により 89 個の ORF が予測され, BLASTX による相同性検索の結果, 61 個がデータベース上のタンパク質と有意な相同性を示した。ORF うち, *S4F-box0* の他に 5 個の ORF が F-box タンパク質と高い相同性を示した。これらのいずれも約 400 アミノ酸をコードしており, N 末端に F-box ドメイン, C 末端に FBA_1 ドメインを持つ典型的な F-box タンパク質であることから, *S4F-box1*~*5* と名付けた。 *S4F-box1*~*5* は

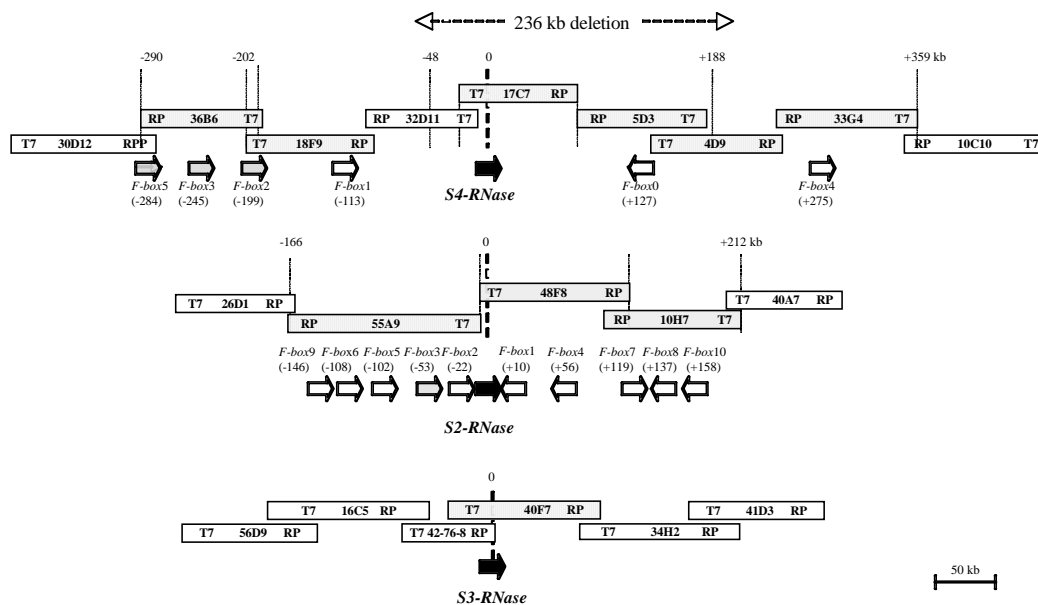


図1. *S-RNase* 周辺の BAC コンティグ上の F-box タンパク質遺伝子の位置
BAC クローンは長方形で示し, 中にはクローン名, T7 および RP 末端を表示した。塩基配列を決定したクローンは \square で示した。 *S-RNase* を \blacksquare で表示した。 *S2F*-, *S4F-box* タンパク質遺伝子群はグループ I (\blacktriangleright) とグループ II グループ (\blacktriangleleft) に分類される。矢印は *S-RNase* と F-box タンパク質転写方向を示す。 \longleftrightarrow は S_{sm} における欠失領域を示す。

花柱縦断面の超薄切片を作製した。一次抗した。脱水後, LR ホワイト樹脂に包埋し, 体として *S3-RNase* 抗体, 二次抗体として金コロイド標識ウサギ IgG 抗体を反応させた後, TEM 電顕観察した。

4. 研究成果

(1) *S* 遺伝子座のゲノム構造解析

S4 BAC コンティグを構築している 4 個の BAC クローン (36B6, 18F9, 4D9, 33G4) の配列を新たに解析した。7 個の BAC クローン (36B6, 18F9, 32D11, 17C7, 5D3, 4D9, 33G4) の配列をアッセンブルし, *S4-RNase* の上流 290 kb, 下流 359 kb におよぶ 648,516 bp の配列を決定した。GENSCAN

いずれも花粉特異的に発現していた (図 1)。

花粉側 *S* は *S-RNase* の近傍に位置し, 花粉で特異的に発現することに加え, ハプロタイプ間で多型を示す必要がある。 *S4F-box1*~*5* がハプロタイプ間での多型を示すかを調べるため, *S2*-と *S3-RNase* の近傍に存在する F-box タンパク質遺伝子を探索した。

‘長十郎’ の BAC ライブラリーを作製し, *S2-RNase* の上流 255 kb 以上, 下流 275 kb 以上をカバーする *S2* BAC コンティグと, *S3-RNase* の上流 214 kb 以上, 下流 297 kb 以上をカバーする *S3* BAC コンティグをそれぞれ構築した (図 1)。

S2 BAC コンティグを構築している 3 個の BAC クローン (55A9, 48F8, and 10H7) の配列を解析した. BAC クローン配列をアッセンブルし, *S2-RNase* の上流 166 kb, 下流 225 kb におよぶ 378,419 bp の配列を決定できた. GENSCAN により 57 個の ORF が予測され, BLASTX による相同性検索の結果, 41 個がデータベース上のタンパク質と有意な相同性を示した. 10 個の ORF が F-box タンパク質と高い相同性を示した. これらは典型的な F-box タンパク質に特徴的な配列を持つことから, *S2F-box1*~*10* と名付けた. *S2F-box1*~*10* はいずれも花粉特異的な発現を示した. *S3-RNase* を含む 40F7 の配列を決定したが, F-box タンパク質様配列は検出されなかった.

S4F-box0~*5* と *S2F-box1*~*10* の推定アミノ酸配列をハプロタイプ間で比較した. *S4F-box0*~*5* と *S2F-box1*~*10* は 66.2~93.1%の相同性を示し, いずれもハプロタイプ間での多型性を有していた. 研究期間中に, ニホンナシ ‘幸水’ (*S4S5*) から *S4-RNase* に連鎖し, ハプロタイプ間で多型を示す花粉特異的な F-box タンパク質遺伝子 (*PpSFBB*^α, *PpSFBB*^β, *PpSFBB*^γ) が報告された (Sassa et al. 2007). しかし, *PpSFBB*^β は *S4-RNase* 近傍には存在せず, *S4F-box0*~*5* は *PpSFBB*^β よりも有力な花粉側 *S4* 候補であると考えられた.

NJ法により *S4F-box0*~*5* と *S2F-box1*~*10* の分子系統樹を作製したところ, これらの F-box タンパク質は 2 つのグループ (I と II) に分類された. グループ II に分類された *S₄F-box2* と *S₂F-box2* (92.1%), *S₄F-box3* と *S₂F-box3* (93.1%) の相同性は高く, ハプロタイプ間での多型性に乏しかった. *S4*-と *S2-RNase* 間の相同性は 61% であることから, グループ II が花粉側 *S* である可能性は低く, グループ I の F-box タンパク質遺伝子 (*S₄F-box0, 1, 4, 5* and *S₂F-box1, 4~10*) が有力な花粉側 *S* 候補となりうると思われた (図 1).

サクラ亜科の *S-RNase* 周辺領域にも花粉側 *S* である *SFB/SLF* の他に 2-3 個の *SFB/SLF* 様遺伝子 (*SLFL*) が見出されている. *SLFL* は

SFB/SLF との相同性は 20% 以下で, ハプロタイプ間で 88% 以上の相同性を示し, 多型性に乏しい. ニホンナシの *S-RNase* 周辺領域にはハプロタイプ間で類似したグループ II と多型性に富んだグループ I の F-box タンパク質遺伝子がクラスターを形成しており, ナシ亜科の *S* 遺伝子座上の F-box タンパク質遺伝子の数や構成は, サクラ亜科とは明らかに異なっている. このことから, ナシ亜科の花粉側認識には, 複数の F-box タンパク質が関与する可能性が考えられ. 今後, クラス I グループから, どのように花粉側 *S* を絞り込むかが課題となる.

(2) 和合・不和合花粉管先端部における微細構造の変化と *S-RNase* の局在

不和合花粉管が伸長停止に向かう過程を明らかにするため, 花粉管誘導組織内の和合・不和合花粉管の先端部を TEM 観察した. 和合花粉管先端部はペクチン・セルロースを主成分とする厚い外壁一層のみから構成されていた. 細胞膜はエンドサイトーシス・エキソサイトーシスによる細胞内外の物質輸送を示唆する波状構造を示し, 細胞質には多数の分泌小胞が観察された (図 2A). 一方, 不和合花粉管先端部ではオルガネラ (ミトコンドリア, 小胞体, ゴルジ体など) の崩壊や細胞膜・細胞壁の構造変化が観察された. これらの構造変化を指標として, 電顕画像を整理し, 不和合花粉管が伸長停止に向かう過程を 3 ステージに分類した.

ステージ 1 (図 2B1): 分泌小胞数が減少し, オルガネラの膨張や崩壊が始まっていた. 膜の波状構造は和合花粉管と同様に維持されていた.

ステージ 2 (図 2B2): オルガネラの膨張や崩壊が進み, 一部は空胞化していた. 分泌小胞は消失し, 細胞膜の波状構造は緩慢になっていた.

ステージ 3 (図 2B3): ほとんどのオルガネラが崩壊または空胞化していた. 細胞膜は完全に平滑化し, 先端部全体が膨張・肥大しており, 花粉管は伸長停止状態にあると考えられた. 不和合花粉管が伸長停止に向かう段階的な内部構造の変化が明らかになった.

抗 S3-RNase 抗体を用いたイムノゴールド法により，花粉管先端部における S-RNase の取り込み，および花粉管内挙動を解析した．S3-RNase の局在を示す金粒子は S4 花粉（和合）と S3（不和合）花粉管の先端部の両方に検出された．和合花粉管では，S3-RNase は細胞膜が陥没した部分と小胞内に局在していた．用いた固定法では膜構造が不鮮明であり，S-RNase の液胞への蓄積を検証することはできなかった．

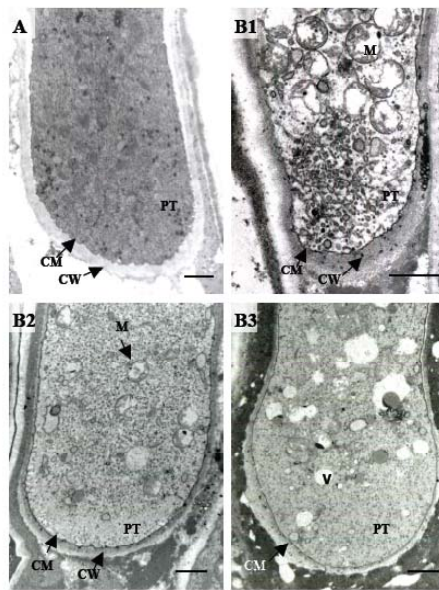


図2 花粉管先端部の微細構造
A: 和合花粉管
B: 不和合花粉管 (B1:ステージ1 B2:ステージ2 B3:ステージ3)
PT: pollen tube CM: cell membrane CW: cell wall M: mitochondria
V: vacuole. bar=1μm

これらの結果から，S-RNase は花粉管先端部でエンドサイトーシスを介して非 S 特異的に取り込まれ，その後，小型エンドソームとして細胞質中を移動することが明らかになった．

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)

- ① Okada, K., Castillo, C., Sawamura, Y., Nakanishi, T. and Takasaki-Yasuda, T. S-genotype assignments of local

cultivars in Japanese pear ‘Senryo’, ‘Kuroki’, and ‘Hogyoku’. 査読有 J. Japan. Soc. Hort. Sci. 78 (1): 55-60. 2009.

- ② Goldway, M., Takasaki-Yasuda, T., Sanzol, J., Mota, M., Zisovich, A., Stern, R. A and Sansavini, S. Renumbering the S-RNase alleles of European pears (*Pyrus communis* L.) and cloning the S109-RNase allele. 査読有 Scientia Horticulturae 119 (4): 417-422. 2009.
- ③ Moriya, Y., Okada, K., Yamamoto, K., Iwanami, H., Bessho, Nakanishi, T. and Takasaki-Yasuda, T. Characterisation of partial self-compatibility in the European pear cultivar, ‘Grand Champion’. 査読有 J. Hortic. Sci. Biotech. 84 (1): 77-82. 2009.
- ④ Okada, K., Tonaka, N., Sawamura, Y., Matumoto, T. and Takasaki-Yasuda, T. Selection of self-compatible trees by S₄sm-haplotype specific marker in Japanese pear. 査読有 Acta. Hort. 800: 401-408. 2008.
- ⑤ Takasaki-Yasuda, T., Moriya, Y., Iwanami, H., Bessho and Nakanishi, T. S-genotype assignment of European pear cultivars using S-RNase specific CAPS marker. Acta. Hort. 800: 391-400. 2008
- ⑥ Okada, K., Tonaka, N., Moriya, Y., Norioka, N., Sawamura, Y., Matumoto, T., Nakanishi, T. and Takasaki-Yasuda, T. Deletion of a 236 kb region around S₄-RNase in a stylar-part mutant S₄sm-haplotype of Japanese pear. 査読有 Plant Mol. Biol. 66 (4): 389-400. 2008.
- ⑦ Norioka, S., Oneyama C., Takuma, S., Shinkawa, T., Ishimizu, T., Nakanishi, T. and Sakiyama, F. Purification and characterization of a non-S-RNase and S-RNases from styles of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). 査読有 Plant Physiol Biochem. 45(12): 878-86. 2007.
- ⑧ Moriya, Y., Yamamoto, K., Okada, K., Iwanami, H., Bessho, Nakanishi, T. and Takasaki, T. Development of a CAPS

marker system for genotyping European pear cultivars harboring 17 alleles. 査読有 Plant Cell Rep. 26(3): 345-354. 2007.

[学会発表] (計 11 件)

- ①河野友美・山北由貴・太田文清・朴杓允・中西テツ・安田(高崎)剛志 ニホンナシ花柱内における不和合花粉管先端部の微細構造の変化. 園芸学会平成 21 年度秋季大会 2009 年 9 月 26-28 日 秋田大学
- ②岡田和馬・戸中希・市川雄彦・澤村豊・中西テツ・安田(高崎)剛志 ニホンナシ *S4-RNase* 周辺 BAC コンテイングの塩基配列解析. 園芸学会平成 21 年度秋季大会 2009 年 9 月 26-28 日 秋田大学
- ③Kono, Y., Y. Yamakita, F. Ota, P. Park, T. Nakanishi, and T. Takasaki-Yasuda. Ultrastructural observation of the compatible and incompatible pollen tube in the style in *S*-homozygotes of the Japanese pear. 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology. 16~18 Sep. 2009. Japan
- ④河野友美・山北由貴・太田文清・朴杓允・中西テツ・安田(高崎)剛志 ニホンナシ花柱における自家・他家花粉管の微細構造の解析 園芸学会平成 20 年度秋季大会 2008 年 9 月 27-29 日 三重大学
- ⑤田口富雄・戸中希・岡田和馬・中西テツ・安田(高崎)剛志 ニホンナシ *S2-RNase* 周辺領域の BAC コンテイングの塩基配列解析 園芸学会平成 20 年度秋季大会 2008 年 9 月 27-29 日 三重大学
- ⑥岡田和馬・Calros Castillo・澤村豊・中西テツ・安田(高崎)剛志 ニホンナシ 在来品種 ‘千両’, ‘黒木’ と ‘宝玉’ の *S* 遺伝子型同定 園芸学会平成 20 年度秋季大会 2008 年 9 月 27-29 日 三重大学
- ⑦戸中希・岡田和馬・澤村豊・中西テツ・安田(高崎)剛志 (2007. 9) ニホンナシ *S2*-および *S3-RNase* 周辺領域の BAC コンテイングの構築 園芸学会平成 19 年度秋季大会 2007 年 9 月 29 日~10 月 1 日 香川大学
- ⑧岡田和馬・戸中希・澤村豊・中西テツ・安田(高崎)剛志 (2007. 9) ニホンナシ *S4sm*

ハプロタイプにおける 236kb 欠失領域の塩基配列解析 園芸学会平成 19 年度秋季大会 2007 年 9 月 29 日~10 月 1 日 香川大学

- ⑨守谷友紀・山本健太郎・岡田和馬・岩波宏・古藤田信博・中西テツ・安田(高崎)剛志 セイヨウナシ三倍体品種の *S* 遺伝子型推定 園芸学会平成 19 年度秋季大会 2007 年 9 月 29 日~10 月 1 日 香川大学
- ⑩Okada, K., Tonaka, N., Sawamura, Y., Matumoto, T. and Takasaki-Yasuda, T. Selection of self-compatible trees by *S₄sm*-haplotype specific marker in Japanese pear. 10th International pear symposium, 22~26 May 2007. Portugal.
- ⑪Takasaki-Yasuda, T. Moriya, Y., Iwanami, H., Bessho and Nakanishi, T. *S*-genotype assignment of European pear cultivars using *S*-RNase specific CAPS marker. 10th International pear symposium, 22~26 May 2007. Portugal.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 剛志 (高崎 剛志)

(TAKESHI TAKASAKI-YASUDA)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 30314511

(2) 研究分担者

中西 テツ (TETSU NAKANISHI)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 80031227

(2007 年度のみ, 2008 年 3 月末退官)

朴 杓允 (PYOYUN PARK)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 20147094