

平成 27 年 5 月 4 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660029

研究課題名(和文)カンキツにおける単一花粉培養法を利用した自家不和合性関連遺伝子の探索

研究課題名(英文) Analysis of self-incompatibility-related genes of citrus using single pollen culture system.

研究代表者

國武 久登 (KUNITAKE, HISATO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80289628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物の自家不和合性は他殖を促進し、自殖を防ぐ重要なメカニズムである。選抜した少数花粉において、nano-LCによる網羅的解析を行ったところ、和合処理で14個、自家不和合処理で27個の関連タンパク質を同定した。また、その比較により自家不和合関連遺伝子を選抜し、リアルタイムPCRによりその発現について解析した。その結果、Cu/Zn SOD, Mn SOD, CATおよびCYP遺伝子の発現は、自家不和合様処理において増加した。ROSはプログラム細胞死(PCD)の鍵となる誘導要因であり、カンキツ花粉管の自家不和合様反応を誘導するROSカスケードは、PCDプロセスの引き金になっている可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Self-incompatibility (SI) is an important mechanism in higher plants that promotes outcrossing and prevents self-fertilization. In this study, We analyzed the protein changes in citrus self-incompatible cultivar, 'Banpeiyu' and 'Hyuganatsu', pollen tubes with the C- and SI-like treatments by nano-LC/MS; 14 and 27 proteins were identified in C- and SI-like treatments, respectively. We picked up some candidate genes that were particularly prevalent in SI-like treatment and analyzed their expression level changes during C- and SI-like treatments in citrus pollen tubes. The expression levels of copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD), manganese SOD (Mn SOD), catalase (CAT), and cysteine protease (CYP) increased after SI-like treatment. Since ROS has been proposed as a key inducer of program cell death (PCD), it is possible that the ROS cascade reaction, which was induced by SI-like treatment in citrus pollen tubes, is a trigger for the PCD process.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：自家不和合性 カンキツ 成熟花粉 配偶体型 花粉培養 プログラム細胞死 花柱タンパク質 SOD

### 1. 研究開始当初の背景

カンキツでは、多くの品種において自家不和合性が報告されており (Soost, 1965), 配偶体型自家不和合性であることを裏付ける様々な報告がなされている (de Nettancourt, 1977; Soost, 1965; Ueno, 1978). カンキツと同じく配偶体型自家不和合性を示すバラ科果樹では, *S* 遺伝子にコードされ, 花柱特異的に発現するリボヌクレアーゼ (*S*-RNase) と, *S*-RNase 遺伝子の近傍に位置して密接に連鎖している *SFB* 遺伝子の転写産物である *F*-box タンパク質により制御されることが明らかとなっている (Yamane ら, 2003). 我々は, 自家不和合性を有するヒュウガナツの花蕾を用いて, プロテオーム解析により雌蕊側タンパク質のプロファイリングを行い, 成熟に伴い発現量が増加するタンパク質を明らかにした (Uchida ら, 2012). 一方, 雄性側自家不和合性関連タンパク質の探索手法の開発については最近大きな進展があった. 我々は世界に先駆けて試験管内で和合/不和合の反応を再現できる花粉液体培養モデルシステムを開発し (内田ら, 2012), 反応が生じた花粉管からのプロテオーム解析技術を確立した (内田ら, 2012). その結果, バラ科果樹で明らかにされている *F*-box タンパク質がその原因タンパク質の一つである可能性が高まった. しかしながら,  $1 \times 10^6$  個以上の培養花粉からのものであり, 詳細な挙動がつかみにくい. 協力研究者である北海道大学の星野洋一郎准教授は, マイクロキャピラリーに接続したマイクロポンプとスライディングステージを装備した倒立顕微鏡等を利用して, 成熟花粉1個をマクロドロップレット液で培養できる手法を開発しており, 既に発表済みである (Hirano・Hoshino, 2009; 2010). 我々はそのシステムをカンキツ品種‘晩白柚’の成熟花粉に応用し, 花柱粗抽出物を添加することにより, 成長する花粉管内で自己・非自己反応を誘導できる系を確立した (安部ら, 2012). このシステムが確立できたことは, カンキツの雄性側自家不和合性関連タンパク質の同定や単一花粉での遺伝子発現の解析に大きく前進したことになり, 他の植物種への技術応用の可能性も極めて高い.

### 2. 研究の目的

高等植物における雄性側自家不和合性は, 柱頭や花柱組織内で起こる複合的な生化学現象のため, 機序の解明は極めて困難である. 我々は, カンキツにおいて, 世界に先駆けて試験管内で和合/不和合の反応を再現できる花粉液体培養モデルシステムを開発し, 反応が生じた花粉管からのプロテオーム解析技術を確立した. しかしながら, 多数の花粉粒からの発現解析では詳細な挙動を確認することが不十分である. そこで, 本研究では, ①単一花粉培養法を利用した自家不和合評

価システムの開発, ②少数花粉からの nano-LC 解析による自家不和合性関連遺伝子の同定, ③和合/不和合反応が生じた花粉管における自家不和合性関連遺伝子の発現解析を行い, 花粉管内で発現する遺伝子の解析を行う.

### 3. 研究の方法

1) 単一花粉培養法を利用した自家不和合評価システムの開発

植物材料には, ‘晩白柚’の成熟花粉を用いた. また, 星野ら (2005) により開発されたマイクロポンプ (ナノスポイト, 池田理科) に接続したマイクロキャピラリーを用いて花粉を単一で採取し, ディッシュ (コーニング社) 中に流動パラフィン (メルク製薬) を流し入れた. また, キャピラリーは目盛り付きガラス毛細管マイクロピペット (Calibrated Pipet, ドラモンド) からアルコールランプにて引き伸ばし作成した. 流動パラフィン中に単一培養用微小培地のためにナノスポイトにより基本培地 (安部ら, 2011; 内田ら, 2012) を 1,000 nL ずつ用意し, その中に単一花粉を置床し, 25 °C, 暗黒条件にて培養を行った (第1図). 花粉発芽および花粉管長を, 培養1~12時間後までは1時間毎に, それ以降は6時間毎に培養30時間後まで観察を行った. また, 単一花粉15個の花粉発芽および花粉管長についての調査を3反復行った.

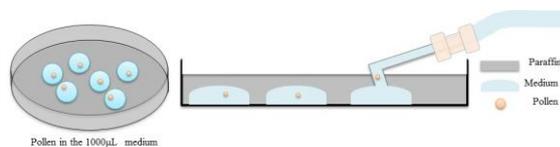


Fig. 1 Single pollen liquid culture method using the microcapillary pipette and the micropump.

次に, 単一花粉培養による自家不和合性様現象の評価を行った. 植物材料には, ‘晩白柚’の成熟花粉を用い, 花柱粗抽出物の作製は, 内田ら (2012) の方法に従い作製し, 抽出バッファのみ添加した処理を対照区とした. また, 前述した方法に従い, 単一花粉培養を行い, 培養4時間後に花柱粗抽出物を添加した. 培養を行った‘晩白柚’花粉に‘晩白柚’花柱粗抽出液, または‘ハッサク’花柱粗抽出物を前述したナノスポイトにより  $75 \sim 300 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  の濃度で添加した. 花柱粗抽出物添加2時間後, 花粉管破裂の観察を行った (n=5, 3反復).

### 2) 少数花粉からの nano-LC 解析

植物材料には, ‘晩白柚’の成熟花粉を用いた. まず, 実験1の方法に従い, 液体花粉培養を行った. 花柱粗抽出物の作製は, 内田ら (2012) の方法に従い, ‘晩白柚’と‘ハッサク’の花柱粗抽出物を作製し, 抽出バッファのみ添加した処理を対照区とした. ‘晩白柚’の成熟花粉の液体花粉培養を行った後, 4時間後にそれぞれの花柱粗抽出物を添加し

(50  $\mu\text{g} \cdot 2\text{mL}^{-1}$ ), 花粉管が正常に発芽しているものだけを前述したナノスポットにより 100 個ピックアップしてサンプルとした。

次に、反応したサンプルからのタンパク質抽出を行った。まず、抽出バッファー (10 mM DTT, 50 mM pH 8.0 Tris-Base, 10 mM EDTA, 0.5% Chaps, プロテアーゼインヒビターカクテル 1錠) にガラスビーズを加え、氷上にてボルテックスを交互に 30 秒を 5 反復した。その後上澄みを回収し、上記をもう 1 反復した。次に 2D Clean-up kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を使用し、タンパク質の精製を行った。その後、還元アルキル化処理のために還元液 (10 mM DTT, 25 mM 重炭酸アンモニウム) にて 56 °C で 45 分間サンプルを処理し、アルキル化液 (55 mM ヨードアセトアミド, 25 mM 重炭酸アンモニウム) 中で遮光したまま、室温で 30 分間静置した。トリプシン処理はトリプシン溶液 (10ng  $\cdot\text{ml}^{-1}$ ) で 37 °C にて、12 時間反応させ、0.1% になるようにギ酸を添加し反応を停止させた。

タンパク質の解析は、nano-LC-MS LTQ Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) で測定を行った。また nano-LC-MS 分析から得られたスペクトルはシロイヌナズナ、イネおよびカンキツのデータベース [国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information: NCBI), (UniProt 知識ベース: UniProt KB (Swiss-Prot + TrEMBL), シロイヌナズナ統合データリソース (The Arabidopsis Information Resource: TAIR), 遺伝子オントロジー (Gene Ontology: GO)) と照合し機能解析を行い、機能を有するタンパク質において含有率を円グラフに示した。

3) 和合/不和合反応が生じた花粉管における自家不和合性関連遺伝子のリアルタイム PCR による発現解析

植物材料には、‘晩白柚’ と ‘ヒュウガナツ’ の成熟花粉を用い、それぞれの花柱祖抽出物を作成し、前述した方法により液体花粉培養を行い、花柱祖抽出物を添加した。また、‘晩白柚’ (花粉) / ‘晩白柚’ (花柱祖抽出物) と ‘ヒュウガナツ’ / ‘ヒュウガナツ’ の組み合わせを自家不和合様処理、‘晩白柚’ / ‘ヒュウガナツ’ と ‘ヒュウガナツ’ / ‘晩白柚’ を和合様処理とした。‘晩白柚’ と ‘ヒュウガナツ’ の花粉管は、0, 1, 2, 4 時間後に回収し、RNA 抽出を行った。なお、対照区として抽出バッファーのみを添加したものを供試した。リアルタイム PCR に用いる RNA の抽出は、培養した花粉を SK ミル用のエッペンに収集し、SK ミル (SK-100, Funakoshi 社) を用いて組織を破碎した後、RNeasy plant mini kit (QIAGEN 社) を用いて抽出した。さらに、DNA の混入を避けるために、RNA 抽出後に RQ1 RNase-Free DNase (PROMEGA 社) を処理した。抽出 RNA は、-80°C で保存した。1st strand cDNA の合成は以下に示す手順で

行った。まず 0.5  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  の抽出 RNA 2.0  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{M}$  oligo (dT) 20.0  $\mu\text{l}$ , 10 mM dNTP 1.0  $\mu\text{l}$ , DEPC 処理水を 10.0  $\mu\text{l}$  混合し、65°C で 5 分間、4°C で 1 分以上の処理した後、5×First strand buffer 4.0  $\mu\text{l}$ , 0.1M Dithiothreitol (DTT) 1.0  $\mu\text{l}$ , Super Script III RT (INVITROGEN 社) 1.0  $\mu\text{l}$  を加えた。50°C で 60 分間、70°C で 15 分間、4°C で静置し、TE を加えて希釈した。次に、作成した 1st standard cDNA 1 $\mu\text{l}$ , KAPA SYBR FAST Bio-Rad iCycler qPCR kit 5 $\mu\text{l}$ , 滅菌水 3.6 $\mu\text{l}$ , 第 1 表に示した自家不和合性関連遺伝子のそれぞれの 10 $\mu\text{M}$  プライマーを 0.2 $\mu\text{l}$  ずつ混合し、反応を行った。反応プログラムは、95°C で 3 分間熱変性後、95°C で 3 秒間、アニーリングを 55°C で 30 秒間を 40 サイクル行った。その後 70°C で 10 分間反応させ、55°C で 30 秒、65°C で 5 秒、95°C から 0.5°C を 5 秒間の反応行い融解曲線を書いた。解析には CFX Connect™ リアルタイム PCR 解析システム (BIO RAD 社) および CFX Manager™ ソフトウェアを使用した。

**Table 1** Primers and polymerase chain reaction (PCR) procedures used for realtime quantitative PCR.

Primer name	Primer sequences (5'-3')	Procedure for qPCR
<i>Zn/Cu SOD</i>	For: AGGAAGCCTCTCTGGTCTCA Rev: CAGCAGGGTTAAAGTGGGGT	94° C, 5 min; 94° C 30 s, 61° C 30 s, 50 cycles; 72° C 10 min
<i>Fe SOD</i>	For: GGAACCTGAGCTTGGTATGGA Rev: AGTTCACCAGACGGCTTTC	94° C, 5 min; 94° C 30 s, 60° C 30 s, 50 cycles; 72° C 10 min
<i>Mn SOD</i>	For: CGGAGGTCAITGCAACCACT Rev: GCACCTCAGCACTCACTT	94° C, 5 min; 94° C 30 s, 59° C 30 s, 50 cycles; 72° C 10 min
<i>catalase</i>	For: GCGCTCCTGATGGAACAA Rev: AAACCTTAGCACTGGCTCC	94° C, 5 min; 94° C 30 s, 58° C 30 s, 50 cycles; 72° C 10 min
<i>CYP</i>	For: AGCTTCGACGACTCCAATCC Rev: CAIACCTGCGAGCAAAACGG	94° C, 5 min; 94° C 30 s, 59° C 30 s, 50 cycles; 72° C 10 min
<i>GFP</i>	For: AGAGGCTGGAACAAAACGTGA Rev: TCCGCAIGCAATCCACAAA	94° C, 5 min; 94° C 30 s, 59° C 30 s, 50 cycles; 72° C 10 min

#### 4. 研究成果

1) 単一花粉培養法を利用した自家不和合評価システムの開発

単一花粉培養は、流動パラフィン中に作った微小培地内に花粉を 1 個のみ加え培養を行った。発芽は培養 3 時間後から観察された。発芽した花粉は培養 4 時間後には 67.0 % の花粉が発芽し、それから花粉管破裂が始まる培養 11 時間後までは、発芽した花粉は安定して伸長することが観察された。しかしながら、大量培養において、花粉管長は 1 時間に約 20  $\mu\text{m}$  程度均一に伸長するのに対し (内田ら, 2012), 単一培養においては、1 時間に約 10  $\mu\text{m}$  程度伸長し、その 1 時間毎の伸長は不均一であった。しかしながら、単一培養した花粉管はその後も安定して伸長し、培養 30 時間において長いものでは 350  $\mu\text{m}$  を超えるものも見られた。本研究で得られた単一花粉培養による花粉管の形状変化として、破裂花粉が観察される培養 11 時間以前には、花粉管の細胞壁も安定しており、正常に伸長していることが確認できた。その後、培養 12 時間を超えると、その形状が少しずつ変化し始め、培養 18 時間後には内容物の崩壊が始まっていることが観察された。また、培養 24

時間後には花粉管の細胞壁の形状変化が起き、花粉管の先端が大きく膨らんだ花粉管が観察され、さらに培養 30 時間後には多くの花粉管が破裂しているのが観察され、花粉管内容物が花粉管から放出されていた。以上のように、‘晩白柚’花粉は、単一花粉培養でも正常に発芽し、このような培養条件にて花粉管は約 10 時間までは安定的に伸長を続けることが明らかとなった。改善する余地はまだあるものの、カンキツの単一花粉培養の成功事例はこれまでに報告はなく、受精行動に関する基礎的な解析を進める上で重要な方法になると考えられる。

次に、‘晩白柚’の単一花粉培養法を利用して、‘晩白柚’花柱粗抽出物、‘ハッサク’花柱粗抽出物添加による自家不和合性様現象を評価した。まず、花粉管破裂に及ぼす花粉粗抽出物濃度の影響について調査したところ、自家‘晩白柚’花柱粗抽出物添加における花粉管破裂は  $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  の濃度で 26.7%,  $225 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  において 53.3%,  $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  において 73.3% の花粉管の破裂が見られ、濃度依存的に花粉管破裂が誘導された。また、‘ハッサク’花柱粗抽出物添加では、 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  の濃度で花柱粗抽出物を添加すると花粉管破裂が生じたがそれ以外の試験区では花粉管破裂は見られなかった。 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  添加した際のそれぞれの花粉破裂率は、自家‘晩白柚’花柱粗抽出物添加において 73.3% であったのに対し、‘ハッサク’花柱粗抽出物添加においては 6.7% であり、大量培養と同様に花粉管破裂は‘晩白柚’花柱粗抽出物添加と、‘ハッサク’花柱粗抽出物添加において有意に差異があることが観察された。以上のように、単一花粉培養においても、花柱粗抽出物を添加することで大量培養と類似した自家不和合性様反応を観察でき、視覚化できることが確認できた。本技術が確立できたことにより、1 花粉中の自家不和合性反応を評価でき、自家不和合性に関与したタンパク質の動きを正確に分析できるようになることが予想される。

## 2) 少数花粉からの nano-LC 解析

‘晩白柚’の成熟花粉を大量培養し、その 4 時間後に‘晩白柚’と‘ハッサク’の花柱粗抽出物を添加し、さらにその 1 時間後に花粉管発芽しているものだけを 100 個ピックアップして、nano-LC による網羅的解析を行った。

本研究ではシロイヌナズナ、イネおよびカンキツのデータベースからタンパク質の推定を行った。その結果、カンキツのデータベースから得られたスペクトルを元に推測したタンパク質は、‘ハッサク’区（自家和合様処理区）と‘晩白柚’区（自家不和合様処理区）において対照区と比較したところ、それぞれ機能未知タンパク質を含め計 14（第 2 表）および 27 個（第 3 表）であった。3 処理区すべてで検出されたタンパク質は、推定シクロフィリン putative cyclophilin と、

部分的ユビキチン ubiquitin, partial であった。これらのタンパク質は培地由来（たとえば、酵母エキスなど）のタンパク質の可能性が高いと考えられる。また、‘晩白柚’区で自家不和合様反応を起こした花粉由来のタンパク質において、遺伝子オントロジーからの機能解析により生物学的過程による分類 (biological process) を調査したところ、機能未知を除くと様々な代謝に関与しているタンパク質 84.6%, ストレス関連タンパク質 11.5% および解糖系関連タンパク質 3.8% が挙げられた。また、分子機構による分類 (molecular function) では触媒活性 77.3%, ヒドラーゼ活性 13.6%, カルシウムイオン結合 4.5%, ATP 結合 4.5% および生体防御タンパク質 4.5% が挙げられた（第 2 図）。

Table 2 Result of protein identification in ‘Banpeiyu’ pollen tubes exposed to compatible-like treatment.

Accession	Coverage	PSMs <sup>a</sup>	Peptides	AA <sup>b</sup>	MW <sup>c</sup> (kDa)	pI <sup>d</sup>	Score	Description
gi11590178	45.69	14	10	232	25.2	7.91	19.27	miraculin-like protein [Citrus x parodiif]
gi28060010	13.26	7	5	445	47.8	5.78	13.92	2-phospho-D-glycerate hydratase [Citrus trifoliata]
gi50199332	30.77	2	2	91	9.3	8.91	4.74	lipid transfer protein [Citrus sinensis]
gi2113425	7.56	2	2	291	32.6	5.59	4.14	hypothetical protein [Citrus x parodiif]
gi11590180	12.29	8	3	236	25.6	6.54	3.77	miraculin-like protein 2 [Citrus x parodiif]
gi08138959	3.95	2	1	380	41.3	6.20	3.33	alcohol dehydrogenase [Citrus x parodiif]
gi7741705	10.56	1	1	142	15.6	6.32	3.06	SOD [Citrus trifoliata var. monstrosa]
gi1679799	10.47	4	4	277	30.0	6.68	2.52	chalcone synthase [Citrus jambhiri]
gi16916065	4.61	4	4	802	91.0	5.95	2.28	phospholipase D alpha [Citrus sinensis]
gi1170567	3.55	2	2	507	56.3	6.07	1.69	RecName: Full-Inositol-3-phosphate synthase; Short-MIP synthase; AbName: Full-Myo-inositol 1-phosphate synthase; Short-IPS; Short-MI-1-P synthase
gi11982613	3.09	2	2	680	78.2	8.37	0.00	RNA polymerase beta [Citrus sinensis]
gi257635110	3.34	2	2	718	78.0	6.89	0.00	unannoted protein product [Citrus clementina x Citrus reticulata]
gi375151858	3.27	2	1	611	62.3	8.29	0.00	GUS151-1 [Citrus sinensis]
gi25430523	16.67	2	2	174	18.9	5.08	0.00	chalcone isomerase [Citrus maxima]

<sup>a</sup>peptide spectral matches; <sup>b</sup>amino acids; <sup>c</sup>molecular weight; <sup>d</sup>calculated isoelectric point.

Table 3 Result of protein identification in ‘Banpeiyu’ pollen tubes exposed to self incompatible-like treatment

Accession	Coverage	PSMs <sup>a</sup>	Peptides	AA <sup>b</sup>	MW <sup>c</sup> (kDa)	pI <sup>d</sup>	Score	Description
gi11590178	45.69	27	10	232	25.2	7.91	44.04	miraculin-like protein [Citrus x parodiif]
gi8729375	42.67	23	9	232	25.2	7.91	38.50	miraculin-like protein 1 [Citrus x jambhiri]
gi28060010	20.80	10	7	445	47.8	5.78	24.63	2-phospho-D-glycerate hydratase [Citrus trifoliata]
gi2113425	27.15	13	7	291	32.6	5.59	18.16	hypothetical protein [Citrus x parodiif]
gi13735853	24.81	12	7	270	29.2	5.35	14.18	putative L-galactose-1-phosphate phosphatase [Citrus aurantium]
gi115948205	14.64	11	9	642	71.3	5.97	14.14	beta-fructofuranosidase [Citrus sinensis]
gi11590180	12.29	17	3	236	25.6	6.54	13.07	miraculin-like protein 2 [Citrus x parodiif]
gi16916065	14.84	15	11	802	91.0	5.95	11.41	phospholipase D alpha [Citrus sinensis]
gi1170567	9.47	5	4	507	56.3	6.07	9.17	RecName: Full-Inositol-3-phosphate synthase; Short-MIP synthase; AbName: Full-Myo-inositol 1-phosphate synthase; Short-IPS; Short-MI-1-P synthase
gi26182812	6.73	5	3	332	38.3	6.47	8.04	condase [Citrus maxima]
gi1679799	11.19	8	5	277	30.0	6.68	7.72	chalcone synthase [Citrus jambhiri]
gi33303286	14.47	4	2	152	15.1	5.87	6.24	copper/zinc superoxide dismutase [Citrus limon]
gi23496447	17.06	6	4	209	32.1	5.33	5.31	acidic class II chitinase [Citrus jambhiri]
gi11590182	13.66	3	3	205	22.5	6.90	4.97	miraculin-like protein 3 [Citrus x parodiif]
gi7741705	18.21	3	2	142	15.6	6.32	4.68	SOD [Citrus sinensis]
gi28110130	14.91	4	3	228	25.1	8.10	4.68	mannanase superoxide dismutase [Citrus japonica]
gi43487807	6.70	3	2	418	45.6	7.34	4.34	carbon-nitrogen hydrolase family protein [Citrus aurantium]
gi199548074	25.77	4	4	163	18.2	5.33	3.27	iron superoxide dismutase [Citrus maxima]
gi2851016	10.24	1	1	127	13.8	6.02	2.68	omitinin [Citrus sinensis]
gi35600141	19.88	5	3	161	16.9	7.34	2.68	cytosolic malate dehydrogenase [Citrus maxima]
gi11475986	6.55	2	2	412	43.4	7.33	1.75	malate dehydrogenase [Citrus japonica]
gi43487829	3.65	1	1	219	23.2	6.32	1.71	ferredoxin-like protein [Citrus aurantium]
gi130600578	14.29	5	3	217	23.4	5.85	1.64	superoxide dismutase [Citrus aurantium]
gi26214744	15.63	3	2	128	13.9	8.32	1.63	type 1 proteinase subunit-like protein [Citrus x parodiif]
gi151547430	6.93	2	2	361	39.4	6.71	0.00	cysteine protease Cp [Citrus sinensis]
gi43487269	2.59	2	1	348	39.4	6.20	0.00	flavonoid synthase flavanone 3-hydroxylase [Citrus aurantium]
gi43487206	1.98	1	1	354	39.9	5.78	0.00	hypothetical protein [Citrus aurantium]

The abbreviations are the same as in Table 2.

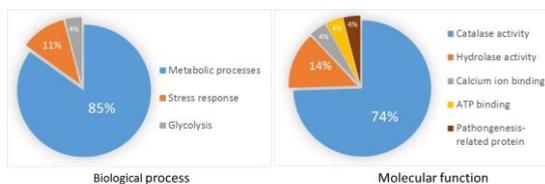


Fig. 2 Distribution of ‘SI-like’ regulated proteins based on proposed molecular function and biological process classification in the pollen liquid cultures of ‘Banpeiyu’.

以上の結果において、自家不和合性様処理においてのみ確認された「生物学的過程におけるストレス反応」と「分子生物学的過程における病原性関連タンパク質」に注目し、Cu/Zn superoxide dismutase (SOD)、Fe SOD、Mn SOD、catalase (CAT)、cysteine protease (CYP) および L-galactose-1-phosphate phosphatase (GPP) の 6 つを自家不和合性関連候補遺伝子として選抜した。

## 3) 和合/不和合反応が生じた花粉管にお

る自家不和合性関連遺伝子のリアルタイム PCR による発現解析

‘晩白柚’と‘ヒュウガナツ’の花粉管での自家不和合および自家和合様反応における遺伝子の発現は、同様の傾向が観察され、自家不和合様処理 2 と 4 時間後では、‘晩白柚’の *Mn SOD* と *CYP* の自家不和合様処理を除いては、*Cu/Zn SOD*, *Mn SOD*, *CAT*, および *CYP* 遺伝子の発現が和合様処理よりも高かった (第 3 図)．‘晩白柚’と‘ヒュウガナツ’の *Mn SOD* においては、和合用処理 4 時間後対照区よりも高かった．‘晩白柚’と‘ヒュウガナツ’の花粉管の *Fe SOD* においては、両処理区の 4 時間を通して有意な変化は観察されなかった．‘ヒュウガナツ’の自家不和合処理 1 時間後の *GPP* 遺伝子の発現は、和合処理や対照区と比較して高かったが、2、4 時間後は有意な差異は確認できなかった．

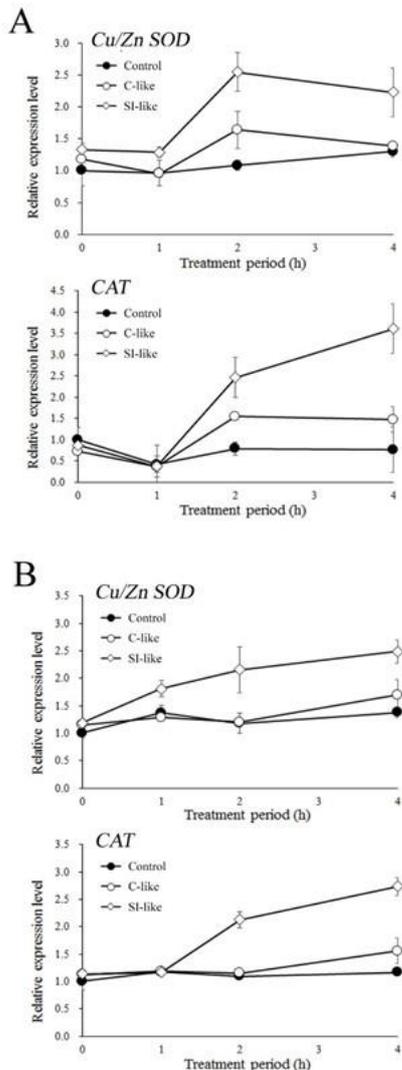


Fig. 3 Gene expression changes during compatible-like (C-like) and self-incompatible-like (SI-like) treatments. The pollen tubes of ‘Banpeiyu’ (A) and ‘Hyuganatsu’ (B) were processed with C-like or SI-like treatments for 0–4 h, and then the gene expression in the pollen tubes were analyzed by real-time quantitative PCR. Values are the mean of three replicates  $\pm$  SD of each timing (n=3). Different letters represent significant differences at 5% level as determined by Tukey’s multiple range test (NS= no significant difference).

候補遺伝子の中で、*CAT*, *Cu/Zn SOD*, および *Mn SOD* は両品種の花粉管での自家不和合様処理区において増加が確認された．SODs (EC1.15.1.1)は、ROS (活性酸素種)の発生や分解の間のバランスを維持したり、酸化ストレスに対して植物細胞を守る捕捉剤として、栄養成長や生殖成長過程において一般的に存在する金属酵素群である (Del Rio ら., 2002; Wang ら., 2009)．抗酸化酵素であるカタラーゼは効果的に過酸化水素を水や酸素に換え、SODs の反応を開始させる．それゆえ、花粉管内の ROS は自家不和合様反応と関係していると思われる．本研究において、カンキツの花粉管内での和合様反応と自家不和合様反応での ROS の変化を調査し、ROS プロブである CM-H2DCFDA の変化を特定し、両品種の自家不和合様反応を示す花粉管内での量は和合様処理や対照区と比較して高かった．ROS は植物において重要なシグナル分子であり、細胞内でのシグナルネットワークに関与している．配偶体型自家不和合性を示すケシの花粉管において、Wilkins et al.

(2011) は、自家不和合過程において、ROS が増加し、カルシウムイオンの流動が生じ、その後、花粉管内のアクチンの断片化が起こることを報告している．カンキツにおいても同様の現象が観察され、ROS の増加が自家不和合性の鍵となる現象のひとつと考えられ、*CAT* や *SODs* の発現の増加は過度の ROS 発生のフィードバック反応ではないかと考えられる．

*CAT* や *SODs* 遺伝子の発現に加えて、カンキツの自家不和合性様反応において *CYP* 遺伝子の発現の増加も観察された．*CYP* はストレス反応と関係しており、*CYP* 遺伝子の高い発現は、プログラム細胞死 (PCD) の初期の誘導要因と考えられている．ROS は PCD の鍵となる誘導要因であり、カンキツ花粉管の自家不和合様反応を誘導する ROS カスケードは、PCD プロセスの引き金になっている可能性が高い (第 4 図)．

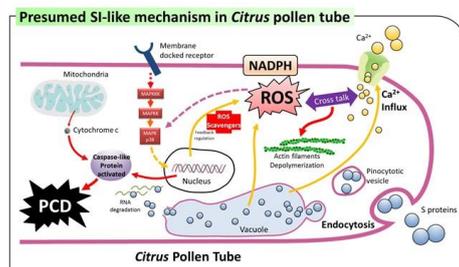


Fig. 4 Presumed SI-like mechanism in Citrus pollen tube.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) Yiran Li, Akiha Abe, Asuka Uchida, Akihiro Yamamoto, Hirano Tomonari, Hisato Kunitake, Effects of polyamines on self-incompatibility-like responses in pollen tubes of *Citrus* cultivars, Banpeiyu and

Hyuganatsu, *Journal of the American Society for Horticulture Science* Vol.140 No.2 pp:183-190

2) Yiran Li, Takuichi Fuse, Shota Kawano, Hisato Kunitake, Self-incompatible-like response induces alterations of actin cytoskeleton and cytosolic calcium in the citrus pollen tube of 'Banpeiyu' and 'Hyuganatsu', *Acta Horticulture (in press)*

3) Shota Kawano, Yiran Li, Masaki Yahata, Hisato Kunitake, Effect of temperature on self-incompatibility in citrus pistil and mature pollen culture systems, *Acta Horticulture (in press)*

〔学会発表〕(計 3 件)

1) Yiran Li, Akihiro Yamamoto, Akiha Abe, Haruhi Morisako, Hirotohi Tsuda, Hisato Kunitake, Effect of stylar crude proteins on polyamine contents of the pollen tube in the mature pollen culture system of self-incompatible Citrus cultivars, 日本園芸学会平成 25 年秋季大会, 平成 25 年 9 月 22 日 (岩手大学)

2) Yiran Li, Takuichi Fuse, Akiha Abe, Asuka Uchida, Yoichiro Hoshino, Hisato Kunitake, Protein identification and gene expression analysis of in vitro pollen tubes in self-incompatibility-like response of 'Banpeiyu' and 'Hyuganatsu', 日本園芸学会平成 26 年秋季大会, 平成 26 年 9 月 29 日 (佐賀大学)

3) Yiran Li, Takuichi Fuse, Shota Kawano, Hisato Kunitake, Self-incompatible-like response induces alteration of actin cytoskeleton, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and calcium content in the Citrus pollen tube of 'Banpeiyu' and 'Hyuganatsu'. The third international symposium on Citrus biotechnology, 平成 26 年 11 月 11 日 (静岡県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

國武久登 (KUNITAKE HISATO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号 : 80289628