

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850001

研究課題名(和文) アブラナ科植物に見出した新規一側性不和合性の花粉・柱頭両認識因子の単離解析

研究課題名(英文) Identification of novel pollen-stigma recognition loci to determine the unilateral incompatibility in *B. rapa*

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアブラナ科植物において、日本とトルコ由来の系統間で引き起こされる新規な一側性不和合性(UI)の認識因子として、柱頭側受容体SUI1 (STIGMATIC UNILATERAL INCOMPATIBILITY 1)ならびに花粉側リガンドPUI1 (POLLEN UNILATERAL INCOMPATIBILITY 1)をそれぞれ単離した。興味深いことにSUI1・PUI1は自家不和合性の認識因子SRK, SP11から遺伝子重複によって生じたと考えられた。日本由来系統ではPUI1が、トルコ由来系統ではSUI1がそれぞれ機能喪失したことが、両系統間の一側性不和合性の原因であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated that recognition between a novel gene pair, a pistil receptor SUI1 (STIGMATIC UNILATERAL INCOMPATIBILITY 1) and pollen ligand PUI1 (POLLEN UNILATERAL INCOMPATIBILITY 1), triggers unilateral incompatibility (UI) between plants of two geographically distant Brassica rapa lines, Japan and Turkey. Interestingly, SUI1 and PUI1 might have been generated by a duplication event of SRK and SP11, which have been reported the recognition factor of self-incompatibility in Brassicaceae. We represented that the functional SUI1 alleles were in the Japanese lines but not in the Turkish lines; conversely, the functional PUI1 allele was in the Turkish lines but not in the Japanese lines. These data suggest a reciprocal loss of SUI1 and PUI1 in different populations cause the UI in *B. rapa*.

研究分野：植物育種学

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

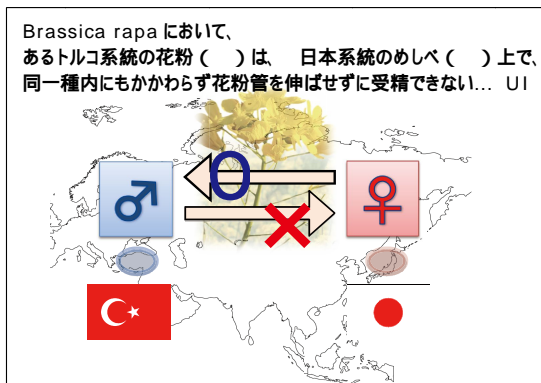
1. 研究開始当初の背景

有性生殖は、生物の進化に対して非常に重要な役割を担っており、興味深い現象を多く含んでいる。特に植物にとっては、雌ずいに無作為に運ばれてくる花粉の中から、適切な交配相手を積極的に選択することが、集団内での遺伝的多様性を維持しつつも次世代を安定的に産出するために必要不可欠である。このため植物は受精を完成させるまでの間に多くの機能を発達させてきた。

花粉・柱頭情報伝達の結果として起こる交雑不適合性に関する研究は、作物育種への応用のみならず、生物界における生殖的隔離機構にも関わることから、古くから多くの研究者の興味を引いてきた。本研究に関連する一側性不適合性(Unilateral Incompatibility, UI)も、近縁種間の交雑時に頻繁に観察される受精拒絶システムの1つとして1950年代から様々な植物種でその例が示されてきた。しかしながら遺伝的背景の異なる近縁種間の交配のため、遺伝学的な解析が困難であり、現在までに明確な機構の解明はおろか、関連する因子に関しても情報が極めて不足しているのが現状であった。

本研究代表者は、以前の研究でアブラナ科植物 *Brassica rapa* において、新規な UI 現象を見出していた。この UI は、日本のある栽培品種系統と、トルコ由来の系統とを交雑させた際に生じるもので、下図の様にトルコ系統花粉は、日本系統のめしべ上で同一種内にもかかわらず花粉管を伸ばすことができず、一方で逆向きの交雑では受粉が成立するというものであった。

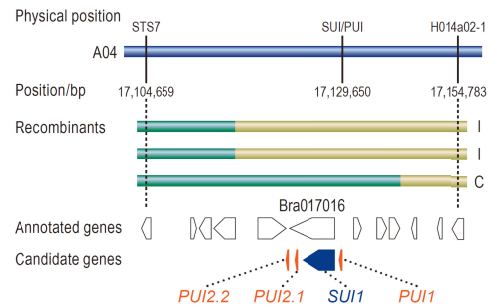
またこれまでの遺伝学的な研究により、次に挙げる点について明らかにしてきた。



- (1) このUIは、自家不適合性(SI)関連因子 *MLPK* 遺伝子を介した経路で不適合性反応を引き起こす。
- (2) 花粉側・柱頭側両制御因子はともにS遺伝子座とは異なる1遺伝子座に支配される。
- (3) 両因子は互いに非常に近接し、分離世代1500個体において1遺伝子座の様に振る舞う。
- (4) 柱頭側は孢子体的に機能し、花粉側は配偶体的の様に機能する。

さらに、1500個体からなる分離世代の解析から、両因子を挟む約80kbの領域を *B. rapa* 染色体A4上に同定した。次にこの領域に両UI制御因子の候補となる遺伝子が座乗していることを明らかに

し、候補因子をそれぞれ柱頭側制御因子 (*STIGMATIC UNILATERAL INCOMPATIBILITY 1, SUI1*)、花粉側制御因子 (*POLLEN UNILATERAL INCOMPATIBILITY, PUI1*)と名付けた。



SUI1-PUI1 遺伝子領域の物理地図

*PUI1*は極近傍領域に遺伝子重複の結果と思われる遺伝子が3つ存在していた(*PUI1, 2, 3*)。さらにRNAゲルプロット解析から、*SUI1*は柱頭特異的に発現し、*PUI1*は雄しべ特異的に発現することが明らかになっていた。

2. 研究の目的

本研究は、上記した種内 UI 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 SI とは異なる情報伝達機構の新機軸を構築し、花粉と柱頭間の細胞間情報伝達機構を解明するという全体構想に沿ったものである。本研究において柱頭側・花粉側両制御因子の単離解析を行うとともに、その遺伝子多型をもとにした進化的考察を行うことを目的とする。さらに本研究は、この形質をアブラナ科植物の育種へ応用するための基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

SUI1, PUI1s のアグロバクテリウム法による遺伝子導入を用いて相補試験を行い、機能を証明する。*PUI1* に関しては、合成ペプチドを作成し、バイオアッセイによる機能解析も試みる。

分離世代の解析を進め、*SUI1-PUI1* 遺伝子間の組み換え個体の探索を行い、*SUI1-PUI1* システムによる新たな自家不適合性システムの構築を目指す。

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、異常な不適合性反応の有無を確認する。次にアブラナ科の植物種間での遺伝子多型解析を行う。

4. 研究成果

まず、花粉側因子 *PUI1* についてアミノ酸配列比較解析を行ったところ、*PUI2, PUI3* は100%一致したことから、これらを *PUI2.1, PUI2.2* と名付けた。

発現解析の結果、*PUI2* mRNA は柱頭上でほとんど蓄積していないことから、*PUI1* が認識因子候補であると考えられた。

次に、低分子システインリッチペプチドである *PUI1* の特性から、合成ペプチドを用いたバイオ

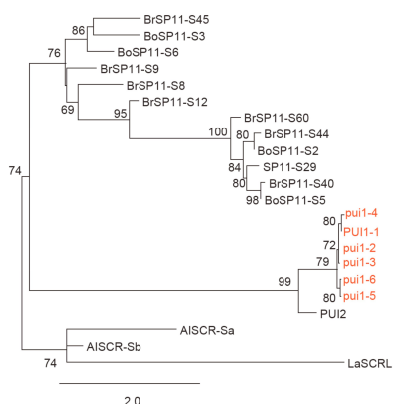
アッセイ法を試みたところ、ペプチド濃度依存的 PUII の不和合性誘導活性を確認できた。この結果から PUII が花粉側の UI 因子であると考えられた。

さらに、PUII 並びに PUI2 を用いた相補性試験を行った。胞子体的に機能する SP11 のプロモーターで PUII, PUI2 の cDNA を制御し、*B. rapa* にアグロバクテリウムにより導入した。この結果、PUII を導入した *B. rapa* に花粉側 UI 形質を付与することができたものの、PUI2 導入個体ではできなかった。以上の結果から、PUII が花粉側 UI の認識本体であることを証明した。

めしべ側因子については、前述した様にめしべ柱頭において特異的に発現する SUII は SI の柱頭側因子 SRK と相同な受容体型キナーゼをコードする遺伝子であり、PUII と結合して SI 様不和合性反応を誘起していることが示唆された。この SUII 遺伝子の柱頭側因子としての機能証明を行うため、遺伝子導入による相補性試験を行った。形質転換体作出のため、柱頭側 UI を持たない個体 (*sui/sui*) を育成し、これを用いてアグロバクテリウムによる遺伝子導入を行った。作出した形質転換個体 3 個体に対して、PUII/PUII ホモ個体由来花粉を受粉したところ、UI 現象が生じた。つまり、SUII が UI のめしべ側因子であることを証明した。

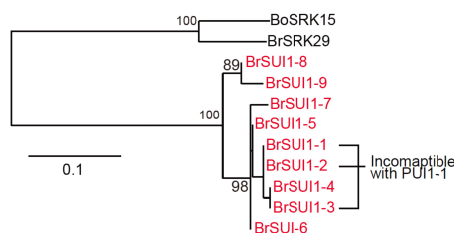
以上の結果、*B. rapa* A04 染色体上に近接して存在する SUII, PUII の認識により、受粉時不和合性を引き起こすことが明らかになった。長い自家不和合性研究の歴史において、SRK 様の受容体が植物ゲノム中には多数存在することが判明しているが、これまで SRK 以外で詳しい機能証明がされた遺伝子は極わずかであり、不和合性反応との関連が示されている遺伝子は全くなかった。この意味で本研究による SUII, PUII ペアの発見は、世界で初めての事例である。

次に日本の栽培品種、野生集団由来系統、そしてトルコの野生集団由来系統を用いて、SUII, PUII の遺伝子多型調査を行ったところ、トルコ由来系統ではすべての系統が機能型と考えられる PUII-1 を有していることが明らかになった。一方で日本由来系統からは PUII-1 アリルは検出できず、*pui1-2* から *pui1-6* までの 5 アリルを検出した。興味深いことに機能型 PUII-1 と非機能型 *pui1-2* との間にはわずかに 3 つのアミノ酸変異があるのみであった。



PUII 推定アミノ酸配列の分子系統樹

SUII では、日本、トルコの両系統から受容体型キナーゼの全長をコードすると考えられるアリルを 8 つ見出した。また、フレームシフトによる異常な終止コドンの原因とするランケート型 *sui1* アリルを 11 個検出した。トルコ系統はすべて SUII-5 アリルを有しており、めしべ側 UI 表現型 (*sui*) からこれは非機能的であると推定された。機能型 SUII-1 に対して、非常に高い相同性を示した SUII-2, SUII-3 を持つ植物個体を用いて UI の検定を行った所、SUII-2, SUII-3 を持つ個体のめしべもまた、PUII-1 個体の花粉を拒絶したことから、これらアリルもまた機能的 SUII アリルであることが明らかになった。この結果から、栽培品種以外の日本由来系統中に柱頭側 UI が存在していることを初めて明らかにした。

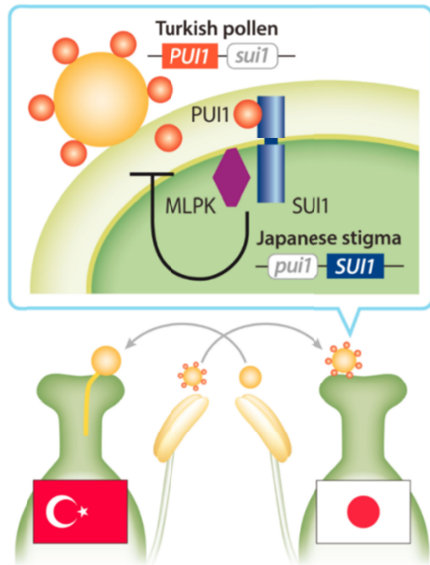


SUII 推定アミノ酸配列の分子系統樹

次に、*B. rapa* の近縁種である *B. oleracea* 栽培品種を用いて遺伝子の単離解析を行った。公開済みのゲノム情報からは *B. oleracea* では PUII の欠失、SUII 配列中の欠損が確認されていたものの、栽培種では完全長の SUII を持つことが明らかになった。公開されている *Brassica* 近縁種の *Arabidopsis* 属植物のゲノム情報を用いたゲノム比較解析では、SUII-PUII 領域を見出すことはできなかった。これら結果から、SUII-PUII 領域の遺伝子重複は *Arabidopsis* 属植物と *Brassica* 属植物の分化後に起こったイベントであると推察した。

また、申請期間を通して 5000 個体以上の SUII, PUII 遺伝子分離世代の解析を終了したが、これら遺伝子間領域での組み換え個体を確定することはできなかった。つまり SUII と PUII は SI 機構の SRK, SP11 と同様に 1 遺伝子座の様にふるまうことが明らかになった。

以上のように本研究では SUII-PUII システムによる異なる地域間に出現した受粉時不和合性機構を明らかにした。今回の UI 現象は *B. rapa* 同一種内で引き起こされたものであり、一般的な種間の一側性不和合性とは異なるものである。しかしながらアブラナ科植物において、SI 機構をつかさどる S 遺伝子の重複と相互の機能損失によって、植物個体が他者の認識と拒絶機構を得るという知見はこれまでにはない、新規なものであり、同様の機構で引き起こされる種間一側性不和合性を否定するものではないと考えられる。植物ゲノム中に存在する多数の SRK 様受容体ならびに SP11 様リガンドがそういった可能性を支持しているのかもしれない。



B. rapa における UI 認識モデル図

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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:

出願年月日:

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

高田 美信 (TAKADA, Yoshinobu)

東北大学・大学院生命科学研究科・技術専門職員

研究者番号:30451610

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

渡辺 正夫 (WATANABE, Masao)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号:90240522

鈴木 剛 (SUZUKI, Go)

大阪教育大学・教育学部・教授

研究者番号:10314444

高山 誠司 (TAKAYAMA, Seiji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号:70273836

(4)研究協力者

()