



アブラナ科植物の自家不和合性における花粉因子の研究

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 助手 柴 博 史

はじめに

自家不和合性は植物のもつ自殖抑制機構の一つで、雌雄の生殖器官は正常であるにもかかわらず自己の花粉では受精できず、他個体由来の花粉が種子の形成に必要な現象を指す。われわれの扱うアブラナ科植物では、遺伝学的解析から1遺伝子座上に雌雄の自他識別にかかわる物質をコードする遺伝子（S遺伝子）が存在し、これが個体ごとに異なる構造を示す複対立遺伝子によって支配されていることが示されている。近年、雌ずい側のS遺伝子としてSRKおよびSLGが単離され、当該遺伝子がS遺伝子型特異的に雌ずい側のS表現型を決定することが明らかとなっていたが、花粉側のS決定因子に関しては不明であった。本研究では、花粉因子の発見とその機能証明、発現様式の詳細な解析を行った。また自家不和合性で見られる花粉の優劣性現象が劣性側の花粉因子をコードする遺伝子の発現抑制によって起こることを明らかにし、その機構としてS遺伝子の相対的な優劣性に基づいた時期および部位特異的な *de novo* DNAメチル化による制御を示した。以下、花粉因子の研究で得られた成果を報告する。

1. 花粉因子の発見・機能証明と発現様式の解析

二つのS系統株を用いて蛍光ディフレンシャルディスプレイ

を行い、S特異的発現遺伝子SP11（S locus protein 11）を単離した。当該遺伝子と共同研究先の東北大で得られた他系統のSP11をもとにして縮重プライマーを作成し、RT-PCRにより複数のS系統のSP11を探索した結果、SP11はすべてのS系統で存在し、多型を有していた（図1）。

また複数のS遺伝子座のゲノム構造を明らかにしてSP11がつねに雌ずい因子であるSRK近傍（約20 kb以内、カブの系統 *Brassica rapa* のS遺伝子座）に位置することを示し、SP11とSRKが強く連鎖していることを明らかにした。さらに化学合成および大腸菌で発現させたSP11タンパク質を用いた受粉試験とSP11を導入したアブラナ形質転換体を作製して、SP11がS遺伝子型特異的に雌ずいのS表現型を決定することを証明した。またアブラナ科植物は孢子体型の自家不和合性を示し、花粉親のS遺伝子型が雌ずいのS遺伝子型と一致すると不和合になる。この機構を明らかにするためSP11の発現様式を詳細に調べた結果、SP11タンパク質は葯タペート組織で生産され、花粉表層に移行していた。またSP11タンパク質が同一S遺伝子型のSRKタンパク質と特異的に結合することを明らかにした。本研究によって花粉因子本体の構造と、その機能を明確にすることができた。上記の結果をもとに作成した自他識

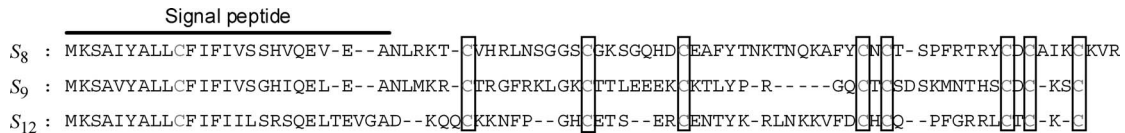


図1 SP11の一次構造

SP11はシステインリッチな花粉表層タンパク質でS遺伝子間で多型を示す。上線は推定シグナルペプチド配列。□はシステイン残基。

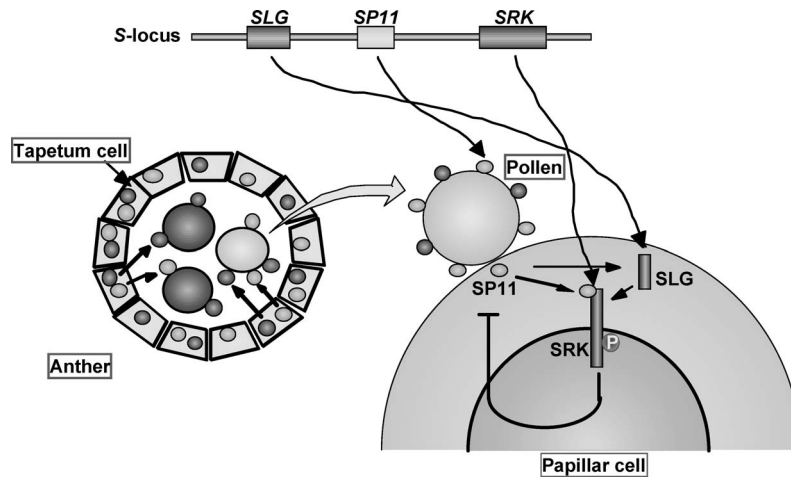


図2 アブラナ科植物のS遺伝子座と不和合反応のモデル

S遺伝子座には雌ずい因子であるSRK、SLGと花粉因子であるSP11がコードされている。葯タペート細胞で生産されたSP11は花粉の成熟に伴い花粉表層に移行する。自家受粉時には花粉表層のSP11は乳頭細胞膜上のSRKに受容され、SRKの自己リン酸化を誘導する。その結果、不和合シグナルが乳頭細胞内に伝えられ、不和合反応を誘起する。

別機構のモデルを示す (図 2)。

本研究で明らかになった S 特異的なリガンド/レセプターの関係は植物のレセプター研究の発展に貢献すると考えている。また雌雄の S 因子で見られる多型性は多様性の進化機構に関する研究にも大いに寄与すると考えている。

2. 花粉側優劣性決定機構に関する研究

本研究 1 で示したように SP11 は葯タペート組織で生産されることから、S ヘテロ体における花粉の S 表現型は花粉親の遺伝子型を示す。つまり、雌ずいのどちらか一方の S 遺伝子型が花粉の S 遺伝子型と一致すると不和合となる (図 3(1))。しかし S 系統の組み合わせによっては一方の S 表現型のみ示し、他方の S 表現型は現れないことがある。例えば S¹S² ヘテロ体の花粉を S¹S¹ ホモあるいは S²S² ホモ体の雌ずいに受粉した場合、S¹S¹ ホモの雌ずいでは不和合となるが、S²S² ホモの雌ずいでは和合になるといった現象である (図 3(2))。このとき二つの S 遺伝子間には優性、劣性の関係があるとされる。

本現象については育種学的アプローチからつねに S 表現型が現れる (花粉優性) グループと優性グループとの S ヘテロ体になると表現型が見られなくなる (花粉劣性) グループに大別されることが知られていた。また交雑により優性/劣性の組合せが解消した次世代では花粉の S 表現型が回復すること、劣性系統間にも linear な優劣性の関係があることなどが明らかとなっていたが、その分子機構は不明であった。そこで花粉で見られる優劣性の現象が、どのようにして制御されているのかを明らかにすることを目的に、まず当時未知であった劣性系統の花粉因子の解明に着手した。最初に本研究 1 で明らかにした優性系統の SP11 をもとにして縮重プライマーを作成し、RT-PCR で優性 SP11 のアレルを探索したが、目的の配列は得ら

れなかった。そこで花粉劣性系統である S₆₀ 系統のゲノムライブラリーを作成して劣性系統の S 遺伝子座を単離し、SRK 近傍に存在し、かつ優性 SP11 で見られるシステインリッチな構造を取るゲノム配列を探索した。その結果、SRK の上流 6.5 kb に SP11 の特徴である八つのシステイン残基がコードされていると推定される遺伝子配列を見いだした。In situ hybridization により当該配列が葯タペート組織で特異的に発現していたことから、これを劣性 SP11 とした。当該配列を用いて他劣性系統で RT-PCR を行ったところ、すべての系統で劣性 SP11 の存在が確認された。得られた配列を比較したところ、劣性系統間における相同性は比較的高かったものの (カブの仲間 B. rapa で 63~73% (アミノ酸配列レベル) の相同性)、優性 SP11 との相同性はほとんど見られなかった。また S 遺伝子座の解析から劣性 SP11 は優性系統と同様、つねに SRK の近傍に位置し、強く連鎖していた。さらに大腸菌で発現させた SP11 タンパク質を用いた受粉試験によって、当該遺伝子産物が花粉劣性系統における花粉因子であることを証明した。

次に劣性 SP11 の発現様式を詳細に調べ、劣性 SP11 が優性/劣性ヘテロ体になるとその発現が抑制されることを明らかにした (図 4)。定量 PCR の結果から優性/劣性ヘテロ体における劣性 SP11 の発現は劣性ホモ体比べて約 15 万分の 1 であった。

さらに劣性系統同士の組み合わせでも、優性/劣性ヘテロ体と同様、相対的に劣性となる系統の SP11 で発現抑制が見られた。このように花粉の優劣性は相対的に劣性となる S 系統の SP11 が抑制されて起こることが明らかになった。そこで上記発現抑制がどのような機構で起こるのかを調べたところ、優性/劣性ヘテロ体では葯タペート組織特異的に劣性 SP11 ゲノ

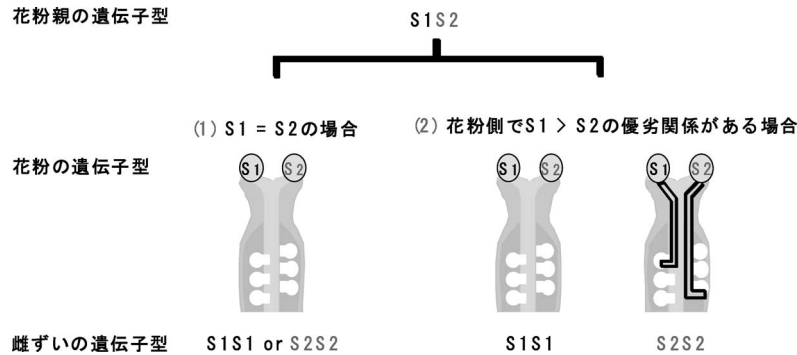


図 3 花粉で見られる優劣性の模式図

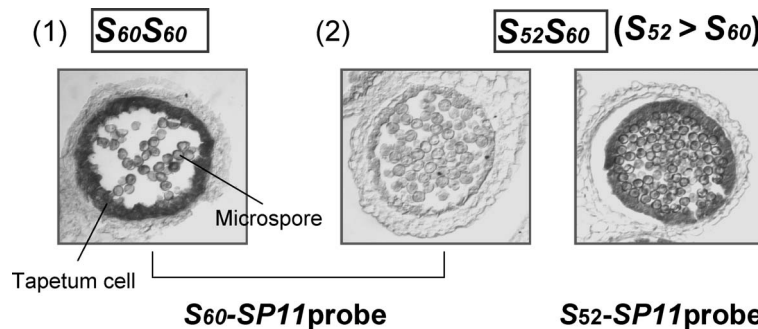


図 4 劣性 SP11 の発現様式

劣性 SP11 はホモ体では葯タペート組織で発現しているが (1)、優性/劣性ヘテロ体では抑制されている (2 左)。一方、優性 SP11 はヘテロ体でも発現パターンは変わらない (2 右)。

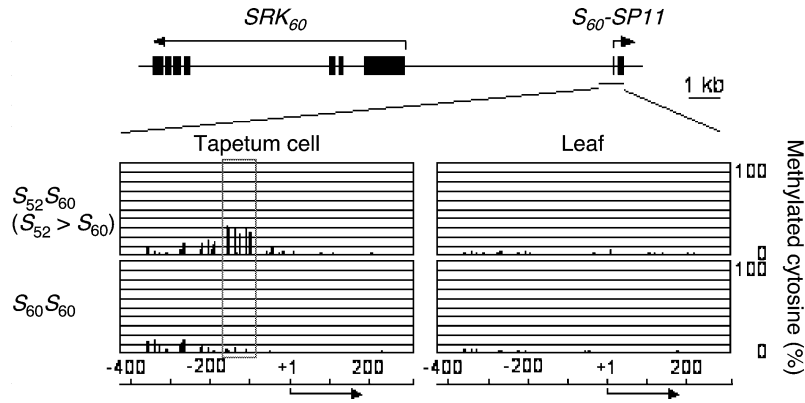


図5 葯タペート組織特異的な劣性 *SP11* のメチル化
劣性 *S60-SP11* 下線部は bisulfite sequencing した領域。棒はタペート組織で見られる高メチル化部位。

ム 5'上流域の *de novo* メチル化が見られた (図5)。葯タペート組織特異的な *de novo* メチル化は劣性系統同士の組み合わせでも見られ、つねに劣性側となる *SP11* ゲノム 5'上流域だけがメチル化されていた。またメチル化は劣性 *SP11* の発現以前から見られること、*SP11* 5'プロモーター領域の *cis*-element 部位が高メチル化されることから、当該部位がメチル化されることで劣性 *SP11* の発現が抑制されることが強く示唆される。

本研究で得られた成果は自家不和合性の優劣性の機構解明に貢献するばかりでなく、広く遺伝子発現調節機構の研究に寄与すると考えている。また本研究は優劣性という広く生物一般に見られる現象にエピジェネティックな遺伝子発現制御がかかわっているという新たな知見を加えるものであり、当該分野の研究の発展、特に複対立遺伝子間での優劣性を考えるうえで大いに貢献すると考えている。今後はS遺伝子の相対的な優劣性に基づいた時期および部位特異的な *de novo* DNA メチル化がどのようにして起こるのかを明らかにしていきたい。

おわりに

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座で行われたものです。本研究を行うに当たり終始ご指導御鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学教授の磯貝 彰先生には心より御礼申し上げます。また当研究室の高山誠司教授にはすべての面にわたり多大なご協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。またともに研究を行い、多大なご協力をいただきました当研究室の岩野 恵先生、円谷徹之先生、下里裕子博士、樽谷芳明博士に心より感謝申し上げ

ます。同様に多大なご協力をいただきました当研究室の多くの卒業生、在学生、スタッフの方々に心より感謝いたしております。また常日頃から温かいご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学学長の安田國雄先生、長浜バイオ大学教授の蔡晃植先生には、心より感謝いたしております。また共同研究者として多大なご協力をいただいた東北大学大学院生命科学研究所教授の渡辺正夫先生、岩手大学農学部の中野智博先生には心から感謝いたしております。また多数の有力なご助言を賜りました大阪教育大学助教授の鈴木 剛先生、ソーク生物学研究所教授の Joseph R. Ecker 先生をはじめとする国内外の諸先生、諸先輩方に深く御礼申し上げます。大学および大学院修了後も絶え間ないご助言、激励をいただきました秋田県立大学学長の鈴木昭憲先生、筑波大学名誉教授の原田 宏先生、筑波大学教授の鎌田 博先生をはじめとする東京大学農学部農芸化学科生物有機化学研究室および筑波大学生物学類植物生理学研究室の諸先生、諸先輩方に深く御礼申し上げます。また東北大学名誉教授の日向康吉先生には大学院在籍時から絶え間ないご助言、激励をいただきました。深く御礼申し上げます。BAC ライブラリーの作成では独立行政法人農業生物資源研究所の川崎信二先生にお世話になりました。タキイ種苗株式会社の坂本浩司博士にはアブラナ種子の提供を受けました。感謝いたしております。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関西支部長の清水 昌先生ならびに諸先生方に厚く御礼申し上げます。