

バラ科サクラ属果樹の自家不和合性花粉側共通因子の同定とその園芸的利用に関する研究

京都大学大学院農学研究科農学専攻 果樹園芸学分野 大野 健太郎

緒言

バラ科サクラ属には多くの果樹作物が含まれ、ほとんどが S-RNase 依存性の配偶体型自家不和合性を示す。このため、サクラ属果樹の果実生産時には他家受粉のためのコストがかかり、交雑育種時の交雑親の組み合わせに制限がかかる。他の作物種においては自家不和合性の人為打破法が開発され実用された例もあるが、サクラ属においては人為処理により自家不和合性を打破した報告はない。S-RNase 型の自家不和合性反応においては、自家受粉した花粉は雌ずい内部を伸長中に途中で花粉管伸長が停止するために受精が成立しない。S-RNase 型自家不和合性のメカニズムはナス科、オオバコ科、バラ科で精力的に研究されており、S 遺伝子座にコードされる雌ずい S 因子 (S-RNase; S-ribonuclease) と花粉 S 因子 (F-box タンパク質) が自他認識機能を担うことが各種で明らかになっている。しかしながらバラ科サクラ属の S 因子は他の植物と同様の分子種が関与するにも関わらず、作用様式は特異的であり未解明の点が多い。

一方、サクラ属のカンカオウトウ (*Prunus avium*) およびアズナギ (*P. armeniaca*) において、第3染色体上の相同領域 (M 遺伝子座) に座乗し自他認識以外の機能を担う、共通因子遺伝子の変異により花粉側の自家不和合性機能が損なわれ自家和合化した個体が存在することが報告されている。本研究では、サクラ属特異的な自家不和合性の反応機構の解明および人為制御法の開発を見据え、このサクラ属共通因子に着目して研究を行った。

第1章 カンカオウトウ自家和合性変異体のゲノム解析による花粉側共通因子の同定

カンカオウトウ品種 ‘Cristobalina’は M 遺伝子座の花粉側共通因子の変異により自家和合化している。本章では ‘Cristobalina’の F₁ 後代による連鎖解析および既存品種群によるアソシエーション解析を組み合わせることで、少ないサンプル数でサクラ属花粉側共通因子の同定を試みた。

‘Cristobalina’ (Mm) の F₁ 分離後代 2 系統 (Mm : 自家和合性 18 個体, MM : 自家不和合性 25 個

体) および既存 17 品種 (*MM*) について, Illumina HiSeq によりゲノム DNA シークエンシング (ペアエンド 150 bp, 100 bp) を行った. シークエンスリードを *Mm* 後代, *MM* 後代, *MM* 品種の 3 グループでプールし, kmer (35 bp) に細分化してグループ間の特異性と共通性に基づいて分類することで, *Mm* 後代特異的 kmer を抽出した. このようにして *m* アレル特異的な多型を kmer の形式で機械的に抽出した. 続いて, 特異的 kmer を含むリードをアセンブルして得られたコンティグに対して 3 グループのリードをマッピングし, *m* 特異的な多型を含むコンティグを選抜した. 選抜されたコンティグのうち, 2 個のコンティグがモモ (*P.persica*) およびカンカオウトウリファレンスゲノムの *M* 遺伝子座相同領域にマッピングされ, *m* 特異的な 1,848 bp のトランスポゾン様挿入配列が同定された. このようにして kmer に基づいて多型を解析することで, *m* アレル特異的な配列挿入を直接検出した. 近傍にはパラログの関係にある Glutathione S-transferase (GST) 様遺伝子が 2 種類座乗していた.

qRT-PCR の結果, GST 様遺伝子の一方は花粉で強く発現して *m* 花粉で発現低下するのに対し, もう一方は様々な器官で一様に発現してアレル間の発現変動は検出されなかったため, 前者をサクラ属花粉側共通因子の候補として *M-locus encoded GST (MGST)* と命名した. *MGST* の上流にトランスポゾン様挿入配列が転移し, *m* アレルを有する花粉において *MGST* が発現減少した結果, ‘Cristobalina’ が自家和合化したと考えられた. 分子系統解析の結果, *MGST* 重複遺伝子は双子葉植物に共通して 1 コピーずつ存在したのに対し, *MGST* はサクラ属およびオランダイチゴ属に特異的でありリンゴ亜連およびナス科には存在しないため, サクラ属特異的な自家不和合性反応に関与すると推測された. 以上のとおり, kmer に基づいた解析によりサクラ属果樹に特異的な最初の自家不和合性花粉側共通因子を同定し, サクラ属に特異的な自家不和合性反応機構の解明への手がかりを得た.

第 2 章 花粉側共通因子 *MGST* の分子機能解析

本章では, サクラ属特異的な自家不和合性反応機構の解明にむけて, サクラ属共通因子の *MGST* の分子機能を解析した. GST は代謝やストレス応答に関与する例が多いため, *MGST* が自家不和合反応に備えて花粉細胞内環境を整える役割を担う可能性が想定された. そこで第 1 節で

は、‘Cristobalina’および後代の花粉粒において Illumina HiSeq により mRNA シークエンシング（ペアエンド 150 bp, 100 bp）を行い、遺伝子発現変動解析および GO エンリッチメント解析により、MGST の分子機能の推定を試みた。‘Cristobalina’ (*Mm*) と野生型品種 (*MM*) の交雑後代間の解析 (*Mm* 系統 11 個体 – *MM* 系統 19 個体)、および‘Cristobalina’自殖後代 (*mm* 系統 6 個体) – ‘Cristobalina’ (*Mm* 3 反復) 間の解析を行った。2 種類の解析で共通して検出された花粉における発現変動遺伝子は 9 個のみであり、また、有意に濃縮された GO term が合計 2 個のみであったため、MGST の発現変動は花粉粒の段階においては特定の反応系に大きな影響を及ぼしていないと考えられた。

また MGST と類似のタンパク質構造が予測される、シュッコクタバコ (*Nicotiana glauca*) の共通因子であるチオレドキシンタンパク質が、S-RNase を還元的に活性化する可能性が報告されていることから、MGST が S-RNase を酸化還元的に活性制御する可能性が示された。そこで、第 2 節において MGST と S-RNase の分子間相互作用を調査したところ、大腸菌発現組換え MGST と雌ずい由来内生 S-RNase の相互作用はプルダウンアッセイにより確認されなかった。一方、花粉由来内生 MGST は、複数アレルのカイコ発現組換え S-RNase と共免疫沈降実験により相互作用した。また、組換え MGST はグルタチオン抱合活性および還元酵素活性を示さず、MGST と相互作用する花粉管内生タンパク質はプルダウンアッセイにより検出されなかった。

以上の結果より、MGST は自家不和合反応に備えて花粉細胞内環境を整えるよりも、S-RNase と作用して活性制御に関与する可能性が支持された。特に、内生 MGST および S-RNase の修飾やコンフォメーション、または花粉由来成分が両者の相互作用に影響する可能性が考えられた。

第 3 章 花粉側因子のサイレンシング処理による自家不和合性の人為制御試験

サクラ属において MGST または花粉 S 因子の *SFB* の変異による自家不和合性個体が報告されているが、サクラ属果樹では効率的な形質転換手法が確立されておらず、遺伝子発現制御実験は行われていない。またサクラ属では自家不和合性の人為的打破の成功例がない。本章では、アンチセンスオリゴによりサクラ属 3 種 {ニホンスモモ (*P. salicina*)、ウメ (*P. mume*)、およびカンカオウトウ} の花粉において MGST または *SFB* をサイレンシングし、自家不和合性の打破を試みた。

人工花粉発芽培地に標的遺伝子のアンチセンス鎖配列のオリゴヌクレオチドを添加して、花粉を培養することでオリゴヌクレオチドを取り込ませた。まず、*MGST* または *SFB* をサイレンシングした花粉を自家受粉し、自殖後代の作出を試みた。対象区では 1,000 花以上受粉しても果実が得られないほどに堅牢な自家不和合性が観察されたが、ニホンスモモ ‘ソルダム’ およびウメ ‘南高’ の自家受粉区において、*MGST* または *SFB* のサイレンシング処理を行った花粉の受粉により自殖後代が合計 3-5 個体得られた。得られた種子の *S* 遺伝子型を PCR 法により決定し、また GRAS-Di 解析によりゲノムワイドに多型情報を収集することで、自家受精に由来する種子であることを確認した。また自家受粉後の雌ずい内部の花粉管伸長距離を測定した結果、ニホンスモモおよびウメの *MGST* または *SFB* のサイレンシング区、またカンカオウトウの *SFB* サイレncing 区において、花粉管伸長の促進が観察された。

以上は、*MGST* および *SFB* がサクラ属の自家不和合性反応に必須の因子であることを裏付ける結果である。また、サクラ属自家不和合性を人為的に打破した初の報告であり、将来的に果実生産、育種、遺伝解析時に利用可能な、より簡便な自家不和合性の人為制御法の開発の足がかりとなるものである。

総括

本研究では、サクラ属自家不和合性花粉側共通因子に関する研究を行った。第 1 章では自家和合化変異体を用いたゲノム解析により、*GST* 様遺伝子 *MGST* の花粉における発現減少によりサクラ属の自家不和合性が打破される可能性が示され、第 3 章のアンチセンス実験によってもこれを支持する結果が得られた。また、第 2 章では花粉粒の段階で *MGST* 発現変動の影響を受ける反応系は検出されず、*MGST* と *S-RNase* が特定の条件においてのみ相互作用することが示された。さらに、第 3 章ではアンチセンスオリゴを花粉に処理して *MGST* または *SFB* をサイレンシング処理することで、ニホンスモモとウメで自家不和合性の打破に成功した。以上の通り、本研究ではサクラ属の自家不和合性における最初の花粉側共通因子を同定し、サクラ属特異的な自家不和合性反応機構の解明にむけて、共通因子の分子機能に関しての重要な知見を得た。さらに、サクラ属の自家不和合性の人為的打破に初めて成功し農業利用への応用可能性を示した。