

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	大野 健太郎
論文題目	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		
(論文内容の要旨)			
<p>バラ科サクラ属には多くの果樹作物が属し、それらのほとんどがS-ribonuclease (S-RNase) 依存性配偶体型自家不和合性を示すので、果実生産時には他家受粉のために多大なコストがかかる。さらに、サクラ属果樹類では自家不和合性の人為打破の成功例がなく、育種時の交雑組み合わせも大きく制限されている。S-RNase型の自家不和合性はナス科、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) と花粉S因子 (S haplotype-specific F-box protein; SFB) が自他認識機能を担うことが明らかにされている。しかしながらバラ科サクラ属のS因子は他の植物とは異なる認識様式を示すとされ、未解明の点が多い。</p> <p>サクラ属果樹のカンカオウトウ (<i>Prunus avium</i>) ‘Cristobalina’は、M遺伝子座に座乗する自家不和合性共通因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ことが報告されている。本研究は、サクラ属に特異な自家不和合性反応機構の解明および人為制御法の開発を目的として、この共通因子の同定と機能解析を行ったものである。</p> <p>第1章では、‘Cristobalina’のF<sub>1</sub>後代43個体 (M遺伝子座の遺伝子型がMmであり自家和合性の18個体とM遺伝子座の遺伝子型がMMであり自家不和合性の25個体) および既存17品種 (M遺伝子座の遺伝子型はMM) を材料にして、連鎖解析とアソシエーション解析を組み合わせて行うことで、サクラ属花粉側共通因子を同定した。全ゲノムシーケンシングリードをMm後代、MM後代、MM品種の3グループでプールし、35 bpよりなるサブシーケンス (k-mer) に細分化してグループ間の特異性と共通性に基づいてm特異的多型をk-merの形式で抽出した。m特異的k-merを含むリードをアセンブルして得られたコンティグの配列情報から、m特異的な1,848 bpのトランスポゾン様挿入配列を同定した。このトランスポゾン様挿入配列の近傍には花粉で強く発現するglutathione S-transferase (GST) 様遺伝子が座乗しており、m花粉で発現低下していたため、これをサクラ属花粉側共通因子の候補とし、M-locus encoded GST (MGST) と命名した。分子系統解析の結果、MGSTはサクラ属およびオランダイチゴ属に特異的に存在し、ナス科など他の双子葉植物には存在しないため、サクラ属に特異な自家不和合性反応に関与することが推察された。</p> <p>第2章では、サクラ属特異的な自家不和合性反応機構の解明のための研究を行った。第1節では‘Cristobalina’および後代の花粉における遺伝子発現解析を、第2節ではMGSTとS-RNaseの分子間相互作用の解析を行った。遺伝子発現解析においては、‘Cristobalina’ (Mm) のF<sub>1</sub>後代 (Mm系統11個体とMM系統19個体) 間の比較、および‘Cristobalina’自殖後代 (mm 6個体) と‘Cristobalina’ (Mm) 間の比較により、共通して検出された発現変動遺伝子および有意に濃縮されたGO termは極めて少数であった。分子間相互作用解析においては、大腸菌発現の組換えMGSTと雌ずい由来の内生S-RNase間の相互作用は確認されなかったが、花粉由来の内生MGSTは、複数アレルのカイコ発現の組換えS-RNaseと相互作用した。以上の結果より、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可能性が高いこと、ならびにMGSTはS-RNaseとの直接の相互作用を通じたS-RNaseの活性制御に関与する可能性が示された。</p>			

第3章では、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} の花粉にアンチセンスオリゴを処理してMGSTまたは花粉側S因子のSFBをサイレンシングし、自家不和合性の人為打破を試みた。GRAS-Di<sup>®</sup>マーカー解析により、得られた種子が自家受精に由来することが確認された。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をサイレンシングした花粉の受粉により自殖後代が得られた。また、サイレンシング処理により雌ずい内の花粉管伸長の促進も観察された。以上の結果は、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ものであり、かつサクラ属自家不和合性の人為打破の初めての成功例でもある。

以上の通り、本研究によって、サクラ属自家不和合性の共通因子MGSTが初めて同定され、さらにMGSTとS-RNaseが特定の条件において相互作用することが示された。またニホンスモモとウメの花粉へのアンチセンスオリゴの処理により、自家不和合性の人為打破にも初めて成功した。本研究の結果は、サクラ属に特異な自家不和合性反応機構の解明およびサクラ属の自家不和合性の人為制御法の開発に活用可能な重要な知見を与えるものである。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

自家不和合性は作物の生産や育種の障壁となるため、自家不和合性の反応機構の解明とそれに基づく自家不和合性の人為打破法の開発が求められている。バラ科サクラ属果樹は、ナス科、オオバコ科、およびバラ科リンゴ亜連と同じS-ribonuclease (S-RNase) 依存性配偶体型自家不和合性を示す。他のS-RNase型自家不和合性の植物と同じく、サクラ属の自家不和合性の雌ずいS因子はS-RNaseであり、花粉S因子はF-boxタンパク質 (S haplotype-specific F-box protein; SFB) であり、これらの認識反応によって自他認識が行われることが明らかにされている。しかしながら、サクラ属における雌ずいS因子と花粉S因子の認識反応は、他のS-RNase型自家不和合性の植物種とは大きく異なり特異的であるために未説明の点が多く、未だサクラ属の自家不和合性の人為制御法は開発されていない。本研究は、サクラ属に特異的に存在する自家不和合性花粉側共通因子の同定と解析を通じて、サクラ属果樹に特異な自家不和合性反応機構の解明とその人為制御法の開発に取り組んだものである。評価すべき点は以下のとおりである。

1. 自家不和合性反応における花粉側認識機構に変異が生じたため自家和合化しているカンカオウトウ (*Prunus avium*) ‘Cristobalina’ を材料に、サクラ属における自家不和合性花粉側共通因子 (*M-locus encoded GST; MGST*) を同定した。リファレンスゲノムが未公開であり、かつ果樹類の特性上利用できる実験材料に限られる状況 (F<sub>1</sub>後代43個体と17品種・系統) で、サブシーケンス (k-mer) 解析とアソシエーション解析を組み合わせることで、原因変異の同定に成功した。

2. 花粉におけるトランスクリプトーム情報を取得して遺伝子発現変動解析とGOエンリッチメント解析を行い、*MGST*の発現変動が特定の反応系に影響を及ぼさない可能性が高いことを示した。また組換えタンパク質実験により*MGST*と雌ずいS因子S-RNaseの相互作用を示した。これらの結果に基づいて、自家不和合性反応における*MGST*の分子機能を考察し、サクラ属に特異な自家不和合性反応の一端を明らかにした。

3. アンチセンス法で花粉側共通因子*MGST*あるいは花粉S因子*SFB*を人為的にサイレンシングすることで、サクラ属の自家不和合性の打破に初めて成功した。アンチセンス法による自家不和合性の制御実験例は皆無であったが、‘Cristobalina’における自家和合化が*MGST*の発現減少に起因することに基づいて、アンチセンス法の適用を行うことで、未だ成功例のなかったサクラ属自家不和合性の人為打破に成功した。遺伝子組み換えに該当しない簡便な手法による自家和合化は、将来的な実用価値も高い。

以上のように、本研究はサクラ属果樹の自家不和合性共通因子*MGST*を同定するとともに、*MGST*とS-RNaseの相互作用を示し、サクラ属に特異な自家不和合性反応の一端を明らかにした。また*MGST*あるいは*SFB*をサイレンシングした花粉を受粉することで自家不和合性の人為打破にも成功している。本研究は、サクラ属に特異な自家不和合性反応機構の解明とその人為制御にむけて重要な知見を与えたものであり、果樹園芸学、育種学、植物遺伝学、植物生理学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和3年2月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)