

氏 名	いけ だ かず お 生
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2666 号
学位授与の日付	平 成 20 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	カンカオウトウ (<i>Prunus avium</i> L.) の配偶体型自家不和合性に関与する花粉側因子の同定とその園芸的利用に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 米 森 敬 三 教 授 矢 澤 進 教 授 谷 坂 隆 俊

論 文 内 容 の 要 旨

カンカオウトウ (*Prunus avium* L.) は配偶体型自家不和合性を示す。この自家不和合性形質はカンカオウトウの栽培を行う上で大きな障壁となっており、古くから自家和合性形質の付与が育種目標の大きな柱の一つになっている。カンカオウトウの示す配偶体型自家不和合性反応は、S 遺伝子座に座乗する雌ずい S 遺伝子と花粉 S 遺伝子によって制御されている。しかし、雌ずい S 遺伝子産物は S-RNase と呼ばれるリボヌクレアーゼであることが明らかになっている一方、花粉 S 遺伝子については遺伝子そのものがこれまで未同定であった。本論文は、カンカオウトウの S 遺伝子座領域の解析を行い、未同定の花粉 S 遺伝子を同定し、さらに花粉側変異体の解析を通じて得られた知見に基づいて、カンカオウトウで和合・不和合を決定するための自己・非自己認識の分子メカニズムを考察するとともに、自家和合性個体判別のための分子マーカーを作出することを目的としたものであり、以下の 6 章よりなっている。

第 1 章ではカンカオウトウ ‘佐藤錦’ (ハプロタイプ S^3S^6) の S^6 -RNase 周辺領域の塩基配列を解析することによって、 S^6 -RNase の約 400bp 下流に 1 つの Open Reading Frame (ORF) を発見した。この S 遺伝子座に座乗している ORF は、26S プロテアソーム系によるタンパク質分解に関わる F-box タンパク質をコードし、花粉特異的な発現とハプロタイプ特異的な配列多様性を示したため、花粉 S 遺伝子である可能性がきわめて強いことを示し、この遺伝子を *Pa-SFB*⁶ (*Prunus avium* S haprotype-specific F-box protein gene) と命名した。

第 2 章では *Pa-SFB* から推定されるタンパク質の一次構造を解析し、*Pa-SFB* がカンカオウトウの花粉 S 遺伝子であるかどうかを検討した。すなわち、前章で単離した *Pa-SFB*³ と *Pa-SFB*⁶ に加え、*Pa-SFB*¹, *Pa-SFB*², *Pa-SFB*⁴, *Pa-SFB*⁵ をクローニングし、データベース上に報告されているアーモンドとウメの SFB 配列を加えて SFB の一次構造の解析を行い、ユビキチン/26S プロテアソームタンパク質分解系に必須である F-box モチーフ領域の保存性が非常に高いことを示した。さらに、SFB に存在する可変領域 (V1 と V2) と超可変領域 (HVa と HVb) が S-RNase との分子間認識反応に関わっていることを示唆し、*Pa-SFB* がカンカオウトウの花粉 S 遺伝子である可能性を強く支持した。

第 3 章では、‘NY54’ (S^2S^6) と ‘Emperor Francis’ (S^3S^4) の F₁ 集団 511 個体の花粉 S 候補遺伝子座と雌ずい S 遺伝子座の遺伝子型を決定し、全ての個体で両遺伝子座の遺伝子型が一致しており、両遺伝子間で組み換えが生じていないことを示した。この結果は *Pa-SFB* と S-RNase が座乗する領域で組み換えが抑制されていることを示唆するものであり、*Pa-SFB* が花粉 S 遺伝子であることに矛盾していなかった。

第 4 章では花粉側認識機構に変異が生じ自家和合化している S^4 ハプロタイプと自家不和合性である S^4 ハプロタイプとを比較し、 S^4 ハプロタイプの SFB に 4 塩基の欠失が存在することを明らかにした。また、この 4 塩基の欠失によるフレームシフトにより新たに生じた終止コドンのため、*SFB*⁴ にコードされる SFB⁴ はハプロタイプ特異的な超可変領域を欠損していることを示し、カンカオウトウの自家不和合性機構における自己・非自己認識の分子メカニズムを考察した。

第 5 章では自家和合性 S^4 ハプロタイプを判別するための分子マーカーを開発し、その有効性を検討した。 S^4 ハプロタイ

ブの $SFB^{4'}$ に存在する 4 塩基欠損部位に制限酵素認識部位を埋め込むように設計した dCAPS プライマーセットを開発し、これを用いた PCR 増幅断片の制限酵素処理後の電気泳動が、 S^d と $S^{4'}$ ハプロタイプの判別に有効であることを示した。

第 6 章では本研究結果を総合的に考察し、単離した $Pa-SFB$ が花粉側 S 遺伝子であることを例証するとともに、開発した PCR マーカーが現在得られている自家和合性 $S^{4'}$ ハプロタイプを交雑親とする自家和合性カンカオウトウの育種計画において、きわめて有用であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

カンカオウトウ (*Prunus avium* L.) は配偶体型自家不和合性を示し、栽培上の大きな障壁となっている。この配偶体型自家不和合性反応は、S 遺伝子座に座乗する雌ずい S 遺伝子と花粉 S 遺伝子によって制御されているが、雌ずい S 遺伝子産物は S-RNase であることが明らかになっているものの、花粉 S 遺伝子については遺伝子そのものが未同定であった。本論文は、カンカオウトウの未同定の花粉 S 遺伝子を同定し、カンカオウトウで和合・不和合を決定するための自己・非自己認識の分子メカニズムを考察するとともに、自家和合性個体判別のための分子マーカーを作出することを目的としたものであり、得られた主要な成果は以下のとおりである。

1. ‘佐藤錦’ (ハプロタイプ S^3S^6) の S^6 -RNase 周辺領域の解析から、 S^6 -RNase の約 400bp 下流に Open Reading Frame (ORF) を発見し、この ORF が 26S プロテアソーム系のタンパク質分解に関わる F-box タンパク質をコードしていることを示した。また、この ORF を $Pa-SFB^6$ (*Prunus avium* S haprotype-specific F-box protein gene) と命名し、この遺伝子が花粉 S 遺伝子である可能性がきわめて高いことを示した。
2. クローニングした $Pa-SFB^1$, $Pa-SFB^2$, $Pa-SFB^3$, $Pa-SFB^4$, $Pa-SFB^5$, $Pa-SFB^6$ から推定されるタンパク質の一次構造を解析し、F-box モチーフ領域の保存性が非常に高いことを示した。さらに、SFB には可変領域 (V1 と V2) と超可変領域 (HVa と HVb) が存在し、この領域が S-RNase との分子間認識反応に関わっている可能性を示唆した。
3. ‘NY54’ (S^2S^6) と ‘Emperor Francis’ (S^3S^4) の F₁ 集団 511 個体の花粉 S 候補遺伝子座と雌ずい S 遺伝子座の遺伝子型を決定し、両遺伝子座間で組み換えが生じていないことを示した。
4. 花粉側認識機構に変異が生じ自家和合化した $S^{4'}$ ハプロタイプと自家不和合性である S^d ハプロタイプとを比較し、 $S^{4'}$ ハプロタイプの SFB に 4 塩基の欠失が存在することを明らかにするとともに、この欠失のために SFB^{4'} はハプロタイプ特異的な超可変領域を欠損していることを示した。
5. 自家和合性 $S^{4'}$ ハプロタイプを判別するための分子マーカーとして、 $S^{4'}$ ハプロタイプの SFB^{4'} に存在する 4 塩基欠損部位に制限酵素認識部位を埋め込むように設計した dCAPS プライマーセットを開発し、これを用いた PCR 増幅断片の制限酵素処理によって、 S^d と $S^{4'}$ ハプロタイプの判別が可能であることを示した。

以上のように、本論文はこれまで未同定であったカンカオウトウの配偶体型自家不和合性反応に関与する花粉側候補遺伝子を同定し、この遺伝子の花粉 S 遺伝子としての高い可能性を示すとともに、実際の育種計画において利用可能な自家和合性個体判別のための分子マーカーを作出したものであり、果樹園芸学並びに果樹の育種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、平成 19 年 12 月 20 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。