

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                  |    |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 博士（農学）                                                                                                                                                                           | 氏名 | 松本 大生 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Molecular Biological Studies on the F-box Proteins Encoded by Genes Linked to the <i>S</i> Locus in <i>Prunus</i> .<br>(サクラ属の <i>S</i> 遺伝子座に連鎖した遺伝子がコードするF-boxタンパク質に関する分子生物学的研究) |    |       |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                  |    |       |
| <p>バラ科サクラ属果樹は配偶体型自家不和合性を示す。この自家不和合性は、サクラ属果樹を営利栽培する上での大きな障壁であり、その分子機構の解明は園芸学上極めて重要な課題である。バラ科サクラ属果樹の自家不和合性は<i>S</i>遺伝子座に座乗する2種類の遺伝子、すなわち雌ずい<i>S</i>遺伝子である<i>S-RNase</i>と花粉<i>S</i>遺伝子であるF-box遺伝子（<i>SFB</i>；<i>S haplotype-specific F-box protein</i>）によって制御されることが示されている。一方、サクラ属果樹では、和合花粉内において<i>S-RNase</i>を無毒化する機能を持つgeneral inhibitorの存在が示唆されているものの、その実体は同定されていない。本論文は、花粉発現F-boxタンパク質である<i>SFB</i>の特性を分子生物学的に調査し、<i>SFB</i>がSkp1-Cullin1-F-box protein (SCF) 複合体を形成して機能することで自家不和合反応を引き起こしている可能性、ならびに和合花粉内において<i>S-RNase</i>の無毒化を担うgeneral inhibitorとして自家不和合性機構に関与していると考えられるタンパク質同定の可能性について検討したものであり、論文は以下の2章よりなっている。</p> <p>第1章では、<i>SFB</i>がSCF複合体形成能を有するかどうかを明らかにする目的で、<i>SFB-S<sup>6</sup></i>のF-boxドメインをベイトとした酵母ツーハイブリッド（Y2H）スクリーニングにより、<i>SFB</i>と結合するSkp1様タンパク質の探索を行い、<i>SFB</i>と結合するSkp1様タンパク質<i>SFB-interacting Skp1-like 1</i>（SSK1）を単離した。SSK1は花粉で強く発現しており、さらに<i>SFB-S<sup>3</sup></i>および<i>SFB-S<sup>6</sup></i>の組換えタンパク質と結合したことから、<i>SFB</i>は花粉管内でSSK1と複合体を形成することを推定した。一方、モメゲノムデータベースを利用して2種類のCullin1様遺伝子<i>Cullin1-like A</i>（<i>Cul1A</i>）と<i>Cullin1-like B</i>（<i>Cul1B</i>）を単離した。<i>Cul1A</i>と<i>Cul1B</i>はともに花粉で発現し、SSK1と結合することを明らかにし、さらに、SSK1を発現させた形質転換タバコを用いたプルダウンアッセイにより、<i>SFB</i>がSSK1を介してタバコCul1様タンパク質と結合することを明らかにした。これらの結果より、<i>SFB</i>はSCF複合体形成能を有しており、自家不和合反応においてタンパク質の分解誘導を行っていることを示唆した。</p> <p>第2章では、サクラ属果樹でその存在が示唆されている、和合花粉内において<i>S-RNase</i>を無毒化する機能を持つgeneral inhibitorとして機能するタンパク質を同定することを目的として、DNAプロット解析によりgeneral inhibitor候補遺伝子の多型および変異を調査した。次にそれらの候補遺伝子がコードするタンパク質のSSK1結合能を検討し、それらタンパク質は花粉管内でSSK1と複合体を形成する可能性を示した。さらに、SSK1を発現させた形質転換タバコを用いたプルダウンアッセイにより、これらタンパク質の一部はSSK1を介してタバコCul1様タンパク質と結合する</p> |                                                                                                                                                                                  |    |       |

ことを示し、それらはSCF複合体形成能を持つことを明らかとした。また、これらタンパク質と $S^{1, 3, 4, 6}$ -RNaseとの結合を調査し、 $S^2$ -RNaseのみに結合するもの、全てのS-RNaseと結合するもの、どのS-RNaseとも結合しないものがあることを示した。以上の結果は調査したタンパク質がgeneral inhibitorとして機能する可能性を示唆している。

(論文審査の結果の要旨)

バラ科サクラ属果樹の自家不和合性はS遺伝子座に座乗する雌ずいS遺伝子のS-RNaseと花粉S遺伝子のF-box遺伝子 (SFB ; *S haplotype-specific F-box protein*) によって制御されているとされる。さらにサクラ属果樹では、和合花粉内においてS-RNaseを無毒化する機能を持つgeneral inhibitorの存在が示唆されている。本論文は、サクラ属の自家不和合性分子機構の解明にむけて、SFBの特性を分子生物学的に調査したもので、得られた主要な成果は以下のとおりである。

1. SFBと結合するSkp1様タンパク質の探索を行い、Skp1様タンパク質SFB-interacting Skp1-like 1 (SSK1) を単離した。また、SFB-S<sup>3</sup>およびSFB-S<sup>6</sup>の組換えタンパク質を作製することで、これらがともにSSK1と結合することを明らかにし、SFBは花粉管内でSSK1と複合体を形成できる可能性を示した。さらに、2種類のCullin1様遺伝子、*Cullin1-like A* (Cul1A)と*Cullin1-like B* (Cul1B)を単離し、Cul1AとCul1BはともにSSK1と結合することを示すことで、SFBはSkp1-Cullin1-F-box protein (SCF)複合体形成能を有し、自家不和合反応においてタンパク質の分解誘導を行っていることを示唆した。
2. DNAブロット解析により、general inhibitor候補遺伝子の多型および変異を明らかにした。また、それらの遺伝子がコードするタンパク質のSSK1結合能を調査し、これらのタンパク質が花粉管内でSSK1と複合体を形成して機能する可能性を示した。さらに、SSK1を発現させた形質転換タバコを用いたプルダウンアッセイにより、一部のタンパク質はSSK1を介してタバコCul1様タンパク質と結合することを示した。一方、S-RNaseとの結合を調査することで、S-RNaseと結合するもの、いずれのS-RNaseとも結合しないものがあることを示し、これらのタンパク質はSCF複合体形成を介してS-RNaseの分解誘導を行う主要なgeneral inhibitorとして機能している可能性を示唆した。

以上のとおり、本論文は、自家不和合性反応に関与する花粉側タンパク質SFBの分子生物学的特性を明確にするとともに、これまで未同定であったサクラ属果樹のgeneral inhibitorとして機能する可能性のあるタンパク質の存在をはじめて明らかにしたものであり、果樹園芸学、果樹生理学並びに果樹育種学の発展に寄与するところが多い。

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25年1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。

要旨公開可能日： 2013 年 6 月 15 日以降