

研究紹介

バラ科植物の自家不和合性の分子機構

牛島 幸一郎

(応用植物機能学講座)

Molecular Mechanism of the Self-incompatibility in the Rosaceous Species

Koichiro Ushijima

(Department of Applied Plant Science)

Self-incompatibility (GSI) in the rosaceous species is controlled by the *S* locus consisting of S-RNase gene and an unidentified 'pollen *S*' gene. A~200kbp of cosmid contig for the *S*^c haplotype of almond was constructed. Genomic Southern blot analyses showed that most cosmid end probes, except those near the *S*^c-RNase gene, cross-hybridized with DNA fragments from different *S* haplotypes. This suggests that regions away from the *S*^c-RNase gene can recombine between different *S* haplotypes, implying that the cosmid contig extends to the borders of the *S* locus. A~70kbp segment of the *S*^c haplotype, the *S* haplotype-specific region containing the S-RNase gene, was completely sequenced. This region was found to contain two pollen-expressed F-box genes that are likely candidates for pollen *S* genes. One of them, named *SFB* (*S* haplotype-specific F-Box protein), was specifically expressed in pollen, and showed high level of *S* haplotype-specific sequence polymorphism, comparable to that of the S-RNases. The other is unlikely to determine the *S* specificity of pollen, because it showed little allelic sequence polymorphism and was expressed also in pistil. Three other *S* haplotypes were cloned and the pollen-expressed genes were physically mapped. In all four cases, *SFBs* were physically linked to the S-RNase genes, and were located at the *S* haplotype-specific region, where recombination is considered to be suppressed, suggesting that the two genes are inherited as a unit. These features are consistent with the hypothesis that *SFB* is the pollen *S* gene. This hypothesis predicts involvement of the ubiquitin/26S proteasome proteolytic pathway in the RNase-based SI system.

Key words : self-incompatibility, S-RNase, SFB, F-box protein, ubiquitin proteasome proteolytic pathway

花粉が同じ花の雌ずいに付着（自家受粉）すると、雌ずいが「自己」花粉を認識・拒絶し、受精に至らないという現象が自家不和合性として知られている¹⁾。自家不和合性は植物が近親交雑を避け、集団の遺伝的多様性を保つための機構の1つである。遺伝学的には単一の遺伝子座 (*S* 遺伝子座) に座乗する複対立遺伝子の作用によって説明でき、花粉と雌ずいの *S* 対立遺伝子が一致すると、雌ずいが花粉を「自己」花粉と認識して花粉管の発芽や伸長を阻害する。しかし近年、突然変異体や形質転換体の解析から、花粉と雌ずいの自家不和合性の表現型は、*S* 遺伝子座領域に座乗し完全に連鎖した2つの異なる遺伝子 (花粉 *S* 遺伝子, 雌ずい *S* 遺伝子) によって決定されていることが明らかになった。現在では、花粉 *S* 遺伝子と雌ずい *S* 遺伝子の組を指してハプロタイプと呼んでいる²⁾。

S 遺伝子座は植物で最も多型に富んだ遺伝子座で、1つの種の中で50以上ものハプロタイプの存在が報告されている場合もあり、非常に多様なハプロタイプがどのように分化したかに対して大きな関心が持たれてきた。また、自家不和合性は植物における最も代表的な細胞間認識反応で、免疫系を持たない植物で、どのような分子機構によって花粉の自己と非自己の認識がなされているのかは古くからの関心事であった。さらに、自家不和合性を示すバラ科果樹の多くは種子や果実を生産物とするために、その受精を制御することは農業生産上重要なことである。このように、自家不和合性研究は理学的意義と農学的意義の二面性を持つため多くの研究者の研究対象となってきた。

バラ科植物の雌ずい *S* 遺伝子はナス科植物やキンギョソウと同じ S-RNase と呼ばれる RNA 分解酵素である。S-RNase は花柱特異的に発現しており、*S* ハプロタイプ特異的な配列多様性を示す。RNA 分解活性を有することから、S-RNase は花柱内を伸長する花粉管内に進入し花粉の RNA を分解して花粉管伸長を阻害すると考えられている²⁾。花粉 *S* 遺伝子は染色体上で S-RNase 遺伝子の近傍に存在するため染色体歩行で容易に単離が可能であると考えられていたが、研究が始まって10年以上経つが未だに同定されていなかった。これまでは、ナス科植物を中心に花粉 *S* 遺伝子の単離のための試みが行われてきた³⁾。しかし、ツーハイブリットシステム、アフィニティークロマトグラフィー、ディファレンシャルディスプレイ、染色体歩行など様々な手法を利用して花粉 *S* 遺伝子

の単離が試みられてきたが、ことごとく失敗に終わっている。特に染色体歩行はもっとも確実な方法として期待されていたが、ナス科植物は染色体歩行を行うのに不利な性質（巨大なゲノムサイズ、 S 遺伝子座が動原体近傍に存在）を備えているため、他の科の植物を材料とした解析が求められていた。

本研究ではバラ科植物であるアーモンドのゲノムライブラリーを作成して染色体歩行を行い、 S 遺伝子座領域を200 kbp以上にわたってカバーするコンティグを構築した。コンティグを構成するクローンの解析から、約70 kbpの範囲に花粉 S 遺伝子が存在することを明らかにし、その中に S ハプロタイプ特異的な配列多様性を示す F-box 遺伝子を見出した。変異体の解析などからこの F-box 遺伝子が花粉 S 遺伝子である可能性を検討した。

アーモンド S 遺伝子座の構造的特徴

アーモンド品種 Nonpareil ($S^c S^d$) からコスミドライブラリーを構築し、 S^c -RNase 遺伝子を起点とする染色体歩行を行った。その結果、12のクローンからなるアーモンド S^c ハプロタイプを約200 kbpに渡ってカバーするコスミドコンティグが構築された (Fig. 1)⁴⁾。これは、当時としては S 遺伝子座をカバーするコンティグとして最長のものであった。各コスミドクローンの末端や内部配列をプローブとしてゲノミックサザンブロット解析を行ったところ S^c ハプロタイプ特異的なバンドもしくは

ゲノムに散在すると思われる繰り返し配列に結合したスメアなバンドパターンが得られた。また、NP 79R より上流、NP 182F より下流のプローブは、 S^c 以外のハプロタイプのバンドも検出した。これはプローブが他の S ハプロタイプにクロスハイブリダイゼーションをしている、つまり DNA 配列が異なる S ハプロタイプ間で保存されていることを示している。一方、 S^c -RNase 遺伝子周辺、約70 kbp の領域 (NP 79R と NP 182F の間の領域) に作成したプローブでは S^c ハプロタイプ特異的なバンドか、スメアなバンドしか得られない。これは S -RNase 遺伝子周辺では70 kbp の DNA 配列は異なる S ハプロタイプでは保存されておらずハプロタイプ特異的な配列であることを示すものである。これは、サクラ亜科だけではなくナシやリンゴなどのナシ亜科の S -RNase 遺伝子の近傍で見られる傾向であった。 S -RNase 遺伝子周辺のハプロタイプ特異的な配列に富む領域は、異なる S ハプロタイプ間で DNA 配列の相同性が低いため、組みかえが抑制されていると思われる。逆に、その外側に隣接する領域は DNA 配列の相同性は高く、異なる S ハプロタイプ間で組みかえが起こると考えられる。

自家不和合性の機能の維持のために、花粉と雌ずい S 遺伝子近傍での異なる S ハプロタイプ間の組みかえの抑制は必要不可欠である。アブラナ科植物においても花粉と雌ずい S 遺伝子近傍の DNA 配列は S ハプロタイプ特異的な傾向が強く、 S 遺伝子近傍では組みかえが抑制

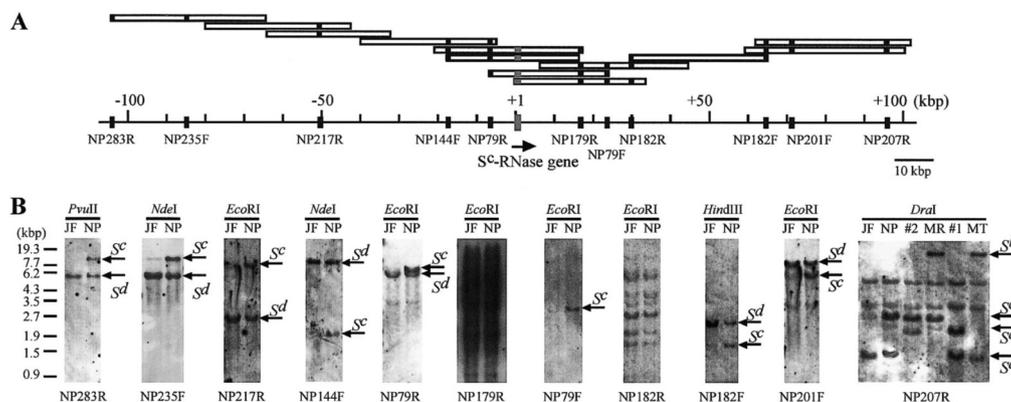


Fig. 1 Construction of a cosmid contig for almond S^c haplotype region and genomic Southern blot analysis with cosmid end probes.

A cosmid library was constructed from the genomic DNA of Nonpareil. The cosmid contig for the S^c haplotype region was constructed by chromosome walking from the S^c -RNase gene to both the upstream and the downstream regions. (A) Schematic representation of the cosmid contig for the S^c haplotype region. The white, black and gray boxes denote the cosmid clones, cosmid end probes used in (B), and the S^c -RNase gene, respectively. The 'A' nucleotide of putative initiation codon (ATG) of the S^c -RNase gene was positioned to be +1. (B) Genomic Southern blot analyses with cosmid end probes and selected restriction enzymes. The genomic DNAs were digested with selected restriction enzymes, which gave the S haplotype-associated RFLP, and probed with cosmid end probes. The four cosmid end probes, NP 201F, 207R, 217R and 235F, were designed from end sequences of the S^d derived clones. Locations of the S^d derived probes on the corresponding S^c derived clones were estimated by PCR with the end primers and the vector primers, WEBF or PWR, and the S^c derived clones as the templates. The restriction enzymes and the cultivars were denoted above the each lane. The arrows of S^a , S^b , S^c and S^d denote the S^a , S^b , S^c and S^d haplotype-associated signals, respectively. JF, Jeffries ($S^m S^d$); NP, Nonpareil ($S^c S^d$); MS, Mission ($S^a S^b$); #2, Sauret no.2 ($S^a S^c$); MR, Merced ($S^b S^c$); #1, Sauret no. 1 ($S^a S^d$); MT, Monterey ($S^b S^d$)

されていると考えられる。従ってアーモンド花粉 S^c 遺伝子は S^c ハプロタイプ特異的な配列に富み、組みかえが抑制されていると考えられる S^c-RNase 遺伝子周辺、約70 kbp の領域に存在する可能性が高いことが示唆された。

花粉 S 遺伝子候補の単離

花粉 S 遺伝子を同定するために花粉 S 遺伝子が存在すると推測される S^c-RNase 遺伝子周辺、約70 kbp の全 DNA 配列をショットガンシーケンシングによって明らかにした⁵⁾。得られた DNA 配列を GENSCAN プログラムで解析したところ12の ORF と推定される配列 (S^c-RNase 遺伝子を含む) が見いだされた。BLAST による相同検索を行ったところ、S^c-RNase 遺伝子の ORF 以外ではレトロトランスポゾン様配列と相同性を示す配列が4つ見いだされた。4つのレトロトランスポゾン様配列は DNA 配列の解読を行った70 kbp の領域の約 1/3 を占めていた。このような DNA 配列の挿入は各々の S ハプロタイプで独自に起きるので、転位因子の挿入により異なる S ハプロタイプ間での DNA 配列の相同性は低くなり異なる S ハプロタイプ間で組みかえが抑制されると考えられる。従って、転位因子の挿入が S 遺伝子座周辺の組みかえの抑制に寄与していることが示唆された。

S-RNase 遺伝子とレトロトランスポゾン以外の ORF の塩基配列からプライマーを作成し、アーモンド品種 'Nonpareil' (S^cS^c) の花粉 RNA を鋳型に 5' および 3' RACE を行ったところ、2つの F-box タンパク質をコードする cDNA が得られた。1つは S^c-RNase 遺伝子の上流側

に位置しており、キンギョソウの S 遺伝子座領域の F-box 遺伝子である SLF (S Locus F-box) と相同性があつたので PdSLF (*Prunus dulcis* SLF) と名付けた。PdSLF は異なる S ハプロタイプ間ではほぼ配列が保存されており、花粉 S 遺伝子ではないものと考えられた。もう一つの F-box 遺伝子は S^c-RNase 遺伝子の下流に位置しており、SFB (S haplotype-specific F-box protein) と名付けた。二つの遺伝子の発現の器官特異性を調べるために、葉および各花器官の RNA を鋳型として RT-PCR を行ったところ、PdSLF は花柱と花粉で発現しているのに対し、SFB は花粉でのみ発現していることが明らかになった。

ゲノム DNA を鋳型とした PCR を行ったところ異なる S ハプロタイプにも SFB が存在していることが明らかになった。配列の比較 (Fig. 2) やゲノムクロンの単離 (Fig. 3) から SFB は以下の5つの特徴を備えていることがわかった。(1)S-RNase 遺伝子に物理的にも遺伝学的にも非常に密接に連鎖している。(2)S ハプロタイプ特異的な配列多様性を示す。(3)花粉特異的に発現している。(4)N末端に F-box モチーフが保存されている。(5)C末端に対立遺伝子間で変異に富む領域 (超可変領域) が存在する。(1)~(3)は、花粉 S 遺伝子およびその産物が備えるべき性質であると考えられていた性質であり、これらすべての性質を備えている SFB は花粉 S 遺伝子である可能性が非常に高いと考えられる。さらに超可変領域のような変異に富むドメインは S-RNase も有しており、自己と非自己花粉の識別に重要な役割を果たしている。このように SFB と S-RNase の間に類似した一次

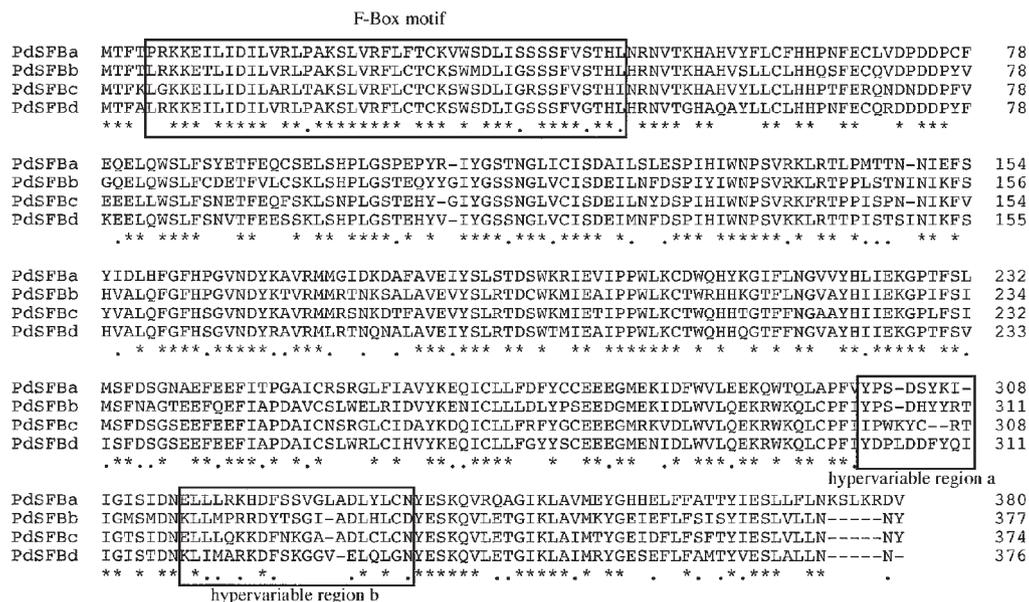


Fig. 2 Alignment of the amino acid sequences of SFBs. Amino acid sequences of SFBs were aligned by Clustal X. F-box motif and two variable regions are boxed. Sites which are conserved or have only conservative replacements are marked underneath with asterisks and dots, respectively.

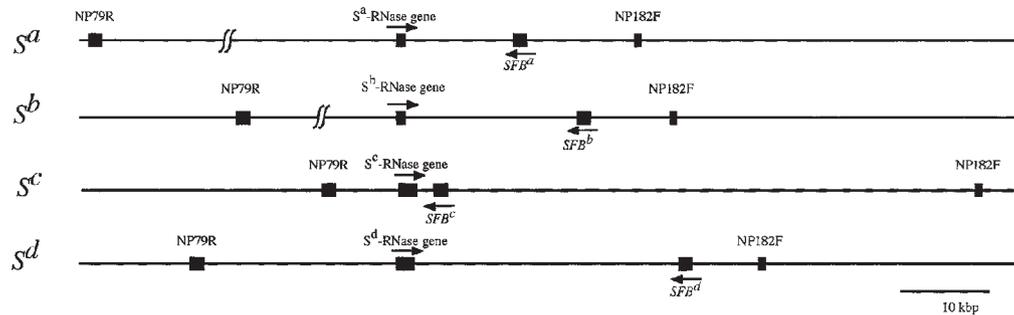


Fig. 3 Gene organization of four S haplotypes of almond.

Boxes represents the exon of the S-RNase genes, *SFBs* and the S locus boundary markers NP 79R and NP 182F. Arrows denote the orientation of the genes. In the *S^a* and the *S^b* haplotypes, physical distance between NP 79R and the S-RNase gene was not determined accurately, although it is certain that NP 79R links to the S-RNase gene.

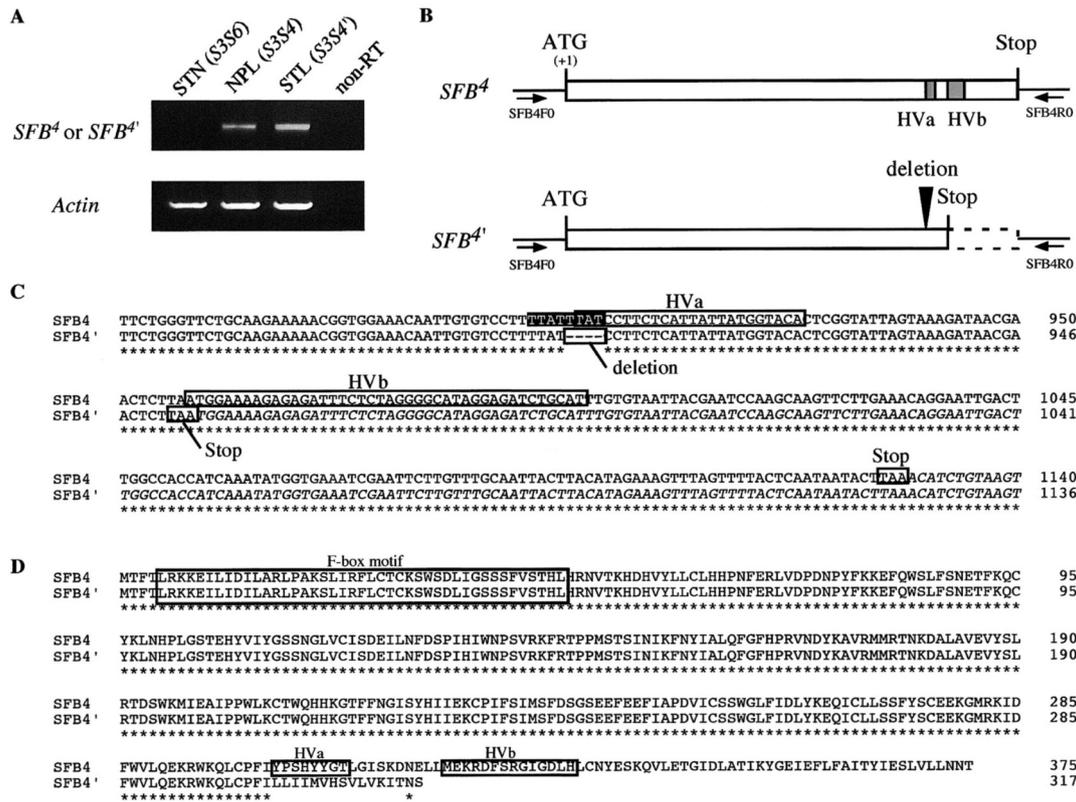


Fig. 4 The mutation in *SFB4'* of sweet cherry.

(A) Expression of *SFB4* and *SFB4'*. Pollen cDNAs were used as template for RT-PCR with primers SFB 4F0 (5'-GTT CAT TCC CAT TGC CCA TTA C-3') and SFB4R0 (5'-TTG TGT TGG ATG AAT TTG ACA T-3'). Total RNA of 'Stella' (lane 'non-RT') was used for a negative control. Actin was used as an internal control. Abbreviations for sweet cherry cultivars are as follows; STN, 'Satonishiki'; NPL, 'Napoleon'; and STL, 'Stella'. (B) Schematic representation of *SFB4* and *SFB4'*. The coding regions are boxed. The 'ATG' and 'Stop' indicate the start and stop codons, respectively. The nucleotide 'A' of the start codon is positioned to be +1. The grey boxes denote HVa and HVb regions. The positions and directions of the primers 'SFB4F0' and 'SFB4R0' are indicated by arrows. (C) Nucleotide sequence comparison of the 3' regions of *SFB4* and *SFB4'*. The characteristic sequences are boxed. The nucleotide sequences of the 3'UTR are italicized. The repeated sequence 'TTAT' around the deletion site are shown in a black box. (D) The amino acid sequence comparison of *SFB4* and *SFB4'*. The F-box motif and the HVa and HVb regions are boxed.

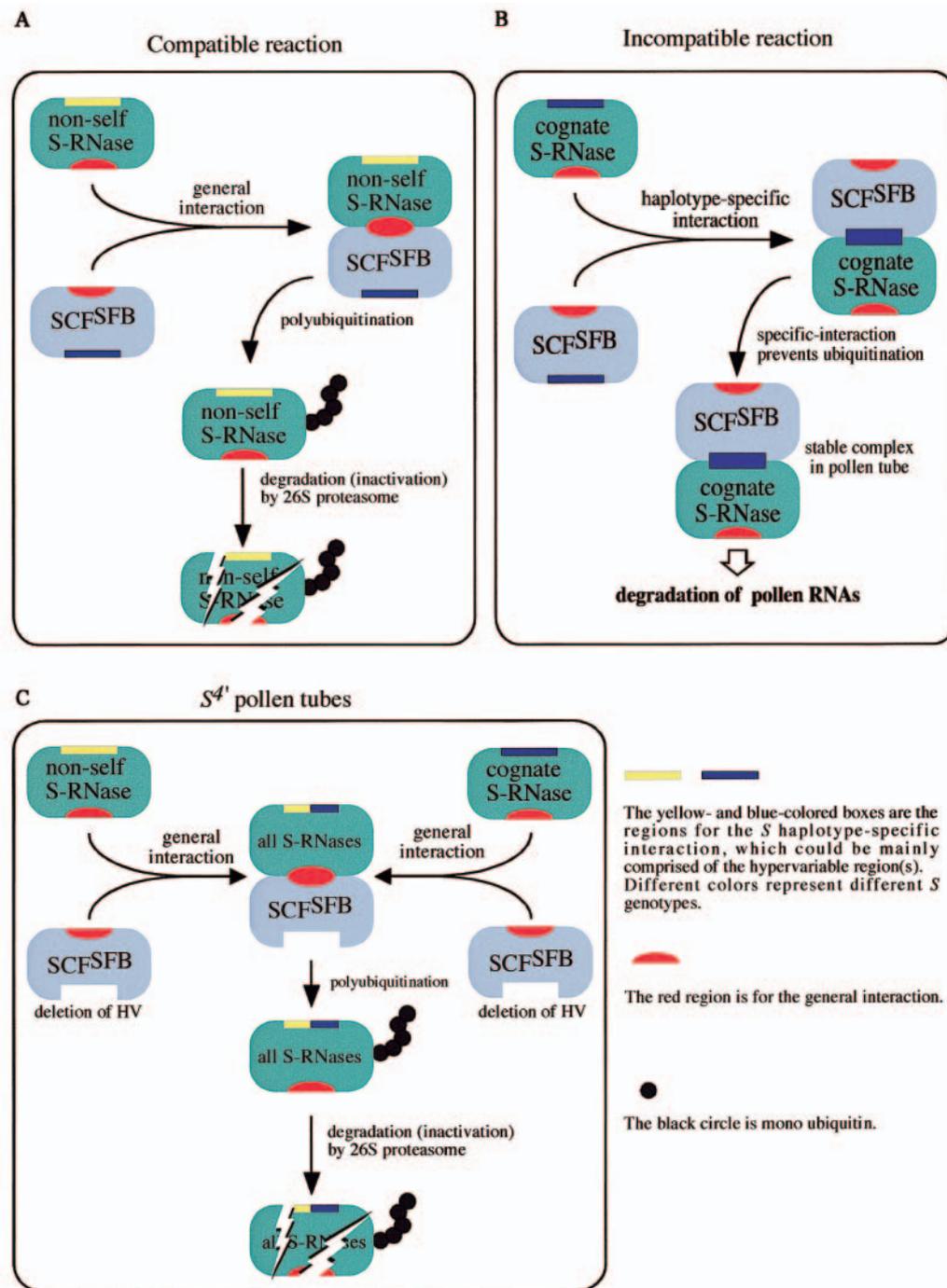


Fig. 5 A model for the mode of S^4 haplotypes.

The haplotype-dependent degradation of S-RNase is assumed to be regulated by SCF^{SFB} and the 26S proteolysis pathway. In this model, all S-RNases enter the pollen tube regardless of their S genotypes. When S-RNases stay active in the pollen tube, they degrade pollen RNAs, which results in the arrest of the pollen tube growth. (A) In the compatible reaction, S-RNases are recognized by the general interaction domain (red color) of SCF^{SFB}, resulting in polyubiquitination and degradation of the S-RNases by the 26S proteasome pathway. (B) In the incompatible reaction, SCF^{SFB} and its cognate S-RNase interact via the haplotype-specific interaction domain, which consists of HV region (s) (blue color). This interaction prevents S-RNase from being polyubiquitinated. As a result, the cognate S-RNase remains active and degrades pollen RNA, which results in the arrest of the pollen tube growth. (C) In S^4 pollen tubes, the absence of the haplotype-specific interaction domain in SCF^{SFB} causes SCF^{SFB} and all S-RNases, including their cognate S-RNases, to interact via the general interaction domains (red color), which results in degradation of all S-RNases. Thus S^4 haplotypes are pollen-part mutant.

構造上の特徴が見られたことは、*SFB* が花粉 *S* 遺伝子であることを裏付ける間接的な証拠の1つとなると考えられる。また、*SFB* のホモログがアーモンドと同じ *Prunus* 属植物で単離されている。これまでに解析された全ての *SFB* ホモログはアーモンド *SFB* が備える上記5つの性質を備えており、このことも *SFB* が花粉 *S* 遺伝子であることを支持するものである。

自家和合性変異体の解析

アーモンドと同じサクラ属植物のオウトウには放射線照射によって *S⁴* ハプロタイプから生じた自家不和合性変異ハプロタイプである *S^{4'}* ハプロタイプが存在する。このハプロタイプでは雌ずい *S* 遺伝子である *S⁴*-RNase 遺伝子には変異がないことや遺伝学的解析から花粉 *S* 遺伝子に変異が起きていると推測されている。そこで、*S^{4'}* ハプロタイプの *SFB* (*SFB^{4'}*) について解析を行った⁶⁾。まず、RT-PCR を行って発現について解析をしたところ、*SFB^{4'}* (野生型) と *SFB^{4'}* の間に変異は見られなかった (Fig. 4)。そこで、塩基配列を解析したところ *SFB^{4'}* には超可変領域をコードする領域の直前に4塩基の欠失が見られた。4塩基の欠失によりフレームシフトが起こるため超可変領域以降の配列が *SFB^{4'}* と *SFB^{4'}* では全く異なるものとなり、*SFB^{4'}* では超可変領域が欠失していることになる。このように、花粉 *S* 遺伝子に変異している変異ハプロタイプで、実際に *SFB* が変異していたことは、*SFB* が花粉 *S* 遺伝子であることを強く支持するものである。

自家不和合性の分子機構

一般に F-box タンパク質は、Skp-1 や Cullin 様タンパク質などと共に、タンパク質の特異的なユビキチン化を触媒する酵素の一種である SCF 複合体を構成する。ユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームによる分解される⁷⁾。F-box タンパク質は SCF 複合体に目的のタンパク質を取り込むレセプターのような役割を担っており、細胞内タンパク質分解の制御を担っている。花粉 *S* 遺伝子の有力な候補である *SFB* が F-box タンパク質をコードしていることは、S-RNase のユビキチン・プロテアソーム系による分解が自家不和合性反応の分子の実体を構成していることを示唆するものである。

花粉管が花柱内を伸長すると、その *S* 遺伝子型にかかわらず全ての S-RNase が花粉管内に進入する。進入してきた S-RNase が活性を維持したままだと花粉管内の

RNA が分解され、伸長が停止してしまう。そこで、*SFB* が S-RNase を認識しユビキチン化、分解することにより、RNase 活性の阻害を行っている。ただし *SFB* は同じ *S* 遺伝子型の S-RNase だけはユビキチン化できないために、自己花粉特異的な伸長阻害が起こってしまうものと考えられる (Fig. 5)⁶⁾。自己の S-RNase の認識に重要な役割を果たしていると考えられるのは超可変領域であり、*SFB* が自己の S-RNase に結合すると超可変領域の作用により S-RNase がユビキチン化されないと考えられている。この仮説は超可変領域を失った *SFB^{4'}* が自家和合性を示すことから支持される。しかし、具体的な超可変領域の作用機構などは解明されておらず、その解明は今後の大きな課題といえる。

引用文献

- 1) de Nettancourt, D. : Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag, Berlin (2001)
- 2) McCubbin, A. G. and T.-H. Kao : Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 333-364 (2000)
- 3) Dowd, P. E., A. G. McCubbin, X. Wang, A. V. Joseph, T. Tsukamoto, T. Ando and T.-H. Kao : Use of *Petunia inflata* as a model for the study of solanaceous type self-incompatibility. *Ann. Bot.*, **85**, 87-93 (2000)
- 4) Ushijima, K., Sassa, H., Kusaba, M., Tao, R., Tamura, M., Gradziel, T. M., Dandekar, A. M. and Hirano, H. : Characterization of the *S*-locus region of almond (*Prunus dulcis*) : analysis of a somaclonal mutant and a cosmid contig for an *S* haplotype. *Genetics*, **158**, 379-386 (2001)
- 5) Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M., Tao, R. and Hirano, H. : Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell*, **15**, 771-781 (2003)
- 6) Ushijima, K., H. Yamane, A. Watari, E. Kakehi, K. Ikeda, N. R. Hauck, A. F. Iezzoni and R. Tao : The *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.*, **39**, 573-586 (2004)
- 7) Deshaies, R. J. : SCF and cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 435-467 (1999)