

# サクラ属果樹の自家不和合性系統選抜マーカーの開発

山根 久代 (京都大学大学院農学研究科)

hyamane@kais.kyoto-u.ac.jp

バラ科サクラ属果樹の多くは配偶体型自家不和合性を示し、このことが栽培や育種を行ううえで大きな障害となっている。自家不和合性認識反応の特異性は、*S* 遺伝子座上で密接に連鎖した雌ずい *S* 遺伝子と花粉 *S* 遺伝子によって制御されていると考えられていたが、その分子実体は長い間、明らかにされていなかった。本研究では、雌ずい *S* 遺伝子および花粉 *S* 遺伝子を明らかにし、得られた情報から *S* 遺伝子型判別のための分子マーカーを開発した。また自家不和合性個体を早期判別するための遺伝子マーカーの開発にも成功した。現在、これらのマーカーは国内外でサクラ属果樹の育種に利用されている。

## はじめに

自家不和合性は植物が進化の過程で種の繁栄のために発達させてきた生命現象の一つであり、ダーウィンが 1876 年に実験的に初めてその存在を示した現象として知られている。木本植物であるサクラ属果樹では、1900 年代初頭に複数の研究者によって、その存在が確認されていた。

サクラ属果樹の自家不和合性は栽培や育種を行ううえで大きな障壁となっている。自家不和合性を有するため、栽培時には授粉樹の混植や人工授粉が必須であり労力を要する。また育種母本の選定の際には *S* 遺伝子型の情報が必要であるが、*S* 遺伝子型の唯一の決定法である交雑試験は単年度の評価が困難で、膨大な労力と時間が必要であり、育種の進展を阻む要因となっていた。

オウトウ、ウメ、スモモなど、バラ科に属するサクラ属果樹の多くが示す配偶体型自家不和合性は、遺伝学的には単一遺伝子座に支配される単純かつ明解なものとされてきた。交雑試験や変異体を用いた解析により、サクラ属の自家不和合性は、*S* 遺伝子座上で組換えが生じないほど密接に連鎖した雌ずい *S* 遺伝子と花粉 *S* 遺伝子によって制御されていることが推定されていたが、原因遺伝子は特定されていなかった。そこで本研究では、サクラ属果樹における自家不和合性の雌ずい *S* 遺伝子と花粉 *S* 遺伝子の同定を試みた。

## サクラ属果樹の自家不和合性雌ずい *S* 遺伝子 (*S*-RNase 遺伝子) の同定

*S* 遺伝子型が既知の品種が比較的多く存在するオウトウを材料に、雌ずいタンパク質を抽出しプロテオーム解析手法によって *S* 対立遺伝子と挙動をともしするタンパク質スポットを検出した。このタンパク質をコードする全長 cDNA をクローニングし、キャラクタライズを進めた結果、このタンパク質スポットは T2/*S*-RNase superfamily に属する RNase 活性を有するタンパク質 (*S*-RNase) であることが明らかになった。すなわちオウトウの自家不和合性には雌ずい細胞外タンパク質である *S*-RNase が関与することが示された。続いて、オウトウと近縁なサクラ属果樹であるウメやスモモの自家不和合性にも、*S*-RNase が関与することを明らかにした。

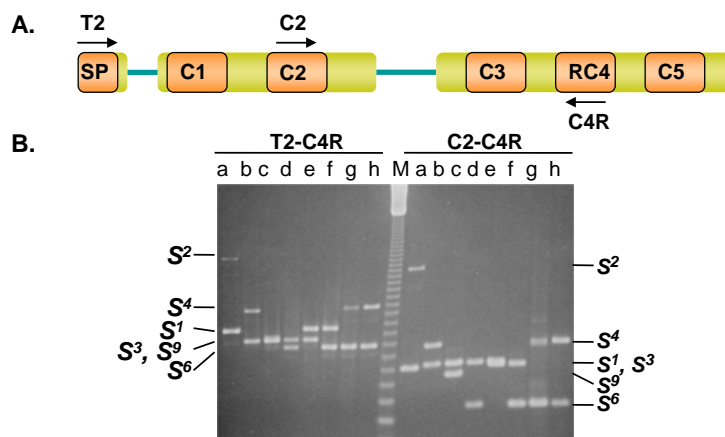
## サクラ属果樹の自家不和合性花粉 *S* 遺伝子 (*S*FB 遺伝子) の同定

*S*-RNase 依存型配偶体型自家不和合性を示す植物は、バラ科サクラ属果樹以外にもナス科やオ

オバコ科で知られていたが、*S-RNase* との認識反応を担う花粉 *S* 遺伝子については長らく不明であった。2003 年から 2004 年にかけて、これら 3 つの科において花粉側 *S* 遺伝子の同定が相次ぎ、いずれも F-box モチーフを有する F-box タンパク質であることが明らかとなった。本研究においても、ポジショナルクローニングや PCR の手法を用いて、2003 年にオウトウやウメより自家不和合性花粉 *S* 遺伝子 [*S haplotype-specific F-box gene (SFB)*] の単離に成功した。オウトウやウメの *SFB* は、*S* 対立遺伝子特異的な配列多様性を有し、花粉で特異的に発現しており、後述するように自家和合性個体において *SFB* の欠損変異が確認されたことから、花粉 *S* 遺伝子としてふさわしい特徴をもっていると考えられた。

### サクラ属果樹の *S* 遺伝子型早期判別法の確立

従来からの *S* 遺伝子型の唯一の決定法である交雑試験は単年度での評価が困難で、膨大な労力と時間を必要とするものであった。本研究では、*S* 遺伝子型を早期に簡便に判別可能な DNA マーカーの開発を試みた。サクラ属果樹の *S-RNase* は種間においても高度に保存されている領域があるため、その領域を利用してプライマーを設計し、コード領域内部に位置する 2 つのイントロン長の違いによる増幅鎖長の違いをもとにした *S* 対立遺伝子のタイピングシステムを確立した。PCR 増幅バンドパターンは既知の *S* 遺伝子型と対応しており (第 1 図)、*S* 遺伝子型が未知の品種における *S* 遺伝子型判別あるいは新規 *S* 対立遺伝子の発見が可能であった。このプライマーは、サクラ属果樹コンセンサスプライマーとして国内外で *S* 遺伝子型の判別に利用されている。一方で、花粉 *S* 遺伝子 *SFB* については、*S* 対立遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR による *S* 遺伝子型のタイピングを可能とした。現在では、雌ずい *S* 遺伝子と花粉 *S* 遺伝子の両方を用いた正確で簡便な *S* 遺伝子型の判別による育種の効率化が可能となっている。



第 1 図 オウトウ *S* 遺伝子型の PCR タイピングシステム

オウトウ *S-RNase* は 2 つのイントロンと 3 つのエキソンからなり、保存性の高い領域 (SP, C1, C2, C3, RC4, C5) が存在する (A)。2 つのプライマーセット (T2-C4R, C2-C4R) を用いた PCR (B) により、各 *S* 対立遺伝子に特異的な増幅サイズパターンを読み取ることで、*S* 遺伝子型の特定が可能である。

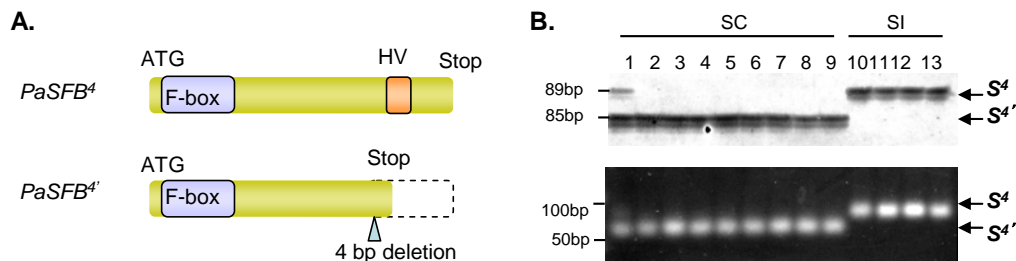
### サクラ属果樹の自家和合性系統選抜マーカーの開発

オウトウやウメでは、大多数の栽培品種が自家不和合性を示すが、自家和合性品種も存在する。寒冷地での果樹栽培では自家和合性品種が適しているため、サクラ属果樹の育種目標のひとつに優良な果実形質をもつ自家和合性品種の作出が挙げられている。

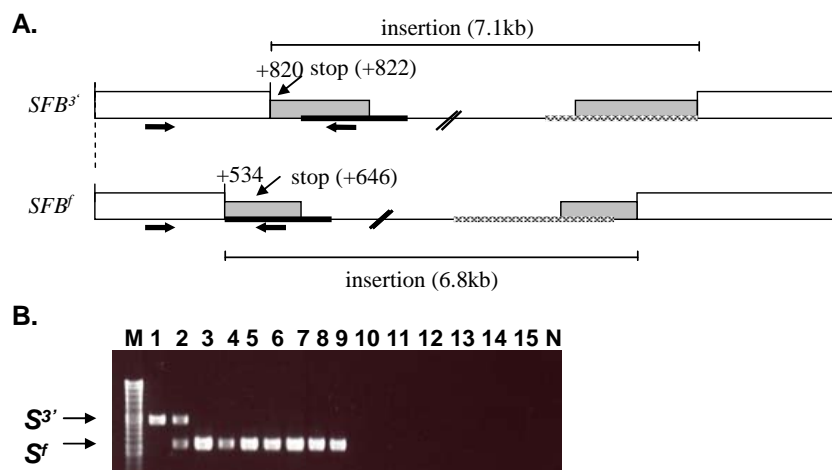
本研究では、花粉へのエクソ線照射により作出された自家和合性系統であり我が国における

自家和合性品種作出のための育種母本となっているオウトウ品種を材料に花粉S遺伝子SFBS<sup>d</sup>について調査をすすめた。その結果、自家和合性を付与するS対立遺伝子であるSFBS<sup>d</sup>は、コード領域内で4bpの欠失がみとめられ、フレームシフトにより欠損型SFBSをコードしていることを示唆する結果を得た。この欠失を利用して作製したdCAPSマーカーは、オウトウ自家和合性系統を選抜するためのDNAマーカーとして利用可能であると考えられた(第2図)。

一方、ウメにおいても自家和合性品種のS対立遺伝子を精査し、自家和合性を付与すると考えられる2つの対立遺伝子(S<sup>f</sup>およびS<sup>s</sup>)の同定に成功した。いずれもS-RNaseには大きな変異は認められなかったが、花粉S遺伝子であるSFBSに変異が認められた。SFBS<sup>f</sup>、SFBS<sup>s</sup>の内部には、レトロポゾン様の挿入配列がみとめられ、オウトウの場合と同様に欠損型SFBSをコードしていると考えられた。内部挿入配列はSFBS<sup>f</sup>とSFBS<sup>s</sup>で共通領域があり、その領域を用いたPCRによって、ウメ自家和合性品種群を識別可能なマーカーの作出に成功した(第3図)。



第2図 欠損型SFBSをコードするオウトウ自家和合性S<sup>d</sup>対立遺伝子と自家和合性マーカーの作出  
(A) SFBS<sup>d</sup>は4bpの欠失がみられ、正常型SFBSが有する超可変領域(HV)を欠損している  
(B) S<sup>d</sup>対立遺伝子を一時的に増幅可能な、オウトウ自家和合性系統選抜のためのdCAPSマーカー  
[SC:自家和合性、SI:自家不和合性]



第3図 欠損型SFBSをコードするウメ自家和合性S<sup>s</sup>およびS<sup>f</sup>対立遺伝子と自家和合性マーカーの作出  
(A) SFBS<sup>s</sup>あるいはSFBS<sup>f</sup>には約7kbの挿入がみられ、フレームシフトが生じている  
(B) S<sup>s</sup>およびS<sup>f</sup>遺伝子を同時に増幅可能なウメ自家和合性系統選抜マーカー  
[自家和合性系統:1~9、自家不和合性系統:10~15、M:分子量マーカー、N:ネガティブコントロール]

## 謝辞

日本農学進歩賞の授賞にあたっては、園芸学会および京都大学大学院農学研究科長・遠藤 隆教授よりご推薦を賜りました。関係の先生方に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたって、終始懇切なるご指導と激励をいただきました京都大学大学院農学研究科・田尾龍太郎准教授に深く感謝いたします。また、本研究の推進に有益なご助言をいただきました京都大学大学院農学研究科・杉浦 明名誉教授、米森敬三教授、研究手法に関して適切なお教示をいただきました千葉大学大学院園芸学研究科・佐々英徳准教授、岡山大学大学院自然科学研究科・牛島幸一郎助教に心より御礼申し上げます。最後に、本研究成果は、筆者とともに研究に取り組んだ京都大学大学院農学研究科果樹園芸学研究室の学生の皆様の力なしでは到底達成できなかったものであり、ここに記して、深く感謝申し上げます。

## 業績リスト

- 1) Yamane, H., R. Tao, and A. Sugiura. 1999. Identification and cDNA cloning for S-RNases in self-incompatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Sordum). *Plant Biotechnology* 16: 389 - 396.
- 2) Tao, R., H. Yamane, A. Sugiura, H. Murayama, H. Sassa, and H. Mori. 1999. Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124: 224 - 233.
- 3) Yamane, H., R. Tao, H. Murayama, M. Ishiguro, Y. Abe, J. Soejima and A. Sugiura. 2000. Determining S-genotypes of two sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars, 'Takasago (Rockport Bigarreau)' and 'Hinode (Early Purple)'. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 69:29-34.
- 4) Yamane, H., R. Tao, A. Sugiura, N. R. Hauck, and A. F. Iezzoni. 2001. Identification and characterization of S-RNases in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126: 661 - 667.
- 5) Yamane, H., K. Ikeda, K. Ushijima, H. Sassa, and R. Tao. 2003. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Plant Cell Physiol.* 44: 764-769.
- 6) Yamane, H., K. Ikeda, N. R. Hauck, A. F. Iezzoni, R. Tao. 2003. Self-incompatibility (S) locus region of the mutated S<sup>6</sup>-haplotype of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional pollen S allele and a non-functional pistil S allele. *J. Exp. Bot.* 54: 2431-2437.
- 7) Ushijima, K\*, H. Yamane\*, A. Watari, E. Kakehi, K. Ikeda, N. R. Hauck, A. F. Iezooni, and R. Tao. 2004. 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. (\*These authors contributed equally to this work.)
- 8) Hauck, N. R., H. Yamane, R. Tao, and A. F. Iezzoni. 2006. Accumulation of nonfunctional S-haplotypes results in the breakdown of gametophytic self-incompatibility in tetraploid *Prunus*. *Genetics* 172: 1191-1198.
- 9) Yamane, H., K. Fukuta, D. Matsumoto, T. Hanada, G. Mei, T. Esumi, T. Habu, Y. Fuyuhiko, S. Ogawa, H. Yaegaki, M. Yamaguchi, and R. Tao. 2009. Characterization of a novel self-compatible S<sup>3'</sup> haplotypes in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.). *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 78: 40-48.
- 10) Yamane, H. and R. Tao. 2009. Molecular basis of self-(in)compatibility and current status of S-genotyping in rosaceous fruit trees. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 78: 137-157.

## Identification of the self-incompatibility genes and establishment of a molecular typing system for self-compatibility of the fruit tree species of *Prunus*

Hisayo Yamane (Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

hyamane@kais.kyoto-u.ac.jp