

アブラナ科自家不和合性における *S* 遺伝子座の分子遺伝学的解析

渡辺正夫 (岩手大学 農学部)

nabe@iwate-u.ac.jp

アブラナ科植物の自家不和合性は、 F_1 雑種育種をする上で重要な農業形質である。この自家不和合性は、胞子体的に機能する 1 遺伝子座 *S* 複対立遺伝子系によって制御されている。筆者らは、この *S* 遺伝子座上に存在する雌雄の *S* 因子がそれぞれ、レセプター型キナーゼ (*SRK*)、低分子ペプチド (*SP11*) であることを遺伝学的、分子生物学的手法により明らかにした。

はじめに

植物の一生は、種子の発芽、栄養生長を経て、様々な環境要因の影響を受け、開花に至る。その花の葯で成熟した花粉は雌ずいに付着し、花粉管を伸長させ、受精が起こり、次世代の種子形成が起きる。花の構造は種によって多様に分化しているが、被子植物の多くは両性花を有している。両性花は、同一花内に雄ずいと雌ずいが分化するため、自家受粉が行われやすい構造を有している。イネなどのようにこの受粉・受精形態に適応した自殖性植物も少なくない。しかしながら、自家受粉による自殖は、種内の遺伝的多様性を減少させ、自殖弱勢が生じる危険性を伴う。それに対して、種内の遺伝的多様性を維持することにより、多様に变化する環境に適応して、種の保存と繁栄を成し得ることができる。このために、植物は遺伝的多様性を維持する機構として、自家受粉が起こらない様々な機構を発達させてきた。その中でもっとも高度な機構と考えられているのが自家不和合性である。

自家不和合性とは、両性花において雌雄の両生殖器官が正常であるにもかかわらず、自家花粉を自家の雌ずいの先端、柱頭に受粉した場合に、受精に至らない現象をいい、自家の柱頭上で自家(自己)と他家(非自己)の花粉が識別される自他識別機構とも言える(図 1)。この現象は、ダーウィン以前から知られていたが、ダーウィンが植物の持つ不思議な能力として、いくつかの著書にその調査結果を公表したことから、有名になった。この自家不和合性は、クラシカルな遺伝解析から、多くの場合、*S* と名付けた 1 遺伝子座 *S* 複対立遺伝子によって制御されていることがわかった。アブラナ科植物の自家不和合性における *S* 遺伝子の発現様式が親植物での *S* 遺伝子間の関係(優劣性)に依存するという特徴から、アブラナ科植物の自家不和合性は、胞子体型に分類される。現在、アブラナ科野菜の多くでは、この形質を利用した経済的 F_1 採種が行われており、自家不和合性は農業形質としてもきわめて重要である。



図1. 和合、不和合花粉管の様子
他家受粉の場合は、花粉管は柱頭の乳頭細胞に侵入し、伸長が見られる(左)。自家受粉の場合には、花粉管は乳頭細胞に侵入できず、不和合性を示す(右、柿崎智博原図)。

このようなことから、*S* 遺伝子座上にコードされている自家不和合性の自他認識遺伝子の同定、機能解析は、学術的、応用農学的な両面から重要な課題である。そこで、本稿では、アブラナ科自家不和合性制御 *S* 遺伝子座の解析から、雌ずい側、花粉側 *S* 因子の同定、*S* 対立遺伝子間の優劣性発現機構に関して、概説する。

柱頭特異的遺伝子 *SLG*, *SRK* の単離・解析から柱頭側 *S* 遺伝子の同定へ

材料に用いた *Brassica campestris* (syn. *rapa*)には、遺伝学的解析から 100 以上の *S* 対立遺伝子があると推測されている^{1, 2)}。研究開始当初、*S* 遺伝子座上には、*S* 対立遺伝子間で多型性がある糖タンパク質(SLG)が同定されていた。筆者らは、この SLG タンパク質に対応する *SLG* 遺伝子を単離した。さらに、この *S* 遺伝子座上には、もう 1 つの柱頭特異的遺伝子である *S* レセプターキナーゼ(*SRK*)も存在していることを明らかにし、その遺伝子も単離した(図 2)。*SRK* のレセプタードメインは、*SLG* と 80-98%の相同性があった^{3, 4, 5)}。しかしながら、このいずれの遺伝子が柱頭側 *S* 因子であるかを決定することは、2 つの遺伝子が高い相同性を持つため、遺伝子を導入した時に co-suppression が起き、導入した遺伝子が発現しないという問題によって困難を極め、その結論を得ることは世界の主要な研究グループ間の競争となった。筆者らは、まず、*B. campestris* における高率の遺伝子導入系を確立するとともに、*SLG*, *SRK* 遺伝子導入による内在 *SLG*, *SRK* の co-suppression が生じない系統の探索を行った⁶⁾。さらに、内在性のもとは異なる遺伝子型を持つ *SLG*, *SRK* を独立に遺伝子導入し、導入遺伝子を発現させた系統の作出に成功した。その結果、*SRK* 導入により、柱頭側の *S* 遺伝子表現型が変化し、花粉側の表現型には影響を与えないことから、*SRK* が柱頭 *S* 因子であることを世界に先駆けて、証明した。また、*SLG* はその認識反応を補助する因子であることも、明らかにした⁷⁾。



図2. *SLG*, *SRK* 転写産物の検出
SLG をプローブとして、柱頭、葯でのノザン解析を行った。*SLG*, *SRK* のいずれも柱頭特異的に発現していた。

S 遺伝子座ゲノム構造解析から花粉側 *S* 遺伝子の同定とその多型性

花粉側因子の単離同定という命題も世界的競争であった。まず、*SLG*, *SRK* を含む 76-kb のゲノム断片を単離し、*S* 遺伝子座のゲノム構造解析から、*SLG*, *SRK* の周辺には、花粉・葯で発現している遺伝子が多数存在することを明らかにした(図 3)^{8, 9, 10)}。さらに、それらの遺伝子のうち、*S* 対立遺伝子間で

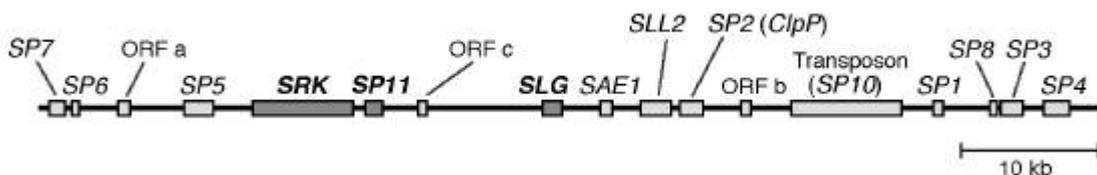


図3. *Brassica campestris* *S*⁹ 系統における *S* 遺伝子座周辺領域の物理地図

多型に富んでおり、発現時期、部位共に花粉側因子としての要件を満たしている *SP11* 遺伝子が、花粉側 *S* 因子であるという正しい推論を行った(図 4)。この *SP11* が花粉側因子である最終的な証明は、遺伝子導入、バイオアッセイを利用した磯貝教授グループとの共同研究により行われ、コーネル大グループと実質的同時期に決定できた。

さらに、10 以上の *SP11* 対立遺伝子を単離・解析し、いずれの *SP11* も *S* 遺伝子座上で *SLG*, *SRK* と物理的に近接した位置にあること、システイン残基に富んだ低分子ペプチドであること、システイン残基は対立遺伝子間で高度に保存されているが、それ以外の部分はきわめて変異に富んでいることを明らかにした(図 5)。また、*SP11* と柱頭側因子 *SRK*、補助因子 *SLG* との共進

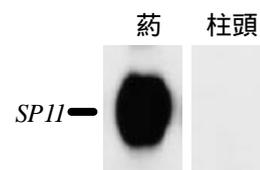


図4. *SP11* 転写産物の検出
SP11 をプローブとして、柱頭、葯でのノザン解析を行った。*SP11* は葯特異的に発現していた。

化が、新しい対立遺伝子を生み出す原動力になっていることを推察した¹¹⁾。

	c1	c2	c3	c4c5	c6c7	c8
SP11-9	IFIV-SSHVQE---VEANLRKT--	GVHRLNSGEGSGKSGQHD-	GEAFVTNKTNQK-AFYCNCTSPFRTRY---	CDCAIK--	CKVR	
SP11-21	IFLIISSHFQ---VEAKP----	GADTF--PEDGRNGGN-ERQAIS	SSYKRRK-ASNCOQRPYDDKKRL--	CDCE----	CK	
SP11-32	IFVV-SIHVQG---VEANPTKL--	GRSVTSRQVQDNSGVQ-RQVTE	SKKIDKDPDL-SCQICRHHGRRF-	CDCE----	CK	
SP11-33	IFVI-SSHVQE---VGANMMNQFL	QRFNRGEGGVSPAD---	GETLTKNKLNEKTASNCTQVRKTGKYARAQCT	CDRLPHK-	CVPR	
SP11-34	LFII-SSHSQE---VEANKVKQ--	FRRLTLTEGVSPGGDKR	GEDYTKNKLNEKTAFNCTQVGSRKHAL--	CTCE	IRRNCPY	
SP11-36	LFVV-SSHVQG---VEANLTKL--	PGNVTSRQVQNSGVQS-	CVTAISKKLHKDRRL-SCCLCKIHEGHRF-	CDCE	CK	
SP11-37	IIIIA-SHFQ-----EANMLKR--	GKSF--PEDGNGNKIV-	GEKSMNAVKKK--AFNCTQDIYILKKDRRI	CKCDLDVHI	CDPL	
SP11-38	IFIV-SSHGQE---VEANLKKN--	KSGRLRSEEGDLGAAL-	GLDSYQATWQTRPAK-CVCSNGRYFGR--	CF	CF	CK
SP11-41	IFIV-SSHGQE---LEAHLMKN--	KADLRLEGGNSRIS-	GETLHDMCRMPSE-CKCSNESDGGR--	CV	YLII	
SP11-45	MFII-SSHGQG---VEADLRKE--	NGYTQLSEPMLGGEA-	CANRYEIRAKKRPS-CNCDVDEVGF--	CH	CSL	CK
SP11-46	IFIV-SGHIQE---VEANPMKQ--	KIGYRMPENAEQAQT-	CENCSRGEKPKPSH-WKCTNGPKNTYS-	CD	CK	
SP11-47	IFIV-SGHIQE---VEANLMP--	DDIFGMEQGGPKT--	CELKYSKGMCKRPPR-CECTNSGKNTYS-	CV	CKL	CK
SP11-48	IFII-SSHVQE---VEANVMKL--	YRKRTFDVPEVKPENKH-	GEDLTKKDLKEITAYNCTQVKLYSKSG--	CT	CKLGRK-	CDPRHFF
SP11-49	IFIV-SSHCQG---VEANLRDE--	LGHVRLSEPQDSEGENA-	GVIRFQRREKKRPS-CGCTNFEGIGR--	CF	-----	CDM
SP11-52	IFIV-SSHAQD---VEANLMNR--	TRELPPEKKGSEEDGG-	GIKLVSSEKKLHPSR-CECEPRYKARF--	CR	CKI	CK

図. 5. *Brassica campestris* 由来 15 S 系統の SP11 推定アミノ酸配列の多重整列

S 対立遺伝子間の優劣性とその発現機構の解明

S 遺伝子の発現が胞子体的に機能することから、S 遺伝子ヘテロ個体では、S 遺伝子間に優劣性が生じる。その優劣性の特徴は、1) 共優性の方が優劣性よりも一般的である、2) 優劣性の関係は、柱頭よりも花粉側で生じることが多い、3) 花粉と柱頭側の優劣性は一致しない、4) 花粉よりも柱頭において non-linear な優劣性関係が生じることが多いという点である¹²⁾。

著者らは、柱頭側の優劣性に関して、SRK 遺伝子導入個体との交配実験から、SRK を導入した個体が、単に柱頭側の S 特異性を発現するだけでなく、優劣性も制御していることを明らかにしている¹³⁾。

おわりに

遺伝学的、分子生物学的手法により、S 遺伝子座の実体、つまり、柱頭側 S 因子、花粉側 S 因子が SRK、SP11 であることを明らかにできた。しかしながら、アブラナ科自家不和合性認識反応の全体像を明らかにしたわけではない。つまり、SRK によって受容された SP11 のシグナルがどのように柱頭内に伝達し、自己花粉の侵入を阻害するのかという点を明らかにする必要がある。さらに、S 対立遺伝子間に見られる優劣性発現機構の解明も重要な課題の 1 つである。

謝辞

本研究は、筆者が東北大学農学部在籍中、日向康吉教授(現岩手生物工学研究所所長)のもとで、東京大学農学部磯貝彰助教授(現奈良先端科学技術大学院バイオサイエンス研究科教授)との共同研究として開始したものであり、研究の機会を与えて頂きました両教授に感謝申し上げますとともに、この研究に携わってきた、盧一燮博士(現韓国順天大学)、高崎剛志博士(現神戸大学農学部)、畠山勝徳博士(現野菜茶業研究所)、鈴木剛博士(現大阪教育大学教育学部)をはじめとする東北大学大学院農学研究科、岩手大学農学部、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、東京大学大学院農学生命科学研究科の多くの共同研究者にあらためてお礼申し上げます。また、筆者らの研究は主として文部科学省科学研究費特定領域研究(植物生殖システム・植物自家不和合性)によって行われました。

引用文献

- 1) Watanabe, M. and K. Hinata 1999. Self-incompatibility. In "Biology of *Brassica* coenospecies". (Eds.: C. Gomez-Campo), Elsevier, Amsterdam, pp149-183.
- 2) Watanabe, M., K. Hatakeyama, Y. Takada and K. Hinata 2001. Molecular aspects of self-incompatibility in *Brassica* species. *Plant Cell Physiol.* 42: 560-565.
- 3) Watanabe, M., T. Takasaki, K. Toriyama, S. Yamakawa, A. Isogai, A. Suzuki and K. Hinata 1994. A high degree of homology exists between the protein encoded by *SLG* and the *S* receptor domain encoded by *SRK* in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Plant Cell Physiol.* 35: 1221-1229.
- 4) Hatakeyama, K., T. Takasaki, M. Watanabe and K. Hinata 1998. Molecular characterization of *S* locus genes, *SLG* and *SRK*, in a pollen-recessive self-incompatibility haplotype of *Brassica rapa* L. *Genetics* 149: 1587-1597.
- 5) Suzuki, G., M. Watanabe, K. Toriyama, A. Isogai and K. Hinata 1995. Molecular cloning of members of the *S*-multigene family in self-incompatible *Brassica campestris*. *Plant Cell Physiol.* 36: 1273-1280.
- 6) Takasaki, T., K. Hatakeyama, K. Ojima, M. Watanabe, K. Toriyama and K. Hinata 1997. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica rapa* L. *Breed. Sci.* 47: 127-134.
- 7) Takasaki, T., K. Hatakeyama, G. Suzuki, M. Watanabe, A. Isogai and K. Hinata 2000. *SRK* determines the *S* specificity of stigma in self-incompatible *Brassica*. *Nature* 403: 913-916.
- 8) Suzuki, G., M. Watanabe, K. Toriyama, A. Isogai and K. Hinata 1997. Direct cloning of the *Brassica S* locus by using a P1-derived artificial chromosome (PAC) vector. *Gene* 199: 133-137.
- 9) Watanabe, M., G. Suzuki, K. Toriyama, S. Takayama, A. Isogai and K. Hinata 1999. Two anther-expressed genes on downstream of *SLG*^o: identification of a novel *S*-linked gene specifically expressed in anthers at the uninucleate stage of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L. *Sex. Plant Reprod.* 12: 127-134.
- 10) Suzuki, G., N. Kai, T. Hirose, K. Fukui, T. Nishio, S. Takayama, A. Isogai, M. Watanabe and K. Hinata 1999. Genomic organization of the *S* locus: Identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of an *S*^o haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* 153: 391-400.
- 11) Watanabe M., A. Ito, Y. Takada, C. Ninomiya, T. Kakizaki, Y. Takahata, K. Hatakeyama, K. Hinata, G. Suzuki, T. Takasaki, Y. Satta, H. Shiba, S. Takayama and A. Isogai 2000. Highly divergent sequences of the pollen self-incompatibility (*S*) gene in class-I *S* haplotypes of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L. *FEBS Lett.* 473: 139-144.
- 12) Hatakeyama, K., M. Watanabe, T. Takasaki, K. Ojima, K. and K. Hinata, K. 1998. Dominance relationships between *S*-alleles in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Heredity* 79: 241-247.
- 13) Hatakeyama, K., T. Takasaki, G. Suzuki, T. Nishio, M. Watanabe, A. Isogai and K. Hinata 2001. The *S* receptor kinase gene determines dominance relationships in stigma expression of self-incompatibility in *Brassica*. *Plant J.* 26: 69-76.

Molecular genetic dissection of the self-incompatibility (*S*) locus in *Brassica* species

Masao Watanabe (Iwate University, Faculty of Agriculture)

nabe@iwate-u.ac.jp